



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

*El péptido As en concentraciones nanomolares es capaz de modular
la actividad del R-NMDA en la DPS por interacción con el receptor
 $p75^{NTR}$*

Memoria para optar al Título de Bioquímico

RODRIGO FERNANDO CALDERON JOFRE

Directora de Tesis

Dra. Ursula Wyneken H.

Facultad de Medicina

Universidad de los Andes

Profesor Patrocinante

Dra. Maria Antonieta Valenzuela P.

**Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas**

Universidad de Chile

Santiago, Chile. 2009

Agradecimientos

Debo agradecer a la Dra. Ursula Wyneken, por haberme recibido en su laboratorio y tener la paciencia de tolerar mis errores y tratar de enseñarme como ser mejor profesional y persona. Agradezco especialmente a Rodrigo Sandoval, por ser mi guía y maestro al enseñarme las técnicas que permitieron realizar este trabajo; a Mauricio Sandoval, por ayudarme en forma desinteresada en la discusión del trabajo; y a Soledad Sandoval, por estar siempre que necesitaba de su ayuda. También debo agradecer al resto del Laboratorio de Neurociencias de la Universidad de los Andes (Dr. Fernando Orrego, Rodrigo González, Estibaliz Ampuero, Romina Falcón, Andrés González, Victoria Bartsch) quienes de alguna forma contribuyeron al presente trabajo.

También agradezco a la Dra. Rommy von Bernhardi (PUC), por toda la ayuda y consejos que nos brindó en el desarrollo de esta memoria.

Finalmente, agradezco a mis padres y familia, que gracias a su apoyo incondicional hicieron posible este trabajo.

“Los obstáculos son esas cosas espantosas que ves cuando apartas los ojos de tu meta.” (Henry Ford)

Esta memoria fue financiada por el proyecto FAI 001-07 de la Universidad de los Andes “Regulación de las sinapsis excitadoras por el péptido A β en su forma no agregada” a cargo de Soledad Sandoval.

Algunos de estos datos fueron presentados como póster en el I Congreso Latinoamericano IBRO/LARC de Neurociencias de América Latina, Caribe y Península Ibérica. // IV Congreso de la Sociedad Chilena de Neurociencia (1 al 4 de Septiembre de 2008), bajo el título “Nitric oxide mediates inhibition of NMDA receptor currents by proNGF in postsynaptic densities transplanted into *Xenopus* oocytes” (Autores: **R. Calderón**, R. Sandoval, y U. Wyneken).

Índice General

Agradecimientos.....	ii
Índice General.....	v
Índice de Figuras.....	vii
Índice de Tablas.....	viii
Abreviaturas.....	ix
Resumen.....	xi
Summary.....	xiii
1. Introducción.....	1
1.1. La Enfermedad de Alzheimer.....	1
1.2. Relación entre el péptido A β , plasticidad sináptica y aprendizaje...	3
1.3. Las sinapsis glutamatérgicas.....	4
2. Hipótesis.....	9
3. Objetivos.....	9
3.1. Objetivo General.....	9
3.2. Objetivos Específicos.....	9
4. Materiales y Métodos.....	11
4.1. Obtención de Densidades Postsinápticas.....	11
4.2. Extracción de ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	12
4.3. Microinyección de DPSs en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	12
4.4. Registros electrofisiológicos	13
4.5. Análisis de datos electrofisiológicos.....	15
4.6. Análisis estadístico.....	16
4.7. Preparación del péptido β -Amiloide.....	16
4.8. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes y Western Blot del péptido A β 1-42.....	17
5. Resultados.....	18
5.1. NMDA produce respuestas específicas en ovocitos inyectados con DPSs.....	19
5.2. proNGF produce inhibición del R- NMDA por interacción con el receptor para neurotrofinas p75 ^{NTR}	19

5.3. La inhibición del R-NMDA ocurre por s-nitrosilación pero no por defosforilación.....	21
5.4 El péptido A β 1-40 monomérico produce efectos opuestos y dosis dependientes sobre el R-NMDA en ovocitos.....	24
5.5. Efecto de los péptidos oligoméricos sobre el R-NMDA.....	26
5.6. El efecto del péptido A β 1-42(O) está mediado por p75 ^{NTR}	28
6. Discusión.....	30
6.1. Registros en ovocitos y corrientes mediadas por NMDA.....	30
6.2. Efecto inhibitorio de proNGF sobre corrientes mediadas por R-NMDA.....	30
6.3. Participación del NO en la inhibición del R-NMDA vía p75 ^{NTR}	31
6.4. Efecto del péptido A β	31
6.5. Relación entre el péptido A β y el receptor p75 ^{NTR}	33
7. Conclusiones.....	35
8. Bibliografía.....	36

Índice de Figuras

Figura 1.	Estructura de la DPS.....	5
Figura 2.	Esquema de purificación de DPS a partir de rata adulta.....	13
Figura 3.	Esquema de obtención de ovocitos y posterior inyección de DPSs.....	14
Figura 4.	Representación grafica de una corriente mediada por el R-NMDA en ovocitos inyectados con DPSs.....	16
Figura 5.	NMDA induce corrientes específicas en forma dependiente a la dosis en ovocitos inyectados con DPSs.....	20
Figura 6.	proNGF produce una inhibición en las corrientes activadas por NMDA a través de la interacción con el relector $p75^{NTR}$	21
Figura 7.	Fosfatasa no participan del efecto de $p75^{NTR}$	23
Figura 8.	NO participa en la inhibición mediada por $p75^{NTR}$	23
Figura 9.	El péptido $A\beta$ 1-40(M) produce un efecto dual dependiente de la concentración sobre las respuestas mediadas por el R-NMDA.....	25
Figura 10.	El péptido $A\beta$ 1-42(M) inhibe la respuesta mediada por NMDA....	25
Figura 11.	Caracterización del péptido $A\beta$ 1-42(O).....	27
Figura 12.	El péptido $A\beta$ 1-42(O) produce un efecto dual sobre la respuesta a NMDA a concentraciones menores que el $A\beta$ 1-40(M).....	27
Figura 13.	Participación del receptor $p75^{NTR}$ en el efecto del péptido $A\beta$ 1-42(O) sobre las respuestas activadas por NMDA.....	29
Figura 14.	Figura 14. Modelo propuesto para la participación de $p75^{NTR}$ en el efecto dual del péptido $A\beta$ sobre la actividad del R-NMDA.....	35

Índice de Tablas

Tabla 1. Efectos del péptido A β	10
Tabla 2. Datos de I, ‡ y t _{0,5} obtenidos para proNGF (150ng/mL) y los péptidos A β 1-40(M), A β 1-42(M) y A β 1-42(O) a las concentraciones usadas.....	22

Abreviaturas

$\alpha 7nAChR$: Receptor de Acetilcolina Nicotínico que contiene la subunidad $\alpha 7$
A β 1-40	: β Amiloide de 40 aminoácidos
A β 1-42	: β Amiloide de 42 aminoácidos
A β (M)	: β Amiloide Monomérico
A β (O)	: β Amiloide Oligomérico
AMPA	: Acido -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
APP	: <i>Amyloid Precursor Protein</i> , Proteína Precursora del Amiloide
APV	: Acido (2R)-amino-5-fosfonovalerico
BACE-1	: <i>s-amyloid cleaving enzyme-1</i> , Enzima cortadora del Amiloide
BDNF	: <i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i> , Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro
CREB	: <i>cAMP Response Element Binding</i> , Proteína que se une al Elemento de Respuesta a AMPc
DPS	: Densidad Postsináptica
EA	: Enfermedad de Alzheimer
EGTA	: Acido etilenglicol-bis (2-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético
K _i	: Constante de Inhibición
K _D	: Constante de Disociación
kDa	: kilo Dalton
L-NNA	: N _o -Nitro-L-Arginina
LTP	: <i>Long-Term Potentiation</i> , Potenciación de Larga Duración
LTD	: <i>Long-Term Depression</i> , Depresión de Larga Duración
NaF	: Fluoruro de Sodio
NF κ B	: <i>Nuclear factor B</i> , Factor Nuclear κ B
NGF	: <i>Nerve Growth Factor</i> , Factor de Crecimiento Neuronal
NMDA	: Acido N-metil-D-aspartico
NO	: Oxido Nítrico

NOS	: <i>Nitric Oxide Synthase</i> , Oxido Nítrico Sintasa
NR1	: Subunidad 1 del receptor NMDA
NR2A, B, C, y D	: Subunidad 2A, B, C y D del receptor NMDA
NT-3	: Neurotrofina 3
NT-4	: Neurotrofina 4
p75 ^{NTR}	: Receptor para Neurotrofina p75
PSD-95	: Proteína de la Densidad Postsináptica de 95 kDa
ROS	: <i>Reactive oxygen species</i> , Especies Reactivas de Oxígeno
SDS	: Sodium dodecyl sulfate, Dodecil sulfato de sodio
TNF	: <i>Tumoral Necrosis Factor</i> , Factor de Necrosis Tumoral
Trk	: <i>Tropomyosin Related Kinase</i> , Quinasa Relacionada a Tropomiosina

Resumen

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología neurodegenerativa progresiva caracterizada principalmente por agregados proteicos intracelulares (ovillos neurofibrilares) y extracelulares (placas seniles o amiloides). Estos últimos están formados por un péptido de 39 a 43 aminoácidos, conocido como péptido β amiloide ($A\beta$), el que se genera por proteólisis de la Proteína Precursora del Amiloide (APP). Existen dos formas principales del péptido $A\beta$, una de 40 aminoácidos presente en personas sanas, y otra de 42 aminoácidos, constituyente principal de las placas observadas en pacientes de EA. Estas placas se forman a partir de la agregación de monómeros (M) que forman oligómeros solubles (O), los que formarían posteriormente protofibrillas y finalmente las fibras insolubles. La falta de correlación entre el grado de demencia y la cantidad de placas ha sugerido que los oligómeros solubles podrían ser los responsables de los síntomas iniciales. Si bien no están claros los blancos específicos del péptido $A\beta$, uno de los principales candidatos son las sinapsis excitatorias que responden a glutamato. Estas sinapsis poseen una especialización de membrana conocida como densidad postsináptica (DPS), estructura que contiene a los receptores para neurotransmisores y proteínas asociadas a la regulación de la función sináptica, agrupadas por proteínas de andamio. Dentro de los receptores para glutamato, el R-NMDA es de gran importancia en procesos de memoria y aprendizaje, y su actividad puede ser modulada por el receptor para neurotrofinas $p75^{NTR}$. Este receptor también está contenido en la DPS, y participa tanto en sobrevivencia como en apoptosis neuronal. Además, posee la capacidad de unirse a ligandos estructuralmente no relacionados, entre los que se encuentra el péptido $A\beta$, postulándose como potencial blanco molecular del péptido.

Nuestra hipótesis es que *El péptido $A\beta$ en concentraciones nanomolares es capaz de inhibir la actividad del R-NMDA en la DPS por interacción con el receptor $p75^{NTR}$* . Para este trabajo, se obtuvieron DPS de corteza de rata adulta, las cuales fueron

microinyectadas en ovocitos de *Xenopus laevis*. Estos ovocitos son sometidos a estudios de fijación de potencial con 2 electrodos (*voltage clamp*), y se midieron las respuestas obtenidas con el agonista NMDA en presencia de distintas concentraciones del péptido A β 1-40(M) y A β 1-42(M) y (O). En el caso del péptido A β 1-42(M), se observa una inhibición a todas las concentraciones utilizadas, sin ser dependiente de la dosis. Por otro lado, los péptidos A β 1-40(M) y A β 1-42(O) poseen efectos duales sobre las corrientes de NMDA: a bajas concentraciones producen un efecto inhibitorio y a altas concentraciones un efecto potenciador. En el caso del péptido A β 1-40(M), la inhibición se logra usando una concentración de 50 nM, mientras que en el caso del A β 1-42(O) se logra con una concentración de 5 nM. En ambos casos la potenciación ocurre al usar una concentración de 1 μ M. Adicionalmente, el efecto A β 1-42(O) está mediado por el receptor p75^{NTR}, ya que el uso de un anticuerpo que produce pérdida de función del receptor es capaz de revertir tanto el efecto inhibitorio como potenciador del péptido. Estos datos permiten confirmar que existe participación del receptor p75^{NTR} en los efectos sinápticos causados por el péptido, especialmente sobre la actividad del R-NMDA, apuntando al rol fisiológico del péptido y su relación con la patología de la EA.

Summary

Amyloid- β peptide in nanomolar concentration is able to modulate NMDAR activity in PSD by interaction with p75^{NTR} neurotrophin receptor

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative progressive pathology characterized mainly by protein intracellular (neurofibrillary tangles) and extracellular (Amyloid plaques) aggregates. The latter are formed by 39-43 aminoacids peptide, known as amyloid β ($A\beta$), generated by proteolysis of Amyloid Precursor Protein (APP). There are two principal forms, one of 40 aminoacids, present in healthy people, and other of 42 aminoacids, main constituent of plaques seen in AD patients. These plaques are formed by aggregation of monomers (M), which form oligomers (O), then protofibrils and finally insoluble fiber. The lack of correlation between grade of dementia and number of plaques has suggested that soluble oligomers could be the responsible of initial symptoms. Although there is no clarity about specific targets of $A\beta$ peptide, one of the most named are excitatory synapses activated by glutamate. These synapses have a membrane specialization known as postsynaptic density (PSD), structure that contains the neurotransmitter receptors and proteins associated with regulation of synaptic function, grouped by scaffolding proteins. Between glutamate receptors, NMDA-R has great importance in memory and learning process, and his activity can be modulated by the neurotrophin receptor p75^{NTR}. This receptor is also present in PSD and participates in both survival and neuronal apoptosis. In addition, it has the ability to bind ligands structurally unrelated, including $A\beta$ peptide, postulating the p75^{NTR} as a potential molecular target of the peptide.

