

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia



**ALTERACIONES MITOCONDRIALES Y DE LOS MECANISMOS
AUTOFÁGICOS EN MODELOS EXPERIMENTALES DE LA ENFERMEDAD
DE ALZHEIMER**

TESIS DOCTORAL

MACARENA DE LA CUEVA DE VICENTE

Madrid, 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia



**ALTERACIONES MITOCONDRIALES Y DE LOS MECANISMOS
AUTOFÁGICOS EN MODELOS EXPERIMENTALES DE LA ENFERMEDAD
DE ALZHEIMER**

Memoria para acceder al grado de DOCTOR de:

Macarena de la Cueva de Vicente

Directores:

Eva María Carro Díaz y Fernando Bartolomé Robledo

Afiliación: Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre

Madrid, 2021



Los Drs. EVA MARÍA CARRO DÍAZ y FERNANDO BARTOLOMÉ ROBLEDO investigadores del Laboratorio de Enfermedades Neurodegenerativas del Instituto de investigación del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid,

Certifican que,

Dña. Macarena de la Cueva de Vicente, graduada en Biología, ha realizado bajo su dirección, en el Laboratorio de Neurociencias del Instituto de Investigación del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid, el trabajo titulado: "Alteraciones mitocondriales y de los mecanismos autofágicos en modelos experimentales de la enfermedad de Alzheimer", considerando que reúne los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor.

Madrid a 01 de junio de 2021

VºBº Directora de tesis

VºBº Co-director de tesis

Dra. Eva María Carro Díaz

Dr. Fernando Bartolomé Robledo

Esta tesis ha dado lugar a la siguiente publicación en la que la doctoranda ocupa la posición de primera autora:

- Bartolome F*, **de la Cueva M***, Pascual C, Antequera D, Fernandez T, Gil C, Martinez A, Carro E. Amyloid β -induced impairments on mitochondrial dynamics, hippocampal neurogenesis, and memory are restored by phosphodiesterase 7 inhibition. *Alzheimers Res Ther.* 2018 Feb 20;10(1):24.

Adicionalmente, la doctoranda ha participado en las siguientes publicaciones:

- Ludtmann MHR, Arber C, Bartolome F, **de Vicente M**, Preza E, Carro E, Houlden H, Gandhi S, Wray S, Abramov AY. Mutations in Valosin-Containing Protein (VCP) Decrease ADP/ATP Translocation Across the Mitochondrial Membrane and Impair Energy Metabolism in Human Neurons. *J Biol Chem.* 2017 May 26;292(21):8907-8917.
- Bartolome F, Antequera D, **de la Cueva M**, Rubio-Fernandez M, Castro N, Pascual C, Camins A, Carro E. Endothelial-specific deficiency of megalin in the brain protects mice against high-fat diet challenge. *J Neuroinflammation.* 2020 Jan 14;17(1):22.
- Bartolome F, Krzyzanowska A, **de la Cueva M**, Pascual C, Antequera D, Spuch C, Villarejo-Galende A, Rabano A, Fortea J, Alcolea D, Lleo A, Ferrer I, Hardy J, Abramov AY, Carro E. Annexin A5 Prevents Amyloid- β -Induced Toxicity in Choroid Plexus: Implication for Alzheimer's Disease. *Sci Rep.* 2020 Jun 10;10(1):9391.

Para más detalle ver Anexos.

El trabajo aquí presentado ha sido realizado con cargo a los siguientes proyectos:

Ministerio de Sanidad/Instituto de Salud Carlos III

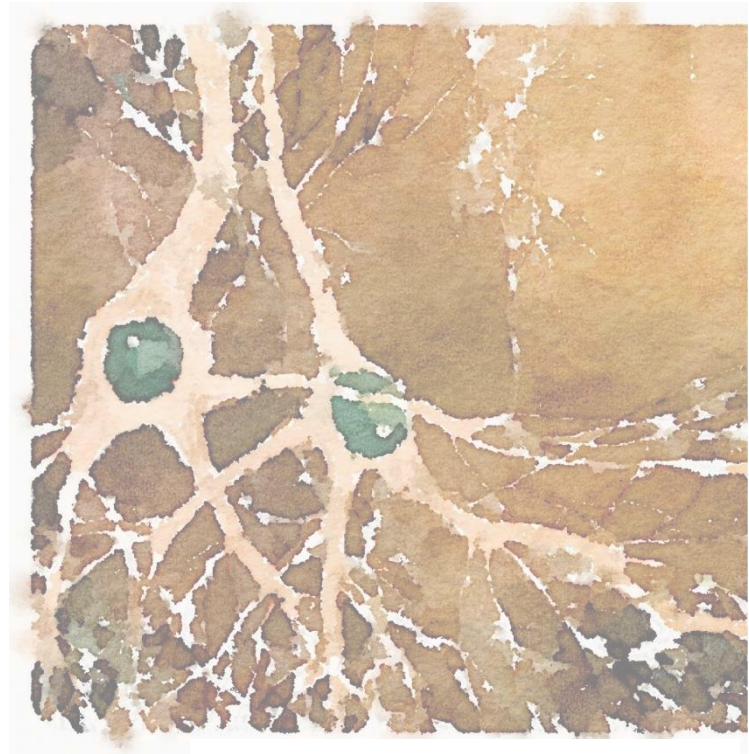
- PI18/00118 (2019-2021): “Validación de la proteína salival Lactoferrina como biomarcador de la enfermedad de Alzheimer: alternativa al diagnóstico y mecanismo patogénico”
- PI15/00780 (2016-2018): “Inflamación periférica como factor de riesgo en la patología de la enfermedad de Alzheimer: nuevas herramientas diagnósticas y dianas terapéuticas”.
- CIBERNED (PI2016/01) (2017-2018): “Alteraciones del metabolismo glucolipídico y desarrollo de la demencia de Alzheimer”.
- PI12/00486 (2013-2015): “Asociación de alteraciones moleculares y funcionales de los plexos coroideos con la severidad, patología y progresión de la enfermedad de Alzheimer”.

Comunidad de Madrid

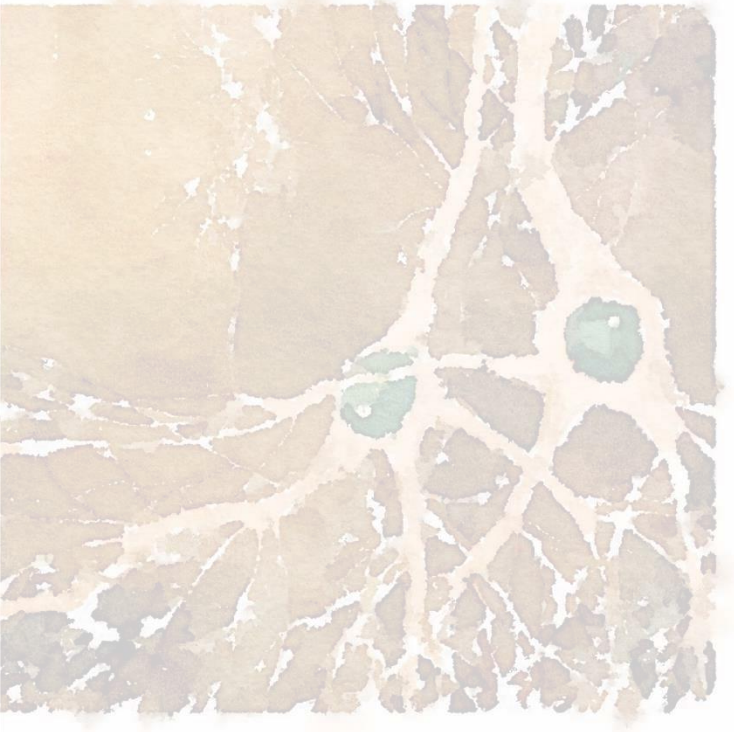
- S2017/BMD-3700 (NEUROMETAB-CM) (2018-2021): “Bases Metabólicas de la Neurodegeneración”.

Por último, la doctoranda ha recibido ayudas de personal del Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (i+12) asociadas a los proyectos de investigación PI18/00118 y PI15/00780.

A Mamá, a Mamabu y a Papam



AGRADECIMIENTOS



Quiero agradecer en primer lugar a Eva y Fernando, mis directores de tesis, por haberme dado la oportunidad de realizar una tesis doctoral, por TODO el tiempo dedicado, los momentos compartidos y por todo lo que he aprendido con vosotros.

A Desi, para ti un párrafo entero y un GRACIAS en mayúsculas, no solo me has enseñado todo lo que sé del laboratorio, me has enseñado a madurar y a crecer como persona. Valoro muchísimo todo el tiempo que me has dedicado, y, en este último año, especialmente tu comprensión, ánimos y ayuda. No solo eres una gran compañera, eres mejor persona y eso me lo llevo a mi casa. GRACIAS por todo lo que hemos vivido juntas.

A Enara y Joana, aunque compartimos poco tiempo tengo un gran recuerdo vuestro. A Marta, me llevo una amiga, gracias por dedicarme siempre un ratito a escucharme y por esas cañas rápidas. A Lauri, ¡qué paciencia has tenido conmigo! Gracias de todo corazón por el apoyo incondicional y por aguantarme, eres una gran amiga. Gracias también porque junto con Marcos me habéis enseñado todo lo que sé de qPCR. Marcos gracias a ti también por tus consejos y tener siempre un rato para fumarnos un piti y ayudarme a seguir adelante. Y por último a toda la gente que ha pasado por el lab durante estos 5 años.

A la gran familia del i+12, gracias al lab de Reuma Manu, Ali, Vane...por hacer más amenas mis comidas, al lab de Porfirias en especial a Ana por dedicarme tu tiempo en enseñarme a secuenciar, al lab de Cardio y a Medicina Regenerativa por los momentos compartidos. A Teresa Onco por tu alegría y ánimos permanentes. A MJP por entenderme siempre. En especial al Súper y a Julita por darle ese toque de calidez a un lugar de trabajo. A Montsina, a día de hoy sigo teniendo pánico a que una rata resucite, pero gracias a ti y a tu tiempo poco a poco lo voy superando. A Jacin y a Adri por esas comidas en la cafetería tan animadas y a Cris Trauma por comprendernos, por escucharme siempre y dedicarme ratitos de tu tiempo.

A Inés, muchas gracias por todo tu tiempo, comprensión y sinceridad. Gracias por todo lo que me has enseñado sobre el mundo de las proteínas. También gracias a JC por dedicar tu tiempo a explicarme los detalles de la genómica.

Y todas aquellas personas que no tengo espacio para nombrar y que en algún momento me dedicaron su tiempo.

A Sari, mi gran AMIGA, gracias por haber estado siempre, a cualquier hora, para escucharme, animarme, hacerme reír y quitarme las lágrimas. Porque gracias a tu apoyo he terminado esta tesis y no me he rendido, este trabajo también te pertenece. Salimos juntas de aquí y con nuestro objetivo cumplido y lo mejor está por llegar. Gracias por entrar en la lista de las personas más importantes de mi vida.

A Rosqui, mi otra gran amiga, porque siempre has tenido paciencia y ganas de escucharme, y aunque nuestros coches pasaban el día juntas nosotras solo podíamos

compartir la hora de la comida, aun así, ¡Qué comidas más divertidas! He descubierto una gran persona que se queda en mi vida para siempre.

A mis amigos, por los viajes, las noches de copas, bailes y risas hasta altas horas de la mañana, en especial a Sofi y Ali. A Ali, por tu generosidad y por escuchar mis grabaciones infinitas, todas os habéis convertido en una parte muy importante de mi vida. A todos, gracias, porque en estos últimos años me habéis hecho sentir muy feliz. A mi familia garruchera, por hacer cada verano mejor que el anterior, no podría nombraros a todos, pero en especial a Jaco, a Pablo y a Pauli siempre atentos y preguntando constantemente como llevaba la tesis, gracias por vuestros ánimos y porque los importantes estáis siempre al pie del cañón.

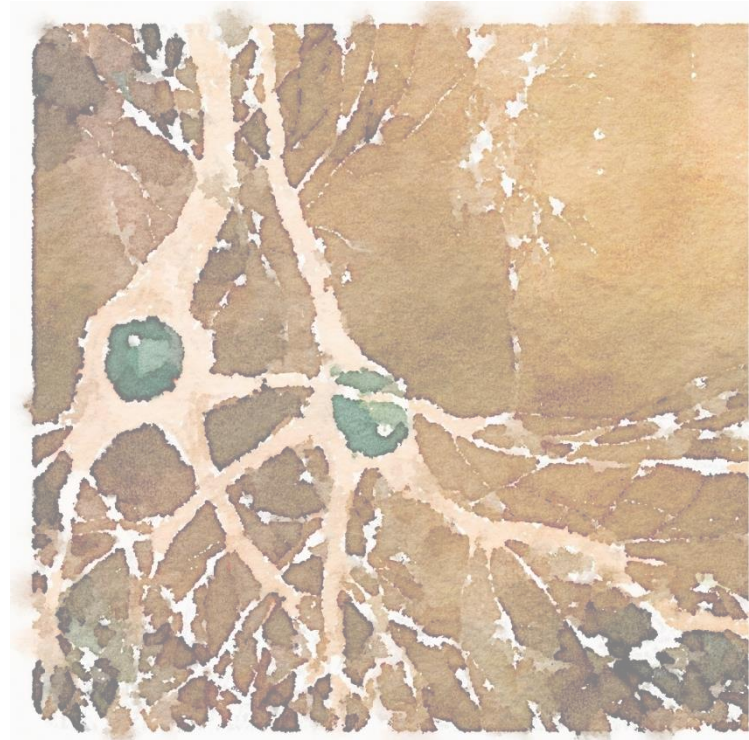
Gracias también a esas personas que ha aparecido en mi vida en el 2021, a mis amiguis de Medpace y al grupo de BadBunnyBaby os habéis convertido en tan poco tiempo en personas importantes para mí. En especial a Roy por tus ánimos constantes, por tu apoyo, por compartir cada momento conmigo, por ponerle ilusión a cada cosa que hacemos juntos y por quererme como soy.

A toda mi familia, en especial a mi Abuloli que desde el cielo estará muy orgullosa de mí. A todos mis tíos, a mi tío Josele y a mi tío Padrino por tratar de entender de qué va esta tesis. Quiero agradecer en especial a mi tío Javi y a mi tía Cris, que más que una tía es una segunda madre, amiga y confidente. Mamá pato no puede olvidarse de sus patitos, Irenita (mi princess) y Javito, siempre dispuestos a escuchar mis historias y hacerme reír, os quiero con todo mi corazón.

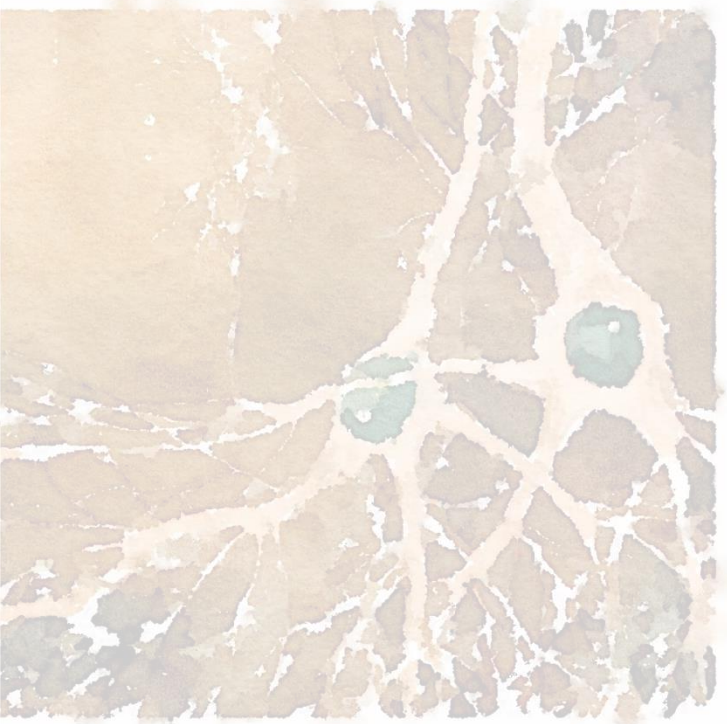
A María, mi hermana, aunque somos como el agua y el aceite, al tenerte lejos me he dado cuenta de todo lo que te quiero y te echo de menos, ¡Hasta lo llevamos tatuado! A Mamabu, mi abuchi, que nunca entiende las cosas que le explico, pero cuando habla por teléfono dice, MI NIETA, ¡es investigadora! Porque cree que soy la más lista de la casa, has sido más que una Abuela y vivir contigo desde hace 6 años ha sido un regalo increíble. Y por supuesto a Papam, que desde el cielo me cuidas y sé que estás orgulloso de lo que he conseguido. ¡Qué gran último verano en el 2014! cuando conseguimos que 65 años de diferencia no se notasen, al final descubrí que siempre me dejabas ganar el juego de la farola. Os quiero mucho.

A mi madre, mi mamita, esta tesis va dedicada completamente a ti. Eres mi gran apoyo incondicional, siempre has tenido una palabra de aliento para animarme a seguir, por tu confianza en mí, por cuidarme, por hacer de mí una mejor persona, porque solo tú has hecho de mi la persona que soy ahora. GRACIAS por ayudarme a no rendirme.

A todos, Gracias de corazón.



RESUMEN/ABSTRACT



La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa que constituye la causa más común de demencia entre las personas de edad avanzada cuyas principales alteraciones neuropatológicas son la acumulación de β -amiloide ($A\beta$) y la hiperfosforilación de la proteína tau. Numerosos estudios han propuesto que el péptido $A\beta$ podría ser responsable de alteraciones en la función mitocondrial en la EA. En esta tesis se ha estudiado el efecto de $A\beta$ sobre diversos aspectos de la dinámica mitocondrial a lo largo de la evolución de esta patología. Para ello se utilizaron modelos de EA *in vivo* (ratones APP/PS1) e *in vitro*. Nuestros resultados indicaron que la sobrecarga de $A\beta$ provocaba alteraciones en la dinámica mitocondrial, incluyendo una disminución de la biogénesis y un desbalance de las proteínas de fusión y fisión mitocondrial que culmina en un incremento de la mitofagia. Estas alteraciones son precedidas por una interacción directa del péptido $A\beta$ en el metabolismo y en la función mitocondrial.

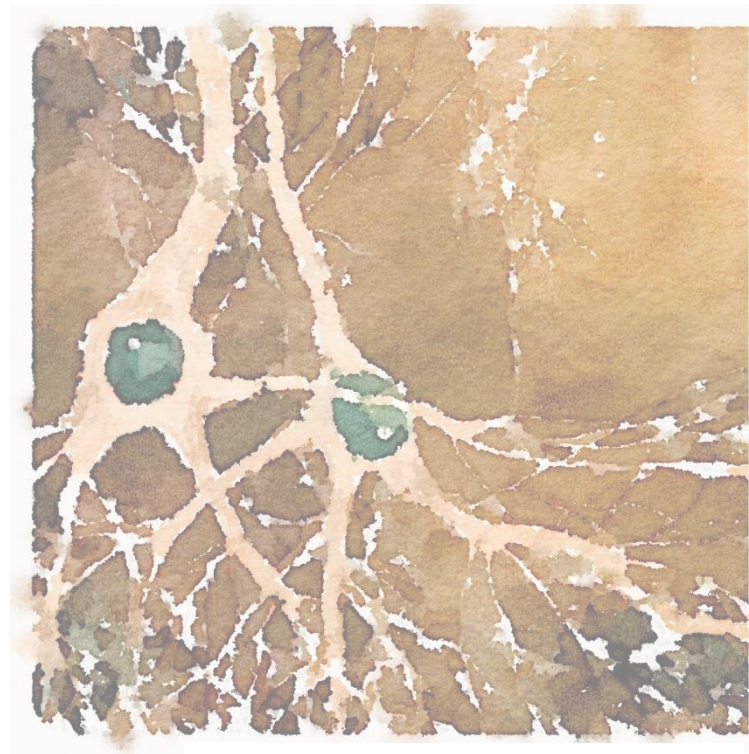
Nuestros resultados muestran que, además de mitofagia, la sobrecarga de $A\beta$ produce un aumento de la autofagia, tal como mostró el incremento en los niveles de sus principales marcadores en los diferentes modelos experimentales. El mecanismo de autofagia en la EA juega un importante papel tanto en la eliminación del péptido amiloide como en la eliminación de orgánulos dañados, incluyendo las mitocondrias, cuya acumulación puede resultar tóxica para las células. Una reducción excesiva en la cantidad de mitocondrias por el efecto tóxico del péptido $A\beta$ puede tener consecuencias fatales para las neuronas, resultando en una reducción en la producción de energía confiada plenamente a las mitocondrias.

Finalmente, se analizó el efecto de un inhibidor de fosfodiesterasa (PDE) 7, el compuesto S14, sobre las alteraciones previamente atribuidas a la sobrecarga de $A\beta$, relacionadas con la dinámica mitocondrial y con los procesos de autofagia. Nuestros datos indicaron que el compuesto S14 revertía los efectos del péptido $A\beta$ sobre la dinámica mitocondrial y autofagia tanto en los modelos animales como celulares. Este trabajo sugiere que el tratamiento con S14 podría ser beneficioso como herramienta terapéutica para la EA.

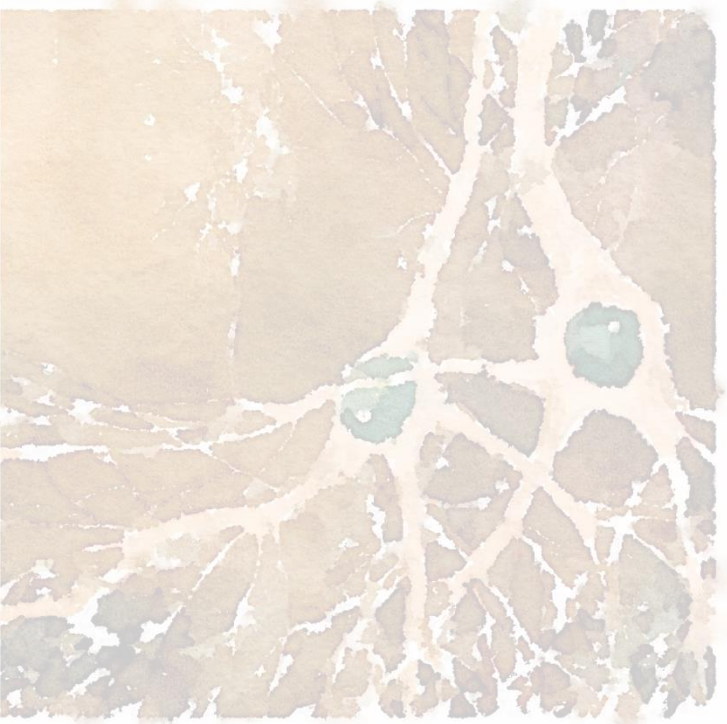
Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease that constitutes the most common cause of dementia among the elderly. The main neuropathological hallmarks are amyloid- β ($A\beta$) accumulation and tau protein hyperphosphorylation. Numerous studies have proposed that the $A\beta$ peptide could be responsible for alterations in mitochondrial function in AD. In this thesis, the $A\beta$ effect on mitochondrial dynamics throughout the evolution of this pathology has been studied. For this, in vivo (APP/PS1 mice) and in vitro models of AD were used. Our results indicated that $A\beta$ overload caused alterations in mitochondrial dynamics, including decreased biogenesis and an imbalance of mitochondrial fusion and fission proteins, resulting in increased mitophagy. These alterations are preceded by direct interaction of the $A\beta$ peptide in metabolism and in mitochondrial function.

In addition to mitophagy, our results show that $A\beta$ overload increases autophagy, as shown by the increased levels of autophagy main markers in the different experimental models. The autophagy mechanism in AD plays an important role both, in the removal of amyloid peptide and in the removal of damaged organelles, including mitochondria, the accumulation of which can be toxic to cells. An excessive reduction in the number of mitochondria by the toxic effect of the $A\beta$ peptide can have fatal consequences for neurons, resulting in a reduction in energy production fully entrusted to the mitochondria.

Finally, the effect of a phosphodiesterase (PDE) 7 inhibitor, S14, on mitochondrial dynamics and autophagy alterations due to $A\beta$ overload was analyzed. Our data indicated that S14 restored the $A\beta$ peptide effects on mitochondrial dynamics and autophagy in both, animal and cellular models. This work suggests that S14 treatment could be beneficial as a therapeutic tool for AD.



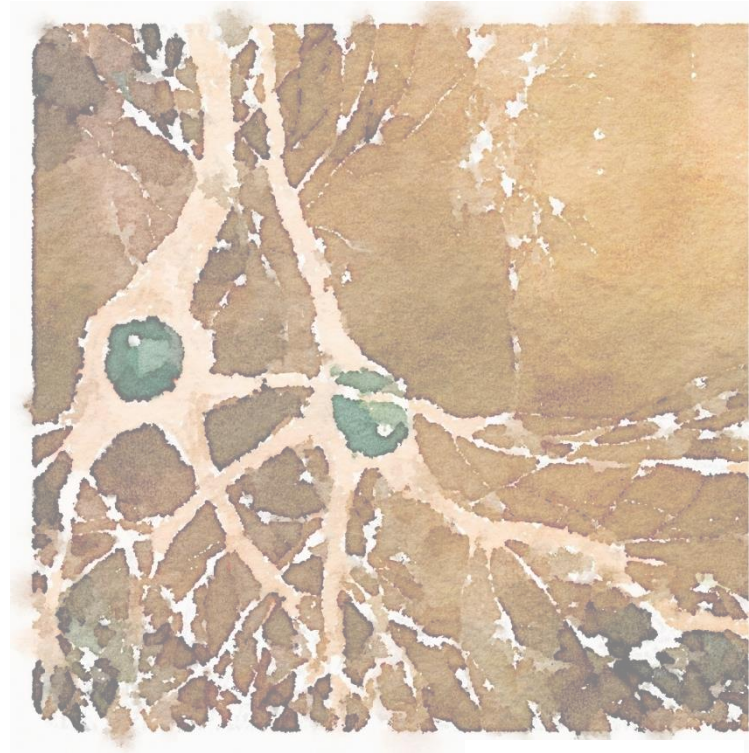
ABREVIATURAS



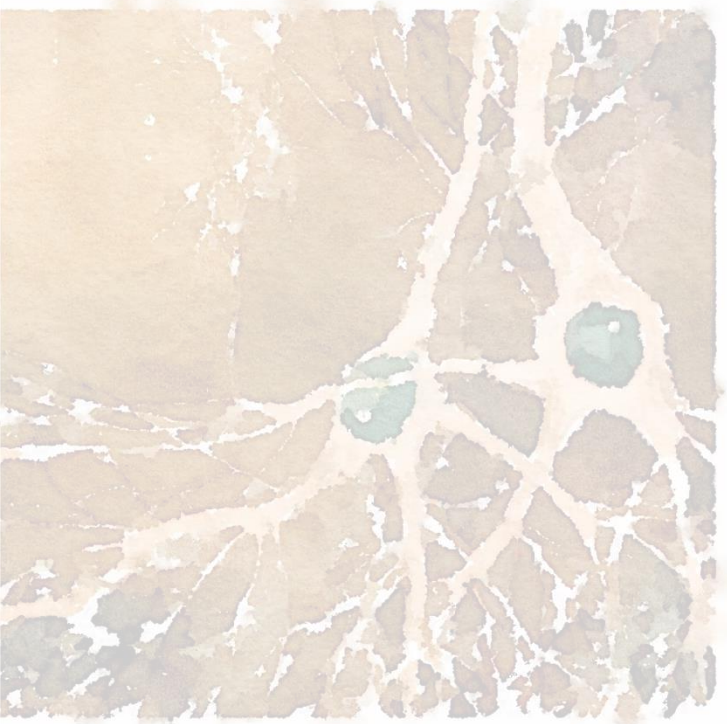
ADN: Ácido desoxirribonucleico	CCCP: carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona
ADNmt: ADN mitocondrial	CDK3 y CDK5: Ciclina dependiente de quinasa (del inglés <i>cyclin dependent kinase</i>)
AICD: Dominio intracelular de APP (del inglés <i>APP intracellular domain</i>)	CH₃COOH: Ácido acético
AMPc: Adenosín monofosfato cíclico (del inglés <i>Cyclic adenosine monophosphate</i>)	CO₂: Dióxido de carbono
ANOVA: Análisis de la varianza	DMEM: <i>Dubelcco's modified Eagle medium</i>
Aph-1: <i>Anterior pharynx defective 1</i>	DMSO: Dimetilsulfóxido
APOE: Gen de la apolipoproteína E	Drp1: Proteína relacionada con dinamina (del inglés <i>Dynammin-related protein</i>)
ApoE: Apolipoproteína E	EA: Enfermedad de Alzheimer
APP: Gen de la proteína precursora del péptido amiloide (del inglés <i>Amyloid precursor protein</i>)	ECL: <i>Enhanced chemiluminiscent</i>
APP: Proteína precursora del péptido amiloide (del inglés <i>Amyloid precursor protein</i>)	EDTA: Ácido etilen diamino tetracético
APP/PS1: Ratón transgénico	ELISA: <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ARIH1: <i>ariadne RBR E3 ubiquitin protein ligase 1</i>	FBS: Suero fetal bovino (del inglés <i>Fetal Bovine Serum</i>)
ARN: Ácido ribonucleico	Fis1: Proteína de fisión mitocondrial (del inglés <i>mitochondrial fission protein 1</i>)
ATG: Genes relacionados con la autofagia (del inglés <i>Autophagy related genes</i>)	GMPc: guanosín monofosfato cíclico (del inglés <i>Cyclic guanosin monophosphate</i>)
ATP: Adenosin tri-fosfato	GSK-3β: <i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i>
ATPβ: ATPasa subunidad 5β (CxVβ)	GTP: Guanosin tri-fosfato
BCA: Ácido bicinconínico (del inglés <i>bicinchoninic acid</i>)	HBSS: <i>Hanks' balanced salt solution</i>
BSA: Albúmina de suero bovino (del inglés <i>Bovine Serum Albumine</i>)	HCl: Ácido clorhídrico
Ca²⁺: Calcio	

Hepes: N-[2-hidroxietil] piperacina-N'- [2-ácido etanosulfónico]	n: Tamaño muestral
HRP: Peroxidasa de rábano (del inglés <i>horseradish peroxidase</i>)	NaCl: Cloruro sódico
KCl: Cloruro potásico	Na-CMC: Celulosa carboxil metil sódica
KDa: Kilodaltons	Na₂HPO₄: Fosfato ácido de sodio
KH₂PO₄: Fosfato monopotásico	NaOH: Hidróxido de sodio
LC3: <i>Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3</i>	NOD: <i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
LDL: Lipoproteínas de baja densidad (del inglés <i>low-density lipoprotein</i>)	NP-40: Nonidet P-40
LIR: <i>LC3-interacting region</i>	Opa1: Factor de atrofia óptica (del inglés <i>Optic atrophy type 1</i>)
mAb: Anticuerpo monoclonal	p: P-valor
MAPK: Proteína quinasas activadas por mitógenos (del inglés <i>mitogen activated protein kinase</i>)	pAb: Anticuerpo policlonal
MAPs: Proteínas asociadas a microtúbulos (del inglés <i>Microtubule-associated protein</i>)	Pb: Pares de bases
Mfn1,2: Mitofusinas 1 y 2	PBS: Tampón fosfato salino (del inglés <i>phosphate buffered saline</i>)
MgCl₂: Cloruro magnésico	PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>polymerase chain reaction</i>)
MitoQ: Mesilato de mitoquinona	PDEs: Fosfodiesterasas (del inglés <i>phosphodiesterases</i>)
MME: Membrana mitocondrial externa	PEN-2: <i>Presenilin enhancer 2</i>
MMI: Membrana mitocondrial interna	PFA: Paraformaldehído
MMP: Potencial de membrana mitocondrial, $\Delta\Psi_m$ (del inglés <i>Mitochondrial membrane potential</i>)	PGC-1α: Coactivador 1 α de los receptores activadores de la proliferación de peroxisomas (del inglés <i>Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1 alpha</i>)
mRNA: ARN mensajero	PINK1: serina/treonina kinasa (del inglés <i>PTEN-induced kinase 1</i>)
MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol	PKA: <i>cAMP-dependent Protein kinase</i>
Mulan1: <i>mitochondrial ubiquitin ligase activator of NF-kB1</i>	PSEN1: Gen de la Presenilina 1

- PSEN2:** Gen de la presenilina 2
- PS-1:** Presenilina 1
- PS-2:** Presenilina 2
- PVDF:** Poli-fluoruro de vinilidene
- p62:** *Ubiquitin binding protein*, también conocida como sequestosoma 1 (SQSTM1)
- ROS:** Especies reactivas de oxígeno (del inglés *Reactive oxygen species*)
- rpm: Revoluciones por minuto
- sAPP:** Ectodominio amino-terminal soluble del APP
- SDS:** Sodio dodecil sulfato
- SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (del inglés *SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)
- SEM:** Error estándar medio
- Sinfilina-1/SIAH: *seven in absentia homolog*
- SNC:** Sistema nervioso central
- TBS:** Tampón Tris base salino (del inglés *Tris-buffered saline*)
- TMRM:** *Tetramethyl rhodamine methyl ester*
- TTBS:** Tampón Tris base salino con Tween20 al 0,05%
- UBA:** *C-terminal ubiquitin-associated domain*
- WT:** *Wild type*



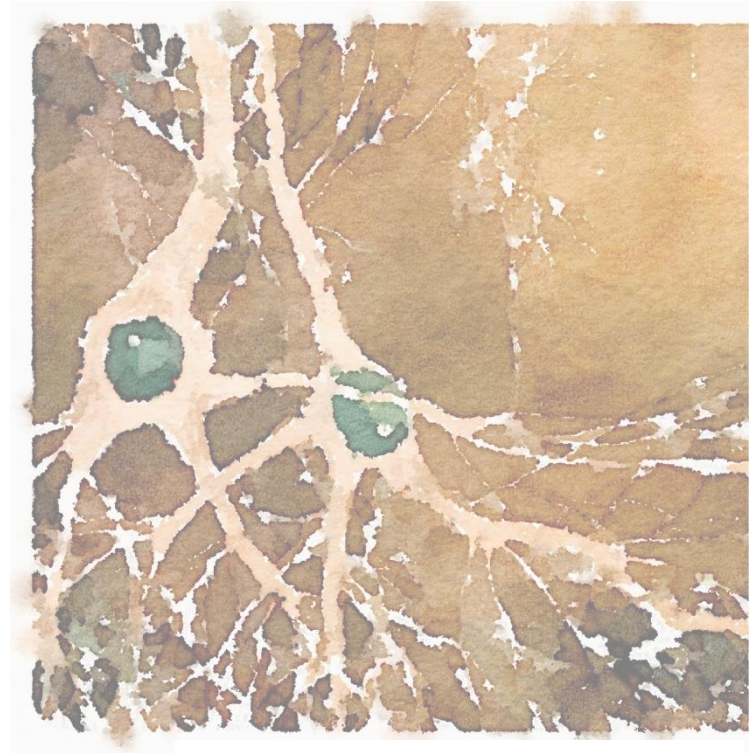
ÍNDICE



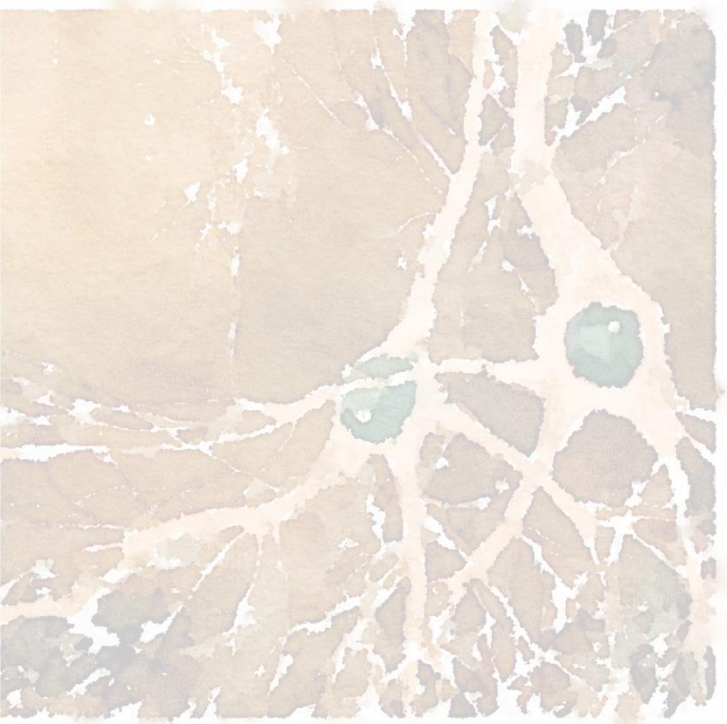
Agradecimientos	I
Resumen	V
Abstract	VI
Abreviaturas	IX
Introducción	21
1. Introducción a la enfermedad de Alzheimer	21
2. Neuropatología de la EA	21
3. Etiología de la EA	22
3.1 Enfermedad de Alzheimer de tipo familiar	23
3.2 Enfermedad de Alzheimer tipo esporádico	23
4. Etiopatogenia de la EA	23
4.1 Hipótesis de la cascada amiloide	23
4.2 Hiperfosforilación de Tau	26
4.3 Neuroinflamación	27
4.4 Estrés oxidativo	29
4.5 Alteraciones en los procesos de autofagia	31
4.6 Alteraciones mitocondriales	32
5. Factores de riesgo en la EA	37
6. Estrategias terapéuticas en la EA	38
6.1 Mitocondria como diana terapéutica	40
6.2 Fosfodiesterasas como dianas terapéuticas de la EA	41
6.3 Inhibidores de la fosfodiesterasa 7 en la EA	43
Objetivos	47
Materiales y Métodos	51
1. Compuestos	51
2. Animales de experimentación	51
3. Genotipado de animales	52
4. Administración oral de S14 en ratones APP/PS1	54
5. Cultivos celulares	55
5.1 Cultivos primarios de neuronas de rata	55
5.2 Líneas celulares	56
6. Procedimientos <i>in vivo</i> con células	57

6.1 Ensayos MTT de viabilidad celular	57
6.2 Potencial de membrana mitocondrial (MMP/ $\Delta\Psi_m$)	57
6.3 Masa mitocondrial	58
7. Procedimientos con proteínas	59
7.1 Extracción de proteínas	59
7.2 Western blot	59
7.3 Inmunofluorescencia	61
7.4 Ensayos de ELISA	62
8. Análisis estadístico	63
Resultados	67
1. Alteraciones mitocondriales en un modelo <i>in vivo</i> de EA: ratones APP/PS1 de 3, 6 y 12 meses	67
1.1 Niveles de A β en corteza cerebral e hipocampo de ratones WT y APP/PS1	67
1.2 Estimación de la cantidad de mitocondrias en corteza cerebral e hipocampo de ratones WT y APP/PS1	69
1.3 Biogénesis mitocondrial en corteza cerebral e hipocampo de ratones WT y APP/PS1	71
1.4 Fusión y fisión mitocondrial en corteza cerebral e hipocampo de ratones WT y APP/PS1	72
2. Biogénesis y dinámica mitocondrial en diferentes modelos <i>in vitro</i> de amiloidosis	77
2.1 Estimación de la masa mitocondrial en los modelos <i>in vitro</i>	77
2.2 Biogénesis mitocondrial en los modelos <i>in vitro</i>	78
2.3 Fusión y fisión mitocondrial <i>in vitro</i> utilizando diferentes modelos celulares	79
2.4 La sobreexpresión de APP en las células SK-APP no produce una sobrecarga de A β significativa	82
2.5 La sobreexpresión de APP en las células SK-APP induce un aumento de autofagia	83
2.6 La sobrecarga de A β induce mitofagia	85
2.7 La mitofagia inducida por A β es independiente del reclutamiento de Parkina en la mitocondria	88

2.8 La sobrecarga de A β reduce la actividad metabólica y despolariza las mitocondrias	91
2.9 La sobrecarga de A β incrementa el flujo autofágico	94
3. Efecto del inhibidor de fosfodiesterasa 7, S14, sobre las alteraciones mitocondriales inducidas por la sobrecarga de A β	100
3.1 El tratamiento con S14 activa la vía de señalización del AMPc	100
3.2 El fármaco S14 incrementa la cantidad de mitocondrias en ratones APP/PS1 y en cultivos neuronales tratados con A β ₄₂	102
3.3 El tratamiento con S14 incrementa la biogénesis mitocondrial en de ratones APP/PS1 6 meses y en la línea celular SH-SY5Y tratada con A β ₄₂	104
3.4 El tratamiento con S14 modula la expresión de proteínas de fusión y fisión mitocondrial en ratones APP/PS1 y en la línea celular SH-SY5Y tratada con A β ₄₂	105
3.5 El tratamiento con S14 modula la expresión de marcadores de autofagia en ratones APP/PS1 y en la línea celular SH-SY5Y tratada con A β ₄₂	108
Discusión	113
1. La sobrecarga de A β produce alteraciones mitocondriales	113
2. Aparte de mitofagia, la sobrecarga de A β induce autofagia	122
3. Efecto del inhibidor de fosfodiesterasa 7, S14, sobre las alteraciones mitocondriales y la autofagia inducidas por A β .	123
Conclusiones	129
Bibliografía	133
Anexos	179



INTRODUCCIÓN



1. Introducción a la enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un proceso neurodegenerativo progresivo que constituye la forma más común de demencia, representando el 50-70% de todos los casos (Winblad et al., 2016). La EA afecta a nivel mundial a más de 24 millones de personas y cada año se diagnostican unos 4,6 millones de nuevos casos. Su prevalencia es de aproximadamente un 6,4% en la población mayor de 60 años (Mayeux & Stern, 2012). Se caracteriza principalmente por pérdida de memoria y un progresivo deterioro cognitivo que afecta a áreas del cerebro relacionadas con la orientación, el uso del lenguaje, el comportamiento y la resolución de problemas, entre otros (Katzman, 1986; Riancho et al., 2020).

Los síntomas típicos de la enfermedad fueron descritos por primera vez en 1906 por el Dr. Alois Alzheimer, tras tratar a una paciente de 51 años. Más tarde, en el año 1910, se acuñó el término de “enfermedad de Alzheimer”, que fue aprobado por toda la comunidad científica.

2. Neuropatología de la EA

A nivel macroscópico, las características patológicas principales que se observan en el cerebro de personas con EA son la atrofia del hipocampo y de la corteza cerebral, dilatación de los ventrículos y disminución del peso y volumen cerebral (Poulakis et al., 2018). La atrofia cortical afecta principalmente a los lóbulos temporales, frontales, parietales y occipitales. Las secciones a través de los hemisferios cerebrales muestran un adelgazamiento de la lámina cortical y dilatación de las cavidades ventriculares.

A nivel microscópico, las principales alteraciones que caracterizan a la EA ya fueron descritas por el Dr. Alzheimer como unos “*depósitos de una sustancia peculiar en la corteza*” que son lo que hoy conocemos como “placas de amiloide”, unos “*cambios peculiares en las neurofibrillas*” hoy conocidos como “ovillos neurofibrilares” y la muerte neuronal en áreas selectivas del cerebro (Šerý et al., 2013). Las placas de amiloide, también conocidas como placas seniles, son acúmulos extracelulares insolubles formados principalmente por el péptido beta-amiloide (A β). Según sus características morfológicas se pueden dividir en dos variedades: difusas o preamiloides y compactas o neuríticas.

El péptido A β se genera a través del procesamiento proteolítico de la proteína

precursora de amiloide (APP; del inglés *Amyloid Precursor Protein*) (Rao et al., 2020) mientras que los ovillos neurofibrilares son inclusiones intracelulares formadas por la proteína Tau hiperfosforilada (Mandelkow & Mandelkow, 2011). Tanto la presencia de ovillos neurofibrilares como la degeneración neuronal comienzan en la corteza entorrinal y se extienden hacia el neocórtex. Por su parte, la presencia de los depósitos de A β comienza en el giro dentado, en el lóbulo temporal y en el sistema límbico (Braak & Braak, 1991; Thal et al., 2002).

Otras alteraciones características de la EA incluyen la presencia de neuritas distróficas alrededor de las placas neuríticas, la pérdida de la función sináptica, la neuroinflamación, el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial (Ganguly et al., 2017). Diversos estudios indican que la pérdida de la función sináptica es una característica fisiopatológica en la EA y la relacionan con la presencia de los agregados característicos de la enfermedad, con la degeneración sináptica, con la pérdida de densidad de espinas dendríticas y con otras alteraciones relacionadas con la plasticidad sináptica (Li et al., 2018; Lista & Hampel, 2017). Las neuritas que se encuentran próximas a las placas de amiloide presentan morfologías distróficas que comprometen el transporte celular (Serrano-Pozo et al., 2011). Otros estudios han visto que las formas solubles de Tau también pueden resultar tóxicas para las sinapsis (Giannakopoulos et al., 2003; Kopeikina et al., 2012). Más adelante, se describirán en detalle el resto de las características mencionadas y su relación con la neuropatología de la EA.

3. Etiología de la EA

Aunque no se conoce la causa concreta de la EA, se considera que es una enfermedad multifactorial que puede tener origen genético y/o ambiental (Dorszewska et al., 2016). En función de las causas que originan la enfermedad, de la incidencia y de la edad de aparición, la EA se puede clasificar en dos variantes: EA de tipo familiar, que está ligada a mutaciones en genes específicos y representa menos del 1% de los casos y, EA de tipo esporádico, que tiene un origen desconocido y está ligada a factores de riesgo. En torno al 99% de los casos de Alzheimer está representado por la EA de tipo esporádico (Harris & Harris, 2015; Lista et al., 2015).

3.1 Enfermedad de Alzheimer de tipo familiar

La EA de tipo familiar suele desarrollarse antes de los 60 años. En los casos de EA familiar los afectados presentan mutaciones en 3 genes específicos que se heredan de forma autosómica dominante. Estos genes son el gen *APP* en el cromosoma 21 y que codifica para la proteína precursora de amiloide (*APP*; del inglés *Amyloid precursor protein*), el gen *PSEN1* en el cromosoma 14, que codifica para la proteína presenilina 1 (PS-1) y, finalmente, el gen *PSEN2* en el cromosoma 1, que codifica para la proteína presenilina 2 (PS-2) (Canevelli et al., 2014). En la actualidad se han descrito 60 mutaciones en *APP*, 314 en *PSEN1* y 56 en *PSEN2* que generan EA familiar. Las mutaciones producidas en estos tres genes (*APP*, *PSEN1* y *PSEN2*) alteran el metabolismo de *APP* y conducen a la acumulación patológica de $A\beta$ (<http://www.alzforum.org/mutations/>; Bagyinszky et al., 2018, 2019; Van Giau et al., 2019). Mutaciones en *PSEN1* y *PSEN2* son las responsables de hasta el 95% de los casos de EA familiar, siendo las mutaciones en *PSEN1* las más comunes (Canevelli et al., 2014).

3.2 Enfermedad de Alzheimer de tipo esporádico

La EA de tipo esporádico es la forma más común y se suele desarrollar a partir de los 65 años. Se han descrito multitud de factores de riesgo entre los que destacan los asociados con la edad, el sexo, la dieta, el sistema inmunitario o alteraciones metabólicas y vasculares, entre otros (Armstrong, 2019). Existen además factores de riesgo genéticos que pueden estar implicados en la patogénesis de la enfermedad de tipo esporádico siendo el principal el genotipo *APOE* (Butterfield & Mattson, 2020). Estudios de asociación de todo el genoma han permitido identificar nuevos genes que pueden constituir factores de riesgo de la EA como *UBQLN1*, *DAPK1*, *GAB2*, *TREM2*, *PICALM*, *ABCA7*, *SORL1* o *CLU*, y más recientemente *TET2* (Bertram et al., 2007; Cochran et al., 2020; Lambert et al., 2013; Williamson et al., 2009).

4. Etiopatogenia de la EA

4.1 Hipótesis de la cascada amiloide

La hipótesis más aceptada sobre el origen de la EA es la “hipótesis de la cascada amiloide”, que fue propuesta en los años 90 y postula que los depósitos de $A\beta$ constituyen

la causa principal en el inicio patológico de la EA y que la formación de ovillos neurofibrilares, el daño vascular, la muerte celular y la demencia son las consecuencias directas de estos depósitos (Hardy & Higgins, 1992). Esta teoría ha sido apoyada durante años, pero también se ha puesto en duda, debido principalmente a que el número de placas de amiloide observadas en estudios postmortem en cerebros de pacientes no correlacionan con el deterioro cognitivo, mientras que el número de ovillos neurofibrilares sí guarda relación de forma muy estrecha con el grado de demencia. Además, se ha observado la presencia de depósitos de A β en personas cognitivamente sanas (Bilgel et al., 2018; Huber et al., 2018; Näslund et al., 2000). El péptido A β procede del procesamiento proteolítico de APP que es catalizado por las enzimas llamadas α -, β -, o γ -secretasas. γ -secretasa, a su vez, es un complejo tetramérico formado por 4 proteínas, presenilina 1 (PS-1) y presenilina 2 (PS-2), nicastrina, Aph-1 (del inglés *anterior pharynx defective 1*) y PEN-2 (del inglés *presenilin enhancer 2*). Las 4 proteínas son necesarias para su correcto funcionamiento. En concreto, PS-1 y PS-2, cuyas formas mutadas, como se ha mencionado, dan lugar a la enfermedad de tipo familiar, forman parte de la subunidad catalítica del complejo de γ -secretasa (Escamilla-Ayala et al., 2020; Keller et al., 2020). APP es una proteína transmembrana que se expresa en la mayoría de los tipos celulares incluyendo las neuronas. Aunque a día de hoy no están claras las funciones de APP, se le atribuyen algunas relacionadas con los mecanismos de supervivencia celular, migración o crecimiento celular, entre otras (Tiwari et al., 2019). Es una proteína formada por 770 aminoácidos que, dependiendo de su procesamiento proteolítico, puede generar los diferentes fragmentos amiloidogénicos (Reiss et al., 2018). Existen dos vías alternativas del procesamiento proteolítico de APP, la vía amiloidogénica, en la que se generan las formas de A β y que es la responsable de la formación de los depósitos de amiloide, y la vía no-amiloidogénica, que no genera A β y se considera la vía predominante (figura 1). El procesamiento de APP por la vía amiloidogénica implica la actuación de los complejos enzimáticos β -secretasa (BACE-1, principalmente) y γ -secretasa. BACE-1 realiza una proteólisis en APP generando un fragmento de 99 aminoácidos (C99) que, queda anclado a la membrana plasmática y, otro fragmento soluble de 16 aminoácidos (sAPP β). Cuando el fragmento C99 es cortado por γ -secretasa, da lugar a los péptidos A β ₄₀ y A β ₄₂, dependiendo del residuo donde se corte (Castro et al., 2019; Das et al., 2015; Otero et al., 2018) (figura 1). En mayor medida, se generan péptidos amiloides con una longitud de 40 aminoácidos (A β ₄₀) y, en menor cantidad, los péptidos que se generan son de 42

aminoácidos ($A\beta_{42}$) (Gugliandolo et al., 2019). El péptido $A\beta_{42}$ constituye el principal componente de las placas de amiloide y se agrega más fácilmente que el péptido $A\beta_{40}$, que es más soluble (Takahashi et al., 2017). La estructura de los péptidos $A\beta$ se modifica una vez alcanzan el espacio extracelular convirtiéndose en monómeros de $A\beta$ mal plegados. Estos pueden ser eliminados o ensamblarse formando oligómeros y agregados de $A\beta$ (Larson & Lesné, 2012; Spies et al., 2012). Durante años se han considerado a los agregados fibrilares como el principal agente causal de la pérdida neuronal pero recientes estudios sugieren que los oligómeros solubles serían la toxina neuronal más probable en la EA (Brito-Moreira et al., 2017; Ferreira et al., 2015).

Por otra parte, cuando se produce el procesamiento proteolítico de APP por la vía no amiloidogénica, se lleva a cabo por mediación de la enzima α -secretasa (figura 1). Se produce una primera escisión generando un fragmento de 83 aminoácidos en el extremo C-terminal (C83) de APP y otro fragmento, más pequeño y soluble, que es liberado al medio extracelular (sAPP α). Posteriormente, el fragmento C83 que había quedado retenido en la membrana plasmática es escindido por la enzima γ -secretasa y da lugar a un fragmento denominado p3 y al dominio intracelular de APP (AICD; del inglés *APP intracellular domain*) (Gugliandolo et al., 2019; Xie et al., 2019) (figura 1).

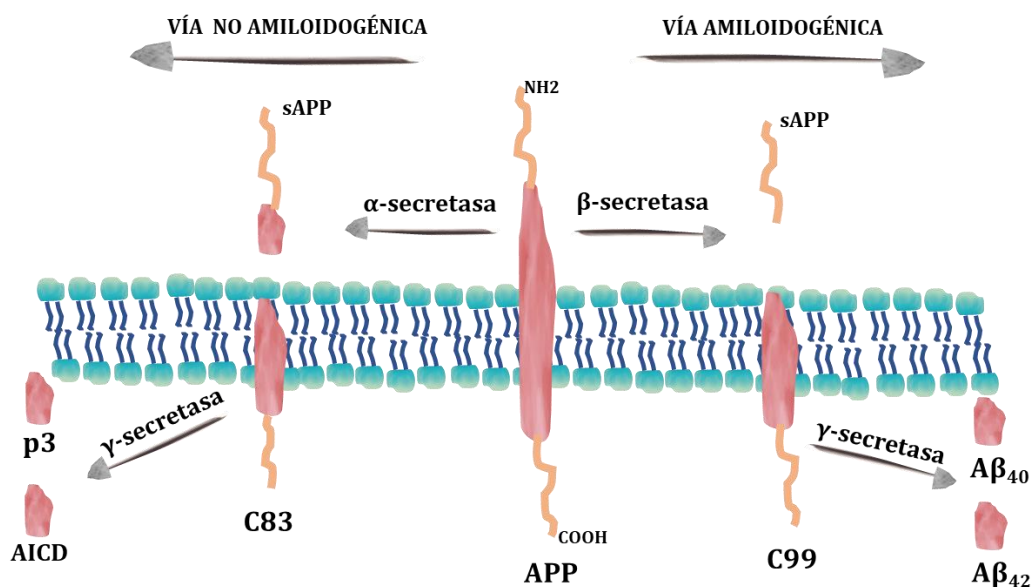


Figura 1. Procesamiento de la proteína APP. En la ruta amiloidogénica, la enzima β -secretasa genera un fragmento soluble (sAPP) y otro fragmento, C99, que es procesado por la enzima γ -secretasa generando los péptidos $A\beta_{40}$ o $A\beta_{42}$. En la ruta no amiloidogénica, la enzima α -secretasa genera un fragmento soluble (sAPP) y otro fragmento, C83, que queda anclado a la membrana. Este fragmento es procesado por la

enzima γ -secretasa dando lugar al fragmento llamado p3 y al dominio intracelular de APP (AICD). La ruta no amiloidogénica evita la formación de A β . (Fuente: elaboración propia).

4.2 Hiperfosforilación de Tau

La hiperfosforilación de Tau da lugar a un conjunto de enfermedades neurodegenerativas cuya característica común es la presencia de agregados de la proteína Tau hiperfosforilada en forma de ovillos neurofibrilares (Mandelkow & Mandelkow, 2011). Estas enfermedades neurodegenerativas se conocen como taupatías (Arendt et al., 2016), que incluyen a la EA y también a otras como la demencia frontotemporal y la enfermedad de Pick (Kovacs, 2018). La proteína Tau forma parte de la familia de proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs; del inglés *microtubule associated proteins*), está codificada por el gen *MAPT* y se expresa principalmente en las neuronas (Buée et al., 2000). La función principal de Tau es proporcionar estabilidad a los microtúbulos en las neuronas mediante su dominio de unión en el extremo C-terminal y, su correcto funcionamiento, depende de su grado de fosforilación. La proteína Tau puede ser fosforilada en 85 sitios de fosforilación distintos (45 serinas, 35 treoninas y 5 tirosinas) (Wang et al., 2013). El estado de fosforilación de cualquier proteína puede determinar la actividad enzimática de la misma, su localización intracelular o su capacidad para interactuar con otras proteínas (Watanabe & Osada, 2016) y su grado de fosforilación depende de la actividad de quinasas y fosfatasas, encargadas de añadir o eliminar grupos fosfato, respectivamente. La fosforilación de Tau resulta del balance entre la acción de quinasas y fosfatasas, donde una mayor actividad por parte de las quinasas da lugar a su hiperfosforilación (Lee et al., 2021). Entre las principales quinasas involucradas en la fosforilación de Tau destacan, MAPK (del inglés *mitogen activated protein kinase*), GSK-3 β (del inglés, *Glycogen synthase kinase 3 beta*) que fosforila multitud de sitios en los filamentos helicoidales (Hernandez et al., 2013), o las quinasas CDK2 y CDK5 (del inglés *cyclin dependent kinase*) (Johnson & Stoothoff, 2004). La hiperfosforilación de Tau provoca una reducción de su afinidad por los microtúbulos, lo cual afecta a la estabilización de los mismos. A su vez, el estado de hiperfosforilación hace que la proteína tienda a polimerizar dando lugar a los filamentos apareados helicoidales. Éstos se agregan y forman los ovillos neurofibrilares, que son insolubles y dificultan el transporte axonal (Rajaei et al., 2020). Además, los ovillos neurofibrilares promueven la muerte celular por apoptosis, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, del

inglés *reactive oxygen species*), dificultan la función mitocondrial y llegan a provocar disfunción sináptica y neurodegeneración (Jouanne et al., 2017; Pîrșcoveanu et al., 2017).

En la EA se sabe que los depósitos de A β aparecen antes que la acumulación de la proteína Tau hiperfosforilada en el cerebro de los pacientes. También, se ha descrito que la reducción de Tau endógena permite disminuir las alteraciones cognitivas inducidas por A β en un modelo animal de amiloidosis (McAllister et al., 2020). Otros estudios *in vitro* e *in vivo* demostraron que la inactivación de la proteína Tau implicaba una reducción de los efectos tóxicos del péptido amiloide (Rapoport et al., 2002; Roberson et al., 2007). Estas evidencias apoyan la importancia del papel de Tau en el proceso de neurodegeneración (Avila et al., 2013) y promovieron el inicio de ensayos clínicos en pacientes con EA enfocados a la reducción de la hiperfosforilación de tau (Congdon & Sigurdsson, 2018). Otros estudios han demostrado que la proteína GSK-3 β interviene en la escisión de APP, favoreciendo el aumento de la producción del péptido A β (Cai et al., 2012). Por su parte, el péptido amiloide es capaz de inhibir la inactivación de GSK-3 β , favoreciendo así la fosforilación de Tau (Alvarez et al., 1999; Hernández et al., 2010; Salcedo-Tello et al., 2011). Estas evidencias refuerzan la idea de que esta proteína, GSK-3 β , podría establecer un vínculo entre la sobrecarga de amiloide y los acúmulos de proteína Tau.

Como se ha comentado anteriormente, la presencia de placas de amiloide no se correlaciona con el nivel de pérdida neuronal en los pacientes con EA. Sin embargo, sí se ha observado una relación más directa entre el grado de la enfermedad y la presencia de ovillos neurofibrilares dando lugar a la clasificación por estadios Braak (Arriagada et al., 1992; Heiko Braak & Braak, 1991; Hardy & Higgins, 1992).

4.3 Neuroinflamación

La inflamación crónica y las alteraciones en el sistema inmune son otra de las características de la EA que, a su vez, pueden encontrarse en otras enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson, la esclerosis múltiple o la esclerosis lateral amiotrófica (Chen et al., 2016). En todos estos casos se encuentran marcadores de inflamación crónica. El término “neuroinflamación” se refiere a la respuesta inflamatoria desencadenada en el sistema nervioso central (SNC) tras un daño neuronal (Calsolaro & Edison, 2016).

En cerebros de pacientes con EA y en modelos animales de la enfermedad, es posible encontrar un aumento de la activación de la microglía y astrocitos reactivos en estadios tempranos de la enfermedad, signos claros de inflamación en el SNC (Ahmad et al., 2019; Hansen et al., 2018; Lian et al., 2016). Se cree que, en los inicios de la enfermedad, la activación de la microglía actúa como un mecanismo protector desencadenando la liberación de citoquinas y la síntesis de enzimas proteolíticas que rompen las placas de amiloide (Heneka et al., 2015). De hecho, se han encontrado células de la microglía rodeando placas de amiloide en cerebros de pacientes con EA (Cai et al., 2014; Minter et al., 2016). Por su parte, los astrocitos son las células más abundantes en el cerebro y ofrecen un apoyo fundamental en multitud de funciones cerebrales como la transmisión neuronal, la regulación de la plasticidad sináptica, apoyo neurotrófico, o mantenimiento de la homeostasis cerebral (Halassa & Haydon, 2009; Heneka et al., 2015). La activación de los astrocitos desencadena una respuesta inflamatoria liberando citoquinas, modulando la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y formando “cicatrices gliales” (Verkhratsky et al., 2010). Se ha demostrado en numerosas ocasiones la presencia de astrocitos reactivos en cerebros de pacientes con EA (Carter et al., 2012; Liddel et al., 2017; Rodriguez-Vieitez et al., 2015; Yu et al., 2005), concretamente en zonas próximas a las placas de amiloide en áreas de la corteza (Morales et al., 2014; Simpson et al., 2010). Los astrocitos reactivos son capaces de detectar y acumular péptidos de amiloide para su posterior degradación (Nagele et al., 2003). Sin embargo, cuando un exceso de inflamación persiste en el sistema nervioso central y, contribuye a la muerte neuronal sobrepasando la respuesta protectora de la microglía, se produce un desequilibrio progresivo conocido como neuroinflamación crónica, que se caracteriza por una producción excesiva de citoquinas proinflamatorias y producción de compuestos oxidantes (Calsolaro & Edison, 2016; C. Liu et al., 2014). A este respecto, se ha descrito que los niveles periféricos de las citoquinas proinflamatorias son más altos, mientras que los niveles de citoquinas antiinflamatorias son más bajos en pacientes con EA (Vida et al., 2018).

Estos desequilibrios desencadenan alteraciones en el sistema inmune en los pacientes con EA. Algunos estudios muestran que los linfocitos de pacientes con EA presentan una escasa actividad proliferativa así como una reducción de la viabilidad celular (Cao & Zheng, 2018; Yoon et al., 2010). También se han observado defectos en la migración de

leucocitos hacia zonas de inflamación en pacientes con EA comparados con individuos sanos (Stieler et al., 2001; Trieb et al., 1996).

La neuroinflamación y las alteraciones en el sistema inmune son eventos tempranos en la EA, que preceden a los depósitos de amiloide y, según algunos autores, podrían ser la causa directa de la muerte neuronal (Combs et al., 2001; O'Brien & Wong, 2011; Wright et al., 2013). En cerebros de pacientes y modelos de EA, se aprecia un aumento de la activación de la microglía en estadios tempranos de la enfermedad. En un primer momento la activación de la microglía actúa como mecanismo protector desencadenando la liberación de citoquinas y síntesis de enzimas proteolíticas que rompen las placas de amiloide. Sin embargo, una inflamación persistente y en exceso en el SNC contribuye a la muerte neuronal y sobrepasaría la respuesta protectora de la microglía (Calsolaro & Edison, 2016; Liu et al., 2014).

4.4 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es otra de las características patológicas encontradas en la EA y en otras enfermedades neurodegenerativas y que se relaciona con la muerte neuronal característica. El estrés oxidativo se produce por un exceso en la producción y acumulación de ROS (Siddhartha et al., 2018; Tönnies & Trushina, 2017), que puede desencadenar daños en las proteínas, en lípidos (peroxidación lipídica), en el ADN y en el ARN. Aunque las ROS pueden desempeñar funciones fisiológicas importantes y necesarias para las células, cuando se producen en exceso pueden ocasionar consecuencias negativas, alterándose el metabolismo lipídico, produciéndose daños en los mecanismos de reparación del ADN y disminuyendo el metabolismo energético (Perluigi et al., 2014).

En estudios postmortem con pacientes con EA se han encontrado aumentados algunos marcadores de estrés oxidativo en las zonas del cerebro más afectadas de la enfermedad. Por ejemplo, se ha visto que la presencia de ácidos grasos poliinsaturados derivados de la peroxidación lipídica (Reddy et al., 2009) o la presencia de grupos carbonilo resultantes de proteínas dañadas por los radicales libres (Skoumalová & Hort, 2012) contribuyeron a la pérdida neuronal. También se han observado niveles altos de la enzima ciclooxigenasa COX-2 que se encarga de mediar los procesos de inflamación y, por

el contrario, se han detectado niveles bajos de la enzima SIRT-1, implicada en mecanismos neuroprotectores (Testa et al., 2016).

Estas observaciones y otros experimentos *in vitro* han probado la relación del péptido A β con la producción de ROS. Concretamente, se ha visto que el cobre, el hierro y el zinc interactúan con A β y contribuyen a la formación de los agregados de amiloide e inducen la formación de ROS a través de la producción de H₂O₂ en las neuronas (Mantzavinos & Alexiou, 2017).

La producción de ROS está estrechamente ligada a la mitocondria al constituir ésta la principal fuente de ROS en la célula pero también porque son la diana principal del estrés oxidativo (Aluise et al., 2010; Hilt et al., 2018). Se han observado algunos efectos relacionando la acumulación de A β con alteraciones en las mitocondrias, reflejados en un aumento de la producción de ROS, una disminución del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y de la producción de ATP y en la liberación de factores apoptóticos (Yan et al., 2018; Yao et al., 2018). En numerosos estudios se han observado cambios significativos en la forma y número de las mitocondrias, modificaciones en el ADN mitocondrial, en proteínas y lípidos, así como alteraciones en los procesos de dinámica mitocondrial en modelos *in vivo* e *in vitro* de la EA (Bossy et al., 2010; Manczak et al., 2011; Wang et al., 2008, 2009).

La conexión entre la muerte neuronal en la EA y el estrés oxidativo podría estar ligada a un aumento en los niveles de Ca²⁺ citosólico que son letales para la célula. El Ca²⁺ celular juega un papel esencial en el crecimiento y diferenciación de las neuronas, en la modulación de los potenciales de acción, en la plasticidad sináptica y en los procesos de aprendizaje y memoria. Por lo tanto, defectos en la homeostasis del Ca²⁺ contribuyen al deterioro celular potenciando los procesos de necrosis, apoptosis, autofagia y degeneración. A mediados de los años 80 se propuso la hipótesis de que la desregulación en el metabolismo del Ca²⁺ era la responsable de la neurodegeneración (Tong et al., 2018). El aumento del estrés oxidativo podría estar relacionado con alteraciones en la homeostasis del Ca²⁺ y estas alteraciones, a su vez, podrían estimular la producción de ROS por parte de la mitocondria (Gibson & Thakkar, 2017). Además, se ha relacionado tanto a los depósitos de amiloide como algunas mutaciones en *PSEN1* con defectos en la regulación de la homeostasis de Ca²⁺ que son observables en los estadios más tempranos de la EA y permanecen en estadios avanzados (Llinas & Moreno, 2017).

4.5 Alteraciones en los procesos de autofagia

Otras alteraciones encontradas en la EA son fallos en los mecanismos de autofagia. La autofagia es un mecanismo catabólico intracelular altamente conservado en eucariotas que permite la degradación y reutilización de proteínas y orgánulos. Existen 3 subtipos de autofagia: macroautofagia, en la que se forma una vesícula de doble membrana, el autofagosoma, que secuestra a las proteínas u orgánulos celulares a eliminar para su posterior fusión con el lisosoma y degradación del contenido por las enzimas lisosomales; microautofagia, en la que se producen invaginaciones en las membranas de los lisosomas para secuestrar componentes citoplasmáticos; y autofagia mediada por chaperonas, en la que la chaperona Hsp70 identifica las proteínas a degradar y las transporta individualmente hasta la membrana de los lisosomas (Parzych & Klionsky, 2014). En el proceso de macroautofagia la proteína LC3-I se conjuga con fosfatidiletanolamina dando lugar a la forma madura LC3-II, que se localiza en la membrana de los autofagosomas, los cuales engullen el sustrato a degradar. El principal adaptador autofágico, p62, interacciona directamente con proteínas ubiquitinadas a través de su dominio de unión UBA (del inglés *C-terminal ubiquitin-associated domain*) e interacciona a su vez con LC3-II a través de su dominio LIR (del inglés *LC3-interacting region*) cerrando el autofagosoma y permitiendo su fusión con el lisosoma (Liu et al., 2016). El complejo formado tras la fusión autofagosoma-lisosoma se denomina autolisosoma y en él se liberan y actúan las enzimas hidrolíticas que degradan el contenido a eliminar o reutilizar por la célula (Boya et al., 2013, 2016; Pankiv et al., 2007).

La alteración del flujo autofágico tiene consecuencias patológicas en multitud de enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y la EA (Nixon, 2013). Todas estas enfermedades tienen en común la presencia de agregados proteicos en el cerebro, que podrían ser el resultado de fallos en los procesos de eliminación como la autofagia. El fallo en la eliminación de estos agregados proteicos y, por tanto, su acumulación, puede resultar tóxico para las células. Multitud de estudios señalan la importancia de un buen funcionamiento de la autofagia para mantener el equilibrio entre la acumulación y la eliminación de proteínas defectuosas en el sistema nervioso, por lo tanto, estas alteraciones pueden ser la base de muchas enfermedades neurodegenerativas (Ghavami et al., 2014; Guo et al., 2018; Levine & Kroemer, 2019; Menzies et al., 2017). Por esta razón, se piensa que la desregulación o

fallos en este proceso podrían estar ligados a la formación de placas de amiloide y agregados de Tau característicos de la EA (Li et al., 2017). En algunos estudios *in vitro* con la línea celular humana dopaminérgica de neuroblastoma, SH-SY5Y, se ha observado que, tras el tratamiento con el péptido A β , se induce la formación de vesículas autofágicas de tal manera que el proceso de autofagia actúa como mecanismo neuroprotector ante la toxicidad causada por A β (Hung et al., 2009; Ohta et al., 2010). Hamano y colaboradores demostraron que la autofagia desempeña un papel importante en la eliminación de la proteína Tau, y que alteraciones en este proceso tienen como resultado la formación de agregados insolubles de Tau (Hamano et al., 2008). En el modelo animal murino de EA, APP/PS1, portador de la mutación sueca en el gen de *APP* y de una delección en el exón 9 del gen *PSEN1*, se ha observado un bloqueo del inicio del proceso de autofagia, una reducción en la formación de autofagosomas y, simultáneamente, acúmulos de autofagosomas, lo que pone de manifiesto la existencia de alteraciones en los procesos de autofagia (Han et al., 2018; Moreira et al., 2010; Zhao et al., 2018). Por último, en cerebros postmortem de pacientes con EA se han apreciado en diferentes estadios de la enfermedad, acumulaciones de vesículas autofágicas y alteraciones en los niveles de proteínas implicadas en la autofagia como LC3-II, p62 o Beclin 1, entre otras (Bordi et al., 2016; Pickford et al., 2008). Todas estas observaciones sugieren que la alteración del flujo autofágico puede contribuir a acumulación de A β y posiblemente al desarrollo de la patología de Alzheimer.

4.6. Alteraciones mitocondriales

En la EA se han encontrado evidencias de alteraciones mitocondriales que, como se ha comentado anteriormente, en algunos casos pueden ser consecuencia de aumentos del estrés oxidativo. Estas alteraciones en la homeostasis mitocondrial se han relacionado con la acumulación del péptido A β y, finalmente, con la muerte neuronal (Briston & Hicks, 2018). Las mitocondrias son orgánulos fundamentales de la célula porque desempeñan importantes funciones como la síntesis de ATP y el control de la muerte celular por apoptosis y están implicadas en procesos de supervivencia celular, en la señalización de Ca²⁺ y en el mantenimiento de la homeostasis celular (Kannurpatti, 2017; Tzameli, 2012). Son orgánulos compuestos por una doble membrana, la mitocondrial externa (MME) y la membrana mitocondrial interna (MMI) que encierran a la matriz mitocondrial. La MMI

posee una estructura más compleja, formando crestas mitocondriales para aumentar su superficie y en ella se lleva a cabo el transporte de electrones en la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa (Mejia & Hatch, 2016; Schwarzländer & Fuchs, 2017). La distribución de las mitocondrias en el cuerpo celular atiende a los requerimientos energéticos. En las neuronas, las mitocondrias juegan un papel relevante porque obtienen la energía en forma de ATP, fundamentalmente a través de la fosforilación oxidativa (Galindo et al., 2010). Además, las mitocondrias están implicadas en el desarrollo de la sinapsis, en el transporte axonal y en la regulación del metabolismo del Ca^{2+} (Reddy & Reddy, 2017; Wang et al., 2009).

Las mitocondrias constituyen una red dinámica en la que todas ellas dentro de la célula están interconectadas y sometidas a un equilibrio dinámico (Hoppins, 2014). El número, la forma y el tamaño de las mitocondrias existentes en las células viene determinado por el equilibrio entre un conjunto de procesos agrupados en el concepto de dinámica mitocondrial que incluyen la biogénesis mitocondrial y el balance entre la fusión y la fisión mitocondrial (Guo et al., 2018; Meyer et al., 2017).

Los procesos de fusión y fisión mitocondrial están relacionados y finamente regulados. La fusión mitocondrial es necesaria para el intercambio de material genético y proteínas entre las mitocondrias (Franco et al., 2016), mientras que la fisión mitocondrial también permite a las mitocondrias separarse de la red mitocondrial y transportarse a otras localizaciones celulares donde la demanda metabólica sea alta (Grohm et al., 2012). Las principales proteínas implicadas en la fusión mitocondrial son las mitofusinas 1 y 2 (Mfn1 y Mfn2) y el factor de atrofia óptica (Opa1; del inglés *Optic atrophy type1*). Las mitofusinas, proteínas con actividad GTPasa, son responsables de la fusión de la MME (Koshiba et al., 2004) y Opa1, también con actividad GTPasa, mantiene la fusión entre mitocondrias a través de la MMI permitiendo formar una red mitocondrial estable (Bertholet et al., 2016; Del Dotto et al., 2018). En la fisión mitocondrial intervienen la proteína relacionada con dinamina 1 (Drp1; del inglés *Dynammin-related protein*) y la proteína de fisión mitocondrial 1 (Fis1; del inglés *mitochondrial fission protein 1*). Drp1 también tiene actividad GTPasa y se encuentra distribuida por el citosol. Ante un estímulo de fisión, Drp1 es reclutada hacia la mitocondria, donde se queda anclada en la MME uniéndose a Fis1 y, a través de la hidrólisis de GTP, es capaz de constreñir y estrangular a las mitocondrias dividiéndolas en dos (Pagliuso et al., 2018; Serasinghe & Chipuk, 2017) (figura 2).

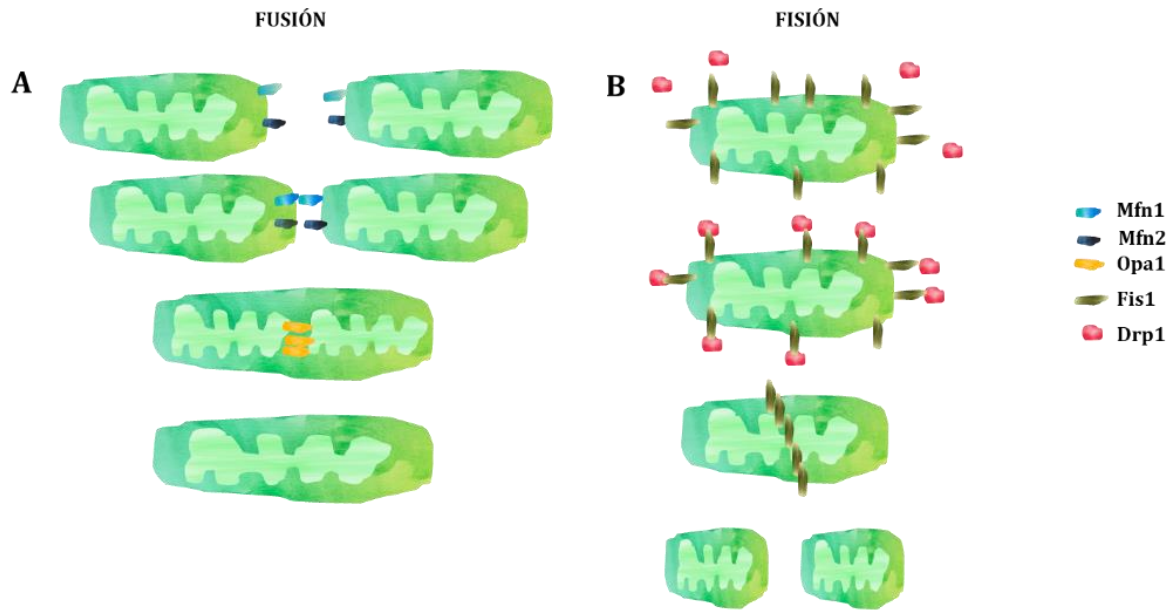


Figura 2. Fusión y fisión mitocondrial. **A)** Fusión mitocondrial. Mfn1 y Mfn2 son proteínas mitocondriales localizadas en la membrana mitocondrial externa (MME) mientras que Opa1 se encuentra en la membrana mitocondrial interna. Las tres, Mfn1, Mfn2 y OPA1, regulan la fusión mitocondrial. **B)** Fisión mitocondrial. Fis1 se localiza de forma uniforme por toda la membrana mitocondrial externa mientras que Drp1 se encuentra en el citosol. Ante un estímulo de fisión, Drp1 es reclutada en las mitocondrias para comenzar el proceso de fisión. (Fuente: elaboración propia).

Aparte de la regulación del número, tamaño y forma de las mitocondrias, los procesos de fusión y fisión están relacionados con los procesos de control de calidad mitocondrial en los que las mitocondrias dañadas o defectuosas son eliminadas a través de mitofagia (Mishra & Chan, 2016).

El sistema de mitofagia más estudiado es el controlado por la serina/treonina quinasa PINK1 (del inglés *PTEN-induced kinase 1*) y la E3 ubiquitina ligasa, también conocida como Parkina. Cuando una mitocondria está dañada, se separa de la red mitocondrial mediante el proceso de fisión para ser eliminada por mitofagia. Cualquier estímulo que disminuya de forma permanente el $\Delta\Psi_m$ como un aumento de ROS, daños en el ADN mitocondrial o presencia de proteínas mal plegadas sirve para iniciar el proceso de fisión mitocondrial. En condiciones normales, PINK1 es importada al espacio intermembrana de la mitocondria para su rápida degradación a través de diversas proteasas, pero ante una disminución permanente del $\Delta\Psi_m$, se detiene la degradación de PINK1, acumulándose en la MME. Esta acumulación de PINK1 en la MME provoca el

reclutamiento de Parkina desde el citosol hacia la mitocondria (Lazarou et al., 2015). Seguidamente, Parkina es fosforilada por PINK1 y activa su actividad E3 ubiquitina-ligasa que permite ubiquitinar las proteínas de la MME, Mfn1 y Mfn2. La ubiquitinación de las mitofusinas induce su degradación y, por tanto, el equilibrio de fusión-fisión mitocondrial cede a favor de la fisión de la mitocondria dañada. Ante la presencia de proteínas disfuncionales ubiquitinadas, la proteína adaptadora p62 es capaz de unirse a ubiquitina y a LC3-II, que está ubicada en la membrana de los autofagosomas. El autofagosoma encapsula a las mitocondrias dañadas y a continuación se produce la fusión del autofagosoma con los lisosomas, que contienen en su interior enzimas hidrolíticas que degradaran la mitocondria finalizando el proceso de mitofagia (Hamacher-Brady & Brady, 2016; Pickles et al., 2018) (figura 3). Aunque la mitofagia dependiente de Parkina es la más caracterizada hasta el momento, existen trabajos que muestran la existencia de mitofagia independiente de Parkina (Kageyama et al., 2014; Lazarou et al., 2015; Murakawa et al., 2015; Sterky et al., 2011). En ellos se indica bien un reclutamiento directo de la maquinaria autofágica a través de la activación de receptores de autofagia en las mitocondrias dañadas o bien la actuación de otras E3 ubiquitina-ligasa distintas a Parkina.

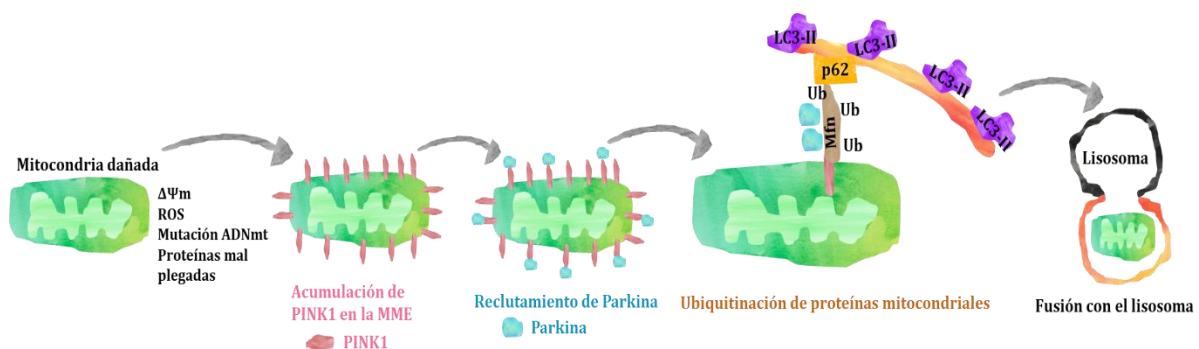


Figura 3. Proceso de mitofagia dependiente de Parkina. El aumento de ROS, los daños en el ADN mitocondrial o la presencia de proteínas mal plegadas disminuyen el $\Delta\Psi_m$, provocando la acumulación de PINK1 en la membrana mitocondrial externa y el reclutamiento de Parkina desde el citosol. Parkina se encarga de ubiquitinar (ub) proteínas mitocondriales como Mfn1. p62 actúa como adaptador de proteínas ubiquitinadas y de LC3-II situado en la membrana de los autofagosomas. El autofagosoma se cierra sobre sí mismo engullendo a las mitocondrias dañadas y, posteriormente, se fusiona con el lisosoma, permitiendo la hidrolización de contenido del autolisosoma por las enzimas lisosomales. (Fuente: elaboración propia).

Por otra parte, otro proceso que interviene en el mantenimiento de la cantidad de mitocondrias en la célula es la biogénesis mitocondrial que permite la generación de nuevas mitocondrias a partir de las ya existentes. Su inducción puede venir motivada por

diferentes causas como el ejercicio, la disponibilidad de nutrientes, niveles hormonales, el ciclo circadiano o condiciones de hipoxia (Ventura-Clapier et al., 2008). A nivel molecular, el principal regulador de la biogénesis mitocondrial es PGC-1 α (del inglés *Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1 alpha*), cofactor que regula genes implicados en el metabolismo, en la función y en la biogénesis mitocondrial (Scarpulla, 2011). Posiblemente, la biogénesis mitocondrial se regule para compensar la demanda energética celular ante situaciones de mayor demanda fisiológica o de déficits energéticos sobrevenidos de mitocondrias defectuosas y/o en proceso de eliminación (Lemecha et al., 2018; Meyer et al., 2017).

En particular en la EA, la proteína Tau hiperfosforilada y el péptido A β , pueden ser responsables de las alteraciones en la función y en la dinámica mitocondrial mediante la interrupción de la respiración mitocondrial, el metabolismo energético y el equilibrio de la dinámica mitocondrial, causando una disminución de los niveles de ATP, aumentando la liberación de factores apoptóticos, aumentando de la entrada de Ca $^{2+}$ al citosol, aumentando la producción de ROS y disminuyendo el $\Delta\Psi_m$ (Kandimalla et al., 2016; Virginie Rhein et al., 2009; Yan et al., 2018) (figura 4).

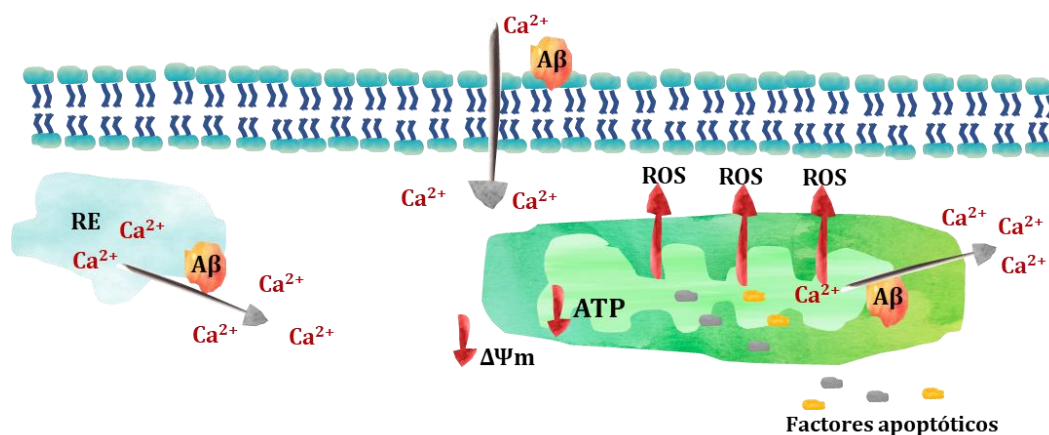


Figura 4. Interacción de A β con las mitocondrias. El péptido A β es capaz de alterar el metabolismo del Ca $^{2+}$ en la membrana plasmática, en el RE (retículo endoplasmático) y en las mitocondrias. La acumulación de A β en las mitocondrias aumenta la producción de ROS, aumenta la liberación de factores apoptóticos, disminuye la producción de ATP y disminuye el $\Delta\Psi_m$. (Fuente: elaboración propia).

Algunos estudios han descrito la existencia de vesículas autofágicas con proteínas sin digerir en la EA. Concretamente, en un estudio reciente se han encontrado acúmulos de autofagosomas rodeando a mitocondrias no funcionales que no han sido eliminadas tanto

en cultivos primarios de neuronas corticales de ratones modelo de EA como en cerebros de pacientes con EA. Este mismo estudio, además puso de manifiesto en el cultivo primario de neuronas y en los cerebros de pacientes con EA, que Parkina era reclutada desde el citosol hacia las mitocondrias despolarizadas desencadenando el proceso de mitofagia por la vía PINK1/Parkina (Ye et al., 2015). Numerosos estudios reforzaron la idea de que la acumulación de mitocondrias aberrantes se debe a un deterioro en el proceso de mitofagia y que en algunas enfermedades neurodegenerativas este deterioro podría respaldar la patogénesis de las mismas (Berezhnov et al., 2016; Du et al., 2017; Reddy & Oliver, 2019).

5. Factores de riesgo en la EA

Existen diversos factores de riesgo asociados a la EA siendo el principal de ellos la edad (Prince et al., 2013). Sin embargo, en los últimos años se han identificado otros factores de riesgo ambientales como el sexo (Pike, 2017), la hipertensión arterial, la diabetes, la capacidad cognitiva o el nivel educacional (Samadi et al., 2019; Yegambaram et al., 2015). Algunos de estos factores de riesgo son modificables y están relacionados con el estilo de vida, como el tabaquismo, (Durazzo et al., 2014), la dieta, el sedentarismo o la exposición a ciertos químicos (Baglietto-Vargas et al., 2016). Últimamente, también están cobrando importancia las infecciones crónicas bacterianas, virales y micóticas como factor de riesgo en la EA. La presencia de estos agentes infecciosos en el SNC a lo largo del tiempo, desencadena una inflamación crónica progresiva y un deterioro del sistema inmunológico que finalmente producen disfunción sináptica progresiva y pérdida neuronal (Ashraf et al., 2019; Itzhaki et al., 2016).

Diferentes a estos factores, son los factores de riesgo genético como el genotipo *APOE*, y la presencia de variantes en otros genes como *TREM2*, *CLU*, *TET2* y *SORL1*, entre otros.

El genotipo *APOE*, es el factor de riesgo genético más estudiado en la EA. El gen *APOE* codifica para la apolipoproteína E (ApoE) cuya función principal es el transporte de lipoproteínas de baja densidad (LDL; del inglés *low-density lipoprotein*) como es el colesterol. Se trata de un gen polimórfico con tres variantes alélicas. Los tres alelos más comunes son $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$ que codifican para tres isoformas de la proteína ApoE llamadas E2, E3 y E4, respectivamente (Xu et al., 2014). La isoforma E3 es la isoforma de la proteína más común, seguida por la isoforma E4. La isoforma E2 es la menos frecuente en la

población (Butterfield & Mattson, 2020). Ser portador de la isoforma E4 aumenta el riesgo de desarrollar EA mientras que la isoforma E2 puede disminuir el riesgo. Las personas portadoras de una copia de la isoforma E4 tienen un riesgo 3 veces mayor de desarrollar EA que los no portadores, mientras que aquellos que heredan dos copias tienen un riesgo de 8 a 12 veces mayor (Apostolova et al., 2014; Hays et al., 2019). Las diferencias entre estas isoformas las otorgan los aminoácidos presentes en determinadas posiciones y afectan a la estructura de las isoformas de ApoE y a su capacidad para unir lípidos, receptores y el péptido A β (Xu et al., 2014). Los mecanismos mediante los cuales el genotipo *APOE4* incrementa el riesgo de desarrollar la patología son múltiples. La mayoría de ellos están relacionados con el péptido A β pues ApoE puede influir en la regulación de sus niveles, en su agregación y toxicidad y en sus efectos sobre la neuroinflamación. Otros mecanismos afectados por el genotipo *APOE4* y que incrementan el riesgo de desarrollar la patología están relacionados con el metabolismo de la glucosa o la excitabilidad neuronal (Liu et al., 2013; Tai et al., 2014).

En relación con otros factores de riesgo genético, los estudios de genoma completo han identificado numerosos genes candidatos que representan un riesgo de susceptibilidad para la EA. El gen *TREM2* se expresa en la microglía y tiene una función protectora evitando el crecimiento de las placas de amiloide y la acumulación de A β (Wolfe et al., 2019). El gen *CLU* que codifica para la proteína clusterina, la cual está implicada en el aclaramiento de los péptidos amiloides (Almeida et al., 2018). Recientemente, se ha identificado un nuevo gen candidato, el gen *TET2*, que juega un papel importante durante el envejecimiento, aprendizaje y memoria y que se ha descrito como factor de riesgo en la EA además de en otras enfermedades neurodegenerativas como la demencia frontotemporal y la esclerosis lateral amiotrófica (Cochran et al., 2020). En cuanto a *SORL1*, distintas mutaciones en este gen se asociaron con casos de EA de inicio temprano y, en los últimos años, se ha visto que también actúa como factor de riesgo en la EA de inicio tardío (Holstege et al., 2017; Takatori et al., 2019; Verheijen et al., 2016; Young et al., 2015).

6. Estrategias terapéuticas en la EA

En la actualidad, aún no puede hablarse de tratamiento etiopatogénico de la EA ya que, si bien se conocen varios de sus determinantes, en su etiología intervienen

numerosos factores genéticos y ambientales y se desconoce la causa o causas primarias de su origen. Hoy por hoy, no existe un tratamiento etiológico y, por lo tanto, curativo de la EA. Ninguno de los tratamientos farmacológicos disponibles consigue detener la disfunción y muerte neuronal causante de los síntomas y desarrollo de la EA. No obstante, sí se dispone de fármacos de utilidad y eficacia comprobada como agentes paliativos, que mejoran los síntomas, pero de forma limitada y que actúan sobre diversos factores de los que es bien conocida su participación en el proceso patológico.