Our hypothesis is that *As peptide in nanomolar concentration is able to inhibit R-NMDA activity in PSD by interacting with p75^{NTR}*. For this work, we obtained PSD from adult rat cortex, which were microinjected into *Xenopus laevis* oocytes. These oocytes were subjected to 2-electrodes voltage clamp, and responses to agonist NMDA were acquired in presence of different concentrations of $A\beta$ 1-40(M) and $A\beta$ 1-42(M) and (O). In the case of $A\beta$ 1-42(M), inhibition was non dose-dependent. On the other hand, $A\beta$ 1-

40(M) and A β 1-42(O) have dual effect on NMDA-R currents: at low concentrations the peptides have an inhibitory effect and at high concentrations a potentiation effect. In the case of A β 1-40(M), inhibition is obtained using a concentration of 50 nM, whereas for the A β 1-42(O) is obtained with a concentration of 5 nM. In both cases, potentiation occurs when a concentration of 1 μ M is used. Additionally, the effect of A β 1-42(O) is p75^{NTR}-mediated, because the use of loss-of-function antibody reversed both inhibition and potentiation effect. These data allow us to confirm that there is participation of p75NTR in synaptic effects caused by A β peptide, specially on NMDA-R activity, pointing to the physiological function of the peptide and its relationship with AD pathology.

1. INTRODUCCION

1.1. La Enfermedad de Alzheimer.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología neurodegenerativa que afecta principalmente a la población mayor de 65 años, y que presenta la mayor prevalencia de las demencias en la población mundial (St George-Hyslop, 2000). La EA fue descrita por primera vez en 1906, caracterizándose por la pérdida de funciones cognitivas y memoria con demencia progresiva, que conlleva a la muerte del paciente (Goedert & Spillantini, 2006).

Los marcadores histopatológicos característicos de la EA son depósitos proteicos intracelulares, llamados ovillos neurofibrilares, y depósitos extracelulares, conocidos como placas seniles o amiloides. Los ovillos neurofibrilares están compuestos mayoritariamente por una proteína accesoria de microtúbulos denominada proteína tau. En cambio, el constituyente principal de las placas seniles es el péptido β -Amiloide ($A\beta$), una proteína de 39 a 43 aminoácidos y un peso aproximado de 4 kDa. Este péptido se forma por proteólisis a partir de un precursor de mayor tamaño, la Proteína Precursora del Amiloide (APP, por *Amyloid Precursor Protein*), una glicoproteína transmembrana codificada en el cromosoma 21 (Kamenetz et al, 2003). La APP es procesada por una familia de proteasas denominadas secretasas, y el producto de la proteólisis son péptidos de longitud variable. Las secretasas asociadas en forma directa con la generación del péptido $A\beta$ son, en forma secuencial, la secretasa β (también llamada BACE-1, por *s-amyloid cleaving enzyme-1*), y posteriormente la secretasa γ que genera el péptido $A\beta$, cuyo largo depende del sitio de corte. Adicionalmente, existe la secretasa α , la cual actúa antes que la secretasa γ , y corta en la zona del precursor que contiene la secuencia $A\beta$, de forma que los fragmentos solubles obtenidos no son tóxicos, evitando la generación del péptido $A\beta$ (De Strooper & Annaert, 2000; Reinhard et al, 2005). Se han encontrado 2 formas principales del péptido $A\beta$: una forma de 40 aminoácidos ($A\beta_{1-40}$), presente en líquido cefalorraquídeo y plasma de personas sanas; y una forma de 42 aminoácidos ($A\beta_{1-42}$), que por su mayor hidrofobicidad es más propenso a formar agregados peptídicos, encontrándose en altas concentraciones en las placas seniles de los pacientes con EA

y considerada la forma más dañina para el Sistema Nervioso Central (SNC) (Walsh & Selkoe, 2007). Además del péptido A β , de la proteólisis de la APP se generan otros fragmentos cuyas funciones estarían involucradas en señalización celular (Reinhard et al, 2005; Findeis, 2007).

El péptido A β sufre un proceso de agregación progresivo que antecede a la formación de las placas seniles o amiloides características de la EA. A partir de los monómeros solubles se forman oligómeros solubles que pueden ir desde trímeros y pentámeros hasta pesos cercanos a los 48 kDa (dodecámeros), también conocidos como *ADDL* (por *As-derived diffusible ligands*; (Lambert et al, 1998; Hepler et al, 2006) o *globulómeros* (Nimmrich et al, 2008), siendo algunos de estos oligómeros caracterizados *in vivo* (Cleary et al, 2005; Shankar et al, 2007). En preparaciones *in vitro* de estos oligómeros, el grado de agregación del péptido que se obtiene depende críticamente del protocolo empleado. Se piensa que estos oligómeros posteriormente se asocian para formar las protofibrillas (agregados insolubles), formando la “semilla” que daría origen finalmente a las fibras amiloides de la placa observadas *post mortem* en cerebros de pacientes con EA (Klein, 2002). Sin embargo, las causas precisas que originan la acumulación y posterior agregación *in vivo* del péptido A β siguen sin conocerse, aunque una proporción creciente de la forma de 42 aminoácidos con respecto a la de 40 favorecería la agregación (Findeis, 2007). Se han descrito mutaciones en la APP cerca de los sitios de corte de las secretasas que aumentan la cantidad de péptido A β generado (según la mutación, se favorecen las dos formas si es cerca del sitio de corte β o sólo la forma A β 1-42 si es cerca del sitio γ). Además existen mutaciones en la misma secretasa γ que aumentan la producción del péptido A β 1-42 (Walsh & Selkoe, 2007). Por otro lado, se ha descrito que personas con síndrome de Down (trisomía del cromosoma 21) son más susceptibles a mostrar signos clínicos similares a la EA, debido a la presencia de una copia adicional del gen que codifica la APP (Findeis, 2007; Venkitaramani et al, 2007). Sin embargo, la genética sólo explica una fracción minoritaria de los pacientes que padecen la EA, quedando el mayor porcentaje sin explicación aparente.

1.2. Relación entre péptido A β , plasticidad sináptica y aprendizaje

La acumulación del péptido A β ha sido considerado como un factor clave en la patogénesis de la EA, asociándose durante muchos años la formación de las placas seniles con la muerte neuronal y los síntomas de la enfermedad (Hardy & Higgins, 1992). Sin embargo, se ha encontrado una falta de correlación entre la abundancia de placas seniles y el grado de demencia observado. Actualmente, múltiples evidencias apoyan la idea de que el péptido A β en su forma no fibrilar tiene efectos deletéreos sobre el funcionamiento del SNC, afectando la morfología y funcionalidad de las neuronas (McLean et al, 1999; Hardy & Selkoe, 2002; Gong et al, 2003). Los oligómeros solubles del péptido A β , cuyas concentraciones aumentan en etapas tempranas de la EA, serían los responsables de los síntomas iniciales (McLean et al, 1999; Mucke et al, 2000). La muerte neuronal asociada al péptido ha sido observada a concentraciones en el orden μ M (Yaar et al, 1997; Lambert et al, 1998; Deshpande et al, 2006). A concentraciones mayores a 1 μ M, el péptido A β 1-40 formaría canales iónicos selectivos para cationes, los que ingresarían hacia el intracelular contribuyendo a inducir muerte neuronal (Vargas et al, 2000; Alarcon et al, 2006). La diversidad de formas solubles usadas en los diferentes estudios, sumado a la amplia escala de concentraciones, podrían dar cuenta de la diversidad de efectos encontrados (Tabla 1).

Actualmente, se piensa que el blanco del péptido A β en su forma soluble, en diversas formas oligoméricas, son las sinapsis (Walsh & Selkoe, 2007). Éstas interactúan directamente con las formas solubles del péptido (Lacor et al, 2004), lo que se correlacionaría con disfunción sináptica y pérdida cognitiva. Dentro de los efectos sinápticos descritos, el péptido A β degrada la proteína andamio de sinapsis excitadoras, PSD-95 (Roselli et al, 2005), inhibe canales de calcio implicados en la liberación de neurotransmisor (Nimmrich et al, 2008), lleva a la disminución de receptores para glutamato en la membrana sináptica (Snyder et al, 2005; Lacor et al, 2007) y a pérdida de sinapsis activas (Shankar et al, 2007). Sin embargo, no se sabe con certeza cuáles serían las proteínas capaces de interactuar directamente con el péptido A β en las sinapsis. Se ha visto que el péptido colocaliza con receptores de L-glutamato y marcadores de sinapsis excitadoras (Lacor et al, 2007; Shankar et al,

2007), pero no con sinapsis inhibitoras. Una interacción directa se ha visto con el receptor colinérgico del tipo $\alpha 7$ nicotínico (Wang et al, 2000a; Wang et al, 2000b). Sin embargo, otros autores han descartado que el péptido A β pueda unirse a dicho receptor, concluyendo que en realidad el péptido se uniría a lípidos de membrana (Small et al, 2007). De esta forma, los receptores para A β en las sinapsis excitadoras aún son desconocidos.

1.3. Las sinapsis glutamatérgicas

Las sinapsis glutamatérgicas son las sinapsis excitadoras más abundantes del SNC. Ocurren entre terminaciones nerviosas y espinas dendríticas, las que contienen una especialización de la membrana postsináptica denominada **densidad postsináptica** (DPS, Figura 1). Esta estructura contiene los receptores postsinápticos para L-glutamato y una gran cantidad de proteínas relacionadas con la regulación de la función sináptica como canales iónicos, proteínas del citoesqueleto, proteínas de adhesión intercelular y enzimas como quinasas y fosfatasas de proteínas (Kennedy, 2000; Sheng, 2001). Todas ellas se encuentran agrupadas en complejos multiproteicos a través de interacción con proteínas andamio.

Los receptores glutamatérgicos se clasifican en dos familias: Receptores metabotrópicos, que actúan acoplados a proteína G, y receptores ionotrópicos que son canales iónicos. Estos últimos receptores se han clasificado según la afinidad que tienen por fármacos selectivos en: Receptores tipo AMPA (R-AMPA), sensibles a ácido -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico; Receptores tipo KAÍNICO (sensibles a ácido kaínico) y Receptores tipo NMDA (R-NMDA), sensibles a ácido N-metil-D-aspártico (Madden, 2002). El papel de los R-NMDA y R-AMPA en la plasticidad sináptica está bien caracterizado, siendo esenciales en procesos subyacentes a aprendizaje y memoria (Xia et al, 1996; Liu et al, 2004; Massey et al, 2004). El presente trabajo se centrará en el R-NMDA, un tetrámero compuesto por 2 subunidades NR1, de la cual existen 8 isoformas derivadas de un gen único, y 2 subunidades NR2, que proviene de 4 genes distintos (NR2A, B, C y D). Cada una de estas subunidades confiere características funcionales y farmacológicas particulares al receptor (Cull-Candy & Leszkiewicz, 2004; Lau & Zukin, 2007).

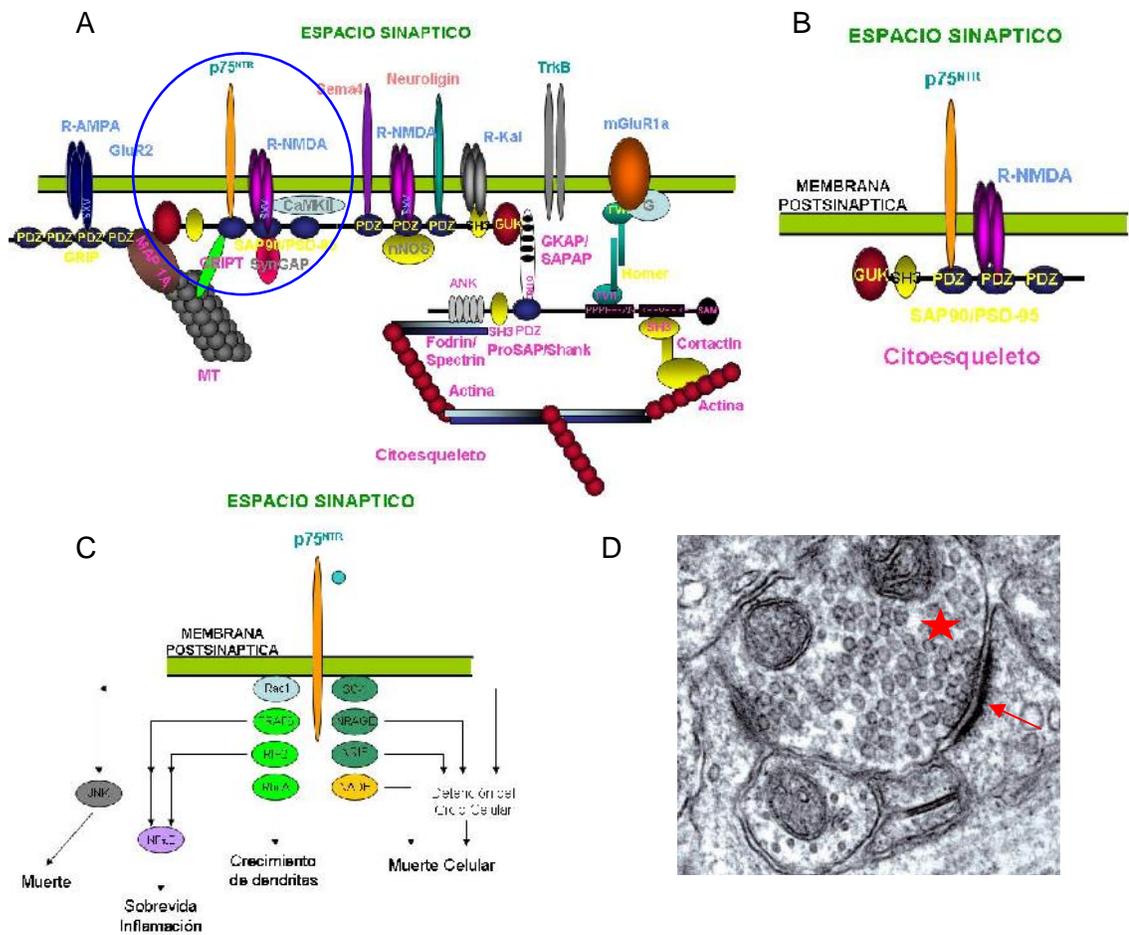


Figura 1. Estructura de la DPS. (A) Esquema de la estructura de la DPS, en el que se muestran los receptores para glutamato (R-AMPA, R-NMDA, R-Kai, mGluR1a), asociados a proteínas de transducción (CaMKII, nNOS, proteína G), ancladas a proteínas de andamio (SAP90/PSD-95, GRIP, Homer) y de citoesqueleto (CRIPT, GKAP, ProSAP, etc.). (B) Ampliación de la DPS, donde se destaca la presencia de p75^{NTR} en el complejo proteico que contiene al R-NMDA (marcada en un círculo azul en (A)). (C) p75^{NTR} necesita asociarse a proteínas efectoras para transducir la señal, produciendo una amplia variedad de efectos. (D) Imagen de microscopía electrónica de la DPS (flecha), mientras que la terminación presináptica que contiene las vesículas sinápticas se muestra con una estrella (tomado de (Kennedy, 2000)).

El R-NMDA es permeable a iones sodio y calcio, y el influjo de este último permite activar cascadas intracelulares involucradas en los procesos de plasticidad sináptica subyacentes a memoria y aprendizaje (Collingridge et al, 1992; Rao & Finkbeiner, 2007). Así, los R-NMDA juegan un papel esencial en modelos celulares de

memoria y aprendizaje tales como la Potenciación de Larga Duración (LTP) y la Depresión de Larga Duración (Bliss & Collingridge, 1993; Liu et al, 2004; Massey et al, 2004; Miyamoto, 2006). El R-NMDA requiere de la presencia obligada de dos agonistas para activarse: L-Glutamato se une a las subunidades NR2, mientras que D-Serina interactúa con las subunidades NR1 (Mothet et al, 2000). Adicionalmente, la actividad del R-NMDA se encuentra regulada por fosforilación/desfosforilación (Westphal et al, 1999; Rycroft & Gibb, 2004) y S-nitrosilación, proceso mediado por el óxido nítrico (NO) (Choi et al, 2000; Takahashi et al, 2007).

Además de los receptores para L-Glutamato, la DPS contiene receptores para neurotrofinas. Las neurotrofinas estimulan el crecimiento, supervivencia y diferenciación de las neuronas durante el desarrollo. Se conocen cuatro neurotrofinas en mamíferos: NGF (Factor de Crecimiento Neuronal), BDNF (Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro), NT-3 (Neurotrofina 3) y NT-4 (Neurotrofina 4). De ellas, BDNF se expresa en altos niveles en el SNC adulto y es liberada mayoritariamente en las sinapsis (Hartmann et al, 2001; Kojima et al, 2001), donde modula la neurotransmisión glutamatérgica ejerciendo una función clave en plasticidad sináptica (Korte et al, 1995; Levine et al, 1998). Cuando se sintetizan las neurotrofinas, éstas forman parte de un precursor proteico de mayor tamaño denominado pro-neurotrofina, el cual sufre diversos cortes proteolíticos hasta llegar a su forma madura (Seidah et al, 1996a; Seidah et al, 1996b)

Existen 2 tipos de receptores para neurotrofinas: la familia de receptores Trk y el receptor p75^{NTR}. La familia de receptores Trk (por *Tropomyosin Related Kinase*) son proteínas tirosina quinasas transmembrana, formadas por 3 miembros (TrkA, TrkB y TrkC). TrkA une a NGF, TrkB lo hace con BDNF y NT-4, y TrkC une a NT-3. La función de los receptores Trk está asociada al desarrollo y supervivencia neuronal (Reichardt, 2006).

El receptor p75^{NTR} pertenece a la superfamilia de receptores TNF (Factor de Necrosis Tumoral). Estructuralmente, posee un dominio extracelular que contiene cuatro motivos ricos en cisteína y en su segmento intracelular un dominio de muerte

celular. Aunque carece de un dominio con actividad catalítica intrínseca (como en el caso de los receptores Trk), se ha visto que el receptor p75^{NTR} está asociado con una batería de proteínas efectoras que realizarían la transducción de la señal (Reichardt, 2006), Figura 1). Inicialmente, el receptor p75^{NTR} fue descrito como un receptor de baja afinidad para NGF, pero se ha visto que es activado con afinidad similar por todas las neurotrofinas y también por sus las pro-neurotrofinas. Efectos fisiológicos antagónicos de p75^{NTR} dependen de la vía intracelular que se activa en cada caso, lo que a su vez depende de su localización subcelular como del tipo celular (Heerssen & Segal, 2002): por ejemplo, la activación del factor NF- κ B estimula la supervivencia neuronal, mientras que la activación de c-Jun (a través de JNK) estimula apoptosis (Dechant & Barde, 2002; Reichardt, 2006). Recientemente, se ha visto que p75^{NTR} está presente en la DPS, donde cumple funciones regulatorias de la actividad sináptica inhibiendo al R-NMDA y formando un complejo macromolecular con este receptor a través de interacción con la proteína andamio PSD-95 (Sandoval et al, 2007). Además, en dicho complejo también se encuentra la enzima óxido nítrico sintasa (NOS, de *Nitric Oxide Synthase*) la cual interactúa con la proteína PSD-95 (Brenman et al, 1996).

Adicionalmente, p75^{NTR} también interactúa con proteínas estructuralmente no relacionadas, tales como un fragmento de la proteína prion (PrP 26-106; (Della-Bianca et al, 2001) y el péptido A β con afinidad nanomolar ($K_D = 23$ nM) (Yaar et al, 1997; Teng & Hempstead, 2004). Existe evidencia adicional respecto a que algunos de los efectos del péptido A β estarían mediados por el receptor p75^{NTR} (Yaar et al, 1997; Kuner et al, 1998; Coulson, 2006; Sotthibundhu et al, 2008). Sin embargo, no se sabe si la interacción de A β con p75^{NTR} requiere de la presencia de co-receptores, así como la forma del receptor al cual se une el péptido (mono, di o trimérica). Asimismo, la conformación de péptido que se une al receptor p75^{NTR} se desconoce.

En nuestro laboratorio hemos desarrollado una metodología que permite registrar corrientes iónicas en DPSs aisladas mediante fraccionamiento subcelular desde telencéfalo de ratas. Esta preparación sináptica permite realizar estudios bioquímicos y electrofisiológicos. Por ejemplo, la funcionalidad de los canales iónicos presentes en DPSs se pueden estudiar en un microambiente semejante al que existe

en forma natural en las neuronas, ya que las DPSs son inyectadas en ovocitos de *Xenopus laevis*, incorporándose a su membrana. Las corrientes iónicas presentes en DPS se registran mediante la técnica de fijación de potencial con dos electrodos. Con esta herramienta experimental, es posible estudiar la regulación de las corrientes mediadas por los receptores glutamatérgicos ionotrópicos por distintos agentes, como lo es el péptido A β y nos permite poner a prueba la participación de p75^{NTR} en un posible efecto.

En resumen:

1. El péptido A β es capaz de afectar la morfología y funcionalidad de las sinapsis glutamatérgicas.
2. El receptor p75^{NTR} se encuentra en las DPSs y es capaz de inhibir la actividad del receptor para glutamato tipo NMDA.
3. El receptor p75^{NTR} es capaz de unir, entre otros ligandos, al péptido A β .

Con todos estos antecedentes, podemos formular la siguiente hipótesis:

2. HIPOTESIS

El péptido A β en concentraciones nanomolares es capaz de inhibir la actividad del R-NMDA en la DPS por interacción con el receptor p75^{NTR}.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General:

- Estudiar si el péptido A β 1-40 y A β 1-42 en sus estados monomérico y oligomérico regula la actividad del R-NMDA en forma dependiente de p75^{NTR}.

3.2. Objetivos Específicos

- Establecer las dosis de NMDA capaces de activar al R-NMDA en DPSs presentes en la membrana celular de ovocitos de *Xenopus laevis* microinyectados con DPSs.
- Evaluar el efecto de un ligando para p75^{NTR}, como proNGF, sobre las corrientes mediadas por el R-NMDA.
- Evaluar la participación de NOS o de Fosfatasa en la acción de p75^{NTR}.
- Estudiar el efecto del péptido A β 1-40 y A β 1-42 en sus formas monoméricas sobre las corrientes de NMDA.
- Preparar péptido A β 1-42 oligomérico no fibrilar.
- Estudiar el efecto del péptido A β 1-42 en su forma oligomérica (A β 1-42(O)) sobre las corrientes de NMDA.
- Evaluar la participación del receptor p75^{NTR} en el efecto mediado por el péptido A β 1-42(O).

Tabla 1. Efectos del péptido A β .

Referencia	Hallazgo	Forma de A β *	Concentración
(Yaar et al, 1997)	Apoptosis neuronal vía p75 ^{NTR}	1-40(O) <14kDa	0,1 μ M
(Kuner et al, 1998)	Apoptosis vía p75 ^{NTR} / Activación de NF κ B	1-40	12,5 μ M
(Lambert et al, 1998)	Muerte celular e Inhibición de LTP	1-42(O) 17-42 kDa	5nM produce >20% Muerte Celular 0,5 μ M inhibe LTP
(Wang et al, 2000b)	Unión de A β 1-42 a α 7nAChR	1-42 (μ M?)	nM y pM (según especie)
(Tong et al, 2001)	Disminución en activación de CREB / Menor expresión de BDNF	1-42(O) y Fibrilar	5-10 μ M (Fibrilar) 0,1 μ M (O)
(Lacor et al, 2004)	Unión de oligómeros a sinapsis	1-42(O) 10-100 kDa	500 nM
(Cleary et al, 2005)	Déficit cognitivo (conductual)	1-42(O) di- y trímeros (SN)	1-2 nM
(Demuro et al, 2005)	Aumento del Ca ⁺² intracelular y de la permeabilidad de membrana	1-42(O) 90 kDa	0,6 μ g/ml (200 nM)
(Snyder et al, 2005)	Disminución de R-NMDA sináptico dependiente de Receptor Nicotínico α -7	1-42(SN)	1 μ M
(Susen & Blochl, 2005)	Activación de p75 ^{NTR} , Ras-ERK y formación de neuritas	1-40 y 1-42 (O)	25 nM
(Deshpande et al, 2006)	Muerte celular y Alteración en función mitocondrial	1-42(O) 90 kDa y ADDL	5 μ M Muerte 0,1 μ M Disfunción mitocondrial
(Shankar et al, 2007)	Pérdida de dendritas y sinapsis activas	Di- y trímeros (SN)	100-300 pM
(Lacor et al, 2007)	Disminución de R-AMPA (sináptico)	1-42(O)	1 μ M
(Nimmrich et al, 2008)	Inhibición corrientes Ca ⁺² tipo P/Q	1-42(O) 48 kDa	8 nM
(Shelat et al, 2008)	Aumento de ROS por activación de R-NMDA	1-42(O)	0,5 μ M
(Sotthibundhu et al, 2008)	Muerte Neuronal a través de p75 ^{NTR}	1-42(O)	5-20 μ M

*M = Monomérico; O = Oligomérico; SN = Síntesis Natural, concentración variable.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Obtención de Densidades Postsinápticas

Las Densidades Postsinápticas (DPSs) fueron preparadas según el método descrito por (Carlin et al, 1980) y modificado según (Wyneken et al, 2001); Figura 2). Para cada preparación, se obtuvieron los telencéfalos de 12 ratas macho Sprague – Dawley adultas (8 a 12 semanas) y se colocaron inmediatamente en 5 mL/gth (gramo tejido húmedo) de tampón de homogenización (Sacarosa 0,32 M, EGTA 0,5 mM, Tris-HCl 5 mM pH 7,4) suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete, Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Boehringer Mannheim). Toda la preparación se realizó en frío, entre 0 y 4°C. Las cortezas se picaron con tijeras de acero inoxidable y se homogenizaron en homogenizador vidrio-teflón. El homogenizado se centrifugó a 1.000 x g por 10 min., se lavó el sedimento (P_1) en tampón de homogenización y se volvió a centrifugar a 700 x g por 10 min. Se recuperaron los sobrenadantes (S_1), que se centrifugaron a 12.000 x g por 20 min. La porción sedimentada (P_2) se resuspendió en un volumen final de 1 mL/gth de solución de carga (sacarosa 0,32 M, EGTA 0,5 mM, Tris-Cl 5 mM pH 8,1), se homogenizó en homogenizador vidrio-teflón, y se cargó sobre una gradiente discontinua de sacarosa 1 M/1,2 M en Tris-Cl 5 mM pH 8,1 (4 mL por fase), con el fin de separar el material por sedimentación a equilibrio. La gradiente se centrifugó a 250.000 x g por 60 min. Después de la centrifugación, se recolectó la interfase entre sacarosa 1 M/1,2 M enriquecida en sinaptosomas o botones presinápticos resellados y unidos a espinas postsinápticas. Se descartó el sedimento (compuesto principalmente por mitocondrias) y la interfase superior (sacarosa 0,32 M/1 M), compuesta principalmente por mielina). A continuación, los sinaptosomas fueron sometidos a un shock hiposmótico, agregando a la interfase colectada 10 volúmenes de tampón de lisis (EGTA 0,5 mM, Tris-HCl 5 mM pH 8,1), incubando la mezcla durante 30 min. sobre hielo con agitación suave. Posteriormente, el material se centrifugó a 33.000 x g por 30 min., y el precipitado resultante se resuspendió nuevamente en un volumen final de 1 mL/gth de solución de carga, se homogenizó en homogenizador vidrio-teflón, y se cargó sobre una gradiente de sacarosa discontinua idéntica a la anterior, que se centrifugó a 250.000 x g por 60 min. para luego recuperar el material presente en la interfase 1 M/1,2 M, correspondiente a membranas sinápticas. Las membranas sinápticas son

sinaptosomas que carecen de organelos intracelulares, los cuales fueron liberados por el shock hiposmótico. Éstas se sometieron a extracción con el detergente no iónico Tritón diluyendo la fracción hasta 6 ml/gth con sacarosa 0,32 M, Tris-Cl 5 mM pH 8,1, para luego agregar un volumen igual de sacarosa 0,32 M, CaCl₂ 0,025 mM, Triton® X-100 1%, DTT 2 mM, Tris-Cl 5 mM pH 8,1. Después de centrifugar a 33.000 x g por 30 min., el sedimento se lavó con HEPES-Na 50 mM pH 7,4 y se centrifugó a 200.000 x g por 10 min. El precipitado obtenido corresponde a las DPSs y es resuspendido en 0,2 mL/gth de HEPES-Na 50 mM pH 7,4. El material obtenido es fraccionado en alícuotas de 30 µg para ser usado en experimentos electrofisiológicos. Estas fracciones son congeladas rápidamente en un baño de N₂ líquido y almacenadas a -80 °C hasta su uso.