El tratamiento actual de la enfermedad, esencialmente sintomático, se basa en tres inhibidores de la enzima colinesterasa y la memantina, que interviene sobre el sistema glutamatérgico (Birks et al., 2015; Birks & Harvey, 2018; Loy & Schneider, 2006; McShane et al., 2006). Los inhibidores de colinesterasa incluyen 3 fármacos: donepezilo, rivastigmina y galantamina, que bloquean la degradación de acetilcolina en el cerebro preservando la función sináptica (Tan, 2014). Como consecuencia de esta acción, algunos síntomas de la enfermedad pueden aliviarse o estabilizarse temporalmente (Matsunaga et al., 2018). Por su parte, la memantina bloquea el receptor NMDA y actúa regulando los niveles de glutamato, que tienden a incrementarse durante la EA. De esta forma la memantina protege a las células cerebrales del efecto tóxico ejercido por un exceso de glutamato (Hynd et al., 2004).

Desde el año 2003, no se han aprobado nuevos medicamentos para el tratamiento de la EA. No obstante, se ha producido una constante búsqueda de estrategias y alternativas terapéuticas basadas en las hipótesis que tratan de explicar el origen u orígenes de la EA, como la hipótesis de la cascada de amiloide, la hipótesis colinérgica, la hipótesis dendrítica, la hipótesis de la cascada mitocondrial, la hipótesis metabólica, la hipótesis inflamatoria, etc. (Folch et al., 2016). Por tanto, estas estrategias terapéuticas comprenden diversos enfoques basados en mecanismos como el aclaramiento del péptido A β y/o de los depósitos de proteína Tau, en la función de la apolipoproteína-E (ApoE), en la neuroprotección y neuroinflamación, así como enfoques no basados en mecanismos que incluyen estimulación cognitiva sintomática, prevención de la EA, modificaciones del estilo de vida y manejo de factores de riesgo, incluyendo intervenciones no farmacológicas (*Home - ClinicalTrials.gov*, n.d.).

En las últimas dos décadas, la industria farmacéutica se ha centrado principalmente en el enfoque del aclaramiento del péptido A β , dedicando recursos extraordinarios para desarrollar fármacos eficaces para la EA. Sin embargo, hasta la fecha, los ensayos clínicos

han tenido una tasa de fracaso muy alta, a menudo debido a efectos adversos graves o falta de eficacia terapéutica. Por ello, estos múltiples fallos de los candidatos a fármacos en los ensayos clínicos han llevado a los investigadores a cuestionar la viabilidad de esta estrategia (Drachman, 2014).

La evidencia científica acumulada hasta la fecha sugiere que la neuropatología de la EA muestra una naturaleza multifactorial e involucra múltiples vías biológicas. La hipótesis de cascada amiloide ha dominado el campo durante más de 30 años, resultando en un gran número de estudios centrados en la inhibición de su producción y en la eliminación de su acumulación y de las placas de A β . Desafortunadamente, los enfoques amiloidogénicos no han demostrado mejoras en la cognición en los pacientes. Por ello, muchas de las farmacoterapias novedosas no deben limitarse a los postulados de la hipótesis de la cascada de amiloide. Por eso se están explorando otras diferentes posibilidades, siempre basadas en los mecanismos etiopatológicos de la EA.

6.1 Mitocondria como diana terapéutica

Las alteraciones mitocondriales se han identificado como un mecanismo central en múltiples enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la EA y, por lo tanto, los procesos en los que intervienen las mitocondrias se han propuesto y explorado como una potencial diana terapéutica (Chakravorty et al., 2019; Macdonald et al., 2018).

Hasta la fecha, las estrategias de tratamiento dirigidas a aspectos de la disfunción mitocondrial se han centrado en prevenir los procesos mitocondriales vinculados principalmente al estrés oxidativo y la apoptosis. Por lo tanto, sería razonable suponer que el tratamiento antioxidante debe resultar beneficioso para la EA. Sin embargo, hasta la fecha los ensayos clínicos con antioxidantes testados en pacientes con EA no han obtenido beneficios claros (Lloret et al., 2019; Miller et al., 2005). El uso de un posible candidato antioxidante dirigido a la mitocondria, el mesilato de mitoquinona (mitoQ), demostró la prevención contra la muerte celular y el estrés oxidativo inducidos por A β en las neuronas corticales de un modelo animal (Mcmanus et al., 2011). Más allá de los efectos antioxidantes, la administración de mitoQ redujo con éxito la acumulación de A β , la astrogliosis y la pérdida sináptica e indujo un mayor rendimiento cognitivo (Mcmanus et al., 2011). Ante estos resultados, se diseñó un ensayo clínico con mitoQ (NCT03514875), del que todavía no han trascendido sus resultados. Además de mitoQ,

se están desarrollando otros ensayos clínicos con otras terapias antioxidantes (R+pramipexol, Sunphenon epigallocatechin gallate (EGCg), DL-3-n-butylphthalide (NBP), resveratrol) y una molécula potenciadora mitocondrial (S-equol) (Cascella et al., 2017; Wilkins et al., 2017).

También existe gran cantidad de evidencias sugiriendo que la mejora directa de la función mitocondrial puede suponer una mejoría en la patología de la EA (Mattson & Arumugam, 2018). Nuevos enfoques buscan reforzar la función mitocondrial utilizando intermediarios de vías bioenergéticas celulares para su potencial terapéutico, ya que parecen mostrar beneficios en modelos de EA (Murray et al., 2016).

Las mitocondrias son capaces de regular la respuesta inflamatoria de la célula mediante la activación del inflamasoma, crucial en la patogénesis de la EA (Walsh et al., 2014) y que se ha asociado con la disfunción mitocondrial (Iyer et al., 2013; Shimada et al., 2012; Walsh et al., 2014; Wilkins et al., 2015; Zhou et al., 2011). El inflamasoma es un complejo multiproteico intracelular, que se forma por la acción de los receptores tipo NOD (del inglés *nucleotide-binding oligomerization domain*) que, a su vez, se activan ante diferentes amenazas para la célula. El inflamasoma controla la actividad de la caspasa-1, formando parte del sistema inmune innato. Diversos estudios han descrito que tras la administración de inhibidores del inflamasoma en modelos animales de amiloidosis se produce una mejoría sustancial en la neuropatología que desarrollan esos ratones (Dempsey et al., 2017; Yin et al., 2018).

El deterioro o la disfunción mitocondrial se traduce, no sólo en una mayor producción de ROS sino también de respuestas inflamatorias, de ahí la pertinencia y necesidad de identificar mecanismos críticos para mejorar la calidad mitocondrial, limitando la producción de respuestas tóxicas. Al mismo tiempo, también se identifican oportunidades terapéuticas para preservar la viabilidad neuronal que permitan retrasar o revertir manifestaciones patológicas de la EA.

6.2 Fosfodiesterasas como dianas terapéuticas de la EA

Como se ha descrito en el apartado anterior, uno de los mecanismos más ampliamente estudiados en relación con el proceso neurodegenerativo de la EA es la neuroinflamación. La activación de la microglía se traduce en una primera respuesta inflamatoria que informa y recluta a las células del sistema inmune. Sin embargo, cuando

se produce una sobreactivación de la microglía, tal y como ocurre en la EA, este proceso inflamatorio se descontrola, adquiriendo carácter crónico y potenciando así la neurodegeneración (Pearse et al., 2004). Diversos estudios sugieren que los niveles de segundos mensajeros en las vías de señalización celular pueden tener un papel importante en la neuroprotección y en la respuesta neuroinflamatoria. Un ejemplo son los nucleótidos cíclicos adenosín monofosfato cíclico (AMPC) y guanosín monofosfato cíclico (GMPc) (Lonze & Ginty, 2002; Volakakis et al., 2010). Estas moléculas señalizadoras regulan gran cantidad de procesos como la neurogénesis, el establecimiento de los circuitos neuronales, la apoptosis, la inflamación, la plasticidad o la memoria (Kelly, 2018; Lonze & Ginty, 2002; Volakakis et al., 2010). En la EA, estos procesos están dañados, lo que puede significar que estas vías de señalización están comprometidas en los pacientes. La regulación mayoritaria de los nucleótidos cíclicos en las células no se consigue por su síntesis, sino por su degradación, a través de las fosfodiesterasas (PDEs, del inglés *phosphodiesterases*).

Las PDEs, pertenecientes a la familia de metaloproteínas, hidrolizan los nucleótidos cíclicos dando lugar a sus correspondientes 5'-nucleósidos monofosfato en presencia de cationes divalentes. Estas enzimas pueden ser específicas de AMPC, GMPc o bien, pueden utilizar ambos sustratos. Por tanto, las PDEs son enzimas clave en la cascada de señalización de AMPC y se han propuesto como diana farmacológica ideal para controlar los niveles intracelulares de este nucleótido (Maurice et al., 2014). Se clasifican en 11 grupos (PDE1-11) en base a su secuencia de aminoácidos, propiedades bioquímicas, sensibilidad a inhibidores, mecanismos reguladores y por sus afinidades por el AMPC o el GMPc (Conti & Beavo, 2007). Los cambios en los niveles de PDEs afectan al nivel de nucleótidos cíclicos y, en consecuencia, a la neuroprotección y la plasticidad celular (Jancic et al., 2009). Es por esto por lo que la inhibición de las PDEs se ha propuesto como una herramienta terapéutica para el tratamiento de diversas enfermedades neurodegenerativas (Menniti et al., 2006). De hecho, en base a los prometedores efectos que se han descrito por parte de los inhibidores de PDEs en modelos animales de la EA, se prevé cercana la puesta en marcha de ensayos clínicos (Prickaerts et al., 2017).

La vía de señalización AMPC/PKA también participa en la regulación de la fisiología mitocondrial (Carlucci et al., 2008; Rinaldi et al., 2018; Valsecchi et al., 2013) a través de la fosforilación dependiente de PKA de varias proteínas mitocondriales implicadas en la mitofagia y los procesos de fusión y fisión mitocondrial (Akabane et al., 2016; Cereghetti

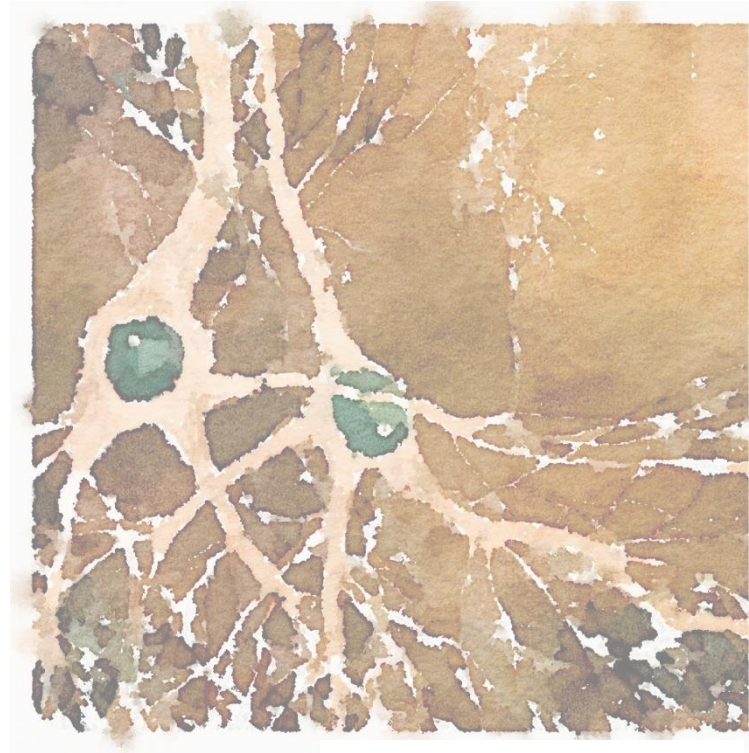
et al., 2008; Cribbs & Strack, 2007). Se ha descrito que la activación de esta vía de señalización contribuye a incrementar la transcripción de PGC-1 α (Knutti & Kralli, 2001; Puigserver & Spiegelman, 2003; Scarpulla, 2011; Scarpulla et al., 2012; Ventura-Clapier et al., 2008). La administración de inhibidores de PDEs como el resveratrol promueve la biogénesis mitocondrial vía PGC-1 α (Park et al., 2012). Otros estudios demostraron que inhibidores de PDE4 como el rolipram son capaces de restaurar los niveles de expresión de PGC-1 α en situaciones de fibrosis renal y proteger así la función mitocondrial (Ding et al., 2018). En pacientes con EA está descrita una menor actividad de la vía de señalización AMPc/PKA (Liang et al., 2007). Por otro lado, diversos estudios mostraron cambios en la expresión en los mRNAs de PDEs a nivel cerebral en pacientes con EA. En concreto, se observó un aumento de la expresión de PDE4A, PDE4B y PDE7A en las primeras etapas de la EA, mientras que las etapas clínicas más severas se vieron asociadas con un aumento de la expresión PDE8B, curiosamente en las regiones cerebrales asociadas a la memoria como la corteza entorrinal (Pérez-Torres et al., 2003). En el mismo trabajo también se describió la existencia de un aumento de los niveles del mRNA de la isoforma PDE7A en el giro dentado del hipocampo en pacientes con EA respecto a cerebros de individuos sanos (Pérez-Torres et al., 2003).

6.3 Inhibidores de fosfodiesterasa 7 en la EA

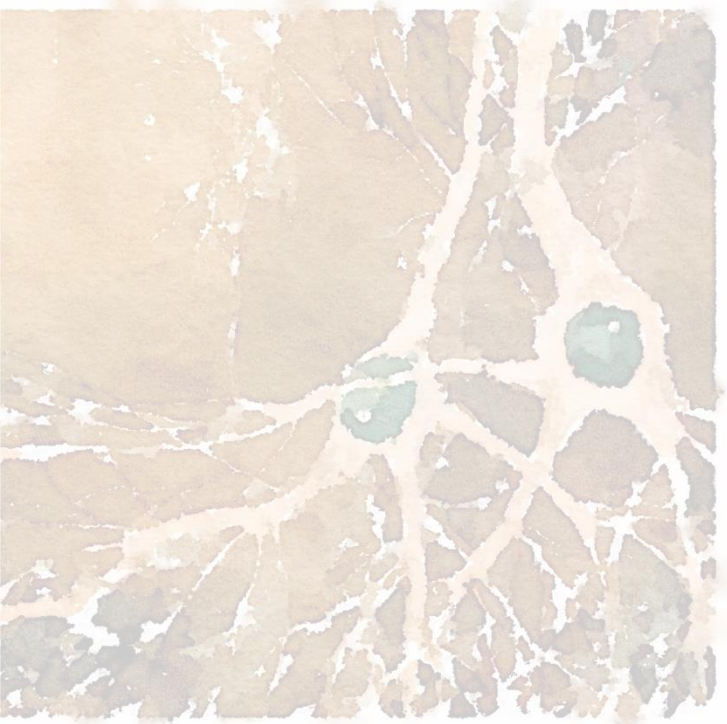
Como se ha comentado anteriormente, uno de los criterios de clasificación de las 11 familias de las PDEs se basa en el grado de afinidad por sus inhibidores. La familia PDE7 está constituida por dos isoformas, PDE7A y PDE7B y se distribuye por diversos tejidos corporales incluyendo el SNC (Miró et al., 2001; Pérez-Torres et al., 2003). Estudios previos de nuestro grupo de investigación testaron los efectos de un inhibidor selectivo de PDE7, llamado S14, en un modelo experimental de EA (Perez-Gonzalez et al., 2013). En este trabajo, utilizando ratones APP/PS1, se puso de manifiesto la capacidad de esta molécula para atravesar la barrera hematoencefálica y, tras un tratamiento crónico de 5 semanas, se vio como el compuesto ejercía sus efectos neuroprotectores, incluyendo disminución de la acumulación cerebral de A β , reducción de la inflamación glial y prevención de la muerte celular (Perez-Gonzalez et al., 2013).

El poder terapéutico de este inhibidor de PDE7, al que a partir de ahora nos referiremos como S14, también ha sido demostrado en otras enfermedades

neurodegenerativas como el Parkinson (Morales-Garcia et al., 2011, 2015, 2017). Sin embargo, aunque los efectos neurotróficos, neuroprotectores e inmunomoduladores de S14 han sido constatados en estos modelos experimentales de neurodegeneración, todavía no se conoce el posible efecto que pueda ejercer sobre otros procesos relacionados con la etiopatogenia de la EA como las alteraciones mitocondriales o el proceso de autofagia.



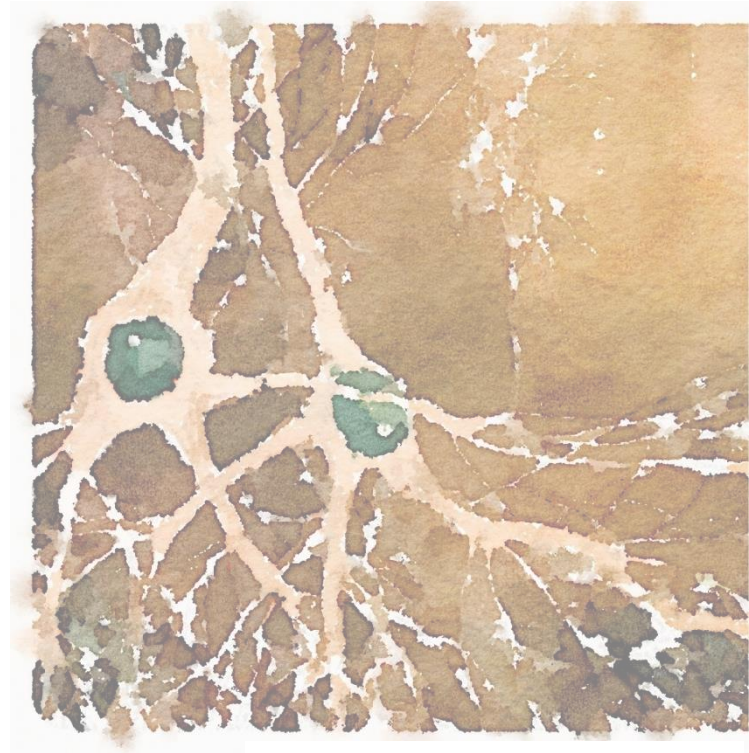
OBJETIVOS



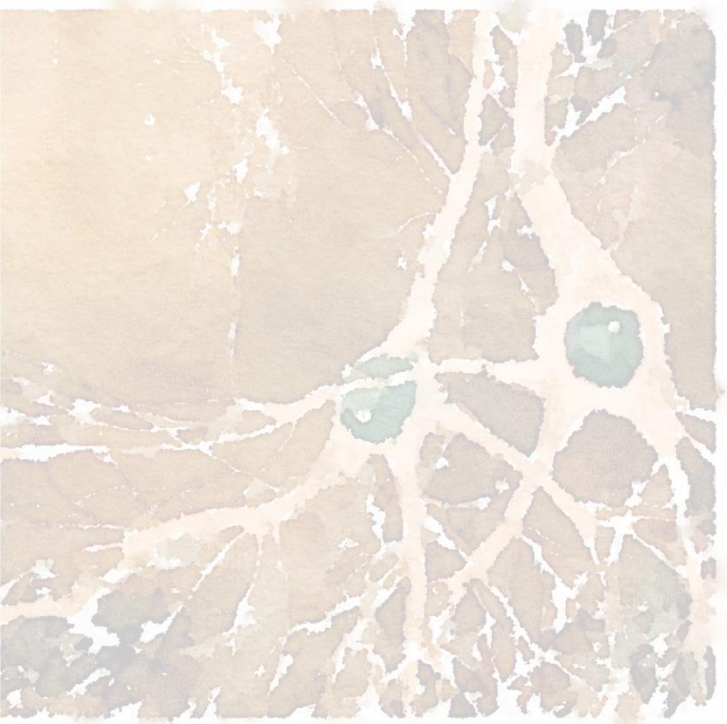
Las alteraciones en la homeostasis mitocondrial y la autofagia constituyen una característica en la patogénesis de la EA. En esta tesis partimos de la hipótesis de que las alteraciones relacionadas con la dinámica mitocondrial y la autofagia en la EA pueden ocurrir en etapas tempranas de la enfermedad incluso cuando no son detectables los característicos depósitos de A β . Diversos estudios tanto *in vivo*, con muestras de pacientes y de modelos animales, como *in vitro* han relacionado el deterioro en la dinámica mitocondrial y en los procesos de autofagia con la acumulación del péptido A β (Davis et al., 2018; Manczak et al., 2011, 2018; Tönnies & Trushina, 2017). Estudios de nuestro grupo y, en colaboración con otros grupos, mostraron alteraciones relacionadas con la función mitocondrial y con los procesos de autofagia en regiones cerebrales como la corteza cerebral y los plexos coroideos en diferentes modelos experimentales de la EA (Antequera et al., 2009; Bartolome et al., 2020; Carro et al., 2010; Petrov et al., 2015). Estas alteraciones mitocondriales podrían explicar la degeneración y disfunción sináptica observada en los pacientes con EA (Xu et al., 2017; Yan et al., 2019). Pero, todavía existen cuestiones sin resolver relacionadas con la aparición de las alteraciones mitocondriales en la patología de la EA y su asociación con la acumulación cerebral del péptido A β así y de ésta con los déficits en el metabolismo energético observados en los pacientes con EA. Por este motivo, el objetivo general de esta tesis ha sido el estudio de la aparición de alteraciones mitocondriales y de los procesos de autofagia a lo largo del desarrollo de la EA, utilizando para ello diferentes modelos *in vivo* e *in vitro* de la enfermedad. Este objetivo general se divide en los siguientes objetivos específicos:

1. Estudio de la dinámica mitocondrial en el cerebro de ratones APP/PS1 como modelo *in vivo* de EA.
2. Validación de los resultados *in vivo* de dinámica mitocondrial en modelos *in vitro* de amiloidosis: cultivos neuronales primarios, células SH-SY5Y y células SK-APP.
3. Análisis del efecto del péptido A β en procesos autofágicos utilizando diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* de EA.
4. Estudio del efecto de un inhibidor de PDE7, S14, sobre las alteraciones mitocondriales observadas en los modelos *in vitro* e *in vivo* de EA.

5. Análisis del efecto del inhibidor de PDE7, S14, sobre los procesos autofágicos inducidos por la sobrecarga de A β .



MATERIAL Y MÉTODOS



1. Compuestos

El péptido β -amiloide de 42 aminoácidos ($A\beta_{42}$) se adquirió en AnaSpec (AnaSpec, California, EE.UU.) y se preparó un stock de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ disolviéndolo en ácido acético (CH_3COOH) 0,1 M. Para los cultivos celulares, se añadió el péptido $A\beta_{42}$ en su forma oligomerizada ya que la forma tóxica que se ha encontrado en la EA tiene una configuración oligomérica. A partir del stock inicial de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (monomérico), se prepararon stocks de $A\beta_{42}$ oligomerizado. El péptido se oligomerizó en medio DMEM (del inglés, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*; Life Technologies, California, EE. UU.) sin rojo fenol durante 24 horas a 4 °C. La concentración final de $A\beta_{42}$ oligomerizado utilizada en los cultivos fue de 1 μM .

Para los estudios de autofagia, el compuesto inhibidor de la autofagia, bafilomicina A1, que impide la unión del autofagosoma al lisosoma, se adquirió en Sigma (Sigma-Aldrich, Misuri, EE. UU.). Se preparó un stock 40 μM en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, Misuri, EE. UU.) que se dividió en diferentes alícuotas. La concentración final que se utilizó en los cultivos fue de 100 nM.

Para los estudios de mitofagia se usó el compuesto CCCP (carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona; Sigma-Aldrich, Misuri, EE. UU.), un agente desacoplante e inductor de mitofagia. La concentración final que se utilizó en los cultivos fue de 10 μM .

El inhibidor de PDE7, S14 fue sintetizado en el CIB-CSIC siguiendo los procedimientos descritos anteriormente (Castaño et al., 2009). El compuesto se diluyó en 0,5% w/v celulosa carboxil metil sódica (Na-CMC) y 0,1% v/v Tween 80 en una suspensión de agua. S14 fue disuelto en DMSO y después diluido en medio DMEM como se describió previamente (Perez-Gonzalez et al., 2013). Para los cultivos celulares, se añadió S14 a una concentración de 15 μM . En los experimentos *in vivo* se administró a una concentración de 15 mg/kg.

2. Animales de experimentación

Los estudios con animales se realizaron utilizando la cepa de ratones doble transgénica APP/PS1 (APP-swe, PSEN1dE9; The Jackson Laboratory, Maine, EE. UU.), como modelo animal de la enfermedad de Alzheimer. Estos ratones expresan la proteína

APP humana, con la mutación sueca (*Mo/HuAPP695swe*) y la proteína PS-1 humana mutada con una deleción en el exón 9 (*PSEN1- dE9*) (Scheuner et al., 1996). Ambas mutaciones están dirigidas para expresarse en neuronas del sistema nervioso central. El transgén humanizado *Mo/HuAPP695* permite a los ratones secretar el péptido A β humano de manera que estos animales presentan placas amiloides a partir de los 6 meses de edad en la corteza cerebral y en el hipocampo, además de gliosis, neuritis distróficas y pérdida de la memoria espacial (Minkeviciene et al., 2008). Como control del estudio, se seleccionaron ratones de la misma edad que no presentaban las modificaciones genéticas, es decir, ratones WT (del inglés, *wild type*) hermanos de la misma camada. Los ratones se sacrificaron por inhalación profunda de CO₂ a las diferentes edades: 3, 6 y 12 meses de edad. Seguidamente, se procedió a la extracción del cerebro, diseccionando corteza e hipocampo, que inmediatamente se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Para la obtención de cultivos primarios neuronales se utilizaron ratas de la cepa Wistar (Harlan, Indiana, EE. UU.).

La manipulación y los procedimientos experimentales se realizaron siguiendo los protocolos y legislación vigente (RD 53/2013; Directiva 2010/63/EU) y las recomendaciones ARRIVE. Todos los animales fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura (23 \pm 2 °C) y humedad (55 - 60%), con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y con acceso libre a comida y agua. Los ratones fueron alojados en grupos de 5-6 animales por jaula. Todos los procedimientos fueron realizados en la Unidad de Cirugía Experimental del Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre y fueron aprobados por el Comité de Bioética del mismo Instituto.

3. Genotipado de animales

Las camadas de ratones de cruces APP/PS1 se genotiparon a partir de muestras de ADN de las colas para separar a los animales portadores del genotipo de los no portadores, clasificados como WT. Para ello se siguió el siguiente protocolo:

a) Digestión de colas para obtención de ADN:

La digestión del extremo distal (2-5 mm) de las colas de animales de 21 días de edad se realizó en el tampón de lisis NID (del inglés, *non-ionic detergent*; KCl 1 M, Tris-HCl 1 M, MgCl₂ 1 M, gelatina 10%, Nonidet P40 2,5%, Tween20 2,5% pH 8,3 y proteinasa-K 0,1 μ g/ μ l) en agitación (1.400 rpm) a 56 °C, durante 3 horas. Seguidamente, se mantuvieron 20 minutos a 500 rpm a 96 °C, usando el termobloque Thermomixer compact (Eppendorf,

Madrid, España). Finalmente, el producto de la digestión se centrifugó a 8.000 rpm a 4 °C, durante 90 segundos. Tras la centrifugación se conservó el sobrenadante en el que se encontraba diluido en ADN (aproximadamente 50 µg).

b) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de *APP* y *PSEN1*:

Para la amplificación del ADN se utilizaron las parejas de oligonucleótidos recogidas en la tabla 1:

Tabla 1: Oligonucleótidos utilizados para las amplificaciones de *APP* y *PSEN1*

Nombre	Secuencia 5' a 3'	Tipo de Oligonucleótido	Amplicón
oIMR3610	AGGACTGACCACTCGACCAG	Transgén <i>APP</i>	377pb
oIMR3611	CGGGGTCTAGTTCTGCAT	Transgén <i>APP</i>	
oIMR8744	CAAATGTTGCTTGTCTGGTG	Control positivo interno	200pb
oIMR8745	GTCAGTCGAGTGCACAGTTT	Control positivo interno	
oIMR1644	AATAGAGAACGGCAGGAGCA	Transgén <i>PSEN1</i>	608pb
oIMR1645	GCCATGAGGGCACTAATCAT	Transgén <i>PSEN1</i>	
oIMR7318	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT	Control positivo interno	324pb
oIMR7339	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC	Control positivo interno	

La PCR se realizó en el termociclador Advanced primus 96 (VWR International Ltd, Pensilvania, EE. UU.), siguiendo el protocolo de ciclos indicado en la figura 5.

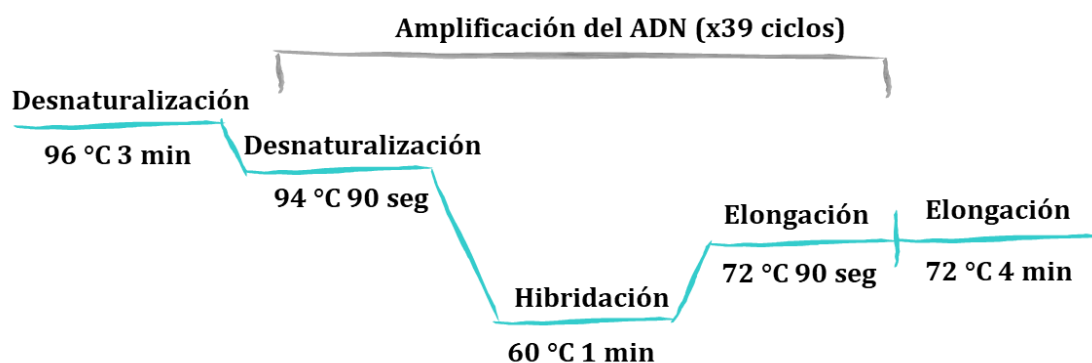


Figura 5. Protocolo de ciclos de PCR para la amplificación de *APP* y *PSEN1*. Comienza con desnaturalización del ADN a 96 °C durante 3 minutos, sigue con 39 ciclos de amplificación del ADN diana (desnaturalización a 94 °C durante 90 segundos, hibridación de los oligonucleótidos a 60 °C durante 1 minuto y elongación a 72 °C durante 90 segundos) y finaliza con un ciclo de elongación final a 72 °C durante 4 minutos.

Los productos de la PCR se separaron en geles de agarosa al 1% en tampón TAE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,5M, CH₃COOH, pH 8). En el caso del gen *APP*, en todos los ratones (transgénicos y no transgénicos) se visualizó una banda de 200 pares de bases correspondiente al segmento del gen endógeno. La presencia de una banda de 377 pares de bases confirmó la presencia del transgén *APP*. En el caso del gen *PSEN1* en todos los ratones (transgénicos y no transgénicos) se visualizó una banda de 324 pares de bases correspondiente al segmento del gen endógeno. La presencia de otra banda de 608 pares de bases confirmó la presencia del transgén *PSEN1* (figura 6).

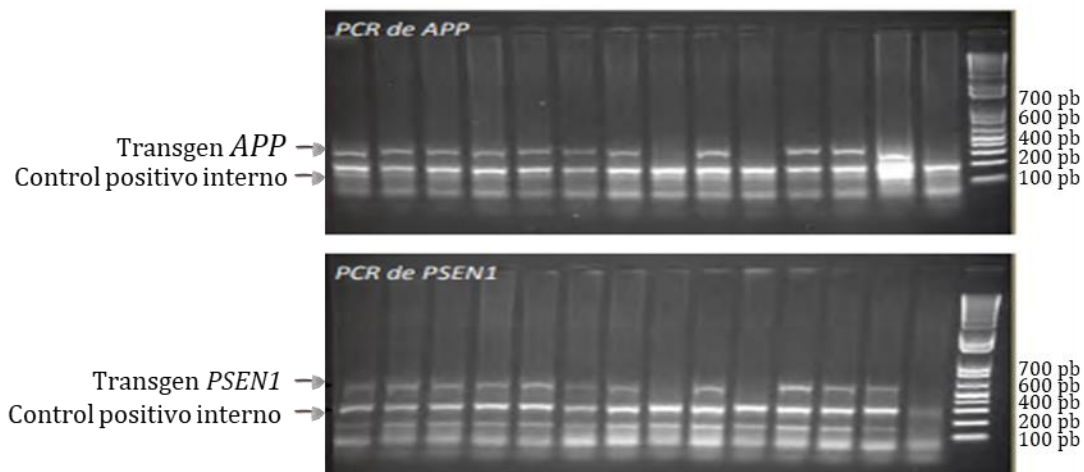


Figura 6. Productos de PCR de los transgenes *APP* (arriba) y *PSEN1* (abajo) en geles de agarosa. Se muestran las bandas control (200pb para *APP* y 324pb para *PSEN1*) y las de los transgenes incorporados (377pb para *APP* y 608pb para *PSEN1*). Los carriles que no presentan banda de los transgenes corresponden a los animales WT. A la derecha de cada uno de los geles aparece el marcador de peso molecular de 100 pares de bases.

4. Administración oral de S14 en ratones APP/PS1

El inhibidor de PDE7, S14, fue administrado por vía oral en ratones APP/PS1 y WT machos, de 6 meses de edad. El fármaco fue diluido en 0,5% w/v celulosa carboxil metil sódica (Na-CMC) y 0,1% v/v Tween 80 en una suspensión de agua y administrado a una concentración de 15 mg/kg una vez al día durante 5 semanas. El grupo control de animales recibió el mismo volumen de medio de dilución sin el fármaco S14 durante el mismo tiempo de administración.

Para la administración oral se utilizó una aguja con el extremo romo acoplada a una jeringa. Los ratones sin anestesiarse fueron sujetos e inmovilizados realizando una pinza en la zona del cuello con los dedos pulgar e índice y con el resto de la mano y dedos se sujetó al animal de la porción dorsal. Seguidamente, se fue introduciendo la aguja

acoplada a la jeringa poco a poco, permitiendo al animal que expusiera la lengua y que, por acción refleja, favoreciera la completa introducción de la aguja. Una vez la aguja estuvo introducida, se procedió a la administración, presionando el émbolo, del tratamiento correspondiente, a una velocidad moderada para evitar cualquier reacción adversa en el ratón. Una vez terminada la administración, se retiró la aguja y se comprobó la ausencia de signos o comportamientos anómalos. Esta pauta se repitió diariamente durante 5 semanas no observándose incidencias significativas (figura 7).



Figura 7. Administración oral del fármaco S14 o del vehículo en ratones APP/PS1 y WT.

5. Cultivos celulares

5.1 Cultivos primarios de neuronas de rata

Para el cultivo primario de neuronas corticales de embriones de rata se sacrificaron entre 7-9 embriones de ratas Wistar para cada replica experimental, correspondientes a los días 16-18 de gestación. Previamente, la rata gestante fue sacrificada con CO₂ y sometida a cesárea para la extracción de los embriones. Seguidamente, se procedió a la resección de los cerebros de los embriones a los que se les retiraron las meninges para la posterior disección de la corteza. Los trozos obtenidos se colocaron en 5 ml de PBS (del inglés, *phosphate buffered saline*: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, pH 7,4) a 4 °C y esterilizado. Pasados unos minutos, cuando los fragmentos de corteza habían sedimentado en el fondo del tubo, se retiró el PBS y se añadió medio de cultivo específico de neuronas Neurobasal (Life Technologies, California, EE. UU.), que contenía 2% de suplemento B27, 0,25% de L-glutamina 200mM y 1% penicilina/estreptomicina (todos ellos adquiridos en Life Technologies, California, EE. UU.). Inmediatamente después, el tejido se disgregó mecánicamente hasta conseguir homogeneizarlo. El homogenado se

centrifugó a 900 rpm durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y las células sedimentadas se resuspendieron en medio de cultivo Neurobasal precalentado a 37 °C. Las neuronas corticales se sembraron directamente en placas o cubreobjetos previamente cubiertos con poli-D-lisina (1 mg/ml, Sigma-Aldrich, Misuri, EE. UU.) tras el recuento de las células viables en la cámara Neubauer por exclusión de azul de tripán (Lonza, Basilea, Suiza). Según el experimento a realizar, las células se sembraron en diferentes soportes y a diferentes densidades y se incubaron a 37 °C con un 5% de CO₂. Los experimentos se llevaron a cabo entre los días 9 y 10 después de la realización del cultivo, momento en que las neuronas alcanzaron la madurez.

5.2 Líneas celulares

En los procedimientos experimentales de esta tesis se han utilizado las siguientes líneas celulares:

- Células SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266): línea celular humana dopaminérgica de neuroblastoma, con fenotipo adrenérgico y expresión de marcadores dopaminérgicos.
- Células SK-N-MC (ATCC® HTB-10) (en adelante, SK-Control): línea de neuroepitelioma humano, procedente de un tumor en la zona supraorbital.
- Células SK-N-MC-APP (en adelante, SK-APP): línea de neuroepitelioma humano, procedente de un tumor en la zona supraorbital, modificada, por sobreexpresión de forma estable de la isoforma de 695 aminoácidos de la proteína APP humana. Esta línea celular fue amablemente cedida por el laboratorio de la Dra. María Jesús Bullido (UAM, Madrid, España).
- Células ^{FLAG}Parkin SH-SY5Y: Línea celular SH-SY5Y que sobreexpresa de manera estable la proteína Parkina fusionada con el péptido FLAG. Esta línea celular fue amablemente cedida por el laboratorio de la Dra. Hélène Plun-Favreau (UCL, Londres, Reino Unido).

Los cultivos de líneas celulares se mantuvieron a 37 °C y 5% CO₂ en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de FBS, 1% penicilina/estreptomicina. Todas las líneas celulares se mantuvieron en posición horizontal en botellas de 75 cm² a un 80-85% de confluencia. Para sembrar las células para cada experimento, éstas se lavaron con PBS y se despegaron del sustrato con tripsina-EDTA 0,05% (Life Technologies, California, EE.

UU.). Tras su recuento en la cámara de Neubauer, se sembraron a diferentes concentraciones dependiendo de cada experimento.

6. Procedimientos *in vivo* con células

6.1 Ensayos MTT de viabilidad celular

Para la determinación de la viabilidad celular se utilizó el ensayo de reducción de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) 2,5-difeniltetrazolio; Sigma-Aldrich, Misuri, EE. UU.). El ensayo MTT se basa en la capacidad metabólica de las células para convertir el MTT en formazán, cuya cantidad generada es directamente proporcional al número de células vivas. Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de $3,1 \times 10^4$ células/cm² y, exclusivamente las neuronas corticales, a una densidad de $4,7 \times 10^4$ células/cm². Tras 24 horas, fueron sometidas a cada uno de los tratamientos y en el caso de las neuronas corticales a los 9 días, una vez alcanzada la madurez. La viabilidad celular en las distintas condiciones experimentales se determinó incubando las células con MTT a una concentración de 1 mg/ml durante 2 horas. Pasado ese tiempo, se retiró el medio y se añadieron 100 µl de DMSO para lisar las células y disolver los cristales de formazán. El color de los cristales disueltos se analizó midiendo la absorbancia a 595nm en el espectrofotómetro EnSpire (Perkin Elmer, Massachusetts, EE. UU.).

6.2 Potencial de membrana mitocondrial (MMP/ $\Delta\Psi_m$)

El potencial de membrana mitocondrial (MMP/ $\Delta\Psi_m$) se determinó utilizando el compuesto *tetramethylrhodamine methyl ester* (TMRM) (Molecular Probes Inc., Oregón, EE. UU.). El $\Delta\Psi_m$ es un claro indicador de la salud y funcionalidad mitocondrial y, por tanto, algunas de las funciones mitocondriales como la respiración, la fosforilación oxidativa, la generación de ROS, la homeostasis de Ca²⁺ y la inducción de apoptosis, son dependientes del mismo. El TMRM es un compuesto fluorescente que es captado por las mitocondrias funcionalmente activas y su fluorescencia es directamente proporcional a la polaridad de la membrana mitocondrial. Una disminución de la fluorescencia del TMRM supone una despolarización y, por tanto, daño mitocondrial. Para su determinación, se sembraron $5,2 \times 10^4$ células/cm² en placas de 6 pocillos sobre cubreobjetos de 25 mm de diámetro. En el caso de los cultivos primarios de neuronas, los cristales fueron tratados previamente con el adyuvante para la adherencia Poli-D-lisina. Una vez alcanzada una confluencia del 80% (en el caso de los cultivos primarios de

neuronas corticales alcanzada su madurez), se añadió TMRM 40 nM en medio HBSS (del inglés *Hanks' balanced salt solution*; con calcio y magnesio y suplementado con HEPES y ajustado el pH a 7,4 con NaOH) durante 40 minutos antes de iniciar el experimento. En los cultivos primarios de neuronas corticales además se añadió Cell Trade Calceína-AM (Calceína, Thermo Scientific, Massachusetts, EE. UU.) que entra en el citosol de las células y nos permitió verificar la pureza de la población en cultivo. Una vez transcurrido este tiempo, las imágenes se obtuvieron en el equipo de microscopía confocal Zeiss 510 VIS CLSM equipado con el sistema de detección *META* con el objetivo 63× manteniendo el TMRM en los cultivos. Las mediciones se hicieron mediante adquisiciones en “*Z-stack*” en diferentes campos de cada cubreobjetos. Las imágenes se adquirieron con el software Zen 2009 (Zeiss, Oberkochen, Alemania) equipado con el módulo de fisiología. Su posterior análisis se llevó a cabo utilizando el software Volocity®3D Image Analysis (Quorum Technologies, Ontario, Canadá).

6.3 Masa mitocondrial

Para medir la masa mitocondrial por fluorescencia mediante *live-cell imaging* (% del volumen mitocondrial dentro del citosol) se sembraron $5,2 \times 10^4$ células/cm² en placas de 6 pocillos sobre cubreobjetos de 25 mm de diámetro (en el caso de los cultivos primarios de neuronas los cristales fueron tratados previamente con el adyuvante para la adherencia Poli-D-lisina). Una vez alcanzada una confluencia del 80% (en el caso de los cultivos primarios de neuronas corticales alcanzada su madurez), 40 minutos antes del experimento, las células se cargaron con TMRM, para visualizar las mitocondrias y con Cell Trade Calceína-AM (Calceína), para visualizar el volumen celular. Se adquirieron cortes en “*Z-stack*” en aproximadamente 15 células por condición (células SH-SY5Ys) o 5 campos diferentes (cultivos primarios de neuronas) en cada experimento. Las imágenes se adquirieron con el equipo de microscopía confocal Zeiss 510 VIS CLSM con el objetivo 63× con excitación a 495 nm, y emisión a partir de 516 nm para la Calceína y 560/580 nm para TMRM. Como el TMRM es dependiente del $\Delta\Psi_m$, la configuración para detectar la fluorescencia roja se redujo para localizar las mitocondrias que aún no se habían degradado. El análisis de imagen se llevó a cabo utilizando el software Volocity®3D Image Analysis. Para cuantificar los cambios en el volumen mitocondrial, se calculó el porcentaje de colocalización de fluorescencia verde (citosol), y la fluorescencia roja (mitocondria). Este cociente representa el volumen de la célula que está ocupado por la

red mitocondrial. Para permitir la comparación entre diferentes condiciones del experimento, la colocalización de estas señales se expresó en porcentaje, siendo el 100% el valor correspondiente a las células sin tratar.

7. Procedimientos con proteínas

7.1 Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas a partir de tejido se utilizó aproximadamente un fragmento de unos 20 mg de las muestras de corteza o de hipocampo, previamente congeladas y almacenadas de los diferentes ratones. Se procedió a la digestión mecánica con un homogeneizador de vidrio para tejido (ReadyPrep™ mini grinder de Bio-rad, California, EE. UU.) en hielo en presencia de tampón de lisis NP40 (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, y Nonidet P40 0,5%, en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasas al 10% (Roche, Basilea, Suiza)). Seguidamente, el homogenado se centrifugó a 14.000 rpm, durante 15 minutos y el sobrenadante se guardó a -80 °C, para la posterior cuantificación de la concentración de proteínas.

La extracción de proteínas de los cultivos celulares se realizó añadiendo el tampón de lisis NP40 frío a los cultivos para lisar las células. Tras actuar unos minutos, se rasparon las células de los pocillos recogiendo finalmente el contenido en tubos eppendorf. Los lisados celulares se guardaron a -80 °C para asegurar una completa lisis celular hasta la cuantificación de la concentración de proteínas.

La estimación de la cantidad total de proteína de los lisados se llevó a cabo con el método del ácido bicinonínico (BCA; Pierce™ BCA Protein Assay kit, Thermo Scientific, Massachusetts, EE. UU.), respecto a concentraciones conocidas de albúmina, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las medidas de absorbancia se realizaron en el espectrofotómetro para placas de 96 pocillos Enspire, a 562 nm.

7.2 Western blot

Los niveles de cada proteína se analizaron mediante Western Blot. Se utilizaron 10 µg de proteína total de cada muestra, a excepción de las muestras de hipocampo que se utilizaron 20 µg, mezclados con tampón de carga reductor Laemmli 4X (Bio-Rad, California, EE. UU.) con 10% de β-mercaptoetanol (Bio-Rad, California, EE. UU.). Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de gradiente prefabricados SDS-PAGE (del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) del 4% al 20%

Tris-Glicina (Bio-Rad, California, EE. UU.) o en geles SDS-PAGE al 10% o al 15% Tris-Glicina (Bio-Rad, California, EE. UU.), dependiendo de la proteína a determinar en condiciones desnaturizantes. El avance de la electroforesis se monitorizó con un marcador de pesos moleculares (Precision Plus Protein Dual Xtra Standards, Bio-Rad, California, EE. UU.). Una vez separadas, las proteínas se transfirieron a una membrana de Poly vinylidene fluoride (PVDF) (Immobilon-P, Bio-Rad, California, EE. UU.). Después de la transferencia, las membranas se bloquearon con leche en polvo desnatada al 5% diluida en TBS (del inglés *Tris-buffered saline*: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Tris-HCl 250 mM, pH 7,5 con 0,1% Tween-20) durante 1 hora, a temperatura ambiente. A continuación, las membranas se incubaron toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios específicos para cada proteína (tabla 2). La señal del anticuerpo primario se amplificó mediante la incubación con un anticuerpo secundario especie-específico conjugado con peroxidasa (tabla 2) a excepción del anticuerpo primario Anti- β -actina que lleva conjugada peroxidasa y su detección fue directa. Los niveles de cada proteína se detectaron con el sistema de detección de sustrato quimioluminiscente ECL (del inglés *enhanced chemiluminescence*; Clarity de Bio-Rad, California EE. UU.) con el equipo *ImageQuant LAS 4000* (GE Healthcare, Illinois, EE. UU.).

Como control de carga, los niveles de cada proteína se refirieron respecto a la proteína β -actina. En todos los casos, los niveles de proteína se normalizaron respecto a la media de los niveles de los casos establecidos como "control". El análisis densitométrico de las bandas se realizó utilizando el programa informático *Image Studio Lite* versión 5.2.

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en Western blot e inmunofluorescencia

Anticuerpo	Especie de origen	Uso	Dilución		Casa comercial	Referencia
			Wb	/ ICC		
Anti-PGC-1 α	pAb-Conejo	Primario	1:200	/ 1:200	Santa Cruz	Sc 13067
Anti-ATPB	mAb-Ratón	Primario	1:1000	/ 1:200	Abcam	Ab14730
Anti-Mfn1	mAb-Ratón	Primario	1:1000	/	Abcam	Ab57602
Anti-Mfn2	mAb-Ratón	Primario	1:1000	/	Abcam	Ab56889
Anti-Drp1	mAb-Conejo	Primario	1:1000	/	Cell Signalling	D6C7
Anti-Opa1	mAb-Ratón	Primario	1:1000	/	Novus Biologicals	NBP1-71656
Anti-SQSTM1/p62	mAb-Conejo	Primario	1:1000	/ 1:200	Abcam	Ab109012
Anti-LC3	pAb-Conejo	Primario	1:2000	/ 1:200	Novus	NB100-2220
Anti-Flag	mAb-Ratón	Primario		/ 1:200	Merck	F3165
Anti-APP	mAb-Conejo	Primario	1:1000	/		NBP2-62566
Anti- β -actina-HRP	mAb-Conejo	Primario	1:25000	/	Abcam	49900
Anti-Conejo	pAb-Cabra	Secundario	1:5000	/	Life technologies	G21234
Anti-Ratón	pAb-Cabra	Secundario	1:5000	/	Abcam	Ab97023
Anti-Conejo Alexa fluor 488	pAb-Cabra	Secundario		/ 1:1000	Thermo Scientific	A11034
Anti-Ratón Alexa Fluor 568	pAb-Cabra	Secundario		/ 1:1000	Thermo Scientific	A11004

Wb: Western blot; ICC: Inmunofluorescencia; mAb: anticuerpo monoclonal; pAb: anticuerpo policlonal.

7.3 Inmunofluorescencia

Para los experimentos de inmunofluorescencia en líneas celulares, las células se sembraron a una densidad de $6,6 \times 10^4$ células/cm² en placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos de 13 mm de diámetro, previo recuento en cámara de Neubauer. Cuando los cultivos alcanzaron una confluencia del 80% se realizaron los experimentos. Al finalizar los mismos, las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4%. Después, se permeabilizaron con 0,1 % Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, Misuri, EE. UU.) en PBS. Previo a la incubación con los anticuerpos primarios, las células se bloquearon con tampón de bloqueo (suero de caballo 10%; Thermo Scientific, Massachusetts, EE. UU.; en PBS). La incubación con los correspondientes anticuerpos primarios (tabla 2) se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, las células se incubaron con los anticuerpos

secundarios correspondientes indicados en la tabla 2, conjugados con diferentes fluoróforos para su detección. Los cubreobjetos con las células adheridas se montaron en portas de cristal utilizando el medio de montaje Prolong™ Gold Antifade conjugado con 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Life technologies, California, EE. UU.). Las imágenes se tomaron con el objetivo de 63× usando el microscopio confocal Zeiss 510 VIS CLSM (Zeiss, Oberkochen, Alemania) equipado con el sistema de detección META. El procesamiento y análisis de las imágenes se realizó utilizando el programa Volocity®3D Image Analysis.

7.4 Ensayos de ELISA

Los niveles de A β ₄₀ y A β ₄₂ fueron analizados mediante la técnica de ELISA (del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Para el análisis de los niveles de A β ₄₀ y A β ₄₂ en las muestras de corteza e hipocampo de ratones de 3, 6 y 12 meses se utilizaron los kits comerciales *Human A β ₄₀ ELISA Kit* (KHB3481, Invitrogen, California, EE. UU.) y *Human A β ₄₂ Ultrasensitive ELISA Kit* (KHB3544, Invitrogen, California, EE. UU.). Para el análisis de los niveles de A β ₄₀ y A β ₄₂ en las líneas celulares se utilizaron los kits comerciales *HUMAN BETA AMYLOID (1-40) KIT ELISA* (298-64601, Wako, Tokio, Japón) y *HUMAN BETA AMYLOID (1-42) KIT ELISA* (296-64401, Wako, Tokio, Japón). En todos los casos, se siguieron las instrucciones de las casas comerciales.

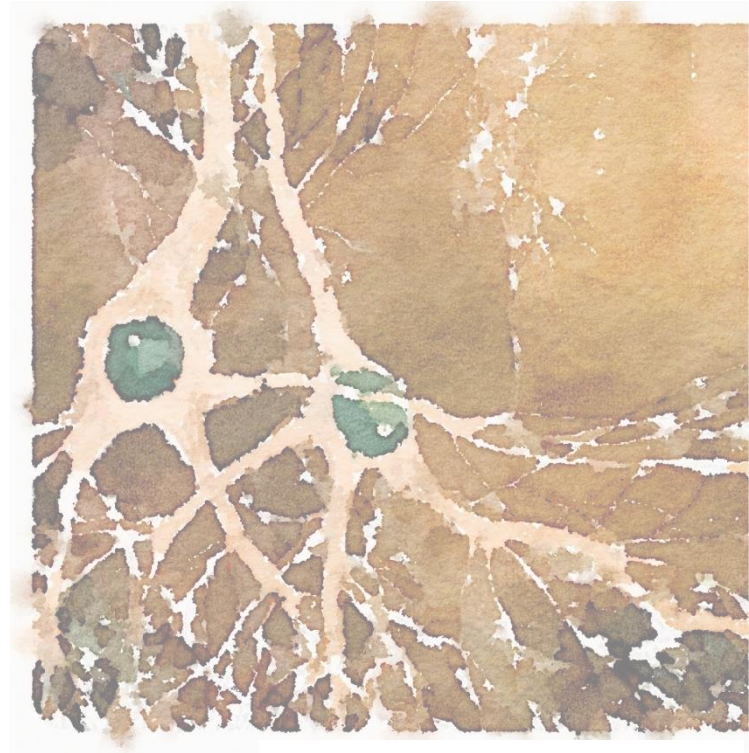
En el caso de las muestras de tejido de ratón, éstas se homogenizaron en la solución A (Guanidina-HCl 5 M, Tris HCl 50 mM pH 8) durante 3-4 horas a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se diluyeron en la solución B (KCl 0,2 g/l, KH₂PO₄ 0,2 g/l, NaCl 8,0 g/l, Na₂HPO₄ 1,15 g/l, BSA 5%, Tween20 0,03%) y se centrifugaron a 16.000 g durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante resultante se utilizó para la realización del inmunoensayo. El análisis de los niveles de A β ₄₀ y A β ₄₂ en células en cultivo se realizó tanto en los lisados celulares como en los sobrenadantes. Tras varios días en cultivo hasta que se alcanzó una confluencia del 90%, se recogió el sobrenadante (~1,5ml) que se liofilizó y reconstituyó en 150 μ l de PBS. Las células se lisaron con el tampón de lisis NP40 en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasa al 10%. Finalmente, se procedió al desarrollo del ensayo siguiendo las indicaciones de las casas comerciales.

Los niveles de AMPc también fueron analizados mediante la técnica de ELISA. Se analizaron los niveles de AMPc en las muestras de corteza e hipocampo de ratones APP/PS1 y WT de 6 meses tras el tratamiento oral con S14 o con la sustancia vehículo, en

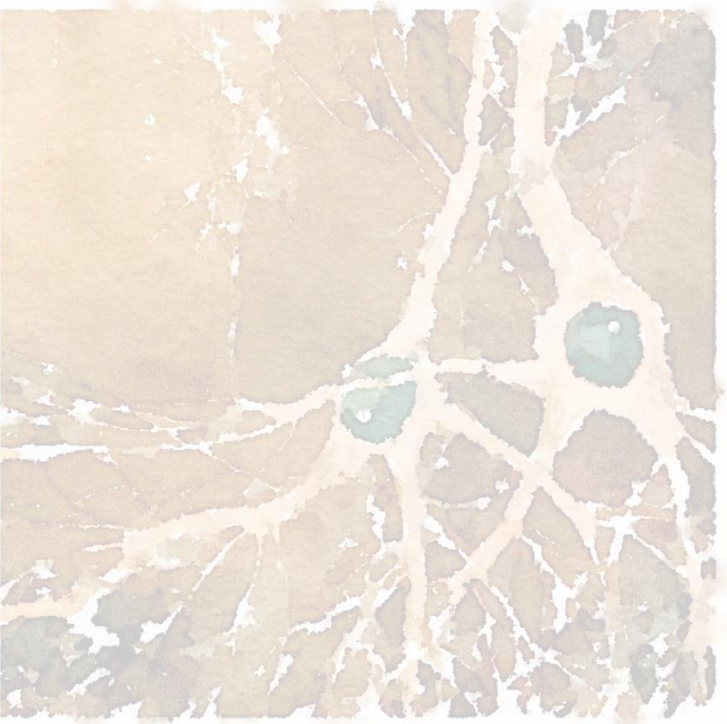
el caso de los grupos control, utilizando el kit comercial *Cyclic AMP Direct ELISA Kit* (K019-H1, Arbor Assay, Michigan, EE. UU.). En este caso, también se siguieron las instrucciones de la casa comercial.

8. Análisis estadístico

Salvo que se especifique otra cosa, todos los datos presentados representan los valores medios \pm el error estándar (SEM). Para los análisis estadísticos se utilizó el programa GraphPad Prism versión 6 (GraphPad Software, California, EE.UU.). Para la comparación de medias entre dos variables con distribución normal, se usó el test t de Student y la comparación de medias entre más de dos grupos de variables se analizó por ANOVA (del inglés *Analysis of Variance*) y posterior análisis “*post hoc*” (Fisher’s LSD test). Las diferencias entre los niveles de proteínas en la corteza e hipocampo de ratones de 3, 6 y 12 meses se analizaron mediante *two-way* ANOVA (dos variables independientes: edad y genotipo) y posterior análisis “*post hoc*” (Fisher’s LSD test). En todos los casos, las diferencias se consideraron significativas a un nivel de $p < 0,05$.



RESULTADOS



Numerosos estudios han propuesto que el péptido A β podría ser responsable de alteraciones en la función mitocondrial en la EA reflejadas en cambios en el potencial de membrana mitocondrial, en la respiración mitocondrial, en la síntesis de ATP y en otros procesos relacionados con el metabolismo energético, todos ellos controlados por la mitocondria (Reddy et al., 2018; Zhao et al., 2019). El efecto inmediato de estas alteraciones puede tener consecuencias en el equilibrio de la dinámica mitocondrial que, finalmente, produce una eliminación excesiva de mitocondrias funcionales y/o una acumulación de mitocondrias defectuosas, que se puede convertir en tóxica. Estos cambios pueden jugar un papel fundamental en el desarrollo de la patología de la EA (Manczak et al., 2011, 2018). Esta tesis se ha centrado en estudiar la contribución específica del péptido A β sobre la dinámica mitocondrial utilizando diversos modelos experimentales.

Como modelo *in vivo* de la EA, se utilizó el modelo murino APP/PS1. Este modelo ha sido ampliamente caracterizado desde sus orígenes por otros grupos y en estudios previos de nuestro laboratorio, donde se ha observado que muestra signos de alteraciones patológicas a edades tempranas (4 meses de edad), incluyendo acumulación de A β en la corteza cerebral e hipocampo y activación astrocitaria (Anitua et al., 2014).

1. Alteraciones mitocondriales en un modelo *in vivo* de EA: ratones APP/PS1 de 3, 6 y 12 meses

1.1 Niveles de A β en corteza cerebral e hipocampo de ratones WT y APP/PS1

Según lo descrito en trabajos previos, el modelo murino de amiloidosis APP/PS1 sufre una acumulación progresiva cerebral de A β conforme avanza la edad de los ratones (Blanchard et al., 2003; Trinchese et al., 2004) que pensamos podría ser responsable de alteraciones mitocondriales. Esta acumulación progresiva de A β con la edad se confirmó analizando los niveles de A β_{40} y A β_{42} en diferentes regiones del cerebro de los ratones APP/PS1 a las edades de 3, 6 y 12 meses y se comparó con ratones de fenotipo salvaje (WT). En cuanto al péptido A β_{40} , se observó un aumento significativo tanto en corteza cerebral como en hipocampo en los animales APP/PS1 a la edad de 12 meses que no fue

evidente en el mismo grupo de ratones a edades más jóvenes ni en los ratones WT (figura 8).

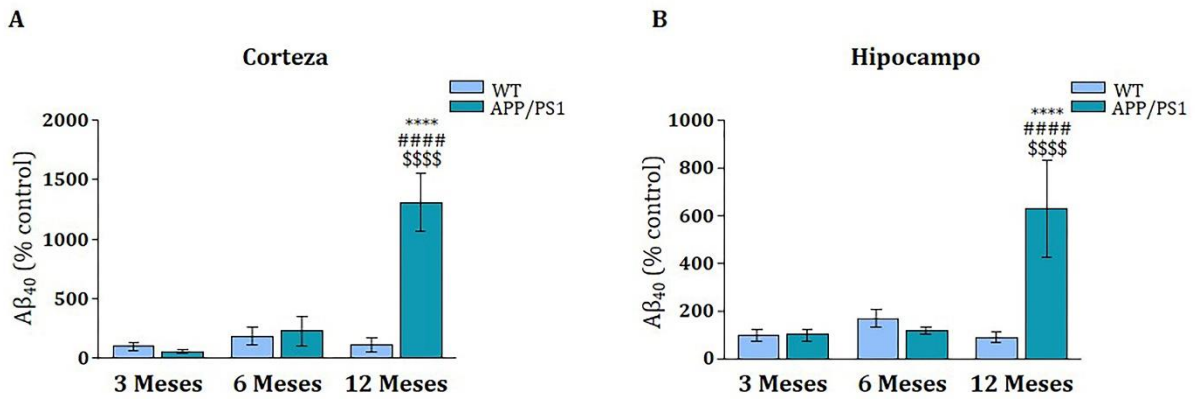


Figura 8. Niveles cerebrales de $A\beta_{40}$ en ratones APP/PS1 y WT a diferentes edades. A) Niveles de $A\beta_{40}$ en corteza cerebral de animales WT y APP/PS1 de 3, 6 y 12 meses de edad. **B)** Niveles de $A\beta_{40}$ en hipocampo de animales WT y APP/PS1 de 3, 6 y 12 meses de edad. Los datos están expresados como porcentaje respecto al grupo WT de 3 meses de edad y son la media \pm SEM de 6 animales por grupo. #### p<0,0001, respecto a ratones APP/PS1 de 3 meses. \$\$\$ p<0,0001, respecto a ratones WT de la misma edad. ****p<0,0001, respecto a ratones APP/PS1 de 6 meses (ANOVA, análisis post-hoc LSD de Fisher).

En cuanto a los niveles de $A\beta_{42}$, se pudo observar un aumento significativo tanto en corteza como en hipocampo en los animales APP/PS1 a los 12 meses de edad respecto a los mismos animales a la edad de 3 meses y que no fue evidente en los ratones WT (figura 9). Cabe destacar que a la edad de 6 meses ya se observaron diferencias significativas en cuanto a los niveles de $A\beta_{42}$ entre los ratones APP/PS1 y los ratones WT (figura 9A).

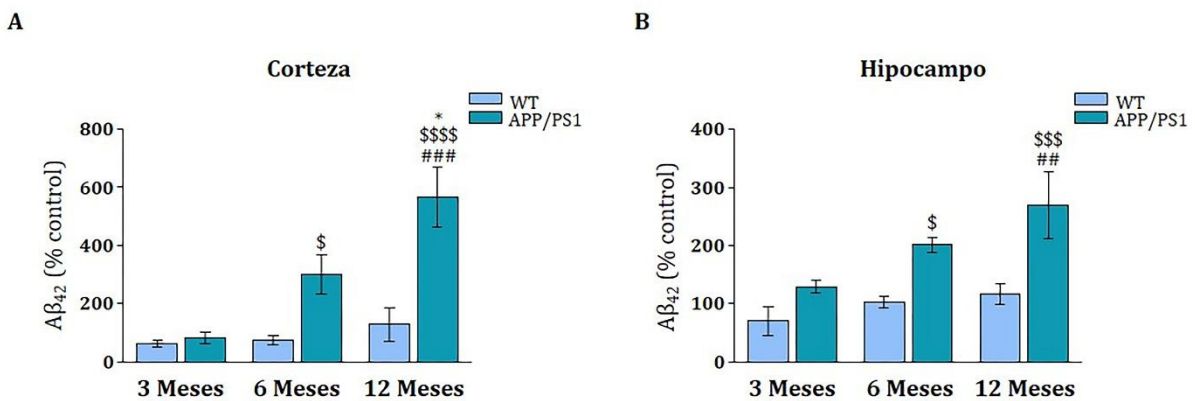


Figura 9. Niveles cerebrales de $A\beta_{42}$ en ratones APP/PS1 y WT a diferentes edades. A) Niveles de $A\beta_{42}$ en corteza cerebral de animales WT y APP/PS1 de 3, 6 y 12 meses de edad. **B)** Niveles de $A\beta_{42}$ en hipocampo de animales WT y APP/PS1 de 3, 6 y 12 meses de edad. Los datos están expresados como porcentaje respecto al grupo WT de 3 meses de edad y son la media \pm SEM de 6 animales por grupo. ## p<0,01; ### p<0,001, respecto a ratones APP/PS1 de 3 meses. \$ p<0,05, \$\$\$ p<0,001; \$\$\$\$ p<0,0001, respecto a ratones

WT de la misma edad. * $p < 0,05$, respecto a ratones APP/PS1 de 6 meses (ANOVA, análisis post-hoc LSD de Fisher).

1.2 Estimación de la cantidad de mitocondrias en corteza cerebral e hipocampo de ratones WT y APP/PS1

La cantidad de mitocondrias en las células puede variar en función de los requerimientos energéticos y, puede reflejar alteraciones relacionadas con la biogénesis, con los procesos de dinámica y con los procesos de degradación mitocondrial, pudiendo llegar a ser todos ellos patológicos. La cantidad de mitocondrias se puede estimar analizando la masa mitocondrial mediante la utilización de anticuerpos específicos contra proteínas mitocondriales estructurales. En nuestro modelo experimental *in vivo* se analizó la masa mitocondrial midiendo los niveles de la subunidad β de la proteína ATP sintasa o complejo V (CxV β), localizada en la membrana mitocondrial interna, mediante western blot. En la corteza cerebral, se observó una disminución significativa en los niveles de esta proteína a los 6 meses de edad en los ratones APP/PS1 al compararse con los niveles de la misma en ratones WT. A la edad de 12 meses, los niveles de esta proteína se encontraron igualmente reducidos en los dos grupos de animales (figura 10A). La reducción de los niveles de esta proteína en el hipocampo fue evidente de forma significativa a edades más tempranas. Los ratones APP/PS1 a la edad de 3 meses mostraron una reducción significativa en los niveles de esta proteína que se mantuvo a lo largo del envejecimiento de los animales. En los ratones WT, los niveles de esta proteína en el hipocampo se vieron reducidos más tarde, a la edad de 12 meses, comparado con los animales transgénicos (figura 10B).

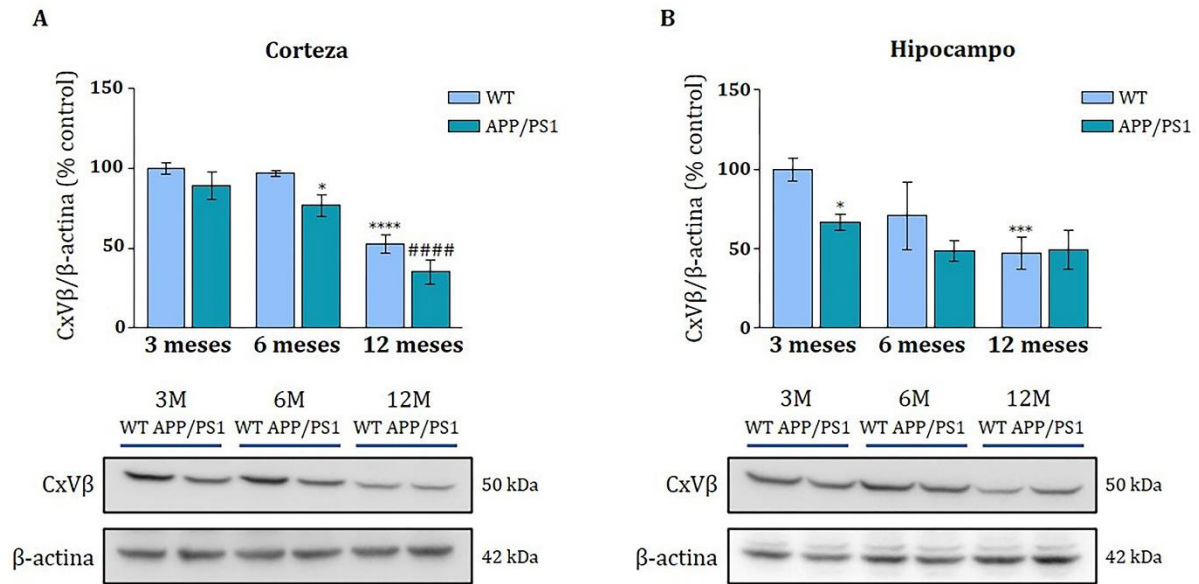


Figura 10. Masa mitocondrial en corteza cerebral e hipocampo de ratones APP/PS1 y ratones WT. **A)** Niveles de CxVβ en corteza cerebral de animales de 3, 6 y 12 meses de edad (panel superior). En la parte inferior se muestra la imagen de un western blot representativo. **B)** Niveles de CxVβ en hipocampo de animales de 3, 6 y 12 meses de edad (panel superior). En la parte inferior se muestra la imagen de un western blot representativo. En todos los casos se utilizó la proteína β-actina como control de carga. En los histogramas se expresan en porcentaje los valores medios ± SEM de entre 6 y 12 animales por grupo respecto a los ratones WT de 3 meses. * p<0,05; *** p<0,001; **** p<0,0001, respecto a ratones WT de 3 meses. #### p<0,0001, respecto a ratones APP/PS1 de 3 meses. (ANOVA, análisis post-hoc LSD de Fisher).

Estos cambios encontrados en la masa mitocondrial en corteza e hipocampo en el modelo *in vivo* de EA indican que pueden existir alteraciones en la generación de nuevas mitocondrias necesarias para cualquier requerimiento energético extra de la célula, o alteraciones en la degradación mitocondrial, esto último, en estrecha regulación por los procesos de fusión y fisión mitocondrial. Por lo tanto, utilizando este modelo animal se estudiaron los procesos de biogénesis y dinámica mitocondrial a las edades anteriormente definidas, 3, 6 y 12 meses, con el fin de establecer una posible relación temporal entre la carga de Aβ y las posibles alteraciones en los procesos mencionados a nivel cerebral y en comparación con animales de fenotipo salvaje. Para ello se analizaron los niveles de diferentes proteínas que pueden ser determinantes en el mantenimiento de la biogénesis y la dinámica mitocondrial en muestras procedentes de la corteza cerebral y de hipocampo de ratones APP/PS1 y WT de los 3 grupos de edad.

1.3 Biogénesis mitocondrial en corteza cerebral e hipocampo de ratones WT y APP/PS1

La biogénesis mitocondrial es un proceso mediante el cual se producen nuevas mitocondrias a partir de las mitocondrias existentes. Se trata de un proceso complejo orquestado por factores de transcripción específicos que regulan la expresión de genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales. El principal factor regulador de la biogénesis mitocondrial es PGC-1 α (PPARG coactivador 1 alpha del inglés *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*) un cofactor transcripcional que además regula la expresión de genes implicados en el metabolismo y función celular. Para analizar la biogénesis mitocondrial, se determinaron los niveles de PGC-1 α en los cerebros de los diferentes grupos de ratones a las edades señaladas anteriormente. En corteza cerebral de los ratones APP/PS1, los niveles de PGC-1 α ya se vieron reducidos a los 3 meses de edad y esta reducción se mantuvo a las siguientes edades estudiadas. En los ratones WT, los niveles de PGC-1 α no parecieron verse afectados a ninguna de las edades (figura 11A). Al analizar los niveles de PGC-1 α en el hipocampo, no se observaron diferencias entre ninguno de los grupos de animales (figura 11B).

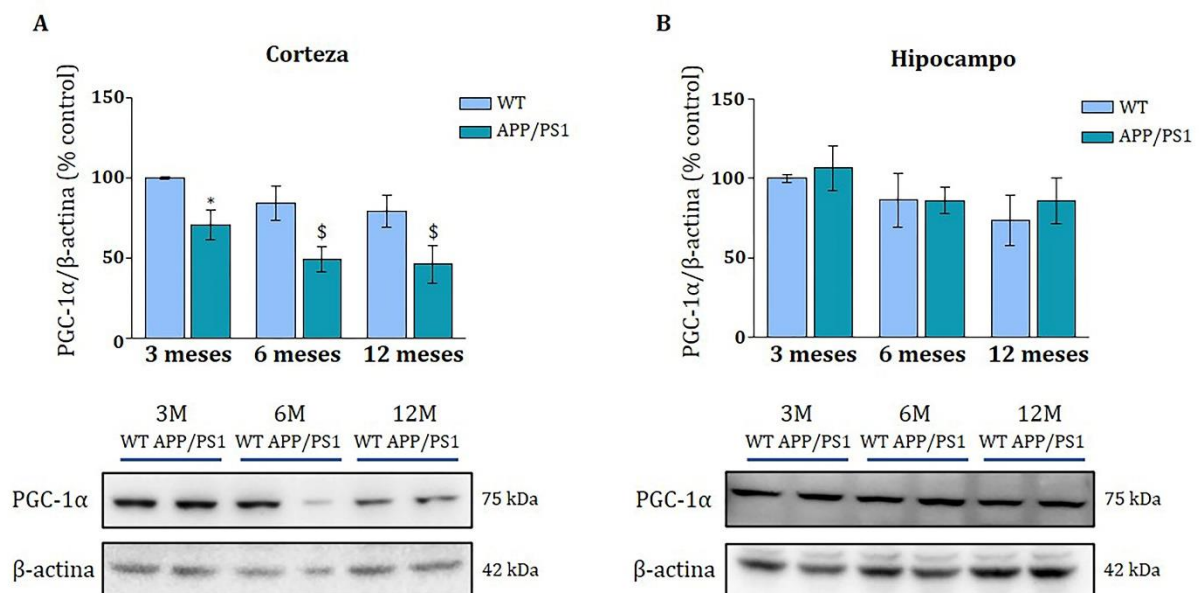


Figura 11. Biogénesis mitocondrial en corteza cerebral e hipocampo de ratones APP/PS1 y WT. A) Niveles de PGC-1 α en corteza cerebral de animales APP/PS1 y WT de 3, 6 y 12 meses de edad (panel superior). En la parte inferior se muestra la imagen de un western blot representativo. **B)** Niveles de PGC-1 α en hipocampo de animales APP/PS1 y WT a las edades de 3, 6 y 12 meses (panel superior). Debajo se muestra la imagen de un western blot representativo. En todos los casos se usó β -actina como control de carga. En los histogramas se expresan en porcentaje los valores medios \pm SEM de entre 6 y 12 animales por

grupo respecto a los ratones control de 3 meses. * $p < 0,05$, respecto a ratones WT de 3 meses. \$ $p < 0,05$, respecto a ratones WT de la misma edad (ANOVA, análisis post-hoc LSD de Fisher).

Estos resultados sugieren que la biogénesis mitocondrial únicamente se ve afectada en los ratones APP/PS1 y no en los ratones de fenotipo salvaje. Este deterioro solo ocurrió en la corteza cerebral a edades tempranas y se mantuvo con el avance de la edad de los animales.

1.4 Fusión y fisión mitocondrial en corteza cerebral e hipocampo de ratones WT y APP/PS1

Otra posible explicación a una reducción en la masa mitocondrial encontrada, como se ha avanzado anteriormente, podría deberse a alteraciones en los procesos que controlan la degradación de mitocondrias no funcionales o dañadas. Las mitocondrias se encuentran unidas unas a otras por la membrana mitocondrial externa formando una red y, esta unión entre mitocondrias es controlada principalmente por los procesos de fusión y fisión mitocondrial, que están a su vez regulados por un conjunto de proteínas GTP-asas de las membranas mitocondriales. Si las mitocondrias no están dañadas, se da un equilibrio entre los niveles de las proteínas de fusión y las proteínas de fisión. Cuando alguna de las mitocondrias de la red está dañada y no desempeña correctamente sus funciones, el efecto de las proteínas de fisión mitocondrial prevalece y las proteínas de fusión comienzan a degradarse favoreciendo la separación de la mitocondria dañada del conjunto de la red. Algunas de las proteínas de fusión mitocondrial principales son las mitofusinas 1 y 2 (Mfn1 y Mfn2, respectivamente) y Opa1 mientras que una de las principales proteínas pro-fisión mitocondrial es Drp1. En el modelo *in vivo* APP/PS1, se analizaron los niveles de cada una de estas proteínas a las diferentes edades (3, 6 y 12 meses) y se compararon con los niveles de las mismas en los animales WT a las mismas edades. En primer lugar, se analizaron los niveles de las proteínas Mfn1 y Mfn2 localizadas en la membrana mitocondrial externa (MME). En la corteza cerebral, los niveles de Mfn1 se vieron significativamente reducidos con la edad, en ambos grupos de animales, pero esta reducción apareció más tempranamente en los ratones APP/PS1, a los 3 meses (figura 12A). En el hipocampo esta disminución significativa sólo se observó en los ratones APP/PS1 a la edad de 12 meses (figura 12B).

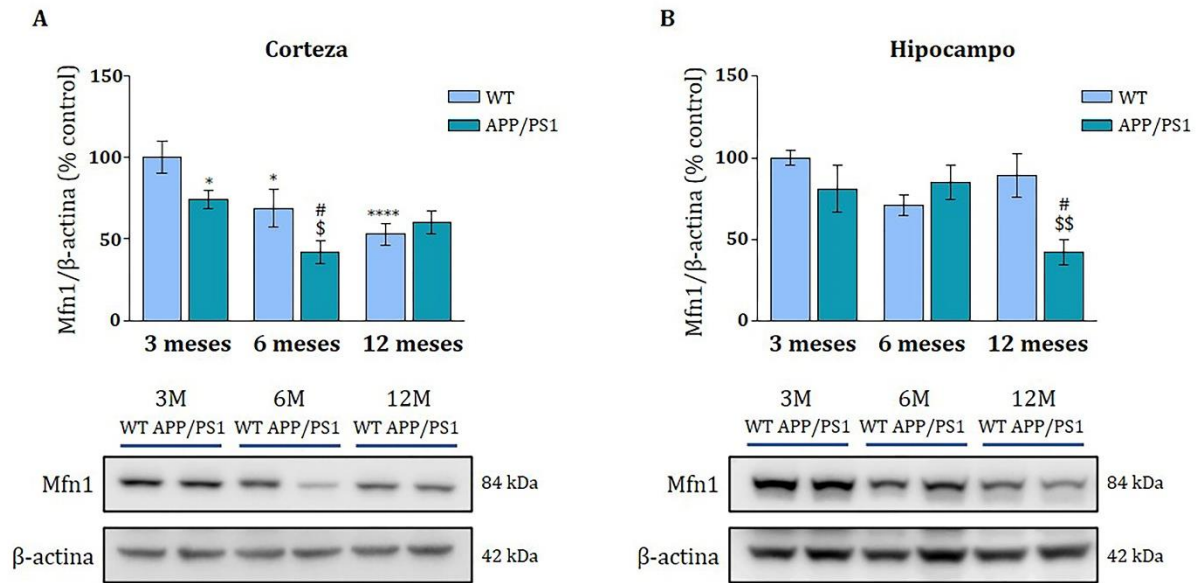


Figura 12. Niveles de Mfn1 en corteza cerebral e hipocampo de ratones APP/PS1 y WT. A) Niveles de Mfn1 en corteza cerebral de animales APP/PS1 y WT de 3, 6 y 12 meses de edad (panel superior). En la parte inferior se muestra la imagen de un western blot representativo. **B)** Niveles de Mfn1 en el hipocampo de animales APP/PS1 y WT de 3, 6 y 12 meses de edad (panel superior). En la parte inferior se muestra la imagen de un western blot representativo. En todos los casos se usó β -actina como control de carga. En los histogramas se expresan en porcentaje los valores medios \pm SEM de entre 6 y 12 animales por grupo respecto a los ratones control de 3 meses. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$, respecto a ratones WT de 3 meses. # $p < 0,05$, respecto a ratones APP/PS1 de 3 meses. \$ $p < 0,05$; \$\$ $p < 0,01$, respecto a ratones WT de la misma edad. (ANOVA, análisis post-hoc LSD de Fisher).

En cuanto a los niveles de Mfn2, en la corteza cerebral también se observó una disminución con la edad que fue estadísticamente significativa en los ratones APP/PS1 ya a la edad de 6 meses y no en los ratones WT de su misma edad (figura 13A). Aunque a los 12 meses se vio una reducción significativa en los dos grupos de ratones (figura 13A), ésta fue mucho mayor en los animales transgénicos que mostraron una tendencia similar a la observada previamente respecto a los niveles de Mfn1 en esta área cerebral (figura 12A). En el hipocampo, el descenso significativo en los niveles de Mfn2 ocurrió en ambos grupos de ratones ya a la edad de 6 meses respecto a los animales más jóvenes de sus mismos grupos (figura 13B).

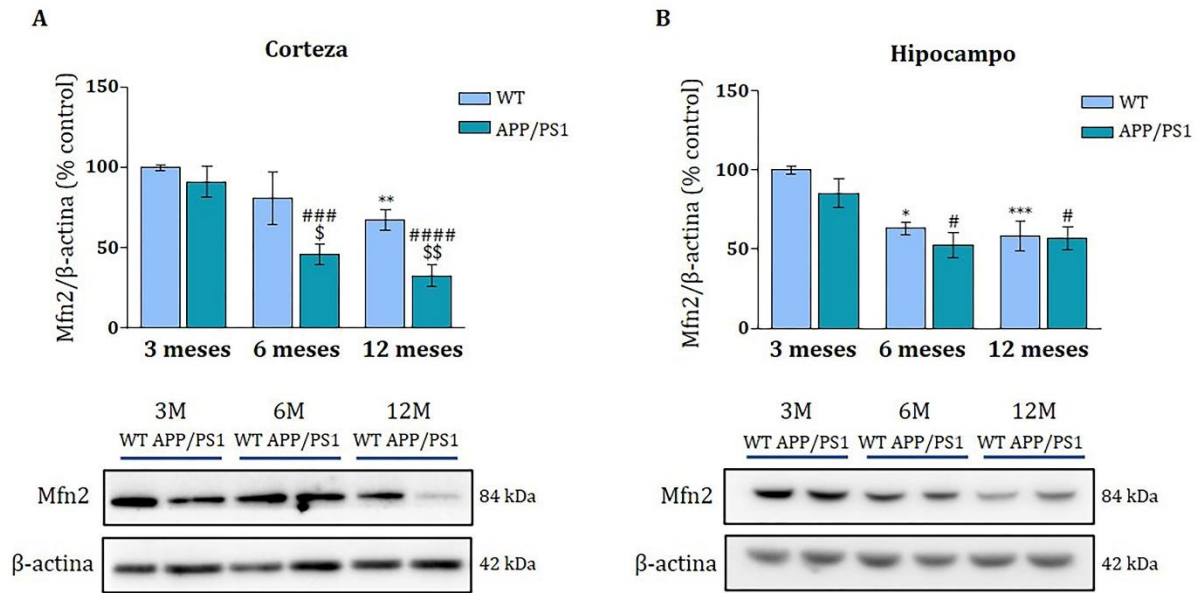


Figura 13. Niveles de Mfn2 en corteza cerebral e hipocampo de ratones APP/PS1 y WT. A) Niveles de Mfn2 en la corteza cerebral de animales APP/PS1 y WT de 3, 6 y 12 meses de edad (panel superior). En el panel inferior se muestra la imagen de un western blot representativo. **B)** Niveles de Mfn2 en el hipocampo de animales APP/PS1 y WT de 3, 6 y 12 meses de edad (panel superior). En el panel inferior se muestra la imagen de un western blot representativo. En todos los casos se usó β-actina como control de carga. En los histogramas se expresan en porcentaje los valores medios ± SEM de entre 6 y 12 animales por grupo respecto a los ratones control de 3 meses. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001, respecto a ratones WT de 3 meses. # p<0,05, ### p<0,001; #### p<0,0001 respecto a ratones APP/PS1 de 3 meses. \$ p<0,05; \$\$ p<0,01, respecto a ratones WT de la misma edad (ANOVA, análisis post-hoc LSD de Fisher).

La fusión de la membrana mitocondrial interna (MMI) ocurre tras la fusión de la MME y es llevada a cabo por Opa1, que posee numerosas isoformas generadas por splicing alternativo, de las cuales L-Opa1 (L, del inglés *long*) y S-Opa1 (S, del inglés *short*) parecen desempeñar funciones más relevantes (Del Dotto et al., 2018). La forma L-Opa1 es suficiente para la fusión de la MMI, mientras que los niveles excesivos de S-Opa1 inhiben la actividad de fusión (Ge et al., 2020). Mayores niveles de L-Opa1 indican una fusión de la MMI más estrecha mientras que si aumentan los niveles de S-Opa1 se produce una inclinación hacia la fisión de la MMI. En nuestros resultados se analizaron los niveles de L-Opa1 que reportaron un descenso significativo en los ratones APP/PS1 a nivel cortical ya a los 3 meses de edad manteniéndose reducidos a lo largo del envejecimiento de los animales transgénicos (figura 14A). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas a nivel del hipocampo en ninguno de los grupos de animales (figura 14B).

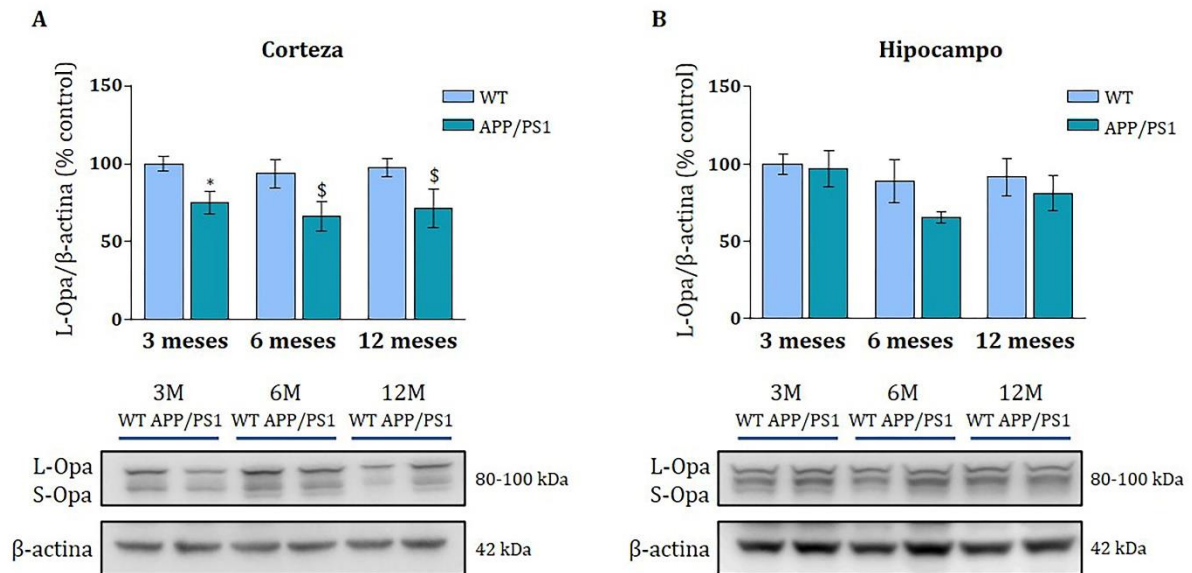


Figura 14. Niveles de Opa1 en corteza cerebral e hipocampo de ratones APP/PS1 y WT. A) Niveles de L-Opa1 en corteza cerebral de animales APP/PS1 y WT de 3, 6 y 12 meses de edad (panel superior). En el panel inferior se muestra la imagen de un western blot representativo indicando las bandas correspondientes a la isoforma pesada de la proteína Opa1 (L-Opa1) y a la forma proteolizada más ligera (S-Opa1). **B)** Niveles de L-Opa1 en hipocampo de animales APP/PS1 y WT de 3, 6 y 12 meses de edad (panel superior). En el panel inferior se muestra la imagen de un western blot representativo indicando las bandas correspondientes a la forma L-Opa1 y a la forma S-Opa1. Tanto en corteza como en hipocampo se cuantificaron los niveles de L-Opa1. En todos los casos se usó β -actina como control de carga. En los histogramas se expresa en porcentaje los valores medios \pm SEM de entre 6 y 12 animales por grupo respecto a los ratones control de 3 meses. * $p < 0,05$, respecto a ratones WT de 3 meses. \$ $p < 0,05$, respecto a ratones WT de la misma edad (ANOVA, análisis post-hoc LSD de Fisher).

Tras el análisis de las proteínas de fusión mitocondrial, se analizaron los niveles de Drp1, cuyos niveles están aumentados respecto a las proteínas de fusión cuando se favorece la fisión mitocondrial. En la corteza cerebral, se observó que en los animales APP/PS1 a las edades de 6 y de 12 meses los niveles de Drp1 aumentaron significativamente respecto al mismo grupo de animales de 3 meses de edad, indicando una inclinación favorable hacia la fisión mitocondrial en estos animales (figura 15A). Sin embargo, no se observaron diferencias en los niveles de Drp1 en hipocampo (figura 15B).

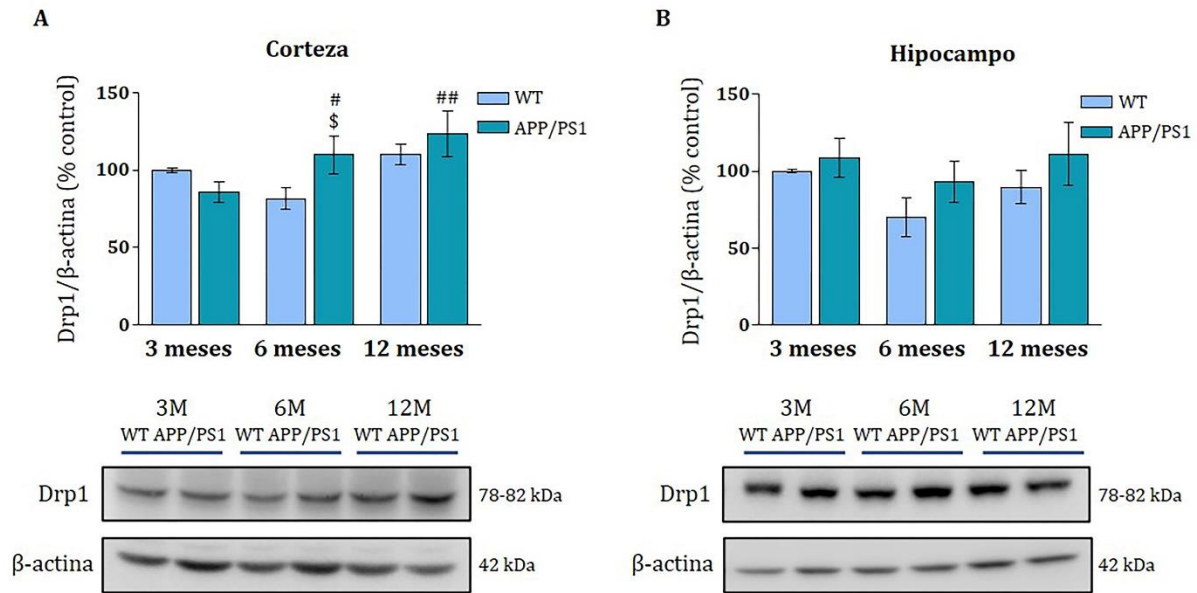


Figura 15. Niveles de la proteína Drp1 en corteza cerebral e hipocampo de ratones APP/PS1 y WT. **A)** Niveles de Drp1 en corteza cerebral de animales APP/PS1 y WT de 3, 6 y 12 meses de edad (panel superior). En el panel inferior se muestra la imagen de un western blot representativo. **B)** Niveles de Drp1 en hipocampo de animales APP/PS1 y WT de 3, 6 y 12 meses de edad (panel superior). En el panel inferior se muestra la imagen de un western blot representativo. En todos los casos se usó β-actina como control de carga. En los histogramas se expresan en porcentaje los valores medios ± SEM de entre 6 y 12 animales por grupo respecto a los ratones control de 3 meses. # p<0,05; ## p<0,01, respecto a ratones APP/PS1 de 3 meses. \$ p<0,05, respecto a ratones WT de la misma edad (ANOVA, análisis post-hoc LSD de Fisher).