4.2. Extracción de ovocitos de *Xenopus laevis*

Hembras maduras *Xenopus laevis* fueron anestesiadas con Benzocaína (0,02% final) de manera de extraer pequeñas porciones de ovario, el que fue tratado con colagenasa 0,5 mg/mL en solución OR-2 (NaCl 82 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 5 mM pH 7,6) por 90 min. a temperatura ambiente, tiempo al cual los ovocitos fueron lavados con solución OR-2 (3 a 4 veces). De los ovocitos aislados se seleccionaron aquellos en estadios V y VI de maduración, y se llevaron a una placa con solución Barth (NaCl 88 mM, KCl 1 mM, Ca(NO₃)₂ 0,33 mM, MgSO₄ 0,82 mM, NaHCO₃ 2,4 mM, HEPES 10 mM pH 7,4) suplementada con penicilina 100 U/mL, hasta su posterior uso (Figura 3).

4.3. Microinyección de DPSs en ovocitos de *Xenopus laevis*

Los ovocitos seleccionados fueron microinyectados con 150-200 ng de DPSs, usando un microinyector electrónico (World Precision Instruments, WPI) y mantenidos en solución Barth a 17° C hasta su utilización para registros electrofisiológicos (Figura 3). En los casos en que se indican, las DPSs fueron incubadas por 1 hora a 4°C antes de la microinyección en ovocitos con un anticuerpo de pérdida de función anti-p75^{NTR} denominado REX, generado contra el dominio extracelular de p75^{NTR} (donado gentilmente por el Dr. Louis Reichardt, San Francisco, California) usado a una concentración final de 0,05 µg/µl.

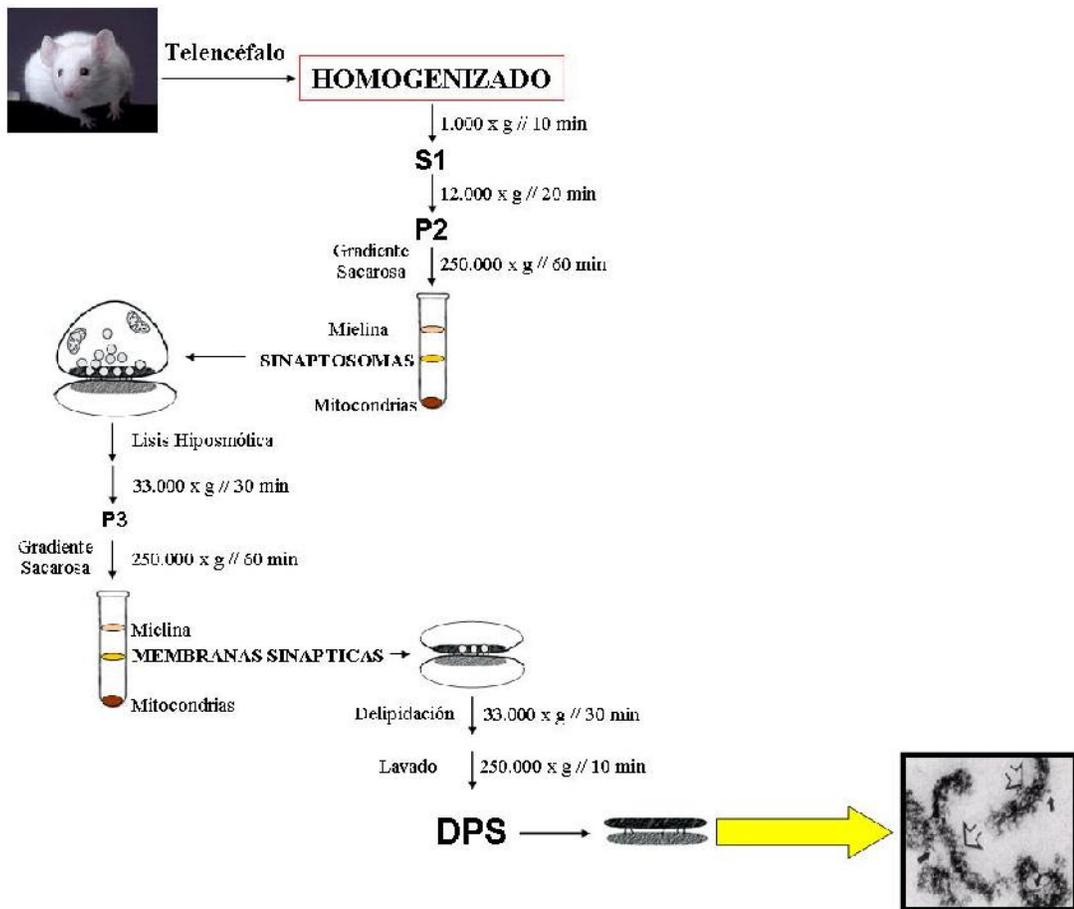


Figura 2. Esquema de purificación de DPS a partir de cortezas de rata adulta.

4.4. Registros electrofisiológicos.

Las corrientes totales de membrana de ovocitos fueron registradas a temperatura ambiente (20°C) 12 a 16 horas posteriores a la inyección de DPS, siguiendo el protocolo descrito anteriormente por (Aleu et al, 1999). Los ovocitos, depositados en una cámara perfundida con 500 μ L de solución Ringer de registro (NaCl 115 mM, KCl 2 mM, BaCl₂ 1,8 mM, HEPES-Na 5 mM pH 7,4), fueron registrados mediante la técnica de fijación de potencial por 2 electrodos (*Voltage Clamp*), usando un amplificador OOCYTE CLAMP OC-725C (Warner Instruments). Las corrientes activadas por el agonista NMDA (Tocris) fueron digitalizadas usando una interfase

análogo-digital Powerlab 4/25T (ADInstruments Pty Ltd.), visualizadas y almacenadas en un computador mediante el programa SCOPE (ADInstruments Pty Ltd.). Para los experimentos en presencia de APV (Tocris), proNGF (Alomone), y de los péptidos A β 1-40 y 1-42 (Biopeptide Co, Inc), éstos fueron adicionados al baño 1 min. antes de la aplicación del agonista. En los experimentos en presencia de Fluoruro de Sodio (NaF) y N ω -Nitro-L-Arginina (L-NNA, Sigma), éstos fueron aplicados 2 min. antes de la aplicación del agonista (1 min. antes de aplicar proNGF).

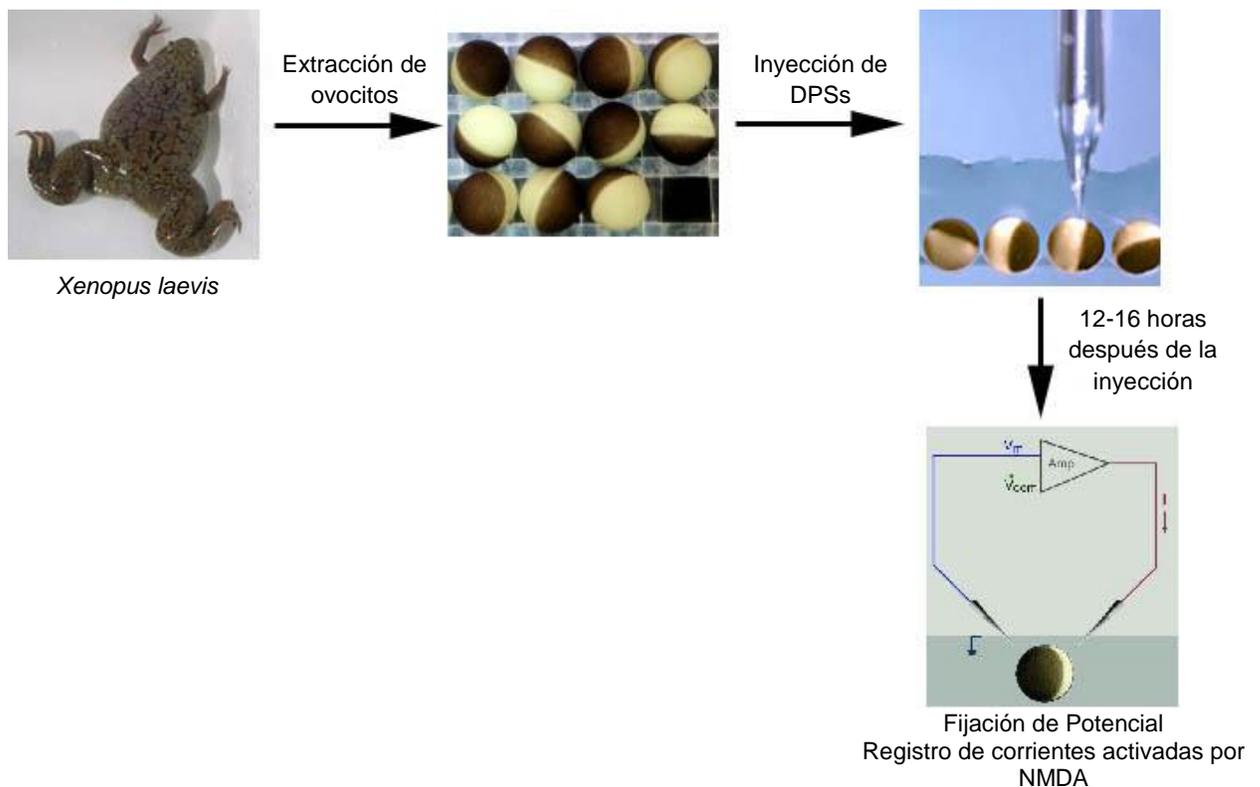


Figura 3. Esquema de obtención de ovocitos y posterior inyección de DPSs.

4.5. Análisis de datos electrofisiológicos

Las corrientes totales de membrana activadas por NMDA en presencia y ausencia de los distintos fármacos y proteínas utilizados, fueron analizadas utilizando el programa Origin (OriginLab Corporation). Los parámetros calculados se muestran en la Figura 4. Los datos de la fase de activación de la curva de corriente fueron ajustados a una función de Boltzmann del tipo $y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x-x_0)/t}} + A_2$, donde A_1 es el valor de la corriente basal (antes del estímulo) y A_2 es el valor de la corriente máxima, desde donde se obtuvo el máximo de corriente o $I_{\text{peak}} = A_1 - A_2$. La constante de activación o t corresponde al tiempo en el cual se obtiene un 67% de la corriente máxima. Para la fase de inactivación se calculó el $t_{0,5}$, que corresponde a la diferencia de tiempo entre I_{peak} y su decaimiento hasta la mitad de I_{peak} ($I_{0,5}$). También se calculó el área bajo la curva o integral de corriente I durante 1 min. posterior a la aplicación de NMDA, lo que refleja el total de corriente conducida por el R-NMDA durante ese tiempo. Para todos los gráficos se consideró como razón de cambio a la fracción $RC = \frac{I_{\text{NMDA+X}}}{I_{\text{NMDA}}}$, donde $I_{\text{NMDA+X}}$ es la respuesta a NMDA en presencia de fármacos y/o péptidos y I_{NMDA} es la respuesta a NMDA.

En los experimentos de dosis respuesta para NMDA (5, 10, 25, 50, 100 y 200 μM), se graficó la razón de cambio en la Integral de corriente I respecto a una concentración de referencia (100 μM) y los puntos obtenidos se ajustaron a una función de Hill de la forma $y = I_{\text{max}} \times \frac{x^n}{K_a^n + x^n}$, donde I_{max} es la saturación del R-NMDA (o la máxima respuesta en presencia de agonista), K_a es la constante de activación (la concentración de NMDA donde se logra el 50% de la respuesta máxima) y n es el coeficiente de Hill.

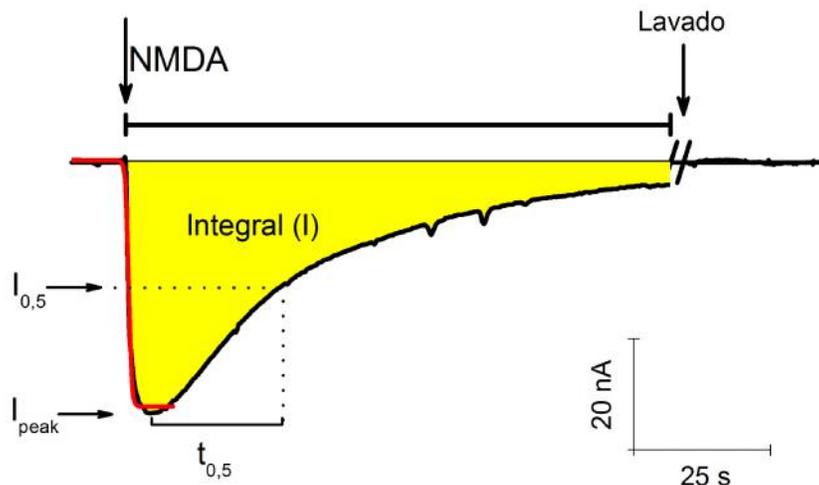


Figura 4. Representación gráfica de una corriente mediada por el R-NMDA en ovocitos inyectados con DPSs. La flecha en la parte superior indica la aplicación del agonista. La línea roja corresponde al ajuste de los datos de la fase de activación a la ecuación de Boltzmann. El área bajo la curva (amarillo) corresponde a la Integral de corriente. Los cortes en el eje x indican el período de lavado del ovocito con 10 volúmenes de solución de registro. Barra vertical: 20 nA; barra horizontal: 25 segundos.

4.6. Análisis Estadístico

En todos los experimentos se calcularon los promedios y los datos se presentaron como media \pm error estándar. La significancia estadística se calculó usando el test de *t de student* mediante el programa GraphPad InStat (GraphPad Software Inc.). Se consideraron como datos no significativos aquellos que obtuvieran un valor de $p > 0,05$.

4.7. Preparación del péptido s-Amiloide

Para obtener el péptido A β en su forma monomérica (A β M), el péptido liofilizado fue disuelto en DMSO puro hasta una concentración de 2,5 mM, fraccionado y mantenido a -20°C hasta su uso. El día del registro, el péptido es diluido en solución de registro hasta 200 μ M, el cual se conserva a 4°C, evitando su congelación.

Para obtener las formas oligoméricas, se utilizaron 2 métodos:

I. Método 1 (A β O1):

Preparado según protocolo del Laboratorio de Neurociencias de la Dra. Rommy von Bernhardt (PUC), el péptido liofilizado es disuelto en DMSO puro hasta una concentración de 5 mM. Luego se adiciona medio de cultivo DMEM/F12 hasta una concentración de 100 μ M. Esta mezcla es incubada con agitación a 4°C por 24 hrs. y posteriormente se centrifuga a 14.000 x g por 10 min. El sobrenadante obtenido contiene oligómeros solubles, lo que fue chequeado por Western Blot.