En conjunto, el estudio de los niveles de las proteínas de fusión y fisión mitocondrial en los cerebros de los animales APP/PS1 sugirió una pérdida del equilibrio entre estas proteínas de forma más acentuada y temprana en la corteza cerebral de estos animales al comparar este equilibrio con los ratones de fenotipo salvaje. La alteración de este equilibrio resulta favorable hacia una mayor fisión mitocondrial y un deterioro del mantenimiento de la fusión mitocondrial que podría venir desencadenada por una interacción del péptido Aβ en la fisiología mitocondrial. Esta diferencia entre los grupos de animales se mantuvo en el hipocampo, pero aparecería de forma más tardía y menos acentuada.

2. Biogénesis y dinámica mitocondrial en diferentes modelos *in vitro* de amiloidosis

Tras comprobar que en el modelo de amiloidosis *in vivo* se producían alteraciones relacionadas con la biogénesis y la dinámica mitocondrial, se quiso confirmar si estas alteraciones efectivamente se debían al efecto del péptido A β en varios modelos celulares *in vitro*. Para ello se utilizaron cultivos primarios de neuronas corticales de rata y de la línea dopaminérgica humana de neuroblastoma, SH-SY5Y, a los que se les añadió el péptido A β_{42} oligomerizado durante 24 horas, así como la línea SK-APP que sobreexpresa la proteína APP.

2.1 Estimación de la masa mitocondrial en los modelos *in vitro*

En primer lugar, se quiso comprobar si en los modelos *in vitro* a estudiar el péptido A β ejercía algún efecto sobre la cantidad de mitocondrias presentes en las células. Para ello nuevamente se analizaron mediante western blot los niveles de la proteína estructural CxV β . Como se puede comprobar, tanto en los cultivos primarios de neuronas corticales de rata como en la línea celular SH-SY5Y, la incubación durante 24 horas con A β_{42} (1 μ M) produjo una disminución significativa de los niveles de esta proteína, sugiriendo, por tanto, una reducción de la masa mitocondrial (figura 16 A y B). Sin embargo, esta reducción no resultó apreciable en la línea SK-APP al compararlo con los niveles de CxV β en las células control (SK-C) que no sobreexpresan la proteína APP (figura 16C).

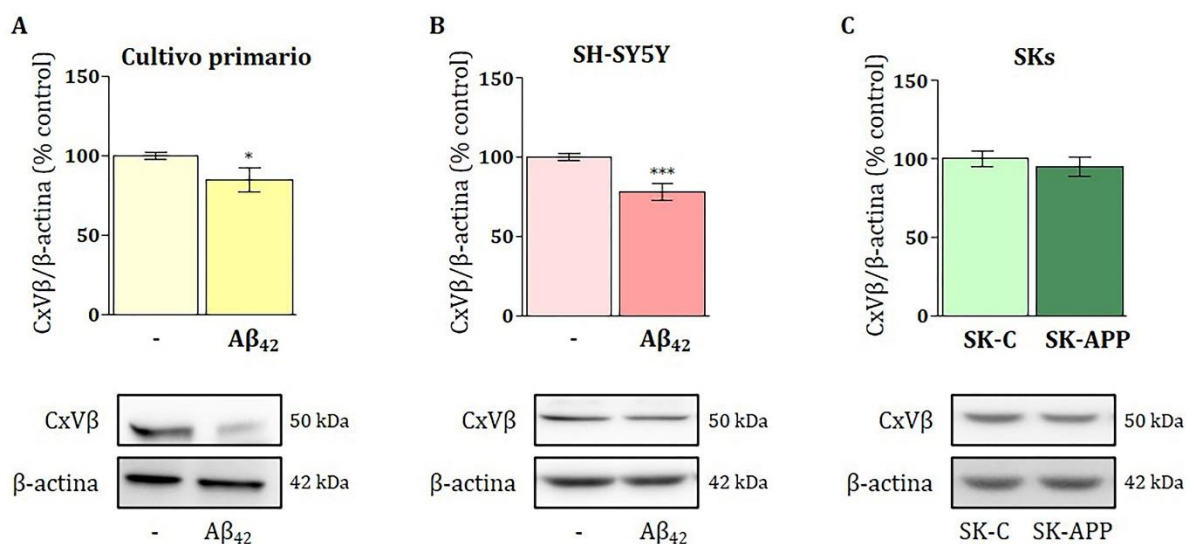


Figura 16. Masa mitocondrial en diferentes modelos celulares de amiloidosis. Niveles de CxV β en (A) cultivo primario de neuronas y (B) células SH-SY5Y tratadas con A β_{42} (1 μ M) durante 24h (panel superior) medidos mediante western blot. En el panel inferior se muestra la imagen de un western blot representativo. C) Niveles de CxV β en las líneas celulares SK-APP y SK-C, utilizada como células control (panel superior) medidos mediante western blot. En el panel inferior se muestra la imagen de un western blot representativo. En todos los casos se usó β -actina como control de carga. En los histogramas se expresan en porcentaje los valores medios \pm SEM de entre 3-5 experimentos independientes. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$, respecto a las respectivas células control (Prueba t de Student).

2.2 Biogénesis mitocondrial en los modelos *in vitro*

Para estudiar la biogénesis mitocondrial, al igual que en el modelo animal, se analizaron los niveles de la proteína PGC-1 α en los diferentes modelos celulares. A las 24 horas de incubación con A β_{42} , se observó un descenso significativo en los niveles de PGC-1 α tanto en los cultivos primarios neuronales como en la línea de neuroblastoma SH-SY5Y respecto a las células sin tratamiento (figura 17 A, B y D). Sin embargo, en las células SK-APP los niveles de PGC-1 α no mostraron diferencias significativas respecto a las células que no sobreexpresaban la proteína (células SK-C; figura 17C).

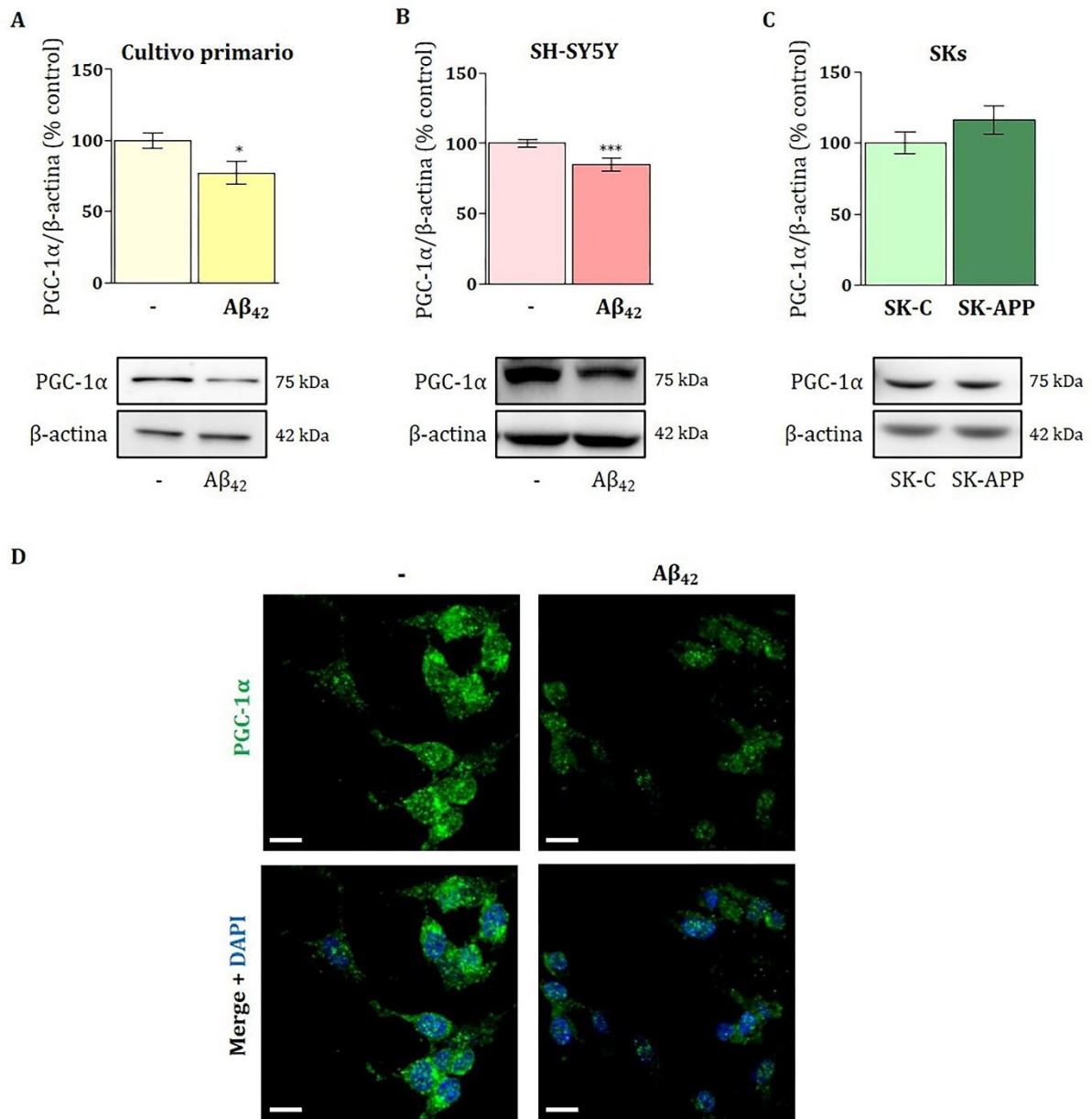


Figura 17. Biogénesis mitocondrial en diferentes modelos celulares de amiloidosis. Niveles de la proteína PGC-1α en (A) cultivo primario de neuronas y (B) células SH-SY5Y tratadas con Aβ₄₂ (1 μM) durante 24h (panel superior) medidos mediante western blot. En el panel inferior se muestra la imagen de un western blot representativo. (C) Niveles de PGC-1α en las líneas celulares SK-APP y SK-C utilizada como control (panel superior). Debajo se muestra la imagen de un western blot representativo. En todos los casos se usó β-actina como control de carga. En los histogramas se expresan en porcentaje los valores medios ± SEM de entre 3-5 experimentos independientes. * p<0,05; *** p<0,001, respecto a las respectivas células control (Prueba t de Student). (D) Imágenes representativas del análisis por inmunofluorescencia de la proteína PGC-1α (verde) en células SH-SY5Ys tratadas con Aβ₄₂ (1 μM) durante 24h (panel derecho). Los núcleos se marcaron con DAPI (azul). Las células sin tratar o control se muestran en la imagen de la izquierda. Barra de escala = 14 μm.

2.3 Fusión y fisión mitocondrial *in vitro* utilizando diferentes modelos celulares

Al igual que en el modelo animal de amiloidosis, el estudio del equilibrio de los procesos de fusión y fisión mitocondrial en los diferentes modelos celulares se llevó a

cabo determinando los niveles de las proteínas de fusión Mfn1 y 2 y Opa1 y de los niveles de la proteína de fisión mitocondrial, Drp1. Tanto en los cultivos primarios de neuronas corticales como en las células SH-SY5Y se apreció una disminución significativa de los niveles de las proteínas de fusión mitocondrial Mfn1, Mfn2 y L-Opa1 tras la incubación durante 24 horas con A β ₄₂ (figura 18 A, B y C). Estos cambios en los niveles de las proteínas de fusión mitocondrial no fueron apreciables en la línea celular SK-APP (figura 18 A y D).

En cuanto a la proteína de fisión mitocondrial, Drp1, sus niveles se encontraron significativamente aumentados tanto en los cultivos primarios de neuronas corticales como en las células SH-SY5Y tratadas con A β ₄₂ durante 24 horas (figura 18 A, B y C). En las células SK-APP los niveles de esta proteína tampoco mostraron cambios significativos respecto las células SK-C (figura 18 A y D).

En conjunto, estos resultados muestran que el tratamiento con A β ₄₂ produjo un desequilibrio del balance de proteínas de fusión y fisión mitocondrial tal como se muestra en los cultivos primarios de neuronas corticales y en la línea SH-SY5Y. Este desbalance se inclinaría hacia una mayor fisión mitocondrial que podría preceder a la degradación de las mitocondrias dañadas. En cuanto al modelo de sobreexpresión de APP, no se observaron alteraciones en el balance de proteínas de fusión y fisión mitocondrial posiblemente porque la carga de A β que pudiera proporcionar este modelo no fuera suficiente o equiparable a la que ofrece la propia incubación con el péptido.

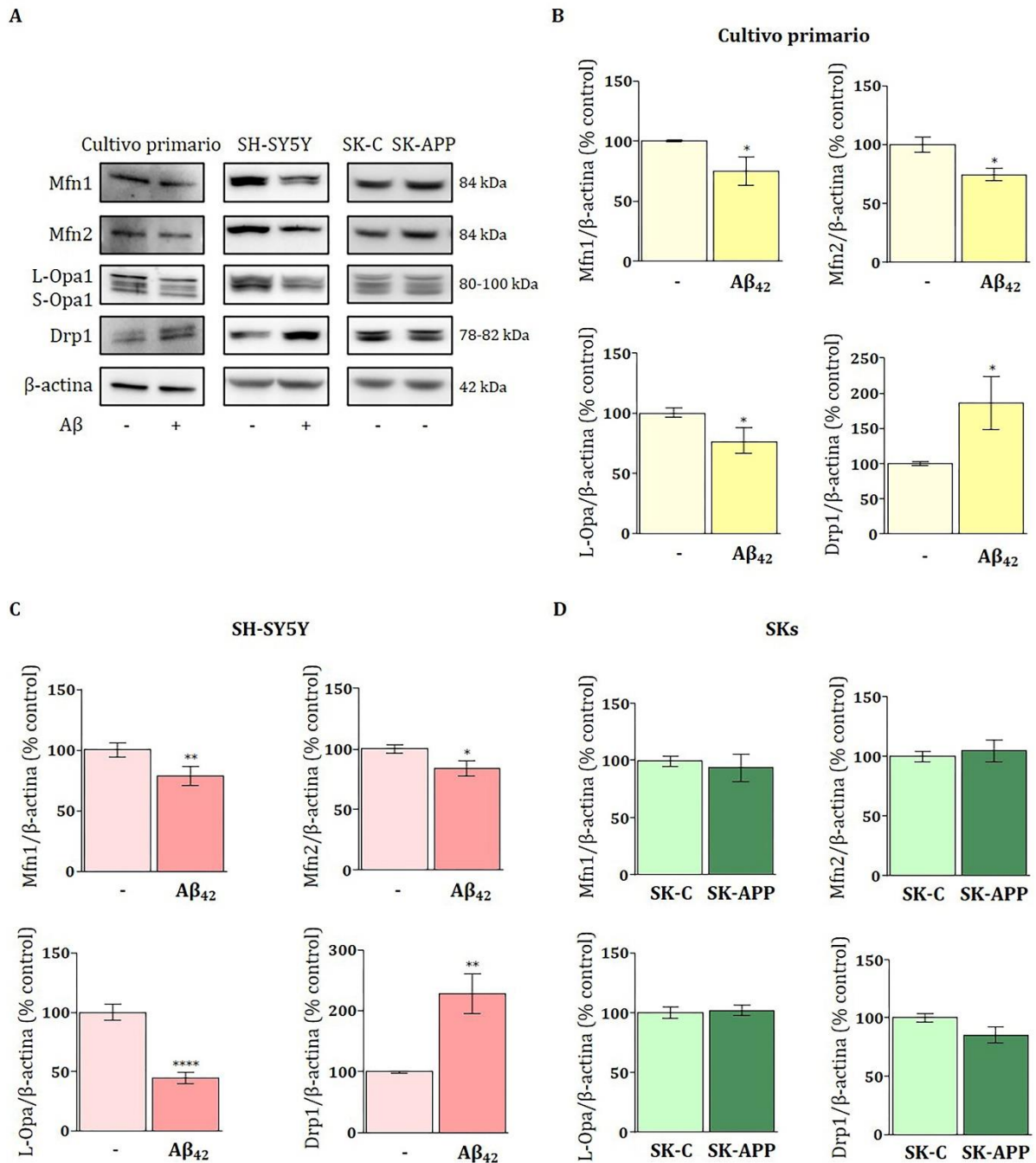


Figura 18. Niveles de proteínas de fusión y fisión mitocondrial en diferentes modelos celulares de amiloidosis. **A)** Western blot representativos mostrando los niveles de las proteínas de fusión (Mfn1, Mfn2 y Opa1) y fisión (Drp1) mitocondrial en los diferentes cultivos celulares. Niveles de las proteínas Mfn1, Mfn2, L-Opa1 y Drp1 en **(B)** cultivos primarios de neuronas y **(C)** células SH-SY5Y tratadas con Aβ₄₂ (1 μM) durante 24h medidos mediante western blot. **D)** Niveles de las proteínas Mfn1, Mfn2, L-Opa1 y Drp1 en las líneas celulares SK-APP y SK-C medidos mediante western blot. En todos los casos se usó β-actina como control de carga. En los histogramas se expresa en porcentaje los valores medios ± SEM de entre 3-5 experimentos independientes. * p<0,05; ** p<0,01, **** p<0,0001, respecto a sus correspondientes células control. (Prueba t de Student).

2.4 La sobreexpresión de APP en las células SK-APP no produce una sobrecarga de A β significativa

Los resultados anteriores muestran que las alteraciones mitocondriales encontradas en los cultivos primarios y de la línea celular SH-SY5Y tratados A β ₄₂ no son extensibles al modelo celular de sobreexpresión de la proteína APP, SK-APP. Aunque esta línea sí ha sido útil para el estudio de otros procesos celulares (Recuero et al., 2004, 2009), es posible que la sobreexpresión de APP en estas células no produjera una sobrecarga de amiloide equiparable a la inducida en los otros modelos estudiados (*in vitro* e *in vivo*) y, en consecuencia, las alteraciones esperadas no fueran lo suficientemente significativas. Para descartar la pérdida de la sobreexpresión debida a diferentes ciclos de división celular, se analizaron por western blot los niveles de APP en las células SK-APP y se compararon con los de la línea celular SK-C. Como se observa en la figura 19, la línea SK-APP mantenía la sobreexpresión de la proteína APP.

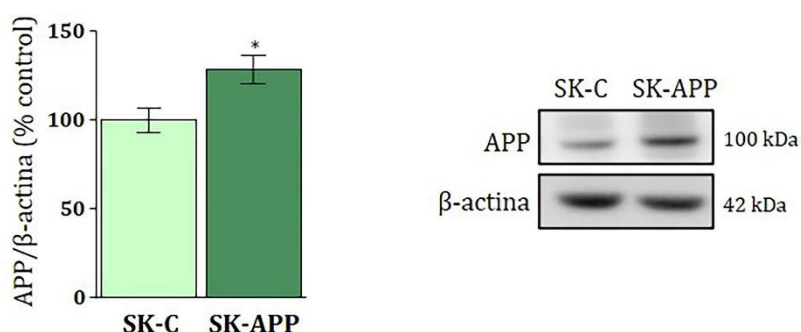


Figura 19. Niveles de APP determinados por western blot en las líneas celulares SK-C y SK-APP. Estimación de los niveles de APP en la línea celular SK-C y SK-APP (izquierda). En el panel derecho se muestra la imagen de un western blot representativo. En todos los casos se usó β -actina como control de carga. En el histograma se expresan en porcentaje los valores medios \pm SEM de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$, respecto a las respectivas células SK-C (Prueba t de Student).

Seguidamente se analizaron los niveles de A β intracelulares y secretados en el medio de cultivo en estas líneas celulares mediante ELISA, diferenciando entre el péptido A β ₄₀ y el péptido A β ₄₂. Como se muestra en la figura 20, a nivel intracelular no se encontraron diferencias significativas en los niveles de A β ₄₀ y A β ₄₂ entre las células SK-C y las células SK-APP (figura 20). Tampoco se apreciaron diferencias significativas en los niveles de A β ₄₀ y A β ₄₂ secretados al medio extracelular (figura 20).

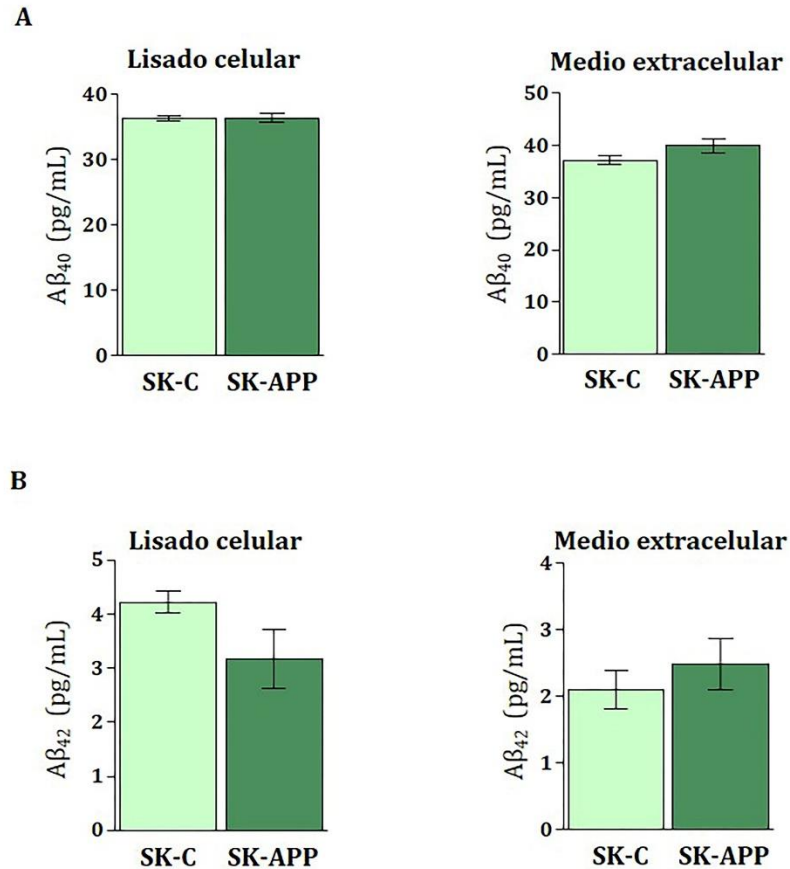


Figura 20. Niveles de Aβ₄₀ y Aβ₄₂ en las líneas celulares SK-C y SK-APP. A) Niveles de Aβ₄₀ y **B)** Niveles de Aβ₄₂, en lisado celular (panel izquierdo) y en el medio extracelular (panel derecho). En los histogramas se expresan los valores medios ± SEM de 3 experimentos independientes respecto a las células SK-C (Prueba t de Student).

En resumen, se podría pensar que al sobreexpresar la proteína APP en esta línea celular no se obtuvo un aumento en los niveles de los péptidos amiloideos. Esto apuntó más hacia la acumulación o sobrecarga de amiloide como la responsable de los desequilibrios encontrados en la biogénesis mitocondrial y en los procesos de fusión y fisión mitocondrial, inapreciables en la línea SK-APP.

2.5 La sobreexpresión de APP en las células SK-APP induce un aumento de autofagia

Puesto que los resultados de ELISA mostraron que los niveles de los péptidos Aβ₄₀ y Aβ₄₂ no variaban en estas células a pesar de que sí mostraban una sobreexpresión de APP respecto a las células SK-C, se pensó que esta ausencia de sobreproducción de estos

péptidos tóxicos podría estar asociada con un mecanismo exacerbado de su eliminación. Algunos estudios indican que la eliminación del péptido A β se puede producir por mecanismos de autofagia y, como ya se adelantó en la introducción, la autofagia es un proceso que permite la degradación y reutilización de proteínas y orgánulos. Por lo tanto, se quiso evaluar los niveles de autofagia en los cultivos celulares con sobreexpresión de APP y compararlos con las células SK-C. Los marcadores autofágicos más comúnmente utilizados son LC3-II, la forma lipidada de LC3-I y, p62, que son degradados en el lisosoma junto con los componentes citoplasmáticos. El incremento en la cantidad de autofagosomas puede deberse tanto a una mayor inducción de autofagia como a un mal aclaramiento por parte del lisosoma. Para analizar la presencia autofagosomas se analizan los niveles de LC3-II, presente en la membrana de estos orgánulos, así como de p62, cuyos niveles pueden disminuir cuando se produce una inducción prolongada del proceso de autofagia. Se analizaron los niveles de p62 y LC3-II en estas células. Como se muestra en la figura 21A, en las células SK-APP los niveles de p62 no mostraron diferencias significativas en condiciones basales al compararlos con las células SK-C (figura 21A). Sin embargo, los niveles del marcador de autofagia, LC3-II, si se encontraban significativamente aumentados en condiciones basales (figura 21B). Para determinar si estas diferencias se debían a una reducción en la síntesis de cada una de las proteínas marcadoras o a un mayor flujo autofágico, se utilizó bafilomicina, compuesto que inhibe la fusión de los autofagosomas con los lisosomas y, por tanto, permite determinar el flujo autofágico. Así es posible detectar la acumulación de p62 y de LC3-II, junto con la de otros marcadores autofágicos, puesto que la bafilomicina inhibe su propia degradación por el lisosoma (Yoshii & Mizushima, 2017). Al aplicar a los cultivos bafilomicina, pudimos comprobar cómo los niveles de p62 y de LC3-II aumentaban en las células con sobreexpresión de APP mucho más que en las células sin sobreexpresión de la proteína (figura 21).

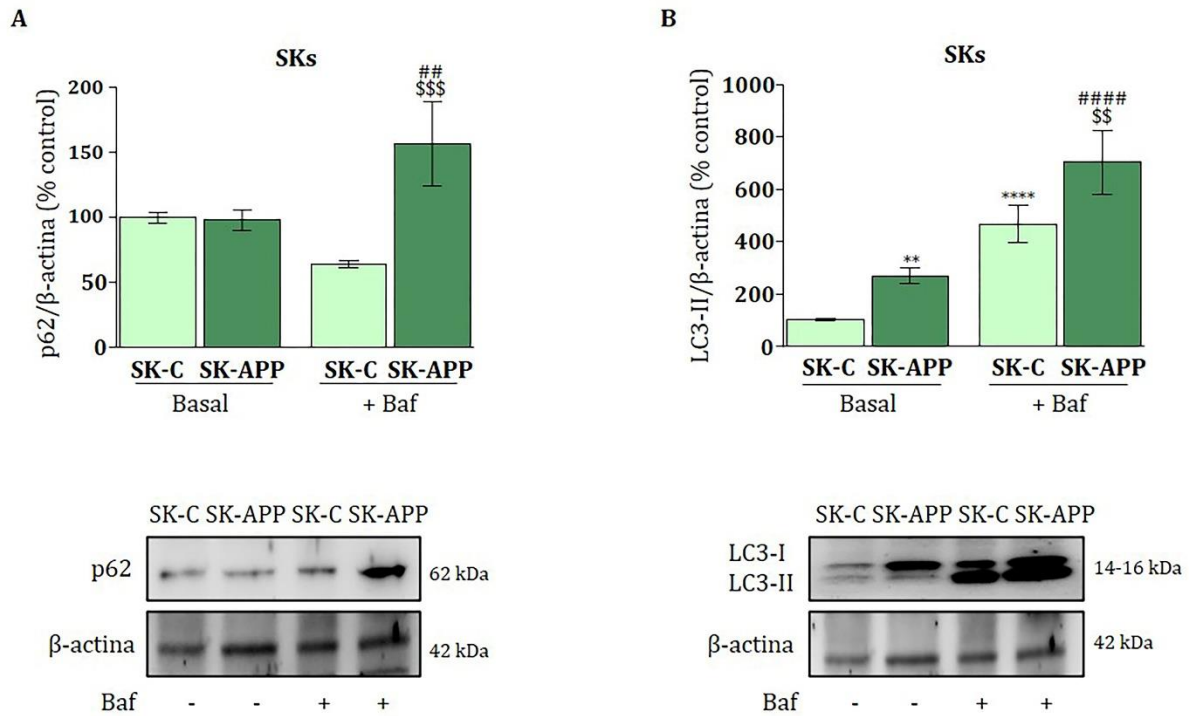


Figura 21. Autofagia en las líneas celulares SK-APP y SK-C. Estimación de los niveles del marcador autofágico (A) p62 y (B) LC3-II en la línea celular SK-APP y SK-C (panel superior) en condiciones basales y en presencia de bafilomicina (100 nM) para determinación del flujo autofágico. En el panel inferior se muestra la imagen de un western blot representativo. En todos los casos se usó β-actina como control de carga. En los histogramas se expresan en porcentaje los valores medios ± SEM de 3 experimentos independientes. ** p<0,01; **** p<0,0001, respecto a las células SK-C sin bafilomicina. ## p<0,01, #### p<0,0001, respecto a las células SK-APP sin bafilomicina. \$\$ p<0,01; \$\$\$ p<0,001, respecto a las células SK-C con bafilomicina. (ANOVA, análisis post-hoc LSD de Fisher).

En resumen, estos resultados sugirieron que la autofagia estaría aumentada en las células con sobreexpresión de la proteína APP. Ésta podría ser la causa por la que no se observó una mayor generación de los péptidos Aβ₄₀ y Aβ₄₂ en esta línea celular, al ser posiblemente eliminados mediante autofagia. La no existencia de una sobrecarga de amiloide en este modelo celular podría indicar que sólo la sobrecarga del péptido amiloide sería causante de las alteraciones mitocondriales encontradas en los otros modelos celulares utilizados, así como en el modelo animal de EA.

2.6 La sobrecarga de Aβ induce mitofagia

El desequilibrio entre los niveles de las proteínas de fusión y fisión mitocondrial favorable a la fisión mitocondrial conduce a las mitocondrias dañadas a ser eliminadas. La eliminación específica de las mitocondrias dañadas dentro de la red mitocondrial se

produce por el proceso selectivo de autofagia mitocondrial, conocido como mitofagia. Los resultados indican que la incubación con el péptido $A\beta_{42}$ podría aumentar la mitofagia. Para confirmar este aumento de mitofagia tras la incubación con $A\beta_{42}$, se analizó mediante inmunofluorescencia la colocalización de los marcadores específicos de autofagia p62 y LC3, con el marcador estructural para las mitocondrias ATP sintasa subunidad β ($CxV\beta$) tanto en condiciones de autofagia basal (ausencia y presencia de $A\beta_{42}$) como en presencia de bafilomicina para visualizar la acumulación de autofagosomas. Como se observa en la figura 22, la colocalización del marcador autofágico p62 con las mitocondrias resultó mayor tras 24 horas de incubación con $A\beta_{42}$ (Manders: SH-SY5Y = 0,89; SH-SY5Y con $A\beta_{42}$ = 0,97; figura 22 A y C). Resultados equivalentes se observaron con el marcador LC3 (Manders: SH-SY5Y = 0,89; SH-SY5Y con $A\beta_{42}$ = 0,95; figura 22 B y D). Al aplicar a los cultivos bafilomicina para comprobar la acumulación de autofagosomas, en las dos condiciones experimentales, se pudo comprobar que la colocalización del marcador p62 con las mitocondrias aumentó significativamente, tanto en presencia como en ausencia de $A\beta_{42}$, pero ésta colocalización fue aún mayor en las células tratadas con $A\beta_{42}$ comparada con las células sin tratamiento con el péptido (Manders: SH-SY5Y + bafilomicina = 0,92; SH-SY5Y con $A\beta_{42}$ + bafilomicina = 0,96; figura 22 A y C). La colocalización del marcador LC3 con las mitocondrias también aumentó al aplicar bafilomicina, en ausencia y presencia de $A\beta_{42}$, aunque no se encontró mayor colocalización en presencia del péptido (Manders: SH-SY5Y + bafilomicina = 0,96; SH-SY5Y con $A\beta_{42}$ + bafilomicina = 0,96; figura 22 B y D). Al analizar la cantidad de mitocondrias en las imágenes de inmunofluorescencia se comprobó que la incubación con el péptido redujo significativamente la cantidad de mitocondrias (figura 22 A, B y F) en consonancia con los experimentos mostrados previamente (figura 16B). Al aplicar a los cultivos bafilomicina, se observó un aumento de la fluorescencia correspondiente al marcador mitocondrial $CxV\beta$, pero este aumento fue mucho mayor en presencia de $A\beta_{42}$, confirmando el incremento de la inducción de mitofagia por el péptido (figura 22 A, B y F).

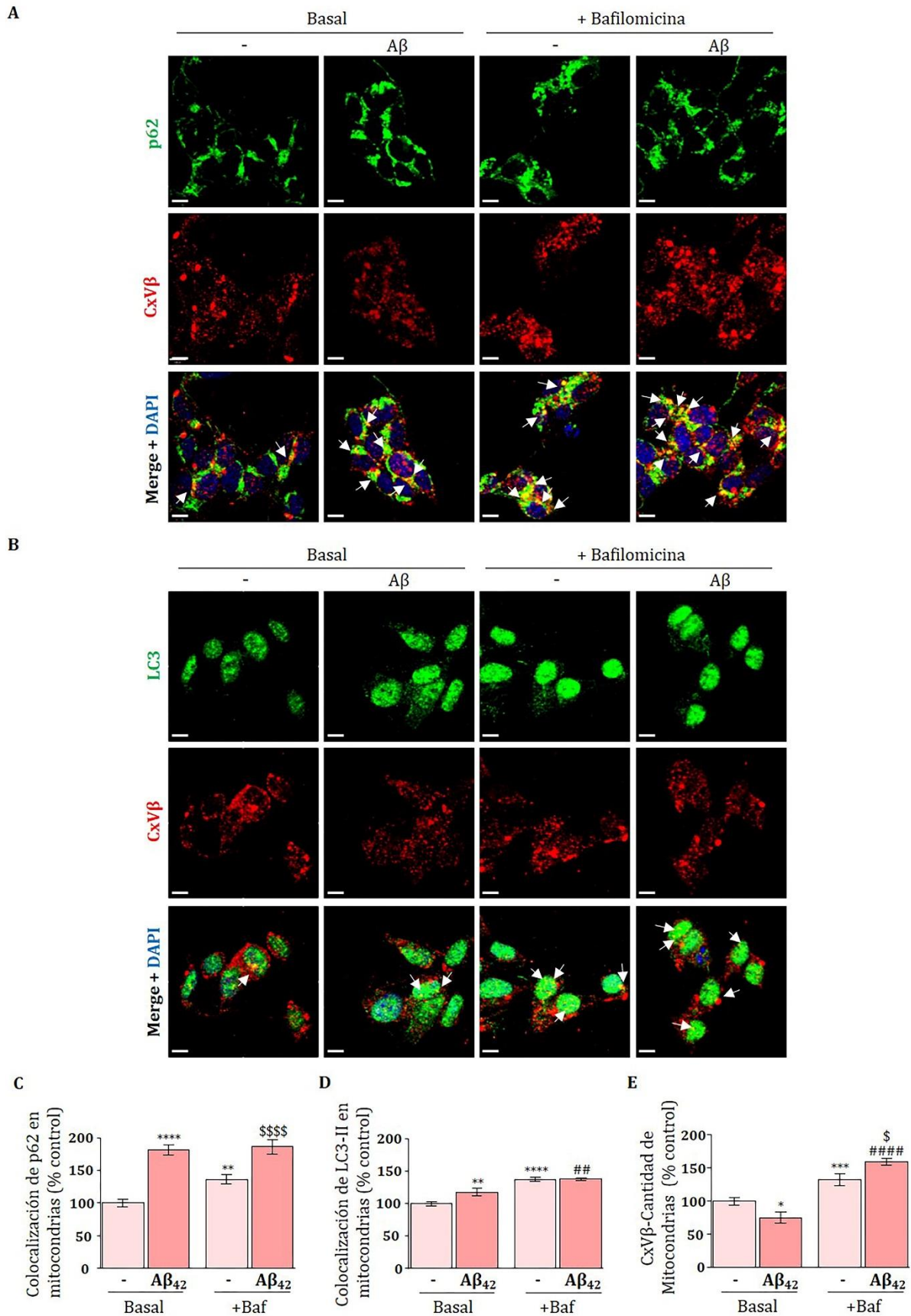


Figura 22. Mitofagia en las células SH-SY5Y en ausencia y presencia de A β_{42} . Inmunofluorescencia en células SH-SY5Y en ausencia y presencia del péptido A β_{42} (1 μ M) durante 24 horas mostrando el marcador

autofágico (A) p62 (verde) y (B) LC3 (verde) y el marcador mitocondrial ATP sintasa subunidad β (CxV β ; rojo). En los paneles marcados como “basal” se midieron los niveles de cada uno de los marcadores de autofagia (p62 y LC3) en ausencia y presencia de A β ₄₂. La adición de bafilomicina (100 nM) se utilizó para comprobar la acumulación de autofagosomas. En los paneles señalados como “merge” se muestran los núcleos de las células marcados con DAPI (azul). Las flechas en blanco indican puntos de colocalización de p62 (A) o LC3 (B), con el marcador mitocondrial CxV β . En todos los casos se muestran imágenes representativas. Barra de escala= 9 μ m. Cuantificación de la colocalización por inmunofluorescencia del marcador autofágico (C) p62 y (D) LC3 con el marcador mitocondrial CxV β en las diferentes condiciones experimentales. F) Cuantificación del marcador mitocondrial CxV β mostrando la cantidad de mitocondrias en las diferentes condiciones experimentales. En los histogramas se expresan en porcentaje los valores medios \pm SEM de 3 experimentos independientes en los cuales se tomaron entre 10-12 imágenes para cada condición. * p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001; **** p<0,0001, respecto a las células SH-SY5Ys sin tratamiento. ## p<0,01; #### p<0,0001, respecto a las células tratadas con A β ₄₂. \$ p<0,05; \$\$\$\$ p<0,0001, respecto a las células SH-SY5Ys tratadas solo con bafilomicina. (ANOVA, análisis post-hoc LSD de Fisher).

En resumen, estos resultados sugirieron que la presencia del péptido A β ₄₂, tras alterar el balance de las proteínas de fusión y fisión mitocondrial, favorable a la fisión, aumentó la mitofagia, lo que puede tener consecuencias fatales para las células, reduciendo el suministro energético al inducir la eliminación de mitocondrias.

2.7 La mitofagia inducida por A β es independiente del reclutamiento de Parkina en la mitocondria.

Como se comprobó anteriormente, la sobrecarga del péptido A β reducía los niveles de las proteínas de fusión localizadas en la membrana mitocondrial iniciando una cascada de eventos que finalizan con la degradación de las mitocondrias dañadas y su eliminación, cuyo resultado final es la mitofagia. La reducción de los niveles de las proteínas de fusión mitocondrial se puede producir por su degradación en el proteasoma para lo cual estas proteínas son previamente ubiquitinadas. Dentro de las posibles vías de inicio de mitofagia, la más común es la dependiente de la enzima E3 ubiquitina ligasa, Parkina, que es reclutada en las mitocondrias ante el daño mitocondrial para ubiquitinar a las proteínas de fusión, señal que las envía al proteasoma. Este hecho rompería el equilibrio de fusión/fisión mitocondrial favorable hacia la fisión de las mitocondrias dañadas. Para comprobar si la mitofagia inducida por la incubación con el péptido A β es dependiente de Parkina, se utilizó el modelo celular SH-SY5Y con sobreexpresión estable de la proteína Parkina fusionada con el péptido FLAG (FLAGParkin SH-SY5Y). La sobreexpresión de Parkina facilita su localización celular y la visualización de su reclutamiento en la

mitocondria al inicio de la mitofagia. Las células se incubaron con el péptido A β ₄₂ y se tomaron imágenes tras 1, 3, 5, 8 y 24 horas de incubación, lo que permitió visualizar la localización mitocondrial de Parkina. Como se observa en la figura 23A, no se observó reclutamiento de Parkina en las mitocondrias a ninguno de los tiempos de incubación con el péptido A β ₄₂. Como control positivo de este reclutamiento, se incubaron las células con el agente desacoplante e inductor de mitofagia carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP; 10 μ M), a los mismos tiempos de incubación que con el péptido A β ₄₂ y, en este caso, sí se observó un reclutamiento de Parkina en las mitocondrias visible tras 1 hora de incubación con CCCP (figura 23B).

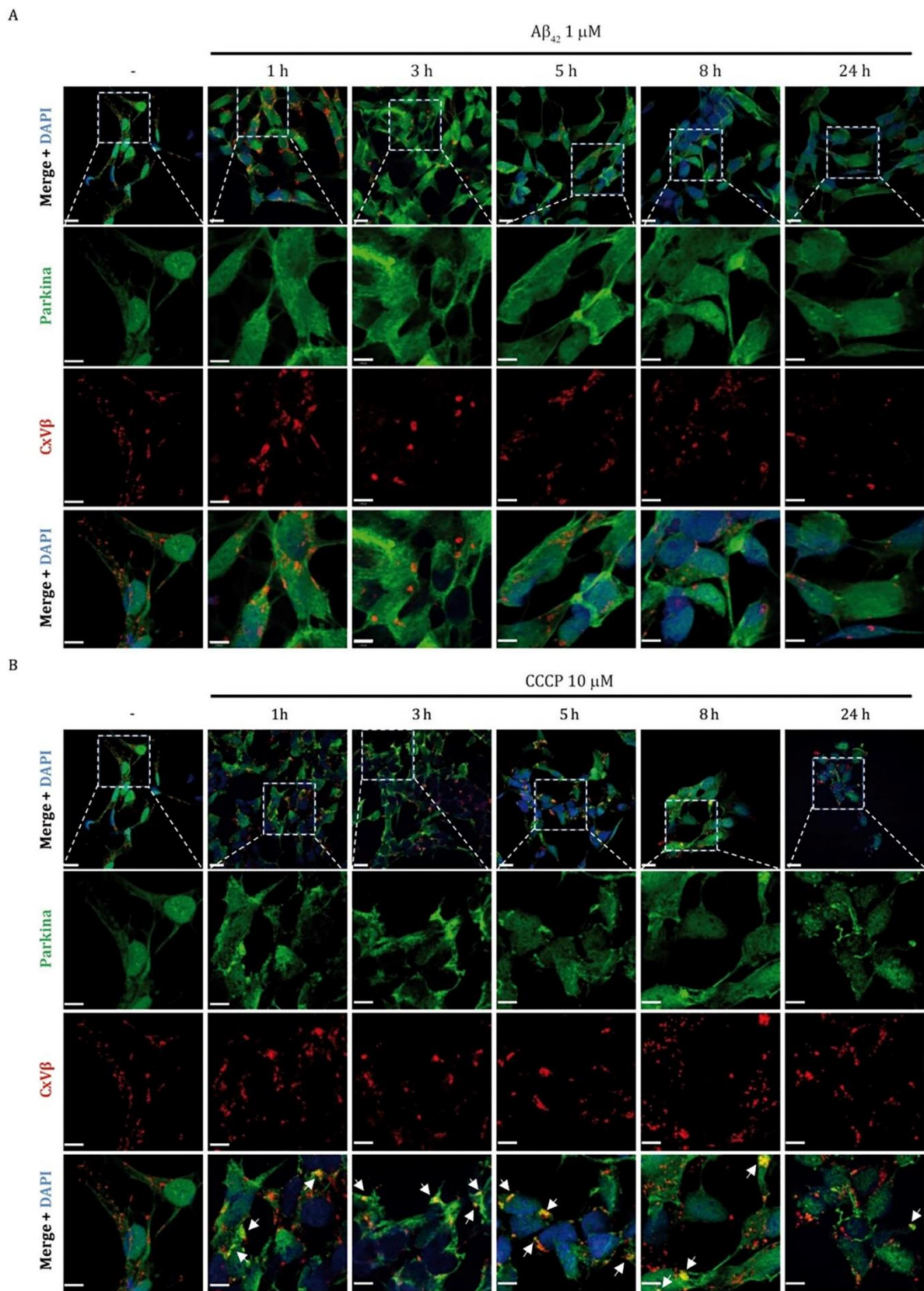


Figura 23. Reclutamiento de Parkina en la mitocondria a lo largo del tiempo en células $FLAG^{Parkin}$ SH-SY5Y tras la incubación con $A\beta_{42}$ y con CCCP. Inmunofluorescencia en células $FLAG^{Parkin}$ SH-SY5Y tras la incubación con (A) el péptido $A\beta_{42}$ (1 μ M) y (B) el compuesto CCCP (10 μ M) durante 1, 3, 5, 8 y 24

horas. En todos los casos se muestra la proteína Parkina fusionada con el péptido FLAG (verde) y el marcador mitocondrial ATP sintasa subunidad β (CxV β ; rojo). En los paneles señalados como “merge” se muestran los núcleos de las células marcados con DAPI (azul). Las imágenes superiores indican la superposición del marcaje de Parkina (verde) con las mitocondrias (rojo) y los núcleos teñidos con DAPI (azul) de un campo de células a escala mayor (barra de escala = 14 μm). Las imágenes de las tres filas inmediatamente debajo corresponden a áreas seleccionadas de las imágenes superiores a menor escala (barra de escala = 7 μm) y muestran el marcaje de Parkina (verde), de las mitocondrias (rojo) y la superposición con el marcaje de los núcleos teñidos con DAPI (azul). Las flechas en blanco indican puntos de colocalización de Parkina con las mitocondrias.

En resumen, estos resultados sugieren que la mitofagia inducida por la sobrecarga del péptido A β_{42} es independiente del reclutamiento de Parkina en la mitocondria. Por tanto, la reducción de los niveles de las proteínas de fusión mitocondrial y la mitofagia inducida por la sobrecarga del péptido A β observada previamente, podría ser dependiente de otras vías tal como se señaló anteriormente como Nix/Bnip3, FUNDC1, SMURF1 o el complejo Hsp90-Cdc37 entre otras (Ding & Yin, 2012; Lemasters, 2014).

2.8 La sobrecarga de A β reduce la actividad metabólica y despolariza las mitocondrias.

Como hemos visto anteriormente, la sobrecarga del péptido A β_{42} puede ser responsable de los desbalances en la biogénesis y en la dinámica mitocondrial iniciando una cascada de eventos que desembocan en la degradación mitocondrial por mitofagia. Las mitocondrias controlan importantes funciones en la célula y cualquier agresión a las mismas se refleja en una alteración funcional de éstas que, si no se repara, sirve de inicio a los procesos de fisión mitocondrial que acaban en mitofagia. En los siguientes experimentos se exploró si la incubación con A β_{42} podría desencadenar daños en la función mitocondrial que finalmente contribuyeran a la degradación de las mitocondrias. Para ello se analizó, en primer lugar, el efecto de la incubación de A β_{42} sobre los diferentes cultivos celulares utilizando el ensayo de viabilidad celular MTT. Este ensayo evalúa la actividad metabólica de las células incubadas con el compuesto bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) que es reducido enzimáticamente dando lugar al producto formazán que puede ser después disuelto y sus niveles medidos como se explica en el apartado 6.1 de Material y Métodos. En la figura 24 se muestra cómo la

incubación de $A\beta_{42}$ redujo significativamente la viabilidad celular indicando una menor actividad metabólica para formar el producto formazán.

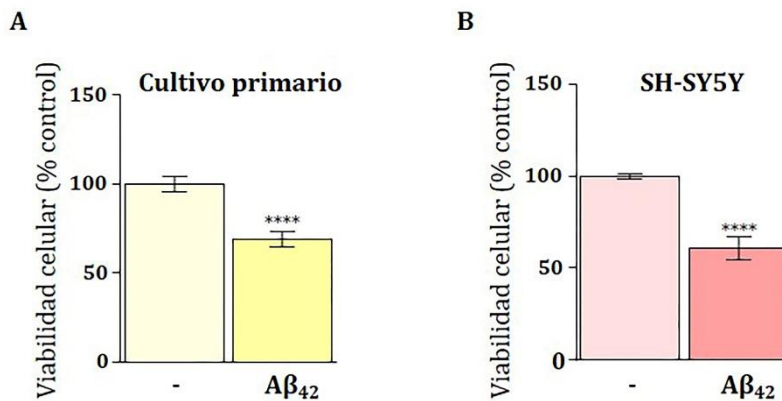


Figura 24. Efecto del péptido $A\beta_{42}$ sobre la viabilidad celular en cultivos celulares expuestos a $A\beta_{42}$. Viabilidad celular en (A) cultivos primarios de neuronas y (B) la línea celular humana de neuroblastoma SH-SY5Y tratadas con $A\beta_{42}$ (1 μ M) durante 24h. En los histogramas se expresan en porcentaje los valores medios \pm SEM de 4 experimentos independientes. **** $p < 0,0001$ respecto a sus respectivas células sin tratar con $A\beta_{42}$ (control) (Prueba t de Student).

Para confirmar que esta reducción de la actividad metabólica era sinónimo de una reducción de la actividad mitocondrial, se evaluó el efecto del péptido $A\beta$ sobre el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). $\Delta\Psi_m$ es un indicador de la homeostasis y función mitocondrial pues de él dependen procesos como la homeostasis de Ca^{2+} , la respiración, la fosforilación oxidativa y la formación de ROS. Una reducción del $\Delta\Psi_m$ indica una despolarización mitocondrial que puede ser el desencadenante para que las mitocondrias funcionalmente deterioradas se separen del resto de la red y se degraden por mitofagia. El potencial de membrana mitocondrial se analizó mediante imagen de células vivas por microscopía confocal analizando la fluorescencia del sensor catiónico fluorescente TMRM. Este compuesto es secuestrado por las mitocondrias funcionalmente activas y su fluorescencia es directamente proporcional al $\Delta\Psi_m$. En la figura 25, se muestra que la incubación del péptido $A\beta_{42}$ tanto en los cultivos primarios de neuronas corticales como en las células SH-SY5Y produjo una despolarización mitocondrial reduciendo el $\Delta\Psi_m$ en un 20% y un 30%, respectivamente.

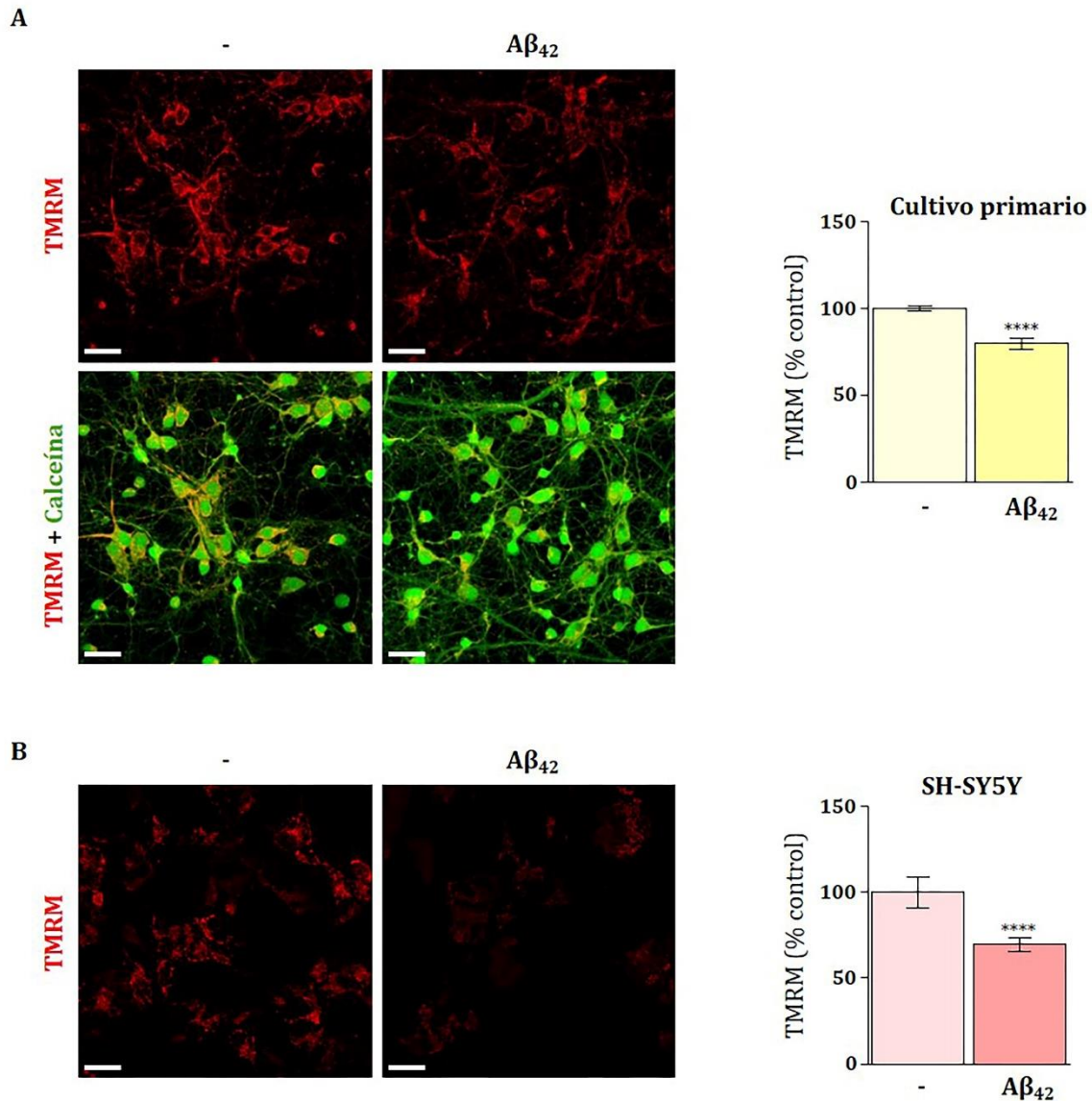


Figura 25. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) en modelos celulares de amiloidosis. El $\Delta\Psi_m$ se analizó evaluando la fluorescencia del TMRM (rojo) mediante microscopía confocal *in vivo*. $\Delta\Psi_m$ en (A) cultivos primarios de neuronas corticales de rata y (B) la línea celular humana de neuroblastoma SH-SY5Y tratadas con $A\beta_{42}$ (1 μ M) durante 24h. En los cultivos primarios además se utilizó calceína (verde) para verificar la pureza de los cultivos. Los datos están expresados como la media \pm SEM de entre 4-6 experimentos independientes **** $p < 0,0001$ respecto a las células control (Prueba t de Student). Barra de escala = 22 μ m

En conjunto estos resultados muestran que la incubación con $A\beta$ redujo la actividad metabólica y alteró la homeostasis y la función mitocondrial en los diferentes modelos celulares. Este hecho sugeriría que el péptido $A\beta$, ejerciendo su efecto sobre la función mitocondrial, podría provocar los desequilibrios en el balance de proteínas de fusión y fisión mitocondrial favorables a la fisión que, finalmente, conducirían a la degradación de las mitocondrias dañadas por mitofagia.

2.9 La sobrecarga de A β incrementa el flujo autofágico.

Los experimentos de inmunofluorescencia encaminados a dilucidar si la sobrecarga del péptido A β_{42} producía finalmente mitofagia, revelaron no sólo que aumentaban los marcadores autofágicos p62 y LC3 en las mitocondrias, sino también un aumento de estos marcadores en general. Al cuantificar los niveles de fluorescencia de p62 y de LC3 en las imágenes de células SH-SY5Ys en ausencia y presencia del péptido A β_{42} observamos un aumento en los niveles de ambos marcadores autofágicos en presencia del péptido (figura 26).

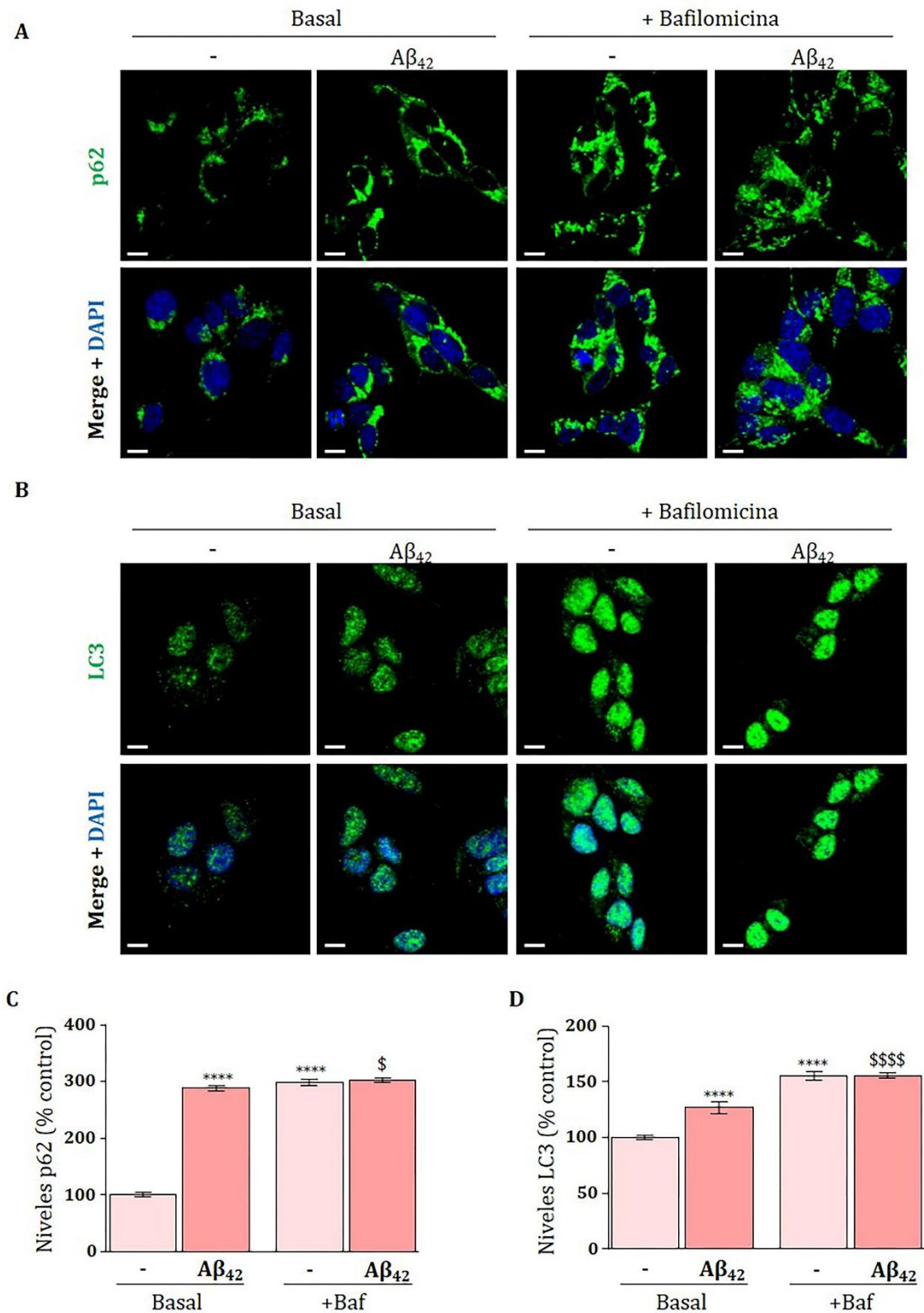


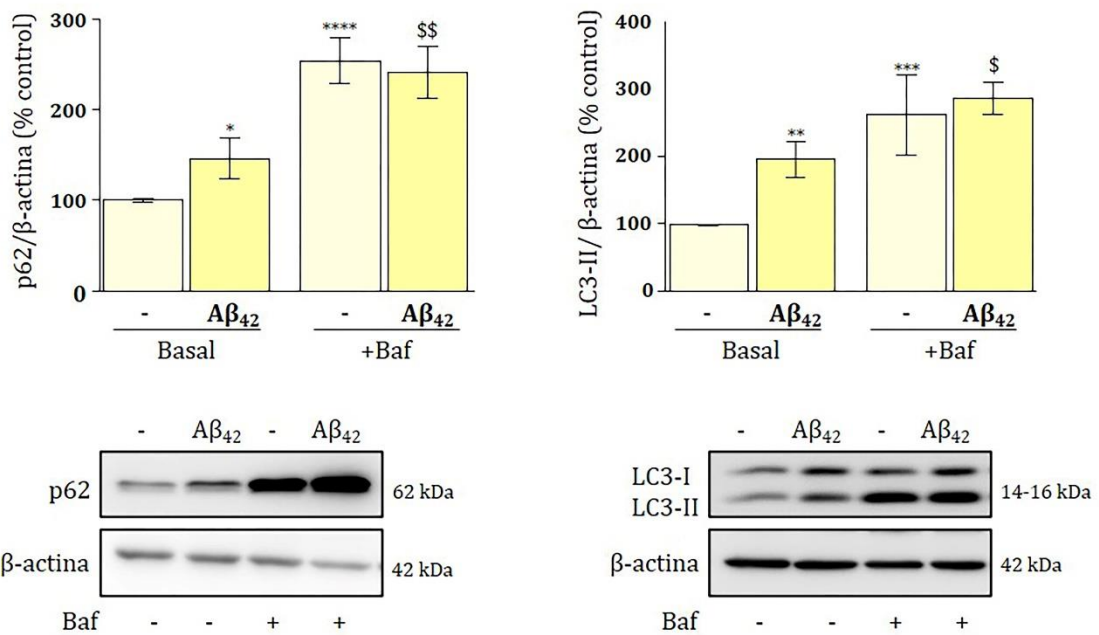
Figura 26. Marcadores autofágicos en inmunofluorescencia de células SH-SY5Y expuestas a Aβ₄₂. Inmunofluorescencia en células SH-SY5Ys en ausencia y presencia del péptido Aβ₄₂ (1 μM) durante 24 horas mostrando el marcador autofágico (A) p62 (verde) y (B) LC3 (verde). En los paneles marcados como “basal” se midieron los niveles de cada uno de los marcadores de autofagia (p62 y LC3) en ausencia y presencia de Aβ₄₂. La adición de bafilomicina (100 nM) se utilizó para comprobar la acumulación de autofagosomas. En los paneles señalados como “merge” se muestran los núcleos de las células marcados con DAPI (azul). En todos los casos se muestran imágenes representativas. Barra de escala = 9 μm. C) Cuantificación de la fluorescencia del marcador autofágico (C) p62 y (D) LC3 en las diferentes condiciones

experimentales. En los histogramas se expresan en porcentaje los valores medios \pm SEM de 5 experimentos independientes en los cuales se tomaron entre 10-12 imágenes para cada condición. **** $p < 0,0001$, respecto a las células SH-SY5Y sin tratamiento. \$ $p < 0,05$; \$\$\$\$ $p < 0,0001$, respecto a las células tratadas con $A\beta_{42}$. (ANOVA, análisis post-hoc LSD de Fisher).

La adición de bafilomicina provocó un aumento en los niveles de fluorescencia de estos marcadores tanto en ausencia como en presencia del péptido $A\beta_{42}$. Este incremento fue menos pronunciado en las células con sobrecarga de $A\beta$, posiblemente indicando que el flujo autofágico sería mayor *per se* al compararlo con la misma condición sin bafilomicina (figura 26). Resultados similares se obtuvieron mediante western blot, tanto en cultivos primarios de neuronas corticales como en células SH-SY5Ys en ausencia y presencia de $A\beta_{42}$ y bafilomicina (figura 27).

A

Cultivo primario



B

SH-SY5Y

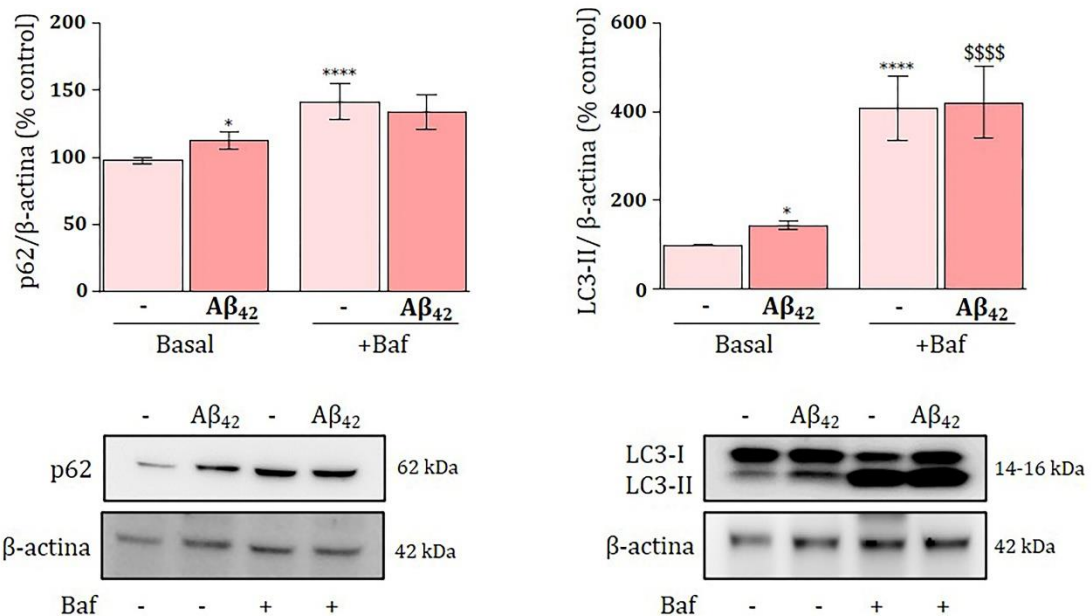


Figura 27. Marcadores autofágicos en cultivos primarios y células SH-SY5Y expuestas a Aβ₄₂. Niveles de los marcadores autofágicos p62 y LC3-II en (A) cultivos primarios de neuronas y (B) células SH-SY5Y tratadas con Aβ₄₂ (1 μM) durante 24h y en presencia de bafilomicina (100 nM) (panel superior) medidos mediante western blot. En los paneles inferiores se muestran las imágenes de western blot representativas. En todos los casos se usó β-actina como control de carga. En los histogramas se expresan en porcentaje los valores medios ± SEM de entre 3-5 experimentos independientes. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; ****

p<0,0001 respecto a las respectivas células SH-SY5Y sin tratamiento. \$ p<0,05; \$\$\$\$ p<0,0001, respecto a las células tratadas con A β ₄₂ (ANOVA, análisis post-hoc LSD de Fisher).

En resumen, estos resultados indican que la sobrecarga del péptido A β , además de incrementar la mitofagia con consecuencias fatales para las células, aumentaría el flujo autofágico en general. Es posible que este incremento en la autofagia pudiera estar relacionado con el aumento del flujo autofágico descrito en pacientes con EA y que se ha asociado con un mecanismo de eliminación del exceso del péptido amiloide en estos sujetos, en los estadios iniciales de la enfermedad. Para encontrar si existe esa posible relación, finalmente, se evaluó *in vivo* la evolución del proceso autofágico en los ratones APP/PS1, analizando los niveles de los marcadores p62 y LC3-II y comparándolos con los de los animales de fenotipo salvaje a las diferentes edades. La figura 28 A y B muestra cómo los niveles de los marcadores autofágicos p62 y LC3-II estaban incrementados tanto en corteza como en hipocampo a la edad de 6 meses y, a excepción del marcador p62 en la corteza, este aumento se mantuvo a la edad más avanzada de 12 meses.

En conjunto estos resultados están de acuerdo con los referidos a cultivos celulares en los que se vio que la incubación del péptido A β también fue inductora de autofagia. Nuestros resultados sugieren que, en los animales, esta sobrecarga de A β induce autofagia a edades tempranas (6 meses) y se mantuvo en edades posteriores, lo que equivaldría a un aumento de autofagia en estadios tempranos de la enfermedad conforme ocurre el proceso de amiloidosis.

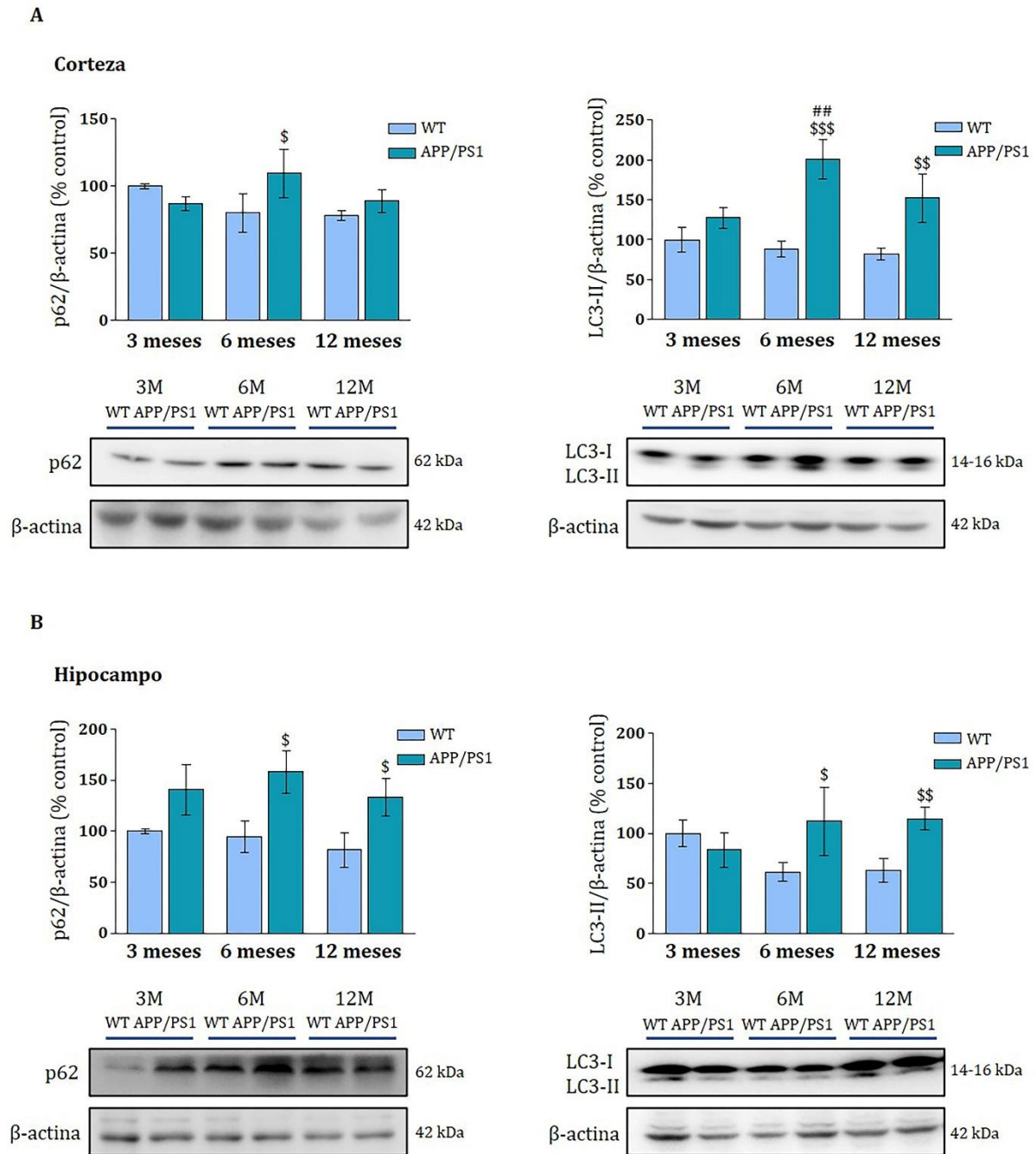


Figura 28. Autofagia en corteza cerebral e hipocampo de ratones APP/PS1 y WT. A) Niveles de p62 y LC3-II en la corteza cerebral de animales APP/PS1 y WT de 3, 6 y 12 meses de edad (panel superior). En el panel inferior se muestran las imágenes de western blot representativas. **B)** Niveles de p62 y LC3-II en el hipocampo de animales APP/PS1 y WT de 3, 6 y 12 meses de edad (panel superior). En el panel inferior se muestran las imágenes de western blot representativas. En todos los casos se usó β -actina como control de carga. En los histogramas se expresan en porcentaje los valores medios \pm SEM de entre 6 y 12 animales por grupo respecto a los ratones control de 3 meses. ## $p < 0,01$, respecto a ratones APP/PS1 de 3 meses. \$ $p < 0,05$, \$\$ $p < 0,01$, \$\$\$ $p < 0,001$, respecto a ratones WT de la misma edad (ANOVA, análisis post-hoc LSD de Fisher).

3. Efecto del inhibidor de fosfodiesterasa 7, S14, sobre las alteraciones mitocondriales inducidas por la sobrecarga de A β

Tras comprobar, utilizando diversos modelos experimentales, que en la EA se producen importantes alteraciones relacionadas con la biogénesis y la dinámica mitocondrial, así como con los procesos de autofagia, se quiso testar una posible aproximación terapéutica basada en la inhibición de PDE, cuyos efectos neuroprotectores ya habían sido previamente referidos en varias enfermedades neurodegenerativas, incluida la EA (Perez-Gonzalez et al., 2013). Además, se había descrito que algunos inhibidores de PDEs eran capaces de modular la función mitocondrial (Ding et al., 2018; Park et al., 2012). Para abordar este estudio, se analizaron los posibles efectos que el tratamiento con un inhibidor de PDE7, el compuesto S14, podría tener sobre la dinámica mitocondrial utilizando varios modelos *in vivo* e *in vitro* de EA.

3.1 El tratamiento con S14 activa la vía de señalización del AMPc

Se sabe que la inhibición de PDE7 activa la vía de señalización dependiente de AMPc, (Perez-Gonzalez et al., 2013; Zhang et al., 2008). En primer lugar, se quiso comprobar que esta vía de señalización también se activaba cuando se administraba un inhibidor de PDE7 por vía oral. Para ello se determinaron los niveles de AMPc en el cerebro de ratones APP/PS1 y WT de 6 meses de edad tras la administración oral S14 durante 4 semanas. Basándonos en los resultados obtenidos previamente, elegimos el grupo de edad de 6 meses por ser la edad a la cual eran manifiestas y significativas las alteraciones mitocondriales en los ratones APP/PS1. Se encontró que el tratamiento con S14, aumentó los niveles de AMPc en los ratones APP/PS1, tanto en corteza (figura 29A) como en hipocampo (figura 29B). En los ratones de fenotipo salvaje el incremento sólo fue significativo en el hipocampo (figura 29B), si bien se observó una tendencia al aumento a nivel cortical (figura 29A). Estos resultados indicaron que este compuesto administrado por vía oral alcanzaba con éxito el cerebro.

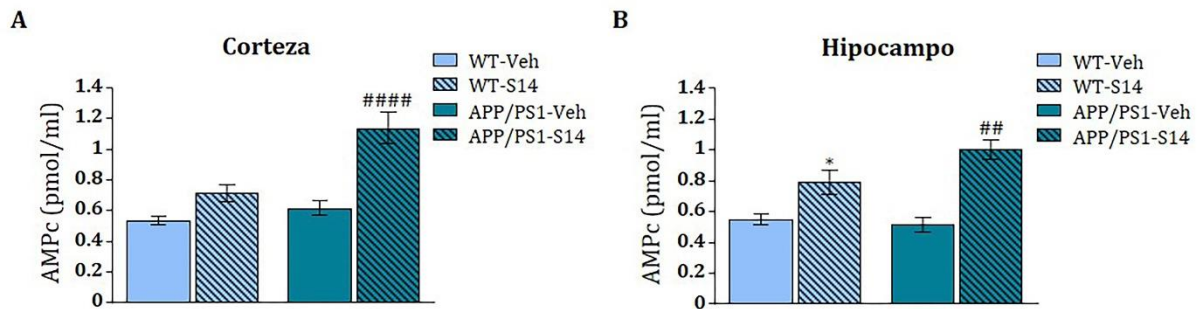


Figura 29. Niveles cerebrales de AMPc en corteza cerebral e hipocampo de ratones APP/PS1 y WT de 6 meses de edad. **A)** Niveles de AMPc en corteza cerebral de animales WT y APP/PS1 de 6 meses de edad tratados con S14 (15 mg/kg) o vehículo. **B)** Niveles de AMPc en hipocampo de animales WT y APP/PS1 de 6 meses de edad tratados con S14 (15 mg/kg) o vehículo. Los datos están expresados como la media \pm SEM de entre 6-7 animales por grupo respecto al grupo WT con vehículo. * $p < 0,05$, respecto a ratones WT vehículo. ## $p < 0,01$, #### $p < 0,0001$, respecto a ratones APP/PS1 vehículo (ANOVA, análisis post-hoc LSD de Fisher).

3.2 El fármaco S14 incrementa la cantidad de mitocondrias en ratones APP/PS1 y en cultivos neuronales tratados con A β ₄₂

Para determinar la cantidad de mitocondrias, se analizó la masa mitocondrial midiendo los niveles de la CxV β mediante western blot. En la corteza cerebral, los resultados mostraron que, tras el tratamiento oral con S14, se recuperaban parcialmente los niveles de CxV β en los ratones APP/PS1, que eran significativamente menores a los observados en los ratones WT (figura 30A). Sin embargo, no se observó ningún efecto del tratamiento con S14 sobre los ratones WT.

En el hipocampo, los niveles de esta proteína en los ratones APP/PS1 de 6 meses se incrementaron con el tratamiento oral con S14 (figura 30B). De nuevo, no se encontraron cambios en los niveles de esta proteína en los ratones de fenotipo salvaje tras el tratamiento con S14 (figura 30B).

En los experimentos *in vitro*, utilizando la línea celular SH-SY5Y, la reducción de los niveles de CxV β por la sobrecarga de A β ₄₂ fueron revertidos por el tratamiento con S14 (figura 30C),

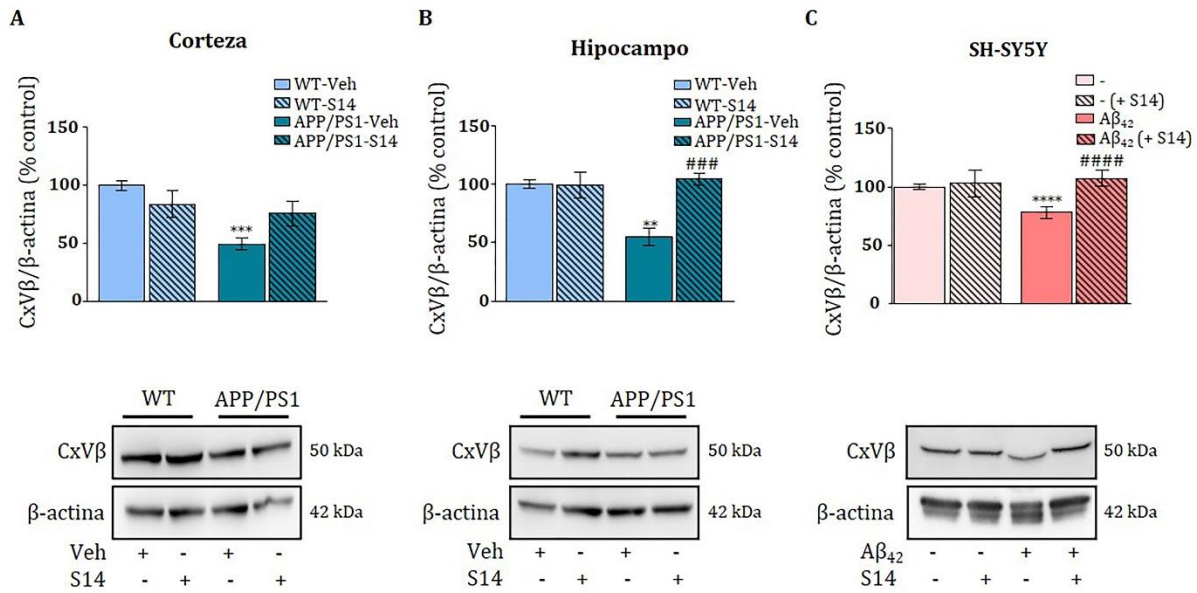


Figura 30. Masa mitocondrial en corteza e hipocampo de ratones APP/PS1 y WT de 6 meses de edad y el modelo celular SH-SY5Y expuesto a Aβ₄₂. Niveles de CxVβ en (A) corteza cerebral y (B) hipocampo de animales de 6 meses de edad tratados con S14 (15 mg/kg) o con vehículo (panel superior). En la parte inferior se muestra la imagen de un western blot representativo. En los histogramas se expresan en porcentaje los valores medios ± SEM de entre 3-7 animales por grupo respecto a los ratones WT con vehículo. ** p<0,01; *** p<0,001, respecto a ratones WT con vehículo. ### p<0,001, respecto a ratones APP/PS1 con vehículo (ANOVA, análisis post-hoc LSD de Fisher). (C) Niveles de CxVβ en las células SH-SY5Y tratadas con Aβ₄₂ (1 μM) y S14 (15 μM) durante 24h (panel superior). En el panel inferior se muestra la imagen de un western blot representativo. En los histogramas se expresan en porcentaje los valores medios ± SEM de 4 experimentos independientes. En todos los casos se utilizó la proteína β-actina como control de carga. Veh=Vehículo. **** p<0,0001, respecto a las células control sin tratamiento. #### p<0,0001, respecto a las células tratadas con Aβ (ANOVA, análisis post-hoc LSD de Fisher).

Se llevó a cabo una evaluación adicional del efecto de S14 sobre la masa mitocondrial *in vivo* utilizando además de la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y, neuronas corticales primarias de rata. Las células estuvieron expuestas simultáneamente a Aβ₄₂ (1 μM) y S14 (15 μM) durante 24 horas. La masa mitocondrial fue evaluada mediante imágenes de inmunofluorescencia utilizando el marcaje con el compuesto TMRM y calceína. El análisis densitométrico de estas imágenes reveló una cantidad reducida de mitocondrias respecto al volumen celular total en células expuestas Aβ₄₂ en comparación con las células tratadas con vehículo, tanto en células SH-SY5Y (figura 31A) como en cultivos neuronales primarios (figura 31B). El tratamiento con S14 evitó este efecto inducido por el Aβ₄₂ en ambos modelos celulares ya que no se observó ningún cambio en la masa mitocondrial respecto a las células control no expuestas a Aβ₄₂ (figura 31).

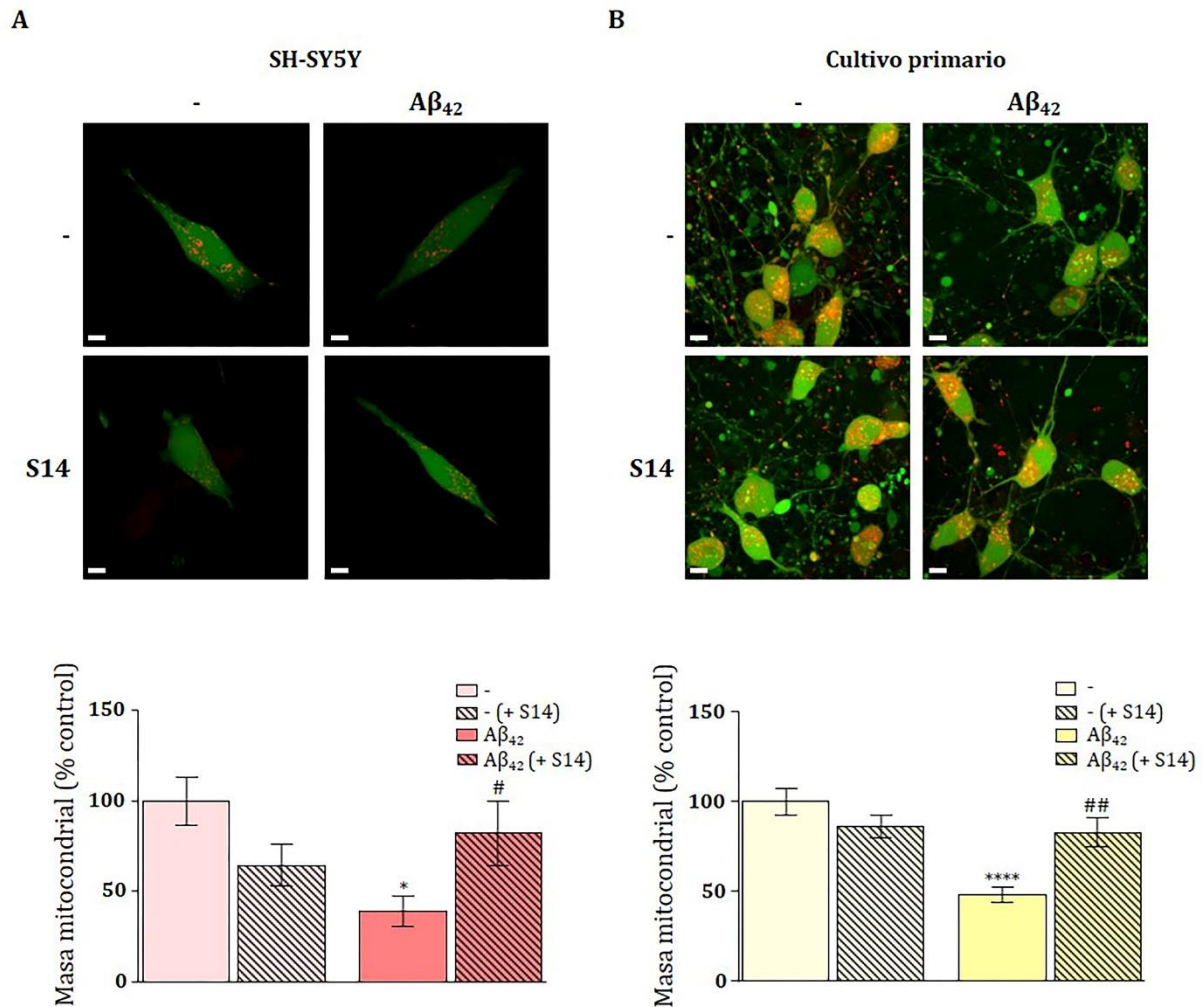


Figura 31. Masa mitocondrial en modelo celular SH-SY5Y y en cultivo primario de neuronas expuestos a Aβ₄₂. La biogénesis mitocondrial se evaluó analizando los volúmenes de células independientes (fluorescencia citosólica correspondiente a Calceína) y los correspondientes volúmenes mitocondriales (fluorescencia de TMRM) en células SH-SY5Y y cultivo primario de neuronas. **A)** Imágenes representativas de células SH-SY5Y incubadas con Calceína (verde) y TMRM (rojo). Las células SH-SY5Y fueron tratadas con Aβ₄₂ (1μM) y con el inhibidor S14 (15μM). Barra de escala = 9.00 μm. **B)** Imágenes representativas de cultivo primario de neuronas incubadas con Calceína y TMRM. Las neuronas fueron tratadas con Aβ₄₂ (1μM) y con el inhibidor S14 (15μM). Barra de escala = 14 μm. En los histogramas (panel inferior) se expresan en porcentaje los valores medios ± SEM de los cocientes de volumen mitocondrial respecto al volumen celular de 4 experimentos independientes. * p<0,05; **** p<0,0001, respecto a las células control. # p<0,05; ## p<0,001, respecto a las células tratadas con Aβ (ANOVA, análisis post-hoc LSD de Fisher).

Estos resultados sugieren que el inhibidor de PDE7, S14, fue capaz de restituir la masa mitocondrial que se vio reducida por efecto de la sobrecarga de Aβ.

3.3 El tratamiento con S14 incrementa la biogénesis mitocondrial en ratones APP/PS1 y en la línea celular SH-SY5Y tratada con Aβ₄₂

Para analizar la biogénesis mitocondrial se determinaron los niveles de PGC-1α en los cerebros de los diferentes grupos de ratones tras el tratamiento oral con S14. En corteza cerebral de los ratones APP/PS1, se observó un ligero descenso en los niveles de PGC-1α en comparación con los detectados en los ratones WT (figura 32A). Tras el tratamiento con S14, los niveles de esta proteína se incrementaron significativamente en los ratones APP/PS1, pero no en los ratones WT (figura 32A).

Al analizar los niveles de PGC-1α en el hipocampo, los resultados fueron similares, incrementándose los niveles de PGC-1α tras la administración de S14 únicamente en los ratones APP/PS1 (figura 32B).

Además, se determinó el efecto de S14 sobre los niveles de PGC-1α en células SH-SY5Y tratadas con Aβ₄₂ oligomérico durante 24 horas. Los resultados mostraron que los niveles de PGC-1α se encontraron reducidos en células expuestas a Aβ₄₂ en comparación con las células no tratadas, mientras que la coadministración con S14 abolió por completo el efecto inducido por Aβ₄₂ (figura 32C).

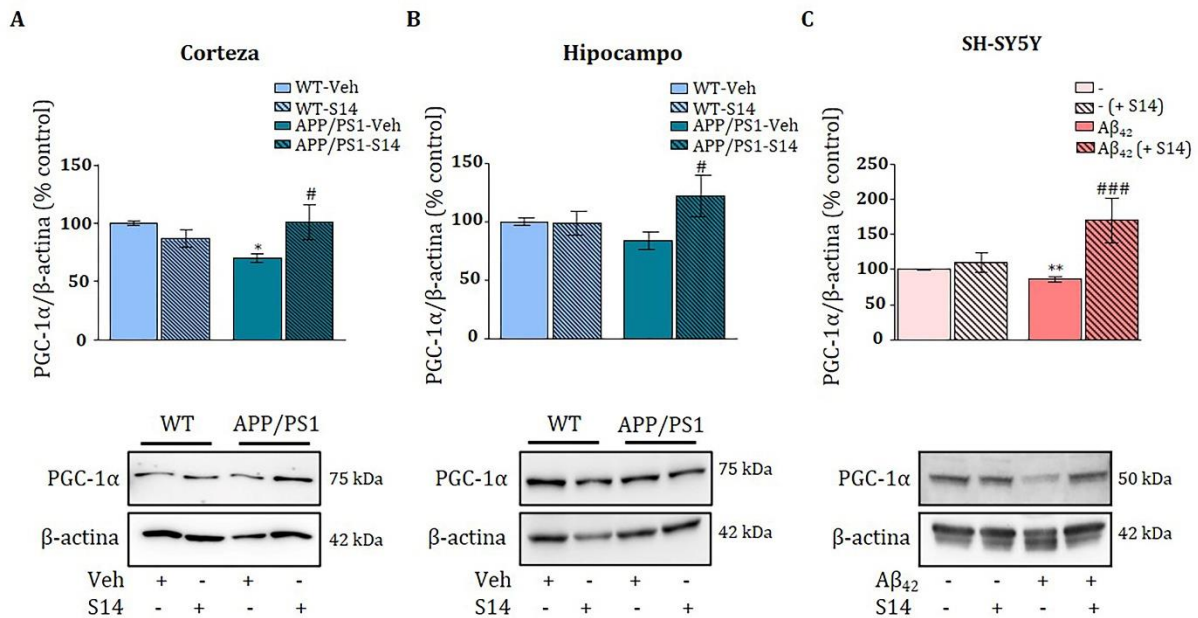


Figura 32. Biogénesis mitocondrial en corteza e hipocampo de ratones APP/PS1 y WT de 6 meses de edad y el modelo celular SH-SY5Y expuestos a Aβ₄₂. Niveles de PGC-1α en (A) corteza cerebral y (B) hipocampo de animales de 6 meses de edad tratados con S14 (15 mg/kg) o con vehículo (panel superior). En la parte inferior se muestra la imagen de un western blot representativo. En los histogramas se expresan en porcentaje los valores medios ± SEM de entre 4-7 animales por grupo respecto a los ratones WT con vehículo. *p<0,05, respecto a ratones WT con vehículo. # p<0,05, respecto a ratones APP/PS1 con vehículo (ANOVA, análisis post-hoc LSD de Fisher). C) Niveles de PGC-1α en las células SH-SY5Y tratadas con Aβ₄₂ (1 μM) y S14 (15 μM) durante 24h (panel superior). En el panel inferior se muestra la imagen de un western

blot representativo En los histogramas se expresan en porcentaje los valores medios \pm SEM de 4 experimentos independientes. En todos los casos se utilizó la proteína β -actina como control de carga. Veh=Vehículo. ** $p < 0,01$, respecto a las células control sin tratamiento. ### $p < 0,001$, respecto a las células tratadas con $A\beta$ (ANOVA, análisis post-hoc LSD de Fisher).