II. Método 2 (A β O2):

Según lo descrito por Demuro et al (2005), el liofilizado es disuelto en una mezcla acetonitrilo al 50% en agua, es alicuotado y los tubos son secados a temperatura ambiente por 2 horas hasta eliminar el solvente, obteniéndose cristales transparentes. Luego se adiciona 100 μ L de Hexafluoroisopropanol (HFIP), dejándolo a temperatura ambiente por 10 a 15 min.s. Luego la mezcla se traspasa en forma lenta, sin formar burbujas para evitar la formación de fibras, a un tubo limpio con 400 μ L de H₂O bidestilada estéril. El tubo (cuya tapa tiene pequeñas perforaciones) se lleva a agitación bajo campana para evaporar el HFIP durante 24 a 36 horas para obtener así la solución con oligómeros solubles.

Para determinar la concentración de proteína se utilizó el método de cuantificación por Acido Bicinconínico, utilizando Albúmina sérica de bovino (BSA) como patrón para la curva de calibración (Smith et al, 1985). La presencia de oligómeros se chequeó mediante western blot y tinción de geles de poliacrilamida con Azul de Coomassie.

4.8. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes y Western Blot del péptido A β 1-42.

Los péptidos obtenidos fueron sometidos a electroforesis en condiciones denaturantes no reductoras en geles de acrilamida al 16%, cargando 2 μ g de péptido por carril y utilizando diferentes tampones para la cámara anódica (Tris-HCl 0,2 M pH

8,9) y catódica (Tricina 0,1 M, Tris-HCl 0,1 M pH 8,25, SDS 0,1%) (Schagger, 2006). Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie o transferidos a una membrana de nitrocelulosa para western blot. La detección en este último caso se llevó a cabo utilizando un anticuerpo contra el péptido A β 1-42 (Chemicon).

5. RESULTADOS

5.1. NMDA activa al R-NMDA en ovocitos inyectados con DPSs.

La aplicación del agonista NMDA al baño de registro produce corrientes de entrada en ovocitos microinyectados con DPSs. Estas corrientes son reproducibles en el tiempo tras aplicaciones consecutivas del agonista a una misma concentración, luego de lavados con solución de registro entre cada aplicación (Figura 5A). Al aplicar distintas concentraciones de NMDA, se observaron respuestas dosis dependientes (Figura 5B). Utilizando la integral de corriente I de cada respuesta y se construyó una curva de dosis-respues utilizando una concentración de NMDA de 100 μM como referencia (Figura 5D), debido a que se ha utilizado esta concentración de NMDA en trabajos anteriores, donde se estudiaban ovocitos que expresaban subunidades recombinantes del R-NMDA (Meguro et al, 1992; Ishii et al, 1993). De los datos ajustados a la ecuación de Hill, se obtiene un valor para la constante de activación K_a de 59,02 μM (ES \pm 8,46 μM) y un coeficiente de Hill de 2,8 (ES \pm 0,89), implicando cooperatividad positiva en la unión entre el agonista y el receptor. Al aplicar 100 μM del agonista, se obtiene un 93% de la respuesta máxima (I_{max}) del receptor, avalando el uso de esta concentración para los experimentos posteriores. Ovocitos no inyectados o inyectados con HEPES-Na 50 mM no muestran respuesta a la aplicación de NMDA 100 μM (no mostrado).

Por otro lado, la incubación por 1 min. con APV a una concentración de 200 μM , un inhibidor competitivo del R-NMDA, previo a la aplicación del agonista, bloqueó la corriente de entrada generada por la aplicación de NMDA (Figura 5C). Esta inhibición de la respuesta es revertida tras el lavado del ovocito con solución de registro. Todos estos antecedentes muestran que las corrientes de entrada registradas están específicamente mediadas por el R-NMDA.

5.2. proNGF produce inhibición del R- NMDA por interacción con el receptor para neurotrofinas p75^{NTR}.

Luego quisimos averiguar si p75^{NTR} tiene algún efecto sobre el R-NMDA, para lo cual se utilizó un ligando que no interactúa con el receptor TrkB, el otro receptor para neurotrofinas que se sabe está presente en DPS. Para estudiar esto, preincubamos los

ovocitos con proNGF 150 ng/mL por 1 min. previo a la adición de NMDA, observándose una inhibición en la corriente total (razón de cambio $0,63 \pm 0,039$; $p < 0,001$; $n=12$; Figura 6A y C) y en la amplitud (razón de cambio $0,69 \pm 0,051$; $p < 0,001$; $n=12$; Figura 6D), siendo este efecto reversible al lavar el ovocito con solución de registro. Además, proNGF produce una disminución en el tiempo de inactivación (reflejado en el valor de $t_{0,5}$; razón de cambio $0,75 \pm 0,062$; $p < 0,005$; $n=12$), sin afectar la constante de activación † (Tabla 2). Experimentos adicionales realizados en nuestro laboratorio indican que esta inhibición es dosis dependiente, con una inhibición máxima del 72% y una constante de inhibición aparente de proNGF (K_i) de 11.8 ng/mL (0.36 nM) (Sandoval et al, 2007). Para inactivar $p75^{NTR}$, se utilizó un anticuerpo generado contra la porción extracelular del receptor (REX), produciendo una pérdida de la función del receptor (Mischel et al. 2001), el cual fue preincubado con las DPSs antes de ser inyectados a los ovocitos. En este caso, la inhibición del R-NMDA por proNGF se pierde (razón de cambio $0,997 \pm 0,034$; $n=6$; $p < 0,0001$; Figura 6B y C), indicando que proNGF actúa vía $p75^{NTR}$.

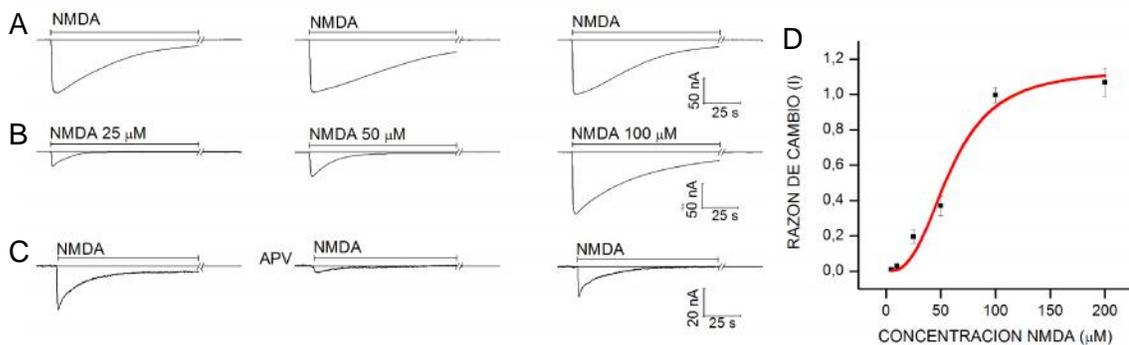


Figura 5. NMDA induce corrientes específicas en forma dependiente a la dosis en ovocitos inyectados con DPSs. (A) Trazos de corriente representativos de 3 aplicaciones consecutivas de NMDA (100 μM) a un mismo ovocito. (B) Trazos de corriente para 3 concentraciones de NMDA (25, 50 y 100 μM) aplicado a un mismo ovocito. (C) Las corrientes activadas por NMDA (100 μM) son bloqueadas por el inhibidor competitivo APV (trazo central), y el efecto es revertido luego del lavado con solución de registro (trazo derecho). (D) Curva de dosis respuesta a NMDA en ovocitos microinyectados con DPSs.

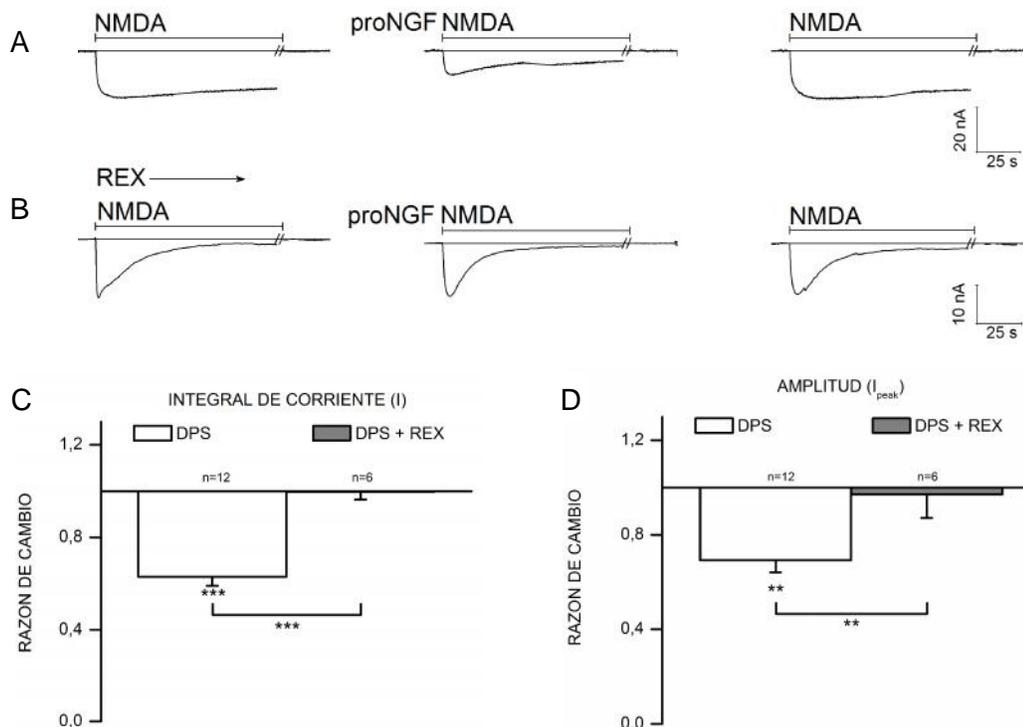


Figura 6. proNGF produce una inhibición en las corrientes activadas por NMDA a través de la interacción con el receptor p75^{NTR}. (A) Trazos de corriente que muestran el efecto inhibitorio de la incubación con proNGF (150ng/mL) sobre las respuestas mediadas por NMDA. (B) El efecto de proNGF es revertido por el uso del anticuerpo dirigido contra p75^{NTR} (REX) preincubado con las DPSs en forma previa a la microinyección. (C) y (D) Promedio de las razones de cambio de la integral de corriente (C) y amplitud (D) en presencia de proNGF (150 ng/mL) para ovocitos inyectados con DPS con y sin preincubar con el anticuerpo REX. **p<0,005 ***p<0,001.

5.3. La inhibición del R-NMDA ocurre por s-nitrosilación pero no por defosforilación.

Se decidió evaluar la participación de fosfatasa que pudieran participar en la inhibición del R-NMDA mediada por p75^{NTR}. Para ello se utilizó NaF, un inhibidor general de fosfatasa de serina/treonina (Shenolikar & Nairn, 1991). La aplicación de 1 μ M de NaF previo a la adición de proNGF no produjo reversión alguna del efecto de la proneurotrofina (Razón de cambio $0,72 \pm 0,063$; p<0,05; n=5; Figura 7).

Péptido	Concentración	n	I		‡I		t _{0,5}	
			Promedio ± ES	p	Promedio ± ES	p	Promedio ± ES	p
Aβ1-40 (M)	10 nM	4	0,760 ± 0,108		0,929 ± 0,096		0,686 ± 0,176	
	50 nM	7	0,774 ± 0,085	*	0,868 ± 0,121		1,077 ± 0,172	
	100 nM	11	0,895 ± 0,095		0,919 ± 0,106		1,259 ± 0,139	
	250 nM	4	0,994 ± 0,067		0,791 ± 0,091		0,861 ± 0,227	
	500 nM	5	1,038 ± 0,109		1,013 ± 0,104		0,837 ± 0,092	
	1 ~M	6	1,310 ± 0,041	***	0,946 ± 0,170		1,072 ± 0,252	
Aβ1-42 (M)	50 nM	5	0,790 ± 0,073	*	0,900 ± 0,033	*	0,989 ± 0,219	
	100 nM	7	0,838 ± 0,037	**	0,682 ± 0,097	*	1,435 ± 0,180	
	250 nM	5	0,588 ± 0,115	*	0,653 ± 0,120	*	0,829 ± 0,199	
	500 nM	5	0,774 ± 0,052	*	0,651 ± 0,130		1,152 ± 0,249	
	1 ~M	6	0,773 ± 0,132		0,790 ± 0,062	*	0,883 ± 0,182	
Aβ1-42 (O)	1 nM	5	0,809 ± 0,098		1,002 ± 0,156		1,456 ± 0,474	
	5 nM	9	0,523 ± 0,090	***	1,212 ± 0,169		0,689 ± 0,124	*
	10 nM	10	0,707 ± 0,072	**	1,110 ± 0,164		1,267 ± 0,345	
	50 nM	4	0,859 ± 0,219		1,110 ± 0,164		1,253 ± 0,181	
	100 nM	5	0,956 ± 0,068		1,334 ± 0,218		1,411 ± 0,283	
	500 nM	10	1,008 ± 0,118		0,834 ± 0,088		3,037 ± 1,688	
	1 ~M	6	3,212 ± 0,853	*	1,010 ± 0,077		1,542 ± 0,321	
proNGF	150 ng/mL	12	0,629 ± 0,039	***	1,127 ± 0,137		0,692 ± 0,051	***

Tabla 2. Datos de I, ‡ y t_{0,5} obtenidos para proNGF (150ng/mL) y los péptidos Aβ1-40(M), Aβ1-42(M) y Aβ1-42(O) a las concentraciones usadas. *p<0,05 **p<0,01; ***p<0,001

Otra alternativa de regulación del R-NMDA es la s-nitrosilación, para lo cual se utilizó L-NNA, un inhibidor competitivo de la NOS. Al aplicar 1 μM de L-NNA previo a la aplicación de proNGF, la inhibición observada es revertida, tanto para la Integral (Razón de cambio 0,980 ± 0,144; n=7; p<0,05), como para la Amplitud (Razón de cambio 0,939 ± 0,073; p<0,005; Figura 8). L-NNA aplicado no produjo efecto alguno sobre la actividad del R-NMDA (Razón de cambio 0,939 ± 0,073; p<0,005), por lo que podemos afirmar que en la inhibición del R-NMDA mediada por p75^{NTR} hay participación de NOS.

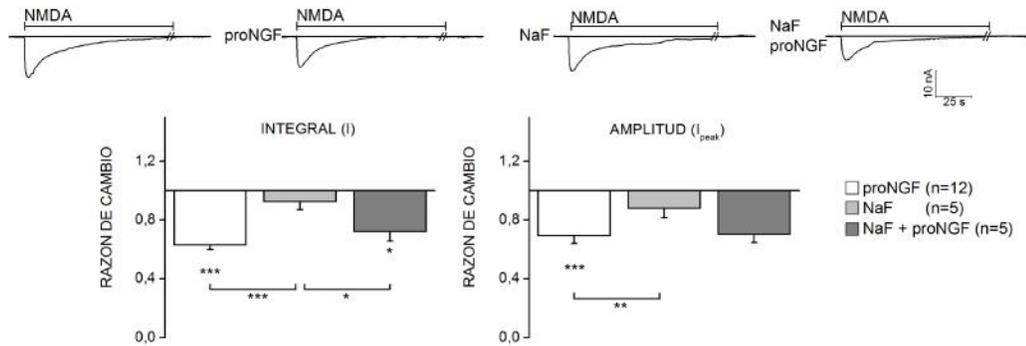


Figura 7. Fosfatasa no participan del efecto de p75^{NTR}. (A) Registro representativo del R-NMDA en presencia proNGF (150ng/mL), L-NNA (1 μ M) y L-NNA con proNGF. (B) y (C) Promedio de las razones de cambio de la integral de corriente (B) y de la amplitud (C) en la respuesta a NMDA en ovocitos incubados proNGF, L-NNA y proNGF preincubado con L-NNA. *p<0,05, **p<0,005, ***p<0,001.

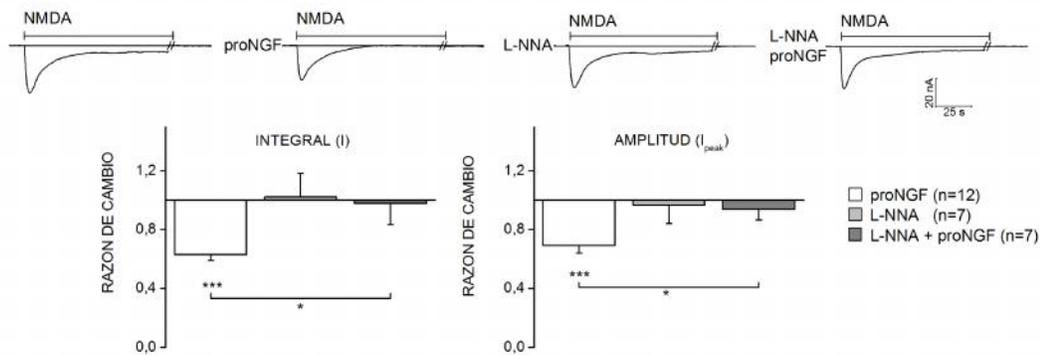


Figura 8. NO participa en la inhibición mediada por p75^{N1K}. (A) Registro representativo del R-NMDA en presencia proNGF (150ng/mL), L-NNA (1 μ M) y L-NNA con proNGF. (B) y (C) Promedio de las razones de cambio de la integral de corriente (B) y de la amplitud (C) en la respuesta a NMDA en ovocitos incubados proNGF, L-NNA y proNGF preincubado con L-NNA. *p<0,05, **p<0,005, ***p<0,001.

5.4. El péptido A β 1-40 monomérico produce efectos opuestos y dosis dependientes sobre el R-NMDA en ovocitos.

Al igual que proNGF, el péptido A β en estado monomérico se aplicó a los ovocitos 1 min. previo a la adición de NMDA. Sorprendentemente, A β 1-40(M) produjo una inhibición de las corrientes totales a concentraciones menores a 100 nM, mientras que a concentraciones mayores de 250 nM el péptido produjo un efecto potenciador (Figura 9B). Estos efectos son significativos a concentraciones de 50 nM (razón de cambio $0,77 \pm 0,08$; $n=7$; $p<0,05$; Figura 9A trazo superior) y 1 μ M (razón de cambio $1,31 \pm 0,04$; $n=6$; $p<0,005$; Figura 9A trazo inferior). La razón de cambio de la amplitud máxima de corriente (I_{peak}) también muestra una inhibición a 50 nM (Razón de cambio $0,84 \pm 0,04$; $p<0,05$) y una tendencia a la potenciación a 1 μ M (Figura 9C). Para los valores de la constante de activación \ddagger no se observa un efecto significativo, lo mismo que para el valor de $t_{0,5}$ (Tabla 2).

Por su parte, el péptido A β 1-42(M) indujo una inhibición en las corrientes mediadas por el R-NMDA a todas las concentraciones usadas menores a 1 μ M. (Figura 10A y B), lo que también se manifiesta a nivel de I_{peak} , a excepción de 50 nM, efecto que no fue significativo. (Figura 10C). También en este caso, la inhibición se pierde al aplicar 1 μ M de péptido (Figura 10B y C). Asimismo, se observa una disminución significativa en los valores de \ddagger para casi todas las concentraciones usadas, pero no se observan cambios en el valor de $t_{0,5}$ a ninguna concentración (Tabla 2).

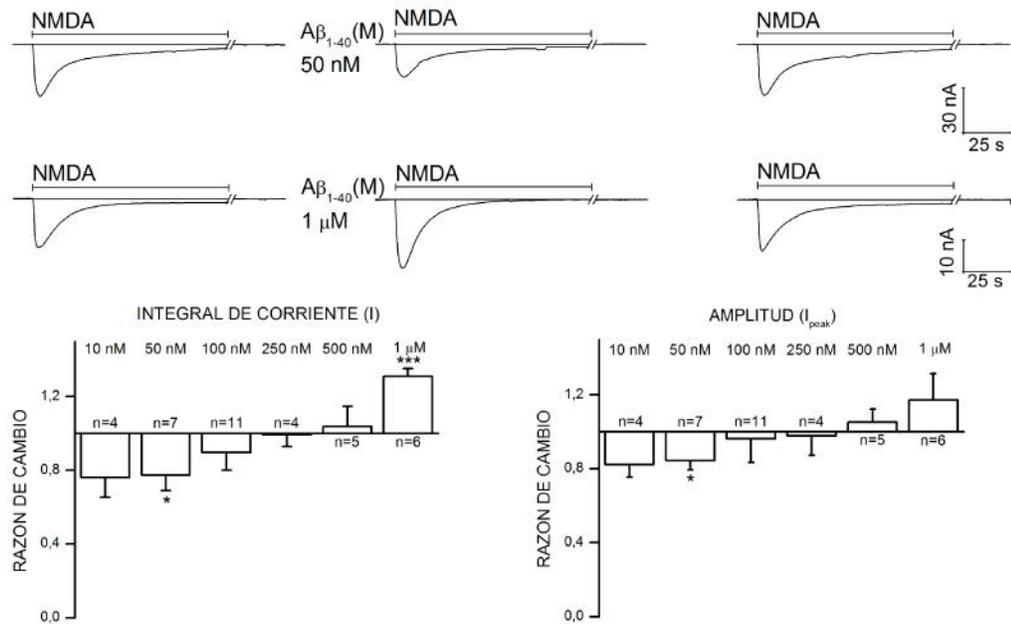


Figura 9. El péptido A β 1-40(M) produce un efecto dual dependiente de la concentración sobre las respuestas mediadas por el R-NMDA. (A) Registros representativos del R-NMDA en presencia de distintas concentraciones del péptido A β 1-40 (M). (B) y (C) Promedio de las razones de cambio de la integral de corriente (B) y de la amplitud (C) en la respuesta a NMDA en ovocitos incubados con el péptido A β 1-40(M) durante 1 min. previo a la aplicación del agonista. *p<0,05 ***p<0,001.

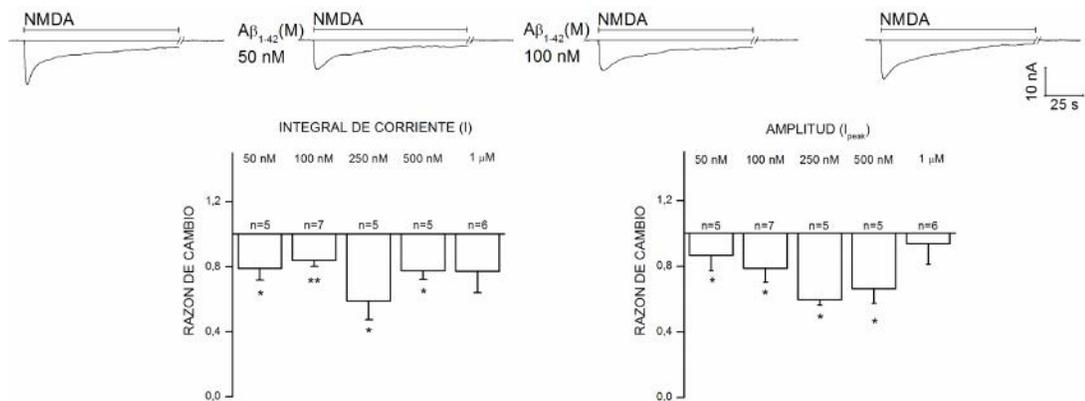


Figura 10. El péptido A β 1-42(M) inhibe la respuesta mediada por NMDA. (A) Trazos representativos de las respuestas activadas por NMDA en presencia de diferentes concentraciones de péptido A β 1-42(M). (B) y (C) Promedio de las razones de cambio de la integral de corriente (B) y de la amplitud (C) en la respuesta a NMDA en ovocitos incubados con distintas concentraciones del péptido A β 1-42(M) durante 1 min. previo a la aplicación del agonista. *p<0,05 **p<0,005.

5.5. Efecto de los péptidos oligoméricos sobre el R-NMDA.

Para evaluar el grado de agregación del péptido obtenido mediante los dos métodos de preparación del oligómero (ver en Materiales y Métodos), éstos fueron analizados por electroforesis con tinción del gel con azul de Coomassie y por western blot utilizando un anticuerpo contra el péptido A β 1-42 (Figura 11A y B). De esos métodos, sólo el método 2, descrito por Demuro et al (2005) produjo oligómeros detectables, de peso molecular variable entre los 8 y 48 kDa, los cuales son apenas visibles con tinción de Coomassie, pero que se aprecian en el western blot. Estas formas se asemejan a lo observado en trabajos anteriores, en líquido cefalorraquídeo de pacientes con EA (Seubert et al, 1992; Kuo et al, 1996). Por ello, para los estudios posteriores se utilizó este método de preparación para evaluar el efecto funcional del oligómero sobre el R-NMDA.

En forma similar a lo mostrado con los péptidos monoméricos, la aplicación de A β 1-42(O) indujo una inhibición del R-NMDA a baja concentración y una pérdida de este efecto al aumentar la concentración (Figura 12A y B). Sin embargo, la concentración efectiva fue mucho menor, observándose inhibición en las corrientes totales a 5 nM (Razón de cambio $0,52 \pm 0,09$; $n=9$; $p<0,001$). Al aumentar la concentración hasta 500 nM, el efecto inhibitor se pierde, apareciendo un efecto potenciador al aplicar 1 μ M (Razón de cambio $3,21 \pm 0,85$; $n=6$; $p<0,05$). La misma tendencia se observa al analizar la amplitud, con una inhibición a 5 nM (Razón de cambio $0,57 \pm 0,06$; $p<0,001$) y potenciación a 1 μ M (Razón de cambio $1,67 \pm 0,26$; $p<0,05$). No se observaron cambios en los valores de \ddagger , y se observó una inhibición significativa en el valor de $t_{0,5}$ al aplicar 5 nM (Razón de cambio $0,69 \pm 0,124$, $p<0,05$; Tabla 2).

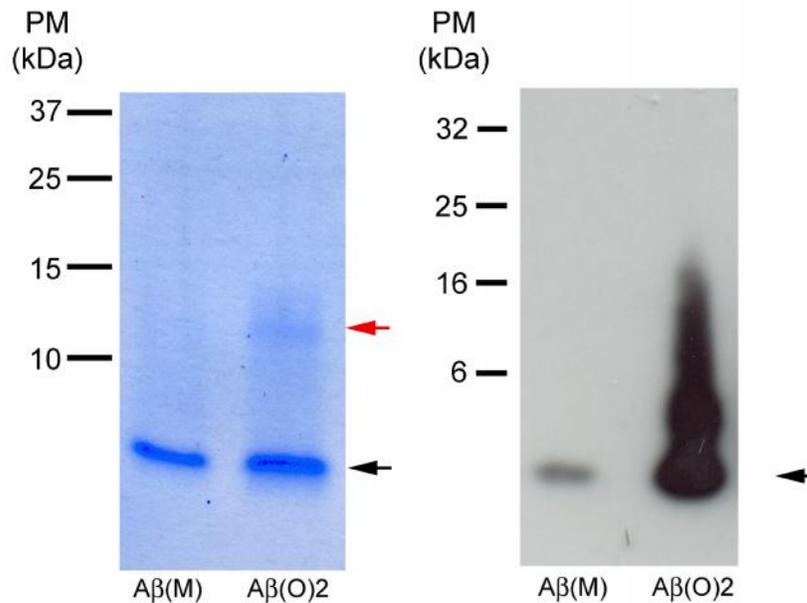


Figura 11. Caracterización del péptido A β 1-42(O). (A) Gel teñido con azul de Coomassie y (B) Western blot para el péptido A β 1-42 oligomérico. Las flechas negras indican el monómero, (cuyo peso es de 4 kDa), mientras que la flecha roja en (A) indica la presencia de oligómero. Sólo el método 2 produjo formas oligoméricas visibles en estas técnicas.