De acuerdo con los resultados obtenidos en ambos modelos experimentales, el inhibidor PDE7, S14, restauró la biogénesis mitocondrial dañada debido a la sobrecarga de $A\beta$ como se desprende de los datos resultantes en los ratones APP/PS1 y las células SH-SY5Y.

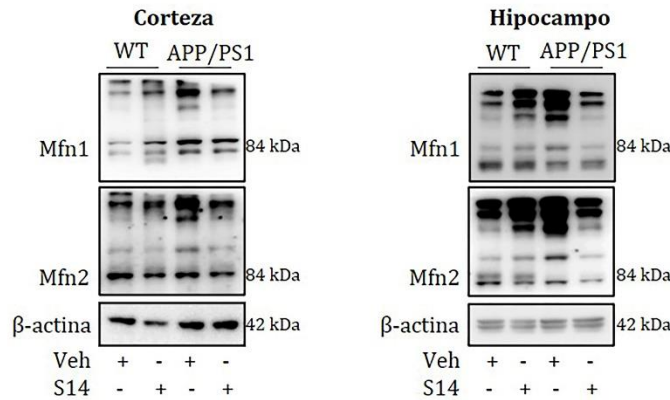
3.4 El tratamiento con S14 modula los niveles de las proteínas de fusión y fisión mitocondrial en ratones APP/PS1 y en la línea celular SH-SY5Y tratada con $A\beta$

Como se vio que el tratamiento oral con S14 podía rescatar los niveles de masa y biogénesis mitocondrial cuya reducción se asoció a una acumulación $A\beta$ en los ratones APP/PS1, se planteó si la inhibición PDE7 también podría inducir cambios en los procesos de fusión y fisión mitocondrial. En primer lugar, se analizaron los niveles de las proteínas Mfn1 y Mfn2 en corteza e hipocampo de los diferentes grupos experimentales. Tras un daño mitocondrial, las proteínas mitofusinas son sustratos para la ubiquitinación aumentando la tasa de fisión mitocondrial. Por ello, analizamos la ubiquitinación de Mfn1 y Mfn2 en las muestras cerebrales de estos animales. En la corteza cerebral observamos una mayor ubiquitinación de Mfn1 y Mfn2 en las muestras procedentes de los ratones APP/PS1 (figura 33A) y este patrón de ubiquitinación de mitofusinas se vio claramente restablecido tras el tratamiento con S14 sólo en ratones transgénicos, en comparación con ratones WT (figura 33A). En el hipocampo, los resultados fueron muy similares a los observados a nivel cortical, detectando una mayor ubiquitinación de Mfn1 y Mfn2 en las muestras procedentes de los ratones APP/PS1 y una reducción tras el tratamiento con S14, sólo en este grupo de animales (figura 33A).

El análisis de los niveles de la proteína de fusión L-Opa1 reveló una recuperación en los niveles de esta proteína tras el tratamiento con S14 en la corteza cerebral (figura 33B) de los ratones APP/PS1, no observándose ningún efecto en los ratones de fenotipo salvaje (figura 33B). A nivel del hipocampo, tras la administración de S14 en los ratones APP/PS1 también se observó un aumento en los niveles de L-Opa1 (figura 33C).

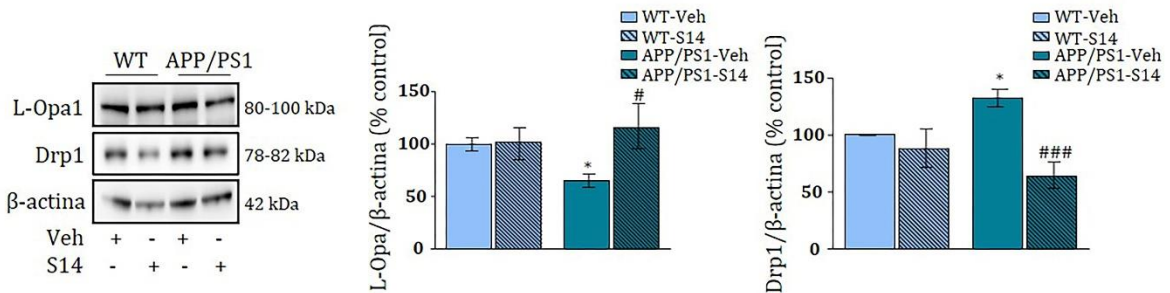
Después se analizaron los niveles de la proteína de fisión Drp1. En la corteza cerebral, se observó que, tras el tratamiento con S14, los niveles de esta proteína, que tendían a estar incrementados en los ratones APP/PS1, revertían hasta valores similares a los detectados en los ratones controles (figura 33B). En el hipocampo de estos animales, el patrón de expresión de Drp1 fue similar al observado a nivel cortical y de nuevo, tras la administración crónica de S14, se recuperaron los niveles de Drp1 hasta valores iguales a los observados en el grupo control, formado por ratones no transgénicos (figura 33C).

A



B

Corteza



C

Hipocampo

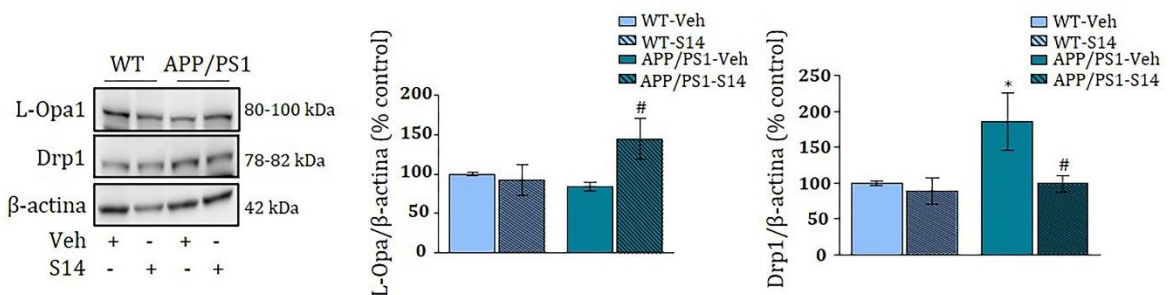


Figura 33. Niveles de proteínas de fusión y fisión mitocondrial en corteza e hipocampo de ratones APP/PS1 y WT de 6 meses de edad. A) Western blot representativos mostrando los niveles de las proteínas de fusión (Mfn1, Mfn2) así como sus patrones de ubiquitinación tanto en corteza cerebral como en hipocampo en ausencia y presencia de S14. **B)** Niveles de las proteínas L-Opa1 y Drp1 en corteza cerebral

de ratones APP/PS1 y WT de 6 meses tratados con S14 (15 mg/kg) o con vehículo. Los paneles de la izquierda muestran imágenes de western blot representativos. **C)** Niveles de las proteínas L-Opa1 y Drp1 en hipocampo de ratones APP/PS1 y WT de 6 meses tratados con S14 (15 mg/kg) o con vehículo. Los paneles de la izquierda muestran imágenes de western blot representativos. En todos los casos se usó β -actina como control de carga. En los histogramas se expresan en porcentaje los valores medios \pm SEM de entre 3-7 animales por grupo respecto a los ratones WT con vehículo. * $p < 0,05$, respecto a ratones WT con vehículo. # $p < 0,05$; ### $p < 0,001$ respecto a ratones APP/PS1 con vehículo (ANOVA, análisis post-hoc LSD de Fisher). Veh=Vehículo.

Paralelamente, se observó que el tratamiento con S14 en células SH-SY5Y expuestas al péptido $A\beta_{42}$ oligomérico rescató los niveles reducidos de proteínas de fusión mitocondrial (Mfn1, Mfn2 y L-Opa1) llevándolos a niveles similares a los de las células no tratadas (figura 34 B, C, D).

También, el tratamiento con S14 en células SH-SY5Y expuestas a $A\beta_{42}$ rescató los niveles de de la proteína de fisión mitocondrial Drp1 a valores similares de las células no tratadas (figura 34E).

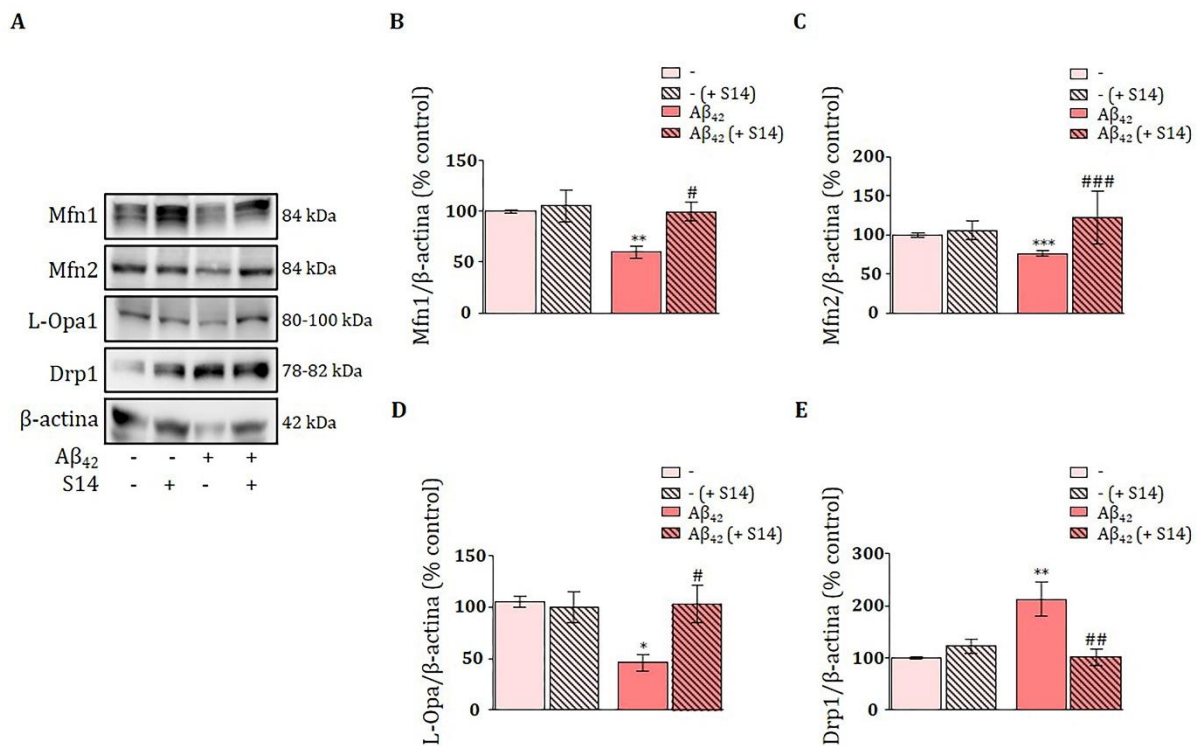


Figura 34. Niveles de proteínas de fusión y fisión mitocondrial en diferentes modelos celulares expuestas a $A\beta_{42}$. **A)** Western blot representativos mostrando los niveles de las proteínas de fusión (Mfn1, Mfn2 y L-Opa1) y fisión (Drp1) mitocondrial en las células SH-SY5Y. Niveles de la proteína **(B)** Mfn1, **(C)** Mfn2, **(D)** L-Opa1 y **(E)** Drp1 en las células SH-SY5Y tratadas con $A\beta_{42}$ 1 μ M y S14 15 μ M durante 24h. En los histogramas se expresa en porcentaje los valores medios \pm SEM de entre 5-7 experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ respecto a las células control sin tratamiento. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$, respecto a las células tratadas con $A\beta$ (ANOVA, análisis post-hoc LSD de Fisher). En todos los casos se utilizó la proteína β -actina como control de carga.

3.5 El tratamiento con S14 modula la expresión de marcadores de autofagia en APP/PS1 y en la línea celular SH-SY5Y tratada con A β ₄₂

Tras comprobar el efecto del tratamiento con S14 en los grupos experimentales a nivel de los procesos de biogénesis y dinámica mitocondrial, se quiso comprobar si la autofagia también se veía modulada por efecto de S14 en estos modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*. Se analizaron los niveles de los principales marcadores de autofagia, p62 y LC3-II.

Se encontró que los niveles de p62 en la corteza de los ratones APP/PS1, que eran significativamente más altos que los observados en los ratones WT, se reducían de forma drástica tras el tratamiento oral con S14 (figura 35A). En los ratones de fenotipo salvaje también se observó un descenso en los niveles de p62 tras el tratamiento con S14, aunque esta reducción no resultó ser estadísticamente significativa (figura 35A).

En el hipocampo, los resultados obtenidos fueron muy similares a los observados a nivel cortical. Los niveles de p62 ligeramente incrementados en los ratones APP/PS1 respecto a los ratones de fenotipo salvaje, se redujeron de forma muy evidente tras el tratamiento con el inhibidor S14 (figura 35D).

Por otra parte, en la corteza cerebral de los ratones APP/PS1 se observó que, tras el tratamiento con S14, los niveles de LC3-II que se encontraban elevados se restauraron hasta valores similares a los detectados en el grupo control (figura 35B). En el grupo de ratones WT no se observó ningún efecto del tratamiento con S14 sobre los niveles de LC3-II.

A nivel del hipocampo, el incremento de los niveles de LC3-II en los ratones APP/PS1 respecto a la observada en ratones WT, desapareció tras el tratamiento con S14 (figura 35E). De nuevo no se encontraron cambios significativos en los niveles de este marcador autofágico en los ratones de fenotipo salvaje tras el tratamiento con S14 (figura 35E).

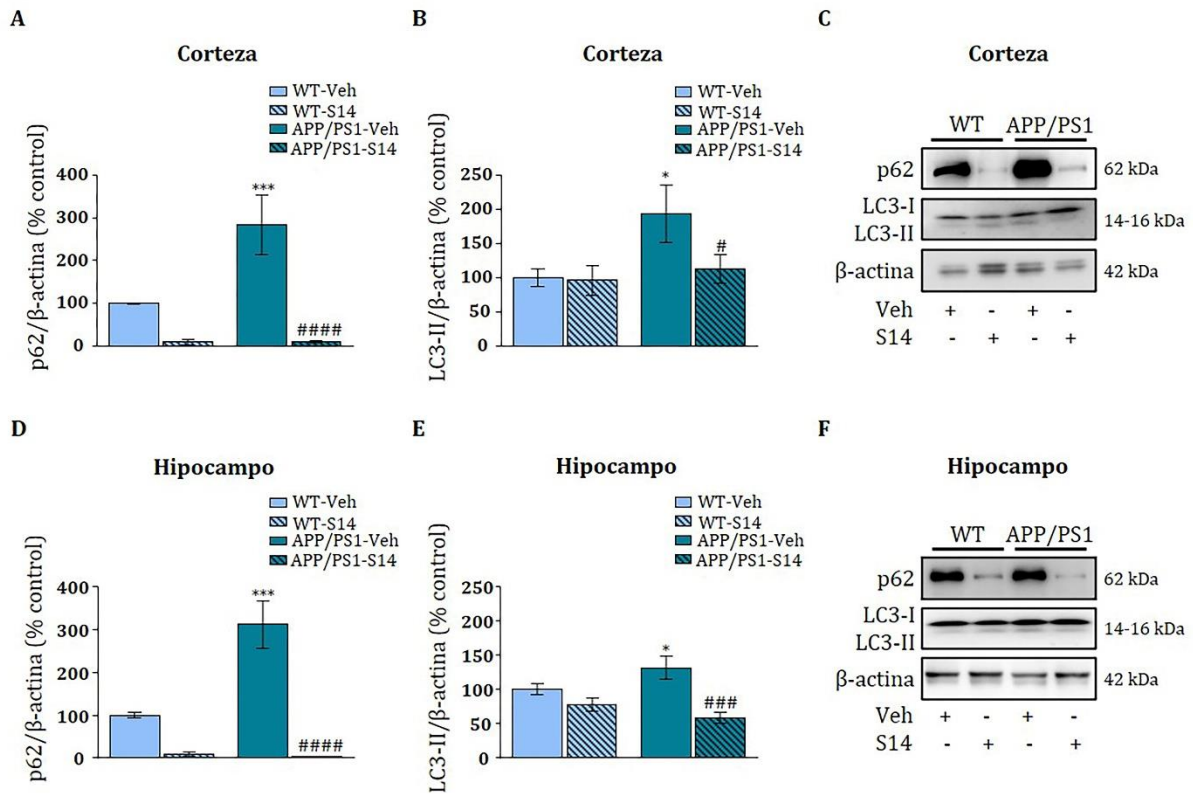


Figura 35. Niveles de marcadores de autofagia en corteza e hipocampo de ratones APP/PS1 y WT de 6 meses de edad. Niveles de (A) p62 y (B) LC3-II en la corteza cerebral de animales APP/PS1 y WT de 6 meses de edad tratados con S14 (15 mg/kg) o con vehículo. (C) Imágenes de western blot representativos de P62 y LC3-II en corteza cerebral. Niveles de (D) p62 y (E) LC3-II en hipocampo de animales APP/PS1 y WT de 6 meses de edad tratados con S14 (15 mg/kg) o con vehículo. (F) Imágenes de western blot representativos de P62 y LC3-II en hipocampo. En todos los casos se usó β-actina como control de carga. En los histogramas se expresan en porcentaje los valores medios ± SEM de entre 3-7 animales por grupo respecto a los ratones WT con vehículo. * p<0,05; *** p<0,001, respecto a ratones WT con vehículo. # p<0,05; ### p<0,001; #### p<0,0001, respecto a ratones APP/PS1 con vehículo (ANOVA, análisis post-hoc LSD de Fisher). Veh=Vehículo.

También se exploró a nivel *in vitro* el efecto de la exposición a Aβ₄₂ oligomérico y S14 sobre los niveles de estos marcadores de autofagia p62 y LC3-II. En la línea celular SH-SY5Y se observó cómo la incubación con el compuesto S14, promovió una recuperación de los niveles de p62 (figura 36A) y de LC3-II (figura 36B) previamente aumentados por efecto de la incubación con Aβ₄₂ durante 24 horas, hasta valores similares al grupo de células sin tratamiento (figura 36).

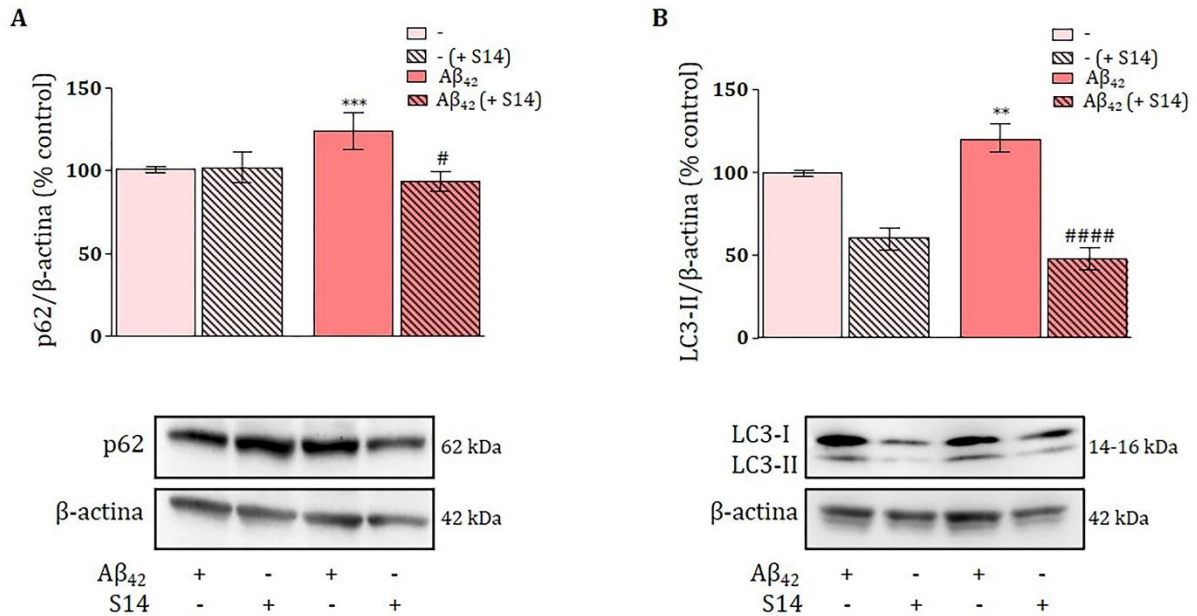
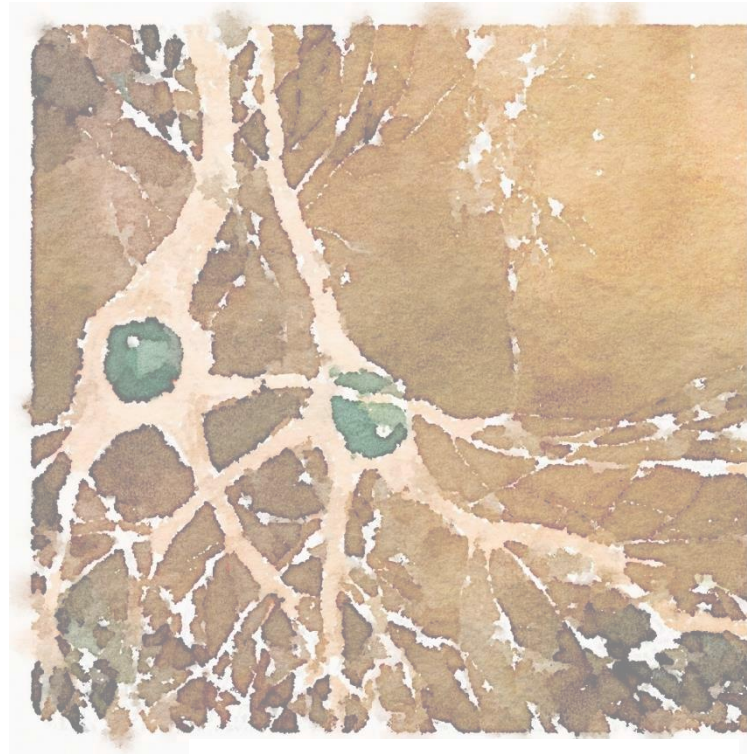
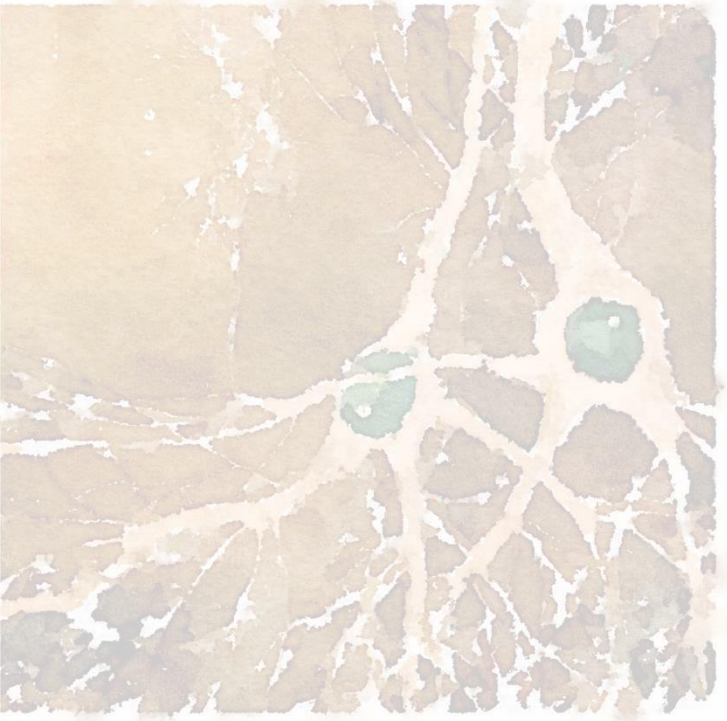


Figura 36. Marcadores autofágicos en células SH-SY5Ys expuestas a Aβ₄₂. Niveles de los marcadores autofágicos (A) p62 y (B) LC3-II en células SH-SY5Y con Aβ₄₂ (1 μM) durante 24h y en presencia de S14 (15 μM) (panel superior) medidos mediante western blot. En los paneles inferiores se muestran las imágenes de western blot representativas. En todos los casos se usó β-actina como control de carga. En los histogramas se expresan en porcentaje los valores medios ± SEM de 6 experimentos independientes. ** p<0,01; *** p<0,001 respecto a las células control. # p<0,05; #### p<0,0001, respecto a las células tratadas con Aβ (ANOVA, análisis post-hoc LSD de Fisher).

En resumen, los resultados mostrados sugieren que a través de la modulación de la actividad AMPc, el tratamiento con el inhibidor de PDE7, S14, restauró los efectos perjudiciales inducidos por Aβ sobre la dinámica mitocondrial en ratones APP/PS1 y en células. Este trabajo sugiere que el tratamiento con S14 podría ser beneficioso como herramienta terapéutica para la EA y otras enfermedades neurodegenerativas que tienen entre sus características patológicas alteraciones relacionadas con la dinámica mitocondrial.



DISCUSIÓN



La EA es una enfermedad neurodegenerativa causada por múltiples factores ambientales y genéticos (Masters et al., 2015). Las principales características neuropatológicas de la EA son la muerte neuronal y la presencia de placas amiloides y ovillos neurofibrilares en zonas selectivas del cerebro (Perl, 2010). Además, en los cerebros de pacientes con EA se observa atrofia en el hipocampo y en la corteza cerebral, una dilatación de los ventrículos y una disminución del peso y volumen cerebral (Poulakis et al., 2018). Existen otras alteraciones en la EA entre las que se incluyen la presencia de neuritas distróficas, la pérdida de función sináptica, la neuroinflamación, el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial (Cai & Tammineni, 2017; Ganguly et al., 2017). Las alteraciones en la homeostasis mitocondrial se han relacionado con la acumulación del péptido A β , con la proteína Tau hiperfosforilada y con la muerte neuronal (Briston & Hicks, 2018; Kandimalla et al., 2018).

Como se ha descrito en la introducción, el deterioro en la dinámica mitocondrial es una característica en la patogénesis de la EA. Numerosos estudios han demostrado la existencia de cambios en los procesos de fusión y fisión mitocondrial en corteza e hipocampo de pacientes de EA, así como en modelos murinos de EA (Davis et al., 2018; Manczak et al., 2011, 2018; Tönnies & Trushina, 2017). Las alteraciones en la función y en los procesos de dinámica mitocondrial así como la fragmentación mitocondrial, podrían explicar los fallos en el transporte axonal y la degeneración sináptica encontrada en los pacientes con EA (Xu et al., 2017; Yan et al., 2019). A pesar de estos antecedentes, todavía existen cuestiones sin resolver relacionadas con las alteraciones mitocondriales en la patología de la EA y su relación con la acumulación cerebral del péptido A β . Por este motivo, esta tesis doctoral ha pretendido estudiar las alteraciones en el equilibrio de la dinámica mitocondrial en la EA y en los procesos de autofagia y sus consecuencias en el desarrollo de la patología.

1. La sobrecarga de A β produce alteraciones mitocondriales

Para profundizar en el estudio del desarrollo de alteraciones mitocondriales se han utilizado diferentes modelos de EA, tanto *in vivo* como *in vitro*. Los primeros análisis se llevaron a cabo con los ratones APP/PS1, que sobreexpresan variantes de los genes humanos *APP* y *Presenilina 1* que causan la patología, lo cual provoca la acumulación de

A β a partir de 4 a 6 meses de edad (Stuart et al., 2019). Centramos nuestros estudios en el análisis de la corteza cerebral y el hipocampo, por ser las principales áreas del cerebro afectadas en esta enfermedad a lo largo del desarrollo de la misma, por lo que utilizamos ratones WT y APP/PS1 de 3, 6 y 12 meses de edad. Con estos grupos experimentales confirmamos la acumulación progresiva de los péptidos A β_{40} y A β_{42} tanto a nivel cortical como del hipocampo a partir de los 6 meses de edad, validando este modelo animal de EA como herramienta ideal para abordar los objetivos fijados en esta tesis doctoral (Anitua et al., 2014).

En cuanto a los modelos *in vitro*, se incluyeron cultivos primarios de neuronas corticales de rata y células dopaminérgicas humanas SH-SY5Y, a los que se les añadió el péptido A β_{42} oligomerizado, cuya presencia *in vivo* se sabe que ocurre anterior a la acumulación patológica de dicho péptido, así como la línea SK-APP, que sobreexpresa la proteína APP. Centrados en el estudio de las alteraciones mitocondriales en estos ratones APP/PS1, observamos en primer lugar, una disminución en la masa mitocondrial en los ratones transgénicos a edades tempranas, incluso a partir de los 3 meses de edad en el hipocampo. En los ratones de fenotipo salvaje, dicha reducción no se observó hasta los 12 meses de edad, asociada a un envejecimiento fisiológico del animal. Estos datos confirman la asociación entre la acumulación del péptido A β y alteraciones mitocondriales, reflejadas en una reducción de la cantidad de mitocondrias. En los modelos *in vitro* se confirmó que la sobrecarga del péptido A β_{42} oligomerizado disminuyó la masa mitocondrial tanto en los cultivos primarios de neuronas como en la línea SH-SY5Y. Sin embargo, las células SK-APP no mostraron diferencias significativas en la masa mitocondrial. Estos resultados están de acuerdo con otros descritos previamente, donde se mostró una reducción de la masa mitocondrial al observar una reducción en la cantidad de mitocondrias y fragmentación de la red mitocondrial debido a la sobrecarga o exposición al A β (Calkins & Reddy, 2011). En cultivos primarios neuronales procedentes de ratones transgénicos sobreexpresando la forma humana de APP mutante (APP^{swe}) observaron que tanto el número como el tamaño de las mitocondrias se encontraban reducidos (Calkins & Reddy, 2011). Equivalentes resultados se encontraron en también en cerebros de pacientes con EA donde se detectó una reducción en la cantidad de mitocondrias en secciones del hipocampo o en lisados de cerebros de pacientes (Wang et al., 2009; Young-Collier et al., 2012).

La disminución de la masa mitocondrial que hemos encontrado tanto en corteza como en hipocampo en el modelo *in vivo* de EA y en los modelos *in vitro* podría estar relacionada con la disminución en la generación de nuevas mitocondrias o con una mayor degradación mitocondrial o mitofagia, precedida de alteraciones en los procesos de fusión y fisión mitocondrial. La biogénesis mitocondrial es un proceso por el cual las células generan nuevas mitocondrias a partir de mitocondrias ya existentes. Se trata de un proceso complejo modulado por diversos factores de transcripción específicos. PGC-1 α está considerado como el principal factor regulador de la biogénesis mitocondrial (Scarpulla, 2011). Nuestros resultados muestran que los niveles de PGC-1 α y, por tanto, la biogénesis mitocondrial, se ven reducidos en los animales APP/PS1 desde edades muy tempranas, pero sólo a nivel de la corteza cerebral. Se ha demostrado en varios trabajos una reducción tanto a nivel de mRNA como a nivel de proteína de PGC-1 α en cerebros de modelos murinos de EA (Folch, 2016; Pedrós et al., 2014; Shaerzadeh et al., 2014). En cerebros de pacientes con EA ya se habían descrito niveles reducidos de PGC-1 α , indicando una alteración en la biogénesis mitocondrial asociada a esta enfermedad neurodegenerativa (Qin et al., 2009; Sheng et al., 2012). En el hipocampo no se observaron cambios significativos en la biogénesis mitocondrial, de lo cual se deduce que el descenso en la masa mitocondrial descrita previamente en los ratones APP/PS1 en esta región del cerebro no sería debida a una disminución de la biogénesis mitocondrial, sino que podría estar asociada a otras posibles causas relacionadas con la degradación mitocondrial. También el tratamiento con el péptido A β_{42} oligomerizado disminuyó los niveles de PGC-1 α tanto en los cultivos primarios de neuronas como en la línea SH-SY5Y y por tanto redujo la biogénesis mitocondrial (Gan et al., 2014; Kandimalla et al., 2018; Manczak et al., 2018). En las células SK-APP no se encontraron diferencias significativas en cuanto a los niveles de PGC-1 α al compararse con las células sin sobreexpresión de APP.

Como se ha mencionado anteriormente, existen otras posibles causas que pueden reducir de forma patológica la cantidad de mitocondrias y que están relacionadas con la degradación mitocondrial, precedida por alteraciones en los procesos de fusión y fisión mitocondrial. Por ello, decidimos analizar las principales proteínas implicadas en la fusión, Mfn1, Mfn2 y Opa1 y, en la fisión mitocondrial, Drp1, en los diferentes modelos de EA. Nuestros datos mostraron un descenso generalizado en los niveles de las proteínas Mfn1, Mfn2 y L-Opa1 en los animales APP/PS1 con aparición ya a edades tempranas, 3

meses de edad en algunas regiones cerebrales. Por el contrario, los niveles de la proteína de fisión Drp1 se incrementaron en los ratones APP/PS1 a edades un poco más avanzadas, asociado con una mayor acumulación de A β . Con estos resultados podemos concluir que existe un desequilibrio evidente en los procesos de fusión y fisión mitocondrial en este modelo animal de amiloidosis y, por lo tanto, asociado a la patología de la EA que sería favorable a la fisión mitocondrial, paso previo a su degradación por mitofagia. Similares resultados se obtuvieron en los modelos celulares donde se comprobó que la sobrecarga del péptido A β_{42} afectaba a los procesos de dinámica mitocondrial. Nuestros datos revelaron que los niveles de las proteínas implicadas en la fusión mitocondrial (Mfn1, Mfn2 y Opa1) se veían reducidos, mientras que los niveles de Drp1, implicada en el proceso de fisión, se incrementaban tras la exposición al péptido A β , tanto en los cultivos primarios de neuronas como en la línea SH-SY5Y. Nuevamente en la línea celular con sobreexpresión de APP, SK-APP no encontramos diferencias en cuanto a los niveles de las proteínas de fusión y fisión mitocondrial. Al igual que en el modelo *in vivo*, los resultados *in vitro* indicaron que el balance de estas proteínas tras la incubación con el péptido A β resultó favorable hacia la fisión mitocondrial, conduciendo a las mitocondrias dañadas hacia su degradación. Estudios previos utilizando otros modelos celulares de EA habían descrito efectos similares sobre los eventos de fusión y fisión mitocondrial, en los que neuronas primarias tratadas con formas difusas del péptido A β presentaban una disminución en los niveles de proteínas de fusión mitocondrial (Mfn1, Mfn2 y Opa1) (Ahmed et al., 2019; Wang et al., 2009) y un aumento en los niveles de proteínas de fisión mitocondrial (Drp1) (Joshi et al., 2018). Si bien estas evidencias parecen demostrar que el péptido A β sería el responsable directo de las alteraciones en los procesos de fusión y fisión mitocondrial, no está claro si las mitocondrias neuronales todavía son capaces de fusionarse y dividirse, pero a un ritmo más lento, o cómo este desequilibrio puede afectar sobre la función mitocondrial y, por tanto, ocasionar disfunción neuronal en la EA.

Algunos estudios con animales han demostrado cambios en el balance en los procesos de dinámica mitocondrial, observándose una disminución de las proteínas de fusión (Mfn1, Mfn2 y Opa1) y un aumento de los niveles de las proteínas de fisión (Drp1 y Fis1), evidenciando que en los animales transgénicos existe un predominio de los procesos de fisión respecto a los procesos de fusión mitocondrial (Trushina et al., 2012; Xu et al., 2017; Xu et al., 2018). Se ha visto que, en neuronas procedentes de algunos modelos animales

de EA, las mitocondrias exhibían un aumento de la fisión y una disminución de la fusión mitocondrial, tanto en términos de ARN como en niveles de proteínas (Calkins & Reddy, 2011). Como consecuencia de estas alteraciones, las mitocondrias mostraban una morfología fragmentada caracterizada por mitocondrias pequeñas y redondeadas, lo que indicaba una clara alteración de la función mitocondrial. Anteriormente se había propuesto el desequilibrio en la fisión mitocondrial y la fusión como un evento temprano en la progresión de la EA (Reddy et al., 2009; Wang et al., 2009). Se han observado aumentos en las proteínas de fisión mitocondrial con las correspondientes disminuciones en las proteínas de fusión en los tejidos cerebrales de los pacientes con EA (Manczak et al., 2011; Wang et al., 2009).

Nuestros resultados obtenidos utilizando ratones APP/PS1 apoyan evidencias publicadas y demuestran una reducción en la masa mitocondrial y alteraciones en el patrón de expresión de proteínas implicadas en la biogénesis y dinámica mitocondrial en la corteza cerebral y el hipocampo de este modelo animal de EA. De manera significativa estos cambios aparecieron de forma muy temprana, tanto a nivel cortical como en el hipocampo, en los ratones APP/PS1 de 3 meses de edad. Este hecho sugiere que los cambios observados en la dinámica mitocondrial se producirían de forma previa a la acumulación cerebral de A β ₄₂ que se produce a partir de los 6 meses de edad en corteza cerebral y en hipocampo. Esta conclusión pone de manifiesto que la disfunción mitocondrial es una característica temprana en esta enfermedad, asociada a la amiloidosis, pero en sus etapas más iniciales, previa a la formación de depósitos de amiloide o placas seniles.

Sorprendentemente, como se ha mencionado con anterioridad, la línea celular SK-APP siguió un patrón diferente respecto al contenido de mitocondrias y la biogénesis mitocondrial, patrón que se mantuvo en cuanto a la dinámica mitocondrial al no observarse diferencias respecto a las células SK-C. En las células SK-APP no se apreciaron cambios significativos en la masa mitocondrial ni en los niveles de PGC-1 α respecto a las células control que no sobreexpresaban la proteína. Tampoco las proteínas de fusión y fisión mitocondrial se vieron alteradas en las células que sobreexpresan la proteína APP comparadas con las células control. Ante estos resultados decidimos comprobar si la sobreexpresión de APP en esta línea celular estaba realmente asociada a un aumento en los niveles de péptidos A β . Si bien la línea SK-APP mantiene la sobreexpresión de APP a nivel intracelular, a pesar de lo esperado, no se encontraron diferencias significativas en

los niveles de A β ₄₀ y A β ₄₂ entre las células control SK-C y las células SK-APP, tanto a nivel intracelular como secretado al medio de cultivo. Un trabajo previo en el que se generaron diferentes clones de sobreexpresión de APP en esta misma línea celular ya mostró resultados contradictorios en cuanto a los niveles de A β generados por estos clones (Recuero et al., 2004). Por eso pensamos que sería posible que la esperada sobreproducción de estos péptidos a su vez activara un mecanismo para su eliminación en las células con sobreexpresión de APP. Se sabe que la eliminación fisiológica del exceso de A β puede producirse por autofagia a través de los lisosomas y de igual manera su acumulación así como la formación de placas seniles en la EA responde a defectos en la autofagia (Yan et al., 2019). Efectivamente comprobamos que los niveles de autofagia estaban aumentados en las células SK-APP de forma basal y que el flujo autofágico es mayor en estas células tal como revelaron los experimentos con bafilomicina. Al no producir una sobrecarga de los péptidos amiloides como ya se había apuntado anteriormente (Martin et al., 1995), pues éstos podrían ser eliminados por autofagia, pensamos que solamente la sobrecarga y acumulación de A β sería la responsable de desencadenar los cambios en los procesos de biogénesis y dinámica mitocondrial encontrados en el modelo animal de amiloidosis y en los otros modelos *in vitro*. Aunque esta línea celular constituye un buen modelo experimental para el estudio de procesos de estrés celular, ya que la sobreexpresión de APP provoca un mayor estrés oxidativo, alteraciones en el metabolismo de Ca²⁺ y reducción de la viabilidad celular, entre otros procesos (Chafekar et al., 2008; Ma et al., 2012; Wang et al., 2006), la sola sobreexpresión de la proteína APP no sería capaz de provocar alteraciones en los procesos mitocondriales anteriormente discutidos. En línea con esta observación, en un trabajo publicado hace años, Zhang y colaboradores sugirieron que la sobreexpresión de la forma WT de APP no tendría excesiva toxicidad en las células y en consecuencia los autores recomendaron la sobreexpresión de APP con la mutación sueca humana causante de EA como un modelo más adecuado (Zhang et al., 2006).

Como se ha visto anteriormente, los resultados obtenidos tanto con los animales APP/PS1 como con los cultivos celulares mostraron que la sobrecarga de A β desencadenaba un desbalance de las proteínas de fusión y fisión mitocondrial favorable hacia la fisión. La fisión de las mitocondrias dañadas, separándose del resto de la red mitocondrial, las conduce a su degradación por mitofagia (Mishra & Chan, 2016). El aumento de mitofagia se comprobó en nuestro modelo *in vitro* de células SH-SY5Ys tras

la incubación con A β , pues se observó un aumento en la colocalización de los marcadores de autofagia p62 y LC3 con las mitocondrias, a la vez que una acumulación de mitocondrias tras aplicar bafilomicina. Por tanto, la sobrecarga de A β desencadenó el reclutamiento de p62 y LC3 en las mitocondrias presuntamente dañadas, favoreciendo su eliminación mediante el proceso de mitofagia. Algunos trabajos están de acuerdo con nuestras observaciones indicando igualmente que el péptido A β puede ser desencadenante de mitofagia. Así lo sugirieron estudios hace años y otros más recientes en los que se mostró en cultivos primarios de neuronas corticales de ratón que la exposición a oligómeros del péptido A β_{42} inducía desbalances en la transcripción de genes codificantes de proteínas de fusión y fisión mitocondrial incrementando la fisión de mitocondrias y aumentando la autofagia (Han et al., 2017; Moreira et al., 2007). También, se demostró que el proceso de mitofagia dependiente de la vía Parkina está exacerbado analizando cerebros humanos de pacientes con EA (Ye et al., 2015).

La mitofagia es precedida por desbalances de las proteínas de fusión y fisión mitocondrial favorables a la fisión debido a una disminución de los niveles absolutos de proteínas de fusión y aumento de los niveles de las proteínas de fisión. Esta disminución de las proteínas de fusión se produce tras su ubiquitinación y posterior degradación en el proteasoma. La vía más estudiada de ubiquitinación previa al proceso de mitofagia es la del reclutamiento de la proteína Parkina en la mitocondria, que es una E3-ubiquitina ligasa que se encuentra en el citosol (Tanaka, 2010; Yoo & Jung, 2018). Cuando se produce un daño mitocondrial, las proteínas de la membrana mitocondrial externa retienen a otra proteína, PINK1, también protagonista en esta vía, que se encuentra en condiciones normales en constante recambio en la mitocondria, pero su retención hace que se acumule en la membrana mitocondrial externa sirviendo de señal para el reclutamiento de Parkina. Nuestros resultados muestran que la mitofagia observada tras la sobrecarga de A β no es dependiente de la vía PINK1/Parkina pues no se detectó reclutamiento de Parkina en la mitocondria tras la incubación con el péptido. Aunque algunos autores han mostrado que la sobrecarga de A β sí podría inducir mitofagia dependiente de la vía PINK1/Parkina (Han et al., 2017; Wang et al., 2018; Ye et al., 2015), existen otras posibles vías de iniciación de mitofagia que no son dependientes de esta vía “canónica” (revisado en Onishi *et al.*, 2021). Como se comentó en la introducción, aparte de existir otras vías de activación de autofagia no dependientes de la ubiquitinación y eliminación de las proteínas de fusión de la membrana mitocondrial externa (Kageyama et al., 2014;

Lazarou et al., 2015; Murakawa et al., 2015; Sterky et al., 2011), también se han descrito otras enzimas E3 ubiquitina ligasa que pueden actuar ubiquitinando las proteínas estabilizadoras de la dinámica mitocondrial independientemente de Parkina. Una de ellas es la vía sinfilina-1/SIAH (del inglés, *seven in absentia homolog*) que actúa junto con PINK1 pero no requiere de la fosforilación de sinfilina por parte de PINK1, como si ocurre con Parkina (Szargel et al., 2016). También actuando en conjunción con PINK1 se ha descrito la participación de ARIH1 (del inglés *ariadne RBR E3 ubiquitin protein ligase 1*) que en este caso sí necesita ser fosforilada por PINK1 para actuar e iniciar la cascada de ubiquitinación de las proteínas mitocondriales de fusión (Ambivero et al., 2014). Otra de estas enzimas E3 ubiquitina ligasa es Mulan1 (del inglés *mitochondrial ubiquitin ligase activator of NF- κ B1*) que tiene multitud de sustratos mitocondriales en común con Parkina incluyendo Drp1 y Mfn1 y Mfn2 (Yun et al., 2014). Esta última actúa independientemente de la acumulación de Pink1 en la mitocondria. Es posible que en nuestros modelos experimentales en los que hemos observado la disminución de los niveles de proteínas de fusión mitocondrial y un aumento de los niveles de Drp1 tras la sobrecarga de A β , el inicio de mitofagia se pueda haber producido por la actuación de alguna de estas otras vías independientes de Parkina, ya que la incubación con A β no mostró la acumulación de ésta en las mitocondrias, ofreciendo la posibilidad de investigaciones futuras.

En nuestros resultados observamos que la incubación con el péptido A β tanto en las células SH-SY5Ys como en los cultivos primarios, produce una disminución de la actividad metabólica y una despolarización mitocondrial, siendo posiblemente estos hechos los desencadenantes iniciales de la cascada de eventos que conducen a la mitofagia. El efecto del péptido A β comprometiendo la viabilidad celular en ambas líneas ha sido ampliamente demostrado por otros autores (Ahmed et al., 2019; Hu & Li, 2016; Xue et al., 2016). En sus trabajos mostraron que la sobrecarga de A β disminuyó la viabilidad celular y finalmente desencadenó la muerte de las células por apoptosis. La disminución del $\Delta\Psi_m$ por efecto del péptido A β podría ser consecuencia de un efecto negativo de inhibición de la respiración y, como consecuencia, desencadenando el proceso de mitofagia en las mitocondrias despolarizadas. En condiciones fisiológicas, las células mantienen el $\Delta\Psi_m$ con la respiración, llevada a cabo por los complejos I a IV de la cadena de transporte electrónico. Este proceso está acoplado a la fosforilación oxidativa que utiliza el gradiente de protones generado por la respiración para sintetizar ATP (Maurer et al., 2000). La

reducción que encontramos en el potencial de membrana mitocondrial inducida por la exposición a A β ₄₂ en cultivos primarios de neuronas y en la línea SH-SY5Y está de acuerdo con los resultados presentados por otros estudios en diversos modelos celulares en los que se da cuenta del efecto perjudicial del péptido amiloide sobre la función mitocondrial (Abramov et al., 2004; Alberdi et al., 2010; Cieřlik et al., 2020; Eckert et al., 2008; Keil et al., 2004; Sompol et al., 2008; Zhao et al., 2019). En el año 2018, Yao y colaboradores demostraron que el péptido amiloide puede entrar en la mitocondria, interaccionando con la cadena transportadora de electrones y, como consecuencia, provocar una caída del $\Delta\Psi_m$ resultando finalmente en una reducción de la producción de ATP mitocondrial, con consecuencias fatales para las células que acaban muriendo por apoptosis (Yao et al., 2018). También, en trabajos previos con el modelo animal de amiloidosis APP/PS1 se mostró que la sobrecarga de A β en los animales de 3 y 6 meses podría estar relacionada con alteraciones funcionales mitocondriales, pues se mostró una reducción en los niveles de los complejos mitocondriales OXPHOS en el hipocampo de los animales transgénicos, con consecuencias negativas en el metabolismo energético en el cerebro de los animales (Pedrós et al., 2014; Petrov et al., 2015).

En esta tesis se presenta el efecto del péptido A β sobre las mitocondrias enlazando la despolarización mitocondrial con los desbalances de las proteínas de fusión y fisión mitocondrial que finalmente conducen a la eliminación de las mitocondrias. En paralelo, observamos muchos de estos efectos en el modelo animal de amiloidosis, los ratones APP/PS1, a diferentes edades y, comprobamos que la aparición de las alteraciones mitocondriales, tanto en corteza cerebral como en hipocampo, son un evento temprano en la patología.

Los desequilibrios entre las proteínas de fusión y fisión mitocondrial que preceden a la mitofagia pueden ser a su vez causa o consecuencia de daños en el ADN mitocondrial, de mayor producción de ROS y de disminución del $\Delta\Psi_m$ y todo ello puede resultar en una reducción del consumo de oxígeno y de la producción de ATP, dos procesos vitales para la célula. El mantenimiento de la homeostasis y el control de calidad mitocondrial es especialmente relevante para las neuronas pues confían en las mitocondrias su producción energética. Es por eso que la disfunción mitocondrial da lugar a una disminución en la producción de ATP, a un aumento del estrés oxidativo y a una limitación de la capacidad de auto-reparación de las neuronas que conduce a una apoptosis neuronal excesiva que culmina en trastornos neurodegenerativos como la enfermedad

de Parkinson, la enfermedad de Huntington y la EA (Grimm & Eckert, 2017; Rhein et al., 2009; Sas et al., 2007; Wang et al., 2020).

2. Aparte de mitofagia, la sobrecarga de A β induce autofagia

Nuestros resultados muestran un efecto dual de la sobrecarga del péptido A β . Por una parte, A β ejerce un efecto perjudicial sobre las mitocondrias posiblemente comprometiendo las funciones y los procesos que éstas controlan, como la homeostasis de calcio, la generación de ATP y la muerte celular por apoptosis. Por otra parte, la sobrecarga de A β incrementa el flujo autofágico, como hemos comprobado en los experimentos *in vitro*, que podemos trasladar a los experimentos con animales, en los que se observó un aumento de los marcadores autofágicos p62 y LC3-II en los ratones APP/PS1 ya a los 6 meses de edad y que no se detectó en los ratones de fenotipo salvaje. La proteína p62 se encuentra distribuida por el citosol y, tras el tratamiento con A β , se puede apreciar un aumento en sus niveles. Existe cierta controversia en cuanto a la interpretación de los niveles de este marcador autofágico. Algunos autores han mostrado una disminución en los niveles de p62 en cerebros de pacientes con EA (Caccamo et al., 2017; Ma et al., 2019) mientras que otros trabajos reportaron un aumento (Vaillant-Beuchot et al., 2020; Zhao et al., 2020). Es posible que estas variaciones dentro de las mismas condiciones patológicas en los niveles de p62 se deban a que los niveles de este marcador autofágico puedan estar influidos por su participación en otros procesos celulares, capacidad conferida por los diferentes motivos funcionales de la proteína o por variación experimental al analizar los niveles de esta proteína en cada uno de estos trabajos (Gómez-Sánchez et al., 2015; Klionsky et al., 2016).

En cuanto a LC3-II, esta proteína se encuentra también distribuida por el cuerpo celular en condiciones basales. Hemos visto que al aumentar el flujo autofágico por la presencia de A β_{42} en las células SH-SY5Ys, los niveles de este marcador autofágico aumentan y comienza a formar agregados. La administración de bafilomicina en los cultivos celulares hizo que aumentaran los niveles tanto de p62 como de LC3-II, más significativamente en presencia de A β_{42} . Alteraciones en la autofagia se han visto en modelos *in vitro* de EA, en animales y tras el análisis de cerebros postmortem de pacientes con la enfermedad (Khandelwal et al., 2011). Se han encontrado niveles de LC3-II aumentados en corteza cerebral e hipocampo de ratones APP/PS1 a diferentes edades,

poniendo de manifiesto que la presencia de autofagosomas es una particularidad en la EA (Joshi et al., 2015; Wang et al., 2015; Zhao et al., 2018). Además de los niveles de proteína (Benito-Cuesta et al., 2020), otros autores han demostrado que los niveles de mRNA de LC3-II y p62 también aumentaron tras el tratamiento con A β *in vitro* (Singh et al., 2017).

En conjunto, nuestros resultados muestran que el péptido A β produce un efecto dual tal como hemos mostrado en los experimentos *in vitro*. Este efecto dual puede ser extrapolado a los experimentos *in vivo* en los que se ha visto que el proceso de autofagia esta exacerbado en edades tempranas y que también en estas etapas se producen desbalances en los procesos de dinámica mitocondrial. Aunque no se ha corroborado a nivel mitocondrial, es posible que estos desequilibrios en las proteínas de fusión y fisión mitocondrial acaben desencadenando la eliminación de las mitocondrias dañadas y, por tanto, ratificando el doble efecto del péptido A β en nuestro modelo *in vivo*. Cabe destacar que, a edades más avanzadas, a pesar del incremento en autofagia, se observa una mayor acumulación del péptido A β , sugiriendo que, a pesar de poder ser eliminado por autofagia, la producción de A β superaría los niveles de eliminación. Esto ofrece la posibilidad de estudiar en pacientes cómo el efecto dual de A β puede contribuir tanto a la acumulación del mismo como a una reducción de la producción energética, ambos hechos característicos de la patología de Alzheimer.

3. Efecto del inhibidor de fosfodiesterasa 7, S14, sobre las alteraciones mitocondriales y la autofagia inducidas por A β .

En estudios de nuestro laboratorio se observó cómo la molécula inhibidora de fosfodiesterasa 7, S14, potenciaba la neurogénesis adulta en los ratones APP/PS1 a través de la activación de CREB (Bartolome, et al., 2018). Resultados equivalentes con este compuesto se encontraron en otros modelos celulares (Morales-Garcia et al., 2017) y de enfermedad de Parkinson (Morales-Garcia et al., 2011, 2015), confirmando el efecto potenciador de la neurogenesis adulta en el hipocampo. Las mitocondrias son esenciales para el correcto funcionamiento celular y la principal fuente de energía para la remodelación del citoesqueleto, el alargamiento de los procesos neuronales y para la actividad sináptica que ocurren durante la neurogénesis (Steib et al., 2014).

En esta parte de la tesis se han estudiado los efectos del tratamiento con la molécula S14 sobre la biogénesis y dinámica mitocondrial *in vivo* e *in vitro*. Estos efectos en los estudios *in vivo* se han analizado en la corteza cerebral y el hipocampo de ratones WT y APP/PS1 de 6 meses de edad tras el tratamiento con S14 y, para los estudios *in vitro*, se ha utilizado la línea celular SH-SY5Y.

La primera aproximación fue analizar los niveles de AMPc en corteza cerebral e hipocampo de los animales. Como ya se explicó en la introducción, las PDEs son proteínas implicadas en la regulación de la cascada de señalización del AMPc y se han propuesto como diana farmacológica para controlar los niveles intracelulares de este nucleótido (Maurice et al., 2014). Tras la administración por vía oral del compuesto inhibidor de PDE7, S14, se midieron los niveles de AMPc. Los resultados indican que el S14 ejerció su efecto inhibitor sobre PDE7 aumentando los niveles de AMPc, tanto en corteza como en hipocampo en los animales con el tratamiento.

Tal y como se adelantó en la introducción, la vía de señalización AMPc/PKA, además de otras funciones, también participa en la regulación de la fisiología mitocondrial (Carlucci et al., 2008; Rinaldi et al., 2018) a través de la fosforilación por parte de la quinasa PKA de varias proteínas mitocondriales implicadas en la mitofagia y los procesos de fusión y fisión mitocondrial (Akabane et al., 2016; Cereghetti et al., 2008; Cribbs & Strack, 2007). Los resultados muestran que tras la administración del inhibidor de PDE7, S14, se recuperó la masa mitocondrial tanto en los animales APP/PS1 y en la línea celular SH-SY5Y en presencia de A β ₄₂ oligomerizado. Como ya se adelantaba previamente, la reducción en la masa mitocondrial puede deberse tanto a un deterioro en la biogénesis mitocondrial como a un aumento de la actividad mitofágica. Previamente, en el laboratorio se observó que el compuesto S14 es capaz de activar la vía AMPc/CREB, lo que provoca la fosforilación de CREB (pCREB) (Bartolome, et al., 2018). pCREB contribuye al aumento de la actividad del regulador de biogénesis mitocondrial, PGC-1 α . Los datos mostraron una clara recuperación de los niveles de PGC-1 α en los animales transgénicos APP/PS1 de 6 meses y en las células SH-SY5Y tras el tratamiento con A β . Estos resultados ponen de manifiesto que la recuperación de los niveles de PGC-1 α reversionaron la disminución de la masa mitocondrial observada en el modelo *in vivo* de EA y por la sobrecarga de A β en el modelo *in vitro*.

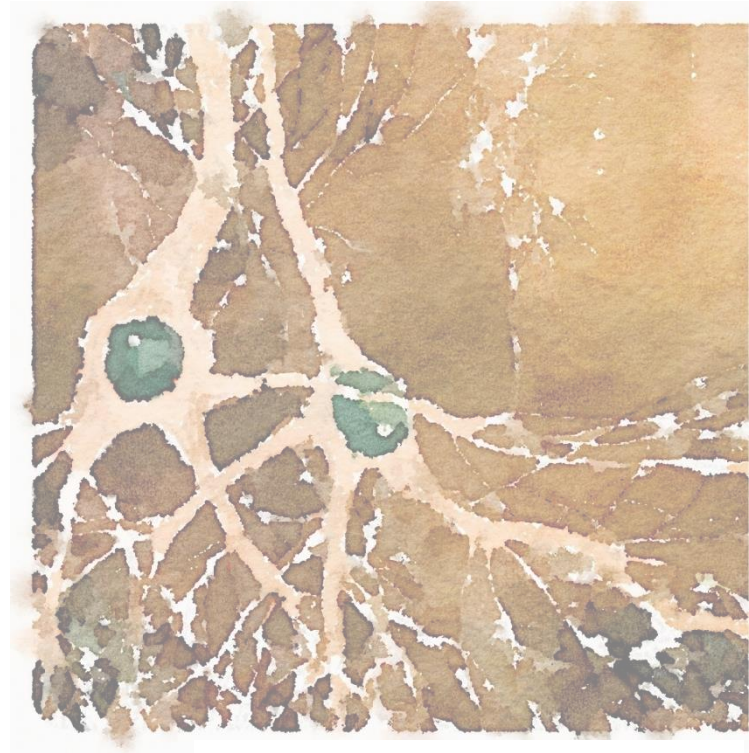
Los resultados muestran que, tras la administración del péptido amiloide, se produjo una alteración de la dinámica mitocondrial, predominando los procesos de fisión

mitocondrial. El tratamiento con S14 restauró los niveles reducidos de las proteínas de fusión Mfn1, Mfn2 y L-Opa1 en la línea celular tras el tratamiento con A β y el patrón de ubiquitinación de las proteínas Mfn1 y Mfn2, así como los niveles de L-Opa1, en los animales transgénicos APP/PS1. Además, el inhibidor de la PDE7 redujo los niveles de la proteína de fisión Drp1 que se encontraban aumentados respecto a los controles en ambos modelos. El balance mitocondrial entre las proteínas de fisión y fusión es esencial para mantener el correcto funcionamiento mitocondrial (Mishra & Chan, 2016). De esta manera, S14 fue capaz de restaurar los desbalances observados en la dinámica mitocondrial inducidos por el péptido amiloide. Si bien la certeza de restauración de la mitofagia inducida por el péptido amiloide no fue demostrada en presencia de S14 mediante el análisis de los marcadores autofágicos en mitocondrias, estos resultados apuntan a que el efecto de S14 podría incidir reduciendo el exceso de mitofagia inducido por A β al restaurar los niveles y status de las proteínas de dinámica mitocondrial cuyo desequilibrio precede la mitofagia.

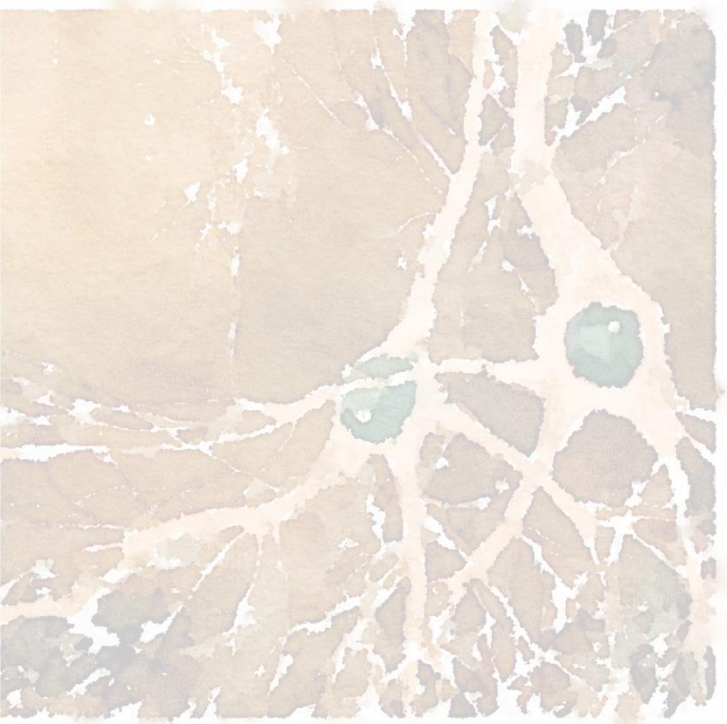
Nuestros resultados mostraron que el péptido amiloide además de interferir aumentando la mitofagia, también mostró efectos de incremento del flujo autofágico. Esta observación, junto con estudios previos que mostraron una reducción de la actividad autofágica a través de la inhibición de diferentes PDEs (Chen et al., 2013; Hosokawa et al., 2013; Zhou et al., 2017), nos llevó a analizar en esta última parte de la tesis, el efecto de S14 sobre el proceso de autofagia analizando los niveles de los marcadores autofágicos en presencia de S14. El compuesto fue capaz de inhibir el proceso de autofagia desencadenado por la sobrecarga de A β tanto en los animales APP/PS1 como en la línea celular SH-SY5Y. S14 redujo los niveles de los dos marcadores autofágicos LC3-II y p62.

Es posible que los efectos de S14 sobre las proteínas marcadoras de autofagia también respondan a una restauración de la autofagia específica de mitocondrias pues como se ha dicho anteriormente el inhibidor de PDE7 restauró los niveles de las proteínas reguladoras del equilibrio de la dinámica mitocondrial. Tal y como se explicó en la introducción, la ubiquitinación de las mitofusinas provoca su eliminación por parte del proteasoma reduciendo así los niveles de estas proteínas de fusión (Lazarou et al., 2015; Pickles et al., 2018). Además, la reducción de los niveles de L-Opa1 y el aumento de los niveles de Drp1 desencadenan la separación de las mitocondrias de la red mitocondrial. Estas mitocondrias ubiquitinadas son engullidas por los autofagosomas, mostrando un aumento de los niveles de LC3-II (Hamacher-Brady & Brady, 2016).

En el año 2013, se publicó que el tratamiento con S14 podría ser beneficioso para la EA (Perez-Gonzalez et al., 2013) y para otras enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson (Morales-Garcia et al., 2011, 2015) Con estas evidencias y los resultados mostrados, se puede concluir que el inhibidor S14 es capaz de regular la homeostasis mitocondrial a través del aumento de los niveles de AMPc y activación de CREB (Perez-Gonzalez et al., 2013). La disfunción mitocondrial es una característica temprana compartida por numerosas enfermedades neurodegenerativas. En esta tesis se propone que inhibidor de PDE7, S14 ralentiza algunos de los efectos patológicos observados en el proceso neurodegenerativo de la EA sugiriendo que S14 podría ser un fármaco prometedor y útil para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

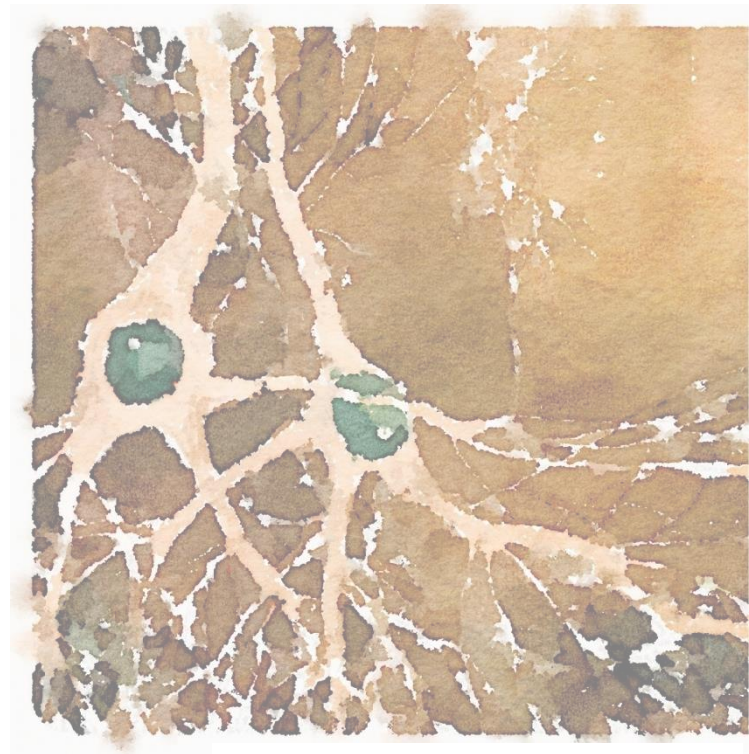


CONCLUSIONES

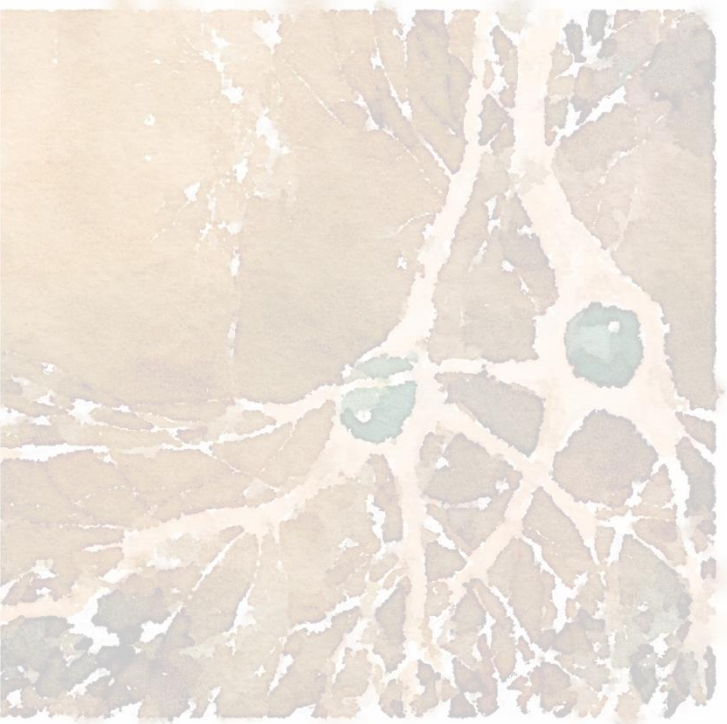


1. La masa mitocondrial se vio disminuida en los cerebros de los ratones APP/PS1 a edades más tempranas que en los ratones no transgénicos y esta reducción apareció antes en el hipocampo que en la corteza cerebral.
2. Esta reducción de la masa mitocondrial pudo deberse a una menor biogénesis mitocondrial en la corteza cerebral de los ratones APP/PS1 que ocurrió a edades tempranas y no se observó en los ratones de fenotipo salvaje.
3. La dinámica mitocondrial controlada por los procesos de fusión y fisión mitocondrial estaba alterada en los cerebros de los ratones APP/PS1 comparada con los ratones de fenotipo salvaje. La disminución de los niveles de las proteínas de fusión, Mfn1, Mfn2 y L-Opa1 y, el aumento de los de la proteína de fisión, Drp1, posiblemente dio lugar a un desequilibrio favorable hacia la fisión mitocondrial que ocurrió de forma más acentuada y temprana en la corteza cerebral de los animales transgénicos. Esta diferencia entre los grupos de animales se mantuvo igualmente en el hipocampo, pero apareció de forma más tardía.
4. En modelos in vitro, utilizando cultivos primarios de neuronas y la línea de neuroblastoma SH-SY5Y, comprobamos que las alteraciones encontradas en la masa y la dinámica mitocondrial, incluyendo la biogénesis y la fusión y fisión mitocondrial, estaban producidas por la exposición a A β . Sin embargo, en las células con sobreexpresión de APP, no se observaron estos cambios.
5. A pesar de la sobreexpresión de APP, en estas células SK-APP no se observó una mayor generación de los péptidos A β ₄₀ y A β ₄₂. A su vez, nuestros resultados muestran que el flujo autofágico estaba incrementado en estas células. La ausencia de cambios en los niveles de estos péptidos podría ser explicada por su eliminación autofágica. La no existencia de una sobrecarga de amiloide en este modelo celular podría indicar que sólo la acumulación del péptido A β fue causante de las alteraciones mitocondriales encontradas en los otros modelos celulares utilizados, así como en el modelo animal de EA.
6. El desequilibrio en las proteínas de fusión y fisión mitocondrial inducido por el péptido A β incrementó la eliminación de mitocondrias por mitofagia. Este proceso de mitofagia fue independiente de la acumulación de Parkina en la mitocondria.

7. Nuestros resultados sugieren que el desbalance de las proteínas de fusión y fisión mitocondrial desencadenante de un aumento de mitofagia estaría producido por la despolarización mitocondrial y otras alteraciones metabólicas causadas por el péptido A β ₄₂.
8. Además de mitofagia, la sobrecarga de A β provocó un aumento de la autofagia. Nuestros experimentos *in vitro* sugieren que la exposición al péptido incrementó el flujo autofágico. A pesar del posible mayor flujo autofágico, a partir de los 6 meses este mecanismo no fue capaz de eliminar la acumulación de A β que siguió aumentando con la edad.
9. El inhibidor de PDE7, S14 restableció la cantidad de mitocondrias en los ratones APP/PS1 y en las células SH-SY5Y tras el tratamiento con A β . Este efecto se produjo por dos posibles causas:
 - restauración de los niveles de la proteína reguladora de la biogénesis mitocondrial, PGC1a,
 - recuperación de los niveles de las proteínas implicadas en los procesos de fusión y fisión mitocondrial desencadenantes de mitofagia.
10. Las alteraciones mitocondriales producidas por el péptido A β en el cerebro constituyen un evento temprano en la patología de la EA. Estas alteraciones comprometen funciones vitales para las neuronas como la producción energética desencadenando la muerte celular. La viabilidad neuronal también se ve comprometida por fallos en los procesos de autofagia inducidos por la acumulación del péptido A β . El inhibidor de PDE7, S14, a través de la modulación de las alteraciones mitocondriales y de los procesos de autofagia producidas por el péptido A β , podría ser una potencial herramienta terapéutica para la EA.



BIBLIOGRAFÍA



- A Armstrong, R. (2019). Risk factors for Alzheimer's disease. In *Folia neuropathologica* (Vol. 57, Issue 2, pp. 87–105). NLM (Medline).
<https://doi.org/10.5114/fn.2019.85929>
- Abramov, A. Y., Canevari, L., & Duchen, M. R. (2004). β -Amyloid Peptides Induce Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Astrocytes and Death of Neurons through Activation of NADPH Oxidase. *Journal of Neuroscience*, *24*(2), 565–575. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4042-03.2004>
- Ahmad, M. H., Fatima, M., & Mondal, A. C. (2019). Influence of microglia and astrocyte activation in the neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease: Rational insights for the therapeutic approaches. In *Journal of Clinical Neuroscience* (Vol. 59, pp. 6–11). Churchill Livingstone. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2018.10.034>
- Ahmed, M. E., Selvakumar, G. P., Kempuraj, D., Thangavel, R., Mentor, S., Dubova, I., Raikwar, S. P., Zaheer, S., Iyer, S., & Zaheer, A. (2019). Synergy in Disruption of Mitochondrial Dynamics by A β (1-42) and Glia Maturation Factor (GMF) in SH-SY5Y Cells Is Mediated Through Alterations in Fission and Fusion Proteins. *Molecular Neurobiology*, *56*(10), 6964–6975. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1544-z>
- Akabane, S., Uno, M., Tani, N., Shimazaki, S., Ebara, N., Kato, H., Kosako, H., & Oka, T. (2016). PKA Regulates PINK1 Stability and Parkin Recruitment to Damaged Mitochondria through Phosphorylation of MIC60. *Molecular Cell*, *62*(3), 371–384. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.03.037>
- Alberdi, E., Sánchez-Gómez, M. V., Cavaliere, F., Pérez-Samartín, A., Zugaza, J. L., Trullas, R., Domercq, M., & Matute, C. (2010). Amyloid β oligomers induce Ca²⁺ dysregulation and neuronal death through activation of ionotropic glutamate receptors. *Cell Calcium*, *47*(3), 264–272.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2009.12.010>
- Almeida, J. F. F., dos Santos, L. R., Trancozo, M., & de Paula, F. (2018). Updated Meta-

- Analysis of BIN1, CR1, MS4A6A, CLU, and ABCA7 Variants in Alzheimer's Disease. *Journal of Molecular Neuroscience*, 64(3), 471–477.
<https://doi.org/10.1007/s12031-018-1045-y>
- Aluise, C. D., Robinson, R. A. S., Beckett, T. L., Murphy, M. P., Cai, J., Pierce, W. M., Markesbery, W. R., & Butterfield, D. A. (2010). Preclinical Alzheimer disease: Brain oxidative stress, A β peptide and proteomics. *Neurobiology of Disease*, 39(2), 221–228. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.04.011>
- Alvarez, G., Muñoz-Montaña, J. R., Satrústegui, J., Avila, J., Bogónez, E., & Díaz-Nido, J. (1999). Lithium protects cultured neurons against β -amyloid-induced neurodegeneration. *FEBS Letters*, 453(3), 260–264.
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00685-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00685-7)
- Ambivero, C. T., Cilenti, L., Main, S., & Zervos, A. S. (2014). Mulan E3 ubiquitin ligase interacts with multiple E2 conjugating enzymes and participates in mitophagy by recruiting GABARAP. *Cellular Signalling*, 26(12), 2921–2929.
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.09.004>
- Anitua, E., Pascual, C., Antequera, D., Bolos, M., Padilla, S., Orive, G., & Carro, E. (2014). Plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) reduces neuropathologic hallmarks and improves cognitive functions in an Alzheimer's disease mouse model. *Neurobiology of Aging*, 35(7), 1582–1595.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.009>
- Antequera, D., Vargas, T., Ugalde, C., Spuch, C., Molina, J. A., Ferrer, I., Bermejo-Pareja, F., & Carro, E. (2009). Cytoplasmic gelsolin increases mitochondrial activity and reduces A β burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, 36(1), 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.06.018>
- Apostolova, L. G., Hwang, K. S., Kohanim, O., Avila, D., Elashoff, D., Jack, C. R., Shaw, L., Trojanowski, J. Q., Weiner, M. W., Thompson, P. M., & Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. (2014). ApoE4 effects on automated diagnostic classifiers for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *NeuroImage. Clinical*, 4, 461–472. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2013.12.012>

- Arendt, T., Stieler, J. T., & Holzer, M. (2016). Tau and tauopathies. In *Brain Research Bulletin* (Vol. 126, Issue Pt 3, pp. 238–292). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.08.018>
- Arriagada, P. V., Growdon, J. H., Hedley-Whyte, E. T., & Hyman, B. T. (1992). Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology*, *42*(3), 631–639. <https://doi.org/10.1212/wnl.42.3.631>
- Ashraf, G. M., Tarasov, V. V., Makhmutova, A., Chubarev, V. N., Avila-Rodriguez, M., Bachurin, S. O., & Aliev, G. (2019). The Possibility of an Infectious Etiology of Alzheimer Disease. In *Molecular Neurobiology* (Vol. 56, Issue 6, pp. 4479–4491). Humana Press Inc. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1388-y>
- Avila, J., de Barreda, E. G., Pallas-Bazarra, N., & Hernandez, F. (2013). Tau and neuron aging. In *Aging and Disease* (Vol. 4, Issue 1, pp. 23–28). International Society on Aging and Disease. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23423462/>
- Baglietto-Vargas, D., Shi, J., Yaeger, D. M., Ager, R., & LaFerla, F. M. (2016). Diabetes and Alzheimer's disease crosstalk. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 64, pp. 272–287). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.03.005>
- Bagyinszky, E., Kang, M. J., Van Giau, V., Shim, K. H., Pyun, J. M., Suh, J., An, S. S. A., & Kim, S. Y. (2019). Novel amyloid precursor protein mutation, Val669Leu ("Seoul APP"), in a Korean patient with early-onset Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *84*, 236.e1-236.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2019.08.026>
- Bagyinszky, E., Lee, H. M., Van Giau, V., Koh, S. B., Jeong, J. H., An, S. S. A., & Kim, S. (2018). PSEN1 p.Thr116ile variant in two korean families with young onset Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(9). <https://doi.org/10.3390/ijms19092604>
- Bartolome, F., Antequera, D., de la Cueva, M., Rubio-Fernandez, M., Castro, N., Pascual, C., Camins, A., & Carro, E. (2020). Endothelial-specific deficiency of megalin in the brain protects mice against high-fat diet challenge. *Journal of Neuroinflammation*, *17*(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-1702-2>

- Bartolome, F., De La Cueva, M., Pascual, C., Antequera, D., Fernandez, T., Gil, C., Martinez, A., & Carro, E. (2018). Amyloid β -induced impairments on mitochondrial dynamics, hippocampal neurogenesis, and memory are restored by phosphodiesterase 7 inhibition. *Alzheimer's Research and Therapy*, *10*(1).
<https://doi.org/10.1186/s13195-018-0352-4>
- Benito-Cuesta, I., Ordóñez-Gutiérrez, L., & Wandosell, F. (2020). AMPK activation does not enhance autophagy in neurons in contrast to MTORC1 inhibition: different impact on β -amyloid clearance. *Autophagy*.
<https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1728095>
- Berezhnov, A. V, Soutar, M. P. M., Fedotova, E. I., Frolova, M. S., Plun-Favreau, H., Zinchenko, V. P., & Abramov, A. Y. (2016). Intracellular pH Modulates Autophagy and Mitophagy. *The Journal of Biological Chemistry*, *291*(16), 8701–8708.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.691774>
- Bertholet, A. M., Delerue, T., Millet, A. M., Moulis, M. F., David, C., Daloyau, M., Arnauné-Pelloquin, L., Davezac, N., Mils, V., Miquel, M. C., Rojo, M., & Belenguer, P. (2016). Mitochondrial fusion/fission dynamics in neurodegeneration and neuronal plasticity. In *Neurobiology of Disease* (Vol. 90, pp. 3–19). Academic Press Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.10.011>
- Bertram, L., McQueen, M. B., Mullin, K., Blacker, D., & Tanzi, R. E. (2007). Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: The AlzGene database. *Nature Genetics*, *39*(1), 17–23. <https://doi.org/10.1038/ng1934>
- Bilgel, M., An, Y., Hephrey, J., Elkins, W., Gomez, G., Wong, D. F., Davatzikos, C., Ferrucci, L., & Resnick, S. M. (2018). Effects of amyloid pathology and neurodegeneration on cognitive change in cognitively normal adults. *Brain : A Journal of Neurology*, *141*(8), 2475–2485. <https://doi.org/10.1093/brain/awy150>
- Birks, J. S., Chong, L. Y., & Grimley Evans, J. (2015). Rivastigmine for Alzheimer's disease. In *Cochrane Database of Systematic Reviews* (Vol. 2015, Issue 9). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001191.pub4>
- Birks, J. S., & Harvey, R. J. (2018). Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. In

Cochrane Database of Systematic Reviews (Vol. 2018, Issue 6). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001190.pub3>

- Blanchard, V., Moussaoui, S., Czech, C., Touchet, N., Bonici, B., Planche, M., Canton, T., Jedidi, I., Gohin, M., Wirths, O., Bayer, T. A., Langui, D., Duyckaerts, C., Tremp, G., & Pradier, L. (2003). Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with A β deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Experimental Neurology*, *184*(1), 247–263. [https://doi.org/10.1016/S0014-4886\(03\)00252-8](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(03)00252-8)
- Bordi, M., Berg, M. J., Mohan, P. S., Peterhoff, C. M., Alldred, M. J., Che, S., Ginsberg, S. D., & Nixon, R. A. (2016). Autophagy flux in CA1 neurons of Alzheimer hippocampus: Increased induction overburdens failing lysosomes to propel neuritic dystrophy. *Autophagy*, *12*(12), 2467–2483. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1239003>
- Bossy, B., Petrilli, A., Klinglmayr, E., Chen, J., Lütz-Meindl, U., Knott, A. B., Masliah, E., Schwarzenbacher, R., & Bossy-Wetzels, E. (2010). S-nitrosylation of DRP1 does not affect enzymatic activity and is not specific to Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *20*(SUPPL.2). <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-100552>
- Boya, P., Esteban-Martínez, L., Serrano-Puebla, A., Gómez-Sintes, R., & Villarejo-Zori, B. (2016). Autophagy in the eye: Development, degeneration, and aging. In *Progress in Retinal and Eye Research* (Vol. 55, pp. 206–245). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2016.08.001>
- Boya, P., Reggiori, F., & Codogno, P. (2013). Emerging regulation and functions of autophagy. In *Nature Cell Biology* (Vol. 15, Issue 7, pp. 713–720). Nat Cell Biol. <https://doi.org/10.1038/ncb2788>
- Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. In *Acta Neuropathologica* (Vol. 82, Issue 4, pp. 239–259). Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/BF00308809>
- Braak, Heiko, & Braak, E. (1991). Demonstration of Amyloid Deposits and Neurofibrillary Changes in Whole Brain Sections. *Brain Pathology*, *1*(3), 213–216. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1991.tb00661.x>

- Briston, T., & Hicks, A. R. (2018). Mitochondrial dysfunction and neurodegenerative proteinopathies: Mechanisms and prospects for therapeutic intervention. In *Biochemical Society Transactions* (Vol. 46, Issue 4, pp. 829–842). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/BST20180025>
- Brito-Moreira, J., Lourenco, M. V., Oliveira, M. M., Ribeiro, F. C., Ledo, J. H., Diniz, L. P., Vital, J. F. S., Magdesian, M. H., Melo, H. M., Barros-Aragão, F., De Souza, J. M., Alves-Leon, S. V., Gomes, F. C. A., Clarke, J. R., Figueiredo, C. P., De Felice, F. G., & Ferreira, S. T. (2017). Interaction of amyloid- β (A β) oligomers with neurexin 2 α and neuroligin 1 mediates synapse damage and memory loss in mice. *Journal of Biological Chemistry*, 292(18), 7327–7337. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.761189>
- Buée, L., Bussièrè, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A., & Hof, P. R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. In *Brain Research Reviews* (Vol. 33, Issue 1, pp. 95–130). Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(00\)00019-9](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(00)00019-9)
- Butterfield, D. A., & Mattson, M. P. (2020). Apolipoprotein E and oxidative stress in brain with relevance to Alzheimer's disease. In *Neurobiology of Disease* (Vol. 138). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104795>
- Caccamo, A., Ferreira, E., Branca, C., & Oddo, S. (2017). p62 improves AD-like pathology by increasing autophagy. *Molecular Psychiatry*, 22(6), 865–873. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.139>
- Cai, Q., & Tammineni, P. (2017). Mitochondrial Aspects of Synaptic Dysfunction in Alzheimer's Disease. In *Journal of Alzheimer's Disease* (Vol. 57, Issue 4, pp. 1087–1103). IOS Press. <https://doi.org/10.3233/JAD-160726>
- Cai, Z., Hussain, M. D., & Yan, L. J. (2014). Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. In *International Journal of Neuroscience* (Vol. 124, Issue 5, pp. 307–321). Informa Healthcare. <https://doi.org/10.3109/00207454.2013.833510>
- Cai, Z., Zhao, Y., & Zhao, B. (2012). Roles of Glycogen Synthase Kinase 3 in Alzheimer's

- Disease. *Current Alzheimer Research*, 9(7), 864–879.
<https://doi.org/10.2174/156720512802455386>
- Calkins, M. J., & Reddy, P. H. (2011). Amyloid beta impairs mitochondrial anterograde transport and degenerates synapses in Alzheimer's disease neurons. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1812(4), 507–513.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.01.007>
- Calsolaro, V., & Edison, P. (2016). Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. In *Alzheimer's and Dementia* (Vol. 12, Issue 6, pp. 719–732). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.02.010>
- Canevelli, M., Piscopo, P., Talarico, G., Vanacore, N., Blasimme, A., Crestini, A., Tosto, G., Troili, F., Lenzi, G. L., Confaloni, A., & Bruno, G. (2014). Familial Alzheimer's disease sustained by presenilin 2 mutations: Systematic review of literature and genotype-phenotype correlation. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 42, pp. 170–179). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.02.010>
- Cao, W., & Zheng, H. (2018). Peripheral immune system in aging and Alzheimer's disease 11 Medical and Health Sciences 1109 Neurosciences. In *Molecular Neurodegeneration* (Vol. 13, Issue 1). BioMed Central Ltd.
<https://doi.org/10.1186/s13024-018-0284-2>
- Carlucci, A., Lignitto, L., & Feliciello, A. (2008). Control of mitochondria dynamics and oxidative metabolism by cAMP, AKAPs and the proteasome. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 18, Issue 12, pp. 604–613). Trends Cell Biol.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.09.006>
- Carro, E., Vargas, T., Antequera, D., Ugalde, C., & Spuch, C. (2010). Gelsolin restores A β - Induced alterations in choroid plexus epithelium. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/805405>
- Carter, S. F., Schöll, M., Almkvist, O., Wall, A., Engler, H., Långström, B., & Nordberg, A. (2012). Evidence for astrocytosis in prodromal alzheimer disease provided by 11C-deuterium-L-deprenyl: A multitracer PET paradigm combining 11C-Pittsburgh compound B and 18F-FDG. *Journal of Nuclear Medicine*, 53(1), 37–46.