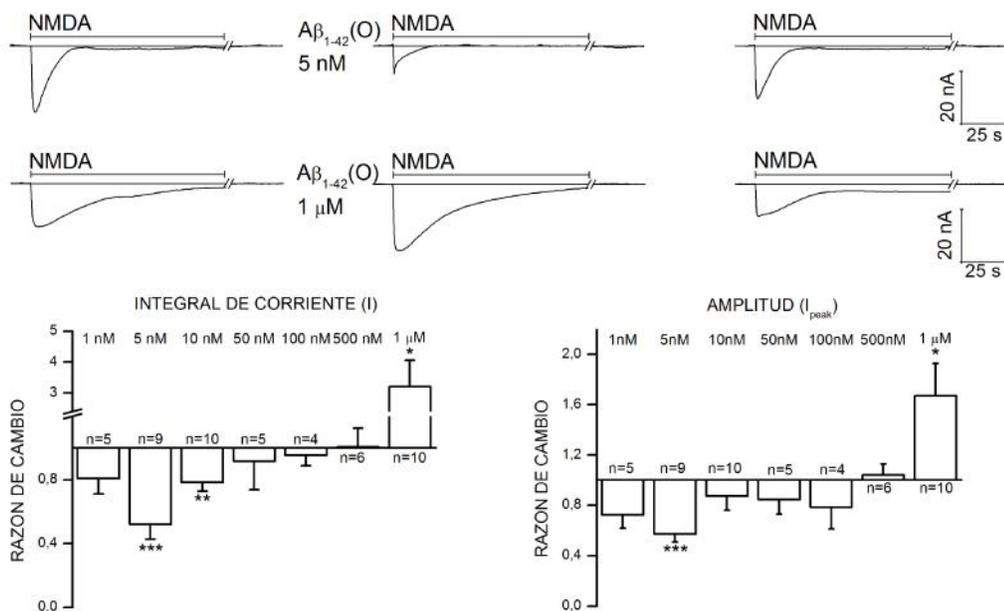


Figura 12. El péptido A β 1-42(O) produce un efecto dual sobre la respuesta a NMDA a concentraciones menores que el A β 1-40(M). (A) Trazos representativos de las respuestas activadas por NMDA en presencia de 5 nM (trazo superior) y 1 μ M (trazo inferior) de péptido A β 1-42(O). (B) y (C) Promedio de las razones de cambio de la integral de corriente (B) y de la amplitud (C) en la respuesta a NMDA en ovocitos incubados con el péptido A β 1-42(O) durante 1 min. previo a la aplicación del agonista. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$.

5.6. El efecto del péptido A β 1-42(O) está mediado por p75^{NTR}.

Para estudiar si los efectos observados anteriormente son mediados por el receptor p75^{NTR}, las DPSs fueron incubadas en forma previa a la inyección en ovocitos con el anticuerpo REX. Al preincubar estos ovocitos con 5 nM del péptido A β 1-42(O), se obtuvo una reversión del efecto inhibitorio (Razón de cambio DPS control: $0,52 \pm 0,09$; n=9; DPS preincubadas con REX: $0,90 \pm 0,07$; n=7; p<0,05; Figura 13). De igual forma, la potenciación obtenida al aplicar 1 μ M también es revertida con el uso del anticuerpo contra p75^{NTR} (Razón de cambio DPS control: $3,21 \pm 0,85$; n=6; DPS preincubadas con REX: $0,96 \pm 0,04$; n=4; p<0,05; Figura 13). La reversión del efecto de ambas concentraciones de péptido también se aplica para los valores de la amplitud (para 5 nM Razón de cambio DPS preincubadas con REX: $0,90 \pm 0,05$; n=7; p<0,05; para 1 μ M Razón de cambio DPS preincubadas con REX: $0,94 \pm 0,02$, p<0,05; Figura 13 C). En conclusión, tanto el efecto inhibitorio como el potenciador del péptido A β 1-42(O) estaría mediado por el receptor p75^{NTR}.

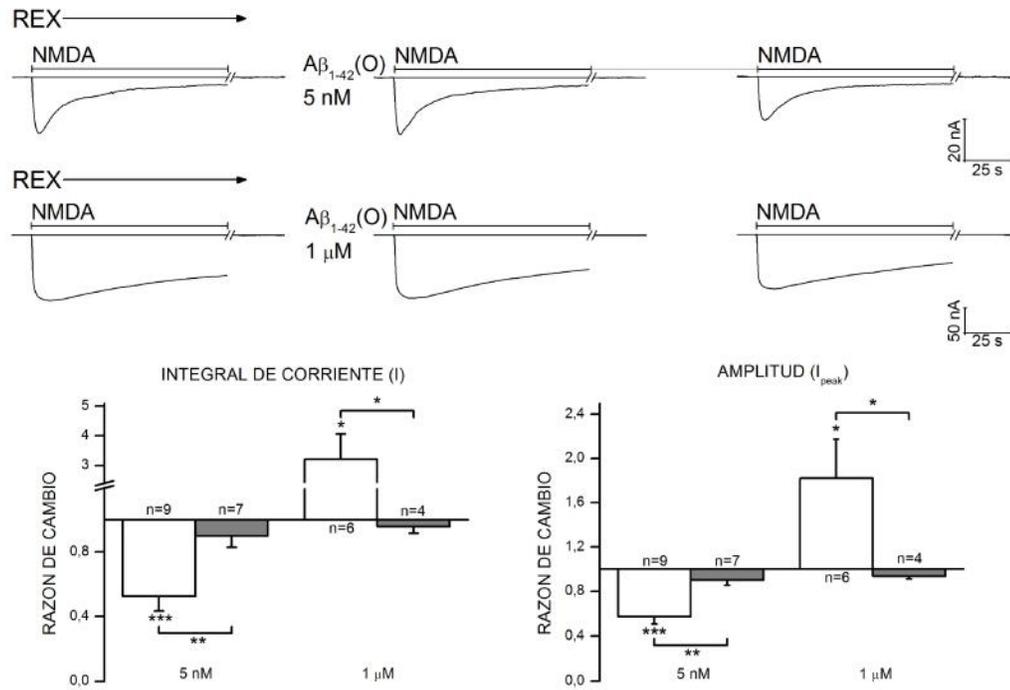


Figura 13. Participación del receptor p75^{NTR} en el efecto del péptido A β 1-42(O) sobre las respuestas activadas por NMDA. (A) Trazos representativos de las respuestas activadas por NMDA en presencia de péptido A β 1-42(O). (B) y (C) Comparación de los promedios de las razones de cambio en la integral de corriente (B) y en la amplitud (C) en la respuesta de NMDA en presencia de A β 1-42(O), en ovocitos inyectados con DPSs preincubadas con el anticuerpo contra p75^{NTR}. *p<0,05, **p<0,005, ***p<0,001.

6. DISCUSION

El presente trabajo muestra que las corrientes mediadas por el R-NMDA en DPSs pueden ser moduladas por el péptido A β por interacción con el receptor de neurotrofina p75^{NTR}. Interesantemente, la concentración efectiva depende tanto de la conformación del péptido (monomérica versus oligomérica) como de su longitud (1-40 versus 1-42), siendo el más potente el péptido A β 1-42(O). Para las formas estudiadas, se observan efectos antagónicos: inhibición del R-NMDA a concentraciones bajas y potenciación a concentraciones más altas.

6.1. Registros en ovocitos y corrientes mediadas por NMDA.

El método de registro de corriente en ovocitos inyectados con DPSs utilizado en este trabajo nos ha permitido estudiar el efecto sobre receptores postsinápticos controlando las concentraciones “extracelulares” de agonistas y ligandos. Si bien la técnica de registro de canales iónicos en ovocitos se desarrolló para el estudio de receptores recombinantes (Gundersen et al, 1984; Meguro et al, 1992; Ishii et al, 1993), con el tiempo también se adaptó para el registro de ovocitos microinyectados con membranas exógenas provenientes incluso de cerebro humano (Marsal et al, 1995; Morales et al, 1995; Miledi et al, 2002). La ventaja de esta estrategia es que permite registrar receptores en su microambiente “fisiológico”, en este caso, en el microambiente proteico de la DPS. De esta forma, se ha podido evaluar la actividad del R-NMDA y su modulación por el receptor p75^{NTR}, también contenido en la DPS, en condiciones extracelulares controladas, excluyendo así la participación de señales o moduladores presinápticos.

6.2. Efecto inhibitorio de proNGF sobre corrientes mediadas por R-NMDA.

El método de registro presentado aquí también fue empleado en nuestro laboratorio para estudiar el efecto de neurotrofinas y sus precursores sobre el R-NMDA (Sandoval et al, 2007). Los primeros experimentos de esta memoria se realizaron en ese contexto, encontrándose que el R-NMDA es modulado por proNGF en forma dependiente del receptor p75^{NTR}. Este receptor, descrito originalmente para el NGF, se ha asociado con múltiple funciones entre las que sobresale apoptosis durante el desarrollo neuronal (Hempstead, 2002). De hecho, la expresión de p75^{NTR} es alta

durante el desarrollo, mientras que en el SNC adulto se estimularía su expresión en diversas enfermedades, especialmente neurodegenerativas (Dechant & Barde, 2002). Por ello, fue sorprendente encontrarse con que p75^{NTR} se encuentra enriquecido en DPS aisladas desde el telencéfalo de una manera similar a lo que sucede con la proteína andamio PSD-95, considerada un marcador de sinapsis excitadoras. Por ello, pensamos que p75^{NTR} está presente en una gran proporción de sinapsis excitadoras a una concentración baja. Ello podría explicar su papel como modulador de la LTD, un modelo celular de plasticidad sináptica dependiente del R-NMDA (Woo et al, 2005). La naturaleza del ligando endógeno para p75^{NTR} es desconocida. Nosotros empleamos proNGF para activar a p75^{NTR}, ya que descartamos así activación cruzada de TrkB, que sabemos está presente en DPS. Sin embargo se desconoce si NGF y su precursor son liberados en sinapsis excitadoras. Una posible fuente de esta neurotrofina serían los astrocitos, que están en contacto íntimo con las sinapsis excitadoras llamándose este sistema las “sinapsis tripartitas” (Toyomoto et al, 2005). Si bien sus niveles de expresión son menores que los de BDNF en el SNC adulto, éstos aumentan en la EA (Fahnestock et al, 2001).

6.3. Participación del NO en la inhibición del R-NMDA via p75^{NTR}.

Los R-NMDA son regulados por múltiples mecanismos (Kloda et al, 2007). Entre los mecanismos que participan en su inhibición está la defosforilación por fosfatasas de proteínas (Westphal et al, 1999; Rycroft & Gibb, 2004) y la S-nitrosilación (Choi et al, 2000; Takahashi et al, 2007). Los resultados de esta memoria sugieren que el NO, pero no la defosforilación, estaría implicada en la inhibición del R-NMDA dependiente de p75^{NTR}, lo cual se apoya con la presencia de la enzima NOS asociada a la proteína de andamio PSD-95, de la misma forma en que lo están R-NMDA y p75^{NTR}.

6.4. Efecto del péptido A β .

El péptido A β ha sido encontrado en líquido cefalorraquídeo y plasma de personas sanas a concentraciones de 2,5 ng/mL (0,625 nM) y 0,9 ng/mL (0,36 nM) respectivamente (Haass et al, 1992; Seubert et al, 1992; Walsh & Selkoe, 2007), lo que no varía significativamente en pacientes con EA (Andreasen et al, 2001). Sin embargo,

estos valores medidos en el LCR no necesariamente reflejan las concentraciones en las sinapsis, donde podría ser mucho mayor. Se ha mostrado que el péptido A β es liberado en forma dependiente de actividad, lo que lo hace un candidato interesante como mediador de plasticidad neuronal y sináptica (Kamenetz et al, 2003; Cirrito et al, 2005). En ese sentido, el péptido A β ha sido propuesto como mediador de plasticidad homeostática (Esteban, 2004). Nuestros hallazgos apoyan la idea, ya que frente a actividad sináptica intensa, la inhibición del R-NMDA constituiría un mecanismo de retroalimentación negativa tendiente a mantener la función sináptica en rangos fisiológicos, mientras que su acumulación en la EA podría exacerbar mecanismos del tipo LTD o depotenciación sináptica, dando cuenta de las dificultades de memoria y aprendizaje tempranos de la enfermedad. En este trabajo, A β 1-42(M) inhibió las corrientes mediadas por el R-NMDA en forma similar en todas las concentraciones empleadas, por lo que sería necesario realizar experimentos en un rango de concentraciones más amplio (tanto menores como mayores) para corroborar si existe un comportamiento dosis dependiente similar al del péptido A β 1-40(M). Por otro lado, cabe destacar que en la inhibición producida por el péptido A β 1-42(M) disminuyen los tiempos de activación τ , lo cual no ocurre para la forma A β 1-40(M) (Tabla 2). Una disminución de τ significa que la respuesta máxima se alcanza más rápido que en condiciones normales. Aún no tenemos una explicación para estas diferencias en este parámetro cinético, pero sugiere que los mecanismos subyacentes a la inhibición por A β 1-40(M) y A β 1-42(M) son diferentes. Es importante resaltar que los tiempos de inactivación ($t_{0.5}$) disminuyen al usar el A β 1-42(O) como proNGF. Ello indica que las corrientes se inactivan más rápidamente, y que al menos considerando este parámetro cinético, proNGF actuaría por un mecanismo similar a A β 1-42(O).

Se ha mostrado que el péptido A β a concentraciones mayores de 500 nM es capaz de bloquear LTP, pero no LTD (Lambert et al, 1998) y de favorecer la internalización del R-NMDA (Snyder et al, 2005) y R-AMPA (Hsieh et al, 2006), lo cual puede reducir el número de sinapsis, así como también el largo y el grado de arborización de neuritas (Evans et al, 2008). La observación nuestra, en que A β es capaz de inhibir rápidamente al R-NMDA desde concentraciones 5 nM, es compatible

con la literatura que indica que concentraciones bajas tienen efectos sinápticos. Estos no necesariamente se reducen al R-NMDA, ya que por ejemplo los canales de calcio P/Q presentes en neuronas presinápticas (Nimmrich et al, 2008) son inhibidos por A β 1-42(O) a una concentración de 8 nM. El calcio tiene un papel clave en la LTP (Bliss & Collingridge, 1993), por lo que cualquier disfunción en su regulación puede gatillar deficiencias de memoria. Además, el influjo de calcio se ha asociado a estrés oxidativo, donde oligómeros de A β 1-42 a una concentración de 500 nM favorecen toxicidad a través del influjo de este ion, con participación del R-NMDA (De Felice et al, 2007). Las concentraciones empleadas son compatibles con el efecto bifásico encontrado por nosotros, en que concentraciones mayores de A β 1-42 son capaces de potenciar al R-NMDA y por tanto, el influjo de calcio.