<https://doi.org/10.2967/jnumed.110.087031>

- Cascella, M., Bimonte, S., Muzio, M. R., Schiavone, V., & Cuomo, A. (2017). The efficacy of Epigallocatechin-3-gallate (green tea) in the treatment of Alzheimer's disease: An overview of pre-clinical studies and translational perspectives in clinical practice. *Infectious Agents and Cancer*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13027-017-0145-6>
- Castaño, T., Wang, H., Campillo, N. E., Ballester, S., González-García, C., Hernández, J., Pérez, C., Cuenca, J., Pérez-Castillo, A., Martínez, A., Huertas, O., Gelpí, J. L., Luque, F. J., Ke, H., & Gil, C. (2009). Synthesis, structural analysis, and biological evaluation of thioxoquinazoline derivatives as phosphodiesterase 7 inhibitors. *ChemMedChem*, 4(5), 866–876. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200900043>
- Castro, M. A., Hadziselimovic, A., & Sanders, C. R. (2019). The vexing complexity of the amyloidogenic pathway. In *Protein Science* (Vol. 28, Issue 7, pp. 1177–1193). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/pro.3606>
- Cereghetti, G. M., Stangherlin, A., Martins De Brito, O., Chang, C. R., Blackstone, C., Bernardi, P., & Scorrano, L. (2008). Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(41), 15803–15808. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808249105>
- Chafekar, S., Zwart, R., Veerhuis, R., Vanderstichele, H., Baas, F., & Scheper, W. (2008). Increased A β 1-42 Production Sensitizes Neuroblastoma Cells for ER Stress Toxicity. *Current Alzheimer Research*, 5(5), 469–474. <https://doi.org/10.2174/156720508785908883>
- Chakravorty, A., Jetto, C. T., & Manjithaya, R. (2019). Dysfunctional Mitochondria and Mitophagy as Drivers of Alzheimer's Disease Pathogenesis. In *Frontiers in Aging Neuroscience* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00311>
- Chen, M. L., Yi, L., Jin, X., Liang, X. Y., Zhou, Y., Zhang, T., Xie, Q., Zhou, X., Chang, H., Fu, Y. J., Zhu, J. D., Zhang, Q. Y., & Mi, M. T. (2013). Resveratrol attenuates vascular endothelial inflammation by inducing autophagy through the cAMP signaling

- pathway. *Autophagy*, 9(12), 2033–2045. <https://doi.org/10.4161/auto.26336>
- Chen, W. W., Zhang, X., & Huang, W. J. (2016). Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). *Molecular Medicine Reports*, 13(4), 3391–3396. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.4948>
- Cieślak, M., Czapski, G. A., Wójtowicz, S., Wieczorek, I., Wencel, P. L., Strosznajder, R. P., Jaber, V., Lukiw, W. J., & Strosznajder, J. B. (2020). Alterations of Transcription of Genes Coding Anti-oxidative and Mitochondria-Related Proteins in Amyloid β Toxicity: Relevance to Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*, 57(3), 1374–1388. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-01819-y>
- Cochran, J. N., Geier, E. G., Bonham, L. W., Newberry, J. S., Amaral, M. D., Thompson, M. L., Lasseigne, B. N., Karydas, A. M., Roberson, E. D., Cooper, G. M., Rabinovici, G. D., Miller, B. L., Myers, R. M., & Yokoyama, J. S. (2020). Non-Coding and Loss-of-Function Coding Variants in TET2 are Associated with Multiple Neurodegenerative Diseases. *The American Journal of Human Genetics*, 106(5). <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2020.03.010>
- Combs, C. K., Colleen Karlo, J., Kao, S. C., & Landreth, G. E. (2001). β -amyloid stimulation of microglia anti monocytes results in TNF α -dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *Journal of Neuroscience*, 21(4), 1179–1188. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-04-01179.2001>
- Congdon, E. E., & Sigurdsson, E. M. (2018). Tau-targeting therapies for Alzheimer disease. In *Nature Reviews Neurology* (Vol. 14, Issue 7, pp. 399–415). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0013-z>
- Conti, M., & Beavo, J. (2007). Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: Essential components in cyclic nucleotide signaling. In *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 76, pp. 481–511). Annu Rev Biochem. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.060305.150444>
- Cribbs, J. T., & Strack, S. (2007). Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Reports*, 8(10), 939–944. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401062>

- Das, U., Wang, L., Ganguly, A., Saikia, J. M., Wagner, S. L., Koo, E. H., & Roy, S. (2015). Visualizing APP and BACE-1 approximation in neurons yields insight into the amyloidogenic pathway. *Nature Neuroscience*, *19*(1), 55–64.
<https://doi.org/10.1038/nn.4188>
- Davis, S. A., Itaman, S., Khalid-Janney, C. M., Sherard, J. A., Dowell, J. A., Cairns, N. J., & Gitcho, M. A. (2018). TDP-43 interacts with mitochondrial proteins critical for mitophagy and mitochondrial dynamics. *Neuroscience Letters*, *678*, 8–15.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.04.053>
- Del Dotto, V., Fogazza, M., Lenaers, G., Rugolo, M., Carelli, V., & Zanna, C. (2018). OPA1: How much do we know to approach therapy? *Pharmacological Research*, *131*, 199–210. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.02.018>
- Dempsey, C., Rubio Araiz, A., Bryson, K. J., Finucane, O., Larkin, C., Mills, E. L., Robertson, A. A. B., Cooper, M. A., O'Neill, L. A. J., & Lynch, M. A. (2017). Inhibiting the NLRP3 inflammasome with MCC950 promotes non-phlogistic clearance of amyloid- β and cognitive function in APP/PS1 mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, *61*, 306–316.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.12.014>
- Ding, H., Bai, F., Cao, H., Xu, J., Fang, L., Wu, J., Yuan, Q., Zhou, Y., Sun, Q., He, W., Dai, C., Zen, K., Jiang, L., & Yang, J. (2018). PDE/cAMP/Epac/C/EBP- β Signaling Cascade Regulates Mitochondria Biogenesis of Tubular Epithelial Cells in Renal Fibrosis. *Antioxidants and Redox Signaling*, *29*(7), 637–652.
<https://doi.org/10.1089/ars.2017.7041>
- Ding, W. X., & Yin, X. M. (2012). Mitophagy: Mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. In *Biological Chemistry* (Vol. 393, Issue 7, pp. 547–564). NIH Public Access.
<https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0119>
- Dorszewska, J., Prendecki, M., Oczkowska, A., Dezor, M., & Kozubski, W. (2016). Molecular Basis of Familial and Sporadic Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research*, *13*(9), 952–963.
<https://doi.org/10.2174/1567205013666160314150501>
- Drachman, D. A. (2014). The amyloid hypothesis, time to move on: Amyloid is the

- downstream result, not cause, of Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia*, 10(3), 372–380. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2013.11.003>
- Du, F., Yu, Q., Yan, S., Hu, G., Lue, L.-F., Walker, D. G., Wu, L., Yan, S. F., Tieu, K., & Yan, S. S. (2017). PINK1 signalling rescues amyloid pathology and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Brain : A Journal of Neurology*, 140(12), 3233–3251. <https://doi.org/10.1093/brain/awx258>
- Durazzo, T. C., Mattsson, N., & Weiner, M. W. (2014). Smoking and increased Alzheimer's disease risk: A review of potential mechanisms. *Alzheimer's and Dementia*, 10(3 SUPPL.), S122. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2014.04.009>
- Eckert, A., Hauptmann, S., Scherping, I., Rhein, V., Müller-Spahn, F., Götz, J., & Müller, W. E. (2008). Soluble beta-amyloid leads to mitochondrial defects in amyloid precursor protein and tau transgenic mice. *Neurodegenerative Diseases*, 5(3–4), 157–159. <https://doi.org/10.1159/000113689>
- Escamilla-Ayala, A., Wouters, R., Sannerud, R., & Annaert, W. (2020). Contribution of the Presenilins in the cell biology, structure and function of γ -secretase. In *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.02.005>
- Ferreira, S. T., Lourenco, M. V., Oliveira, M. M., & De Felice, F. G. (2015). Soluble amyloid- β oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 9, Issue MAY). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00191>
- Folch, J. (2016). Molecular links between early energy metabolism alterations and Alzheimer's disease. *Frontiers in Bioscience*, 21(1), 8–19. <https://doi.org/10.2741/4372>
- Folch, J., Petrov, D., Ettcheto, M., Abad, S., Sánchez-López, E., García, M. L., Olloquequi, J., Beas-Zarate, C., Auladell, C., & Camins, A. (2016). Current Research Therapeutic Strategies for Alzheimer's Disease Treatment. In *Neural Plasticity* (Vol. 2016). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2016/8501693>

- Franco, A., Kitsis, R. N., Fleischer, J. A., Gavathiotis, E., Kornfeld, O. S., Gong, G., Biris, N., Benz, A., Qvit, N., Donnelly, S. K., Chen, Y., Mennerick, S., Hodgson, L., Mochly-Rosen, D., & Dorn, G. W. (2016). Correcting mitochondrial fusion by manipulating mitofusin conformations. *Nature*, *540*(7631), 74–79.
<https://doi.org/10.1038/nature20156>
- Galindo, M. F., Ikuta, I., Zhu, X., Casadesus, G., & Jordán, J. (2010). Mitochondrial biology in Alzheimer's disease pathogenesis: REVIEW. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 114, Issue 4, pp. 933–945). Blackwell Publishing Ltd.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06814.x>
- Gan, X., Huang, S., Wu, L., Wang, Y., Hu, G., Li, G., Zhang, H., Yu, H., Swerdlow, R. H., Chen, J. X., & Yan, S. S. Du. (2014). Inhibition of ERK-DLP1 signaling and mitochondrial division alleviates mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease cybrid cell. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1842*(2), 220–231.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.11.009>
- Ganguly, G., Chakrabarti, S., Chatterjee, U., & Saso, L. (2017). Proteinopathy, oxidative stress and mitochondrial dysfunction: Cross talk in alzheimer's disease and parkinson's disease. *Drug Design, Development and Therapy*, *11*, 797–810.
<https://doi.org/10.2147/DDDT.S130514>
- Ge, Y., Shi, X., Boopathy, S., McDonald, J., Smith, A. W., & Chao, L. H. (2020). Two forms of opa1 cooperate to complete fusion of the mitochondrial inner-membrane. *ELife*, *9*.
<https://doi.org/10.7554/eLife.50973>
- Ghavami, S., Shojaei, S., Yeganeh, B., Ande, S. R., Jangamreddy, J. R., Mehrpour, M., Christoffersson, J., Chaabane, W., Moghadam, A. R., Kashani, H. H., Hashemi, M., Owji, A. A., & Łos, M. J. (2014). Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 112, pp. 24–49). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.10.004>
- Giannakopoulos, P., Herrmann, F. R., Bussi ere, T., Bouras, C., Kovari, E., Perl, D. P., Morrison, J. H., Gold, G., & Hof, P. R. (2003). Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology*, *60*(9),

1495–1500. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000063311.58879.01>

- Gibson, G. E., & Thakkar, A. (2017). Interactions of Mitochondria/Metabolism and Calcium Regulation in Alzheimer's Disease: A Calcinist Point of View. *Neurochemical Research*, 42(6), 1636–1648. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2182-3>
- Gómez-Sánchez, R., Pizarro-Estrella, E., Yakhine-Diop, S. M. S., Rodríguez-Arribas, M., Bravo-San Pedro, J. M., Fuentes, J. M., & González-Polo, R. A. (2015). Routine Western blot to check autophagic flux: Cautions and recommendations. *Analytical Biochemistry*, 477, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.02.020>
- Grimm, A., & Eckert, A. (2017). Brain aging and neurodegeneration: from a mitochondrial point of view. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 143, Issue 4, pp. 418–431). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jnc.14037>
- Groh, J., Kim, S. W., Mamrak, U., Tobaben, S., Cassidy-Stone, A., Nunnari, J., Plesnila, N., & Culmsee, C. (2012). Inhibition of Drp1 provides neuroprotection in vitro and in vivo. *Cell Death and Differentiation*, 19(9), 1446–1458. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.18>
- Gugliandolo, A., Chiricosta, L., Silvestro, S., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2019). α -Tocopherol Modulates Non-Amyloidogenic Pathway and Autophagy in an In Vitro Model of Alzheimer's Disease: A Transcriptional Study. *Brain Sciences*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/brainsci9080196>
- Guo, C., Wang, J., Jing, L., Ma, R., Liu, X., Gao, L., Cao, L., Duan, J., Zhou, X., Li, Y., & Sun, Z. (2018). Mitochondrial dysfunction, perturbations of mitochondrial dynamics and biogenesis involved in endothelial injury induced by silica nanoparticles. *Environmental Pollution*, 236, 926–936. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.060>
- Guo, F., Liu, X., Cai, H., & Le, W. (2018). Autophagy in neurodegenerative diseases: pathogenesis and therapy. In *Brain Pathology* (Vol. 28, Issue 1, pp. 3–13). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/bpa.12545>

- Halassa, M. M., & Haydon, P. G. (2009). Integrated brain circuits: Astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. In *Annual Review of Physiology* (Vol. 72, pp. 335–355). Annu Rev Physiol. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135843>
- Hamacher-Brady, A., & Brady, N. R. (2016). Mitophagy programs: Mechanisms and physiological implications of mitochondrial targeting by autophagy. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 73, Issue 4, pp. 775–795). Birkhauser Verlag AG. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2087-8>
- Hamano, T., Gendron, T. F., Causevic, E., Yen, S. H., Lin, W. L., Isidoro, C., Deture, M., & Ko, L. W. (2008). Autophagic-lysosomal perturbation enhances tau aggregation in transfectants with induced wild-type tau expression. *European Journal of Neuroscience*, 27(5), 1119–1130. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06084.x>
- Han, K., Jia, N., Zhong, Y., & Shang, X. (2018). S14G-humanin alleviates insulin resistance and increases autophagy in neurons of APP/PS1 transgenic mouse. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(4), 3111–3117. <https://doi.org/10.1002/jcb.26452>
- Han, X. J., Hu, Y. Y., Yang, Z. J., Jiang, L. P., Shi, S. L., Li, Y. R., Guo, M. Y., Wu, H. L., & Wan, Y. Y. (2017). Amyloid β -42 induces neuronal apoptosis by targeting mitochondria. *Molecular Medicine Reports*, 16(4), 4521–4528. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7203>
- Hansen, D. V., Hanson, J. E., & Sheng, M. (2018). Microglia in Alzheimer's disease. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 217, Issue 2, pp. 459–472). Rockefeller University Press. <https://doi.org/10.1083/jcb.201709069>
- Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis. In *Science* (Vol. 256, Issue 5054, pp. 184–185). Science. <https://doi.org/10.1126/science.1566067>
- Harris, S. A., & Harris, E. A. (2015). Herpes Simplex Virus Type 1 and Other Pathogens are Key Causative Factors in Sporadic Alzheimer's Disease. In *Journal of Alzheimer's Disease* (Vol. 48, Issue 2, pp. 319–353). IOS Press. <https://doi.org/10.3233/JAD->

142853

- Hays, C. C., Zlatar, Z. Z., Meloy, M. J., Bondi, M. W., Gilbert, P. E., Liu, T. T., Helm, J. L., & Wierenga, C. E. (2019). APOE modifies the interaction of entorhinal cerebral blood flow and cortical thickness on memory function in cognitively normal older adults. *NeuroImage*, 202. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2019.116162>
- Heneka, M. T., Carson, M. J., Khoury, J. El, Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., ... Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. In *The Lancet Neurology* (Vol. 14, Issue 4, pp. 388–405). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5)
- Hernández, F., Gómez de Barreda, E., Fuster-Matanzo, A., Lucas, J. J., & Avila, J. (2010). GSK3: A possible link between beta amyloid peptide and tau protein. In *Experimental Neurology* (Vol. 223, Issue 2, pp. 322–325). Exp Neurol. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.09.011>
- Hernandez, F., Lucas, J. J., & Avila, J. (2013). GSK3 and tau: Two convergence points in Alzheimer's disease. In *Journal of Alzheimer's Disease* (Vol. 33, Issue SUPPL. 1). IOS Press. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-129025>
- Hilt, S., Altman, R., Kálai, T., Maezawa, I., Gong, Q., Wachsmann-Hogiu, S., Jin, L. W., & Voss, J. C. (2018). A bifunctional anti-amyloid blocks oxidative stress and the accumulation of intraneuronal amyloid-beta. *Molecules*, 23(8). <https://doi.org/10.3390/molecules23082010>
- Holstege, H., Van Der Lee, S. J., Hulsman, M., Wong, T. H., Van Rooij, J. G. J., Weiss, M., Louwersheimer, E., Wolters, F. J., Amin, N., Uitterlinden, A. G., Hofman, A., Ikram, M. A., Van Swieten, J. C., Meijers-Heijboer, H., Van Der Flier, W. M., Reinders, M. J. T., Van Duijn, C. M., & Scheltens, P. (2017). Characterization of pathogenic SORL1 genetic variants for association with Alzheimer's disease: A clinical interpretation strategy. *European Journal of Human Genetics*, 25(8), 973–981. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2017.87>

- Home - *ClinicalTrials.gov*. (n.d.). Retrieved March 24, 2021, from <https://clinicaltrials.gov/>
- Hoppins, S. (2014). The regulation of mitochondrial dynamics. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 29, Issue 1, pp. 46–52). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.03.005>
- Hosokawa, S., Koseki, H., Nagashima, M., Maeyama, Y., Yomogida, K., Mehr, C., Rutledge, M., Greenfeld, H., Kaneki, M., Tompkins, R. G., Jeevendra Martyn, J. A., & Yasuhara, S. E. (2013). Title efficacy of phosphodiesterase 5 inhibitor on distant burn-induced muscle autophagy, microcirculation, and survival rate. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 304(9). <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00078.2013>
- Hu, H., & Li, M. (2016). Mitochondria-targeted antioxidant mitotempo protects mitochondrial function against amyloid beta toxicity in primary cultured mouse neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 478(1), 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.07.071>
- Huber, C. M., Yee, C., May, T., Dhanala, A., & Mitchell, C. S. (2018). Cognitive Decline in Preclinical Alzheimer's Disease: Amyloid-Beta versus Tauopathy. *Journal of Alzheimer's Disease*, 61(1), 265–281. <https://doi.org/10.3233/JAD-170490>
- Hung, S. Y., Huang, W. P., Liou, H. C., & Fu, W. M. (2009). Autophagy protects neuron from A β -induced cytotoxicity. *Autophagy*, 5(4), 502–510. <https://doi.org/10.4161/auto.5.4.8096>
- Hynd, M. R., Scott, H. L., & Dodd, P. R. (2004). Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. In *Neurochemistry International* (Vol. 45, Issue 5, pp. 583–595). Neurochem Int. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2004.03.007>
- Itzhaki, R. F., Lathe, R., Balin, B. J., Ball, M. J., Bearer, E. L., Braak, H., Bullido, M. J., Carter, C., Clerici, M., Cosby, S. L., Del Tredici, K., Field, H., Fulop, T., Grassi, C., Griffin, W. S. T., Haas, J., Hudson, A. P., Kamer, A. R., Kell, D. B., ... Whittum-Hudson, J. A. (2016). Microbes and Alzheimer's disease. In *Journal of Alzheimer's Disease* (Vol. 51, Issue 4,

pp. 979–984). IOS Press. <https://doi.org/10.3233/JAD-160152>

- Iyer, S. S., He, Q., Janczy, J. R., Elliott, E. I., Zhong, Z., Olivier, A. K., Sadler, J. J., Knepper-Adrian, V., Han, R., Qiao, L., Eisenbarth, S. C., Nauseef, W. M., Cassel, S. L., & Sutterwala, F. S. (2013). Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation. *Immunity*, *39*(2), 311–323.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.001>
- Jancic, D., Lopez De Armentia, M., Valor, L. M., Olivares, R., & Barco, A. (2009). Inhibition of cAMP response element-binding protein reduces neuronal excitability and plasticity, and triggers neurodegeneration. *Cerebral Cortex*, *19*(11), 2535–2547.
<https://doi.org/10.1093/cercor/bhp004>
- Johnson, G. V. W., & Stoothoff, W. H. (2004). Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. In *Journal of Cell Science* (Vol. 117, Issue 24, pp. 5721–5729). J Cell Sci. <https://doi.org/10.1242/jcs.01558>
- Joshi, A. U., Saw, N. L., Shamloo, M., & Mochly-Rosen, D. (2018). Drp1/Fis1 interaction mediates mitochondrial dysfunction, bioenergetic failure and cognitive decline in Alzheimer's disease. *Oncotarget*, *9*(5), 6128–6143.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.23640>
- Joshi, G., Gan, K. A., Johnson, D. A., & Johnson, J. A. (2015). Increased Alzheimer's disease-like pathology in the APP/ PS1 δ E9 mouse model lacking Nrf2 through modulation of autophagy. *Neurobiology of Aging*, *36*(2), 664–679.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.09.004>
- Jouanne, M., Rault, S., & Voisin-Chiret, A. S. (2017). Tau protein aggregation in Alzheimer's disease: An attractive target for the development of novel therapeutic agents. In *European Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 139, pp. 153–167). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.07.070>
- Kageyama, Y., Hoshijima, M., Seo, K., Bedja, D., Sysa-Shah, P., Andrabi, S. A., Chen, W., Höke, A., Dawson, V. L., Dawson, T. M., Gabrielson, K., Kass, D. A., Iijima, M., & Sesaki, H. (2014). Parkin-independent mitophagy requires Drp1 and maintains the integrity of mammalian heart and brain. *The EMBO Journal*, *33*(23), 2798–2813.

<https://doi.org/10.15252/embj.201488658>

- Kandimalla, R., Manczak, M., Fry, D., Suneetha, Y., Sesaki, H., & Reddy, P. H. (2016). Reduced dynamin-related protein 1 protects against phosphorylated Tau-induced mitochondrial dysfunction and synaptic damage in Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*, 25(22), 4881–4897. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw312>
- Kandimalla, R., Manczak, M., Yin, X., Wang, R., & Reddy, P. H. (2018). Hippocampal phosphorylated tau induced cognitive decline, dendritic spine loss and mitochondrial abnormalities in a mouse model of Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*, 27(1), 30–40. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx381>
- Kannurpatti, S. S. (2017). Mitochondrial calcium homeostasis: Implications for neurovascular and neurometabolic coupling. In *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* (Vol. 37, Issue 2, pp. 381–395). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1177/0271678X16680637>
- Katzman, R. (1986). Alzheimer's Disease. In *New England Journal of Medicine* (Vol. 314, Issue 15, pp. 964–973). N Engl J Med. <https://doi.org/10.1056/NEJM198604103141506>
- Keil, U., Bonert, A., Marques, C. A., Scherping, I., Weyermann, J., Strosznajder, J. B., Müller-Spahn, F., Haass, C., Czech, C., Pradier, L., Müller, W. E., & Eckert, A. (2004). Amyloid β -induced changes in nitric oxide production and mitochondrial activity lead to apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(48), 50310–50320. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405600200>
- Keller, L. J., Sekula, N. M., Svirsky, S., Maesako, M., Zoltowska, K. M., & Berezovska, O. (2020). Presenilin 1 increases association with synaptotagmin 1 during normal aging. *Neurobiology of Aging*, 86, 156–161. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2019.10.006>
- Kelly, M. P. (2018). Cyclic nucleotide signaling changes associated with normal aging and age-related diseases of the brain. In *Cellular Signalling* (Vol. 42, pp. 281–291). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.11.004>

- Khandelwal, P. J., Herman, A. M., Hoe, H. S., Rebeck, G. W., & Moussa, C. E. H. (2011). Parkin mediates beclin-dependent autophagic clearance of defective mitochondria and ubiquitinated A β in AD models. *Human Molecular Genetics*, 20(11), 2091–2102. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr091>
- Klionsky, D. J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M. J., Abeliovich, H., Arozena, A. A., Adachi, H., Adams, C. M., Adams, P. D., Adeli, K., Adhihetty, P. J., Adler, S. G., Agam, G., Agarwal, R., Aghi, M. K., Agnello, M., Agostinis, P., Aguilar, P. V., Aguirre-Ghiso, J., ... Zughraier, S. M. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). In *Autophagy* (Vol. 12, Issue 1, pp. 1–222). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1100356>
- Knutti, D., & Kralli, A. (2001). PGC-1, a versatile coactivator. In *Trends in Endocrinology and Metabolism* (Vol. 12, Issue 8, pp. 360–365). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(01\)00457-X](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(01)00457-X)
- Kopeikina, K. J., Hyman, B. J., & Spires-Jones, T. L. (2012). Soluble forms of tau are toxic in alzheimer's disease. *Translational Neuroscience*, 3(3), 223–233. <https://doi.org/10.2478/s13380-012-0032-y>
- Koshiha, T., Detmer, S. A., Kaiser, J. T., Chen, H., McCaffery, J. M., & Chan, D. C. (2004). Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science*, 305(5685), 858–862. <https://doi.org/10.1126/science.1099793>
- Kovacs, G. G. (2018). Tauopathies. In *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 145, pp. 355–368). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802395-2.00025-0>
- Lambert, J. C., Ibrahim-Verbaas, C. A., Harold, D., Naj, A. C., Sims, R., Bellenguez, C., Jun, G., DeStefano, A. L., Bis, J. C., Beecham, G. W., Grenier-Boley, B., Russo, G., Thornton-Wells, T. A., Jones, N., Smith, A. V., Chouraki, V., Thomas, C., Ikram, M. A., Zelenika, D., ... Seshadri, S. (2013). Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, 45(12), 1452–1458. <https://doi.org/10.1038/ng.2802>
- Larson, M. E., & Lesné, S. E. (2012). Soluble A β oligomer production and toxicity. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 120, Issue SUPPL. 1, pp. 125–139). J Neurochem.

<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07478.x>

Lazarou, M., Sliter, D. A., Kane, L. A., Sarraf, S. A., Wang, C., Burman, J. L., Sideris, D. P., Fogel, A. I., & Youle, R. J. (2015). The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature*, *524*(7565), 309–314.

<https://doi.org/10.1038/nature14893>

Lee, Y. H., Im, E., Hyun, M., Park, J., & Chung, K. C. (2021). Protein phosphatase PPM1B inhibits DYRK1A kinase through dephosphorylation of pS258 and reduces toxic tau aggregation. *The Journal of Biological Chemistry*, *296*, 100245.

<https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.015574>

Lemasters, J. J. (2014). Variants of mitochondrial autophagy: Types 1 and 2 mitophagy and micromitophagy (Type 3). In *Redox Biology* (Vol. 2, Issue 1, pp. 749–754).

Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.06.004>

Lemecha, M., Morino, K., Imamura, T., Iwasaki, H., Ohashi, N., Ida, S., Sato, D., Sekine, O., Ugi, S., & Maegawa, H. (2018). MiR-494-3p regulates mitochondrial biogenesis and thermogenesis through PGC1- α signalling in beige adipocytes. *Scientific Reports*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33438-3>

Levine, B., & Kroemer, G. (2019). Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. In *Cell* (Vol. 176, Issues 1–2, pp. 11–42). Cell Press.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.048>

Li, K., Wei, Q., Liu, F. F., Hu, F., Xie, A. J., Zhu, L. Q., & Liu, D. (2018). Synaptic Dysfunction in Alzheimer's Disease: A β , Tau, and Epigenetic Alterations. *Molecular Neurobiology*, *55*(4), 3021–3032. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0533-3>

<https://doi.org/10.1007/s12035-017-0533-3>

Li, Q., Liu, Y., & Sun, M. (2017). Autophagy and Alzheimer's Disease. In *Cellular and Molecular Neurobiology* (Vol. 37, Issue 3, pp. 377–388). Springer New York LLC.

<https://doi.org/10.1007/s10571-016-0386-8>

Lian, H., Litvinchuk, A., Chiang, A. C. A., Aithmitti, N., Jankowsky, J. L., & Zheng, H. (2016). Astrocyte-microglia cross talk through complement activation modulates amyloid pathology in mouse models of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, *36*(2),

577–589. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2117-15.2016>

Liang, Z., Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., & Gong, C. X. (2007). Down-regulation of cAMP-dependent protein kinase by over-activated calpain in Alzheimer disease brain. *Journal of Neurochemistry*, *103*(6), 2462–2470.

<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04942.x>

Liddelow, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., Bennett, M. L., Münch, A. E., Chung, W. S., Peterson, T. C., Wilton, D. K., Frouin, A., Napier, B. A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M. S., Rowitch, D. H., Dawson, V. L., Dawson, T. M., ... Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, *541*(7638), 481–487.

<https://doi.org/10.1038/nature21029>

Lista, S., & Hampel, H. (2017). Synaptic degeneration and neurogranin in the pathophysiology of Alzheimer's disease. In *Expert Review of Neurotherapeutics* (Vol. 17, Issue 1, pp. 47–57). Taylor and Francis Ltd.

<https://doi.org/10.1080/14737175.2016.1204234>

Lista, S., O'Bryant, S. E., Blennow, K., Dubois, B., Hugon, J., Zetterberg, H., & Hampel, H. (2015). Biomarkers in Sporadic and Familial Alzheimer's Disease. In *Journal of Alzheimer's Disease* (Vol. 47, Issue 2, pp. 291–317). IOS Press.

<https://doi.org/10.3233/JAD-143006>

Liu, C. C., Kanekiyo, T., Xu, H., & Bu, G. (2013). Apolipoprotein e and Alzheimer disease: Risk, mechanisms and therapy. In *Nature Reviews Neurology* (Vol. 9, Issue 2, pp. 106–118). Nat Rev Neurol. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.263>

Liu, C., Cui, G., Zhu, M., Kang, X., & Guo, H. (2014). Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Chemokines produced by astrocytes and chemokine receptors. In *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* (Vol. 7, Issue 12, pp. 8342–8355). E-Century Publishing Corporation.

Liu, W. J., Ye, L., Huang, W. F., Guo, L. J., Xu, Z. G., Wu, H. L., Yang, C., & Liu, H. F. (2016). p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. In *Cellular and Molecular Biology Letters* (Vol.

- 21, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s11658-016-0031-z>
- Llinas, R., & Moreno, H. (2017). Perspective on calcium and Alzheimer's disease. In *Alzheimer's and Dementia* (Vol. 13, Issue 2, pp. 196–197). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2017.01.004>
- Lloret, A., Esteve, D., Monllor, P., Cervera-Ferri, A., & Lloret, A. (2019). The effectiveness of vitamin E treatment in alzheimer's disease. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20040879>
- Lonze, B. E., & Ginty, D. D. (2002). Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. In *Neuron* (Vol. 35, Issue 4, pp. 605–623). Cell Press. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00828-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00828-0)
- Loy, C., & Schneider, L. (2006). Galantamine for Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1. <https://doi.org/10.1002/14651858.cd001747.pub3>
- Ma, S., Attarwala, I. Y., & Xie, X. Q. (2019). SQSTM1/p62: A Potential Target for Neurodegenerative Disease. In *ACS Chemical Neuroscience* (Vol. 10, Issue 5, pp. 2094–2114). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.8b00516>
- Ma, T., Gong, K., Yan, Y., Song, B., Zhang, X., & Gong, Y. (2012). Mitochondrial modulation of store-operated Ca²⁺ entry in model cells of Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 426(2), 196–202. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.08.062>
- Macdonald, R., Barnes, K., Hastings, C., & Mortiboys, H. (2018). Mitochondrial abnormalities in Parkinson's disease and Alzheimer's disease: Can mitochondria be targeted therapeutically? In *Biochemical Society Transactions* (Vol. 46, Issue 4, pp. 891–909). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/BST20170501>
- Manczak, M., Calkins, M. J., & Reddy, P. H. (2011). Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer's disease: Implications for neuronal damage. *Human*

- Molecular Genetics*, 20(13), 2495–2509. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr139>
- Manczak, M., Kandimalla, R., Yin, X., & Reddy, P. H. (2018). Hippocampal mutant APP and amyloid beta-induced cognitive decline, dendritic spine loss, defective autophagy, mitophagy and mitochondrial abnormalities in a mouse model of Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*, 27(8), 1332–1342. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy042>
- Mandelkow, E. M., & Mandelkow, E. (2011). Biochemistry and cell biology of Tau protein in neurofibrillary degeneration. In *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* (Vol. 3, Issue 10, pp. 1–25). Cold Spring Harb Perspect Med. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006247>
- Mantzavinos, V., & Alexiou, A. (2017). Biomarkers for Alzheimer's Disease Diagnosis. *Current Alzheimer Research*, 14(11), 1149. <https://doi.org/10.2174/1567205014666170203125942>
- Martin, B. L., Schrader-Fischer, G., Busciglio, J., Duke, M., Paganetti, P., & Yankner, B. A. (1995). Intracellular accumulation of β -amyloid in cells expressing the Swedish mutant amyloid precursor protein. *Journal of Biological Chemistry*, 270(45), 26727–26730. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.45.26727>
- Masters, C. L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C. C., Sperling, R. A., & Cummings, J. L. (2015). Alzheimer's disease. In *Nature Reviews Disease Primers* (Vol. 1). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.56>
- Matsunaga, S., Kishi, T., Nomura, I., Sakuma, K., Okuya, M., Ikuta, T., & Iwata, N. (2018). The efficacy and safety of memantine for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opinion on Drug Safety*, 17(10), 1053–1061. <https://doi.org/10.1080/14740338.2018.1524870>
- Mattson, M. P., & Arumugam, T. V. (2018). Hallmarks of Brain Aging: Adaptive and Pathological Modification by Metabolic States. In *Cell Metabolism* (Vol. 27, Issue 6, pp. 1176–1199). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.05.011>
- Maurer, I., Zierz, S., & Möller, H. J. (2000). A selective defect of cytochrome c oxidase is

- present in brain of Alzheimer disease patients. *Neurobiology of Aging*, 21(3), 455–462. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(00\)00112-3](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(00)00112-3)
- Maurice, D. H., Ke, H., Ahmad, F., Wang, Y., Chung, J., & Manganiello, V. C. (2014). Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 13, Issue 4, pp. 290–314). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrd4228>
- Mayeux, R., & Stern, Y. (2012). Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006239>
- McAllister, B. B., Lacoursiere, S. G., Sutherland, R. J., & Mohajerani, M. H. (2020). Intracerebral seeding of amyloid- β and tau pathology in mice: Factors underlying prion-like spreading and comparisons with α -synuclein. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 112, pp. 1–27). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.01.026>
- Mcmanus, M. J., Murphy, M. P., & Franklin, J. L. (2011). The mitochondria-targeted antioxidant mitoq prevents loss of spatial memory retention and early neuropathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 31(44), 15703–15715. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0552-11.2011>
- McShane, R., Areosa Sastre, A., & Minakaran, N. (2006). Memantine for dementia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2. <https://doi.org/10.1002/14651858.cd003154.pub5>
- Mejia, E. M., & Hatch, G. M. (2016). Mitochondrial phospholipids: role in mitochondrial function. In *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* (Vol. 48, Issue 2, pp. 99–112). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s10863-015-9601-4>
- Menniti, F. S., Faraci, W. S., & Schmidt, C. J. (2006). Phosphodiesterases in the CNS: Targets for drug development. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 5, Issue 8, pp. 660–670). Nat Rev Drug Discov. <https://doi.org/10.1038/nrd2058>
- Menzies, F. M., Fleming, A., Caricasole, A., Bento, C. F., Andrews, S. P., Ashkenazi, A.,

- Füllgrabe, 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. In *Neuron* (Vol. 93, Issue 5, pp. 1015–1034). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.01.022>
- Meyer, J. N., Leuthner, T. C., & Luz, A. L. (2017). Mitochondrial fusion, fission, and mitochondrial toxicity. *Toxicology*, *391*, 42–53. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.07.019>
- Miller, E. R., Pastor-Barriuso, R., Dalal, D., Riemersma, R. A., Appel, L. J., & Guallar, E. (2005). Meta-analysis: High-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. In *Annals of Internal Medicine* (Vol. 142, Issue 1). American College of Physicians. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-142-1-200501040-00110>
- Minkeviciene, R., Ihalainen, J., Malm, T., Matilainen, O., Keksa-Goldsteine, V., Goldsteins, G., Iivonen, H., Leguit, N., Glennon, J., Koistinaho, J., Banerjee, P., & Tanila, H. (2008). Age-related decrease in stimulated glutamate release and vesicular glutamate transporters in APP/PS1 transgenic and wild-type mice. *Journal of Neurochemistry*, *105*(3), 584–594. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05147.x>
- Minter, M. R., Taylor, J. M., & Crack, P. J. (2016). The contribution of neuroinflammation to amyloid toxicity in Alzheimer's disease. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 136, Issue 3, pp. 457–474). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jnc.13411>
- Miró, X., Pérez-Torres, S., Palacios, J. M., Puigdomènech, P., & Mengod, G. (2001). Differential distribution of cAMP-specific phosphodiesterase 7A mRNA in rat brain and peripheral organs. *Synapse*, *40*(3), 201–214. <https://doi.org/10.1002/syn.1043>
- Mishra, P., & Chan, D. C. (2016). Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *Journal of Cell Biology*, *212*(4), 379–387. <https://doi.org/10.1083/jcb.201511036>
- Morales-Garcia, J. A., Alonso-Gil, S., Gil, C., Martinez, A., Santos, A., & Perez-Castillo, A. (2015). Phosphodiesterase 7 Inhibition Induces Dopaminergic Neurogenesis in Hemiparkinsonian Rats. *STEM CELLS Translational Medicine*, *4*(6), 564–575.

<https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0277>

- Morales-Garcia, J. A., Alonso-Gil, S., Santos, Á., & Perez-Castillo, A. (2020). Phosphodiesterase 7 Regulation in Cellular and Rodent Models of Parkinson's Disease. *Molecular Neurobiology*, *57*(2), 806–822.
<https://doi.org/10.1007/s12035-019-01745-z>
- Morales-Garcia, J. A., Echeverry-Alzate, V., Alonso-Gil, S., Sanz-SanCristobal, M., Lopez-Moreno, J. A., Gil, C., Martinez, A., Santos, A., & Perez-Castillo, A. (2017). Phosphodiesterase7 Inhibition Activates Adult Neurogenesis in Hippocampus and Subventricular Zone In Vitro and In Vivo. *Stem Cells*, *35*(2), 458–472.
<https://doi.org/10.1002/stem.2480>
- Morales-Garcia, J. A., Redondo, M., Alonso-Gil, S., Gil, C., Perez, C., Martinez, A., Santos, A., & Perez-Castillo, A. (2011). Phosphodiesterase 7 inhibition preserves dopaminergic neurons in cellular and rodent models of Parkinson disease. *PLoS ONE*, *6*(2).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017240>
- Morales, I., Guzmán-Martínez, L., Cerda-Troncoso, C., Farías, G. A., & Maccioni, R. B. (2014). Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*(1 APR). <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00112>
- Moreira, P. I., Santos, R. X., Zhu, X., Lee, H. G., Smith, M. A., Casadesus, G., & Perry, G. (2010). Autophagy in Alzheimers disease. In *Expert Review of Neurotherapeutics* (Vol. 10, Issue 7, pp. 1209–1218). Expert Rev Neurother.
<https://doi.org/10.1586/ern.10.84>
- Moreira, P. I., Siedlak, S. L., Wang, X., Santos, M. S., Oliveira, C. R., Tabaton, M., Nunomura, A., Szweda, L. I., Aliev, G., Smith, M. A., Zhu, X., & Perry, G. (2007). Autophagocytosis of mitochondria is prominent in Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *66*(6), 525–532.
<https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000240476.73532.b0>
- Murakawa, T., Yamaguchi, O., Hashimoto, A., Hikoso, S., Takeda, T., Oka, T., Yasui, H., Ueda, H., Akazawa, Y., Nakayama, H., Taneike, M., Misaka, T., Omiya, S., Shah, A. M.,

- Yamamoto, A., Nishida, K., Ohsumi, Y., Okamoto, K., Sakata, Y., & Otsu, K. (2015). Bcl-2-like protein 13 is a mammalian Atg32 homologue that mediates mitophagy and mitochondrial fragmentation. *Nature Communications*, 6.
<https://doi.org/10.1038/ncomms8527>
- Murray, A. J., Knight, N. S., Cole, M. A., Cochlin, L. E., Carter, E., Tchabanenko, K., Pichulik, T., Gulston, M. K., Atherton, H. J., Schroeder, M. A., Deacon, R. M. J., Kashiwaya, Y., King, M. T., Pawlosky, R., Rawlins, J. N. P., Tyler, D. J., Griffin, J. L., Robertson, J., Veech, R. L., & Clarke, K. (2016). Novel ketone diet enhances physical and cognitive performance. *FASEB Journal*, 30(12), 4021–4032.
<https://doi.org/10.1096/fj.201600773R>
- Mutations | ALZFORUM*. (n.d.). Retrieved May 20, 2020, from
<https://www.alzforum.org/mutations>
- Nagele, R. G., D'Andrea, M. R., Lee, H., Venkataraman, V., & Wang, H. Y. (2003). Astrocytes accumulate A β 42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains. *Brain Research*, 971(2), 197–209. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(03\)02361-8](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)02361-8)
- Näslund, J., Haroutunian, V., Mohs, R., Davis, K. L., Davies, P., Greengard, P., & Buxbaum, J. D. (2000). Correlation between elevated levels of amyloid β -peptide in the brain and cognitive decline. *Journal of the American Medical Association*, 283(12), 1571–1577. <https://doi.org/10.1001/jama.283.12.1571>
- Nixon, R. A. (2013). The role of autophagy in neurodegenerative disease. In *Nature Medicine* (Vol. 19, Issue 8, pp. 983–997). Nat Med.
<https://doi.org/10.1038/nm.3232>
- O'Brien, R. J., & Wong, P. C. (2011). Amyloid precursor protein processing and alzheimer's disease. *Annual Review of Neuroscience*, 34, 185–204.
<https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113613>
- Ohta, K., Mizuno, A., Ueda, M., Li, S., Suzuki, Y., Hida, Y., Hayakawa-Yano, Y., Itoh, M., Ohta, E., Kobori, M., & Nakagawa, T. (2010). Autophagy impairment stimulates PS1 expression and γ -secretase activity. In *Autophagy* (Vol. 6, Issue 3, pp. 345–352).

Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/auto.6.3.11228>

Onishi, M., Yamano, K., Sato, M., Matsuda, N., & Okamoto, K. (2021). Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy. *The EMBO Journal*, *40*(3). <https://doi.org/10.15252/embj.2020104705>

Otero, M. G., Fernandez Bessone, I., Hallberg, A. E., Cromberg, L. E., De Rossi, M. C., Saez, T. M., Levi, V., Almenar-Queralt, A., & Falzone, T. L. (2018). Proteasome stress leads to APP axonal transport defects by promoting its amyloidogenic processing in lysosomes. *Journal of Cell Science*, *131*(11), jcs214536. <https://doi.org/10.1242/jcs.214536>

Pagliuso, A., Cossart, P., & Stavru, F. (2018). The ever-growing complexity of the mitochondrial fission machinery. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 75, Issue 3, pp. 355–374). Birkhauser Verlag AG. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2603-0>

Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J. A., Outzen, H., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., & Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy*[S]. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(33), 24131–24145. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702824200>

Park, S. J., Ahmad, F., Philp, A., Baar, K., Williams, T., Luo, H., Ke, H., Rehmann, H., Taussig, R., Brown, A. L., Kim, M. K., Beaven, M. A., Burgin, A. B., Manganiello, V., & Chung, J. H. (2012). Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell*, *148*(3), 421–433. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.017>

Parzych, K. R., & Klionsky, D. J. (2014). An overview of autophagy: Morphology, mechanism, and regulation. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 20, Issue 3, pp. 460–473). Mary Ann Liebert, Inc. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5371>

Pearse, D. D., Pereira, F. C., Stolyarova, A., Barakat, D. J., & Bunge, M. B. (2004). Inhibition of tumour necrosis factor- α by antisense targeting produces immunophenotypical and morphological changes in injury-activated microglia and macrophages.

European Journal of Neuroscience, 20(12), 3387–3396.

<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03799.x>

- Pedrós, I., Petrov, D., Allgaier, M., Sureda, F., Barroso, E., Beas-Zarate, C., Auladell, C., Pallàs, M., Vázquez-Carrera, M., Casadesús, G., Folch, J., & Camins, A. (2014). Early alterations in energy metabolism in the hippocampus of APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1842(9), 1556–1566. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.05.025>
- Perez-Gonzalez, R., Pascual, C., Antequera, D., Bolos, M., Redondo, M., Perez, D. I., Pérez-Grijalba, V., Krzyzanowska, A., Sarasa, M., Gil, C., Ferrer, I., Martinez, A., & Carro, E. (2013). Phosphodiesterase 7 inhibitor reduced cognitive impairment and pathological hallmarks in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 34(9), 2133–2145. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.03.011>
- Pérez-Torres, S., Cortés, R., Tolnay, M., Probst, A., Palacios, J. M., & Mengod, G. (2003). Alterations on phosphodiesterase type 7 and 8 isozyme mRNA expression in Alzheimer's disease brains examined by in situ hybridization. *Experimental Neurology*, 182(2), 322–334. [https://doi.org/10.1016/S0014-4886\(03\)00042-6](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(03)00042-6)
- Perl, D. P. (2010). Neuropathology of Alzheimer's disease. In *Mount Sinai Journal of Medicine* (Vol. 77, Issue 1, pp. 32–42). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1002/msj.20157>
- Perluigi, M., Swomley, A. M., & Butterfield, D. A. (2014). Redox proteomics and the dynamic molecular landscape of the aging brain. In *Ageing Research Reviews* (Vol. 13, Issue 1, pp. 75–89). Ageing Res Rev. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2013.12.005>
- Petrov, D., Pedrós, I., Artiach, G., Sureda, F. X., Barroso, E., Pallàs, M., Casadesús, G., Beas-Zarate, C., Carro, E., Ferrer, I., Vazquez-Carrera, M., Folch, J., & Camins, A. (2015). High-fat diet-induced deregulation of hippocampal insulin signaling and mitochondrial homeostasis deficiencies contribute to Alzheimer disease pathology in rodents. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1852(9), 1687–1699. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.05.004>
- Pickford, F., Masliah, E., Britschgi, M., Lucin, K., Narasimhan, R., Jaeger, P. A., Small, S.,

- Spencer, B., Rockenstein, E., Levine, B., & Wyss-Coray, T. (2008). The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid β accumulation in mice. *Journal of Clinical Investigation*, *118*(6), 2190–2199. <https://doi.org/10.1172/JCI33585>
- Pickles, S., Vigié, P., & Youle, R. J. (2018). Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance. In *Current Biology* (Vol. 28, Issue 4, pp. R170–R185). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.004>
- Pike, C. J. (2017). Sex and the development of Alzheimer's disease. In *Journal of Neuroscience Research* (Vol. 95, Issues 1–2, pp. 671–680). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jnr.23827>
- Pîrșcoveanu, D. F. V., Pirici, I., Tudorică, V., Bălșeanu, T. A., Albu, V. C., Bondari, S., Bumbea, A. M., & Pîrșcoveanu, M. (2017). Tau protein in neurodegenerative diseases – a review. In *Romanian Journal of Morphology and Embryology* (Vol. 58, Issue 4, pp. 1141–1150). Editura Academiei Romane.
- Poulakis, K., Pereira, J. B., Mecocci, P., Vellas, B., Tsolaki, M., Kłoszewska, I., Soininen, H., Lovestone, S., Simmons, A., Wahlund, L. O., & Westman, E. (2018). Heterogeneous patterns of brain atrophy in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *65*, 98–108. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.01.009>
- Prickaerts, J., Heckman, P. R. A., & Blokland, A. (2017). Investigational phosphodiesterase inhibitors in phase I and phase II clinical trials for Alzheimer's disease. In *Expert Opinion on Investigational Drugs* (Vol. 26, Issue 9, pp. 1033–1048). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/13543784.2017.1364360>
- Prince, M., Bryce, R., Albanese, E., Wimo, A., Ribeiro, W., & Ferri, C. P. (2013). The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. In *Alzheimer's and Dementia* (Vol. 9, Issue 1, pp. 63-75.e2). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2012.11.007>
- Puigserver, P., & Spiegelman, B. M. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC-1 α): Transcriptional coactivator and metabolic regulator. In *Endocrine Reviews* (Vol. 24, Issue 1, pp. 78–90). Endocr Rev.

<https://doi.org/10.1210/er.2002-0012>

Qin, W., Haroutunian, V., Katsel, P., Cardozo, C. P., Ho, L., Buxbaum, J. D., & Pasinetti, G. M. (2009). PGC-1 α expression decreases in the Alzheimer disease brain as a function of dementia. *Archives of Neurology*, 66(3), 352–361.

<https://doi.org/10.1001/archneurol.2008.588>

Rajaei, S., Karima, S., Sepasi Tehrani, H., Shateri, S., Mahmoodi Baram, S., Mahdavi, M., Mokhtari, F., Alimohammadi, A., Tafakhori, A., Amiri, A., Aghamollaii, V., Fatemi, H., Rajabibazl, M., Kobarfard, F., & Gorji, A. (2020). Conformational Change and GTPase Activity of Human Tubulin: A Comparative Study on Alzheimer's Disease and Healthy Brain. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/jnc.15009>

Rao, C. V., Asch, A. S., Carr, D. J. J., & Yamada, H. Y. (2020). "Amyloid-beta accumulation cycle" as a prevention and/or therapy target for Alzheimer's disease. In *Aging Cell* (Vol. 19, Issue 3). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/accel.13109>

Rapoport, M., Dawson, H. N., Binder, L. I., Vitek, M. P., & Ferreira, A. (2002). Tau is essential to β -amyloid-induced neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(9), 6364–6369.

<https://doi.org/10.1073/pnas.092136199>

Recuero, M., Serrano, E., Bullido, M. J., & Valdivieso, F. (2004). A β production as consequence of cellular death of a human neuroblastoma overexpressing APP. *FEBS Letters*, 570(1–3), 114–118. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.06.025>

Recuero, M., Vicente, M. C., Martínez-García, A., Ramos, M. C., Carmona-Ssaez, P., Sastre, I., Aldudo, J., Vilella, E., Frank, A., Bullido, M. J., & Valdivieso, F. (2009). A free radical-generating system induces the cholesterol biosynthesis pathway: A role in Alzheimer's disease. *Aging Cell*, 8(2), 128–139. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2009.00457.x>

Reddy, A. P., & Reddy, P. H. (2017). Mitochondria-Targeted Molecules as Potential Drugs to Treat Patients With Alzheimer's Disease. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 146, pp. 173–201). Elsevier B.V.

<https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2016.12.010>

- Reddy, P. H., & Oliver, D. M. (2019). Amyloid Beta and Phosphorylated Tau-Induced Defective Autophagy and Mitophagy in Alzheimer's Disease. *Cells*, *8*(5), 488. <https://doi.org/10.3390/cells8050488>
- Reddy, P. H., Yin, X. L., Manczak, M., Kumar, S., Pradeepkiran, J. A., Vijayan, M., & Reddy, A. P. (2018). Mutant APP and amyloid beta-induced defective autophagy, mitophagy, mitochondrial structural and functional changes and synaptic damage in hippocampal neurons from Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*, *27*(14), 2502–2516. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy154>
- Reddy, V. P., Zhu, X., Perry, G., & Smith, M. A. (2009). Oxidative Stress in Diabetes and Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, *16*(4), 763. <https://doi.org/10.3233/JAD-2009-1013>
- Reiss, A. B., Arain, H. A., Stecker, M. M., Siegert, N. M., & Kasselmann, L. J. (2018). Amyloid toxicity in Alzheimer's disease. In *Reviews in the Neurosciences* (Vol. 29, Issue 6, pp. 613–627). Walter de Gruyter GmbH. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0063>
- Rhein, V., Baysang, G., Rao, S., Meier, F., Bonert, A., Müller-Spahn, F., & Eckert, A. (2009). Amyloid-beta leads to impaired cellular respiration, energy production and mitochondrial electron chain complex activities in human neuroblastoma cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *29*(6–7), 1063–1071. <https://doi.org/10.1007/s10571-009-9398-y>
- Rhein, Virginie, Song, X., Wiesner, A., Ittner, L. M., Baysang, G., Meier, F., Ozmen, L., Bluethmann, H., Dröse, S., Brandt, U., Savaskan, E., Czech, C., Götz, J., & Eckert, A. (2009). Amyloid- β and tau synergistically impair the oxidative phosphorylation system in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(47), 20057–20062. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905529106>
- Riancho, J., Sanchez de la Torre, J. R., Paz-Fajardo, L., Limia, C., Santurtun, A., Cifra, M., Kourtidis, K., & Fdez-Arroyabe, P. (2020). The role of magnetic fields in neurodegenerative diseases. *International Journal of Biometeorology*.

<https://doi.org/10.1007/s00484-020-01896-y>

- Rinaldi, L., Delle Donne, R., Borzacchiello, D., Insabato, L., & Feliciello, A. (2018). The role of compartmentalized signaling pathways in the control of mitochondrial activities in cancer cells. In *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* (Vol. 1869, Issue 2, pp. 293–302). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.04.004>
- Roberson, E. D., Scarce-Levie, K., Palop, J. J., Yan, F., Cheng, I. H., Wu, T., Gerstein, H., Yu, G. Q., & Mucke, L. (2007). Reducing endogenous tau ameliorates amyloid β -induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science*, *316*(5825), 750–754. <https://doi.org/10.1126/science.1141736>
- Rodriguez-Vieitez, E., Ni, R., Gulyás, B., Tóth, M., Häggkvist, J., Halldin, C., Voytenko, L., Marutle, A., & Nordberg, A. (2015). Astrocytosis precedes amyloid plaque deposition in Alzheimer APPswe transgenic mouse brain: a correlative positron emission tomography and in vitro imaging study. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, *42*(7), 1119–1132. <https://doi.org/10.1007/s00259-015-3047-0>
- Salcedo-Tello, P., Ortiz-Matamoros, A., & Arias, C. (2011). GSK3 function in the brain during development, neuronal plasticity, and neurodegeneration. In *International Journal of Alzheimer's Disease* (Vol. 2011). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.4061/2011/189728>
- Samadi, M., Moradi, S., Moradinazar, M., Mostafai, R., & Pasdar, Y. (2019). Dietary pattern in relation to the risk of Alzheimer's disease: a systematic review. In *Neurological Sciences* (Vol. 40, Issue 10, pp. 2031–2043). Springer-Verlag Italia s.r.l. <https://doi.org/10.1007/s10072-019-03976-3>
- Sas, K., Robotka, H., Toldi, J., & Vécsei, L. (2007). Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *Journal of the Neurological Sciences*, *257*(1–2), 221–239. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2007.01.033>
- Scarpulla, R. C. (2011). Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell*

- Research* (Vol. 1813, Issue 7, pp. 1269–1278). NIH Public Access.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.09.019>
- Scarpulla, R. C., Vega, R. B., & Kelly, D. P. (2012). Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. In *Trends in Endocrinology and Metabolism* (Vol. 23, Issue 9, pp. 459–466). Trends Endocrinol Metab.
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.06.006>
- Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T. D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levy-Lahad, E., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkaj, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., ... Younkin, S. (1996). Secreted amyloid β -protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature Medicine*, 2(8), 864–870.
<https://doi.org/10.1038/nm0896-864>
- Schwarzländer, M., & Fuchs, P. (2017). Plant mitochondrial membranes: adding structure and new functions to respiratory physiology. In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 40, pp. 147–157). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.09.002>
- Serasinghe, M. N., & Chipuk, J. E. (2017). Mitochondrial fission in human diseases. In *Handbook of Experimental Pharmacology* (Vol. 240, pp. 159–188). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/164_2016_38
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E., & Hyman, B. T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1).
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006189>
- Šerý, O., Povová, J., Míšek, I., Pešák, L., & Janout, V. (2013). Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: A review. In *Folia Neuropathologica* (Vol. 51, Issue 1, pp. 1–9). Termedia Publishing House Ltd.
<https://doi.org/10.5114/fn.2013.34190>
- Shaerzadeh, F., Motamedi, F., Minai-Tehrani, D., & Khodagholi, F. (2014). Monitoring of neuronal loss in the hippocampus of A β -injected rat: Autophagy, mitophagy, and

- mitochondrial biogenesis stand against apoptosis. *NeuroMolecular Medicine*, 16(1), 175–190. <https://doi.org/10.1007/s12017-013-8272-8>
- Sheng, B., Wang, X., Su, B., Lee, H. G., Casadesus, G., Perry, G., & Zhu, X. (2012). Impaired mitochondrial biogenesis contributes to mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 120(3), 419–429. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07581.x>
- Shimada, K., Crother, T. R., Karlin, J., Dagvadorj, J., Chiba, N., Chen, S., Ramanujan, V. K., Wolf, A. J., Vergnes, L., Ojcius, D. M., Rentsendorj, A., Vargas, M., Guerrero, C., Wang, Y., Fitzgerald, K. A., Underhill, D. M., Town, T., & Arditi, M. (2012). Oxidized Mitochondrial DNA Activates the NLRP3 Inflammasome during Apoptosis. *Immunity*, 36(3), 401–414. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.01.009>
- Siddhartha, M. R., Anahi, S. G., Perla, G. P., Macías, M., Ordaz, B., Fernando, P. O., Azucena, A. V., Erika, O. S., Sofia, D. C., Perry, G., & Williams, S. (2018). Phosphorylation of Tau protein correlates with changes in hippocampal theta oscillations and reduces hippocampal excitability in Alzheimer's model. *Journal of Biological Chemistry*, 293(22), 8462–8472. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001187>
- Simpson, J. E., Ince, P. G., Lace, G., Forster, G., Shaw, P. J., Matthews, F., Savva, G., Brayne, C., & Wharton, S. B. (2010). Astrocyte phenotype in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. *Neurobiology of Aging*, 31(4), 578–590. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.05.015>
- Singh, A. K., Bissoyi, A., Kashyap, M. P., Patra, P. K., & Rizvi, S. I. (2017). Autophagy Activation Alleviates Amyloid- β -Induced Oxidative Stress, Apoptosis and Neurotoxicity in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Neurotoxicity Research*, 32(3), 351–361. <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9746-5>
- Skoumalová, A., & Hort, J. (2012). Blood markers of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16(10), 2291–2300. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2012.01585.x>
- Sompol, P., Ittarat, W., Tangpong, J., Chen, Y., Doubinskaia, I., Batinic-Haberle, I., Abdul, H. M., Butterfield, D. A., & St. Clair, D. K. (2008). A neuronal model of Alzheimer's

disease: An insight into the mechanisms of oxidative stress-mediated mitochondrial injury. *Neuroscience*, 153(1), 120–130.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.01.044>

Spies, P. E., Verbeek, M. M., Van Groen, T., & Claassen, J. A. H. R. (2012). Reviewing reasons for the decreased CSF Abeta42 concentration in Alzheimer disease. In *Frontiers in Bioscience* (Vol. 17, Issue 6, pp. 2024–2034). Front Biosci (Landmark Ed). <https://doi.org/10.2741/4035>

Steib, K., Schäffner, I., Jagasia, R., Ebert, B., & Chichung Lie, D. (2014). Mitochondria modify exercise-induced development of stem cell-derived neurons in the adult brain. *Journal of Neuroscience*, 34(19), 6624–6633.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4972-13.2014>

Sterky, F. H., Lee, S., Wibom, R., Olson, L., & Larsson, N. G. (2011). Impaired mitochondrial transport and Parkin-independent degeneration of respiratory chain-deficient dopamine neurons in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(31), 12937–12942.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1103295108>

Stieler, J. T., Lederer, C., Brückner, M. K., Wolf, H., Holzer, M., Gertz, H. J., & Arendt, T. (2001). Impairment of mitogenic activation of peripheral blood lymphocytes in Alzheimer's disease. *NeuroReport*, 12(18), 3969–3972.
<https://doi.org/10.1097/00001756-200112210-00023>

Stuart, K. E., King, A. E., King, N. E., Collins, J. M., Vickers, J. C., & Ziebell, J. M. (2019). Late-life environmental enrichment preserves short-term memory and may attenuate microglia in male APP/PS1 mice. *Neuroscience*, 408, 282–292.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.04.015>

Szargel, R., Shani, V., Elghani, F. A., Mekies, L. N., Liani, E., Rott, R., & Engelender, S. (2016). The PINK1, synphilin-1 and SIAH-1 complex constitutes a novel mitophagy pathway. *Human Molecular Genetics*, 25(16), 3476–3490.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddw189>

Tai, L. M., Mehra, S., Shete, V., Estus, S., Rebeck, G. W., Bu, G., & Ladu, M. J. (2014). Soluble

- apoE/A β complex: Mechanism and therapeutic target for APOE4-induced AD risk. In *Molecular Neurodegeneration* (Vol. 9, Issue 1). Mol Neurodegener. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-9-2>
- Takahashi, R. H., Nagao, T., & Gouras, G. K. (2017). Plaque formation and the intraneuronal accumulation of β -amyloid in Alzheimer's disease. In *Pathology International* (Vol. 67, Issue 4, pp. 185–193). Blackwell Publishing. <https://doi.org/10.1111/pin.12520>
- Takatori, S., Wang, W., Iguchi, A., & Tomita, T. (2019). Genetic Risk Factors for Alzheimer Disease: Emerging Roles of Microglia in Disease Pathomechanisms. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1118, pp. 83–116). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/978-3-030-05542-4_5
- Tan, L. (2014). Efficacy and safety of donepezil, galantamine, rivastigmine, and memantine for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 41(2), 615–631. <https://doi.org/10.3233/JAD-132690>
- Tanaka, A. (2010). Parkin-mediated selective mitochondrial autophagy, mitophagy: Parkin purges damaged organelles from the vital mitochondrial network. In *FEBS Letters* (Vol. 584, Issue 7, pp. 1386–1392). FEBS Lett. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.02.060>
- Testa, G., Staurenghi, E., Zerbinati, C., Gargiulo, S., Iuliano, L., Giaccone, G., Fantò, F., Poli, G., Leonarduzzi, G., & Gamba, P. (2016). Changes in brain oxysterols at different stages of Alzheimer's disease: Their involvement in neuroinflammation. *Redox Biology*, 10, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.09.001>
- Thal, D. R., Rüb, U., Orantes, M., & Braak, H. (2002). Phases of A β -deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*, 58(12), 1791–1800. <https://doi.org/10.1212/WNL.58.12.1791>
- Tiwari, S., Atluri, V., Kaushik, A., Yndart, A., & Nair, M. (2019). Alzheimer's disease: Pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. In *International Journal of Nanomedicine* (Vol. 14, pp. 5541–5554). Dove Medical Press Ltd.

<https://doi.org/10.2147/IJN.S200490>

Tong, B. C. K., Wu, A. J., Li, M., & Cheung, K. H. (2018). Calcium signaling in Alzheimer's disease & therapies. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1865, Issue 11, pp. 1745–1760). Elsevier B.V.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.07.018>

Tönnies, E., & Trushina, E. (2017). Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. In *Journal of Alzheimer's Disease* (Vol. 57, Issue 4, pp. 1105–1121). IOS Press. <https://doi.org/10.3233/JAD-161088>

Trieb, K., Ransmayr, G., Sgonc, R., Lassmann, H., & Grubeck-Loebenstien, B. (1996). APP peptides stimulate lymphocyte proliferation in normals, but not in patients with Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 17(4), 541–547.

[https://doi.org/10.1016/0197-4580\(96\)00068-1](https://doi.org/10.1016/0197-4580(96)00068-1)

Trinchese, F., Liu, S., Battaglia, F., Walter, S., Mathews, P. M., & Arancio, O. (2004). Progressive age-related development of Alzheimer-like pathology in APP/PS1 mice. *Annals of Neurology*, 55(6), 801–814. <https://doi.org/10.1002/ana.20101>

Trushina, E., Nemutlu, E., Zhang, S., Christensen, T., Camp, J., Mesa, J., Siddiqui, A., Tamura, Y., Sesaki, H., Wengenack, T. M., Dzeja, P. P., & Poduslo, J. F. (2012). Defects in mitochondrial dynamics and metabolomic signatures of evolving energetic stress in mouse models of familial Alzheimer's disease. *PLoS ONE*, 7(2).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032737>

Tzamelis, I. (2012). The evolving role of mitochondria in metabolism. In *Trends in Endocrinology and Metabolism* (Vol. 23, Issue 9, pp. 417–419). Trends Endocrinol Metab. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.07.008>

Vaillant-Beuchot, L., Mary, A., Pardossi-Piquard, R., Bourgeois, A., Lauritzen, I., Eysert, F., Kinoshita, P. F., Cazareth, J., Badot, C., Fragaki, K., Bussiere, R., Martin, C., Mary, R., Bauer, C., Pagnotta, S., Paquis-Flucklinger, V., Buée-Scherrer, V., Buée, L., Lacas-Gervais, S., ... Chami, M. (2020). Accumulation of amyloid precursor protein C-terminal fragments triggers mitochondrial structure, function, and mitophagy defects in Alzheimer's disease models and human brains. *Acta Neuropathologica*.

<https://doi.org/10.1007/s00401-020-02234-7>

Valsecchi, F., Ramos-Espiritu, L. S., Buck, J., Levin, L. R., & Manfredi, G. (2013). cAMP and mitochondria. In *Physiology* (Vol. 28, Issue 3, pp. 199–209). Physiology (Bethesda).
<https://doi.org/10.1152/physiol.00004.2013>

Van Giau, V., Bagyinszky, E., Youn, Y. C., An, S. S. A., & Kim, S. Y. (2019). APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in asian patients with early-onset alzheimer disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19).
<https://doi.org/10.3390/ijms20194757>

Ventura-Clapier, R., Garnier, A., & Veksler, V. (2008). Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovascular Research*, 79(2), 208–217. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn098>

Verheijen, J., Van den Bossche, T., van der Zee, J., Engelborghs, S., Sanchez-Valle, R., Lladó, A., Graff, C., Thonberg, H., Pastor, P., Ortega-Cubero, S., Pastor, M. A., Benussi, L., Ghidoni, R., Binetti, G., Clarimon, J., Lleó, A., Fortea, J., de Mendonça, A., Martins, M., ... Sleegers, K. (2016). A comprehensive study of the genetic impact of rare variants in SORL1 in European early-onset Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 132(2), 213–224. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1566-9>

Verkhatsky, A., Olabarria, M., Noristani, H. N., Yeh, C. Y., & Rodriguez, J. J. (2010). Astrocytes in Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics*, 7(4), 399–412.
<https://doi.org/10.1016/j.nurt.2010.05.017>

Vida, C., de Toda, I. M., Garrido, A., Carro, E., Molina, J. A., & De la Fuente, M. (2018). Impairment of several immune functions and redox state in blood cells of Alzheimer's disease patients. Relevant role of neutrophils in oxidative stress. *Frontiers in Immunology*, 8(JAN). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01974>

Volakakis, N., Kadkhodaei, B., Joodmardi, E., Wallis, K., Panman, L., Silvaggi, J., Spiegelman, B. M., & Perlmann, T. (2010). NR4A orphan nuclear receptors as mediators of CREB-dependent neuroprotection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(27), 12317–12322.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1007088107>

- Walsh, J. G., Muruve, D. A., & Power, C. (2014). Inflammasomes in the CNS. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 15, Issue 2, pp. 84–97). Nat Rev Neurosci. <https://doi.org/10.1038/nrn3638>
- Wang, H. C., Zhang, T., Kuerban, B., Jin, Y. L., Le, W., Hara, H., Fan, D. S., Wang, Y. J., Tabira, T., & Chui, D. H. (2015). Autophagy is involved in oral rAAV/A β vaccine-induced A β clearance in APP/PS1 transgenic mice. *Neuroscience Bulletin*, 31(4), 491–504. <https://doi.org/10.1007/s12264-015-1546-4>
- Wang, H., Jiang, T., Li, W., Gao, N., & Zhang, T. (2018). Resveratrol attenuates oxidative damage through activating mitophagy in an in vitro model of Alzheimer's disease. *Toxicology Letters*, 282, 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.10.021>
- Wang, J. Z., Xia, Y. Y., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (2013). Abnormal hyperphosphorylation of tau: Sites, regulation, and molecular mechanism of neurofibrillary degeneration. In *Journal of Alzheimer's Disease* (Vol. 33, Issue SUPPL. 1). IOS Press. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-129031>
- Wang, W., Zhao, F., Ma, X., Perry, G., & Zhu, X. (2020). Mitochondria dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease: Recent advances. In *Molecular Neurodegeneration* (Vol. 15, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13024-020-00376-6>
- Wang, X., Su, B., Lee, H. G., Li, X., Perry, G., Smith, M. A., & Zhu, X. (2009). Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 29(28), 9090–9103. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1357-09.2009>
- Wang, X., Su, B., Siedlak, S. L., Moreira, P. I., Fujioka, H., Wang, Y., Casadesus, G., & Zhu, X. (2008). Amyloid- β overproduction causes abnormal mitochondrial dynamics via differential modulation of mitochondrial fission/fusion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(49), 19318–19323. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804871105>
- Wang, Z. F., Li, H. L., Li, X. C., Zhang, Q., Tian, Q., Wang, Q., Xu, H., & Wang, J. Z. (2006). Effects of endogenous β -amyloid overproduction on tau phosphorylation in cell

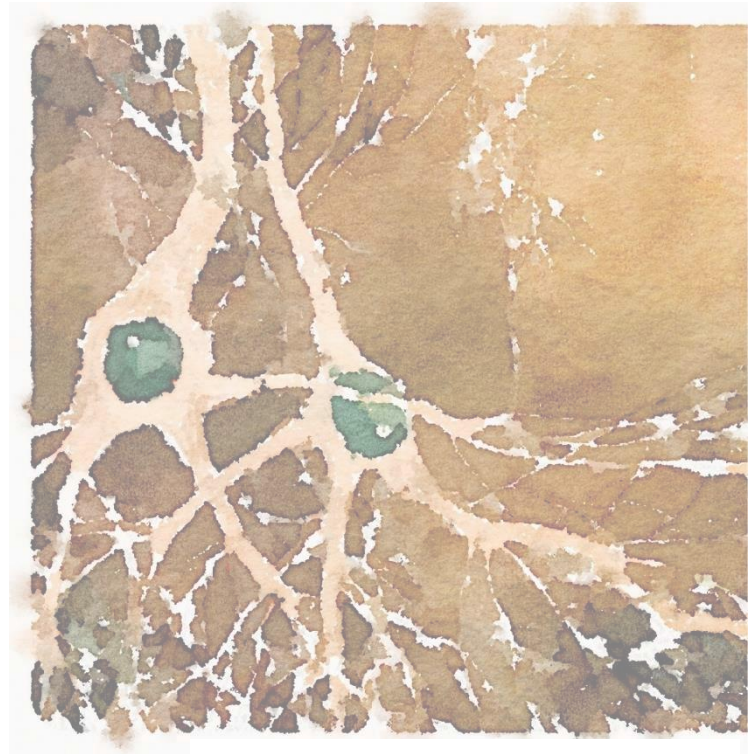
- culture. *Journal of Neurochemistry*, 98(4), 1167–1175.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03956.x>
- Watanabe, N., & Osada, H. (2016). Small molecules that target phosphorylation dependent protein–protein interaction. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 24(15), 3246–3254. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.03.023>
- Wilkins, H. M., Carl, S. M., Weber, S. G., Ramanujan, S. A., Festoff, B. W., Linseman, D. A., & Swerdlow, R. H. (2015). Mitochondrial lysates induce inflammation and alzheimer's disease-relevant changes in microglial and neuronal cells. *Journal of Alzheimer's Disease*, 45(1), 305–318. <https://doi.org/10.3233/JAD-142334>
- Wilkins, H. M., Mahnken, J. D., Welch, P., Bothwell, R., Koppel, S., Jackson, R. L., Burns, J. M., & Swerdlow, R. H. (2017). A Mitochondrial Biomarker-Based Study of S-Equol in Alzheimer's Disease Subjects: Results of a Single-Arm, Pilot Trial. *Journal of Alzheimer's Disease*, 59(1), 291–300. <https://doi.org/10.3233/JAD-170077>
- Williamson, J., Goldman, J., & Marder, K. S. (2009). Genetic aspects of alzheimer disease. In *Neurologist* (Vol. 15, Issue 2, pp. 80–86). NIH Public Access.
<https://doi.org/10.1097/NRL.0b013e318187e76b>
- Winblad, B., Amouyel, P., Andrieu, S., Ballard, C., Brayne, C., Brodaty, H., Cedazo-Minguez, A., Dubois, B., Edvardsson, D., Feldman, H., Fratiglioni, L., Frisoni, G. B., Gauthier, S., Georges, J., Graff, C., Iqbal, K., Jessen, F., Johansson, G., Jönsson, L., ... Zetterberg, H. (2016). Defeating Alzheimer's disease and other dementias: A priority for European science and society. In *The Lancet Neurology* (Vol. 15, Issue 5, pp. 455–532). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)00062-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)00062-4)
- Wolfe, C. M., Fitz, N. F., Nam, K. N., Lefterov, I., & Koldamova, R. (2019). The role of APOE and TREM2 in Alzheimer's disease—Current understanding and perspectives. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 1). MDPI AG.
<https://doi.org/10.3390/ijms20010081>
- Wright, A. L., Zinn, R., Hohensinn, B., Konen, L. M., Beynon, S. B., Tan, R. P., Clark, I. A., Abdipranoto, A., & Vissel, B. (2013). Neuroinflammation and Neuronal Loss Precede A β Plaque Deposition in the hAPP-J20 Mouse Model of Alzheimer's

- Disease. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059586>
- Xie, Y., Niu, M., Ji, C., Huang, T. Y., Zhang, C., Tian, Y., Shi, Z., Wang, C., Zhao, Y., Luo, H., Can, D., Xu, H., Zhang, Y. W., & Zhang, X. (2019). SNX8 Enhances Non-amyloidogenic APP Trafficking and Attenuates A β Accumulation and Memory Deficits in an AD Mouse. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00410>
- Xu, H., Finkelstein, D. I., & Adlard, P. A. (2014). Interactions of metals and apolipoprotein e in Alzheimer's disease. In *Frontiers in Aging Neuroscience* (Vol. 6, Issue JUN). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00121>
- Xu, L. L., Shen, Y., Wang, X., Wei, L. F., Wang, P., Yang, H., Wang, C. F., Xie, Z. H., & Bi, J. Z. (2017). Mitochondrial dynamics changes with age in an APPsw/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease. *NeuroReport*, 28(4), 222–228. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000000739>
- Xu, Y. J., Mei, Y., Qu, Z. L., Zhang, S. J., Zhao, W., Fang, J. S., Wu, J., Yang, C., Liu, S. J., Fang, Y. Q., Wang, Q., & Zhang, Y. Bin. (2018). Ligustilide Ameliorates Memory Deficiency in APP/PS1 Transgenic Mice via Restoring Mitochondrial Dysfunction. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/4606752>
- Xue, Z., Guo, Y., & Fang, Y. (2016). Moderate activation of autophagy regulates the intracellular calcium ion concentration and mitochondrial membrane potential in beta-amyloid-treated PC12 cells. *Neuroscience Letters*, 618, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.02.044>
- Yan, Q. W., Zhao, N., Xia, J., Li, B. X., & Yin, L. Y. (2019). Effects of treadmill exercise on mitochondrial fusion and fission in the hippocampus of APP/PS1 mice. *Neuroscience Letters*, 701, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.02.030>
- Yan, S. F., Akhter, F., Sosunov, A. A., & Yan, S. S. Du. (2018). Identification and characterization of amyloid- β accumulation in synaptic mitochondria. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1779, pp. 415–433). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7816-8_25

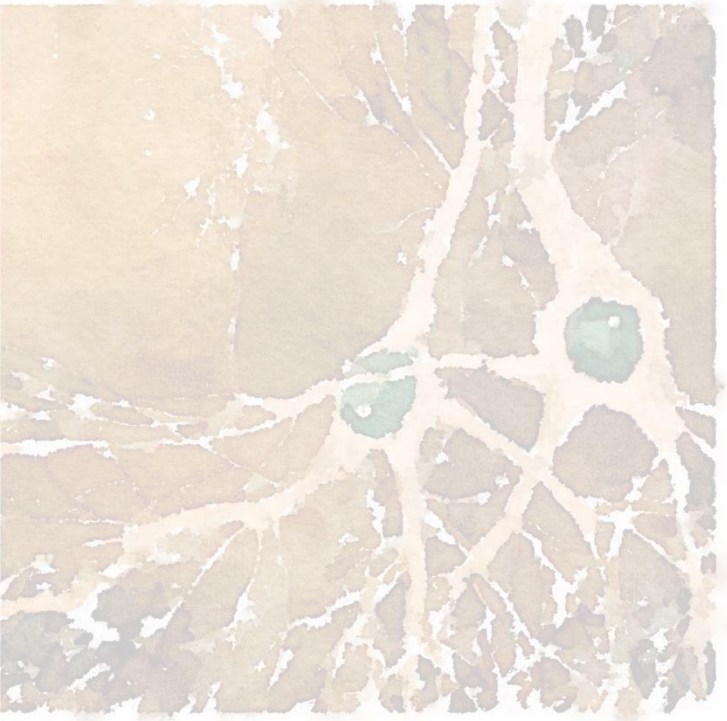
- Yao, Y., Huang, J. Z., Chen, Y., Hu, H. J., Tang, X., & Li, X. (2018). Effects and mechanism of amyloid β 1-42 on mitochondria in astrocytes. *Molecular Medicine Reports*, 17(5), 6997–7004. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8761>
- Ye, X., Sun, X., Starovoytov, V., & Cai, Q. (2015). Parkin-mediated mitophagy in mutant hAPP neurons and Alzheimer's disease patient brains. *Human Molecular Genetics*, 24(10), 2938–2951. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv056>
- Yegambaram, M., Manivannan, B., Beach, T., & Halden, R. (2015). Role of Environmental Contaminants in the Etiology of Alzheimer's Disease: A Review. *Current Alzheimer Research*, 12(2), 116–146. <https://doi.org/10.2174/1567205012666150204121719>
- Yin, J., Zhao, F., Chojnacki, J. E., Fulp, J., Klein, W. L., Zhang, S., & Zhu, X. (2018). NLRP3 Inflammasome Inhibitor Ameliorates Amyloid Pathology in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*, 55(3), 1977–1987. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0467-9>
- Yoo, S. M., & Jung, Y. K. (2018). A molecular approach to mitophagy and mitochondrial dynamics. In *Molecules and Cells* (Vol. 41, Issue 1, pp. 18–26). Korean Society for Molecular and Cellular Biology. <https://doi.org/10.14348/molcells.2018.2277>
- Yoon, S. C., Kwon, Y. A., Kim, H., Kim, S., Jo, S. A., & Kim, D. K. (2010). Altered cell viability and proliferation activity of peripheral lymphocytes in patients with Alzheimer's disease. *Psychiatry Investigation*, 7(1), 68–71. <https://doi.org/10.4306/pi.2010.7.1.68>
- Yoshii, S. R., & Mizushima, N. (2017). Monitoring and measuring autophagy. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 18, Issue 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms18091865>
- Young-Collier, K. J., McArdle, M., & Bennett, J. P. (2012). The dying of the light: Mitochondrial failure in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 28(4), 771–781. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-111487>
- Young, J. E., Boulanger-Weill, J., Williams, D. A., Woodruff, G., Buen, F., Revilla, A. C.,

- Herrera, C., Israel, M. A., Yuan, S. H., Edland, S. D., & Goldstein, L. S. B. (2015). Elucidating molecular phenotypes caused by the SORL1 Alzheimer's disease genetic risk factor using human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 16(4), 373–385. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.02.004>
- Yu, W. F., Guan, Z. Z., Bogdanovic, N., & Nordberg, A. (2005). High selective expression of $\alpha 7$ nicotinic receptors on astrocytes in the brains of patients with sporadic Alzheimer's disease and patients carrying Swedish APP 670/671 mutation: A possible association with neuritic plaques. *Experimental Neurology*, 192(1), 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.12.015>
- Yun, J., Puri, R., Yang, H., Lizzio, M. A., Wu, C., Sheng, Z. H., & Guo, M. (2014). MUL1 acts in parallel to the PINK1/parkin pathway in regulating mitofusin and compensates for loss of PINK1/parkin. *ELife*, 2014(3). <https://doi.org/10.7554/eLife.01958.001>
- Zhang, J., Mori, A., Chen, Q., & Zhao, B. (2006). Fermented papaya preparation attenuates β -amyloid precursor protein: β -amyloid-mediated copper neurotoxicity in β -amyloid precursor protein and β -amyloid precursor protein Swedish mutation overexpressing SH-SY5Y cells. *Neuroscience*, 143(1), 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.07.023>
- Zhang, L., Murray, F., Zahno, A., Kanter, J. R., Chou, D., Suda, R., Fenlon, M., Rassenti, L., Cottam, H., Kipps, T. J., & Insel, P. A. (2008). Cyclic nucleotide phosphodiesterase profiling reveals increased expression of phosphodiesterase 7B in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(49), 19532–19537. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806152105>
- Zhao, C., Su, P., Lv, C., Guo, L., Cao, G., Qin, C., & Zhang, W. (2019). Berberine alleviates amyloid β -induced mitochondrial dysfunction and synaptic loss. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/7593608>
- Zhao, N., Zhang, X., Song, C., Yang, Y., He, B., & Xu, B. (2018). The effects of treadmill exercise on autophagy in hippocampus of APP/PS1 transgenic mice. *NeuroReport*, 29(10), 819–825. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001038>

- Zhao, Y., Long, Z., Ding, Y., Jiang, T., Liu, J., Li, Y., Liu, Y., Peng, X., Wang, K., Feng, M., & He, G. (2020). Dihydroartemisinin Ameliorates Learning and Memory in Alzheimer's Disease Through Promoting Autophagosome-Lysosome Fusion and Autolysosomal Degradation for A β Clearance. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.00047>
- Zhou, R., Yazdi, A. S., Menu, P., & Tschopp, J. (2011). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*, 469(7329), 221–226. <https://doi.org/10.1038/nature09663>
- Zhou, Y., Cao, Z. Q., Wang, H. Y., Cheng, Y. N., Yu, L. G., Zhang, X. K., Sun, Y., & Guo, X. L. (2017). The anti-inflammatory effects of Morin hydrate in atherosclerosis is associated with autophagy induction through cAMP signaling. *Molecular Nutrition and Food Research*, 61(9). <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600966>



ANEXOS



RESEARCH

Open Access



Amyloid β -induced impairments on mitochondrial dynamics, hippocampal neurogenesis, and memory are restored by phosphodiesterase 7 inhibition

Fernando Bartolome^{1,2*}, Macarena de la Cueva^{1†}, Consuelo Pascual¹, Desiree Antequera^{1,2}, Tamara Fernandez¹, Carmen Gil³, Ana Martinez³ and Eva Carro^{1,2*} 

Abstract

Background: The phosphodiesterase (PDE) 7 inhibitor S14 is a cell-permeable small heterocyclic molecule that is able to cross the blood–brain barrier. We previously found that intraperitoneal treatment with S14 exerted neuroprotection in an Alzheimer's disease (AD) model (in APP/PS1 mice). The objective of this study was to investigate the neurogenic and cellular effects of oral administration of S14 on amyloid β ($A\beta$) overload.

Methods: We orally administered the PDE7 inhibitor S14 (15 mg/kg/day) or vehicle in 6-month-old APP/PS1 mice. After 5 weeks of S14 treatment, we evaluated cognitive functions and brain tissues. We also assessed the effects of S14 on the $A\beta$ -treated human neuroblastoma SH-SY5Y cell line.

Results: Targeting the cyclic adenosine monophosphate (cAMP)/cAMP-response element binding protein (CREB) pathway, S14 rescued cognitive decline by improving hippocampal neurogenesis in APP/PS1 transgenic mice. Additionally, S14 treatment reverted the $A\beta$ -induced reduction in mitochondrial mass in APP/PS1 mice and in the human neuroblastoma SH-SY5Y cells co-exposed to $A\beta$. The restoration of the mitochondrial mass was found to be a dual effect of S14: a rescue of the mitochondrial biogenesis formerly slowed down by $A\beta$ overload, and a reduction in the $A\beta$ -increased mitochondrial clearance mechanism of mitophagy.

Conclusions: Here, we show new therapeutic effects of the PDE7 inhibitor, confirming S14 as a potential therapeutic drug for AD.

Keywords: Phosphodiesterase, Alzheimer's disease, Transgenic mice, Oral administration, Memory, Hippocampus, Neurogenesis, Mitochondria, Mitophagy

Background

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia and accelerates with advancing age. The most prominent symptoms of the disease are the progressive decline in cognitive functions and memory. AD is characterized by three major neuropathological hallmarks: senile plaques composed of amyloid β ($A\beta$) peptides, intracellular neurofibrillary tangles, and neuronal loss.

The loss of neurons and synapses spreads to the hippocampus, entorhinal cortex, and frontal cortex, all of which play important roles in reference and working memory [1, 2]. In particular, the hippocampus is critical for learning and memory as well as mood regulation, and adult neurogenesis is necessary for its normal function [3, 4]. Adult hippocampal neurogenesis is known to contribute to the processing and the storage of new information [5, 6]. In AD brains the pathophysiological environment could have adverse effects on neurogenesis [7]. While memory deficits observed in AD could be linked to alterations in hippocampal neurogenesis [8, 9] we still need to actively investigate how neurogenesis is

* Correspondence: fbartolome.imas12@h12o.es; carroeva@h12o.es

†Equal contributors

¹Group of Neurodegenerative Diseases, Hospital 12 de Octubre Research Institute (imas12), 28041 Madrid, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

linked to cognitive function and whether stimulating regenerative mechanisms in the brain could restore or prevent further deterioration of cognition during the disease process. During the process of synaptic strengthening and memory formation a variety of molecular mechanisms are activated. The cyclic adenosine monophosphate (cAMP)/cAMP-response element binding protein (CREB) pathway may regulate the transcription of genes controlling these processes. Many neurodegenerative diseases are associated with aberrant cyclic nucleotide signalling related to phosphodiesterase (PDE) expression. PDEs are key enzymes in the cAMP signalling cascade. In AD brains, changes in cAMP-specific PDE mRNA expression were detected [10, 11]. PDE7 inhibition has been implicated in inflammation and neurodegenerative disorders [12, 13]. Peripheral administration of S14, a small heterocyclic molecule able to inhibit the cAMP-specific PDE7, produced anxiolytic-like effects, restored visual short-term memory, and decreased different pathological hallmarks in brains of APP/PS1 mice [14]. S14 treatment also induced *in vitro* and *in vivo* proliferation of neural stem cells, promoting their differentiation toward a dopaminergic phenotype in the substantia nigra of hemiparkinsonian rats [15]. More recently, the PDE7 inhibitor showed a significant increase in newly generated neurons in the olfactory bulb and the hippocampus of adult rats [16]. While PDE inhibitors have demonstrated neurotrophic, neuroprotective, and immunomodulatory potencies in AD models, little is known about the role of PDE7 in hippocampal neurogenesis in AD and its effects on learning and memory.

Through activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator α (PGC-1 α) and regulating p62 degradation, the cAMP/CREB pathway may also control mitochondrial dynamics and autophagy, respectively [17–21]. Mitochondria are important organelles in cells and more so in neurons since these demand high amounts of energy for almost all cellular processes including cell survival and death, calcium homeostasis regulation, synaptic plasticity, and neurotransmitter synthesis [22]. Mitochondrial dysfunction has been further demonstrated in the pathogenesis of neurodegenerative disorders [23–25] but not much is known about the interaction of PDE inhibition and mitochondrial dynamics in neurodegeneration.

In this study, we evaluated the effects of oral administration of S14 in APP/PS1 mice. Our results demonstrated that S14 rescued memory deficits and increased hippocampal neurogenesis mediated by upregulation of the pCREB signalling pathway. Additionally, we reported that S14 treatment restored the A β -induced impairments in mitochondrial dynamics in APP/PS1 mice and in the human neuroblastoma SH-SY5Y cells co-exposed to A β .

Methods

PDE inhibitor S14

S14 was synthesized in CIB-CSIC following previously described procedures [26]. The compound was diluted in 0.5% w/v sodium carboxyl methyl cellulose (Na-CMC) and 0.1% v/v Tween 80 in water suspension. Pharmacokinetic data for S14 showing a brain to plasma ratio oral bioavailability of 0.2 and the effective dose for experiments of this compound after oral administration calculated through evaluation of brain and plasma levels of S14 have been previously reported [14].

Animal experiments

Male double transgenic APP/PS1 mice (6 months old), a cross between Tg2576 (overexpressing human APP695) and mutant PS1 (M146 L), were used from our inbred colony (Instituto de Investigacion Hospital 12 de Octubre). Age-matched mice not expressing the transgene were used as wild-type controls. The PDE7 inhibitor S14 was orally administered in a 0.5% w/v sodium carboxyl methyl cellulose (Na-CMC) and 0.1% v/v Tween 80 in water suspension. For testing the effects of oral chronic treatment on memory and neurogenesis, S14 (15 mg/kg) or vehicle was given once per day for 5 weeks. At the end of treatment, animals were deeply anaesthetised and perfused transcardially either with saline for biochemical analysis, or 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4, for immunohistochemical analysis. All animals were handled and cared for according to the Council Directive 2010/63/UE of 22 September 2010.

Measurement of learning and memory

Behavioural tests were performed 28 days after oral drug administration following protocol A (Fig. 1a). An object recognition test was performed as described previously [27]. During this trial mice were placed individually in the open field in the presence of a familiar object, and the time spent exploring this object was measured. During a 10-min retention trial (second trial), which was performed 3 h later, a novel object was placed together with the familiar object in the open field. The time the animal spent exploring the two objects was recorded. The recognition index, defined as the ratio of the time spent exploring the novel object over the time spent exploring both objects, was used to measure non-spatial memory. Trials were recorded and tracked using the Smart Video Tracking System (Panlab). Spatial memory was tested using a Morris water maze for 4 consecutive days, carrying out four trials of memory training each day. Mice were allowed 60 s to reach the platform on the opposite side of the channel. Mice were allowed to stay on the platform for 15 s before being removed from the water. The latencies were determined by measuring the time to reach the platform. Twenty-four hours after

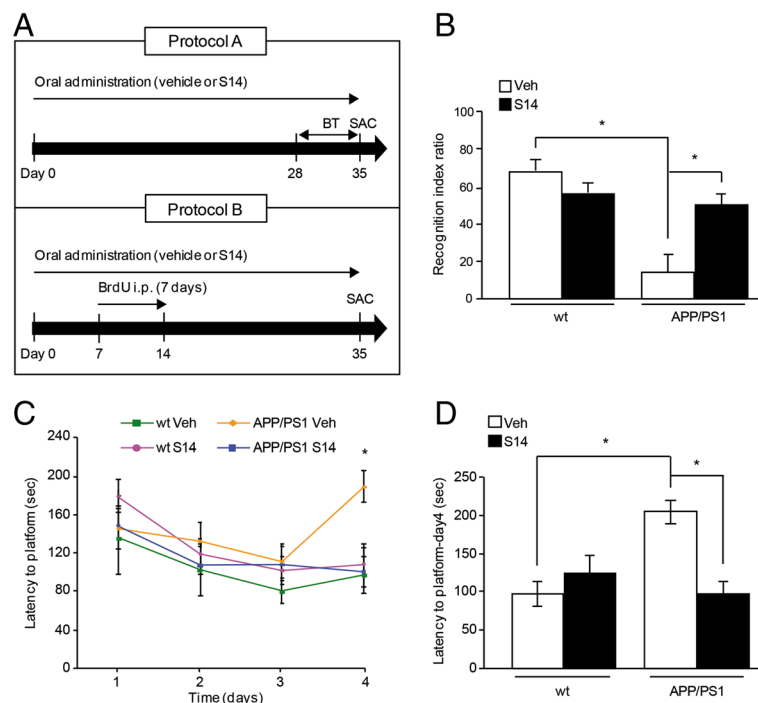


Fig. 1 Behavioural performance of APP/PS1 and wild-type (wt) mice after oral treatment with S14. **a** Protocol A: treatment schedule for memory testing. Behavioural tests (BT) were carried out on days 28–35. S14 or vehicle (0.5% w/v Na-CMC and 0.1% v/v Tween 80 in water suspension) were orally administered once per day for 5 weeks until the end of the tests (day 35) when the animals were sacrificed (SAC). Protocol B: treatment schedule for neurogenesis testing. 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) or saline was injected intraperitoneally (i.p.) on days 7–14. S14 or vehicle was orally administered once per day for 5 weeks until the end of the treatment (day 35) when the animals were sacrificed (SAC). **b** In the novel-object recognition test, APP/PS1 mice showed a significant decline in performance. In APP/PS1 mice orally treated with S14 for 5 weeks, the ratio exploring the novel object was enhanced. Data are expressed as mean \pm SEM; $n = 9$ –13 mice/group; $*p < 0.05$. **c** APP/PS1 mice exhibited impaired spatial memory in the Morris water maze test. **d** Latency to reach the platform on the last day of training was higher in APP/PS1 mice. S14 treatment restored the spatial memory in APP/PS1 mice since latency to reach the platform was similar to wild-type mice. Data are expressed as mean \pm SEM; $n = 9$ –13 mice/group; $*p < 0.05$. Statistical significance was assessed by two-way ANOVA followed by Fisher's post-hoc test for multiple comparisons. Veh vehicle

the final trial, the platform was removed, and the mice were given probe trials to test their memory of the hidden platform. Trials were recorded and tracked using the Smart Video Tracking System (Panlab).

Evaluation of neurogenesis

Neurogenic effects of orally administered S14 were evaluated after 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU; 50 mg/kg) intraperitoneal injection once a day for 7 days, following protocol B (Fig. 1a). On day 35, 21 days after the last BrdU injection, the mice were anaesthetized with isoflurane and perfused transcardially with 4% PFA. Fixed brains were cut on a vibratome (Leica Microsystems) at 40 μ m, and tissue sections were collected in cold PB 0.1 M, and incubated overnight with primary antibodies at 4 $^{\circ}$ C. All primary antibodies were diluted in PB 0.1 M containing 0.5% bovine serum albumin and 0.5% Triton X-100. The following primary antibodies were used: rat monoclonal anti-BrdU (1:20,000; Hybridoma Bank), goat polyclonal anti-doublecortin (DCX; 1:500; Santa Cruz

Biotechnology), and mouse monoclonal anti-neuronal nuclei (NeuN; 1:500; Millipore). After overnight incubation, primary antibody staining was revealed using the avidin-biotin complex method (VECTASTAIN Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) or fluorescence-conjugated secondary antibodies from Molecular Probes. To estimate the total number of BrdU⁺ cells in the brain, we performed 3,3'-diaminobenzidine (DAB) staining for BrdU on every sixth brain section. The number of BrdU⁺ cells in the granule cell of the dentate gyrus was counted using fluorescence microscopy (Zeiss microscope) at a magnification of 40 \times to estimate the total number of BrdU⁺ cells in the entire dentate gyrus. Based on a modified stereological method [28], BrdU⁺ were counted in one of every six sections from rostral (2 mm from the bregma) to caudal (–4.3 mm from the bregma). To determine the fate of dividing cells, 100–150 BrdU⁺ cells across 4–6 sections per mouse were analysed by fluorescence microscopy co-localizing with NeuN (NeuN⁺). The number of

double-positive cells was expressed as a percentage of BrdU⁺ cells.

cAMP assay

Measurement of cAMP levels was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the manufacturer's instructions (Arbor Assays) in brain tissue samples from APP/PS1 and wild-type mice.

Immunoblot analysis

Proteins were isolated from brain tissue or cell cultures by standard methods. Briefly, brain tissues or cell lysates were homogenized in lysis buffer NP-40 (50 mM Tris-base, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM EDTA) containing a mixture of protease and phosphatase inhibitors (Roche Applied Science) and centrifuged for 15 min at 10,000 rpm at 4 °C. The supernatants were collected, and the total protein concentrations were measured by BCA assay (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA); proteins from each sample were loaded in a precast 4–20% Tris-Glycine gels (Novex) and transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Bio-Rad). Primary antibodies used were: rabbit polyclonal anti-pCREB (1:500, Millipore), rabbit polyclonal anti-CREB (1:1000, Cell Signalling Technology), mouse anti-ATPasa β (1:1000, Abcam), rabbit anti-PGC-1 α (1:200, Santa Cruz), mouse anti-Mitofusin1 (Mfn1; 1:1000, Abcam), mouse anti-Mitofusin2 (Mfn2; 1:1000, Abcam), mouse anti- β actin horseradish peroxidase (HRP; 1:25,000, Abcam), mouse anti-mitochondrial dynamin-like GTPase (OPA1; 1:1000, Novus Biological), rabbit anti-Dynamin-related protein 1 (Drp1; 1:1000, Cell Signalling Technology), rabbit anti-p62/SQSTM1 (1:20,000, Abcam), and rabbit anti-light chain 3 (LC3; 1:1000, Novus Biological). Secondary HRP-conjugated goat anti-mouse (1:5000, Sigma) and goat anti-rabbit (1:5000, Life Technologies) were used. Immunoreactive bands were visualized by enhanced chemiluminescence (ECL; Pierce) and scanned on an ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare).

Cell cultures

Human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells were purchased from the European Collection of Cell Cultures (Health Protection Agency, Salisbury, UK) and maintained as previously described [29]. Unless otherwise stated, SH-SY5Y cells were seeded at a density of 4×10^4 cells/cm² and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) and 2 mM L-glutamine at 37 °C and 5% CO₂. Cultures were incubated in fresh medium with or without S14 (15 μ M), and alone or in combination with A β ₄₂ (1 μ M). S14 was previously dissolved in dimethyl

sulfoxide (DMSO) and then diluted in a sterile culture medium, as reported previously [30]. A β ₄₂ stock was previously dissolved in acetic acid 0.1 M. Oligomeric A β ₄₂ was prepared by incubating a volume of stock solution in DMEM at 4 °C for 24 h prior to addition to the cell cultures as previously described [31].

Primary cortical neuronal cultures

Pregnant Wistar rats (3–5 months) were obtained from the inbred colony of the Research Institute, Hospital Doce de Octubre, Madrid, Spain. Primary cortical neuronal cultures were prepared from rat embryos (E15–16) based on methods previously described [32], and 4×10^5 cells per well were plated on poly-L-lysine-coated coverslips in six-well plates. Cells were maintained at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere in Neurobasal A medium (Gibco) containing 2 mM L-glutamine, and 10% B27 Supplement (Invitrogen). Nine days after cell culture preparation, cortical neurons were treated with or without S14 (15 μ M), alone or in combination with oligomerised A β ₄₂ (1 μ M). All live cell imaging experiments were performed between days 10 and 14 in culture. All animals were handled and cared for according to the Council Directive 2010/63/UE of 22 September 2010.

Mitochondrial mass assessment

To measure mitochondrial mass (mitochondrial volume as a percentage of cell volume in living cells) 40 min before the experiment, SH-SY5Y cells were loaded with Cell Trace Calcein-AM (Invitrogen) to visualise the whole cell volume and tetramethylrhodamine methylester (TMRM) to visualise the mitochondria inside each cell. High-resolution Z-stacks were acquired for approximately 15 cells per group using a confocal Zeiss 510 microscope equipped with a META detection system and a 63 \times oil immersion objective with an excitation/emission of 495/515 nm for calcein and 560/580 nm for TMRM. As TMRM is mitochondrial membrane potential dependent, the setting to detect red fluorescence was reduced to localise mitochondria still not degraded. Image analysis was carried out using *Volocity* software (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) to measure the mitochondrial and cytosolic volume.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed using a two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's post-hoc test for multiple comparisons. All calculations were made using GraphPad Prism6 software. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Oral S14 treatment restored memory disturbances in APP/PS1 mice

Memory functioning was assessed in 6-month-old transgenic APP/PS1 and wild-type mice using two different behavioural tests. In the object recognition test, recognition index was significantly impaired in APP/PS1 mice compared to wild-type mice ($p < 0.05$; Fig. 1b). S14-treated APP/PS1 mice showed restoration of the impaired cognition similar to the wild-type group. Note that S14 administration in wild-type mice did not significantly alter behaviour. In the Morris water maze paradigm, APP/PS1 mice displayed significant spatial learning impairment compared with their littermate controls ($p < 0.05$; Fig. 1c), while S14-treated APP/PS1 mice were completely rescued from this impairment. Mice treated with this drug candidate displayed reductions in the latency to reach the hidden platform that was similar to those of wild-type controls during the probe test, suggesting that S14 induced an improvement in spatial memory (Fig. 1c). To further elucidate these differences, an additional analysis was conducted, comparing the latencies to reach the platform on the last day of training (Fig. 1d), demonstrating a significant overall difference among the groups ($p < 0.05$), with complete reversal of the memory impairment in S14-treated APP/PS1 mice (compared to wild-type mice).

Oral S14 treatment enhanced hippocampal cell proliferation and neurogenesis in APP/PS1 mice

The association between cognitive deterioration and decline in neurogenesis during aging, coupled with disruption in neurogenesis and cognitive dysfunction in AD mouse models, suggests that enhancing neurogenesis may be a feasible therapeutic approach. Thus, we explored the effects of S14 on hippocampal neurogenesis in mice sacrificed 21 days after the last BrdU injection. Positive BrdU cells (BrdU⁺) were predominantly localised in the sub-granular cell layer and, to a less extent, in the hilus (Fig. 2a). S14 treatment for 5 weeks significantly increased the number of BrdU⁺ cells in the dentate gyrus in APP/PS1 mice when compared with vehicle-treated mice ($p < 0.01$; Fig. 2b). Then the specific rate of new-born neurons in adult mice was evaluated in brain sections from S14- and vehicle-treated wild-type and APP/PS1 mice processed for dual-labelling immunohistochemistry with antibodies against BrdU and the neuronal-specific marker NeuN (Fig. 2c, d). Co-localisation analysis revealed that the number of BrdU⁺ neurons was significantly higher in both groups of S14-treated mice. Although the neurogenesis rate was found to be increased even in the wild-type group ($p < 0.05$), the neurogenesis was much higher in the APP/PS1-treated mice ($p < 0.01$; Fig. 2d).

S14 treatment activates the hippocampal cAMP/pCREB pathway

It is known PDE7 inhibitors activate the cAMP-dependent pathway [14, 33]; therefore, we examined the levels of cAMP and CREB activation (phospho-CREB, or pCREB) in the hippocampus from the different mice groups to probe the target engagement of S14 and the link with the observed higher rate of neurogenesis. We found that S14 treatment increased cAMP accumulation in both wild-type ($p < 0.05$; Fig. 3a) and APP/PS1 mice ($p < 0.01$; Fig. 3a), indicating that this compound reached both the target and the brain. A significant decrease in the phosphorylation status of CREB was found in the hippocampus of APP/PS1 mice compared to the wild-type group, showing no changes in the total CREB protein levels ($p < 0.05$; Fig. 3b, c). Conversely, S14 treatment increased the phosphorylation status of CREB in the hippocampus of both groups compared to vehicle-treated mice (Fig. 3b, c) showing no changes in the total CREB protein levels. As pCREB may be considered a surrogate biomarker of cAMP increasing, the enhancement of pCREB in the treated animals confirms that oral administration of S14 targets the cAMP-specific PDE7 pathway in the hippocampus.

S14 treatment increases the PGC-1 α levels and the mitochondrial biogenesis in the hippocampus of APP/PS1 mice and in A β -treated SH-SY5Y cells

PGC-1 α is a downstream effector of CREB activation. The levels of PGC-1 α in the hippocampus of APP/PS1 mice tended to be reduced when compared to wild-type mice, but the difference was not statistically significant (Fig. 4a). S14 treatment, however, induced an increase in PGC-1 α levels in APP/PS1 mice (Fig. 4a). PGC-1 α is a master regulator of mitochondrial biogenesis and dynamics; therefore, we investigated the effect of S14 treatment on the mitochondrial biogenesis in wild-type and APP/PS1 mice in the hippocampus. To verify whether PGC-1 α down- and upregulation by A β and S14, respectively, could cause changes in mitochondrial mass, we estimated the amount of total mitochondrial mass by analysing the levels of the representative mitochondrial protein complex V β subunit (CxV β) using immunoblotting (Fig. 4b). Quantified Western blots revealed a significantly reduced amount of mitochondrial mass in APP/PS1 mice compared to the wild-type group ($p < 0.05$; Fig. 4b). S14 treatment restored the mitochondrial mass in APP/PS1 mice with no effects on wild-type mice ($p < 0.05$; Fig. 4b). Further evaluation of the effect of S14 on the mitochondrial mass was carried out in live cells using the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line and rat primary cortical neurons. Cells were simultaneously exposed to 1 μ M oligomeric A β ₄₂ for 24 h and mitochondrial mass was evaluated by confocal imaging (Fig. 4c, d, and Additional file 1: Figure S1). Imaging analysis revealed a reduced amount of

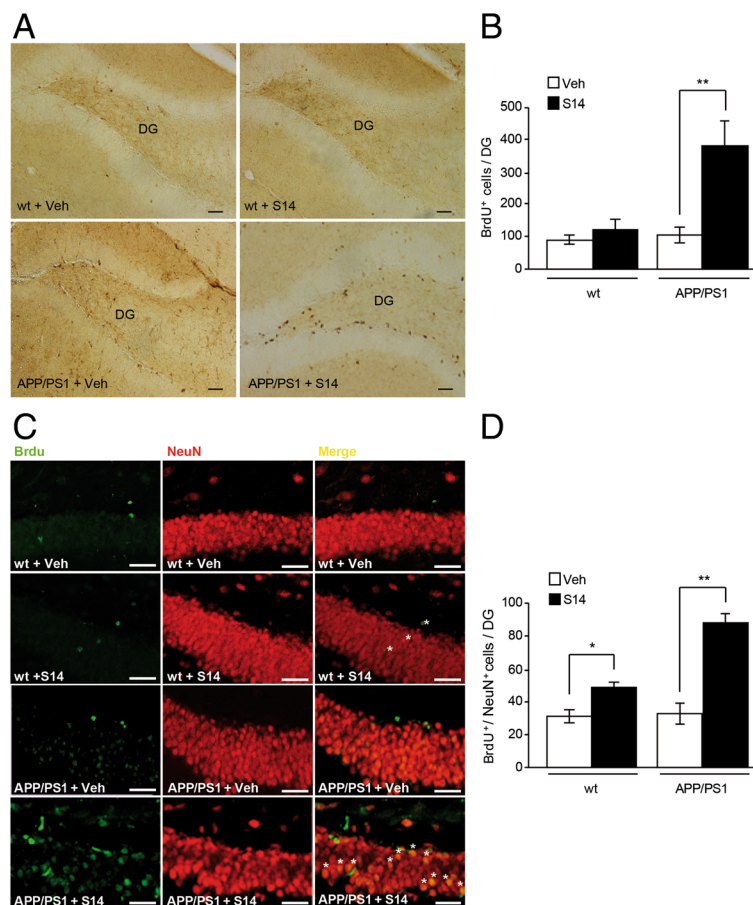


Fig. 2 S14 treatment enhances hippocampal cell proliferation and neurogenesis in APP/PS1 mice. **a** Representative images showing 5-bromo-2'-deoxyuridine-positive (BrdU⁺) cells in the dentate gyrus (DG) in wild-type (wt) and APP/PS1 mice. Scale bar = 20 μm. **b** Quantification of BrdU⁺ cells showing higher cell proliferation in S14-treated APP/PS1 mice compared to vehicle (Veh)-treated mice. Data are expressed as mean ± SEM; *n* = 9–13 mice/group; ***p* < 0.01. **c** Representative images showing BrdU⁺/neuronal nuclei (NeuN)⁺ cells in the dentate gyrus in wild-type and APP/PS1 mice. Scale bar = 20 μm. **d** Quantification of BrdU⁺/NeuN⁺ cells showing a significant increase in neurogenesis in both S14-treated mice groups compared to vehicle-treated mice. Data are expressed as mean ± SEM; *n* = 9–13 mice/group; **p* < 0.05; ***p* < 0.01. Statistical significance was assessed by two-way ANOVA followed by Fisher's post-hoc test for multiple comparisons

mitochondrial volume from the whole cell volume in Aβ₄₂-exposed cells compared to untreated cells (*p* < 0.01; Fig. 4d) in both SH-SY5Y cells and primary neuronal cultures. S14 treatment on Aβ₄₂-exposed cells avoided this effect, showing no changes on those cells not exposed (*p* < 0.05; Fig. 4d and Additional file 1: Figure S1). Immunoblotting experiments on SH-SY5Y cells confirmed a reduced number of mitochondria, estimated by analysis of Cxvβ levels, in SH-SY5Y cells exposed to oligomeric Aβ₄₂ compared to untreated cells, and this effect was restored upon S14 treatment (*p* < 0.0001; Fig. 4e). Additionally, PGC-1α levels were found to be reduced in cells exposed to Aβ₄₂ compared to untreated cells (*p* < 0.01), whereas co-administration with S14 completely abolished the Aβ₄₂-induced effect (*p* < 0.001; Fig. 4f). In agreement with the above results, the PDE7 inhibitor S14 restored the damaged

mitochondrial biogenesis due to Aβ overload as demonstrated in the APP/PS1 mice and SH-SY5Y cells.

S14 treatment modulates Aβ-induced effects on mitochondrial fusion and fission processes

A combination of mitochondrial biogenesis, mitochondrial fusion/fission, and mitochondrial degradation is reflected in the amount and distribution of mitochondria in cells. As we have demonstrated, S14 can rescue the disrupted rate of mitochondrial biogenesis by Aβ overload we also answered whether PDE7 inhibition could induce changes in the fusion/fission mitochondrial quality control processes. Mitofusins 1 and 2 (Mfn1 and Mfn2, respectively) in the outer mitochondrial membrane and optic atrophy 1 (Opa1) in the inner mitochondrial membrane regulate the fusion process, and the dynamin-related

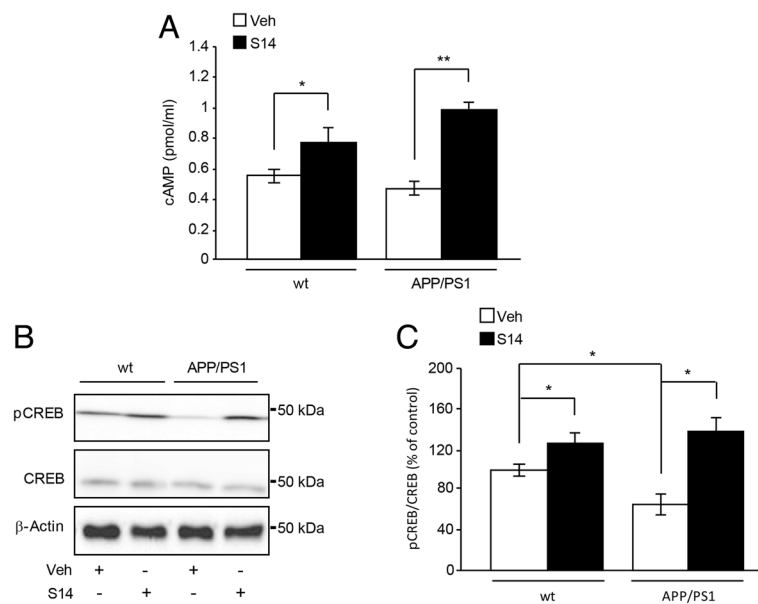


Fig. 3 cAMP and pCREB levels in the hippocampus are increased after PDE7 inhibition in APP/PS1 and wild-type mice. **a** Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) levels in the hippocampus of both S14-treated mice groups compared to untreated mice. Data are expressed as mean \pm SEM; $n = 6-7$ mice/group; $*p < 0.05$; $**p < 0.01$. **b,c** Representative immunoblots and quantified levels of phosphorylated (p) and total cAMP-response element binding (CREB) protein. pCREB levels were reduced in the hippocampus of APP/PS1 mice, whereas S14 treatment increased pCREB expression in wild-type (wt) and APP/PS1 mice compared with vehicle-treated groups. Levels of total CREB remained unchanged. Data are expressed as mean \pm SEM; $n = 6-7$ mice/group; $*p < 0.05$; $**p < 0.01$. Statistical significance was assessed by two-way ANOVA followed by Fisher's post-hoc test for multiple comparisons. Veh vehicle

protein 1 (Drp1) regulates the mitochondrial fission. A reduction in Mfn1, Mfn2, and Opa1 levels, as well as increased levels in Drp1, could indicate an increased rate of mitochondrial fission degradation. SH-SY5Y cells exposed to oligomeric A β_{42} showed reduced mitochondrial fusion proteins levels (Mfn1, Mfn2, and Opa1) and increased levels of the mitochondrial fission protein Drp1 (Fig. 5a, b). S14 treatment on SH-SY5Y cells exposed to A β_{42} rescued the levels of these proteins to values similar to those of the untreated cells (Fig. 5a, b). Upon mitochondrial damage, the outer mitochondrial membrane mitofusins are substrates for ubiquitination, increasing the mitochondrial fission rate. We therefore used the ubiquitination of Mfn1 and Mfn2 as a readout for activation of mitophagy in the hippocampus of the APP/PS1 mice. The ubiquitination pattern of mitofusins in transgenic mice was enhanced compared to wild-type mice (Fig. 5c). Accordingly, the levels of Opa1 were reduced and the Drp1 protein levels were found to be increased in APP/PS1 mice ($p < 0.05$; Fig. 5d, e). S14 treatment reduced the ubiquitination of Mfn1 and Mfn2 and significantly restored the Opa1 and Drp1 protein levels restoring them to wild-type values ($p < 0.05$; Fig. 5c-e). In summary, the PDE7 inhibitor S14 could rescue the mitochondrial fusion/fission balance previously impaired upon A β overload exposure.

S14 treatment modulates A β -induced effects on mitophagy

Ubiquitination of mitochondrial profusion proteins and increased levels of mitochondrial profusion proteins may result in autophagic clearance of damaged mitochondria. Since the PDE7 inhibitor S14 rescued the A β -induced mitochondrial fusion/fission imbalance, we further investigate its effect on subsequent mitophagy. During induction of autophagy, LC3-I is lipidated on its mature form, LC3-II, which localizes to the autophagosome as it engulfs the substrate for degradation [34]. Immunoblotting revealed that A β_{42} exposure resulted in elevated LC3-II levels compared to untreated cells ($p < 0.01$; Fig. 6a, b). A similar effect was observed in APP/PS1 mice compared to the wild-type group ($p < 0.05$; Fig. 6c, d). S14 treatment in cells and APP/PS1 mice restored the LC3-II levels to similar values to untreated cells ($p < 0.0001$), and wild-type mice ($p < 0.001$), respectively. Another protein, p62, anchors both the exposed LC3-II in the phagophore (preformed autophagosome) and the damaged mitochondria prompted to be degraded; therefore, increased levels of p62 are also distinctive of autophagy. Immunoblotting carried out in SH-SY5Y cells showed that A β_{42} exposure induced a significant increase in p62 levels compared to untreated cells ($p < 0.001$; Fig. 6a, b), and a similar effect was

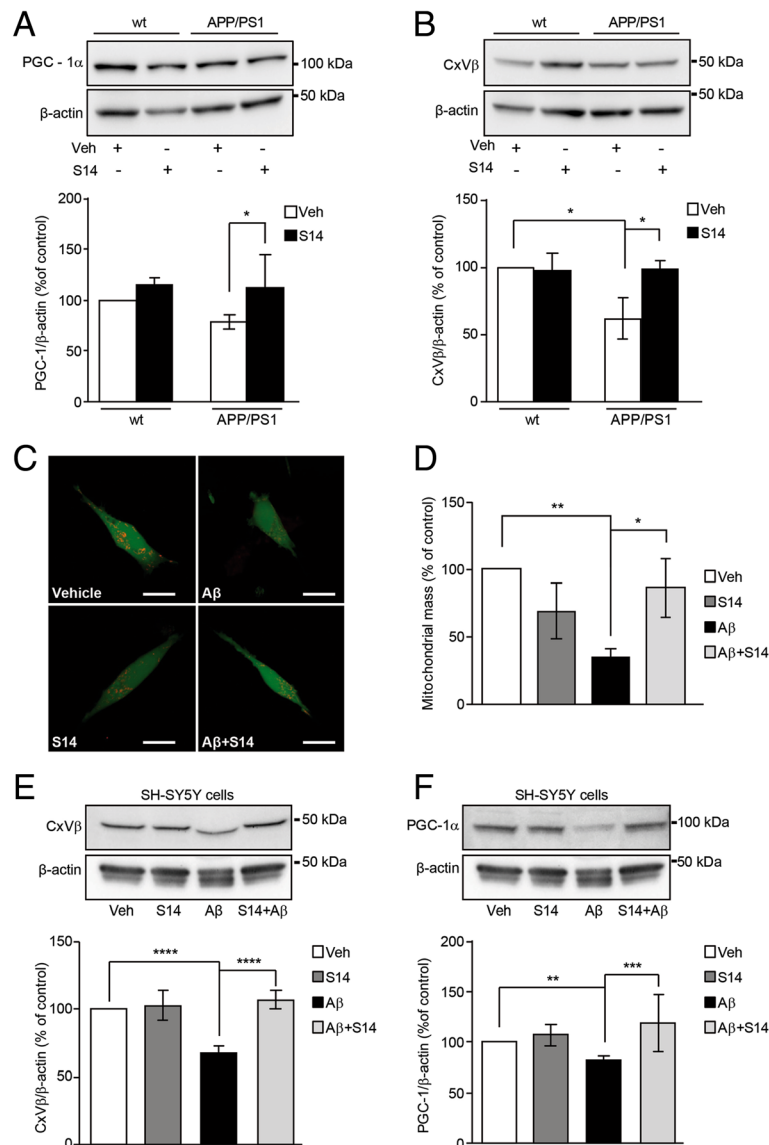


Fig. 4 Amyloid β (Aβ)-induced reduction on mitochondrial biogenesis is restored after S14 treatment. **a** Upper panel shows representative Western blot bands, and the lower panel shows increased peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator α (PGC-1α) expression in the hippocampus of S14-treated APP/PS1 mice compared with the vehicle (Veh)-treated group ($n = 5-7$ mice per group; $*p < 0.05$). **b** Representative immunoblots (upper panels) and protein level quantification detected by Western blot (lower panel) showing a significant reduction in the expression of complex V β subunit (CxVβ) in the hippocampus of S14-treated APP/PS1 mice compared with the vehicle-treated group ($n = 5-7$ mice per group; $*p < 0.05$). When transgenic mice were treated with S14, CxVβ levels were recovered. Data are expressed as mean \pm SEM. **c** Mitochondrial mass was measured in live cells using the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line simultaneously exposed to 1 μ M oligomeric Aβ₄₂ for 24 h and evaluated by confocal imaging. **d** Imaging analysis revealed a reduced amount of mitochondrial volume from the whole cell volume in Aβ₄₂-exposed cells compared to untreated cells. Treatment with 15 μ M S14 on Aβ₄₂-exposed cells obliterated this effect, showing no changes on the unexposed cells. Data are expressed as mean \pm SEM; $n = 4$; $*p < 0.05$; $**p < 0.01$. **e,f** Representative immunoblots (upper panel) and quantification of the measures detected by Western blot (lower panel) showing a significant reduction in the CxVβ levels (**e**) and PGC-1α (**f**) in SH-SY5Y cells exposed to 1 μ M oligomeric Aβ₄₂. When cells were co-treated with 15 μ M S14, CxVβ (**e**) and PGC-1α (**f**) expression were recovered. Data are expressed as mean \pm SEM; $n = 4$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; $****p < 0.0001$. Statistical significance was assessed by two-way ANOVA followed by Fisher's post-hoc test for multiple comparisons. wt wild-type

found in the APP/PS1 mice compared to wild-type mice ($p < 0.05$; Fig. 6c, d). S14 treated cells co-exposed to Aβ₄₂ exhibited similar levels of p62 to those from untreated

cells ($p < 0.001$; Fig. 6a, b). PDE7 inhibitor treatment in mice induced a high reduction in the p62 levels in both wild-type and APP/PS1 mice, but the reduction in this

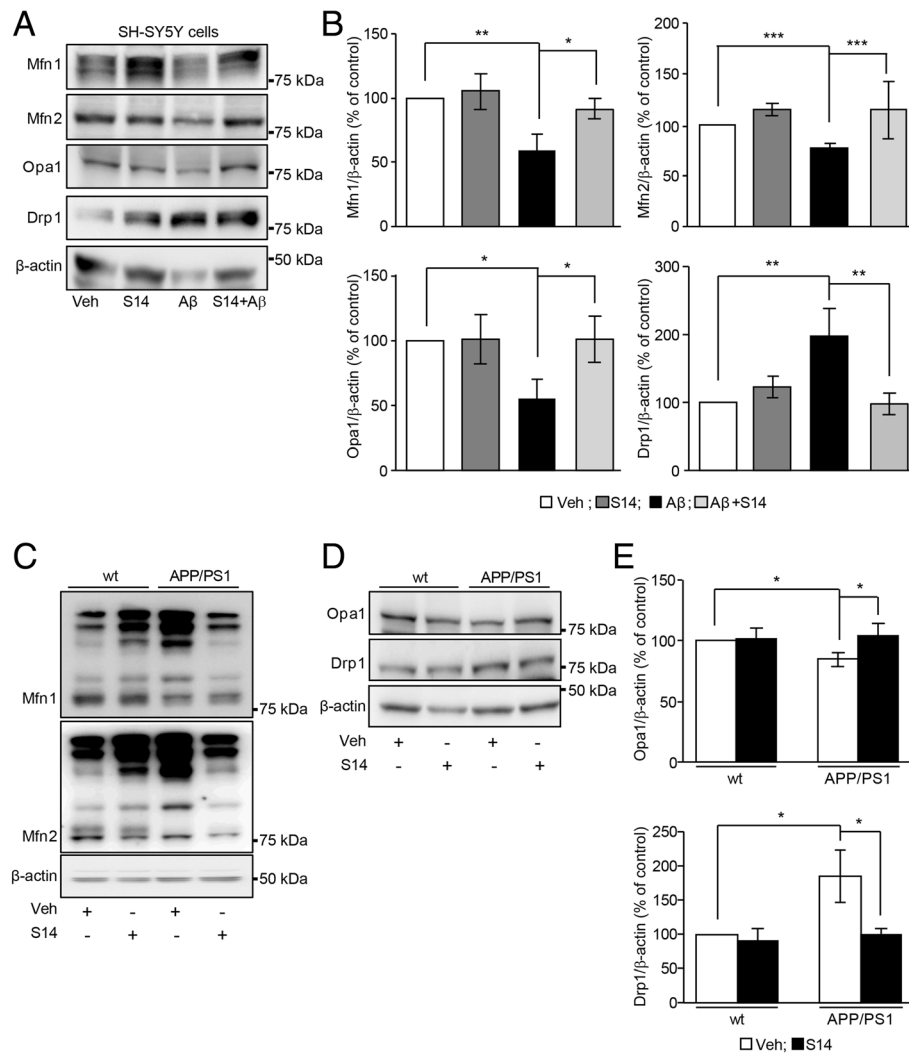


Fig. 5 PDE7 inhibition modulates amyloid β ($A\beta$)-induced effects on mitochondrial fission, and fusion protein levels. **a** Immunoblots and **b** densitometric analysis of mitochondrial fission and fusion proteins in SH-SY5Y cells exposed to 1 μ M oligomeric $A\beta_{42}$. The fusion proteins mitofusin1 (Mfn1), mitofusin2 (Mfn2), and optic atrophy 1 (Opa1) were reduced in SH-SY5Y cells exposed to 1 μ M oligomeric $A\beta_{42}$. When cells were co-treated with S14, the expression of all these fusion proteins was recovered. Dynamin-related protein 1 (Drp1) levels were significantly increased in $A\beta_{42}$ -treated SH-SY5Y cells, and those levels were restored after co-administration of 15 μ M S14. Data are expressed as mean \pm SEM; $n = 5-7$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. **c** In the transgenic APP/PS1 mice, the ubiquitination pattern of mitofusins was enhanced compared to wild-type (wt) mice and S14 treatment abolished this ubiquitination. Whereas **d** Opa1 levels were reduced, **e** Drp1 expression was increased in the hippocampus of APP/PS1 and wild-type mice. S14 treatment restored these protein levels to those observed in wild-type mice. Data are expressed as mean \pm SEM; $n = 3-6$ mice; * $p < 0.05$. Statistical significance was assessed by two-way ANOVA followed by Fisher's post-hoc test for multiple comparisons. Veh vehicle

was much higher in APP/PS1 mice whose p62 levels in the hippocampus were found to be 1.5-fold higher than in wild-type mice. This could be related to the increased cAMP observed in both wild-type and APP/PS1 mice since cAMP could upregulate p62 degradation ($p < 0.001$; Fig. 6c, d). In summary, the above results could indicate that S14 treatment abolished the $A\beta$ -induced mitophagy by reducing the p62 levels and LC3 lipidation.

PDE7 inhibition upregulates mitochondrial biogenesis and mitophagy in the cerebral cortex from APP/PS1 mice
 Recognition memory control is typically attributed to the hippocampus, but the cerebral cortex is also controlling this process. Therefore, we investigated if S14 could interfere in mitochondrial dynamic alterations in the same way as it is interfering in the hippocampus. We confirmed that S14 also induced a twofold increase in cAMP levels in cortical samples from APP/PS1 (untreated APP/PS1 = 0.61

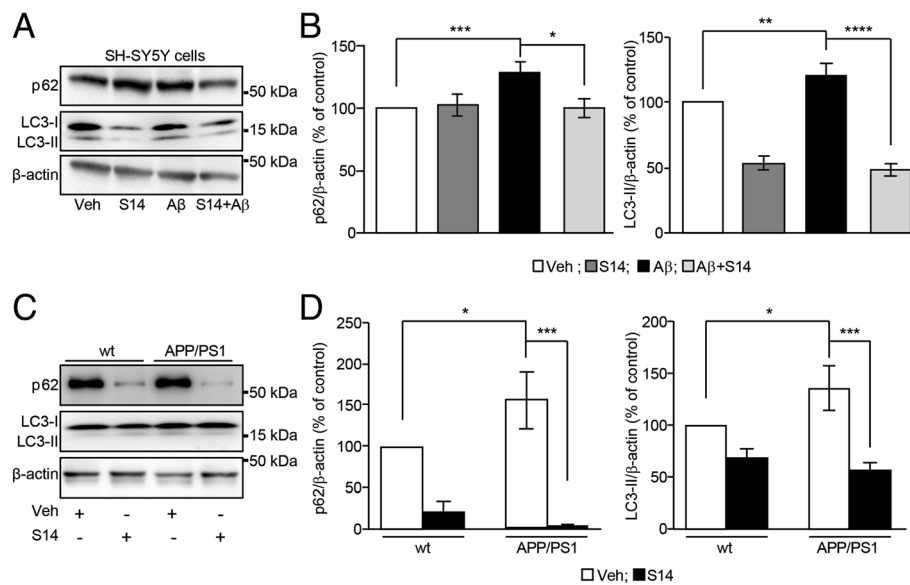


Fig. 6 S14 treatment modulates amyloid β ($A\beta$)-induced effects on autophagic markers. **a** Representative Western blot and **b** estimated p62 and light chain 3 (LC3)-II protein levels in SH-SY5Y cells. Protein level analysis revealed a significant increase in p62 and LC3-II levels in SH-SY5Y cells exposed to 1 μ M oligomeric $A\beta_{42}$. When cells were co-treated with 15 μ M S14, p62 and LC3-II levels were recovered. Data are expressed as mean \pm SEM; $n = 6$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; $****p < 0.0001$. **c** Representative Western blot and **d** estimated p62 and LC3-II protein levels in the hippocampus of APP/PS1 and wild-type (wt) mice. p62 and LC3-II protein levels were found increased in the hippocampus of APP/PS1 mice and S14 treatment was able to restore both to those observed in wild-type mice. Data are expressed as mean \pm SEM; $n = 3$ –7 mice; $*p < 0.05$; $***p < 0.001$. Statistical significance was assessed by two-way ANOVA followed by Fisher's post-hoc test for multiple comparisons. Veh vehicle

pmol/ml; APP/PS1 + S14 = 1.13 pmol/ml; $n = 4$ mice/group). The analysis of CxV β protein levels revealed reduced mitochondrial mass in cortical lysates from APP/PS1 mice compared to wild-type mice (Fig. 7a). The reduction in the mitochondrial mass in APP/PS1 mice was subsequently related to a reduction in the mitochondrial biogenesis reflected in reduced PGC-1 α levels compared to the wild-type group ($p < 0.05$; Fig. 7b) and imbalances in the mitochondrial fusion/fission events as demonstrated by increased ubiquitination of Mfn1 and Mfn2, reduced levels of Opa1 ($p < 0.01$), and increased levels of Drp1 ($p < 0.05$) in APP/PS1 mice compared to wild-type mice (Fig. 7c–e). S14 treatment did not significantly rescue the reduced mitochondrial mass in the cerebral cortex from APP/PS1 mice; however, the PGC-1 α levels, the ubiquitination pattern of Mfn1 and Mfn2, and the Opa1 and Drp1 levels in APP/PS1 mice were significantly restored to equivalent values to the wild-type group (Fig. 7a–e). Equivalent to the effect observed in hippocampus, S14 treatment significantly reduced the p62 levels in both wild-type and APP/PS1 mice but this reduction was much more significant in APP/PS1 mice whose p62 levels in the cortex were found to be 1.8-fold higher than wild-type mice (Fig. 7f). The LC3-I lipidation to LC3-II was found to be increased in the cortex from APP/PS1 mice ($p < 0.05$) compared to wild-type mice, and S14 treatment attenuated this

effect in APP/PS1 mice (Fig. 7g). The above results may indicate that the PDE7 inhibitor S14 could ameliorate the behavioural impairments induced by $A\beta$ overload in the cerebral cortex of the APP/PS1 mice by interfering in the mitochondrial dynamics.

Discussion

In this study, we investigated the effects of oral administration of the small heterocyclic molecule S14 on the neuronal and cognitive features of AD. We report here that inhibition of PDE7 reversed hippocampal and cortical $A\beta$ -induced memory impairments, restored CREB phosphorylation via increasing intracellular cAMP levels, and increased the hippocampal neurogenesis in transgenic APP/PS1 mice. We also find that co-administration of S14 abolished the $A\beta$ -induced mitochondrial dynamic impairments.

Our results showed that S14 was able to restore learning and memory deficits in APP/PS1 mice as shown by a reduced latency to reach the hidden platform in the Morris water maze. Consistent with our previous studies using intraperitoneal administration [14], oral treatment with S14 also improved non-spatial visual recognition memory measured in the object recognition test. Inhibitors of PDE7 have proven to be effective experimental drugs for exploring cognitive and motor recovery [14, 35–37].

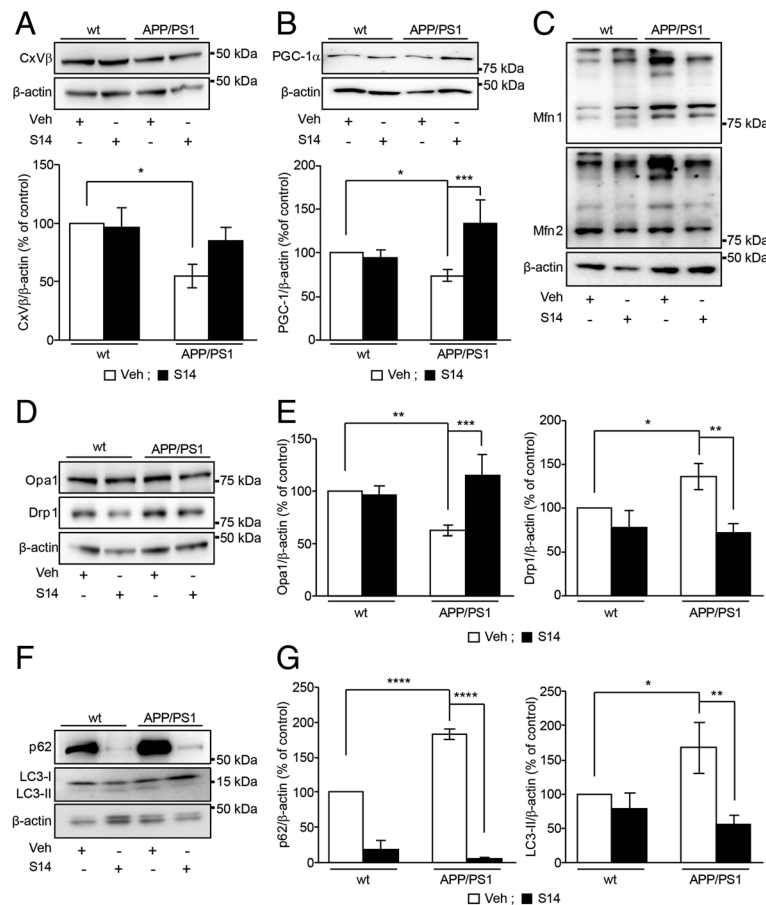


Fig. 7 S14 treatment restores mitochondrial protein levels in the cerebral cortex in APP/PS1 mice. **a** Representative immunoblots (upper panels) and protein level quantification detected by Western blot (lower panel) showing a significant reduction in the complex V β subunit (Cxv β) levels in the cerebral cortex from APP/PS1 mice compared to the wild-type (wt) group. When transgenic mice were treated with S14, Cxv β levels were slightly but not significantly recovered ($n = 3-5$ mice per group; $*p < 0.05$). **b** Representative Western blot bands (upper panel), and quantified levels detected by Western blot (bottom panel) showing a significant reduction in Peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator α (PGC-1 α) levels in the cerebral cortex from APP/PS1 mice compared to the wild-type group. When transgenic mice were treated with S14, PGC-1 α levels were recovered. Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 4-5$ mice per group; $*p < 0.05$; $***p < 0.001$). **c** Ubiquitination pattern of mitofusins in cerebral cortex from mice. S14 treatment restored the observed increased ubiquitination of mitofusin1 (Mfn1) and mitofusin2 (Mfn2) in the APP/PS1 transgenic mice. **d** Representative Western blot and **e** estimated optic atrophy 1 (Opa1) and dynamin-related protein 1 (Drp1) protein levels in the cortex from APP/PS1 and wild-type mice. Opa1 protein levels were found to be reduced and Drp1 levels were found to be increased in APP/PS1 mice. S14 treatment was able to restore both to those observed in wild-type mice. Data are expressed as mean \pm SEM; $n = 3-6$ mice per group; $*p < 0.05$; $***p < 0.001$. **f** Representative Western blot and **g** estimated p62 and light chain 3 (LC3)-II protein levels in the cortex from APP/PS1 and wild-type mice. p62 and LC3-II protein levels were found to be increased in the cerebral cortex from APP/PS1 mice, and S14 treatment was able to restore both to those observed in wild-type mice. Data are expressed as mean \pm SEM; $n = 3-5$ mice per group; $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $****p < 0.0001$. Statistical significance was assessed by two-way ANOVA followed by Fisher's post-hoc test for multiple comparisons. Veh vehicle

We provide several new insights into the mechanisms of S14-enhanced hippocampal neurogenesis and memory in APP/PS1 mice. The hippocampus is a key brain structure for learning and memory and one of the main brain regions to be affected in AD, which arises on the pathological background of A β burden, neurofibrillary tangles, and synaptic and neuronal loss [38]. Although decreased neurogenesis is generally thought to be responsible for learning and memory impairments in AD, it is somewhat controversial whether neurogenesis is

decreased or increased in the context of AD [39–42]. Here, we show that neurogenesis was not significantly different in the dentate gyrus of 6-month-old APP/PS1 mice compared to the wild-type group as assessed by BrdU⁺/NeuN⁺ staining. However, S14 treatment was found to upregulate neurogenesis in the dentate gyrus of these animals; this was much more increased in the transgenic mice. The observed memory improvements in APP/PS1 mice may be related to the subsequent increase in intracellular cAMP and pCREB levels that we

found in the cortex and hippocampus after PDE7 inhibition using S14. CREB is a key regulator of differentiation and maturation in adult neurogenesis [43] and its activation by phosphorylation leads to transcription of memory-associated genes as a hub of pathways and mechanisms activated during the processes of synaptic strengthening and memory formation [44]. Disruption of these mechanisms in AD results in reduced CREB activation and memory impairments [45]. Decreased activation of CREB in our APP/PS1 mice and its re-establishment after chronic oral treatment with S14 in the cortex and hippocampus suggest that the cAMP/CREB cascade may be involved in the protective role of S14 on synaptic strengthening and memory improvement/enhancement/long-term potentiation (LTP) memory, in agreement with new therapeutic strategies based on the use of drugs enhancing CREB activation [46].

Our findings show that S14 treatment rescued the reduced mitochondrial mass in both A β -treated SH-SY5Y cells and APP/PS1 mice. Reduced mitochondrial mass has already been found in brains from AD patients compared to healthy controls in a mouse model of AD and in AD cellular models [47–49]. A reduction in the number of mitochondria could be a consequence of impairments in the mitochondrial biogenesis or enhanced mitochondrial-specific autophagy clearance known as mitophagy. Activation of the cAMP/CREB pathway resulting in the phosphorylation of CREB contributes to enhance the transcription of the PGC-1 α promoter, a key regulator of mitochondrial biogenesis [19, 20]. Our data showed that S14 treatment increased PGC-1 α levels, reversing the A β -mediated reduction in mitochondrial biogenesis. A β -induced decreased mitochondrial biogenesis has been found previously by other authors [50, 51]. Additional studies show that mitochondrial DNA copy number and the expression levels of PGC-1 α were significantly reduced in brains from AD patients and transgenic mouse models of AD, suggesting impaired mitochondrial biogenesis [23, 52–55]. Mitochondria are essential in adult neurogenesis, including having a modulatory function over maturation of adult-born hippocampal neurons [56]. Transcriptional pathways may not only control the expression of neuron-specific genes but may also target mitochondrial biogenesis. In this regard, the transcription factor CREB may fulfil coordinative functions given that its target, PGC-1 α , has been linked with the control of cell maturation in hippocampal neurons [57]. It is reasonable that S14 treatment, by improving neurogenesis in APP/PS1 mice, simultaneously induces mitochondrial biogenesis since mitochondria are the power houses of neurons, providing energy for cytoskeletal remodelling, outgrowth of neuronal processes, growth cone activity, and synaptic activity. The number of mitochondria may also be controlled by mitophagy, a tightly regulated process in which damaged or non-functional mitochondria are separated from the mitochondrial network and prompted

for degradation. We showed that A β treatment shifted the fusion/fission balance towards increased fission. The PDE7 inhibitor S14 restored the A β -reduced levels of the mitochondrial profusion proteins Mfn1, Mfn2, and Opa1, and, conversely, it rescued the A β -increased levels of the fission protein Drp1. A β treatment shifted the fusion/fission balance towards increased fission. A balance between the mitochondrial levels of these fusion/fission proteins is essential to maintain a functional mitochondrial network in the cells. This has been further demonstrated in brains from AD patients and mouse and cellular models of AD related to A β deposition [58, 59]. Based on the A β accumulation effect, our results link PDE7 inhibition and downstream signalling with a restoration of the fusion/fission protein levels. Additionally, Mfn2, whose expression is induced by PGC-1 α , regulates not only the mitochondrial fusion but also mitochondrial biogenesis and mitochondrial function through changes in mitochondrial membrane potential and the expression of OXPHOS subunits [60].

Finally, we have demonstrated PDE7 inhibition abolished the A β -induced mitophagy by reduction in LC3-II and p62 levels previously increased as a consequence of misbalances on mitochondrial fusion/fission events after A β exposure/overload. Mitofusin ubiquitination induces their proteasomal degradation and subsequently reduces the mitofusin levels. This, along with reduced Opa1 and increased Drp1 levels, triggers the split of damaged mitochondria from the mitochondrial network. At the same time, ubiquitination of mitochondrial proteins targets the mitochondria to be engulfed by autophagosome membranes showing increased lipidated LC3 (LC3-II) levels. p62 protein anchors the targeted mitochondria to the autophagosome membranes. Previous work has shown reduced autophagy rates in several disease models by PDE inhibition. In particular, p62 degradation has been found to be increased in several works analysing the effects of antioxidants on autophagy [17, 21]. In these studies, authors reported increased levels of cAMP regulating the increased degradation of p62, thus reducing p62 levels. In 2015, Boland et al. simultaneously inhibited most PDE isoforms targeting the cAMP/CREB pathway by using classical inhibitors of autophagy [61]. They observed that this treatment increased the cAMP in pancreatic cells, increasing the insulin production that was formerly deteriorated [61]. In other work, Hosokawa et al. reported that PDE5 inhibition restored the increased autophagy rates in a muscle weakness mouse model [62]. We can conclude that S14 treatment reduces the previously A β -increased mitophagy rates. It is known that A β induces mitophagy, as has been demonstrated in recent studies [58, 59]. We can speculate that PDE7 inhibition through S14 can regulate the mitochondrial homeostasis by

increasing the cAMP levels, as has been recently reviewed by Di Benedetto et al. [63]. Since mitochondrial dysfunction is involved in many neurodegenerative diseases and aging [64], S14 may slow down pathological events in the neurodegenerative process.

Conclusions

In conclusion, our data provide evidence that PDE7 inhibition improved hippocampal neurogenesis and memory by modulating cAMP/pCREB activity and that these effects may be associated with mitochondrial dynamics regulation. Considering that S14 treatment has been reported to be beneficial for AD [14] and other neurodegenerative disorders such as Parkinson's disease [15, 30, 37], this study suggests that S14 is a very promising disease-modifying drug candidate for the future treatment of neurodegenerative disorders.

Additional file

Additional file 1 Figure S1. A β -induced reduction in mitochondrial biogenesis in neurons is restored after S14 treatment. Mitochondrial mass was carried out in live rat neuronal primary cultures simultaneously exposed to 1 μ M oligomeric A β ₄₂ for 24 h and evaluated by confocal imaging. Representative images showing the mitochondria and the whole cell body with the range of treatments are presented in the left panels. Imaging analysis revealed a reduced amount of mitochondrial volume from the whole cell volume in A β ₄₂-exposed cells compared to untreated cells. Treatment with 15 μ M S14 on A β ₄₂-exposed cells obliterated this effect, showing no changes in the unexposed cells. Statistical significance was assessed by two-way ANOVA followed by Fisher's post-hoc test for multiple comparisons. Data are expressed as mean \pm SEM; $n = 4$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$. (JPEG 1623 kb)

Abbreviations

A β : Amyloid β ; AD: Alzheimer's disease; APP/PS1: APP_{SWE}/PS1_{M146L}; BrdU: 5-Bromo-2'-deoxyuridine; cAMP: Cyclic adenosine monophosphate; CREB: cAMP-response element binding protein; CxV β : Complex V β subunit; DAB: 3,3'-Diaminobenzidine; DCX: Doublecortin; DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium; Drp1: Dynamin-related protein 1; FBS: Fetal bovine serum; HRP: Horseradish peroxidase; LC3: Light chain 3; Mfn1: Mitofusin1; Mfn2: Mitofusin2; NeuN: Neuronal nuclei; Opa1: Optic atrophy 1; PB: Phosphate buffer; PDE: Phosphodiesterase; PFA: Paraformaldehyde; PGC-1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator α ; TMRM: Tetramethyl-rhodamine methylester

Acknowledgments

This study was supported by grants from the *Instituto de Salud Carlos III* (FIS2012/00486, FIS2015/00780), FEDER, Alzheimer's Drug Discovery Foundation (grant no. 20121102), and *CIBERNED*. AM and CG are members of the "CIB Intramural Program "Molecular Machines for Better Life" (MACBET)".

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions

EC, FB, and AM designed the research study. EC and FB wrote the manuscript. CP and DA performed the S14 administration and behavioural experiments. TF performed the immunohistochemical experiments. FB and MdC performed the biochemical experiments. CG performed the S14 compound synthesis. AM and FB assisted in data analysis and discussion. All authors actively reviewed and edited the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval

Animal experiments were carried out in accordance with the Council Directive 2010/63/UE of 22 September 2010.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Group of Neurodegenerative Diseases, Hospital 12 de Octubre Research Institute (imas12), 28041 Madrid, Spain. ²Networked Biomedical Research Center in Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), 28031 Madrid, Spain. ³Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain.

Received: 14 September 2017 Accepted: 30 January 2018

Published online: 20 February 2018

References

- Nistico R, Cavallucci V, Piccinin S, Macri S, Pignatelli M, Mehdawy B, Blandini F, Laviola G, Lauro D, Mercuri NB, D'Amelio M. Insulin receptor beta-subunit haploinsufficiency impairs hippocampal late-phase LTP and recognition memory. *NeuroMolecular Med.* 2012;14:262–9.
- Pozueta J, Lefort R, Shelanski ML. Synaptic changes in Alzheimer's disease and its models. *Neuroscience.* 2013;251:51–65.
- Bruel-Jungerman E, Rampon C, Laroche S. Adult hippocampal neurogenesis, synaptic plasticity and memory: facts and hypotheses. *Rev Neurosci.* 2007; 18:93–114.
- Cameron HA, Glover LR. Adult neurogenesis: beyond learning and memory. *Annu Rev Psychol.* 2015;66:53–81.
- Frankland PW, Kohler S, Josselyn SA. Hippocampal neurogenesis and forgetting. *Trends Neurosci.* 2013;36:497–503.
- Shors TJ, Miesegae G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature.* 2001;410:372–6.
- Spalding KL, Bergmann O, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Huttner HB, Boström E, Westerlund I, Vial C, Buchholz BA, et al. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell.* 2013;153:1219–27.
- Lazarov O, Marr RA. Neurogenesis and Alzheimer's disease: at the crossroads. *Exp Neurol.* 2010;223:267–81.
- Rodriguez JJ, Verkhratsky A. Neurogenesis in Alzheimer's disease. *J Anat.* 2011;219:78–89.
- Perez-Torres S, Cortes R, Tolnay M, Probst A, Palacios JM, Mengod G. Alterations on phosphodiesterase type 7 and 8 isozyme mRNA expression in Alzheimer's disease brains examined by in situ hybridization. *Exp Neurol.* 2003;182:322–34.
- McLachlan CS, Chen ML, Lynex CN, Goh DL, Brenner S, Tay SK. Changes in PDE4D isoforms in the hippocampus of a patient with advanced Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2007;64:456–7.
- Safavi M, Baeri M, Abdollahi M. New methods for the discovery and synthesis of PDE7 inhibitors as new drugs for neurological and inflammatory disorders. *Expert Opin Drug Discov.* 2013;8:733–51.
- Martinez A, Gil C. cAMP-specific phosphodiesterase inhibitors: promising drugs for inflammatory and neurological diseases. *Expert Opin Ther Pat.* 2014;24:1311–21.
- Perez-Gonzalez R, Pascual C, Antequera D, Bolos M, Redondo M, Perez DI, Perez-Grijalba V, Krzyzanowska A, Sarasa M, Gil C, et al. Phosphodiesterase 7 inhibitor reduced cognitive impairment and pathological hallmarks in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2013;34:2133–45.
- Morales-Garcia JA, Alonso-Gil S, Gil C, Martinez A, Santos A, Perez-Castillo A. Phosphodiesterase 7 inhibition induces dopaminergic neurogenesis in hemiparkinsonian rats. *Stem Cells Transl Med.* 2015;4:564–75.
- Morales-Garcia JA, Echeverry-Alzate V, Alonso-Gil S, Sanz-SanCristobal M, Lopez-Moreno JA, Gil C, Martinez A, Santos A, Perez-Castillo A. Phosphodiesterase 7 inhibition activates adult neurogenesis in

- hippocampus and subventricular zone in vitro and in vivo. *Stem Cells* (Dayton, Ohio). 2017;35:458–72.
17. Chen ML, Yi L, Jin X, Liang XY, Zhou Y, Zhang T, Xie Q, Zhou X, Chang H, Fu YJ, et al. Resveratrol attenuates vascular endothelial inflammation by inducing autophagy through the cAMP signaling pathway. *Autophagy*. 2013;9:2033–45.
 18. Herzig S, Long F, Jhala US, Hedrick S, Quinn R, Bauer A, Rudolph D, Schutz G, Yoon C, Puigserver P, et al. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature*. 2001;413:179–83.
 19. Knutti D, Kralli A. PGC-1, a versatile coactivator. *Trends Endocrinol Metab*. 2001;12:360–5.
 20. Scarpulla RC. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev*. 2008;88:611–38.
 21. Zhou Y, Cao ZQ, Wang HY, Cheng YN, Yu LG, Zhang XK, Sun Y, Guo XL. The anti-inflammatory effects of Morin hydrate in atherosclerosis is associated with autophagy induction through cAMP signaling. *Mol Nutr Food Res*. 2017;61. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600966>.
 22. Mattson MP, Gleichmann M, Cheng A. Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. *Neuron*. 2008;60:748–66.
 23. Sheng B, Wang X, Su B, Lee HG, Casadesus G, Perry G, Zhu X. Impaired mitochondrial biogenesis contributes to mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2012;120:419–29.
 24. Burchell VS, Gandhi S, Deas E, Wood NW, Abramov AY, Plun-Favreau H. Targeting mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disease: part II. *Expert Opin Ther Targets*. 2010;14:497–511.
 25. Burchell VS, Gandhi S, Deas E, Wood NW, Abramov AY, Plun-Favreau H. Targeting mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disease: part I. *Expert Opin Ther Targets*. 2010;14:369–85.
 26. Castano T, Wang H, Campillo NE, Ballester S, Gonzalez-Garcia C, Hernandez J, Perez C, Cuenca J, Perez-Castillo A, Martinez A, et al. Synthesis, structural analysis, and biological evaluation of thioxoquinazoline derivatives as phosphodiesterase 7 inhibitors. *ChemMedChem*. 2009;4:866–76.
 27. Spuch C, Antequera D, Portero A, Orive G, Hernandez RM, Molina JA, Bermejo-Pareja F, Pedraz JL, Carro E. The effect of encapsulated VEGF-secreting cells on brain amyloid load and behavioral impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. *Biomaterials*. 2010;31:5608–18.
 28. Perez-Gonzalez R, Antequera D, Vargas T, Spuch C, Bolos M, Carro E. Leptin induces proliferation of neuronal progenitors and neuroprotection in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2011; 24(Suppl 2):17–25.
 29. Muqit MM, Abou-Sleiman PM, Saurin AT, Harvey K, Gandhi S, Deas E, Eaton S, Payne Smith MD, Venner K, Matilla A, et al. Altered cleavage and localization of PINK1 to aggresomes in the presence of proteasomal stress. *J Neurochem*. 2006;98:156–69.
 30. Morales-Garcia JA, Redondo M, Alonso-Gil S, Gil C, Perez C, Martinez A, Santos A, Perez-Castillo A. Phosphodiesterase 7 inhibition preserves dopaminergic neurons in cellular and rodent models of Parkinson disease. *PLoS One*. 2011;6:e17240.
 31. Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, et al. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:6448–53.
 32. Bartolome F, Wu HC, Burchell VS, Preza E, Wray S, Mahoney CJ, Fox NC, Calvo A, Canosa A, Moglia C, et al. Pathogenic VCP mutations induce mitochondrial uncoupling and reduced ATP levels. *Neuron*. 2013;78:57–64.
 33. Zhang L, Murray F, Zahno A, Kanter JR, Chou D, Suda R, Fenlon M, Rassenti L, Cottam H, Kipps TJ, Insel PA. Cyclic nucleotide phosphodiesterase profiling reveals increased expression of phosphodiesterase 7B in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:19532–7.
 34. Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, Aliev G, Askew DS, Baba M, Baehrecke EH, Bahr BA, Ballabio A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*. 2008;4:151–75.
 35. Redondo M, Brea J, Perez DI, Soteras I, Val C, Perez C, Morales-Garcia JA, Alonso-Gil S, Paul-Fernandez N, Martin-Alvarez R, et al. Effect of phosphodiesterase 7 (PDE7) inhibitors in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. Discovery of a new chemically diverse family of compounds. *J Med Chem*. 2012;55:3274–84.
 36. Lipina TV, Palomo V, Gil C, Martinez A, Roder JC. Dual inhibitor of PDE7 and GSK-3-VP1.15 acts as antipsychotic and cognitive enhancer in C57BL/6J mice. *Neuropharmacology*. 2013;64:205–14.
 37. Morales-Garcia JA, Aguilar-Morante D, Hernandez-Encinas E, Alonso-Gil S, Gil C, Martinez A, Santos A, Perez-Castillo A. Silencing phosphodiesterase 7B gene by lentiviral-shRNA interference attenuates neurodegeneration and motor deficits in hemiparkinsonian mice. *Neurobiol Aging*. 2015;36:1160–73.
 38. Ittner LM, Gotz J. Amyloid-beta and tau—a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*. 2011;12:65–72.
 39. Feng R, Rampon C, Tang YP, Shrom D, Jin J, Kyin M, Sopher B, Miller MW, Ware CB, Martin GM, et al. Deficient neurogenesis in forebrain-specific presenilin-1 knockout mice is associated with reduced clearance of hippocampal memory traces. *Neuron*. 2001;32:911–26.
 40. Dong H, Goico B, Martin M, Csernansky CA, Bertchume A, Csernansky JG. Modulation of hippocampal cell proliferation, memory, and amyloid plaque deposition in APPsw (Tg2576) mutant mice by isolation stress. *Neuroscience*. 2004;127:601–9.
 41. Jin K, Galvan V, Xie L, Mao XO, Gorostiza OF, Bredesen DE, Greenberg DA. Enhanced neurogenesis in Alzheimer's disease transgenic (PDGF-APPsw,Ind) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:13363–7.
 42. Donovan MH, Yazdani U, Norris RD, Games D, German DC, Eisch AJ. Decreased adult hippocampal neurogenesis in the PDAPP mouse model of Alzheimer's disease. *J Comp Neurol*. 2006;495:70–83.
 43. Merz K, Herold S, Lie DC. CREB in adult neurogenesis—master and partner in the development of adult-born neurons? *Eur J Neurosci*. 2011;33:1078–86.
 44. Kandel ER. The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses. *Biosci Rep*. 2001;21:565–611.
 45. Li N, Liu GT. The novel squamosamide derivative FLZ enhances BDNF/TrkB/CREB signaling and inhibits neuronal apoptosis in APP/PS1 mice. *Acta Pharmacol Sin*. 2010;31:265–72.
 46. Teich AF, Nicholls RE, Puzzo D, Fiorito J, Purgatorio R, Fa M, Arancio O. Synaptic therapy in Alzheimer's disease: a CREB-centric approach. *Neurotherapeutics*. 2015;12:29–41.
 47. Amadoro G, Corsetti V, Florenzano F, Atlante A, Ciotti MT, Mongiardi MP, Bussani R, Nicolini V, Nori SL, Campanella M, Calissano P. AD-linked, toxic NH2 human tau affects the quality control of mitochondria in neurons. *Neurobiol Dis*. 2014;62:489–507.
 48. Calkins MJ, Manczak M, Mao P, Shirendeb U, Reddy PH. Impaired mitochondrial biogenesis, defective axonal transport of mitochondria, abnormal mitochondrial dynamics and synaptic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*. 2011;20:4515–29.
 49. Young-Collier KJ, McArdle M, Bennett JP. The dying of the light: mitochondrial failure in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2012;28:771–81.
 50. Caldeira GL, Ferreira IL, Rego AC. Impaired transcription in Alzheimer's disease: key role in mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *J Alzheimers Dis*. 2013;34:115–31.
 51. Shaerzadeh F, Motamedi F, Minaei-Tehrani D, Khodagholfi F. Monitoring of neuronal loss in the hippocampus of Abeta-injected rat: autophagy, mitophagy, and mitochondrial biogenesis stand against apoptosis. *NeuroMolecular Med*. 2014;16:175–90.
 52. Pedros I, Petrov D, Allgaier M, Sureda F, Barroso E, Beas-Zarate C, Auladell C, Pallas M, Vazquez-Carrera M, Casadesus G, et al. Early alterations in energy metabolism in the hippocampus of APPsw/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842:1556–66.
 53. Rice AC, Keeney PM, Algarzae NK, Ladd AC, Thomas RR, Bennett JP Jr. Mitochondrial DNA copy numbers in pyramidal neurons are decreased and mitochondrial biogenesis transcriptome signaling is disrupted in Alzheimer's disease hippocampi. *J Alzheimers Dis*. 2014;40:319–30.
 54. Gong B, Pan Y, Vempati P, Zhao W, Knable L, Ho L, Wang J, Sastre M, Ono K, Sauve AA, Pasinetti GM. Nicotinamide riboside restores cognition through an upregulation of proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha regulated beta-secretase 1 degradation and mitochondrial gene expression in Alzheimer's mouse models. *Neurobiol Aging*. 2013;34:1581–8.
 55. Qin W, Haroutunian V, Katsel P, Cardozo CP, Ho L, Buxbaum JD, Pasinetti GM. PGC-1alpha expression decreases in the Alzheimer disease brain as a function of dementia. *Arch Neurol*. 2009;66:352–61.
 56. Steib K, Schaffner I, Jagasia R, Ebert B, Lie DC. Mitochondria modify exercise-induced development of stem cell-derived neurons in the adult brain. *J Neurosci*. 2014;34:6624–33.
 57. Wilkins HM, Harris JL, Carl SM, E L, Lu J, Eva Selfridge J, Roy N, Hutfles L, Koppel S, Morris J, et al. Oxaloacetate activates brain mitochondrial biogenesis, enhances the insulin pathway, reduces inflammation and stimulates neurogenesis. *Hum Mol Genet*. 2014;23:6528–41.

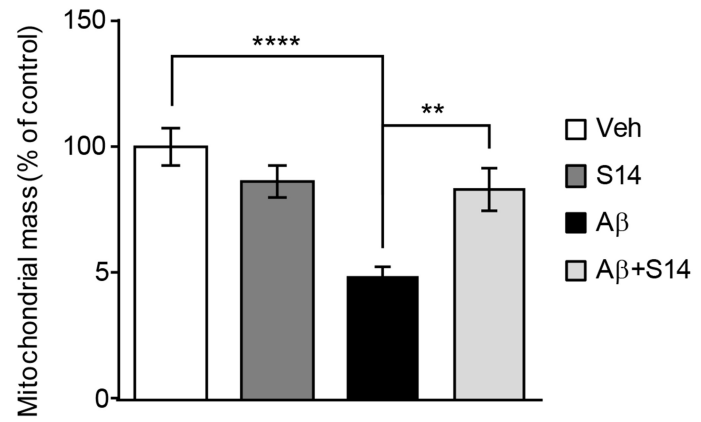
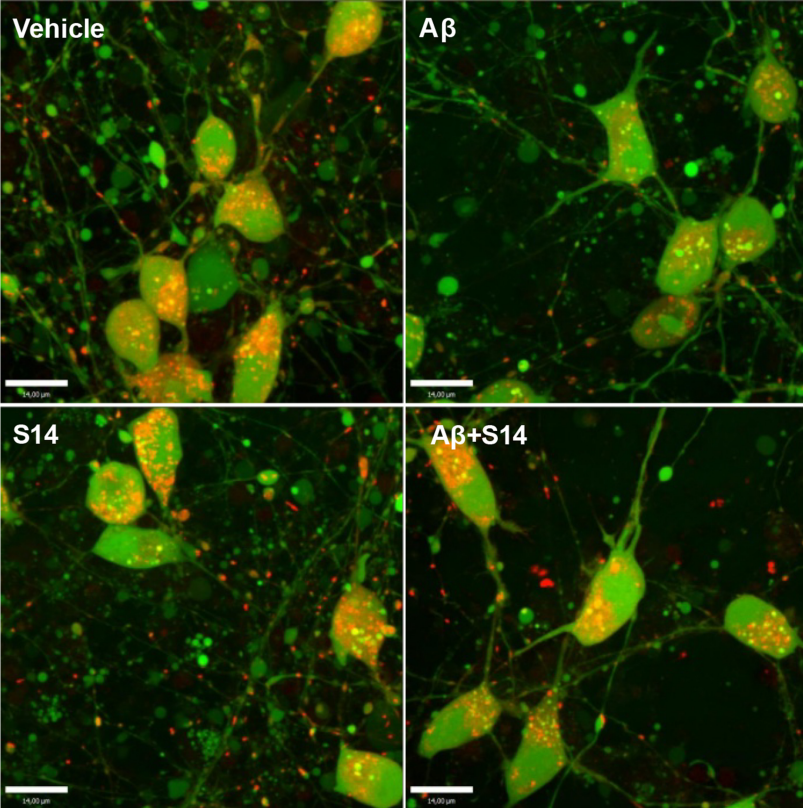
58. Martin-Maestro P, Gargini R, Perry G, Avila J, Garcia-Escudero V. PARK2 enhancement is able to compensate mitophagy alterations found in sporadic Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet.* 2016;25:792–806.
59. Ye X, Sun X, Starovoytov V, Cai Q. Parkin-mediated mitophagy in mutant hAPP neurons and Alzheimer's disease patient brains. *Hum Mol Genet.* 2015;24:2938–51.
60. Pich S, Bach D, Briones P, Liesa M, Camps M, Testar X, Palacin M, Zorzano A. The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Hum Mol Genet.* 2005;14:1405–15.
61. Boland BB, Alarcon C, Ali A, Rhodes CJ. Monomethylated-adenines potentiate glucose-induced insulin production and secretion via inhibition of phosphodiesterase activity in rat pancreatic islets. *Islets.* 2015;7:e1073435.
62. Hosokawa S, Koseki H, Nagashima M, Maeyama Y, Yomogida K, Mehr C, Rutledge M, Greenfeld H, Kaneki M, Tompkins RG, et al. Title efficacy of phosphodiesterase 5 inhibitor on distant burn-induced muscle autophagy, microcirculation, and survival rate. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013;304:E922–33.
63. Di Benedetto G, Gerbino A, Lefkimiatis K. Shaping mitochondrial dynamics: the role of cAMP signalling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.05.041>.
64. Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature.* 2006;443:787–95.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit





Supplementary Figure 1



Mutations in valosin-containing protein (VCP) decrease ADP/ATP translocation across the mitochondrial membrane and impair energy metabolism in human neurons

Received for publication, October 11, 2016, and in revised form, March 29, 2017. Published, Papers in Press, March 30, 2017, DOI 10.1074/jbc.M116.762898

Marthe H. R. Ludtmann^{‡1}, Charles Arber^{‡1}, Fernando Bartolome^{§¶1}, Macarena de Vicente^{§¶1}, Elisavet Preza[‡], Eva Carro^{§¶1}, Henry Houlden^{||}, Sonia Gandhi^{**}, Selina Wray[‡], and Andrey Y. Abramov^{‡2}

From the [‡]Department of Molecular Neuroscience, UCL Institute of Neurology, London WC1N 3BG, United Kingdom, the [§]Neurodegenerative Disorders Group, Research Institute Hospital 12 de Octubre (i+12), Madrid 28041, Spain, the ^{||}Institute of Neurology, MRC Centre for Neuromuscular Diseases, London WC1N 3BG, United Kingdom, the ^{**}Sobell Department of Motor Neuroscience and Movement Disorders, UCL Institute of Neurology, London WC1N 3BG, United Kingdom, and the [¶]Biomedical Research Networking Center on Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Madrid 28041, Spain

Edited by Roger J. Colbran

Mutations in the gene encoding valosin-containing protein (VCP) lead to multisystem proteinopathies including frontotemporal dementia. We have previously shown that patient-derived VCP mutant fibroblasts exhibit lower mitochondrial membrane potential, uncoupled respiration, and reduced ATP levels. This study addresses the underlying basis for mitochondrial uncoupling using VCP knockdown neuroblastoma cell lines, induced pluripotent stem cells (iPSCs), and iPSC-derived cortical neurons from patients with pathogenic mutations in VCP. Using fluorescent live cell imaging and respiration analysis we demonstrate a VCP mutation/knockdown-induced dysregulation in the adenine nucleotide translocase, which results in a slower rate of ADP or ATP translocation across the mitochondrial membranes. This deregulation can explain the mitochondrial uncoupling and lower ATP levels in VCP mutation-bearing neurons via reduced ADP availability for ATP synthesis. This study provides evidence for a role of adenine nucleotide translocase in the mechanism underlying altered mitochondrial function in VCP-related degeneration, and this new insight may inform efforts to better understand and manage neurodegenerative disease and other proteinopathies.

Valosin-containing protein (VCP)³ (alias p97/TERA) is a ubiquitously expressed member of the type II AAA⁺ ATPase family. Mutations in VCP have been found in patients with inclusion body myopathy with early-onset Paget disease and frontotemporal dementia as well as familial amyotrophic lateral

sclerosis (ALS). VCP has been linked to a variety of cellular functions including ubiquitin-proteasome system, protein degradation at the outer mitochondrial membrane, and autophagy but the underlying molecular mechanism in disease is yet to be fully understood.

Clues to the molecular mechanism associated with VCP mutations have come from model organisms that possess high inter-species homologies in the VCP protein. In particular, mutant mouse knock-in models mirror age-dependant motor-neuron dysfunction (1, 2). Abnormalities have been found in mitochondria cristae structures suggesting mitochondrial pathology in VCP mutation bearing cells (3). Our recent work has provided an insight into the observed mitochondrial pathologies through the utilization of a human dopaminergic neuroblastoma VCP knockdown cell line (SH-SY5Y), fibroblasts from patients carrying pathogenic mutations in the VCP gene and VCP knockdown mouse neurons, where we revealed an uncoupling of respiration from oxidative phosphorylation. Furthermore, it was shown that uncoupling leads to a lower mitochondrial membrane potential (indicator of cell health), higher respiration, and lower ATP levels in these cells (4). We hypothesized that the VCP mutation-induced uncoupling event may occur due to one of two reasons: 1) uncoupling proteins (UCPs) may alter the mitochondrial proton gradient, thus uncoupling respiration from oxidative phosphorylation. 2) Dysfunctional adenine nucleotide translocase (ANT1, SLC25A4), which is responsible for the simultaneous ADP import and ATP export across the mitochondrial inner membrane, leading to reduced ADP substrate for oxidative phosphorylation.

Other studies have investigated the effects of VCP on cellular health in patient fibroblasts, SH-SY5Y, as well as myoblasts (5) and this present study is the first to employ a disease-relevant neuronal model. In this current study, we set out to generate a human neuronal model of VCP mutations to explain the underlying mechanism of mitochondrial uncoupling in VCP mutant cells. To produce a human neuronal cell model, expressing mutant VCP at physiological levels, we generated iPSCs from patient fibroblasts and subsequently differentiated the cells to cortical neurons to study mitochondrial function. Live cell imaging techniques and a combination of VCP knockdown

This work was supported by the National Institute for Health Research (NIHR) University College London Hospitals (UCLH) Biomedical Research Centre (BRC), a Wellcome Trust grant, and the NIHR Queen Square Dementia Biomedical Research Unit UCL/UCLH. The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

✂ Author's Choice—Final version free via Creative Commons CC-BY license.

¹ These authors should be considered first co-authors.

² To whom correspondence should be addressed. Tel.: 44-2034484062; E-mail: a.abramov@ucl.ac.uk.

³ The abbreviations used are: VCP, valosin-containing protein; ANT, adenine nucleotide translocase; UCPs, uncoupling proteins; KD, knockdown; ETC, electron transport chain; CATR, carboxyatractyloside; FTD, frontotemporal dementia; iPSC, induced pluripotent stem cell; SCR, scrambled; RCR, respiratory control rate; qPCR, quantitative PCR; BKA, bongkrekic acid.

ANT deregulation in VCP mutation bearing neurons

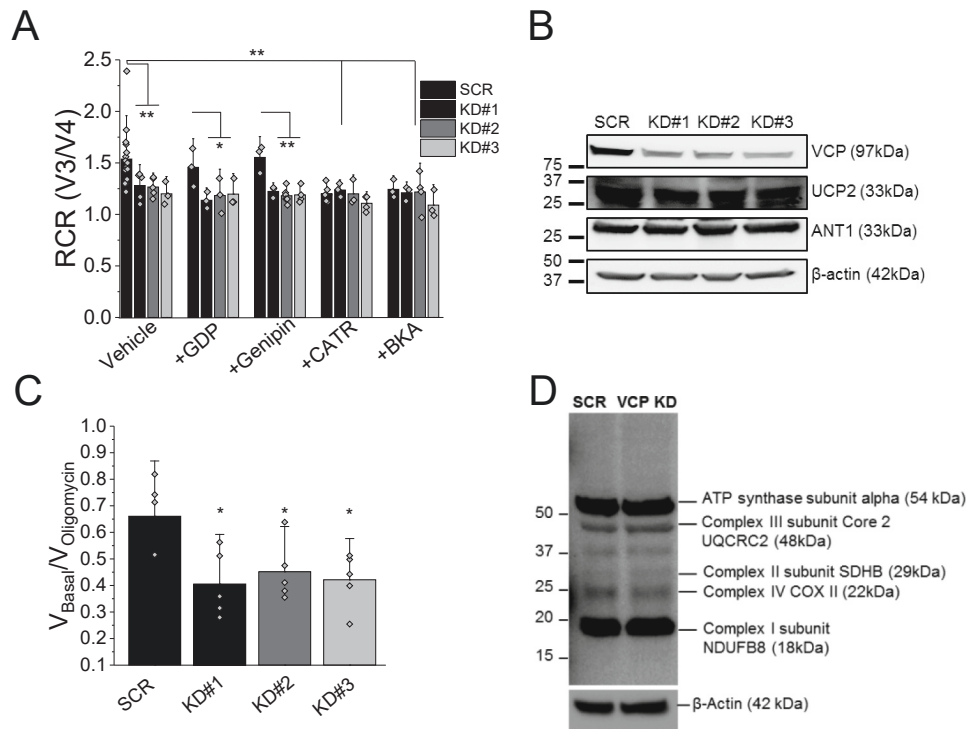


Figure 1. A, RCR is the ratio of state 3 respiration (ADP stimulated) to state 4 respiration (no ADP present), and is considered an indication of the degree of coupling of mitochondrial respiratory chain activity to oxidative phosphorylation. RCR of mitochondria in permeabilized SHY5Y control and *VCP* knockdown cells (KD#1, KD#2, KD#3) in the presence of vehicle control, uncoupling protein inhibitors (*GDP*; *Genipin*), or ANT inhibitors (*CATR*; *BKA*). B, SHY5Y SCR and KD cells were probed for *VCP*, *ANT1*, *UCP2*, and β -actin by Western blotting (cropped). C, quantification of $V_{\text{Basal}}/V_{\text{oligomycin}}$ in permeabilized SHY5Y control and *VCP* knockdown cells as an alternative indicator of coupling of mitochondrial respiratory chain activity to oxidative phosphorylation. D, full-length representative Western blot analysis of whole cell lysates from stable SCR SH-SY5Y cells and stable *VCP* knockdown SH-SY5Y cells probing for mitochondrial complexes and β -actin. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

SH-SY5Y cell lines as well as iPSCs and iPSC-derived neurons enabled us to establish that a reduced activity of ANT1 leads to the uncoupling of mitochondria in *VCP* mutation bearing cells.

Results

Uncoupling of *VCP* mutation bearing cells is not caused by UCPs

Our previous study provided evidence of lower ATP levels as well as uncoupled mitochondria (4). To investigate this further, we assessed mitochondrial coupling in stable *VCP* knockdown (KD) and scrambled (SCR) SH-SY5Y neuroblastoma cell lines. The *VCP* KD mimics the dominant-negative effect displayed by pathogenic loss-of-function *VCP* mutations. As previously shown by Bartolome *et al.* (4), *VCP* KD cells (clones KD#1, KD#2 and KD#3) displayed a significantly lower respiratory control rate (RCR; an indicator of coupling of oxidative phosphorylation and respiration) when compared with SCR cells (Fig. 1 A; $n \geq 3$ experiments; $p < 0.01$). To assess whether the mitochondrial uncoupling in SH-SY5Y *VCP* KD cells is caused by UCPs, permeabilized cells were pre-exposed for 1 min to the UCP inhibitors *GDP* (100 μM) or *Genipin* (50 μM) and the coupling of oxidative phosphorylation and respiration was assessed (Fig. 1A). Application of *GDP* and *Genipin* did not alter the RCR of SCR or *VCP* KD cells indicating that UCPs are not the underlying reason for the mitochondrial uncoupling in *VCP* mutants ($n \geq 3$ experiments). In support of this finding, Western blotting for *UCP2* showed equal levels in control and *VCP* KD cells (Fig. 1B). Protein levels of mitochondrial electron

transport chain (ETC) complexes were also found to be unchanged in *VCP* KD cells when compared with control suggesting that the mitochondrial phenotype is not caused by an alteration in ETC complex expression (Fig. 1D).

Lack of ATP synthase substrate in *VCP* KD cells

Due to the difference in charge between ATP and ADP, changes in ANT activity can affect mitochondrial membrane potential and respiration. To test whether this is the underlying cause of the uncoupling event observed in *VCP* knockdown cells, we exposed SCR control and *VCP* KD cells to ANT inhibitors carboxyatractyloside (*CATR*; 5 μM) or bongkreikic acid (*BKA*) (5 μM) and RCR was assessed. Inhibition of ANT resulted in a significantly reduced RCR in SCR cells, which mirrors the RCR observed in SH-SY5Y *VCP* KD cells (Fig. 1A; $p < 0.01$; $n \geq 3$ experiments). Furthermore, the lower RCR in the ANT inhibitor-treated SCR cell suggests that inhibition of ANT alone is able to uncouple mitochondria. There was no additional reduction in RCR in *VCP* KD cells exposed to ANT inhibitors suggesting that ANT is already inhibited and substrate (ADP) supply is reduced (Fig. 1A). To exclude a reduced ANT1 expression being the underlying reason, a Western blot analysis probing for ANT1 was undertaken. No changes in total ANT1 protein expression were found in *VCP* KD cells (Fig. 1B).

A proton leak through the ATP synthase could be the underlying reason for uncoupled mitochondria in *VCP* KD cells (6). Therefore, the irreversible ATP synthase inhibitor oligomycin (2 $\mu\text{g/ml}$) was applied (Fig. 1C). Oligomycin induced much

smaller inhibition of respiration in VCP KD cells providing evidence that the uncoupling of these mitochondria is not caused by a proton leak in these cells. These results suggest that substrate supply in the form of ADP is limited in VCP KD cells leading to mitochondrial uncoupling.

Generation of VCP mutant iPSCs and cortical neurons

To further our understanding of mutant-VCP disease mechanism, we employed a more physiologically relevant model in the form of patient-derived iPSCs and iPSC-derived neurons.

Fibroblasts from two patients carrying the R155C (most prevalent VCP mutation) and R191Q mutations were reprogrammed to iPSCs using episomal reprogramming factors (7). These patients both exhibited autosomal dominant inclusion body myopathy and frontotemporal dementia (FTD). The resultant iPSC clones exhibited similar expression of pluripotency markers to control hESCs at the protein (Fig. 2A) and RNA level (Fig. 2B). Reprogrammed cells exhibited a stable karyotype with unaltered g-banding (data not shown) and DNA sequencing confirmed that these stem cell lines retained the VCP mutation (Fig. 2D). The potential of the cells to differentiate into three germ layers was confirmed (Fig. 2E). Two clones from each patient were taken forward for further experiments and compared with two control iPSC lines and one control hESC line.

iPSCs were differentiated into cortical neurons, which are affected in VCP-linked FTD, as described previously (8). After 80 days of neurogenesis, control and VCP mutant lines generated similar proportions of deep (TBR1), middle (CTIP2), and upper (SATB2) cortical neurons (Fig. 2, A, ii, and F). The faithful silencing of pluripotency marker gene expression reinforces the footprint free reprogramming method (Fig. 2C). SOX2 expression remains high; representing the neural stem cells that persist within the culture (9). The fact that VCP mutant iPSCs can generate cortical neurons at a similar efficiency to control lines hints at a normal capacity of VCP mutant cells for neurogenic differentiation and supports disease associated to aging rather than developmental abnormalities. The glutamatergic identity was confirmed by loading neurons with the cytosolic calcium indicator Fura-2 and application of a physiological concentration of glutamate (1 μM), which resulted in a transient intracellular calcium signal (Fig. 2G). Furthermore, a mature glutamatergic neuronal phenotype was validated via punctate vGLUT1 staining and expression of the post-synaptic marker PSD95 (Fig. 2H). Together, these results demonstrate an effective ability of the cells to differentiate into cortical neurons and represent an appropriate model to study VCP mutations in the cell type affected in FTD.

VCP and ANT expression is not affected in patient-derived neurons

To further investigate the restricted ATP synthase substrate supply through ANT, we employed patient-derived iPSCs and cortical neurons bearing VCP mutations. First, we assessed *ANT1/2* gene expression on the mRNA level in iPSCs and iPSC-derived neurons where no significant changes could be found in R155C or R191Q mutation-bearing cells (Fig. 3, A and B). Protein expression levels of VCP and ANT in the iPSC-derived

mutant neurons were also not changed when compared with control neurons (Fig. 3, C and D); reinforcing the dominant-negative theory that VCP mutations interfere with VCP hexamer function without affecting expression levels (10).

Mitochondrial swelling in iPSC-derived neurons bearing a VCP mutation

Mitochondrial morphology was assessed in iPSC-derived neurons by EM (representative images in Fig. 4A, i). We observed that the number of swollen mitochondria in VCP mutant R115C neurons and R191Q was significantly higher ($p < 0.001$) when compared with control neurons (Fig. 4A, ii). This was confirmed in three independent neuronal inductions and not seen in three parallel control cultures. Additionally, swollen mitochondria displayed cristae that were disordered and interdigitation was disrupted (Fig. 4A, i, white arrows). These observations in mitochondrial morphology further support that mitochondrial health is likely to be affected in VCP mutant iPSC-derived neurons. It should be noted that abnormal mitochondrial morphology has been witnessed in other VCP mutant models, such as R155H homozygous and heterozygous mice (3, 11).

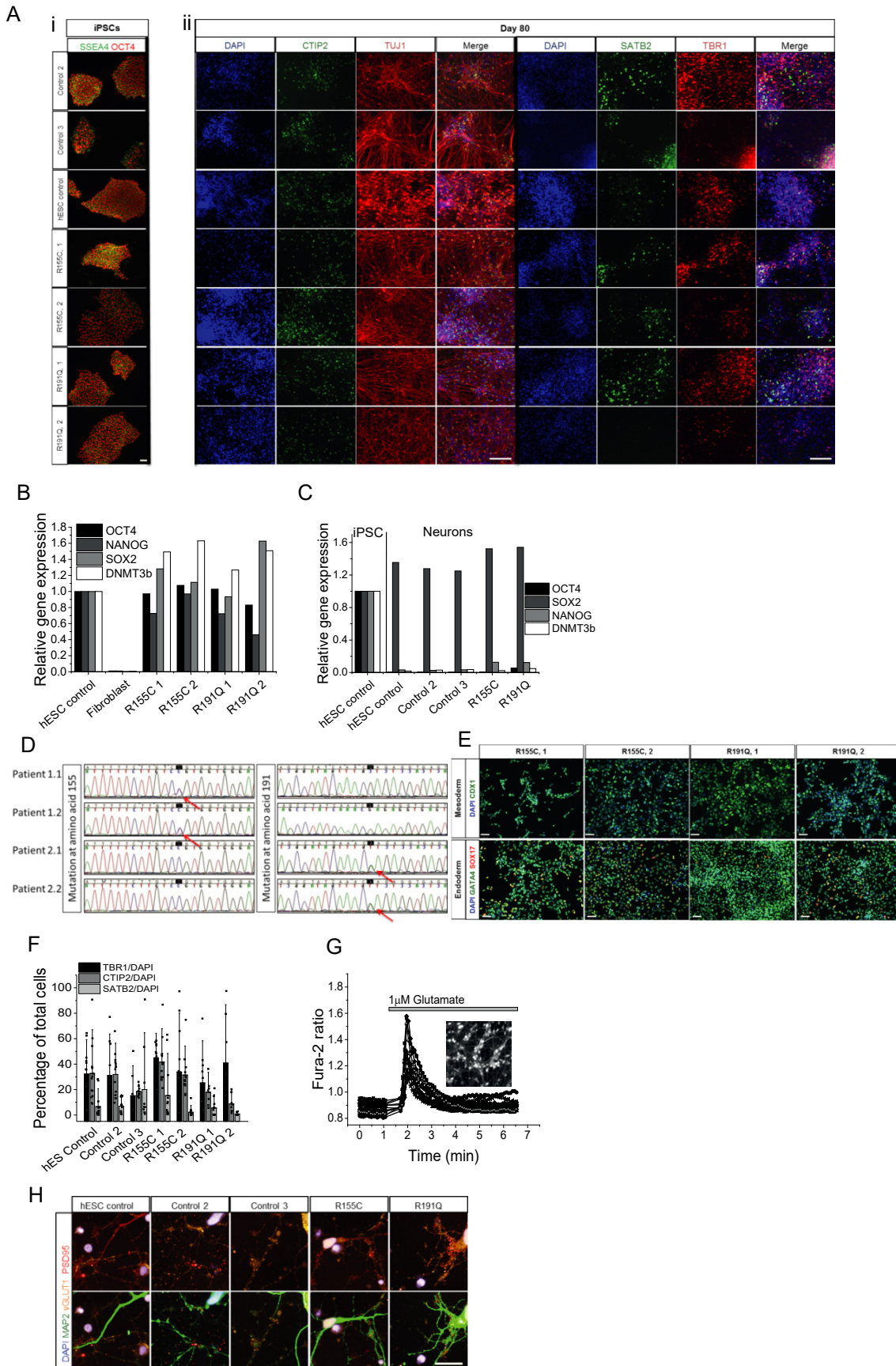
Lower ATP synthase activity in VCP mutation bearing cells

Oxygen consumption measurements are an indirect assessment of ATP synthase efficiency rather than ATP levels. To measure mitochondrial ATP levels in real-time, a FRET-based ATP probe was employed to allow assessment of ATP level changes (12). Patient-derived iPSCs and neurons were transfected with this probe where the fluorescent signal reflects mitochondrial ATP levels (Fig. 4B). The transfected cells were then permeabilized (40 μM digitonin to permeabilize the plasma membrane) in pseudo-intracellular solution and ATP synthase activity was assessed in the presence of mitochondrial substrates (5 mM malate and 5 mM glutamate) and ADP (500 nmol) (13). The applied ADP is translocated across the mitochondrial membranes via ANT where it is converted to ATP by the ATP synthase. ATP binds to the probe, which allows fluorescent live time recordings (Fig. 4C). All measurements were carried out in 3 control cell lines and two patient cell lines bearing either R155H or R191Q mutations (pool of two clones each) and statistical analysis was carried out on the pool of all control cell lines *versus* mutant cell lines.

iPSCs of affected patients had a significantly lower rate of ATP synthesis when compared with control (Fig. 4D). The rate of ATP increase in R155C ($n = 10$) and R191Q ($n = 6$) was significantly slower ($p < 0.001$) when compared with the pooled unaffected iPSC controls ($n = 9$; Fig. 4D). The rate was also significantly lower in neurons bearing the R155C mutation ($n = 17$; $p < 0.001$; Fig. 4D) and R191Q mutation ($n = 12$; $p < 0.05$) when compared with control iPSC-derived neurons ($n = 13$).

These results provide evidence that the ATP synthase in VCP mutant cells does not convert ADP to ATP as efficiently when compared with control cells. However, this approach does not distinguish between ATP synthase malfunction or a lower substrate (ADP) supply as the underlying basis for the difference in rate in ATP synthesis between control and VCP mutant cells.

ANT deregulation in VCP mutation bearing neurons



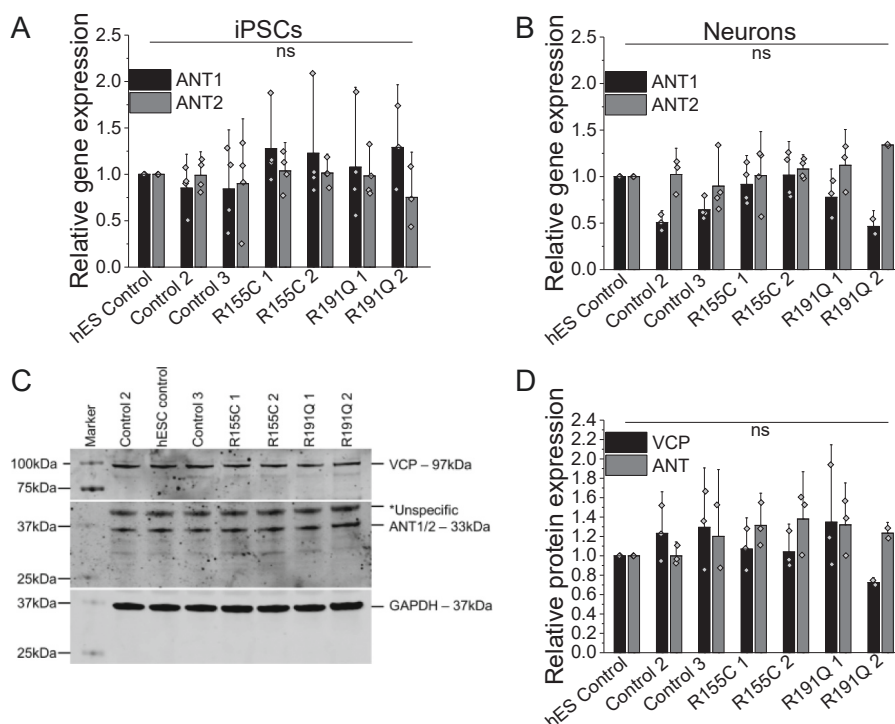


Figure 3. Quantification of *ANT1/2* gene expression in iPSC (A) and iPSC-derived neurons (B) by qPCR. Number of repeats are indicated in the bar chart. C, cropped Western blotting and D, densitometry analysis of VCP and ANTI/2 in iPSC-derived neurons. GAPDH was used as a loading control.

ADP/ATP translocation is inhibited in VCP mutation bearing cells

The translocase activity of ANT can be reversed through the application of high concentrations of ATP to permeabilized cells, which enables the import of ATP across the mitochondrial membranes. The translocated ATP is then bound by the mitochondrial ATP probe and the kinetic fluorescent measurements are a direct assessment of ATP translocation by ANT. It should be noted that this process is independent of the ATP synthase or ETC substrates and merely a measurement of ATP uptake, hence ANT activity (Fig. 5A). This method allowed investigation whether a lower substrate supply in the form of ADP is the reason for uncoupling.

Application of ATP (500 nmol) to permeabilized cells revealed a significantly slower ATP uptake into mitochondria of R155C iPSCs ($n = 7$; $p < 0.001$) as well as R191Q iPSCs ($n = 14$; $p < 0.01$) when compared with control cell lines ($n = 8$; Fig. 5, A and B). This observation was reproduced in iPSC neurons where ATP uptake into the mitochondria was significantly reduced in R155C neurons ($p < 0.001$) and R191Q when compared with control neurons ($n = 8$; Fig. 5C).

As a proof of principle, permeabilized control iPSCs were exposed to ANT inhibitors BKA or CATR for 30 min and the rate of ATP uptake was recorded (Fig. 5, D and E). Mitochondria pre-exposed to either ANT inhibitor displayed a significantly reduced ATP uptake (CATR $n = 4$; BKA $n = 5$; $p < 0.001$), mirroring the uptake observed in untreated patient iPSC ($n = 8$), when compared with control ($n = 8$). The rate of ATP uptake in iPSC-derived control neurons exposed to CATR ($p < 0.01$) and BKA ($p < 0.05$) was also significantly lower when compared with control neurons ($n = 3$; Fig. 5E). These results provide evidence that the mitochondrial uncoupling and lower ATP levels in VCP mutation bearing cells are caused by a lack of substrate (ADP) being translocated from the cytoplasm across the mitochondrial membranes.

Discussion

We have previously shown that fibroblasts from patients harboring mutations in the *VCP* gene display mitochondrial uncoupling, seen by increased respiration, reduced oxidative phosphorylation, and lower ATP levels (4). In the present study we focused on the mechanism of this mitochondrial uncou-

Figure 2. A, immunocytochemistry showing three control iPSCs and two patient-derived VCP mutant iPSCs lines (2 clones each). All stem cells show expression of pluripotency markers OCT4 and SSEA4 in stem cell conditions and have characteristic colony morphology. By day 80 of differentiation, β -III-tubulin positive neurons are formed expressing markers of deep (*TBR1*), middle (*CTIP2*), and upper (*SATB2*) cortical neurons. Size bar = 100 μ m. B, qPCR analysis of four pluripotent stem cell markers in VCP patient-derived iPSCs and control fibroblasts, normalized to three housekeeping genes. C, qPCR analysis to represent faithful silencing of pluripotency genes in neuronal cultures, relative to hESC controls. D, DNA sequencing of iPSC-derived neuron genomic DNA showing mutated nucleotides corresponding to amino acid residues 155 and 191 (arrows). E, monolayer directed differentiation, showing the ability of newly derived iPSC lines to enter the endoderm and mesoderm differentiation pathways. Size bar = 50 μ m. F, automated counting of mature neuronal markers displays no difference in the ability of control and VCP iPSCs to form deep (*TBR1*), middle (*CTIP2*), and upper (*SATB2*) layer cortical neurons. G, representative traces of Fura-2-loaded iPSC-derived neurons showing a transient cytosolic calcium response to physiological concentrations of glutamate. Representative image depicts iPSC-derived neurons loaded with Fura-2. H, iPSC-derived neurons express markers of glutamatergic neurons (*VGLUT1*) and functional synapses (*PSD95*). Size bar = 20 μ m.

ANT deregulation in VCP mutation bearing neurons

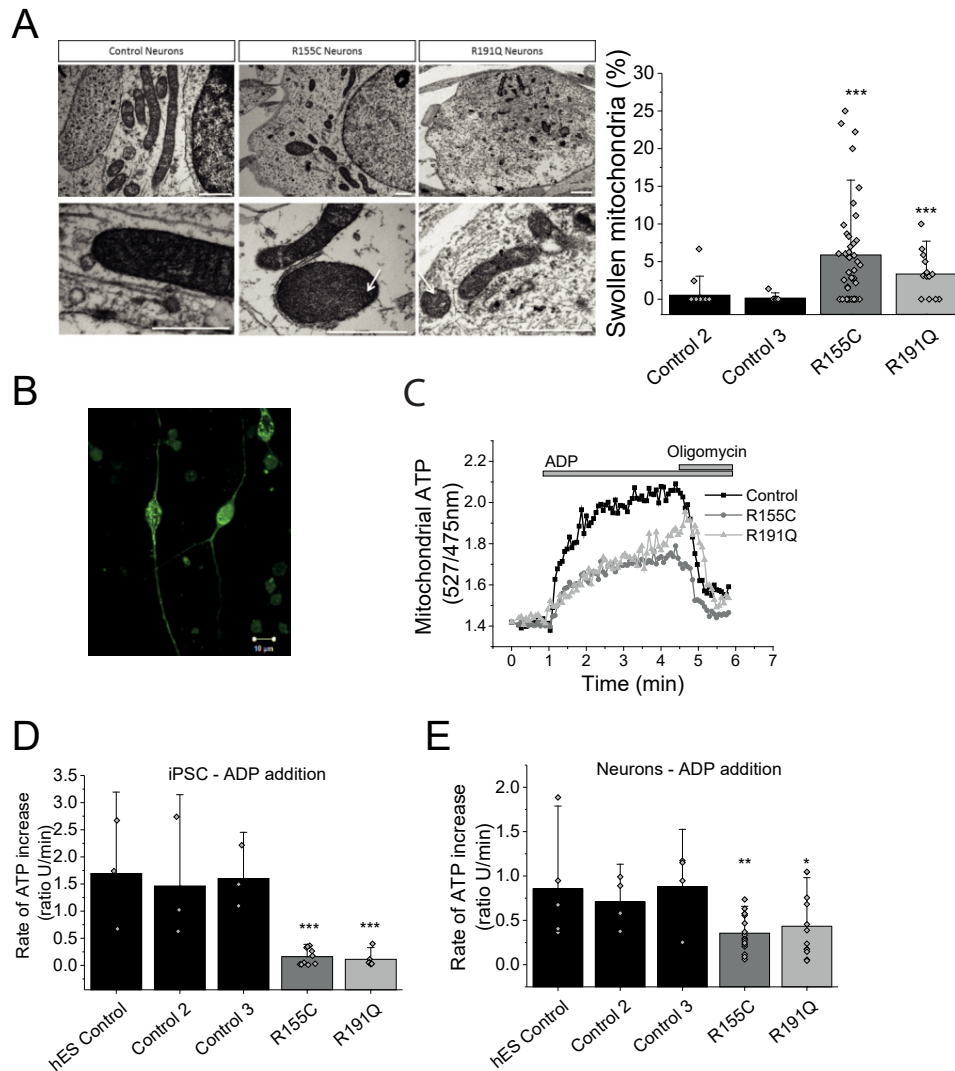


Figure 4. *A, i*, transmission electron microscopy images of mitochondria within control and mutant iPSC-derived neurons at day 80 of differentiation. Mutant neurons consistently display a small proportion of swollen, electron dense mitochondria. Arrows show damaged cristae. Scale bar represent 1 μm . *ii*, quantification of swollen mitochondria. $n = 3$ control, $n = 3$ R155C and $n = 1$ R191Q. *B*, representative image of a neuron transfected with mitAT1.03 probe. *C*, representative traces of mitochondrial ATP after ADP application. Oligomycin was applied as a negative control. Scale bar represent 10 μm . *D*, quantification of the rate of ATP increase in control and VCP mutation bearing iPSC cells. *E*, quantification of the rate of ATP increase in control and VCP iPSC-derived neurons. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

pling. The UCP family and ANT both play an important role in regulating the coupling of the mitochondrial respiratory chain to oxidative phosphorylation. UCPs are mitochondrial carriers functioning via dissipation of the proton gradient across the inner membrane (14). To date, five human UCP homologues have been identified in different tissues and all are located at the mitochondria. UCP1 has a well characterized thermogenic role in brown adipose tissue. UCP3 is mainly expressed in both brown adipose tissue and muscle, whereas UCP2, UCP4, and UCP5 are mainly expressed in the central nervous system and therefore play key roles in neurons. Although only the role of UCP1 has been well characterized, it is generally accepted that all five UCPs uncouple oxidative phosphorylation from ATP synthesis by dissipating the proton gradient across the inner membrane (14).

Mitochondrial respiration analysis and Western blotting of VCP KD cells established that uncoupling of respiration from oxidative phosphorylation is not caused by UCPs or a proton

leak through the ATP synthase. However, ANT inhibition in VCP KD did not lead to further uncoupling indicating that ANT could already be inhibited. Classical uncoupling is understood to be a reduction in coupling between the rate of electron transport in the respiratory chain (ADP independent; State 4) and ATP production (ADP-dependent; State 3) leading to a lower RCR. However, a reduced substrate supply (ADP) through limited uptake via ANT will lead to state 3 being inhibited resulting also in a lower RCR. Both scenarios decrease ATP levels and will ultimately lead to a lower bioenergetic status of the cell.

ANT1 is a mitochondrial protein that is thought to have an intrinsic uncoupling property (15–17). Additionally, ANT1 has been associated with the mitochondrial permeability transition pore and believed to be involved in mitochondria-mediated apoptosis (18). This study provided evidence that reduced ANT activity can lead to mitochondrial uncoupling as shown by ANT inhibition in SCR cells. The observed mitochondrial deficiency in VCP KD cells is in agreement with our previous work (4)

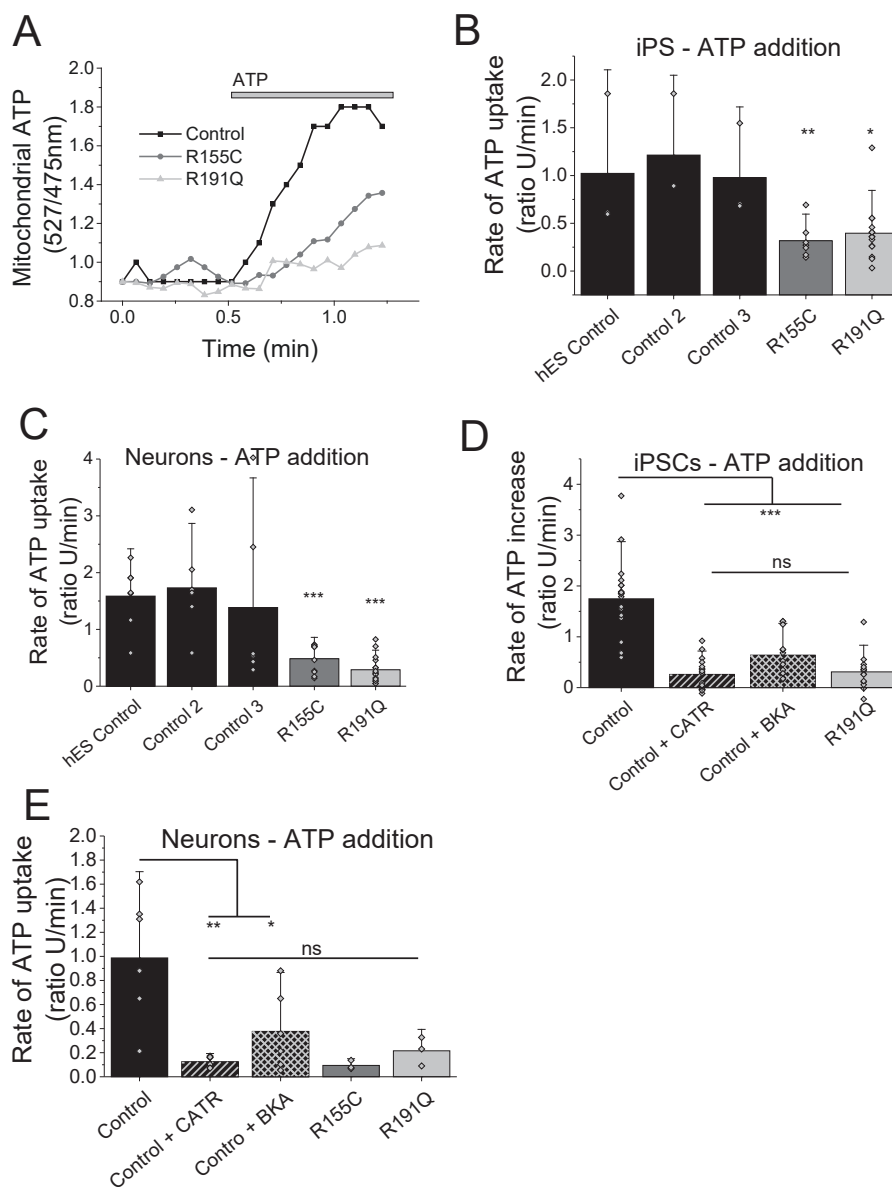


Figure 5. A, representative traces of mitochondrial ATP uptake. B, quantification of the rate of ATP uptake in control and VCP mutation bearing iPS cells. C, quantification of the rate of ATP uptake in control and VCP iPS-derived neurons. D, quantification of the rate of ATP uptake in control iPSCs or pre-exposed to ANT inhibitors (BKA/ATRAC) as well as mutation bearing iPSCs. E, quantification of the rate of ATP uptake in control neurons, neurons pre-exposed to ANT inhibitors (BKA/ATRAC), and mutations bearing neurons. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

where a lower NADH redox index and faster basal V2 respiration in VCP KD cells was reported. These features, together with a lower RCR, have been implicated in a number of neurodegenerative models. For example, Plun-Favreau *et al.* (6) showed similar phenotypes in an *HTRA2* knock-out mouse model where mutations in the *HTRA2* gene have been linked to Parkinson's disease. Additionally, studies have shown how the most common genetic cause of Parkinson's disease, G2019S mutations in the leucine-rich repeat kinase 2 gene (*LRRK2*), displayed uncoupling and low RCR implicating UCP2 and -4 proteins (19). Other transgenic mice for Huntington's disease reflected metabolic and thermoregulatory defects associated to uncoupling and reduced RCRs (20).

We extended our study by employing VCP patient-derived iPSCs and iPSC-derived neurons, which allowed us to investi-

gate the dynamics of ADP and ATP translocation at the mitochondria in a human neuronal model. Investigations utilizing this highly energy-demanding cell type enabled us to validate previously observed mitochondrial abnormalities in the cell type affected by FTD.

Electron microscopy of mitochondria in iPSC-derived neurons displayed a significantly higher subset of swollen mitochondria that exhibit disordered inner mitochondrial membranes in VCP-deficient cells compared with those from control derived neurons. Damaged mitochondria were described as a common feature in VCP-associated disease models and in patient cell samples but there have been no reports showing this feature in neurons (5, 11, 21). For example, Johnson *et al.* (21) in 2015 showed damaged mitochondria in muscle cells from *Drosophila* and Nalbandian *et al.* (11) in 2012 showed

ANT deregulation in VCP mutation bearing neurons

mitochondrial megaconia and disrupted cristae in myoblasts from a VCP mouse model. The same group more recently showed damaged mitochondrial dynamics and function in fibroblasts and myoblasts from VCP patients (5). Here for the first time, we are showing EM images of damaged mitochondria in human neurons with VCP mutations. Additionally, the swollen mitochondria observed in the VCP mutant neurons could be an indicator of uncoupling, a feature originally described by Weinbach *et al.* (22) in 1963 and subsequently confirmed in a number of reports (23, 24).

The results suggest a decreased transport of ADP/ATP by ANT, which explains the mechanism behind the reduced ATP levels in the cells as previously shown in multiple other disease models (5, 25, 26). Inhibition of ADP/ATP transport could be observed in all cell types employed by this study. However, neurons require more energy than any other cell type (such as iPSC) and rely predominantly on oxidative phosphorylation for ATP production (with a very small impact of glycolysis). This makes neurons more vulnerable to mitochondrial uncoupling and inhibition of ATP transport (27).

Our data provide evidence that mutations in VCP lead to mitochondrial uncoupling due to a reduced ADP/ATP translocation by ANT. Here we provide unique analysis of the bioenergetics of VCP mutant human neurons with patient genotypes, allowing rational and relevant bioenergetic analysis in the cell type affected by neurodegeneration. The underlying deficiency in mitochondrial bioenergetics may help to explain disease in the context of VCP mutation and provide a focus for further studies into the brain metabolism in healthy aging and disease.

Experimental procedures

Cell culture

Human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells were purchased from the European Collection of Cell Cultures (Health Protection Agency, Salisbury, UK) and maintained as previously described (28). Unless otherwise stated, SH-SY5Y cells were seeded at a density of 4×10^4 cells/cm² and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, and 1% (v/v) penicillin/streptomycin at 37 °C and 5% CO₂. The scramble and VCP KD SH-SY5Y cells were generated by lentiviral infection with either a pool of 5 shRNA vectors or individual shRNA (Thermo Fisher) as described previously by Bartolome *et al.* (4). Subsequent clonal selection was carried out using puromycin (1 μg/ml). Two different independent clones and a pool with 90% approximate reduction in gene expression were used in all experiments. 1 clone expressing nontargeting RNA vector was used as control (stable SCR).

Cell differentiation

Fibroblast and iPSC cultures were performed as described previously (29, 30) and all reagents were obtained from Life Technologies, unless otherwise stated. Clinical data about the patients was described previously (4). Fibroblasts were cultured in DMEM with 10% fetal bovine serum and passaged with 0.05% trypsin. Reprogramming was performed as per the method detailed by Okita *et al.* (7) using episomal reprogramming plasmids (given as a gift from Shinya Yamanaka; Addgene plasmids

Table 1

Antibodies used for immunocytochemistry and Western blotting

Antibody name	Source	Dilution	Species
OCT4	Santa Cruz	1:500	gt
SSEA4	BioLegend	1:200	m
MAP2	Abcam	1:10,000	ch
PSD95	Abcam	1:1000	m
vGLUT1	Synaptic systems	1:1000	rb
TUJ1	Covance	1:1000	m/rb
TBR1	Abcam	1:500	rb
SATB2	Abcam	1:100	m
CTIP	Abcam	1:500	rat
VCP	Cell Signalling	1:1000	m
ANT1/2/3	Santa Cruz	1:200	gt
UCP2 (C-20)	Santa Cruz	1:200	gt
GAPDH	Ambion	1:5000	m
β-actin	Sigma	1:5000	rb
hGATA-4	Santa Cruz	1:100	m
hSox17	R&D	1:200	gt
hCDX1	Abcam	1:200	r
OXPHOS complexes	Abcam	1:250	m

#27077, #27078, and #27080) and the P2 nucleofection kit (Amaya). One week after nucleofection, cells were passaged onto mouse embryonic feeders (AMS Bio) and media was changed to KO-DMEM, 20% knock-out serum replacement, 2 mM L-glutamine, non-essential amino acids, 50 μM β-mercaptoethanol, and 10 ng of FGF2 (Peprotech).

Newly formed iPSC colonies were manually picked and, together with control iPSCs and hESCs, were maintained in Essential 8 medium on Geltrex-coated plates. Karyotype analysis was performed by Cell Guidance Systems, Cambridge, UK. Differentiation to cortical neurons was performed as detailed (8, 34). 10 days of dual SMAD inhibition using 1 μM dorsomorphin and 10 μM SB431542 was followed by 70–90 additional days of differentiation in N2B27 media containing retinoids on laminin-coated dishes and coverslips. The hESC line SHEF6 was obtained from the United Kingdom Stem Cell Bank, control iPS line 1 was obtained from the lab of Dr. Tilo Kunath, and control iPS line 2 from Coriell repository.

For mesoderm and endoderm fate specification a defined monolayer protocol was followed, which allowed up-regulation of mesoderm- and endoderm-specific fate determinant gene networks, as published by others (31, 32). In brief, endoderm differentiation was achieved via a 3-day treatment consisting of 0.1 g/ml of activin (days 1–3), 80 ng/ml of FGF2 (days 1–3), 10 ng/ml of BMP4 (days 1–2), and 3 μM Chir (day 1). Mesoderm differentiation was directed via a 2-day treatment with 0.1 μg/ml of Activin, 20 ng/ml of FGF2, 10 ng/ml of BMP4, and 5 μM Chir.

Immunocytochemistry

Cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min and washed three times in PBS containing 0.3% Triton X-100 (PBST), before blocking in 3% BSA in PBST for 20 min. Primary antibodies (Table 1) were incubated overnight at 4 °C in blocking solution, followed by three washes in PBST. Secondary antibodies were then added for 1 h at room temperature in the dark (Alexa Fluor, Invitrogen), DAPI was added for one wash at 1 μM and a final two washes was performed in PBST before mounting the coverslips for imaging on a Zeiss LSM microscope or a Zen confocal microscope. Cell counts were performed on 5 images per condition from three independent experiments, using the

Table 2
Primers used for qPCR

Gene	Forward Primer	Reverse Primer	Product
<i>GAPDH</i>	atgacatcaagaagggtggtg	cataccaggaaatgagcttg	177 bp
<i>CYCLOPHILIN</i>	ggcaaatgctggaccaaacac	ttcctggacccaaaacgctc	147 bp
<i>β-ACTIN</i>	tcaccaccacggccgagcg	tctcctttctgcatcctgtcg	351 bp
<i>OCT4</i>	ttctggcgccggttacagaacca	gacaacaatgaaaatcttcaggaga	218 bp
<i>SOX2</i>	catggcaatcaaaatgtcca	tttcacggttgcaactgtcc	119 bp
<i>NANOG</i>	gcttgcccttgccttgaagca	ttcctgactgggaccttgctc	256 bp
<i>ANT1</i>	aagatcttcaagtctgatgg	ataaatatcgccccctttc	263 bp
<i>ANT2</i>	gcttgctcttgcctgatgaa	aatagttgcccactgagaa	145 bp
<i>DNMT3b</i>	tttagggagaacgggaat	agcaccagtaagaagagt	88 bp

ITCN nuclear counting software plug-in for ImageJ) with consistent settings between all conditions.

Western blotting analysis

Cells were lysed for 1 h at 4 °C in lysis buffer containing 10 mM Tris, pH 8, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS plus protease and phosphatase inhibitors (Roche Applied Science), before centrifugation at 10,000 rpm for 15 min at 4 °C. Proteins were separated on NuPage 10% SDS-polyacrylamide gels (Novex) and transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were blocked in PBS containing 0.1% Tween and 3% milk solution. Primary antibodies were incubated in blocking solution overnight at 4 °C (Table 1). Subsequent washes were performed in PBS-Tween and secondary antibodies (800 nm Rockland and 680 nm Molecular Probes) were incubated for 1 h at room temperature. Final washes were in PBS and membranes were scanned on an Odyssey imaging system (Li-Cor). All gels have been run under the same experimental conditions.

qPCR analysis

RNA was isolated from cells using TRIzol reagent and the manufacturer's instructions (Thermo Fisher). Reverse transcription was performed using SuperScript III Reverse Transcriptase and random hexamer primers (Thermo Fisher). qPCR was performed using Power SYBR Green master mix (Thermo Fisher) and the Agilent Mx300P qPCR system and software with annealing of primers at 60 °C (Table 2). All results are relative to the expression of three housekeeping genes, *GAPDH*, *CYCLOPHILIN*, and *β-ACTIN*.

Sanger sequencing

Genomic DNA was extracted from VCP cells using the QuickExtract DNA extraction solution (Epicenter) as per the manufacturer's instructions. The regions of the VCP mutations were PCR amplified with VCP exon 5 (forward, TTAAGACA-GGTGGGGTGGAG; reverse, CCCATCTCAGTCTCCCA-AAG) primers using POLYMERASE HERE (it may be: FastStart PCR Master (Roche Applied Science)) in PCR containing 10 μl of FastStart of PCR Master, 1 μl of each primer, 1 μl of DMSO, 10 μl of H₂O, and 1 μl of extracted gDNA. PCR was performed using a 65td55 standard cycling program. PCR products were subsequently purified by incubation with Exonuclease I/FastAPTM Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Scientific) mixture as per the manufacturer's instructions. 5 μl of purified products were used in sequencing reactions with 0.5 μl of Big Dye (BigDye Terminator V.3.1 Cycle Sequencing Kit,

Applied Biosystems), 2 μl of sequencing buffer (BigDye Terminator V.3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems), 1 μl of primer, and 2.5 μl of H₂O. For the removal of BigDye Terminator, sequencing reactions were filtered through Sephadex (Sigma) containing filter plates (Corning). Sequencing was performed using an Applied Biosystems 3730XI Sequencer and analysis of results was carried out using the Sequencher software (Gene Codes Corporation).

Transmission electron microscopy

Neurons were fixed in 3% glutaraldehyde (EM grade, Agar Scientific), 0.1 M sodium cacodylate, and 5 mM calcium chloride. Neurons were then post-fixed in osmium tetroxide, stained with uranyl acetate and Reynold's lead citrate, and dehydrated with stepwise washes with increasing concentrations of ethanol. Cells were then mounted in epoxy resin using propylene oxide to aid infiltration, which was hardened at 60 °C for 2 days. Ultrathin sections were taken using a diamond knife (Leica Reichert Ultracut), sections were mounted on copper mesh grids, stained with uranyl acetate, and images were taken using the Philips CM12 transmission electron microscope using the Olympus Soft Imaging System iTEM and MegaViewIII camera. Mitochondria were analyzed in triplicate from two control lines and one line from each patient. At least 15 fields of view were analyzed per line for every replicate.

Oxygen consumption measurements

SH-SY5Y cells were permeabilized with 40 μM digitonin and subsequent re-suspension in a hypotonic medium containing 135 mM KCl, 10 mM NaCl, 20 mM HEPES, 0.5 mM KH₂PO₄, 1 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, and 1.86 mM CaCl₂, pH 7.1. Oxygen consumption was measured in the Clark-type oxygen electrode (Hansatech) thermostatically maintained at 25 °C. Glutamate (5 mM), malate (5 mM), and inhibitors were indicated were added to the chamber before the measurement took place. To assess V3, 50 nmol of ADP was added and all data were obtained using the Oxygraph Plus system with chart recording software.

Fura-2 imaging

Calcium measurements using fura-2 were generated using an epifluorescence inverted microscope equipped with a ×20 fluorite objective (33). Changes in cytosolic calcium levels were monitored in single cells using excitation light provided by a Xenon arc lamp, the beam passing monochromator at 340 and 380 nm (Cairn Research, UK). The emitted fluorescence light was reflected through a 515-nm long pass filter to a cooled CCD camera (Retiga, QImaging, Canada) and digitized to 12-bit res-

ANT deregulation in VCP mutation bearing neurons

olution. All imaging data were collected and analyzed using software from Andor (Belfast, UK).

Kinetic ATP measurements

To determine the ATP levels, patient-derived iPSC and neurons were transfected with a mitochondrial ATP probe (mitAT1.03), which was generated by Imamura *et al.* (12) using Effectine (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Confocal images were obtained using a Zeiss 710 VIS CLSM microscope equipped with a META detection system and a $\times 40$ oil immersion objective. The FRET was quantified by the 527:475 nm ratio with an excitation of 405 nm and a filter from 515 to 580 nm. ATP kinetics were assessed in permeabilized iPSC and iPSC-derived neurons. To permeabilize the transfected cells, a buffer (0.137 M NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM, NaH_2PO_4 , 25 mM, Tris-HCl, pH 7.1) containing a low concentration of digitonin (20 μM) was added to the cells. Upon permeabilization, the buffer containing digitonin was replaced by fresh buffer containing mitochondrial substrates (5 mM glutamate and 5 mM malate). Cells were allowed to rest for at least 5 min before measurements took place. Basal mitochondrial ATP levels were recorded for 1 min before 500 nmol of ADP/ATP was added to the imaging chamber (500 μl final volume). Oligomycin (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was added as a negative control at the end of the ADP experiments.

Statistical analysis

Statistical analysis and exponential curve fitting were performed using Origin 9 (Microcal Software Inc., Northampton, MA) software. Experimental data are shown as column scatter \pm S.D. *n* represents experiments undertaken. Statistical analysis between samples was performed using a one-way analysis of variance with Bonferroni correction. Differences were considered to be significantly different if $p < 0.05$ (*).

Ethics approval and consent to participate

Informed consent was obtained from all patients in this study. All experimental protocols were carried out according to approved guidelines and regulations by the National Hospital for Neurology and Neurosurgery and the Institute of Neurology joint research ethics committee (09/0272).

Author contributions—M. H. R. L., C. A., F. B., M. D. V., and E. P. performed the experiments; M. H. R. L., C. A., and F. B. analyzed the data. A. Y. A., S. W., E. C., H. H. contributed reagents/materials/analysis tools. M. H. R. L., C. A., F. B., A. Y. A., S. W., S. G., and H. H wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments—We thank Dr. Imamura (Kyoto University, Japan) for the mitAT1.03 construct. We also thank Kerrie Venner from the EM imaging unit at the National Hospital for Neurology and Neurosurgery for technical expertise.

References

1. Yin, H. Z., Nalbandian, A., Hsu, C. I., Li, S., Llewellyn, K. J., Mozaffar, T., Kimonis, V. E., and Weiss, J. H. (2012) Slow development of ALS-like spinal cord pathology in mutant valosin-containing protein gene knock-in mice. *Cell Death Dis.* **3**, e374
2. Weihl, C. C., Miller, S. E., Hanson, P. I., and Pestronk, A. (2007) Transgenic expression of inclusion body myopathy associated mutant p97/VCP causes weakness and ubiquitinated protein inclusions in mice. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 919–928
3. Nalbandian, A., Llewellyn, K. J., Badadani, M., Yin, H. Z., Nguyen, C., Katheria, V., Watts, G., Mukherjee, J., Vesa, J., Caiozzo, V., Mozaffar, T., Weiss, J. H., and Kimonis, V. E. (2013) A progressive translational mouse model of human valosin-containing protein disease: the VCP(R155H/+) mouse. *Muscle Nerve* **47**, 260–270
4. Bartolome, F., Wu, H. C., Burchell, V. S., Preza, E., Wray, S., Mahoney, C. J., Fox, N. C., Calvo, A., Canosa, A., Moglia, C., Mandrioli, J., Chiò, A., Orrell, R. W., Houlden, H., Hardy, J., Abramov, A. Y., and Plun-Favreau, H. (2013) Pathogenic VCP mutations induce mitochondrial uncoupling and reduced ATP levels. *Neuron* **78**, 57–64
5. Nalbandian, A., Llewellyn, K. J., Gomez, A., Walker, N., Su, H., Dunnigan, A., Chwa, M., Vesa, J., Kenney, M. C., and Kimonis, V. E. (2015) In vitro studies in VCP-associated multisystem proteinopathy suggest altered mitochondrial bioenergetics. *Mitochondrion* **22**, 1–8
6. Plun-Favreau, H., Burchell, V. S., Holmström, K. M., Yao, Z., Deas, E., Cain, K., Fedele, V., Moiso, N., Campanella, M., Miguel Martins, L., Wood, N. W., Gourine, A. V., and Abramov, A. Y. (2012) HtrA2 deficiency causes mitochondrial uncoupling through the F_1F_0 -ATP synthase and consequent ATP depletion. *Cell Death Dis.* **3**, e335
7. Okita, K., Matsumura, Y., Sato, Y., Okada, A., Morizane, A., Okamoto, S., Hong, H., Nakagawa, M., Tanabe, K., Tezuka, K., Shibata, T., Kunisada, T., Takahashi, M., Takahashi, J., Saji, H., and Yamanaka, S. (2011) A more efficient method to generate integration-free human iPSCs. *Nat. Methods* **8**, 409–412
8. Shi, Y., Kirwan, P., Smith, J., Robinson, H. P., and Livesey, F. J. (2012) Human cerebral cortex development from pluripotent stem cells to functional excitatory synapses. *Nat. Neurosci.* **15**, 477–486, S1
9. Edri, R., Yaffe, Y., Ziller, M. J., Mutukula, N., Volkman, R., David, E., Jacob-Hirsch, J., Malcov, H., Levy, C., Rechavi, G., Gat-Viks, L., Meissner, A., and Elkabetz, Y. (2015) Analysing human neural stem cell ontogeny by consecutive isolation of Notch active neural progenitors. *Nat. Commun.* **6**, 6500
10. Meyer, H., Bug, M., and Bremer, S. (2012) Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system. *Nat. Cell Biol.* **14**, 117–123
11. Nalbandian, A., Llewellyn, K. J., Kitazawa, M., Yin, H. Z., Badadani, M., Khanlou, N., Edwards, R., Nguyen, C., Mukherjee, J., Mozaffar, T., Watts, G., Weiss, J., and Kimonis, V. E. (2012) The homozygote VCP(R1(5)(5)H/R(1)(5)(5)H) mouse model exhibits accelerated human VCP-associated disease pathology. *PLoS ONE* **7**, e46308
12. Imamura, H., Nhat, K. P., Togawa, H., Saito, K., Iino, R., Kato-Yamada, Y., Nagai, T., and Noji, H. (2009) Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 15651–15656
13. Ludtmann, M. H., Angelova, P. R., Ninkina, N. N., Gandhi, S., Buchman, V. L., and Abramov, A. Y. (2016) Monomeric α -synuclein exerts a physiological role on brain ATP synthase. *J. Neurosci.* **36**, 10510–10521
14. Krauss, S., Zhang, C. Y., and Lowell, B. B. (2005) The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 248–261
15. Brand, M. D., Pakay, J. L., Ocloo, A., Kokoszka, J., Wallace, D. C., Brookes, P. S., and Cornwall, E. J. (2005) The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content. *Biochem. J.* **392**, 353–362
16. Kokoszka, J. E., Waymire, K. G., Levy, S. E., Sligh, J. E., Cai, J., Jones, D. P., MacGregor, G. R., and Wallace, D. C. (2004) The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature* **427**, 461–465
17. Vieira, H. L., Haouzi, D., El Hamel, C., Jacotot, E., Belzacq, A. S., Brenner, C., and Kroemer, G. (2000) Permeabilization of the mitochondrial inner membrane during apoptosis: impact of the adenine nucleotide translocator. *Cell Death Differ.* **7**, 1146–1154
18. Zhivotovsky, B., Galluzzi, L., Kepp, O., and Kroemer, G. (2009) Adenine nucleotide translocase: a component of the phylogenetically conserved cell death machinery. *Cell Death Differ.* **16**, 1419–1425

19. Papkovskaia, T. D., Chau, K. Y., Inesta-Vaquera, F., Papkovsky, D. B., Healy, D. G., Nishio, K., Staddon, J., Duchen, M. R., Hardy, J., Schapira, A. H., and Cooper, J. M. (2012) G2019S leucine-rich repeat kinase 2 causes uncoupling protein-mediated mitochondrial depolarization. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 4201–4213
20. Weydt, P., Pineda, V. V., Torrence, A. E., Libby, R. T., Satterfield, T. F., Lazarowski, E. R., Gilbert, M. L., Morton, G. J., Bammler, T. K., Strand, A. D., Cui, L., Beyer, R. P., Easley, C. N., Smith, A. C., Krainc, D., *et al.* (2006) Thermoregulatory and metabolic defects in Huntington's disease transgenic mice implicate PGC-1 α in Huntington's disease neurodegeneration. *Cell Metab.* **4**, 349–362
21. Johnson, A. E., Shu, H., Hauswirth, A. G., Tong, A., and Davis, G. W. (2015) VCP-dependent muscle degeneration is linked to defects in a dynamic tubular lysosomal network *in vivo*. *Elife* **4**, 10.7554/eLife.07366
22. Weinbach, E. C., Sheffield, H., and Garbus, J. (1963) Restoration of oxidative phosphorylation and morphological integrity to swollen, uncoupled rat liver mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **50**, 561–568
23. Ding, W. X., Li, M., Biazik, J. M., Morgan, D. G., Guo, F., Ni, H. M., Goheen, M., Eskelinen, E. L., and Yin, X. M. (2012) Electron microscopic analysis of a spherical mitochondrial structure. *J. Biol. Chem.* **287**, 42373–42378
24. Ganote, C. E., and Armstrong, S. C. (2003) Effects of CCCP-induced mitochondrial uncoupling and cyclosporin A on cell volume, cell injury and preconditioning protection of isolated rabbit cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **35**, 749–759
25. Bobba, A., Amadoro, G., Petragallo, V. A., Calissano, P., and Atlante, A. (2013) Dissecting the molecular mechanism by which NH₂tau and A β 1–42 peptides impair mitochondrial ANT-1 in Alzheimer disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1827**, 848–860
26. Schirris, T. J., Ritschel, T., Herma Renkema, G., Willems, P. H., Smeitink, J. A., and Russel, F. G. (2015) Mitochondrial ADP/ATP exchange inhibition: a novel off-target mechanism underlying ibipinabant-induced myotoxicity. *Sci. Rep.* **5**, 14533
27. Abramov, A. Y., and Duchen, M. R. (2010) Impaired mitochondrial bioenergetics determines glutamate-induced delayed calcium deregulation in neurons. *Biochim. Biophys. Acta* **1800**, 297–304
28. Muqit, M. M., Abou-Sleiman, P. M., Saurin, A. T., Harvey, K., Gandhi, S., Deas, E., Eaton, S., Payne Smith, M. D., Venner, K., Matilla, A., Healy, D. G., Gilks, W. P., Lees, A. J., Holton, J., and Revesz, T., *et al.* (2006) Altered cleavage and localization of PINK1 to aggresomes in the presence of proteasomal stress. *J. Neurochem* **98**, 156–169
29. Sposito, T., Preza, E., Mahoney, C. J., Setó-Salvia, N., Ryan, N. S., Morris, H. R., Arber, C., Devine, M. J., Houlden, H., Warner, T. T., Bushell, T. J., Zagnoni, M., Kunath, T., Livesey, F. J., Fox, N. C., *et al.* (2015) Developmental regulation of tau splicing is disrupted in stem cell-derived neurons from frontotemporal dementia patients with the 10 + 16 splice-site mutation in MAPT. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 5260–5269
30. Wray, S., Self, M., NINDS Parkinson's Disease iPSC Consortium, NINDS Huntington's Disease iPSC Consortium, NINDS ALS iPSC Consortium, Lewis, P. A., Taanman, J. W., Ryan, N. S., Mahoney, C. J., Liang, Y., Devine, M. J., Sheerin, U. M., Houlden, H., Morris, H. R., Healy, D., *et al.* (2012) Creation of an open-access, mutation-defined fibroblast resource for neurological disease research. *PLoS ONE* **7**, e43099
31. Brown, S., Teo, A., Pauklin, S., Hannan, N., Cho, C. H., Lim, B., Vardy, L., Dunn, N. R., Trotter, M., Pedersen, R., and Vallier, L. (2011) Activin/Nodal signaling controls divergent transcriptional networks in human embryonic stem cells and in endoderm progenitors. *Stem Cells* **29**, 1176–1185
32. Vallier, L., Touboul, T., Brown, S., Cho, C., Bilican, B., Alexander, M., Cedervall, J., Chandran, S., Ahrlund-Richter, L., Weber, A., and Pedersen, R. A. (2009) Signaling pathways controlling pluripotency and early cell fate decisions of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* **27**, 2655–2666
33. Angelova, P. R., Ludtmann, M. H., Horrocks, M. H., Negoda, A., Cremades, N., Klenerman, D., Dibson, C. M., Wood, N. W., Pavlov, E. V., Ghandhi, S., and Abramov, A. Y. (2016) Calcium is a key factor in α -synuclein induced neurotoxicity. *J. Cell Sci.* **129**, 1792–1801
34. Shi, Y., Kirwan, P., and Livesey, F. J. (2012) Directed differentiation of human pluripotent stem cells to cerebral cortex neurons and neural networks. *Nat. Protoc.* **7**, 1836–1846

RESEARCH

Open Access

Endothelial-specific deficiency of megalin in the brain protects mice against high-fat diet challenge



Fernando Bartolome^{1,2*†}, Desiree Antequera^{1,2†}, Macarena de la Cueva^{1,2†}, Marcos Rubio-Fernandez^{1,2}, Nerea Castro^{1,2}, Consuelo Pascual^{1,2}, Antoni Camins^{2,3} and Eva Carro^{1,2*} 

Abstract

Background: The increasing risk of obesity and diabetes among other metabolic disorders are the consequence of shifts in dietary patterns with high caloric-content food intake. We previously reported that megalin regulates energy homeostasis using blood-brain barrier (BBB) endothelial megalin-deficient (EMD) mice, since these animals developed obesity and metabolic syndrome upon normal chow diet administration. Obesity in mid-life appears to be related to greater dementia risk and represents an increasing global health issue. We demonstrated that EMD phenotype induced impaired learning ability and recognition memory, neurodegeneration, neuroinflammation, reduced neurogenesis, and mitochondrial deregulation associated with higher mitochondrial mass in cortical tissues.

Methods: EMD mice were subjected to normal chow and high-fat diet (HFD) for 14 weeks and metabolic changes were evaluated.

Results: Surprisingly, BBB megalin deficiency protected against HFD-induced obesity improving glucose tolerance and preventing hepatic steatosis. Compared to wild type (wt), the brain cortex in EMD mice showed increased levels of the mitochondrial biogenesis regulator, peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α), and uncoupling protein 2 (UCP2), a thermogenic protein involved in the regulation of energy metabolism. This agreed with the previously found increased mitochondrial mass in the transgenic mice. Upon HFD challenge, we demonstrated these two proteins were found elevated in wt mice but reported no changes over the already increased levels in EMD animals.

Conclusion: We propose a protective role for megalin on diet-induced obesity, suggesting this could be related to metabolic disturbances found in dementia through brain endocrine system communications.

Keywords: Megalin, Leptin, Obesity, High-fat diet, Mitochondrial biogenesis

Background

Urban lifestyle conducts changes in human eating habits, in which intake of high caloric content foods come along with reduced physical activity. This context is putatively associated with many epidemic chronic diseases that have emerged in relatively recent times. For example, obesity has been found to increase in developed countries where high-calorie food intake is a major cause of

this global health problem. Food intake and energy expenditure balance modulate body weight, and this is regulated mainly through hormone leptin [1]. Leptin is internalized by the multiligand endocytic receptor megalin, also known as low-density lipoprotein receptor-related protein 2 (LRP-2) or glycoprotein 330, the largest member of the low-density lipoprotein receptor (LDLR) family [2, 3]. Megalin is expressed in several absorptive epithelial cells, and in the central nervous system (CNS) mainly in the blood-brain barrier (BBB). Because megalin binds and internalizes leptin and insulin [4–6], and megalin is expressed exclusively in brain endothelial cells, we previously set out to specifically delete the

* Correspondence: fbartolome.imas12@h12o.es; carroeva@h12o.es

[†]Fernando Bartolome, Desiree Antequera and Macarena de la Cueva contributed equally to this work.

¹Neurodegenerative Disorders Group, Instituto de Investigacion Hospital 12 de Octubre (i+12), Avda de Cordoba s/n, 28041 Madrid, Spain
Full list of author information is available at the end of the article



endothelial megalin in C57/BL6 mice using the Cre/loxP system (EMD mice) [7, 8] to explore the metabolic impact of BBB megalin deletion [9]. These EMD mice developed neurodegeneration and impaired learning and memory abilities, similar to symptoms described in AD [9]. Also, we reported this mouse model displayed obesity and metabolic syndrome, mediated by leptin signaling disruption in the hypothalamus, upon normal chow diet administration [10]. Hence, we consider this model gives the opportunity to explore and understand several overlapping and common mechanisms, including mitochondrial dysfunction, that is observed in these disorders.

Obesity in mid-life appears to be related to greater dementia risk and there are several studies reporting this connection [11–15]. This is consistent with the observed higher Alzheimer's disease (AD) incidence in world regions associated with high risk of obesity, sedentarism, diabetes, hypertension, dyslipidemia, and metabolic syndrome [16, 17]. A number of adverse neuronal effects have been observed under obese conditions [18]. Higher dietary fat intake has been associated with increased AD risk [19]. Also, using common AD mouse models, it has been found diet-induced obesity accelerates AD-related pathology [20–24]. Paradoxically, it is known that AD subjects show a hypermetabolic state accompanied by increased energy expenditure. This makes AD patients undergo a significant weight loss even when they have increased food intake [25]. These features have been observed still in patients with the preclinical condition of mild cognitive impairment (MCI) [26, 27]. In our EMD mouse model, we firstly demonstrated that BBB megalin deletion induced impaired learning ability and recognition memory, and neurodegeneration, similar to symptoms described in AD [9]. More recently, we also showed these mice displayed neuroinflammation, reduced neurogenesis and mitochondrial deregulation associated with higher mitochondrial mass in cortical tissues [10].

In the present study, we investigated the effects of HFD challenge in EMD mice compared to wt animals. We found that BBB megalin deletion preserved HFD-induced metabolic alterations and obesity. We consider it important to fully characterize EMD mice as this model constitutes a valuable obesity model, linking obesity and neurodegeneration as previously was already demonstrated that megalin deletion in brain endothelial cells could be a novel mechanism to promote neurodegeneration and obesity. Our mice model would help to understand the molecular mechanisms that may link obesity and dementia as obesity is proposed as a putative risk factor for AD.

Methods

Animals and diets

Male EMD mice were generated using the Cre/loxP system under the control of the Tie2 as previously reported

[10]. Wild-type (wt) littermates (i.e., Tie2-Cre⁻ mice) were used as controls (megalin flox/flox). EMD and control mice were housed on a 12 h light/12 h dark schedule. At the age of 3 weeks, male EMD and WT mice (16–18 per group) were provided a normal chow diet (NCD, 10% fat in kilocalories) or high-fat diet (HFD) containing 60% fat (Harlan Teklad, USA) ad libitum for 14 weeks. Body-weight was monitored weekly throughout the study. At the end of experiments, animals were anesthetized with isoflurane, blood was drawn, and perfused transcardially with saline buffer or 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4) for biochemical and immunohistochemical analysis, respectively. Then, the brain, liver, and adipose tissue were collected for further processing and stored at -80°C until analysis. The liver and adipose tissue were previously weighed. Visceral fat was collected and weighed prior to -80°C storage, and average obtained weights per group are shown expressed in grams (Fig. 1b). All animals were handled and cared for according to the Council Directive 2010/63/UE of 22 September 2010 (animal experiment license number: CEI 97–1778–A291).

Metabolic studies

Glucose tolerance test was assessed prior to sacrifice. After 14 weeks under the diets, a glucose tolerance test was performed. Briefly, mice were fasted for 16 h before receiving intraperitoneal (ip) administration of 2 g/kg body weight of glucose in saline (0.9% NaCl). Blood samples of conscious mice were taken from the tail vein at 0, 15, 30, 60, and 120 min after glucose loading, and the blood glucose levels were determined. Blood glucose measurements were performed using a glucometer (Accu-Chek, Roche, Mannheim, Germany).

The insulin-tolerance test was performed with male mice after 6 h fast. The animals were ip injected with 0.75 UI/kg body weight of insulin (Actrapid, Novo Nordisk Pharma, Bagsvaerd, Denmark). Blood glucose measurements were performed with the glucometer before the injection and at 15, 30, 60, and 120 min after the injection. Serum triglycerides (TG), total cholesterol, HDL cholesterol, non-esterified fatty acids (NEFA), leptin, and insulin were determined using commercial kits from Abcam (Abcam, Cambridge, UK) and Wako Diagnostics, (Richmon, USA).

Immunohistochemistry

Liver tissue was fixed for 24 h in 4% paraformaldehyde (PFA) by immersion. Then, liver samples were cryoprotected overnight in 30% sucrose 0.1 M phosphate buffer, frozen at -80°C , and sectioned at 20 μm using a Leica cryostat (Leica, Wetzlar, Germany). Oil Red O (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) staining was performed according to standard procedures and counterstained with hematoxylin-eosin (H-E, Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Briefly,

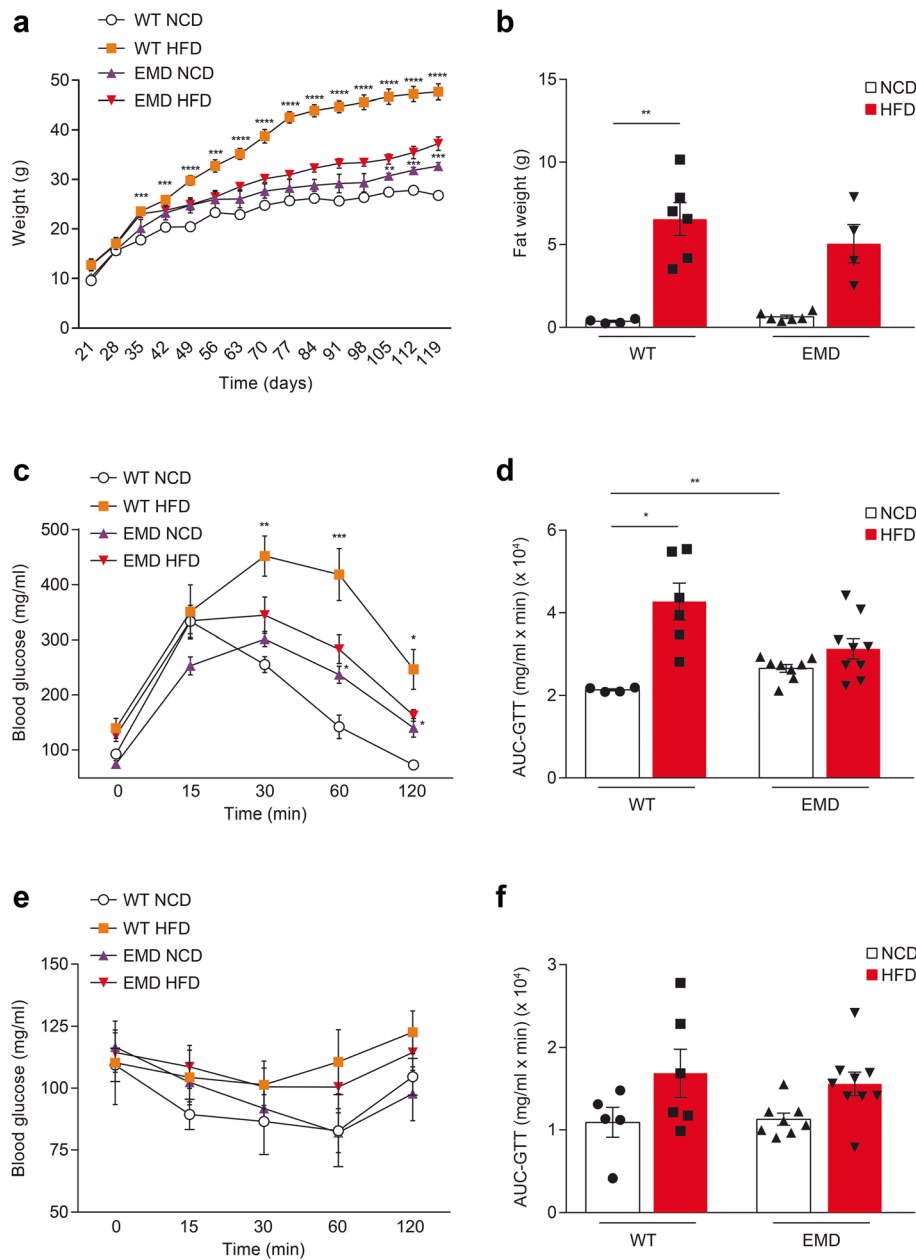


Fig. 1 EMD mice display a significant reduction in HFD-induced obesity phenotype. Wt and EMD male mice were fed with NCD or HFD for 14 weeks. **a** Under NCD, bodyweight gain during 14-week feeding was significantly increased in EMD mice compared to wt. HFD administration significantly increased body weight in both mice groups but this increase was much more significant in wt group ($n=9$, in all animal groups). **b** Fat weight in NCD-fed or HFD-fed mice at week 14. **c** Glucose tolerance test in wt and EMD mice fed with NCD or HFD for 14 weeks in the 16-h-fasted state (wt NCD, $n=5$; wt HFD, $n=6$; EMD NCD, $n=8$; EMD HFD $n=9$). **d** Scatter plots with bars represent the area under the glucose curve from the glucose tolerance test. **e** Insulin tolerance test in wt and EMD mice fed with NCD or HFD for 14 weeks in the 6-h-fasted state (wt NCD, $n=5$; wt HFD, $n=6$; EMD NCD, $n=8$; EMD HFD $n=9$). **f** Scatter plots with bars represent the area under the glucose curve from the insulin tolerance test. All data are presented as the mean \pm SEM. Statistical significance in **a**, **c** and **e** is based on multivariate ANOVA analysis followed by Games-Howell post hoc test. Statistical significance in **b**, **d**, and **f** was based on one-way ANOVA followed by Games-Howell's (**b** and **d**) or Tukey's (**f**) post hoc test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

liver sections were washed with running tap water for 10 min, rinsed with 60% isopropanol, and stained with Oil Red O mixed with 60% isopropanol for 15 min. The sections were then rinsed with 60% isopropanol, and nuclei were stained with H-E, rinsed in tap water, and

mounted in coverslips with aqueous mounting medium. Images were captured using a light microscope (Zeiss microscope; Carl Zeiss Microimaging, GmbH, Oberkochen, Germany) at $\times 40$ magnification from five different fields. Positive areas of Oil Red O

staining, corresponding to red droplets, were calculated using a color differentiation system and the result is expressed as the total area of the image using Image J software (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Western blot analysis

Protein extracts were prepared from frontal cortex cerebral tissue by mechanic homogenization in ice-cold lysis buffer NP-40 (50 mM Tris-base pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM EDTA) containing a mixture of protease and phosphatase inhibitors (Roche Applied Science, Basel, Switzerland) and centrifuged for 15 min at 14000 rpm at 4 °C. Supernatants were collected, and the total protein concentrations were estimated by BCA assay (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). Twenty micrograms from each sample were loaded in a precast 4–20% Tris-Glycine gels (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) and transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Bio-Rad, CA, USA). Then, membranes were blocked and incubated with the corresponding primary antibody: mouse monoclonal anti-Glial fibrillary acidic protein (GFAP, 1:2500; Sigma-Aldrich, G3893; St. Louis, USA); rabbit polyclonal anti-ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1, 1:1000; Wako Diagnostics, 016–20,001; Richmond, USA), mouse monoclonal anti-complex V β subunit (CxV β) (1:1000; Abcam, ab14730; Cambridge, UK), rabbit polyclonal anti-peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator 1 α (PGC-1 α ; 1:200; Santa Cruz Biotechnologies, sc13067; CA, USA), rabbit polyclonal anti-UCP-2 (1:1000; Abcam, ab203244; Cambridge, UK) and mouse monoclonal anti- β -actin (1:40000, Abcam ab49900, Cambridge, UK) to monitor protein loading control. Secondary horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse (1:5000; Bio-Rad, 170–6516; CA, USA) and goat anti-rabbit (1:5000; Thermo Fisher Scientific, A16110; MA, USA) were used. Immunoreactive bands were detected using an enhanced chemiluminescence reagent (ECL Clarity, Bio-Rad, CA, USA) using the ImageQuant TL Image Analysis system version 7.0 (LAS 4000, GE Healthcare, Chicago, IL, USA). Densitometric quantification was carried out with Image Studio Lite 5.0 software (Li-COR Biosciences, NE, USA). Protein bands were normalized to β -actin levels and expressed as a percentage of the control group.

Data analysis

Immunohistochemistry images were minimally processed in a uniform manner across treatment groups and were analyzed using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA). Results are presented in scatter plots with bars. Statistical analysis was carried out using GraphPad Prism 6.01 software (La Jolla, CA, USA) and IBM SPSS Statistics Version 21.0. (Armonk, NY, USA). Grubbs

outlier filter was used for all data and the Shapiro-Wilk normality test was carried out to check normality. When results met normality criteria one-way ANOVA and Levene's test to analyze homoscedasticity were performed in order to choose suitable post hoc analysis (Tukey's or Games-Howell's tests) to determine individual differences. When results did not meet normality criteria Kruskal-Wallis ANOVA was used. For experiments showing weight and glucose curves over time with all different conditions, a mixed ANOVA analysis was carried out and sphericity was checked with Mauchly's test. When sphericity was violated (weight and glucose results), a multivariate ANOVA analysis was conducted. When results did not meet homogeneity criteria, the Games-Howell post hoc test was carried out. A p value equal to 0.05 or less was considered statistically significant.

Results

BBB megalin deletion protects to HFD-induced obesity

Megalyn deletion in brain endothelial cells was previously shown to be a novel mechanism promoting obesity [10]. Additionally, it is known that brain megalyn deletion activates obesity-induced neuropathological mechanisms similar to those found in AD models [9, 10]. On the grounds of the observed hypermetabolic state and weight loss in AD patients even when they are under HFD intake, we wondered how HFD challenge could affect BBB megalyn deletion mouse model weight and glucose metabolism. To address this question, EMD and wt animals were fed with HFD and NCD for 4 months. Figure 1a shows weight gain in the grouped animals during this time. EMD mice fed with NCD exhibited higher weight gain compared to wt animals (Fig. 1a), equivalent to the previously reported results [10]. HFD administration induced a significant weight gain in both wt and EMD mice, but such an increase was much more representative in wt group (Fig. 1a). Although fat weight was increased in both wt and EMD mice groups 14 weeks after HFD diet administration (Fig. 1b), only wt mice showed significant fat weight gain compared to those mice fed with NCD ($P < 0.01$; Fig. 1b). The increase in fat mass in EMD mice was found 28.6% lower than that observed in wt mice (Fig. 1b). These results suggest that EMD deficiency may protect against diet-induced adiposity.

We next investigated whether fat mass gains in mice under HFD challenge would lead to improved glucose handling and insulin sensitivity. Indeed, glucose tolerance test 14 weeks after HFD administration revealed a significant protection to glucose intolerance in EMD mice compared to wt group (Fig. 1c) as HFD administration did not change the resulting area under the glucose curve (AUC-GTT) in EMD mice as occurred in wt mice ($P < 0.05$;

Fig. 1d). Similar glucose disposal rates upon insulin administration were found between groups (Fig. 1e, f). Together, these results indicate BBB megalin deletion may exert a protective effect on the HFD-induced obesity phenotype.

HFD-induced lipid dyshomeostasis is attenuated in EMD mice

Lipid homeostasis in serum was also evaluated. HFD administration resulted in increased serum triglyceride levels in both, wt ($P < 0.0001$; Fig. 2a) and EMD ($P < 0.05$; Fig. 2a) mice compared to mice fed with NCD. However, whereas high-density lipoprotein (HDL) levels in wt mice were found

increased upon HFD administration compared to NCD-fed animals ($P < 0.001$; Fig. 2b), no effect on these levels was found in HFD-fed EMD mice (Fig. 2b). Surprisingly, serum cholesterol levels remained unchanged in EMD mice compared to wt mice under NCD and as well as upon HFD administration (Fig. 2c). No differences were found in non-esterified *fatty acid* (NEFA) among the genotypes and diets (Fig. 2d).

Leptin and insulin levels in serum were found higher in EMD mice compared to wt mice upon NCD administration according to previous data (Leptin = $P < 0.05$; Fig. 2e; Insulin = $P < 0.05$; Fig. 2f). After 14 weeks of HFD, wt mice displayed a significant increase in serum leptin levels ($P < 0.01$;

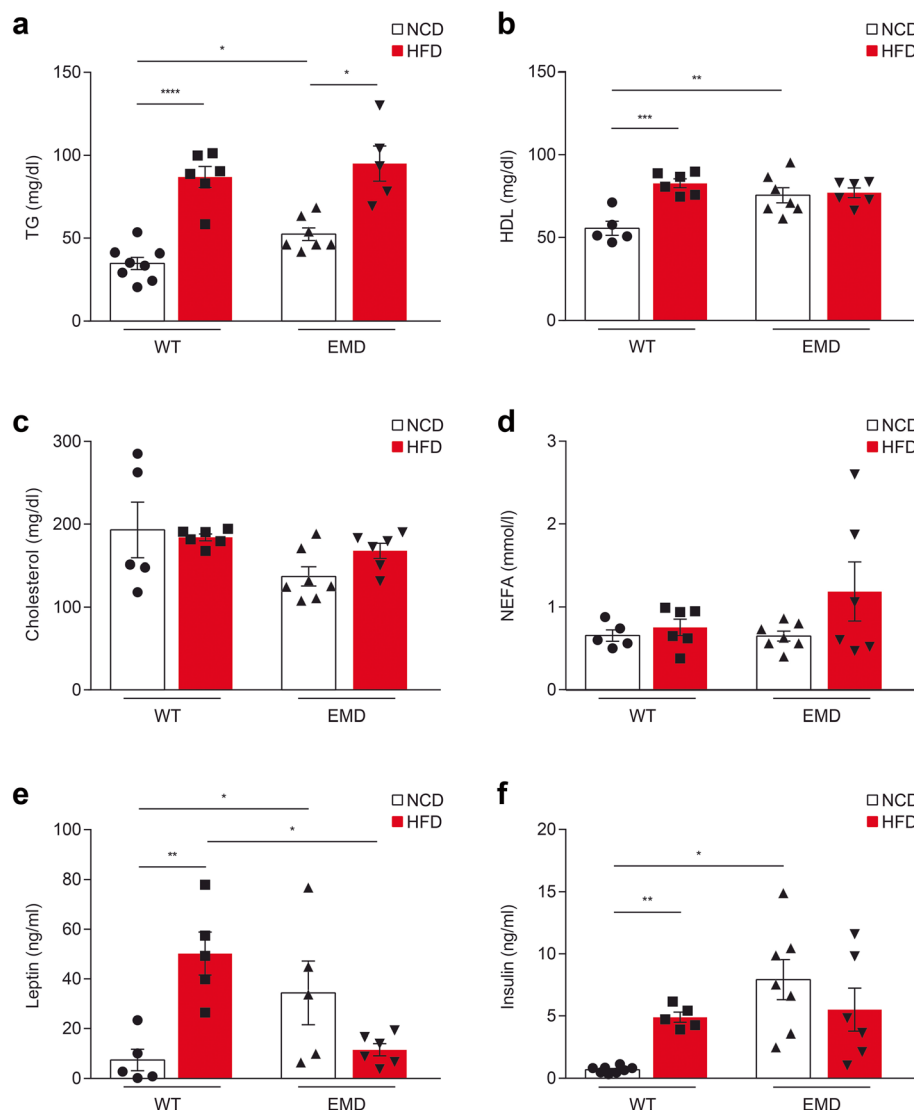


Fig. 2 Serum metabolic parameters in wt and EMD mice under NCD and HFD for 14 weeks. **(a-f)** a Triglycerides (TG), **b** high-density lipoprotein (HDL), **c** cholesterol, **d** non-esterified *fatty acid* (NEFA), **e** leptin, and **f** insulin tests in wt and EMD mice fed with NCD or HFD for 14 weeks. All data are presented as the mean ± SEM. Statistical significance was based on one-way ANOVA followed by Games-Howell's (**a, c, d, and f**) or Tukey's (**b and e**) post hoc test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

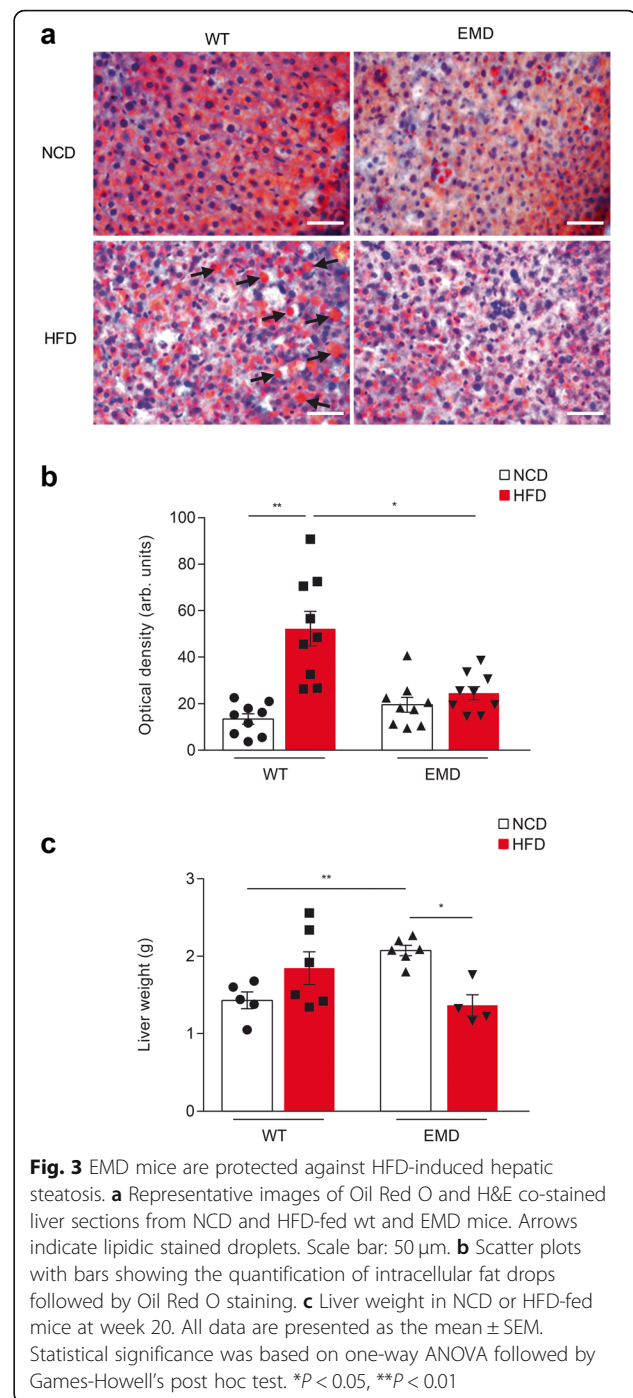
Fig. 2e), whereas HFD challenge did not change serum leptin levels in EMD mice (Fig. 2e). Serum insulin levels were also found increased in wt upon HFD ($P < 0.01$; Fig. 2f) but in EMD group, insulin levels remained unchanged after 14 weeks HFD feeding (Fig. 2f).

EMD mice display reduced liver damage upon HFD administration

Linked to lipid homeostasis is the liver health and lipid dys-homeostasis induce liver lipid accumulation. Therefore, we next analyzed lipid accumulation in mice liver sections from HFD-fed mice compared to mice fed with NCD. H&E and Oil Red O-co-staining showed an increased number of red droplets in wt but not in EMD mice upon HFD challenge indicating liver lipid accumulation and hepatic steatosis (Fig. 3a). Oil Red O histological analysis of liver sections showed a significant increase of lipid infiltration in HFD-fed wt mice compared to NCD-fed animals ($P < 0.01$; Fig. 3b). In addition, after 14 weeks of HFD feeding, EMD mice exhibited a significant reduction in liver weight ($P < 0.05$) not observed in wt mice (Fig. 3c).

HFD challenge does not affect the PGC-1 α and UCP2 brain cortex levels in EMD mice

We previously demonstrated that mitochondrial mass was increased in brains from EMD mice compared to wt animals [10]. It is known that HFD induces an increase in mitochondrial mass [28]; therefore, we wondered how HFD administration could affect mitochondrial mass levels in the frontal cerebral cortex of EMD mice. To this end, we estimated the amount of total mitochondrial mass in this brain area by analyzing the levels of the structural mitochondrial protein complex V, β subunit (CxV β) by immunoblotting (Fig. 4a). The mitochondrial mass analysis confirmed the previously reported results showing that upon NCD administration, brain cortical samples from EMD mice displayed significant elevated mitochondrial mass levels compared to wt animals ($P < 0.01$; Fig. 4a). Upon HFD administration, mitochondrial mass levels remained unchanged. Then, we analyzed PGC-1 α levels as this protein is the master regulator of mitochondrial biogenesis in order to verify whether these protein levels could be related to the observed changes in mitochondrial mass upon HFD administration. PGC-1 α was found significantly increased in EMD mice frontal cerebral cortex samples compared to samples from the same brain area in wt animals ($P < 0.01$; Fig. 4b). HFD administration induced an increase in PGC-1 α protein levels in wt mice compared with animals from the same group fed with NCD ($P < 0.05$; Fig. 4b). However, the HFD challenge did not alter PGC-1 α protein levels on EMD mice (Fig. 4b). Apart from the mitochondrial biogenesis, PGC-1 α regulates uncoupling protein-2 (UCP2), a thermogenic protein involved in the



regulation of energy metabolism. EMD mice fed with NCD showed increased UCP2 levels compared to wt mice in agreement with the highly observed PGC-1 α levels ($P < 0.05$; Fig. 4c). HFD administration to wt mice reported an increase in UCP2 levels ($P < 0.05$; Fig. 4c) reaching similar values to those observed in NCD treated EMD mice. No differences in UCP2 levels were

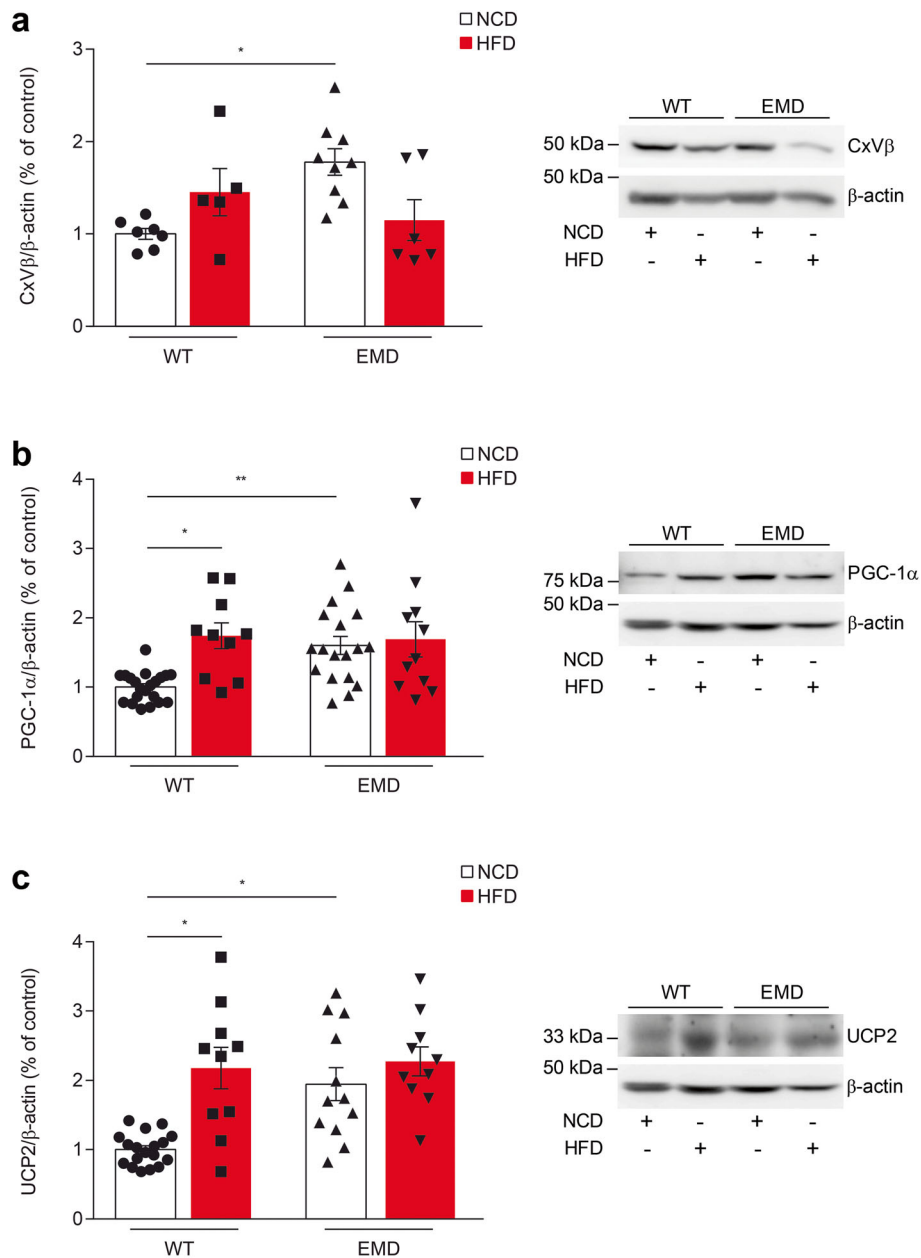


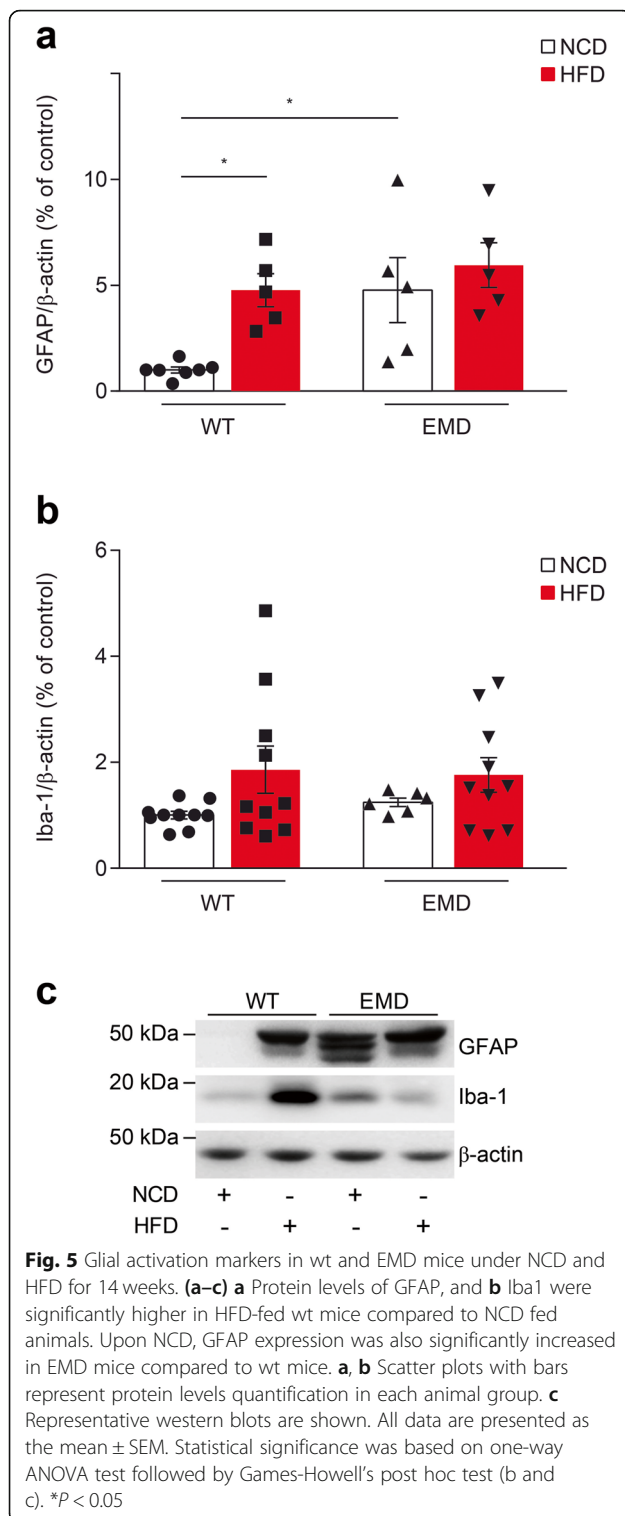
Fig. 4 HFD challenge does not affect the PGC1-1α and UCP2 cortex levels in EMD mice. **(a–c)** **a** Protein levels of Complex V-β subunit (CxVβ), **b** PGC-1α, and **c** UCP-2 were significantly higher in EMD mice cortical samples compared to samples from the same brain area in wt animals under NCD. HFD administration increased **b** PGC-1α, and **c** UCP-2 protein levels in wt mice but not in EMD mice. Scatter plots with bars represent the quantification of protein expression in each animal group, and representative western blots are shown (right panels). All data represent the mean of at least 3 independent experiments ±SEM. Statistical significance was based on the Kruskal-Wallis ANOVA test (**a**) or one-way ANOVA (**b** and **c**) followed by Games-Howell’s post hoc test (**b** and **c**). **P* < 0.05, ***P* < 0.01

observed in EMD mice, indicating this pathway could be already activated (Fig. 4c).

HFD challenge does not affect glial activation in EMD mice

It is known that diet-induced obesity triggers glial activation. A recent study reported a link between

mitochondrial dynamics and inflammation, showing that HFD induced an increase in UCP2 expression that mediates neuroinflammation [29]. We then tested astrocyte and microglial inflammatory markers in frontal cerebral cortex from wt and EMD mice upon HFD challenge. Consistent with our previous work [10], we found



significant higher GFAP levels, in the cerebral cortex of NCD-fed EMD mice compared to wt mice ($P < 0.05$; Fig. 5a, c) indicating astrogliosis. Upon HFD administration we also found significantly increased GFAP levels in the cerebral cortex of wt mice, compared to NCD-fed

animals ($P < 0.05$; Fig. 5a, c) but no changes upon HFD administration were found in EMD mice. The analysis of Iba-1 levels did not report significant differences between mice groups (Fig. 5b, c) although a trend of increased levels was found upon HFD administration in both of them.

Discussion

Endocytic multiligand receptor megalin internalizes leptin, a hormone modulator of body weight through the balance of food intake and energy expenditure [1]. Here, we show that the HFD-induced obesity phenotype is attenuated in EMD mice compared to wt-fed animals. We found that HFD-fed EMD mice developed reduced body weight gain and improved glucose tolerance. About fat body composition, several interesting observations were observed. High fat diet-fed wt mice demonstrated hyperinsulinemia and hyperleptinemia as well as elevated circulating triglyceride levels, and hepatic steatosis in comparison with control diet-fed mice, consistent with previous studies [30]. However, over the 14 weeks HFD-treatment period, EMD mice exhibited less overweight, and fat gain compared with wt mice, and contrary to expected, leptin and insulin levels did not change. Also, HFD-fed EMD mice did not show hepatic steatosis. Up-regulation of PGC-1 α and thermogenic protein UCP2 was observed in the brain cortex from HFD-fed wt mice. Such increases were not apparent in EMD mice as both PGC-1 α and UCP2 levels were found already increased with normal chow diet. This result is consistent with the previously reported increased mitochondrial mass detected in EMD mice compared to wt as PGC-1 α is a master regulator of mitochondrial biogenesis. Our results suggest BBB endothelial megalin deletion protects HFD-induced obesity in mice, insulin resistance and hepatic steatosis through brain endocrine system communications.

Our present study agrees with previous findings that identify LRP-6 as bodyweight and glucose metabolism regulator [31]. In that study, authors reported that LRP6^{+/-} mice on high-fat diet are protected against diet-induced obesity. We previously demonstrated that the silencing of megalin in the mouse brain endothelium was sufficient to increase the weight gain and adiposity triggering hyperleptinemia, hyperinsulinemia, increased triglyceride blood levels, and impaired glucose tolerance [10]. Additionally, we provided evidences supporting megalin as physiological energy balance regulator in agreement with other works [32–34].

Megalin knockout mice manifest abnormalities in the development of brain and other tissues, including lung and kidney [35]. This phenotype is consistent with a role of megalin as endocytic receptor that mediates the cellular uptake of essential nutrients, possibly lipoproteins-

derived cholesterol. A series of preceding biochemical and experimental studies have provided compelling evidence showing that megalin plays an important role in modulating protein and lipids transport [4]. Indeed, several studies revealed that megalin can also act as a receptor to transport leptin in the renal epithelium [6, 36]. Additionally, in a previous work, we showed that leptin entry into the brain occurs through its binding to megalin and the effects of blocking megalin expression indicated that leptin needs megalin to exert its function in the brain [5]. Then, food intake regulation and subsequent energy balance depend on the efficiency of leptin delivery in CNS [37]. There are not consistent results regarding the effects of high-fat diet administration compared to standard diets on triglyceride levels. Guo et al. showed mice fed for 7 weeks with obesogenic diets (60% high fat diet enriched) exhibited lower serum triglyceride levels compared with normal chow diet [38]. Contrarily, in a previous work, we demonstrated western-style high fat diet in rats fed during 1 and 3 months increased lipid profile levels including triglycerides and HDL compared to rats fed with a standard diet [39]. We confirm here the obesity phenotype in EMD mice as they show increased triglyceride levels along with hyperleptinemia and hyperinsulinemia. We did not find changes in NEFA levels between groups and diets.

Although cholesterol levels between EMD mice and wt were not found different, other blood metabolic parameters showed typical obese phenotype as increased triglyceride levels, increased insulin and increased leptin levels. Surprisingly, increased HDL levels were also found to increase in EMD mice compared to wt. This may account for undetectable differences in cholesterol levels between EMD and wt mice. Upon HFD administration wt mice showed increased blood levels of triglycerides, insulin and leptin, and also HDL, while EMD mice only showed enhanced triglyceride levels but did not show changes in the already increased insulin, leptin, and HDL blood levels. Since megalin mediates HDL endocytosis [40], the lack of this receptor in EMD mice may impair HDL brain uptake resulting in the observed high circulating HDL levels, regardless of feeding. Our results here agree with those from Dietrich et al., as we found wt mice exhibited increased triglyceride and HDL levels after HFD administration. As was demonstrated in previous works, we may speculate such controversy comes from the timing of HFD feeding, animal strain and/or diet composition [41, 42]. Under NCD, EMD mice showed significantly increased serum HDL and triglyceride levels compared with WT mice.

Diet-induced obesity is a well-known model of hyperleptinemia and central leptin resistance [43, 44]. In rodents, high-fat intake may be associated with increased serum leptin and obesity, and these leptin levels are

related to the body lipid content. In the present study, EMD mice showed no changes in serum leptin concentrations after HFD. As EMD mice showed lower fat gain with HFD and leptin is secreted in proportion to fat stores [45], it is possible that EMD mice are more efficient maintaining leptin sensitivity compared to wt mice throughout the course of the HFD administration period even to show leptin levels reduction.

Diet-induced obesity also predisposes individuals to insulin resistance [46]. Elevations in circulating insulin were evident in both mouse models of obesity used in our study: genetic (EMD mice) and diet-induced obesity model (HFD-fed wt mice). The present findings are important because hyperinsulinemia is a risk factor for many, if not all, symptoms used to sort out the metabolic syndrome and elevated insulin levels have been suggested to be a causal factor for obesity [47, 48].

An increase in liver fat content has been shown to predict insulin resistance. It is generally thought that hepatic steatosis is developed via peripheral mechanisms associated with obesity [49]. However, in our present study, we show that EMD mice did not exhibit liver steatosis. Some evidences indicate that experimental exercise can prevent steatosis in HFD-induced obesity [50, 51]. Here we report increased anxiety behavior in NCD-fed EMD mice. This was demonstrated in experiments carried out using the elevated plus maze. EMD showed increased number of entries and time spent in the open arms. These results indicated that EMD mice are more prone to physical activity. This finding connecting increased anxiety in EMD mice and greater physical activity may likely contribute to attenuate their liver steatosis.

Mitochondrial bioenergetics may be influenced by insulin signaling [52]. At least in some tissues, impaired mitochondrial function causes insulin resistance [53]. Our previous work showed endothelial BBB megalin deletion was associated with deficient mitochondrial complex I in the brain cortex but increased mitochondrial mass [10]. Then, we proposed that such mitochondrial mass increase in EMD mice could be a consequence of higher mitochondrial biogenesis. Indeed, here, we verified PGC-1 α levels were increased in frontal cerebral cortex from EMD mice. PGC-1 α is expressed in the brain, including the cerebral cortex, and hippocampus [54, 55] and this protein is the master regulator for mitochondrial biogenesis. Therefore, cells may compensate for the energetic deficit due to reduced complex I levels by increasing the mitochondrial biogenesis. HFD administration increased the PGC-1 α levels in wt mice and therefore the mitochondrial biogenesis was found upregulated. However, HFD did not affect the mitochondrial biogenesis already increased in EMD mice. Although this is controversial, several previous works demonstrated similar features showing increased

mitochondrial content in skeletal muscle after HFD administration [28, 56, 57] suggesting such increase in the mitochondrial content could be beneficial for improving insulin resistance at the beginning of HFD [58]. In addition, we also found increased UCP2 levels in EMD mice compared to wt animals, and HFD induced an increase of these protein levels in wt mice but did not affect the already increased levels in EMD mice. PGC-1 α regulates UCP2 protein expression and this protein plays an important role in the regulation of energy metabolism restoring glucose intolerance and insulin resistance [59, 60]. Regarding glucose metabolism, PGC-1 α has been associated with glucose intolerance and insulin resistance as has been demonstrated using PGC-1 α knockout mice [61]. For example, loss of function or lower expression levels of PGC-1 α has been associated with increased risk of type 2 diabetes [62]. As suggested by Summermatter et al., PGC-1 α could be involved in glucose refueling and body lactate homeostasis [63]. Mitochondrial uncoupling proteins as UCP2 could also regulate glucose homeostasis and lipid metabolism [64]. UCPs increases their neuronal expression induced by metabolic changes and several works link UCP2 levels in the brain and systemic metabolic abnormalities. For example, UCP2 was found to increase in cerebral cortex mitochondria after exercise [65]. UCP2 is involved in central autonomic, endocrine, and metabolic regulation and is thus associated with cognition, mood, and behavior [66, 67]. UCP2 in the ventromedial nucleus restores glucose tolerance and regulates insulin sensitivity mediated by glucose-excited neurons, which is important for the physiological control of systemic glucose metabolism [68]. We may propose that metabolic changes in EMD mice induce elevated PGC-1 α and UCP2 brain cortical expression and we may hypothesize such elevated expression could be considered a potential prevention mechanism against HFD challenge trying to compensate defective mitochondria. This potential prevention mechanism may be extensible against the brain inflammation pathways as EMD mice exposed to HFD did not show evidence of increased glial activation compared with mice from the same group exposed to NCD. This protective effect might be the result of higher energy expenditure, based on the levels of the thermogenic factor PGC-1 α that were found significantly increased in the brain cortex from EMD mice compared to wt.

Conclusion

In summary, EMD mice recapitulate several features found in human dementia as AD, suggesting megalin as a control gate for metabolic homeostasis. We may conclude that the metabolic phenotype of HFD-fed EMD mice may be, at least in part, explained by improved glucose tolerance.

Abbreviations

AD: Alzheimer's disease; BBB: Blood-brain barrier; CNS: Central nervous system; Cxv β : Mitochondrial complex V, β subunit; EMD: Endothelial megalin deficient; HDL: High-density lipoprotein; HFD: High-fat diet; LRP: Low-density lipoprotein receptor-related protein receptor; NCD: Normal chow diet; NEFA: Non-esterified fatty acids; PGC-1 α : Transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor α coactivator; TG: Triglyceride; UCP2: Uncoupling protein-2

Acknowledgements

Not applicable.

Authors' contributions

FB and EC were responsible for experimental designs, data interpretation, and writing of the paper. DA performed most of the in vivo experiments, and NC and CP helped and participated in metabolic studies. M de la C performed western blot assays. AC contributed feedback to the manuscript. EC obtained the funding. All authors reviewed and corrected the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This study was supported by grants from the *Instituto de Salud Carlos III* (PI15/00780; PI18/00118), *FEDER, CIBERNED* (PI2016/01), and S2017/BMD-3700 (NEUROMETAB-CM) from Comunidad de Madrid co-financed with the Structural Funds of the European Union.

Availability of data and materials

The datasets supporting the conclusions of this article are included within the article and its additional files.

Ethics approval and consent to participate

Animal procedures are in compliance with the European Directive 2010/63/EU of 22 September 2010.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Neurodegenerative Disorders Group, Instituto de Investigacion Hospital 12 de Octubre (i+12), Avda de Cordoba s/n, 28041 Madrid, Spain. ²Network Center for Biomedical Research in Neurodegenerative Diseases, CIBERNED, Madrid, Spain. ³Unitat de Farmacologia i Farmacognosia, Facultat de Farmacia, Institut de Biomedicina de la UB (IBUB), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

Received: 13 September 2019 Accepted: 6 January 2020

Published online: 14 January 2020

References

- Coll AP, Farooqi IS, O'Rahilly S. The hormonal control of food intake. *Cell*. 2007;129:251–62.
- Jaeger S, Pietrzik CU. Functional role of lipoprotein receptors in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2008;5:15–25.
- May P, Woldt E, Matz RL, Boucher P. The LDL receptor-related protein (LRP) family: an old family of proteins with new physiological functions. *Ann Med*. 2007;39:219–28.
- Moestrup SK, Verroust PJ. Megalin- and cubilin-mediated endocytosis of protein-bound vitamins, lipids, and hormones in polarized epithelia. *Annu Rev Nutr*. 2001;21:407–28.
- Dietrich MO, Spuch C, Antequera D, Rodal I, de Yébenes JG, Molina JA, Bermejo F, Carro E. Megalin mediates the transport of leptin across the blood-CSF barrier. *Neurobiol Aging*. 2008;29:902–12.
- Hama H, Saito A, Takeda T, Tanuma A, Xie Y, Sato K, Kazama JJ, Gejyo F. Evidence indicating that renal tubular metabolism of leptin is mediated by megalin but not by the leptin receptors. *Endocrinology*. 2004;145:3935–40.
- Sauer B, Henderson N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85:5166–70.

8. Sauer B. Manipulation of transgenes by site-specific recombination: use of Cre recombinase. *Methods Enzymol.* 1993;225:890–900.
9. Dietrich M, Antequera D, Pascual C, Castro N, Bolos M, Carro E. Alzheimer's disease-like impaired cognition in endothelial-specific megalin-null mice. *J Alzheimers Dis.* 2014;39:711–7.
10. Bartolome F, Antequera D, Tavares E, Pascual C, Maldonado R, Camins A, Carro E. Obesity and neuroinflammatory phenotype in mice lacking endothelial megalin. *J Neuroinflammation.* 2017;14:26.
11. Anstey KJ, Cherbuin N, Budge M, Young J. Body mass index in midlife and late-life as a risk factor for dementia: a meta-analysis of prospective studies. *Obes Rev.* 2011;12:e426–37.
12. Fitzpatrick AL, Kuller LH, Lopez OL, Diehr P, O'Meara ES, Longstreth WT Jr, Luchsinger JA. Midlife and late-life obesity and the risk of dementia: cardiovascular health study. *Arch Neurol.* 2009;66:336–42.
13. Hassing LB, Dahl AK, Pedersen NL, Johansson B. Overweight in midlife is related to lower cognitive function 30 years later: a prospective study with longitudinal assessments. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2010;29:543–52.
14. Hassing LB, Dahl AK, Thorvaldsson V, Berg S, Gatz M, Pedersen NL, Johansson B. Overweight in midlife and risk of dementia: a 40-year follow-up study. *Int J Obes.* 2009;33:893–8.
15. Whitmer RA, Gunderson EP, Barrett-Connor E, Quesenberry CP Jr, Yaffe K. Obesity in middle age and future risk of dementia: a 27 year longitudinal population based study. *BMJ.* 2005;330:1360.
16. Kalmijn S, Launer LJ, Ott A, Witteman JC, Hofman A, Breteler MM. Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam study. *Ann Neurol.* 1997;42:776–82.
17. Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet.* 2005;366:2112–7.
18. Lee EB, Mattson MP. The neuropathology of obesity: insights from human disease. *Acta Neuropathol.* 2014;127:3–28.
19. Luchsinger JA, Tang MX, Shea S, Mayeux R. Caloric intake and the risk of Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2002;59:1258–63.
20. Barron AM, Rosario ER, Elteriefi R, Pike CJ. Sex-specific effects of high fat diet on indices of metabolic syndrome in 3xTg-AD mice: implications for Alzheimer's disease. *PLoS One.* 2013;8:e78554.
21. Ho L, Qin W, Pompl PN, Xiang Z, Wang J, Zhao Z, Peng Y, Cambareli G, Rocher A, Mobbs CV, et al. Diet-induced insulin resistance promotes amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J.* 2004;18:902–4.
22. Julien C, Tremblay C, Phivilay A, Berthiaume L, Emond V, Julien P, Calon F. High-fat diet aggravates amyloid-beta and tau pathologies in the 3xTg-AD mouse model. *Neurobiol Aging.* 2010;31:1516–31.
23. Kohjima M, Sun Y, Chan L. Increased food intake leads to obesity and insulin resistance in the tg2576 Alzheimer's disease mouse model. *Endocrinology.* 2010;151:1532–40.
24. Orr ME, Salinas A, Buffenstein R, Oddo S. Mammalian target of rapamycin hyperactivity mediates the detrimental effects of a high sucrose diet on Alzheimer's disease pathology. *Neurobiol Aging.* 2014;35:1233–42.
25. Gillette-Guyonnet S, Secher M, Vellas B. Nutrition and neurodegeneration: epidemiological evidence and challenges for future research. *Br J Clin Pharmacol.* 2013;75:738–55.
26. Sergi G, De Rui M, Coin A, Inelmen EM, Manzato E. Weight loss and Alzheimer's disease: temporal and aetiological connections. *Proc Nutr Soc.* 2013;72:160–5.
27. Wang PN, Yang CL, Lin KN, Chen WT, Chwang LC, Liu HC. Weight loss, nutritional status and physical activity in patients with Alzheimer's disease. A controlled study. *J Neurol.* 2004;251:314–20.
28. Jain SS, Paglialunga S, Vigna C, Ludzki A, Herbst EA, Lally JS, Schrauwen P, Hoeks J, Tupling AR, Bonen A, Holloway GP. High-fat diet-induced mitochondrial biogenesis is regulated by mitochondrial-derived reactive oxygen species activation of CaMKII. *Diabetes.* 2014;63:1907–13.
29. Kim JD, Yoon NA, Jin S, Diano S. Microglial UCP2 mediates inflammation and obesity induced by high-fat feeding. *Cell Metab.* 2019;30:952–62 e955.
30. Hoffer U, Hobbie K, Wilson R, Bai R, Rahman A, Malarkey D, Travlos G, Ghanayem BI. Diet-induced obesity is associated with hyperleptinemia, hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and glomerulopathy in C57Bl/6J mice. *Endocrine.* 2009;36:311–25.
31. Liu W, Singh R, Choi CS, Lee HY, Keramati AR, Samuel VT, Lifton RP, Shulman GI, Mani A. Low density lipoprotein (LDL) receptor-related protein 6 (LRP6) regulates body fat and glucose homeostasis by modulating nutrient sensing pathways and mitochondrial energy expenditure. *J Biol Chem.* 2012;287:7213–23.
32. Gil SY, Youn BS, Byun K, Huang H, Namkoong C, Jang PG, Lee JY, Jo YH, Kang GM, Kim HK, et al. Clusterin and LRP2 are critical components of the hypothalamic feeding regulatory pathway. *Nat Commun.* 2013;4:1862.
33. Perez-Pinzon MA, Stetler RA, Fiskum G. Novel mitochondrial targets for neuroprotection. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012;32:1362–76.
34. Schottl T, Kappler L, Fromme T, Klingenspor M. Limited OXPHOS capacity in white adipocytes is a hallmark of obesity in laboratory mice irrespective of the glucose tolerance status. *Mol Metab.* 2015;4:631–42.
35. Willnow TE, Hilpert J, Armstrong SA, Rohlmann A, Hammer RE, Burns DK, Herz J. Defective forebrain development in mice lacking gp330/megalyn. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:8460–4.
36. Christensen EI, Birn H. Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3:256–66.
37. Davis JF, Choi DL, Schurdak JD, Fitzgerald MF, Clegg DJ, Lipton JW, Figlewicz DP, Benoit SC. Leptin regulates energy balance and motivation through action at distinct neural circuits. *Biol Psychiatry.* 2011;69:668–74.
38. Guo J, Jou W, Gavrilova O, Hall KD. Persistent diet-induced obesity in male C57BL/6 mice resulting from temporary obesigenic diets. *PLoS One.* 2009;4:e5370.
39. Dietrich MO, Muller A, Bolos M, Carro E, Perry ML, Portela LV, Souza DO, Torres-Aleman I. Western style diet impairs entrance of blood-borne insulin-like growth factor-1 into the brain. *NeuroMolecular Med.* 2007;9:324–30.
40. Hammad SM, Barth JL, Knaak C, Argraves WS. Megalin acts in concert with cubilin to mediate endocytosis of high density lipoproteins. *J Biol Chem.* 2000;275:12003–8.
41. Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring).* 2007;15:798–808.
42. Van Heek M, Compton DS, France CF, Tedesco RP, Fawzi AB, Graziano MP, Sybertz EJ, Strader CD, Davis HR Jr. Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. *J Clin Invest.* 1997;99:385–90.
43. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and Ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med.* 1995;1:1155–61.
44. Munzberg H, Flier JS, Bjorbaek C. Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology.* 2004;145:4880–9.
45. Jequier E. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;967:379–88.
46. Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2000;106:473–81.
47. Mehran AE, Templeman NM, Brigidi GS, Lim GE, Chu KY, Hu X, Bottezelli JD, Asadi A, Hoffman BG, Kieffer TJ, et al. Hyperinsulinemia drives diet-induced obesity independently of brain insulin production. *Cell Metab.* 2012;16:723–37.
48. Unger RH. Reinventing type 2 diabetes: pathogenesis, treatment, and prevention. *JAMA.* 2008;299:1185–7.
49. Yki-Jarvinen H. Fat in the liver and insulin resistance. *Ann Med.* 2005;37:347–56.
50. Lesser IA, Dick T, Gasevic D, Mackey DC, Leipsic JA, Lear SA. The association between physical activity and liver fat after five years of follow-up in a primary prevention multi-ethnic cohort. *Prev Med.* 2014;67:199–203.
51. Tetri LH, Basaranoglu M, Brunt EM, Yerian LM, Neuschwander-Tetri BA. Severe NAFLD with hepatic necroinflammatory changes in mice fed trans fats and a high-fructose corn syrup equivalent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008;295:G987–95.
52. Morino K, Petersen KF, Shulman GI. Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. *Diabetes.* 2006;55(Suppl 2):S9–S15.
53. Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2004;350:664–71.
54. Siteneski A, Cunha MP, Lieberknecht V, Pazini FL, Gruhn K, Brocardo PS, Rodrigues ALS. Central irisin administration affords antidepressant-like effect and modulates neuroplasticity-related genes in the hippocampus and prefrontal cortex of mice. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry.* 2018;84:294–303.
55. Wrann CD, White JP, Salogiannis J, Laznik-Bogoslavski D, Wu J, Ma D, Lin JD, Greenberg ME, Spiegelman BM. Exercise induces hippocampal BDNF through a PGC-1alpha/FNDC5 pathway. *Cell Metab.* 2013;18:649–59.
56. Hancock CR, Han DH, Chen M, Terada S, Yasuda T, Wright DC, Holloszy JO. High-fat diets cause insulin resistance despite an increase in muscle mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:7815–20.

57. Turner N, Bruce CR, Beale SM, Hoehn KL, So T, Rolph MS, Cooney GJ. Excess lipid availability increases mitochondrial fatty acid oxidative capacity in muscle: evidence against a role for reduced fatty acid oxidation in lipid-induced insulin resistance in rodents. *Diabetes*. 2007;56:2085–92.
58. Benton CR, Holloway GP, Han XX, Yoshida Y, Snook LA, Lally J, Glatz JF, Luiken JJ, Chabowski A, Bonen A. Increased levels of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha (PGC-1alpha) improve lipid utilisation, insulin signalling and glucose transport in skeletal muscle of lean and insulin-resistant obese Zucker rats. *Diabetologia*. 2010; 53:2008–19.
59. Coppola A, Liu ZW, Andrews ZB, Paradis E, Roy MC, Friedman JM, Ricquier D, Richard D, Horvath TL, Gao XB, Diano S. A central thermogenic-like mechanism in feeding regulation: an interplay between arcuate nucleus T3 and UCP2. *Cell Metab*. 2007;5:21–33.
60. St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jager S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, et al. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell*. 2006;127: 397–408.
61. Kleiner S, Mepani RJ, Laznik D, Ye L, Jurczak MJ, Jornayvaz FR, Estall JL, Chatterjee Bhowmick D, Shulman GI, Spiegelman BM. Development of insulin resistance in mice lacking PGC-1alpha in adipose tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:9635–40.
62. Hara K, Tobe K, Okada T, Kadowaki H, Akanuma Y, Ito C, Kimura S, Kadowaki T. A genetic variation in the PGC-1 gene could confer insulin resistance and susceptibility to type II diabetes. *Diabetologia*. 2002;45:740–3.
63. Summermatter S, Santos G, Perez-Schindler J, Handschin C. Skeletal muscle PGC-1alpha controls whole-body lactate homeostasis through estrogen-related receptor alpha-dependent activation of LDH B and repression of LDH A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:8738–43.
64. Vimalaswaran KS, Radha V, Ghosh S, Majumder PP, Sathyanarayana Rao MR, Mohan V. Uncoupling protein 2 and 3 gene polymorphisms and their association with type 2 diabetes in asian indians. *Diabetes Technol Ther*. 2011;13:19–25.
65. Marques-Aleixo I, Santos-Alves E, Balca MM, Moreira PI, Oliveira PJ, Magalhaes J, Ascensao A. Physical exercise mitigates doxorubicin-induced brain cortex and cerebellum mitochondrial alterations and cellular quality control signaling. *Mitochondrion*. 2016;26:43–57.
66. Diano S, Urbanski HF, Horvath B, Bechmann I, Kagiya A, Nemeth G, Naftolin F, Warden CH, Horvath TL. Mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) in the nonhuman primate brain and pituitary. *Endocrinology*. 2000;141:4226–38.
67. Wang D, Zhai X, Chen P, Yang M, Zhao J, Dong J, Liu H. Hippocampal UCP2 is essential for cognition and resistance to anxiety but not required for the benefits of exercise. *Neuroscience*. 2014;277:36–44.
68. Toda C, Kim JD, Impellizzeri D, Cuzzocrea S, Liu ZW, Diano S. UCP2 regulates mitochondrial fission and ventromedial nucleus control of glucose responsiveness. *Cell*. 2016;164:872–83.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions





OPEN

Annexin A5 prevents amyloid- β -induced toxicity in choroid plexus: implication for Alzheimer's disease

Fernando Bartolome^{1,2,12}✉, Agnieszka Krzyzanowska^{2,12}, Macarena de la Cueva^{1,2}, Consuelo Pascual², Desiree Antequera^{1,2}, Carlos Spuch³, Alberto Villarejo-Galende^{1,2,4}, Alberto Rabano⁵, Juan Fortea^{1,6,7}, Daniel Alcolea^{1,6,7}, Alberto Lleó^{1,6,7}, Isidro Ferrer^{1,8,9}, John Hardy¹⁰, Andrey Y. Abramov¹¹ & Eva Carro^{1,2}✉

In Alzheimer's disease (AD) amyloid- β (A β) deposits may cause impairments in choroid plexus, a specialised brain structure which forms the blood–cerebrospinal fluid (CSF) barrier. We previously carried out a mass proteomic-based study in choroid plexus from AD patients and we found several differentially regulated proteins compared with healthy subjects. One of these proteins, annexin A5, was previously demonstrated implicated in blocking A β -induced cytotoxicity in neuronal cell cultures. Here, we investigated the effects of annexin A5 on A β toxicity in choroid plexus. We used choroid plexus tissue samples and CSF from mild cognitive impairment (MCI) and AD patients to analyse A β accumulation, cell death and annexin A5 levels compared with control subjects. Choroid plexus cell cultures from rats were used to analyse annexin A5 effects on A β -induced cytotoxicity. AD choroid plexus exhibited progressive reduction of annexin A5 levels along with progressive increased A β accumulation and cell death as disease stage was higher. On the other hand, annexin A5 levels in CSF from patients were found progressively increased as the disease stage increased in severity. In choroid plexus primary cultures, A β administration reduced endogenous annexin A5 levels in a time-course dependent manner and simultaneously increased annexin A5 levels in extracellular medium. Annexin A5 addition to choroid plexus cell cultures restored the A β -induced impairments on autophagy flux and apoptosis in a calcium-dependent manner. We propose that annexin A5 would exert a protective role in choroid plexus and this protection is lost as A β accumulates with the disease progression. Then, brain protection against further toxic insults would be jeopardised.

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder and the most common cause of dementia in elderly^{1,2}. The imbalance between amyloid- β (A β) peptide generation from amyloid precursor protein³ and clearance, induces its accumulation, aggregation, and deposition in the brain, which is thought to be an early and main pathogenic event in AD^{2,4}. Besides accumulation and production in specific parenchyma areas, such as hippocampus and cortex, and blood vessels⁵, A β also accumulates in choroid plexus^{6,7}. More specifically it was demonstrated that A β may be additionally produced and degraded in choroid plexus along with other brain areas^{8–10}. Choroid plexus is a monolayer of specialised epithelial cells in the brain ventricles forming the blood – cerebrospinal fluid (CSF) barrier. The choroid plexus main function is to produce and secrete CSF (CSF turnover)

¹Networking Biomedical Research Center on Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Madrid, Spain. ²Group of Neurodegenerative Diseases, Hospital 12 de Octubre Research Institute (imas12), Madrid, Spain. ³Neuroscience Translational Group, Galicia Sur Health Research Institute, SERGAS-Universidad de Vigo; CIBERSAM, Vigo, Spain. ⁴Neurology service Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain. ⁵Department of Neuropathology and Tissue Bank, Unidad de Investigación Proyecto Alzheimer, Fundación CIEN, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. ⁶Memory Unit, Neurology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain. ⁷Institut d'Investigacions Biomediques Sant Pau - Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. ⁸IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge, Hospitalet de Llobregat, Hospitalet de Llobregat, Spain. ⁹Universitat de Barcelona, Hospitalet de Llobregat, Hospitalet de Llobregat, Spain. ¹⁰Department of Neurodegenerative Disease, UCL Queen Square Institute of Neurology, London, United Kingdom. ¹¹Department of Clinical and Movement Neurosciences, UCL Queen Square Institute of Neurology, London, United Kingdom. ¹²These authors contributed equally: Fernando Bartolome and Agnieszka Krzyzanowska. ✉e-mail: fbartolome.imas12@h12o.es; carroeva@h12o.es

protecting therefore CSF against external toxic insults. Works carried out by Jean Marie Serot *et al.*, found choroid plexus functions of secretion, synthesis, and transport were deteriorated in AD as they observed morphological modifications including epithelial atrophy, fibrosis and calcifications of stroma, and thickened basement membrane¹¹. These impairments resulted in lower turnover and CSF stasis, reduced transthyretin levels, a sequestering protein synthesised by choroid plexus, and oligomerisation and subsequent accumulation of A β (reviewed in¹²). Also, it was demonstrated that A β peptides accumulation in choroid plexus is largely responsible for an increased level of oxidative stress and cell death^{7,13}. A decreased activity of enzymes involved in oxidative phosphorylation¹⁴ and mitochondrial activity⁷, may also contribute to impair protein synthesis in choroid plexus. The observed decrease in the choroid plexus functional activity would be partially correlated with reduced protein secretion and mentioned CSF renewal, which may be involved in the initiation and progression of AD¹². Although the detailed mechanism of A β -induced toxicity in choroid plexus is unclear, perturbation of Ca²⁺ homeostasis, and destabilisation of cellular metabolism by pronounced membrane permeabilisation might likely play an important role.

Annexin A5, a Ca²⁺-regulated, phospholipid-binding protein belongs to the annexins superfamily. This protein is abundantly expressed in a wide range of tissues¹⁵ with intra- and extracellular locations¹⁶. Although annexin A5 is extensively used as an indicator of early apoptosis, it was demonstrated that annexin A5 exerts protective functions including inhibition of proinflammatory response and improvement of cardiac function and survival during endotoxemia in mice¹⁷. Also, annexin A5 was found interacting with amyloidogenic proteins reducing its toxicity in neurodegenerative diseases and type II diabetes mellitus¹⁸. It was also shown annexin A5 provided protection against A β cytotoxicity, and it was proposed that this effect occurs by competitive interaction with phosphatidylserine (PS) on the membrane surface^{19–21}.

Annexins are predominately located within the cell, where they mediate cellular processes such as exocytosis and endocytosis, membrane structure and generation of lipid rafts, but also extracellular roles such as inflammation^{22,23}. Particularly, it was reported annexin A5 has antithrombotic properties, reducing vascular inflammation and improving endothelial function^{24–26}. Annexin A5 was proposed as biomarker in heart injury²⁷ and also in nephrotic syndrome²⁸. Moreover, annexin A5 was associated with various neuropathological conditions. Levels of annexin A5 were reported reduced in CSF from Parkinson's disease (PD) patients²⁹. It was suggested that such reduction resulted as consequence of protein consumption during neuronal apoptosis²⁹. Plasma levels of annexin A5 were found significantly higher in AD patients compared with healthy individuals³⁰. These works suggested a defensive function for annexin A5 in these neurodegenerative diseases based on its interacting role with amyloidogenic proteins, islet amyloid polypeptides and α -synuclein inclusions by reducing the toxicity of these proteins and aggregates¹⁸.

Using a mass proteomic based study, we previously found changes in annexin A5 protein levels in choroid plexus from AD patients³¹. The present study was focused on examining the potential effects of annexin A5 on A β toxicity in choroid plexus. For that purpose, we analysed choroid plexus tissue samples and CSF from MCI and AD patients, and choroid plexus primary cultures. Here, we show annexin A5 levels in CSF were found progressively increased as the disease stage increased in severity. Simultaneously, annexin A5 levels were found decreased with the disease severity in choroid plexus, in opposite way A β burden and cell death. We also show that annexin A5 may play a protective role in A β -induced cell toxicity in choroid plexus by a Ca²⁺-dependent mechanism.

Results

Annexin A5 levels are increased in CSF from AD patients. By doing a mass proteomic based study, we previously found annexin A5 protein levels were differentially expressed in choroid plexus from AD patients compared with healthy controls³¹. Here, we show annexin A5 levels were significantly increased in CSF from MCI and moderate AD patients determined by ELISA (Fig. 1a). We also checked by Western Blot annexin A5 levels in choroid plexus from brain donors with AD pathology and healthy subjects. Annexin A5 protein levels were significantly lower in Braak stages III/IV and V/VI compared with control samples (Fig. 1b). In contrast with our previous work³¹, by increasing the number of samples here we increased the variability losing the significance when comparing AD subjects (stages I–II) with control. When comparing last AD stages with controls, variability was reduced, and results reflect a significant reduction in annexin A5 levels in advanced AD stages compared with aged-matched control subjects. Together, these results could suggest annexin A5 levels in choroid plexus progressively are reduced starting at early AD clinical stages.

A β -related choroid plexus cell death. AD-related pathology was confirmed analysing the A β load in choroid plexus by immunohistochemistry using an anti-A β antibody (Fig. 2a). The progressive pattern of A β accumulation in choroid plexus was estimated using an A β ₄₂ human specific ELISA kit (Fig. 2b). A β ₄₂ burden was significantly higher at Braak stages III/IV and stages V/VI when compared with control cases (Fig. 2b). The effects of A β accumulation determined in choroid plexus using a Cell Death Detection ELISA kit resulted in progressive increased cell death in AD subjects that was significantly higher at Braak stages V/VI compared with healthy donors (Fig. 2c). These results were consistent with the previously reported findings showing deleterious effects of A β in choroid plexus from AD subjects and the AD transgenic APP/PS1 mouse model⁷. It is important to note that the observed progressive A β accumulation and cell death in choroid plexus match with the reduced annexin A5 levels (Fig. 1b), more evident at late AD stages (III–VI) (Fig. 2d).

A β induces Annexin A5 release outside choroid plexus cells. Annexin A5 may be secreted extracellularly and increased annexin A5 levels were previously found in the supernatant of A β ₄₂-treated neuronal cells³². Hence, we asked if changes in annexin A5 levels between choroid plexus and CSF could be related to A β overload in choroid plexus. We used rat primary cultures of epithelial choroid plexus cells treated with oligomerised A β ₄₂ (10 μ M) at 6, 12, 24 and 48 hours. A β exposure in choroid plexus cells resulted in reduced annexin A5 protein

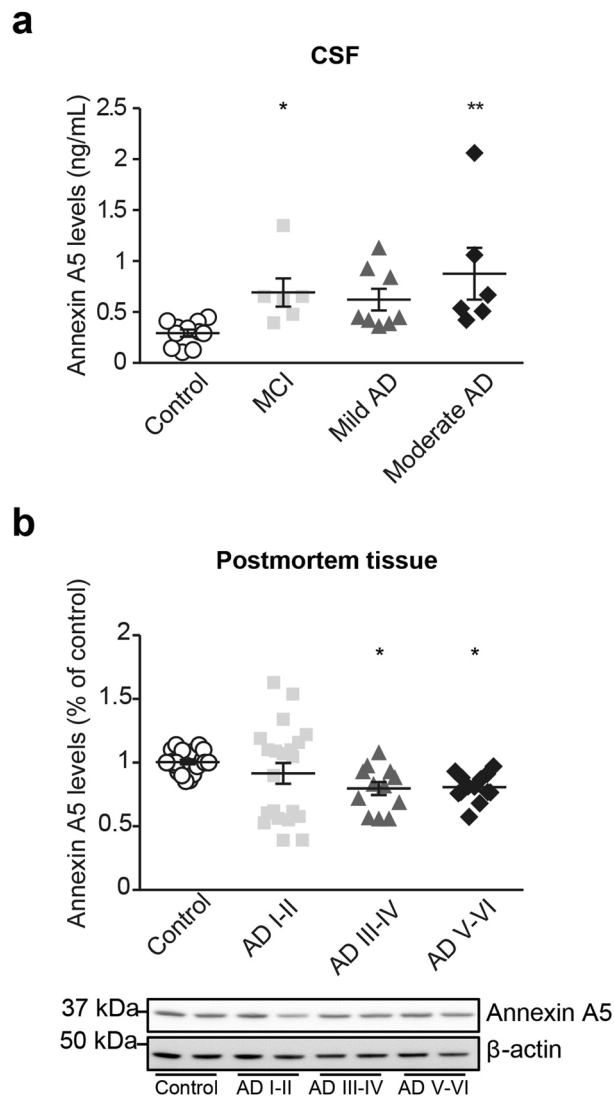


Figure 1. CSF and choroid plexus annexin A5 protein levels were differentially expressed in AD patients. **(a)** Scatter plot showing CSF levels of annexin A5 protein in healthy donors and clinically diagnosed MCI and AD patients determined by ELISA. Annexin A5 levels in CSF samples were found higher in MCI and AD patients compared with controls ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$; control $n = 11$; MCI $n = 6$; Mild AD $n = 8$; Moderate AD $n = 6$). In all cases, each individual value is shown along with the mean \pm SEM per group. **(b)** Scatter plot showing annexin A5 protein levels in choroid plexus from AD and healthy donors. Annexin A5 levels were significantly reduced in choroid plexus from Braak stages III/IV and V/VI compared with control samples ($*p < 0.05$; control $n = 22$; AD I-II $n = 21$; AD III-IV $n = 12$; AD V-VI $n = 13$). In all cases, each individual value is shown along with the mean \pm SEM per group. Bottom images show representative western blots. These images were cropped from full-length blots and they are shown in the Supplementary Information section.

levels in a time course-dependent manner (Fig. 3a). This reduction was significant compared with untreated cells 24 and 48 hours after $A\beta$ treatment (Fig. 3a). Conversely, $A\beta$ induced a time course-dependent increase of annexin A5 in the extracellular medium (Fig. 3b). Such annexin A5 increase in supernatant was clearly significant 24 and 48 hours after $A\beta$ treatment (Fig. 3b).

Annexin A5 restores the $A\beta$ -induced impairments on autophagy. A number of studies demonstrate autophagy is disrupted at one point in the progression of AD^{33,34}. This pathway may degrade accumulated aberrant proteins and peptides such as $A\beta$. Results above could suggest that annexin A5 may be beneficial in choroid plexus from AD patients; therefore we investigated the effect of annexin A5 on autophagy. Analysis of autophagy markers in postmortem tissue from AD and healthy donors by immunoblotting, showed significantly increased LC3-II levels in choroid plexus from all AD stages including early AD (Fig. 4a) and significantly increased p62 levels at Braak stages I-IV (Fig. 4b). These results may suggest both, increased autophagy induction and disrupted autophagosome – lysosome fusion^{35,36}. Then we investigated annexin A5 effects on $A\beta$ -disrupted autophagy flux in choroid plexus cultures from rats. Cells were treated with and without annexin A5 for 1 hour and then exposed

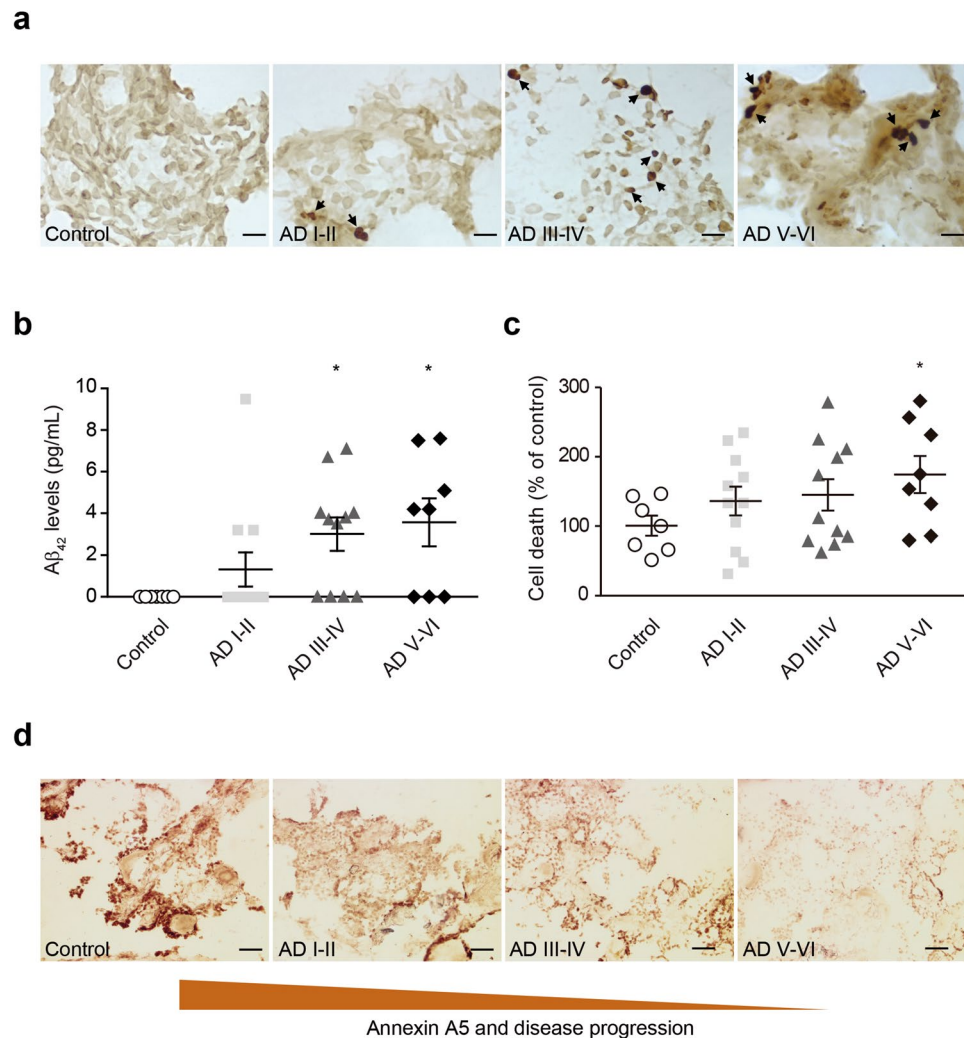


Figure 2. Aβ deposits and cell death in choroid plexus from AD patients. **(a)** Representative micrographs showing Aβ deposits in choroid plexus from early and advanced AD cases compared with healthy donors. Scale bar = 20 μm. **(b)** Quantified levels of Aβ burden in choroid plexus from healthy donors compared with AD subjects measured by ELISA (Cell Death Detection ELISAPLUS kit, Roche). Scatter plot reveals a progressive increase in Aβ levels in choroid plexus samples from AD subjects compared with control group (**p* < 0.05; control *n* = 7; AD I-II *n* = 12; AD III-IV *n* = 11; AD V-VI *n* = 8). In all cases, each individual value is shown along with the mean ± SEM per group. **(c)** Cell death analysis in choroid plexus from control and AD patients was measured using Cell Death Detection ELISAPLUS kit. Scatter plot shows a significant increase in cell death in choroid plexus from advanced AD patients (Braak stages V–VI) compared with control subjects (**p* < 0.05; control *n* = 7; AD I-II *n* = 11; AD III-IV *n* = 11; AD V-VI *n* = 8). In all cases, each individual value is shown along with the mean ± SEM per group. **(d)** Representative micrographs showing annexin A5 immunostaining in choroid plexus from early and advanced AD cases compared with healthy donors. Scale bar = 20 μm.

to oligomerised Aβ₄₂ to avoid extracellular Aβ sequestering by annexin A5, thereby preventing the toxicity. Immunoblotting revealed that Aβ₄₂ exposure resulted in significantly elevated LC3-II and p62 levels compared with untreated cells suggesting autophagosome accumulation (Fig. 4c,d, respectively). Annexin A5 treatment in cells restored the LC3-II and p62 levels being similar to the obtained values in untreated or cells treated with annexin A5 only (Fig. 4c,d, respectively). In summary, the above results could indicate annexin A5 abolished the Aβ-induced impairments on autophagy in choroid plexus cells.

Annexin A5 protects against Aβ-induced apoptosis. It was previously shown annexin A5 inhibited Aβ toxicity in neuronal cell cultures^{16,17,19,20,34,37}. We further investigated annexin A5 effect on Aβ-induced toxicity in choroid plexus cells. As Aβ-induced autophagy may precede Aβ-induced toxicity we tested the biological role of annexin A5 on cell viability carrying out bioactivity assays with choroid plexus cell cultures. Cells were previously treated with and without annexin A5 for 1 hour and then exposed to oligomerised Aβ₄₂ (10 μM) for 48 hours (Fig. 5). Aβ₄₂ induced 25% decrease in cell viability in choroid plexus cultures, as assessed by cell counting kit (CCK) assay, compared with control (Fig. 5a). Annexin A5 completely prevented cell loss when was added prior to Aβ₄₂ (Fig. 5a). The reduction in

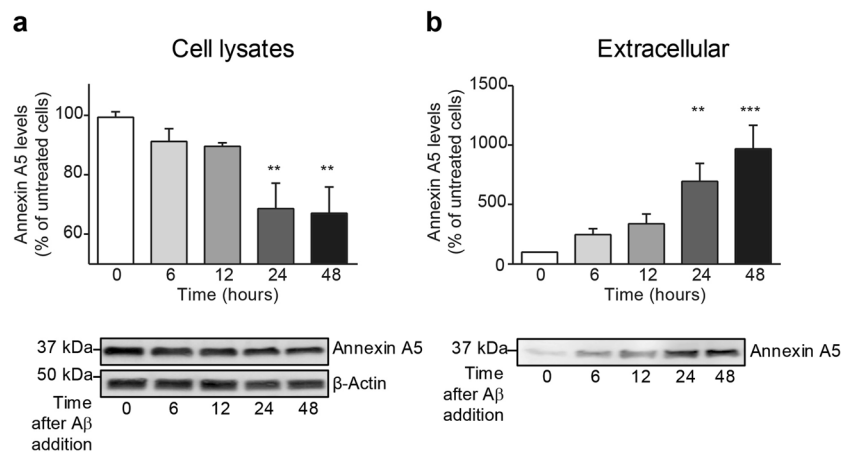


Figure 3. Analysis of intra- and extracellular annexin A5 levels in choroid plexus cultures after A β incubation. **(a)** Annexin A5 levels in epithelial choroid plexus cell cultures incubated with oligomerised A β_{42} for 6, 12, 24 and 48 hours determined by Western blot. Annexin A5 levels are shown as percentage of untreated cells. β -actin was used as loading control. Histogram reveals a progressive decrease in annexin A5 levels in cells incubated with A β_{42} already significant at 24 hours after A β_{42} addition ($**p < 0.01$; $n = 4$). Representative bands of annexin A5 protein levels in choroid plexus cells at 0, 6, 12, 24 and 48 hours after A β_{42} addition (bottom panel). These images were cropped from full-length blots and they are shown in the supplementary information section. In all cases data represents mean \pm SEM. **(b)** Annexin A5 levels in extracellular medium of A β_{42} -incubated choroid plexus cells for 0, 6, 12, 24 and 48 hours. Histogram shows a progressive increase of annexin A5 levels in extracellular medium which is already significant 24 hours after A β_{42} incubation ($**p < 0.01$; $***p < 0.001$; $n = 4$). Representative bands of annexin A5 protein levels in extracellular medium at 0, 6, 12, 24 and 48 hours after A β_{42} addition (bottom panel). This image was cropped from a full-length blot shown in the Supplementary Information section. In all cases data represents mean \pm SEM.

cell viability on choroid plexus cells and the protective role of annexin A5 was studied analysing apoptotic cell death using the LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit (Fig. 5b,c). 48 hours after incubation with A β_{42} (10 μ M), a significant increase of apoptotic cell death in choroid plexus cultures was found (Fig. 5b,c). The presence of annexin A5 attenuated the A β_{42} -induced apoptosis, recovering the amount of living cells and reducing the cell loss (Fig. 5b,c).

Annexin A5 attenuates A β -induced impairments on mitochondrial function and [Ca $^{2+}$] homeostasis in choroid plexus epithelial cells. Both, apoptosis and autophagy are two cellular processes closely linked to mitochondria and mitochondrial health and function is reflected in the $\Delta\Psi_m$. By using the fluorescent indicator TMRM, we analysed the $\Delta\Psi_m$ (Fig. 6a). This dye accumulates in active mitochondria with intact membrane potentials, therefore the more fluorescence, the more mitochondrial health and quality. A significant decrease in $\Delta\Psi_m$ was observed in A β -exposed choroid plexus cells reducing the TMRM signal to $74 \pm 3\%$ compared with either untreated or cells treated with annexin A5 (Fig. 6b). Treatment of A β -exposed choroid plexus cells with annexin A5 prevented the reduction in the $\Delta\Psi_m$ as TMRM signal showed similar values to untreated cells or cells with annexin A5 (Fig. 6b). Mitochondria are master regulators of Ca $^{2+}$ homeostasis³⁸ that simultaneously is linked to autophagy and apoptotic cell death regulation. Because annexin A5 is a Ca $^{2+}$ binding protein we hypothesised that the protective role of annexin A5 could be related to its Ca $^{2+}$ binding capacity. This could be supported by findings in which was demonstrated A β -induced toxicity in neurons involved perturbation of Ca $^{2+}$ homeostasis³⁹. We analysed Ca $^{2+}$ flux upon physiological Ca $^{2+}$ stimuli in choroid plexus cells incubated for 24 hours with oligomerised A β_{42} in absence or presence of annexin A5 (Fig. 6c). Ca $^{2+}$ signal was evaluated using fura-2. Purinergic receptors in epithelial choroid plexus cells were stimulated with ATP allowing the massive release of Ca $^{2+}$ from the endoplasmic reticulum (ER) to the cytosol which was ratiometrically quantified (Fig. 6c, top panels). After recovery, mitochondrial Ca $^{2+}$ uptake was analysed by adding the uncoupler FCCP and the amount of Ca $^{2+}$ was quantified (Fig. 6c, top panels). Upon physiological Ca $^{2+}$ stimuli, changes in $\Delta\Psi_m$ were simultaneously analysed using Rh123 and the fluorescence was also quantified (dequench mode, Fig. 6c, bottom panels). ATP application to A β -treated choroid plexus cells was associated to loss of $\Delta\Psi_m$ as Rh123 signal increased by 23% before FCCP addition. Annexin A5 treatment to A β -incubated choroid plexus cells prevented the mitochondrial depolarisation as Rh123 fluorescence did not increase after ATP addition. We found that A β_{42} incubation resulted in a significantly higher Ca $^{2+}$ release from the ER in response to ATP in choroid plexus cells (Fig. 6d, left panel). Simultaneous incubation with A β and annexin A5 restored the ATP-induced Ca $^{2+}$ release from the ER in choroid plexus cells resulting in a smaller Ca $^{2+}$ signal similar to the obtained in untreated or only annexin A5 treated cells (Fig. 6d, left panel). Mitochondrial Ca $^{2+}$ uptake after FCCP addition was also higher in A β treated cells compared with untreated or only annexin A5 treated cells (Fig. 6d, right panel). Treatment of choroid plexus cells with annexin A5 under A β presence restored the mitochondrial Ca $^{2+}$ uptake reaching similar levels of the untreated cell or cells treated with annexin A5 (Fig. 6d, right panel). Together, these results confirmed

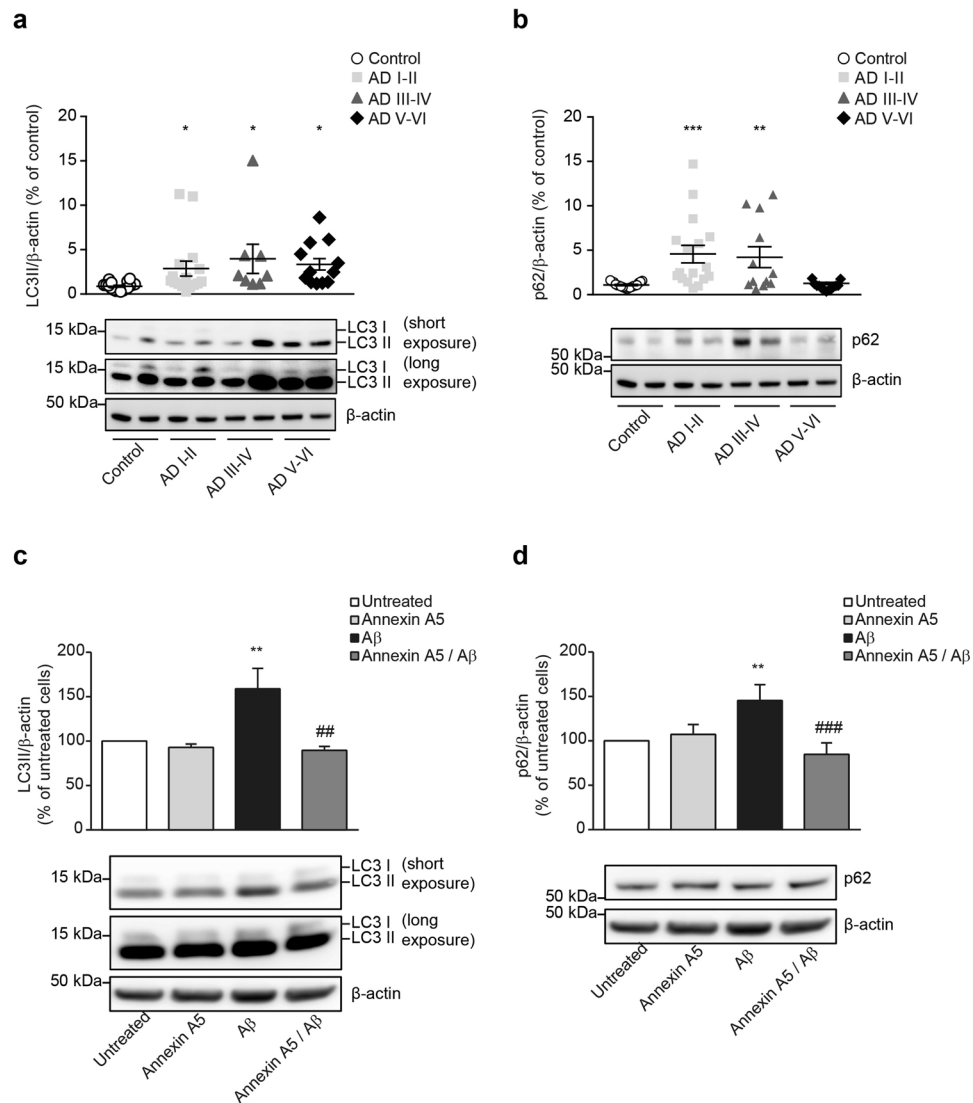


Figure 4. Impaired autophagy in AD choroid plexus. **(a,b)** LC3-II **(A)** and p62 **(b)** protein levels in choroid plexus from healthy donors and AD patients from I, II, III, IV, V and VI Braak stages determined by Western blot. β -actin was used as loading control and data are shown as percentage of untreated cells. **(a)** Scatter plot indicates that autophagic marker LC3-II is significantly increased at early AD stages (Braak I-II). **(b)** p62 is significantly increased at early (Braak I-II) and mid (Braak III-IV) AD stages but decreased at late AD stages (Braak V-VI). Representative Western blot showing LC3-II **(a)** and p62 **(b)** levels in choroid plexus samples from healthy donors, and AD are shown. These images were cropped from full-length blots and they are shown in the Supplementary Information section. ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$; control $n = 19$; AD I-II $n = 17$; AD III-IV $n = 12$; AD V-VI $n = 13$). In all cases, each individual value is shown along with the mean \pm SEM per group. **(c,d)** LC3-II **(c)** and p62 **(d)** protein levels in epithelial choroid plexus cell cultures incubated with and without oligomerised $A\beta_{42}$ ($10 \mu\text{M}$) for 24 hours under presence or absence of annexin A5 ($15 \mu\text{g/ml}$). β -actin was used as loading control and data are shown as percentage of untreated cells. **(c)** Autophagic marker LC3-II is significantly increased upon $A\beta_{42}$ incubation compared with untreated or annexin A5-treated cells. Annexin A5 co-incubation restored the $A\beta_{42}$ -increased autophagic markers levels similar to untreated cells. **(d)** Autophagic marker p62 is significantly increased upon $A\beta_{42}$ incubation compared with untreated or annexin A5-treated cells. Annexin A5 co-incubation restored the $A\beta_{42}$ -increased autophagic markers levels similar to untreated cells. Representative Western blot showing LC3II **(c)** and p62 **(d)** levels in epithelial choroid plexus cell cultures are shown. These images were cropped from full-length blots and they are shown in the Supplementary Information section. ($**p < 0.01$ versus untreated cells; $##p < 0.01$, $###p < 0.001$ versus $A\beta_{42}$ -treated cells; $n = 6$). In all cases data represents mean \pm SEM.

annexin A5 exerts its protective role on $A\beta$ -induced autophagy and apoptotic cell death in choroid plexus in a Ca^{2+} -dependent manner controlled by mitochondria.

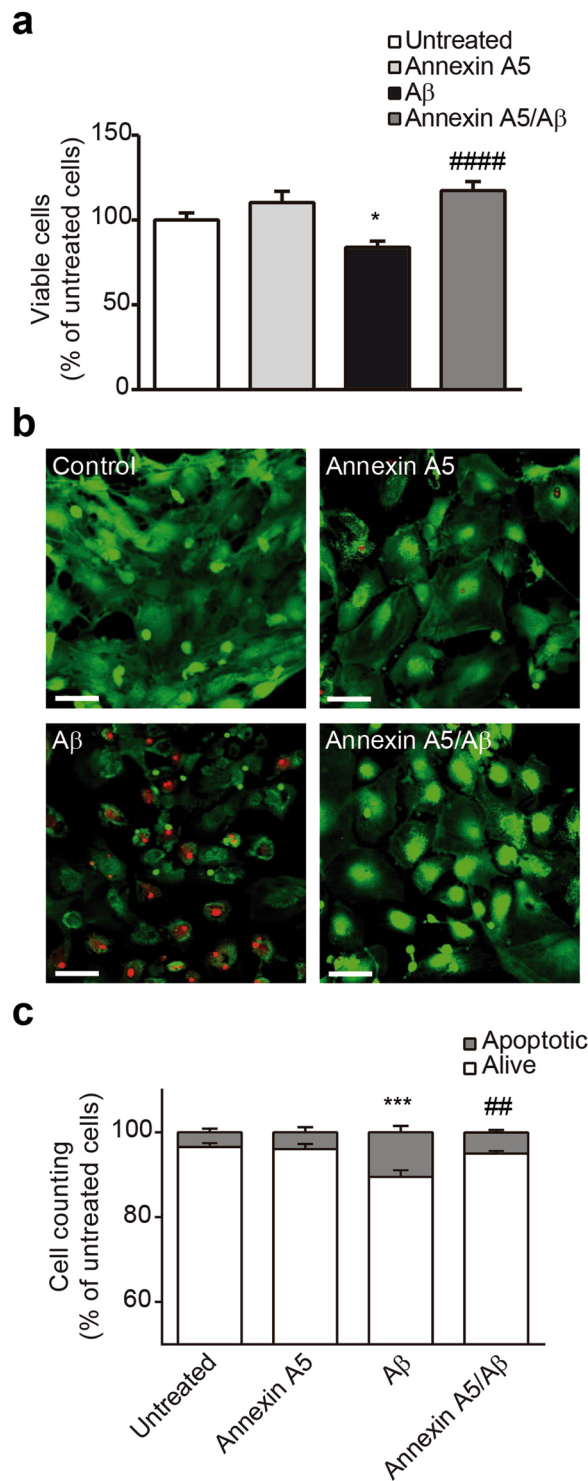


Figure 5. Annexin A5 restores the A β -induced cell viability reduction and apoptosis. **(a)** Epithelial choroid plexus cell viability after incubation with and without oligomerised A β_{42} (10 μ M) for 48 hours in absence or presence of annexin A5. A significant decrease in cellular viability was found in A β_{42} incubated cells compared with untreated cells or cells treated with annexin A5 only. Co-administration of annexin A5 (15 μ l/ml) and A β_{42} (10 μ M) restored cell viability in choroid plexus epithelial cell cultures (* p < 0.05 versus untreated cells; #### p < 0.0001 versus A β_{42} -treated cells; n = 7). In all cases, data represents mean \pm SEM. **(b)** Apoptotic cell death was analysed using the LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular Probes). Fluorescent images of epithelial choroid plexus cell culture show living cells (green) and apoptotic cells (red). Cells were incubated with and without oligomerised A β_{42} (10 μ M), in absence and presence of annexin A5 (15 μ l/ml). Scale bar = 44 μ m. **(c)** Counting alive (green) and apoptotic (red) cells shows that A β_{42} incubation induced a significant increase of apoptotic cells compared with untreated or annexin A5 treated cells. Co-administration annexin A5 and A β_{42} reduced the number of apoptotic cells (*** p < 0.001 versus untreated cells; ## p < 0.01 versus A β_{42} -treated cells; n = 4). In all cases, data represents mean \pm SEM.

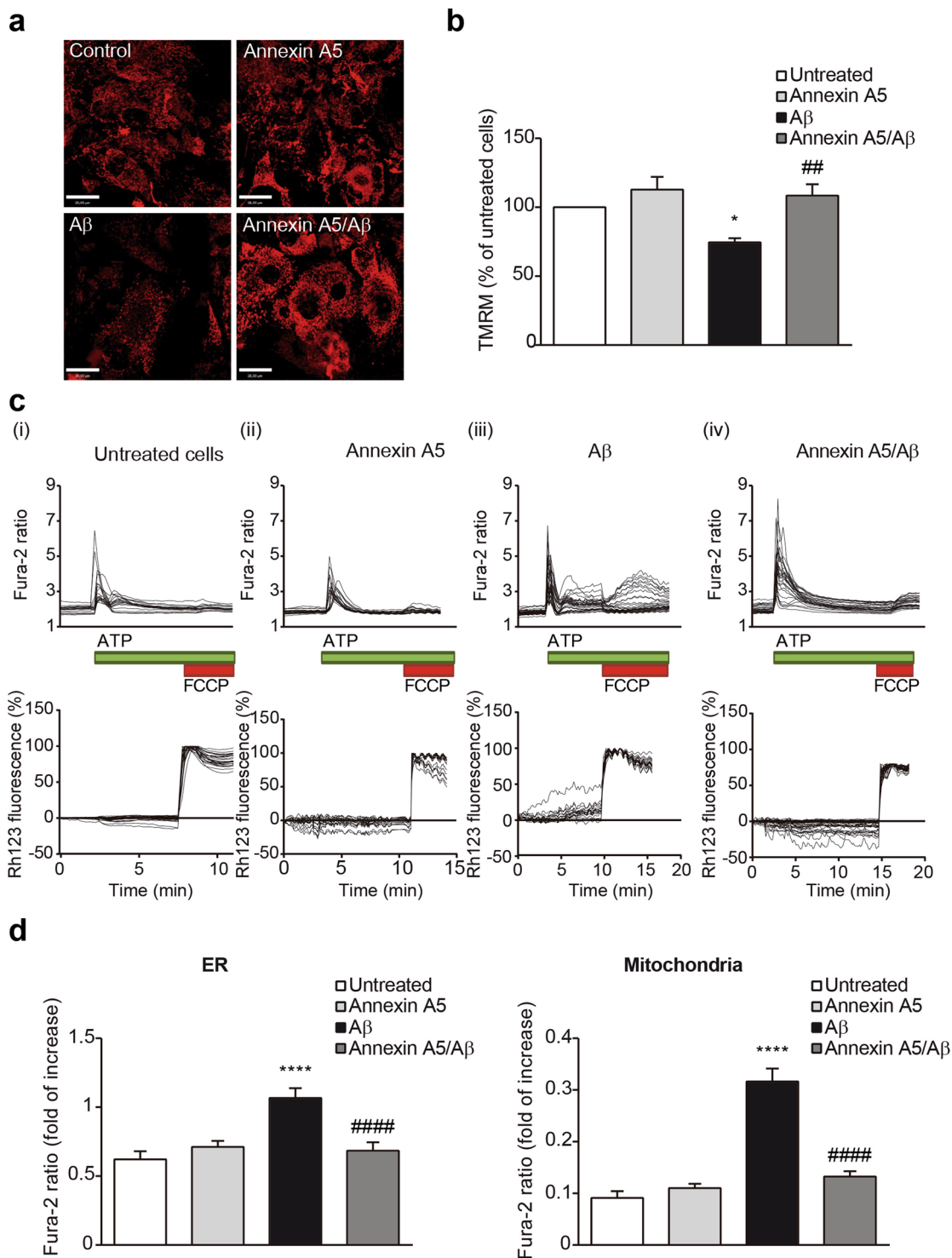


Figure 6. Annexin A5 restores mitochondrial depolarisation in A β -treated choroid plexus cultures in a Ca $^{2+}$ -dependent manner. **(a)** Representative images of tetramethyl-rhodamine methylester (TMRM) fluorescence used in redistribution mode (40 nM) in choroid plexus cultures incubated with and without oligomerised A β_{42} (10 μ M), in absence and presence of annexin A5 (15 μ l/ml). **(b)** Annexin A5 restored the A β -induced mitochondrial depolarisation. Data were normalised to untreated cells and are represented as mean \pm SEM from at least three independent experiments. (* p < 0.05 versus untreated cells; ## p < 0.01 versus A β_{42} -treated cells; n = 4). **(c)** Traces showing changes-over time in fura-2 (upper panels) and simultaneous rhodamine 123 (Rh123) (bottom panels) fluorescence in choroid plexus epithelial cells upon physiological Ca $^{2+}$ stimuli. Physiological Ca $^{2+}$ was induced by addition of ATP (100 μ M). Following Ca $^{2+}$ release from ER, FCCP (1 μ M) was added to obtain the maximal mitochondrial depolarisation allowing mitochondrial Ca $^{2+}$ release. Upon stimulation of choroid plexus cells with ATP, Ca $^{2+}$ stored in the ER was released and profound mitochondrial depolarisation was found in A β -incubated cells as shown by the increase in the Rh123 signal (iii). This effect was

not observed in untreated cells (i) or annexin A5-treated cells only (ii). Annexin A5 treatment prevented the mitochondrial depolarisation when Ca^{2+} stimulus was added (iv). (d) Histograms showing ER Ca^{2+} (left panel) and mitochondrial Ca^{2+} levels (right panel) after addition of ATP and FCCP respectively as explained above. ER Ca^{2+} in choroid plexus cells incubated with $\text{A}\beta$ were higher compared with untreated cells or annexin A5-treated cells only. Annexin A5 co-treatment restored the $\text{A}\beta$ -induced increase of ER Ca^{2+} levels. Mitochondrial Ca^{2+} in $\text{A}\beta$ -incubated choroid plexus cells was significantly higher compared with untreated cells or annexin A5-treated cells only. These levels were restored upon co-incubation with annexin A5. Data were normalised to untreated cells and are represented as mean \pm SEM from at least three independent experiments. (*** $p < 0.0001$ versus untreated cells; **** $p < 0.0001$ versus $\text{A}\beta_{42}$ -treated cells; $n = 4$).

Discussion

Annexins are widely distributed among tissues and their ubiquitous distribution suggests they have important roles in cell biology. In particular, annexin A5 has been found exerting anti-inflammatory, anticoagulant and anti-apoptotic functions^{40–46}. In endothelial cells, annexin A5 was able to protect against vascular inflammation contributing to protect barrier integrity²⁵. Expression of other annexins, annexin A1, A4 and A6, was described in choroid plexus^{47,48}, but little is known about expression and role of annexin A5 in this brain structure. Here we report increased annexin A5 levels in CSF from clinically diagnosed MCI and AD patients and simultaneous reduced annexin A5 levels in choroid plexus from AD brains. These findings are accompanied by increased $\text{A}\beta$ overload in choroid plexus related to the disease severity and significantly altered autophagic flux and increased cell death at late AD stages. *In vitro*, we also demonstrate that annexin A5 extracellular release in choroid plexus cells could be $\text{A}\beta$ -overload dependent. We propose that $\text{A}\beta$ in choroid plexus may induce increased autophagosome accumulation. Such effects result finally in increased cell death and annexin A5 down-regulation. On the other hand, annexin A5 protects against $\text{A}\beta$ toxicity restoring the $\text{A}\beta$ -induced Ca^{2+} homeostasis dysregulation linked to the mitochondrial health and function. Together, our findings suggest that annexin A5 plays a crucial role in maintaining physiological protection of blood-CSF barrier that is impaired in AD.

The higher levels of annexin A5 found in CSF from MCI and AD subjects compared with healthy donors suggests that secreted annexin A5 may indicate early changes in choroid plexus from these patients. Increased annexin A5 levels were also found in plasma from AD patients and the AD transgenic mouse model Tg2576³². We suggest that choroid plexus epithelial cells contribute to increase the annexin A5 levels in CSF along with other sources as neurons. Our results indicate CSF levels of annexin A5 become increased even at early stages of disease, including MCI, when $\text{A}\beta$ accumulation in the brain becomes evident. This is consistent with other findings observed in neuronal cell cultures, describing increased annexin A5 levels in the supernatant of $\text{A}\beta_{42}$ -treated cells³².

$\text{A}\beta$ deposition in brains of AD patients agrees with the hypothesis suggesting $\text{A}\beta$ accumulation as the main cause for neuronal cell death^{1,5,49}. Exposure of cells to $\text{A}\beta$ peptides cause typical apoptotic cell death^{50,51}, although lower $\text{A}\beta$ concentrations appear to only affect expression of neuronal apoptotic genes, without directly causing apoptosis^{52,53}. Here we show that $\text{A}\beta$ accumulation in AD is also present in choroid plexus. This observation was found gradually increasing as the disease progresses and is consistent with the increased cell death observed in choroid plexus from AD subjects. We demonstrate $\text{A}\beta$ overload in choroid plexus cultures induced annexin A5 reduction in cells and subsequently increased annexin A5 in extracellular medium. Annexin A5 release outside cells occurs from the cellular apical compartment as has been demonstrated in epithelial cell cultures^{46,54}. Upon Ca^{2+} stimulation, cytoplasmic annexin A5 is translocated to the plasma membrane while nuclear annexin A5 is moved to the nuclear membrane, in all cases binding to phosphatidylserine (PS)⁵⁵. As $\text{A}\beta$ also binds PS, both annexin A5 and $\text{A}\beta$ could exert competitive interaction to each other. Reduced levels of intracellular annexin A5 result in lower competitive inhibition with $\text{A}\beta$ at PS interaction site leading to increasing $\text{A}\beta$ -induced cytotoxicity¹⁹. We may suggest $\text{A}\beta$ overload in patient choroid plexus could induce annexin A5 drain from these cells, hence contributing to the observed increased levels in CSF.

Our experiments show that annexin A5 restores the $\text{A}\beta$ -induced autophagic flux impairments in choroid plexus cells reducing the $\text{A}\beta$ -increased levels of LC3-II and p62. Previous works showed elevated LC3-II and p62 levels in brains from AD patients at different stages of disease^{56,57}. Here we found an increase in these autophagy markers in human choroid plexus suggesting that such increase is due to $\text{A}\beta$ overload. In support of this observation several works showed similar effects increasing autophagy markers after $\text{A}\beta$ incubation in human neuroblastoma H4 cells⁵⁸ and in cells overexpressing mutant forms of *PSEN2* and *APP*, both linked to $\text{A}\beta$ overproduction in AD familial cases^{59,60}. Therefore, we may suggest an induction of autophagy is triggered in choroid plexus due to $\text{A}\beta$ overload. Then autophagosomes containing $\text{A}\beta$ cannot be fused with lysosomes resulting in their accumulation and subsequent increased levels of autophagic markers LC3-II and p62. Apart of the mentioned cellular models^{59,60} this dual effect has been also observed in AD brains showing high autophagy flux. Such increased flux would try to maintain low $\text{A}\beta$ levels through autophagic clearance but this is followed by impaired autolysosomal proteolysis^{33,34,57,61–63}. We found that annexin A5 treatment restored the levels of autophagy markers to similar values that those obtained in untreated cells. We suggest the annexin A5 effect on autophagy may work enhancing autophagosome – lysosomes fusion allowing lysosomal cargo degradation. This agrees with other observations where annexin A5 was proposed stimulating autophagy⁶⁴. In this work, authors showed that overexpression of annexin A5 in HEK293T cells decreased LC3-II levels. They proposed such decrease was produced by the annexin A5 effect of increasing the autophagosome conversion into autolysosomes and enhancing lysosomal proteolysis⁶⁴.

Linked to the protective role on autophagy could be the observation that annexin A5 reduced the number of $\text{A}\beta$ -induced apoptotic cells. The idea of $\text{A}\beta$ -induced cell death is preceded by impaired autophagy was also showed by other authors^{65,66}. Further analysis about this connection was discussed by Nixon and Yang where they

	Control	MCI	Mild AD	Mod AD	p-value
	(n = 26)	(n = 26)	(n = 20)	(n = 20)	
Age, mean (SD)	70.9 (9.2)	70.7 (7.3)	76.6 (6.5)	78.3 (3.6)	0.01
Sex female, n (%)	14 (53.8%)	15 (57.7%)	11 (55.0%)	10 (50.0%)	ns
MMSE, mean (SD)	29.0 (1.2)	24.5 (3.4)	19.3 (4.4)	12.3 (5.2)	<0.001
CDR	0	0.5	1	2.3	<0.001
ApoE ϵ 4, %	0%	41.6%	46.1%	40.2%	0.01
CSF A β ₄₂ , mean (sem)	885.2 (105.2)	457.3 (53.0)***	513.8 (95.9)**	339.1 (46.2)***	<0.001
CSF t-tau, mean (sem)	394.5 (54.6)	534.8 (123.5)	690.4 (73.4)*	982.8 (105.4)**	0.01

Table 1. Demographic and clinical characteristics of CSF donors. MCI: mild cognitive impairment; AD: Alzheimer's disease; Mod: moderate-severe; SD: standard deviation; MMSE: Minimal Status Examination; ns: non-significant. # p-value indicates statistical differences between all groups; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, versus control group.

proposed defects in autophagy promoting apoptotic cell death in neurodegenerative diseases⁶⁷. This is consistent with our results as we observed a reduction in autophagy markers and apoptotic cell death when rat primary cultures of epithelial choroid plexus cells were incubated with A β in presence of annexin A5. Both, stimulation of autophagy and apoptotic cell death are tightly regulated by intracellular Ca²⁺ levels^{68,69}. On this regard, mitochondria play an important role in cells as they control bioenergetics, Ca²⁺ homeostasis and apoptotic cell death. Failures in this regulation have been recognised in neurodegenerative disorders. Here, we show that annexin A5 restored the A β -induced mitochondrial depolarisation reflected by a reduction in the mitochondrial membrane potential which mirrors the mitochondrial health and function. Therefore, mitochondrial depolarisation may indicate altered Ca²⁺ homeostasis regulation. Indeed, our work show A β impaired Ca²⁺ homeostasis, and annexin A5 prevented this effects. A β exposure made the choroid plexus cells to increase the ER Ca²⁺ stores. Then, by inducing Ca²⁺ signal, mitochondrial Ca²⁺ uptake was higher. Both effects were restored by annexin A5 incubation. It has been shown A β affects intracellular Ca²⁺ concentration by generating Ca²⁺ permeable channels in plasma membrane of neurons and astrocytes^{70,71}. Works carried out in neuronal cells showed A β exposure induced Ca²⁺ homeostasis impairments⁷²⁻⁷⁵. *In vivo*, elevated Ca²⁺ levels in neuronal cytoplasm were linked to A β ₄₂ accumulation⁷⁶. The observed protective role of annexin A5 in the A β -induced autophagy impairments and cell death could be related to its affinity binding preferentially acidic phospholipids in a Ca²⁺ dependent manner²². This could be in line with the observed annexin A5 ability to interact with membrane PS. Through this interaction, it was found that annexin A5 protected neuronal cells against A β toxicity by competitive inhibition as both, A β oligomers and annexin A5 showed binding affinity to PS in the cell membrane in a Ca²⁺-dependent manner^{19,20}. In a different scenario, we may also explain the protective role of annexin A5 on A β -induced toxicity by its Ca²⁺ chelating capacity decreasing the intracellular Ca²⁺ concentration. All these observations are consistent with our findings in which we found annexin A5 could have a potential beneficial effect on choroid plexus and such effect is lost in AD along with progressive increased A β accumulation. This beneficial effect of annexin A5 has been proved in other neurodegenerative disorders showing its interaction ability with amyloidogenic proteins¹⁸.

In summary, we show that levels of annexin A5 in choroid plexus from AD are reduced in late stages of disease, accompanied by high A β levels and cell death and simultaneous increased levels of annexin A5 in CSF. The data presented here indicate that annexin A5 protects choroid plexus cells from A β -induced autophagic impairments and apoptosis by a Ca²⁺-dependent mechanism under mitochondrial control.

Material and Methods

All methods were performed following the relevant guidelines and regulations approved by the local ethical review committee from the Hospital 12 de Octubre Research Institute. Other review committees partially involved in the present project were the following: 12 de Octubre Hospital, (Madrid, Spain) and Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona, Spain) review committees for research related to CSF samples; The Institute of Neuropathology Brain Bank IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge (Hospitalet de Llobregat, Spain) review committee, The Netherlands Brain Bank (NBB) (Amsterdam, The Netherlands) review committee and Banco de Tejidos, Fundación CIEN (Centro de Investigación de Enfermedades Neurológicas, Madrid, Spain) review committee for research involving the use of choroid plexus samples from human donors. Informed consent was obtained from all participants and/or their legal guardians.

CSF collection. CSF samples (10 ml per subject) from 26 mild cognitive impairment (MCI), 20 mild AD, 20 moderate AD, and 26 healthy control subjects were collected by lumbar puncture upon informed patient consent. All samples were centrifuged at 3000 rpm at 4°C for 10 min to remove any cell and debris, aliquoted in small volumes and stored in low bind polypropylene tubes at -80°C. Samples were obtained from the Hospital 12 de Octubre Neurology Service (Madrid, Spain), and Hospital de la Santa Creu i Sant Pau Neurology Service (Barcelona, Spain). Subjects were clinically diagnosed as probably having AD according to the National Institute on Aging and Alzheimer's Association (NIA-AA) guidelines⁷⁷. MCI was diagnosed in patients with cognitive impairment that did not fulfil the criteria for dementia^{78,79}. All subjects had mini-mental state examination (MMSE) scores available. Inclusion criteria for cognitively normal older individual subjects were MMSE scores 24-30, no history or clinical signs of neurological or psychiatric disease or cognitive symptoms⁸⁰. Subjects'

	Control (n = 22)	AD I-II (n = 21)	AD III-IV (n = 14)	AD V-VI (n = 13)	p-value
Age, mean (SD)	71.2 (10.0)	69.4 (9.9)	78.9 (7.7)	78.3 (6.6)	<0.001
Sex female, n (%)	9 (40.9%)	7 (33.3%)	6 (42.9%)	6 (46.2%)	ns

Table 2. Demographic and clinical characteristics of choroid plexus donors. AD I-VI: Alzheimer disease-related changes, stages of Braak and Braak; SD: standard deviation; ns: non-significant.

consent was obtained according to [Declaration of Helsinki](#), and approval came from the research ethics committee of each responsible institution. Written informed consent was given from all participants or representatives. Subject demographic and clinical characteristics are listed in Table 1.

Tissue samples. Post-mortem choroid plexus tissue was obtained from brain donors diagnosed with AD and control individuals. Frozen samples were supplied by the Institute of Neuropathology Brain Bank IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge (Hospitalet de Llobregat, Spain), The Netherlands Brain Bank (NBB) (Amsterdam, The Netherlands), and Banco de Tejidos, Fundación CIEN (Centro de Investigación de Enfermedades Neurológicas, Madrid, Spain). In all cases, post-mortem delays before sampling was between 3–8 hours. Subjects' consent was obtained according to the [Declaration of Helsinki](#), and approval came from the research ethics committee of each responsible institution. For all cases, written informed consent is available. Subjects were selected on the basis of post-mortem diagnosis of AD according to neurofibrillary pathology and A β plaques. Control cases were considered those without neurological symptoms and lesions in the neuropathological examination. A total of 70 samples were categorised into four groups, as presented in Table 2.

Choroid plexus cultures. Choroid plexus epithelial cell cultures were prepared as described previously⁸¹. Choroid plexus were dissected from 3–5-day-old Wistar rats (Charles River, MA, USA). ARRIVA guidelines for the care and use of animals were followed. Once disaggregated, choroid plexus epithelial cells were seeded at a 4×10^4 cells/cm² density on laminin-coated plates and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS; Thermo Fisher Scientific, MA, USA), 2 mM L-glutamine and 1% penicillin/streptomycin (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) at 37°C and 5% CO₂. After 5–7 days on culture cells reached confluence and they were serum-deprived for 2 hours and oligomerised A β_{42} (10 μ M; AnaSpec, Inc., San Jose, CA) was added. In the experiments with annexin A5 (15 μ l/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), this drug was added 1 hour before oligomerised A β_{42} , to allow annexin A5 enter into the cells and avoiding extracellular sequestering of oligomerised A β_{42} . A β_{42} stock was previously dissolved in acetic acid 0.1 M. Oligomeric A β_{42} was prepared by incubating a volume of stock solution in DMEM at 4°C for 24 hours prior addition to the cell cultures as previously described⁸².

Immunohistochemistry. Human choroid plexus tissue was fixed for 24 hours in 4% paraformaldehyde (PFA) by immersion. Then, choroid plexus samples were OCT embedded and stored at –80°C for subsequent cryostat sectioning (Leica, Wetzlar, Germany). 20 μ m thick sections were processed free-floating for immunohistochemistry. To carry out immunohistochemistry for A β deposits, brain slices were 20 min pre-incubated with 88% formic acid and immunolabeled with mouse anti-A β antibody (1:500, MBL, Nagoya, Japan). After overnight incubation, primary antibody staining was revealed using the avidin-biotin complex method (VECTASTAIN Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA) and 3,3'-diaminobenzidine chromogenic reaction (Vector Laboratories, Inc). Images were captured using a light microscope (Zeiss microscope; Carl Zeiss Microimaging, GmbH, Oberkochen, Germany).

ELISA. Levels of human endogenous A β_{42} in choroid plexus fractions from human subjects were determined with human specific ELISA kit (Innotest β -amyloid_{1–42}, Innogenetics, Ghent, Belgium), according to the manufacturer's instructions. Prior to tissue homogenisation, endothelial vessels were removed in order to have pure choroid plexus epithelium. Obtained data were normalised to protein content.

DNA fragmentation undergoing apoptosis was detected in choroid plexus tissue from human subjects with a Cell Death Detection ELISAPLUS kit (Roche, Basel, Switzerland). According to the manufacturer's instructions, unfixed frozen tissue was incubated with incubation buffer (lysis buffer provided in the kit) and tissue lysates were transferred to a streptavidin-coated 96 well microplate and allowing nucleosomes to interact with monoclonal antibodies: antihistone (biotin-labeled) and anti-DNA (peroxidase-conjugated). Finally, the amount of coloured product was determined using a microplate reader.

Annexin A5 levels in CSF from human subjects were determined with specific human ELISA kit (Abcam, Cambridge, UK). Briefly, CSF samples were added to the pre-coated wells, followed by the antibody mix. Finally, the signal intensity was measured at 450 nm using a microplate reader.

Western blot. Conditional medium from choroid plexus cultures was collected and protease and phosphatase inhibitor cocktails (Roche, Basel, Switzerland) were added. Choroid plexus tissue and cultured choroid plexus epithelial cells were homogenised in lysis buffer (50 mM Tris/HCl buffer, pH 7.4 containing 2 mM EDTA, 0.2% Nonidet P-40, 1 mM PMSE, protease and phosphatase inhibitor cocktails – Roche, Basel, Switzerland), and centrifuged for 10 min at 14000 rpm. The supernatant was recovered and stored at –80°C. Protein content from cell lysates, and extracellular medium was determined with the BCA method (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Equal amount of protein (20 μ g per lane) were separated by SDS-PAGE (4–12%) and transferred onto

polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Millipore, MA, USA). For human choroid plexus tissue homogenates 25 µg of protein were loaded. Non-specific bindings were blocked by incubation in 5% non-fat milk in Tris-buffered saline (100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.4) containing 0.1% Tween (TTBS) for 1 hour at room temperature. Afterwards, membranes were 4 °C incubated overnight with mouse anti-annexin A5 antibody (ab54775, 1:1000; Abcam, Cambridge, UK), rabbit monoclonal anti-p62 antibody (ab91526, 1:20000; Abcam, Cambridge, UK), and rabbit polyclonal anti-LC3 antibody (NB100–2220, 1:1000; Novus, CO, USA). Protein loading was monitored using a mouse monoclonal antibody against β-actin (A1978, 1:10000; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Membranes were then incubated for 1 hour in the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:2000; Dako, CA, USA), and immunocomplexes were revealed by an enhanced chemiluminescence reagent (ECL Clarity; Bio Rad, CA, USA). Densitometric quantification was carried out with Image Studio Lite 5.0 software (Li-COR Biosciences, NE, USA). Protein bands were normalised to β-actin levels and expressed as percentage of the control group.

Bioactivity and cell death quantification. *In vitro*, cell viability was assessed using Cell Counting Kit-8 (CCK-8 assay, Sigma, St. Louis, USA) according manufacturer's instructions. Briefly, primary cultures of choroid plexus epithelial cells were incubated 48 hours with and without oligomerised Aβ₄₂ (10 µM) and treated with or without annexin A5 (15 µl/ml). Then, CCK-8 solution was added, and absorbance was measured 1 hour later at 450 nm using a microplate reader.

Cell death was assessed 48 hours after incubation with and without both, oligomerised Aβ₄₂ (10 µM) and annexin A5 (15 µl/ml) using the LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Fixed cells were labelled with propidium iodide. Healthy cells were recognised by their morphology and green staining, whereas propidium iodide-positive red cells (with condensed chromatin) were scored as apoptotic. Resulting images were taken using a fluorescence microscopy (Zeiss microscope; Carl Zeiss Microimaging, GmbH, Oberkochen, Germany) at a magnification of 40×. Fluorescence was quantified using the Volocity software (PerkinElmer, Waltham, MA, USA).

Measurement of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$). $\Delta\Psi_m$ was measured as was described previously⁸³. Briefly, cells plated on 25 mm laminin-coated coverslips and loaded with 40 nM tetramethyl-rhodamine methyl ester (TMRM) in a HEPES-buffered salt solution (HBSS) (composed of 156 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 1.25 mM KH₂PO₄, 2 mM CaCl₂, 10 mM glucose and 10 mM HEPES; pH adjusted to 7.35 with NaOH) for 40 min at room temperature and keeping the dye present in the chamber at the time of recording. TMRM is a cell-permeant fluorescent dye used in the redistribution mode to assess $\Delta\Psi_m$, and therefore, a reduction in TMRM fluorescence represents mitochondrial depolarisation. Confocal images were obtained using a Zeiss 510 microscope equipped with META detection system (Zeiss, Oberkochen, Germany) and × 40 oil immersion objective. Excitation wavelength for TMRM was 560 nm and emission was detected above 580 nm. Z-stack images were obtained and analysed using the Volocity software (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) and TMRM values for untreated cells were set to 100%. TMRM values for Aβ₄₂ and/or annexin A5 treated cells were expressed relative to untreated cells.

Imaging of [Ca²⁺]_c. For cytosolic [Ca²⁺]_c ([Ca²⁺]_c) measurements cells were plated on 25 mm laminin-coated coverslips and maintained in DMEM supplemented with 10% (v/v) FBS, 2 mM L-glutamine and 1% penicillin/streptomycin at 37 °C and 5% CO₂. After 5–7 days on culture, media was replaced with HBSS (156 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 1.25 mM KH₂PO₄, 2 mM CaCl₂, 10 mM glucose and 10 mM HEPES, pH adjusted to 7.35) and cells were loaded with fura-2 AM (5 µM; Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) and 0.005% pluronic for 30 minutes. For simultaneous measurement of [Ca²⁺]_c and $\Delta\Psi_m$, rhodamine123 (Rh123, 10 µM; Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) was added into the cultures during the last 15 min of the fura-2 loading period, and cells were then washed. We stimulated P2Y receptors from choroid plexus cells with 100 µM ATP and we added 1 µM carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP) to depolarise mitochondria. Fluorescence measurements were obtained on an epifluorescence inverted microscope equipped with a × 20 fluorite objective. Simultaneous [Ca²⁺]_c and $\Delta\Psi_m$ were monitored in single cells using excitation light provided by a Xenon arc lamp, the beam passing sequentially through 10 nm band pass filters centred at 340, 380 and 490 nm housed in computer-controlled filter wheel (Cairn Research, Kent, UK). Emitted fluorescence light was reflected through a 515 nm long-pass filter to a cooled CCD camera (Retiga, QImaging, Canada). All imaging data were collected and analysed using the Andor software (Belfast, UK). The fura-2 data were not calibrated in terms of [Ca²⁺]_c because of the uncertainty arising from the use of different calibration techniques. The fluorescent signal is quenched by Rh123 accumulation in polarised mitochondria; in response to depolarisation the fluorescence signal is dequenched; an increase in Rh123 signal therefore indicates mitochondrial depolarisation. We normalised the signals between resting level (set to 0) and a maximal signal generated in response to the uncoupler FCCP (1 µM; set to 100%).

Data and statistical analysis. *In vivo* and *in vitro* results are shown related to healthy donors and untreated cells, respectively. All of them are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM) in percentage. *In vitro* data were generated from a minimum of three independent replicates per experiment (n = 3) performed in different days. For *in vivo* imaging, each replicate consisted of at least 1 coverslip per condition where a number of 15–30 cells per coverslip were analysed. Statistical analysis and exponential curve fitting were performed using GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) software. Grubbs outlier filter was used for all data. Statistical significance for multiple comparisons was calculated by one-way ANOVA followed by Fisher's LSD correction. In all cases, statistical significance was set at p < 0.05 (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001; #p < 0.05, ##p < 0.01, ###p < 0.001, ####p < 0.0001).

Ethical approval and informed consent. All participants gave written informed consent for participation. ARRIVA guidelines for the care and use of animals were followed. The project in full was approved by the 12 de Octubre Research Institute ethical review committee. Additionally, research related to CSF samples was also approved by the 12 de Octubre Hospital, (Madrid, Spain) and Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona, Spain) review committees; research involving the use of choroid plexus samples from human donors was also approved by the Institute of Neuropathology Brain Bank IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge (Hospitalet de Llobregat, Spain) review committee, The Netherlands Brain Bank (NBB) (Amsterdam, The Netherlands) review committee and Banco de Tejidos, Fundación CIEN (Centro de Investigación de Enfermedades Neurológicas, Madrid, Spain) review committee.

Data availability

The datasets generated and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 10 February 2020; Accepted: 9 May 2020;

Published online: 10 June 2020

References

- Hardy, J. & Selkoe, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**, 353–356 (2002).
- Goedert, M. & Spillantini, M. G. A century of Alzheimer's disease. *Science* **314**, 777–781 (2006).
- Zheng, H. & Koo, E. H. Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein. *Mol. neurodegeneration* **6**, 27 (2011).
- Koffie, R. M., Hyman, B. T. & Spires-Jones, T. L. Alzheimer's disease: synapses gone cold. *Mol. neurodegeneration* **6**, 63 (2011).
- Selkoe, D. J. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **924**, 17–25 (2000).
- Dietrich, M. O. *et al.* Megalin mediates the transport of leptin across the blood-CSF barrier. *Neurobiol. Aging* **29**, 902–912, <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.01.008> (2008).
- Vargas, T. *et al.* Abeta accumulation in choroid plexus is associated with mitochondrial-induced apoptosis. *Neurobiol. Aging* **31**, 1569–1581 (2010).
- Crossgrove, J. S., Smith, E. L. & Zheng, W. Macromolecules involved in production and metabolism of beta-amyloid at the brain barriers. *Brain Res.* **1138**, 187–195, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.12.022> (2007).
- Kalaria, R. N., Premkumar, D. R., Pax, A. B., Cohen, D. L. & Lieberburg, I. Production and increased detection of amyloid beta protein and amyloidogenic fragments in brain microvessels, meningeal vessels and choroid plexus in Alzheimer's disease. *Brain Res. Mol. Brain Res* **35**, 58–68, [https://doi.org/10.1016/0169-328x\(95\)00180-z](https://doi.org/10.1016/0169-328x(95)00180-z) (1996).
- Liu, F. *et al.* gamma-secretase binding sites in aged and Alzheimer's disease human cerebrum: the choroid plexus as a putative origin of CSF Abeta. *Eur. J. Neurosci.* **37**, 1714–1725, <https://doi.org/10.1111/ejn.12159> (2013).
- Serot, J. M., Bene, M. C., Foliguet, B. & Faure, G. C. Morphological alterations of the choroid plexus in late-onset Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica* **99**, 105–108 (2000).
- Serot, J. M., Zmudka, J. & Jouanny, P. A possible role for CSF turnover and choroid plexus in the pathogenesis of late onset Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's disease: JAD.* **30**, 17–26, <https://doi.org/10.3233/jad-2012-111964> (2012).
- Perez-Gracia, E., Blanco, R., Carmona, M., Carro, E. & Ferrer, I. Oxidative stress damage and oxidative stress responses in the choroid plexus in Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica* **118**, 497–504 (2009).
- Preston, J. E. Ageing choroid plexus-cerebrospinal fluid system. *Microsc. Res. Tech.* **52**, 31–37 (2001).
- Rescher, U. & Gerke, V. Annexins—unique membrane binding proteins with diverse functions. *J. Cell Sci.* **117**, 2631–2639, <https://doi.org/10.1242/jcs.01245> (2004).
- Romisch, J. *et al.* Annexins I to VI: quantitative determination in different human cell types and in plasma after myocardial infarction. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **3**, 11–17 (1992).
- Arnold, P. *et al.* Recombinant human annexin A5 inhibits proinflammatory response and improves cardiac function and survival in mice with endotoxemia. *Crit. care Med.* **42**, e32–41, <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3182a63e01> (2014).
- Bedrood, S. *et al.* Annexin A5 directly interacts with amyloidogenic proteins and reduces their toxicity. *Biochemistry* **48**, 10568–10576, <https://doi.org/10.1021/bi900608m> (2009).
- Lee, G., Pollard, H. B. & Arispe, N. Annexin 5 and apolipoprotein E2 protect against Alzheimer's amyloid-beta-peptide cytotoxicity by competitive inhibition at a common phosphatidylserine interaction site. *Peptides* **23**, 1249–1263 (2002).
- Hung, L. W. *et al.* Amyloid-beta peptide (Abeta) neurotoxicity is modulated by the rate of peptide aggregation: Abeta dimers and trimers correlate with neurotoxicity. *J. neuroscience: Off. J. Soc. Neurosci.* **28**, 11950–11958 (2008).
- Ciccotosto, G. D. *et al.* Stereospecific interactions are necessary for Alzheimer disease amyloid-beta toxicity. *Neurobiol. Aging* **32**, 235–248 (2011).
- Gerke, V., Creutz, C. E. & Moss, S. E. Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat. reviews. Mol. Cell Biol.* **6**, 449–461 (2005).
- Creutz, C. E., Hira, J. K., Gee, V. E. & Eaton, J. M. Protection of the membrane permeability barrier by annexins. *Biochemistry* **51**, 9966–9983, <https://doi.org/10.1021/bi3013559> (2012).
- Domeij, H. *et al.* Annexin A5 inhibits atherogenic and pro-inflammatory effects of lysophosphatidylcholine. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* (2013).
- Ewing, M. M. *et al.* Annexin A5 therapy attenuates vascular inflammation and remodeling and improves endothelial function in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 95–101 (2011).
- Gu, C., Liu, M., Zhao, T., Zhai, L. & Wang, Y. Recombinant Human Annexin A5 Can Repair the Disrupted Cardiomyocyte Adherens Junctions in Endotoxemia. *Shock* **44**, 83–89, <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000370> (2015).
- Hofstra, L. & Heymans, S. Annexin A5 and the failing heart; lost or found in translation? *Eur. Heart J.* **28**, 2695–2696, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehm452> (2007).
- Simsek, B. *et al.* Urinary annexin V in children with nephrotic syndrome: a new prognostic marker? *Pediatr. Nephrol.* **23**, 79–82, <https://doi.org/10.1007/s00467-007-0606-z> (2008).
- Vermes, I., Steur, E. N., Reutelingsperger, C. & Haanen, C. Decreased concentration of annexin V in parkinsonian cerebrospinal fluid: speculation on the underlying cause. *Mov. disorders: Off. J. Mov. Disord. Soc.* **14**, 1008–1010 (1999).
- Sohma, H. *et al.* Evaluation of annexin A5 as a biomarker for Alzheimer's disease and dementia with lewy bodies. *Front. aging Neurosci.* **5**, 15 (2013).
- Krzyzanowska, A. *et al.* Expression of regulatory proteins in choroid plexus changes in early stages of Alzheimer disease. *J. neuropathology Exp. Neurol.* **74**, 359–369, <https://doi.org/10.1097/nen.0000000000000181> (2015).

32. Yamaguchi, M. *et al.* Investigation of annexin A5 as a biomarker for Alzheimer's disease using neuronal cell culture and mouse model. *J. Neurosci. Res.* **88**, 2682–2692 (2010).
33. Cataldo, A. M., Barnett, J. L., Pieroni, C. & Nixon, R. A. Increased neuronal endocytosis and protease delivery to early endosomes in sporadic Alzheimer's disease: neuropathologic evidence for a mechanism of increased beta-amyloidogenesis. *The J. neuroscience: Off. J. Soc. Neurosci.* **17**, 6142–6151 (1997).
34. Nixon, R. A., Yang, D. S. & Lee, J. H. Neurodegenerative lysosomal disorders: a continuum from development to late age. *Autophagy* **4**, 590–599 (2008).
35. Klionsky, D. J. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* **4**, 151–175 (2008).
36. Klionsky, D. J., Cuervo, A. M. & Seglen, P. O. Methods for monitoring autophagy from yeast to human. *Autophagy* **3**, 181–206 (2007).
37. Neniskyte, U., Neher, J. J. & Brown, G. C. Neuronal death induced by nanomolar amyloid beta is mediated by primary phagocytosis of neurons by microglia. *J. Biol. Chem.* **286**, 39904–39913 (2011).
38. Abeti, R. & Abramov, A. Y. Mitochondrial Ca(2+) in neurodegenerative disorders. *Pharmacol. research: Off. J. Italian Pharmacol. Soc.* **99**, 377–381, <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.05.007> (2015).
39. Abramov, A. Y., Canevari, L. & Duchen, M. R. Beta-amyloid peptides induce mitochondrial dysfunction and oxidative stress in astrocytes and death of neurons through activation of NADPH oxidase. *The J. neuroscience: Off. J. Soc. Neurosci.* **24**, 565–575, <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4042-03.2004> (2004).
40. Cederholm, A. & Frostegard, J. Annexin A5 as a novel player in prevention of atherothrombosis in SLE and in the general population. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1108**, 96–103 (2007).
41. Baek, H. S. *et al.* Annexin A5 suppresses cyclooxygenase-2 expression by downregulating the protein kinase C-zeta-nuclear factor-kappaB signaling pathway in prostate cancer cells. *Oncotarget* **8**, 74263–74275, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19392> (2017).
42. de Jong, R. C. M. *et al.* Annexin A5 reduces infarct size and improves cardiac function after myocardial ischemia-reperfusion injury by suppression of the cardiac inflammatory response. *Sci. Rep.* **8**, 6753, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25143-y> (2018).
43. Stohr, R. *et al.* Annexin A5 reduces early plaque formation in ApoE^{-/-} mice. *PLoS One* **12**, e0190229, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190229> (2017).
44. Zhang, X. *et al.* Anti-cancer activity of Annexin V in murine melanoma model by suppressing tumor angiogenesis. *Oncotarget* **8**, 42602–42612, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16645> (2017).
45. Kenis, H., Hofstra, L. & Reutelingsperger, C. P. Annexin A5: shifting from a diagnostic towards a therapeutic realm. *Cell. Mol. life sciences: CMLS* **64**, 2859–2862 (2007).
46. van Genderen, H. O., Kenis, H., Hofstra, L., Narula, J. & Reutelingsperger, C. P. Extracellular annexin A5: functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization. *Biochim. Biophys. Acta* **1783**, 953–963, <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.01.030> (2008).
47. Eberhard, D. A., Brown, M. D. & VandenBerg, S. R. Alterations of annexin expression in pathological neuronal and glial reactions. Immunohistochemical localization of annexins I, II (p36 and p11 subunits), IV, and VI in the human hippocampus. *Am. J. Pathol.* **145**, 640–649 (1994).
48. Cristante, E. *et al.* Identification of an essential endogenous regulator of blood-brain barrier integrity, and its pathological and therapeutic implications. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* **110**, 832–841 (2013).
49. Kowall, N. W., McKee, A. C., Yankner, B. A. & Beal, M. F. *In vivo* neurotoxicity of beta-amyloid [beta(1-40)] and the beta(25-35) fragment. *Neurobiol. Aging* **13**, 537–542 (1992).
50. Loo, D. T. *et al.* Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* **90**, 7951–7955 (1993).
51. Cotman, C. W., Whittemore, E. R., Watt, J. A., Anderson, A. J. & Loo, D. T. Possible role of apoptosis in Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **747**, 36–49 (1994).
52. Paradis, E., Douillard, H., Koutroumanis, M., Goodyer, C. & LeBlanc, A. Amyloid beta peptide of Alzheimer's disease downregulates Bcl-2 and upregulates bax expression in human neurons. *J. neuroscience: Off. J. Soc. Neurosci.* **16**, 7533–7539 (1996).
53. White, A. R. *et al.* Sublethal concentrations of prion peptide PrP106-126 or the amyloid beta peptide of Alzheimer's disease activates expression of proapoptotic markers in primary cortical neurons. *Neurobiol. Dis.* **8**, 299–316 (2001).
54. Pillai, D. K. *et al.* Directional secretomes reflect polarity-specific functions in an *in vitro* model of human bronchial epithelium. *Am. J. Respiratory Cell Mol. Biol.* **50**, 292–300, <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0188OC> (2014).
55. Calderon, F. & Kim, H. Y. Detection of intracellular phosphatidylserine in living cells. *J. Neurochem.* **104**, 1271–1279, <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05079.x> (2008).
56. Jaeger, P. A. *et al.* Regulation of amyloid precursor protein processing by the Beclin 1 complex. *PLoS One* **5**, e11102, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011102> (2010).
57. Nixon, R. A. *et al.* Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J. neuropathology Exp. Neurol.* **64**, 113–122 (2005).
58. Lipinski, M. M. *et al.* Genome-wide analysis reveals mechanisms modulating autophagy in normal brain aging and in Alzheimer's disease. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* **107**, 14164–14169, <https://doi.org/10.1073/pnas.1009485107> (2010).
59. Fedeli, C., Filadi, R., Rossi, A., Mammucari, C. & Pizzo, P. PSEN2 (presenilin 2) mutants linked to familial Alzheimer disease impair autophagy by altering Ca(2+) homeostasis. *Autophagy*, 1–19, <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1596489> (2019).
60. Zhang, Z. H. *et al.* Selenomethionine Attenuates the Amyloid-beta Level by Both Inhibiting Amyloid-beta Production and Modulating Autophagy in Neuron-2a/AbetaPPsw Cells. *J. Alzheimers Dis.* **59**, 591–602, <https://doi.org/10.3233/jad-170216> (2017).
61. Nixon, R. A., Cataldo, A. M. & Mathews, P. M. The endosomal-lysosomal system of neurons in Alzheimer's disease pathogenesis: a review. *Neurochem. Res.* **25**, 1161–1172 (2000).
62. Boland, B. *et al.* Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *J. neuroscience: Off. J. Soc. Neurosci.* **28**, 6926–6937, <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0800-08.2008> (2008).
63. Yu, W. H. *et al.* Macroautophagy—a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J. Cell Biol.* **171**, 87–98, <https://doi.org/10.1083/jcb.200505082> (2005).
64. Ghislat, G., Aguado, C. & Knecht, E. Annexin A5 stimulates autophagy and inhibits endocytosis. *J. Cell Sci.* **125**, 92–107, <https://doi.org/10.1242/jcs.086728> (2012).
65. Ditaranto, K., Tekirian, T. L. & Yang, A. J. Lysosomal membrane damage in soluble Abeta-mediated cell death in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* **8**, 19–31, <https://doi.org/10.1006/nbdi.2000.0364> (2001).
66. Oku, Y., Murakami, K., Irie, K., Hoseki, J. & Sakai, Y. Synthesized Abeta42 Caused Intracellular Oxidative Damage, Leading to Cell Death, via Lysosome Rupture. *Cell structure Funct.* **42**, 71–79, <https://doi.org/10.1247/csf.17006> (2017).
67. Nixon, R. A. & Yang, D. S. Autophagy and neuronal cell death in neurological disorders. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **4**, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008839> (2012).
68. Gordon, P. B., Holen, I., Fosse, M., Rotnes, J. S. & Seglen, P. O. Dependence of hepatocytic autophagy on intracellularly sequestered calcium. *J. Biol. Chem.* **268**, 26107–26112 (1993).
69. Williams, A. *et al.* Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 295–305, <https://doi.org/10.1038/nchembio.79> (2008).

70. Arispe, N., Rojas, E. & Pollard, H. B. Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum. *Proc. Natl Acad. Sci. U S Am.* **90**, 567–571 (1993).
71. Abramov, A. Y., Canevari, L. & Duchen, M. R. Changes in intracellular calcium and glutathione in astrocytes as the primary mechanism of amyloid neurotoxicity. *J. neuroscience: Off. J. Soc. Neurosci.* **23**, 5088–5095 (2003).
72. LaFerla, F. M. Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat. reviews. Neurosci.* **3**, 862–872 (2002).
73. Viola, K. L. & Klein, W. L. Amyloid beta oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. *Acta neuropathologica* **129**, 183–206, <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1386-3> (2015).
74. Bhatia, R., Lin, H. & Lal, R. Fresh and globular amyloid beta protein (1–42) induces rapid cellular degeneration: evidence for AbetaP channel-mediated cellular toxicity. *FASEB journal: Off. Publ. Federation Am. Societies Exp. Biol.* **14**, 1233–1243 (2000).
75. Kawahara, M., Kuroda, Y., Arispe, N. & Rojas, E. Alzheimer's beta-amyloid, human islet amylin, and prion protein fragment evoke intracellular free calcium elevations by a common mechanism in a hypothalamic GnRH neuronal cell line. *J. Biol. Chem.* **275**, 14077–14083 (2000).
76. Kuchibhotla, K. V. *et al.* Abeta plaques lead to aberrant regulation of calcium homeostasis *in vivo* resulting in structural and functional disruption of neuronal networks. *Neuron* **59**, 214–225, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.06.008> (2008).
77. McKhann, G. M. *et al.* The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia: J. Alzheimer's Assoc.* **7**, 263–269, <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.005> (2011).
78. Petersen, R. C. Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *J. Intern. Med.* **256**, 183–194 (2004).
79. Albert, M. S. *et al.* The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's dementia: J. Alzheimer's Assoc.* **7**, 270–279, <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.008> (2011).
80. Alcolea, D. *et al.* Amyloid precursor protein metabolism and inflammation markers in preclinical Alzheimer disease. *Neurology* **85**, 626–633, <https://doi.org/10.1212/wnl.0000000000001859> (2015).
81. Carro, E., Trejo, J. L., Gomez-Isla, T., LeRoith, D. & Torres-Aleman, I. Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels. *Nat. Med.* **8**, 1390–1397 (2002).
82. Lambert, M. P. *et al.* Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1–42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc. Natl Acad. Sci. U S Am.* **95**, 6448–6453 (1998).
83. Bartolome, F. *et al.* Pathogenic p62/SQSTM1 mutations impair energy metabolism through limitation of mitochondrial substrates. *Sci. Rep.* **7**, 1666, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01678-4> (2017).

Acknowledgements

We are grateful to the patients and donors without which these work would not have been possible. Also, we thank Dr. Marife Cano who kindly helped us to obtain and perform choroid plexus cell cultures. This study was supported by grants from the *Instituto de Salud Carlos III* (FIS2015/00780, PI18/00118), FEDER, joint grant from Comunidad de Madrid (S2017/BMD-3700; NEUROMETAB-CM), *Fundación Ramón Areces* (CIVP16A1825), and *CIBERNED* (PI2016/01). Part of the work was supported by the NIHR Queen Square Dementia Biomedical Research Unit. This work was undertaken at UCLH/UCL which receives a proportion of funding from the Department of Health's NIHR Biomedical Research Centres funding scheme.

Author contributions

F.B. and E.C. were responsible for experimental designs, data interpretation and writing of the paper. F.B., A.K., M.C., C.P. and D.A. performed and analysed the experiments. C.S., A.V.G., A.R., J.F., D.A., A.L.L. and I.F. provided human samples. J.H. and A.Y.A. contributed feedback the manuscript. J.H., A.Y.A. and E.C. obtained the funding. All authors reviewed and corrected the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66177-5>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to F.B. or E.C.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020