Otra consideración que debemos hacer es respecto a la conformación. *In vitro*, existen diferentes formas de preparar el péptido los que dan como resultado distintos tamaños de oligómeros, por lo que fue necesario caracterizar los péptidos obtenidos utilizando técnicas de Western blot. Aunque en la literatura se muestra una gran variedad de efectos del péptido A β , en muchos de esos trabajos no se caracteriza el estado de agregación o de la concentración efectiva utilizada, lo que podría explicar la variedad de resultados (Tabla 1). Trabajos recientes utilizando muestras de pacientes apoyan la idea que los oligómeros de bajo peso molecular (dímeros) son los que poseen la capacidad de inhibir la LTP y favorecer la LTD en tajadas de hipocampo (Shankar et al, 2008). Respecto al presente trabajo, el oligómero obtenido comprende formas que varían entre dímeros y dodecámeros. En relación al efecto que se muestra en esta memoria, si bien el péptido A β 1-42(O) tiene el mismo comportamiento cualitativo que el péptido A β 1-40(M), las concentraciones a las que se observó el efecto inhibitorio son 10 veces menores, lo que convierte a esta forma en un modulador más potente.

6.5. Relación entre el péptido A β y el receptor p75^{NTR}.

En forma análoga a lo que ocurre con proNGF, se decidió poner a prueba la participación del receptor p75^{NTR} en el efecto del péptido A β sobre el R-NMDA. Se ha

descrito que el receptor $p75^{NTR}$ es capaz de unir ligandos estructuralmente no relacionados con las neurotrofinas, como el péptido $A\beta$, observándose muerte en forma dependiente del receptor a concentraciones de $25 \mu M$ (Yaar et al, 1997). El bloqueo del receptor $p75^{NTR}$ protege frente al daño mediado por el péptido a concentraciones 20 y $10 \mu M$, respectivamente (Yaar et al, 2007; Yang et al, 2008).

La dualidad de efecto observada por nosotros para el mismo receptor plantea como interrogante la identificación de diferentes efectores intracelulares asociados a $p75^{NTR}$ que puedan responder en forma diferencial a estos cambios de concentración. Los datos de este trabajo sugieren que $A\beta$, a través de $p75^{NTR}$, es capaz de participar en plasticidad homeostática a bajas concentraciones, donde podría existir una posible mediación del NO en forma análoga a lo que ocurre con proNGF, mientras que a concentraciones mayores participaría en aumentos de calcio mediados, en el caso particular de este trabajo, por potenciación del R-NMDA, pero cuyos intermediarios en este caso son desconocidos. Por otra parte, en nuestro laboratorio se ha empleado el péptido $A\beta_{1-42}(O)$ para estudiar cambios en las concentraciones de calcio intracelular en neuronas en cultivo, observándose aumentos de calcio dosis-dependientes a concentraciones mayores a $10 nM$ (datos no publicados), lo que también es compatible con los resultados aquí presentados. Es posible que en los ovocitos el péptido $A\beta_{1-42}(O)$ también estimule la movilización de calcio por diferentes mecanismos, como ha sido planteado en la literatura (Bojarski et al, 2008), el que actuaría como un segundo mensajero potenciándolo por una vía indirecta al R-NMDA, lo que podría explicar en parte el comportamiento dual del péptido.

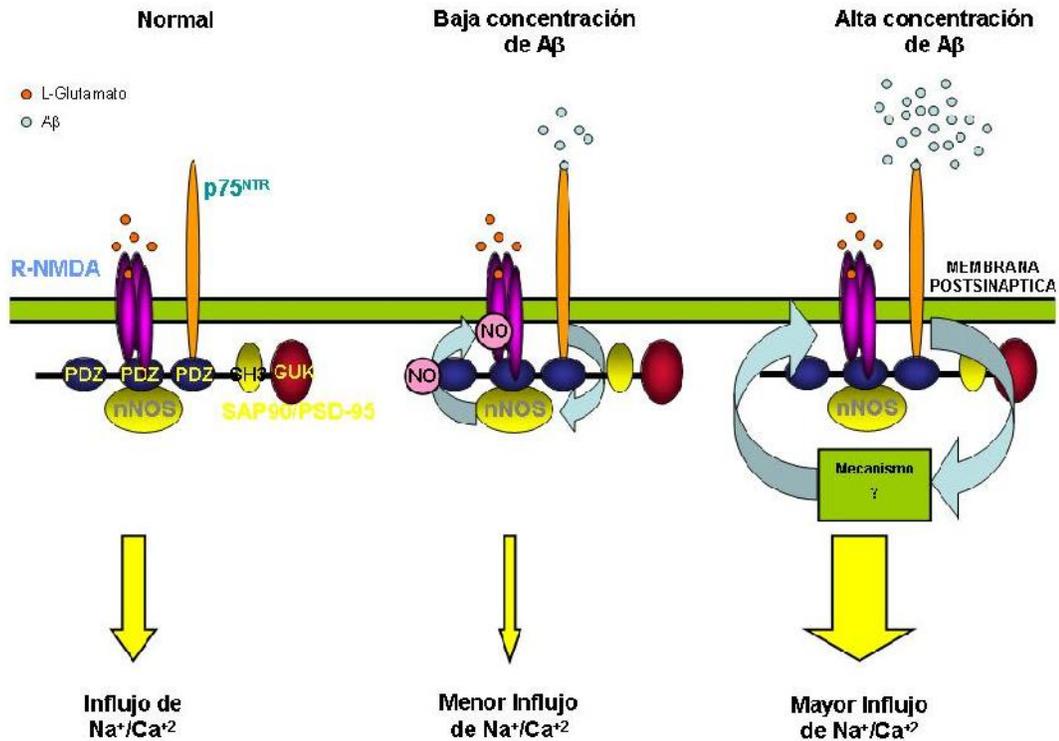


Figura 14. Modelo propuesto para la participación de p75^{NTR} en el efecto dual del péptido Aβ sobre la actividad del R-NMDA.

7. CONCLUSIONES

En la presente memoria se estudió la modulación de las corrientes sinápticas mediadas por el R-NMDA en respuesta al péptido Aβ (en formas monoméricas y oligoméricas) y la posible intervención del receptor para neurotrofina p75^{NTR} en dicho efecto. Para este fin, se utilizó una técnica de fijación de potencial en ovocitos de *X. laevis* microinyectados con DPSs. El principal aporte de este trabajo es el hallazgo de efectos opuestos a distintas concentraciones de péptido, los cuales, al ser mediados por el mismo receptor sináptico p75^{NTR}, permiten considerar a éste como blanco molecular del péptido a nivel de las sinapsis. Por su importancia en la patología de la EA, encontramos que existe un efecto funcional importante producido por el péptido Aβ1-42(O), lo que contribuiría a una mejor comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes a los efectos sinápticos de Aβ, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

BIBLIOGRAFIA

Alarcon JM, Brito JA, Hermosilla T, Atwater I, Mears D, Rojas E (2006) Ion channel formation by Alzheimer's disease amyloid beta-peptide (A β 40) in unilamellar liposomes is determined by anionic phospholipids. *Peptides* **27**(1): 95-104

Aleu J, Barat A, Burgos JS, Solsona C, Marsal J, Ramirez G (1999) Guanine nucleotides, including GMP, antagonize kainate responses in *Xenopus* oocytes injected with chick cerebellar membranes. *J Neurochem* **72**(5): 2170-2176

Andreasen N, Gottfries J, Vanmechelen E, Vanderstichele H, Davidson P, Blennow K, Rosengren L (2001) Evaluation of CSF biomarkers for axonal and neuronal degeneration, gliosis, and beta-amyloid metabolism in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **71**(4): 557-558

Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**(6407): 31-39

Bojarski L, Herms J, Kuznicki J (2008) Calcium dysregulation in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* **52**(4-5): 621-633

Brenman JE, Chao DS, Gee SH, McGee AW, Craven SE, Santillano DR, Wu Z, Huang F, Xia H, Peters MF, Froehner SC, Brecht DS (1996) Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* **84**(5): 757-767

Carlin RK, Grab DJ, Cohen RS, Siekevitz P (1980) Isolation and characterization of postsynaptic densities from various brain regions: enrichment of different types of postsynaptic densities. *J Cell Biol* **86**(3): 831-845

Cirrito JR, Yamada KA, Finn MB, Sloviter RS, Bales KR, May PC, Schoepp DD, Paul SM, Mennerick S, Holtzman DM (2005) Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo. *Neuron* **48**(6): 913-922

Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, Shankar GM, Kuskowski MA, Selkoe DJ, Ashe KH (2005) Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci* **8**(1): 79-84

Collingridge GL, Randall AD, Davies CH, Alford S (1992) The synaptic activation of NMDA receptors and Ca²⁺ signalling in neurons. *Ciba Found Symp* **164**: 162-171; discussion 172-165

Coulson EJ (2006) Does the p75 neurotrophin receptor mediate A β -induced toxicity in Alzheimer's disease? *J Neurochem* **98**(3): 654-660

Cull-Candy SG, Leszkiewicz DN (2004) Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE* **2004**(255): re16

Choi YB, Tenneti L, Le DA, Ortiz J, Bai G, Chen HS, Lipton SA (2000) Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation. *Nat Neurosci* **3**(1): 15-21

De Felice FG, Velasco PT, Lambert MP, Viola K, Fernandez SJ, Ferreira ST, Klein WL (2007) Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *J Biol Chem* **282**(15): 11590-11601

De Strooper B, Annaert W (2000) Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci* **113** (Pt 11): 1857-1870

Dechant G, Barde YA (2002) The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat Neurosci* **5**(11): 1131-1136

Della-Bianca V, Rossi F, Armato U, Dal-Pra I, Costantini C, Perini G, Politi V, Della Valle G (2001) Neurotrophin p75 receptor is involved in neuronal damage by prion peptide-(106-126). *J Biol Chem* **276**(42): 38929-38933

Demuro A, Mina E, Kaye R, Milton SC, Parker I, Glabe CG (2005) Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J Biol Chem* **280**(17): 17294-17300

Deshpande A, Mina E, Glabe C, Busciglio J (2006) Different conformations of amyloid beta induce neurotoxicity by distinct mechanisms in human cortical neurons. *J Neurosci* **26**(22): 6011-6018

Esteban JA (2004) Living with the enemy: a physiological role for the beta-amyloid peptide. *Trends Neurosci* **27**(1): 1-3

Evans NA, Facci L, Owen DE, Soden PE, Burbidge SA, Prinjha RK, Richardson JC, Skaper SD (2008) Abeta(1-42) reduces synapse number and inhibits neurite outgrowth in primary cortical and hippocampal neurons: a quantitative analysis. *J Neurosci Methods* **175**(1): 96-103

Fahnestock M, Michalski B, Xu B, Coughlin MD (2001) The precursor pro-nerve growth factor is the predominant form of nerve growth factor in brain and is increased in Alzheimer's disease. *Mol Cell Neurosci* **18**(2): 210-220

Findeis MA (2007) The role of amyloid beta peptide 42 in Alzheimer's disease. *Pharmacol Ther* **116**(2): 266-286

Goedert M, Spillantini MG (2006) A century of Alzheimer's disease. *Science* **314**(5800): 777-781

Gong Y, Chang L, Viola KL, Lacor PN, Lambert MP, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (2003) Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands

(ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(18): 10417-10422

Gundersen CB, Miledi R, Parker I (1984) Messenger RNA from human brain induces drug- and voltage-operated channels in *Xenopus* oocytes. *Nature* **308**(5958): 421-424

Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB, et al. (1992) Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* **359**(6393): 322-325

Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**(5580): 353-356

Hardy JA, Higgins GA (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **256**(5054): 184-185

Hartmann M, Heumann R, Lessmann V (2001) Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. *EMBO J* **20**(21): 5887-5897

Heerssen HM, Segal RA (2002) Location, location, location: a spatial view of neurotrophin signal transduction. *Trends Neurosci* **25**(3): 160-165

Hempstead BL (2002) The many faces of p75NTR. *Curr Opin Neurobiol* **12**(3): 260-267

Hepler RW, Grimm KM, Nahas DD, Breese R, Dodson EC, Acton P, Keller PM, Yeager M, Wang H, Shughrue P, Kinney G, Joyce JG (2006) Solution state characterization of amyloid beta-derived diffusible ligands. *Biochemistry* **45**(51): 15157-15167

Hsieh H, Boehm J, Sato C, Iwatsubo T, Tomita T, Sisodia S, Malinow R (2006) AMPAR removal underlies A β -induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron* **52**(5): 831-843

Ishii T, Moriyoshi K, Sugihara H, Sakurada K, Kadotani H, Yokoi M, Akazawa C, Shigemoto R, Mizuno N, Masu M, et al. (1993) Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J Biol Chem* **268**(4): 2836-2843

Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, Sisodia S, Malinow R (2003) APP processing and synaptic function. *Neuron* **37**(6): 925-937

Kennedy MB (2000) Signal-processing machines at the postsynaptic density. *Science* **290**(5492): 750-754

Klein WL (2002) A β toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochem Int* **41**(5): 345-352

Kloda A, Martinac B, Adams DJ (2007) Polymodal regulation of NMDA receptor channels. *Channels (Austin)* **1**(5): 334-343

- Kojima M, Takei N, Numakawa T, Ishikawa Y, Suzuki S, Matsumoto T, Katoh-Semba R, Nawa H, Hatanaka H (2001) Biological characterization and optical imaging of brain-derived neurotrophic factor-green fluorescent protein suggest an activity-dependent local release of brain-derived neurotrophic factor in neurites of cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res* **64**(1): 1-10
- Korte M, Carroll P, Wolf E, Brem G, Thoenen H, Bonhoeffer T (1995) Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(19): 8856-8860
- Kuner P, Schubel R, Hertel C (1998) Beta-amyloid binds to p75NTR and activates NFkappaB in human neuroblastoma cells. *J Neurosci Res* **54**(6): 798-804
- Kuo YM, Emmerling MR, Vigo-Pelfrey C, Kasunic TC, Kirkpatrick JB, Murdoch GH, Ball MJ, Roher AE (1996) Water-soluble Abeta (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains. *J Biol Chem* **271**(8): 4077-4081
- Lacor PN, Buniel MC, Chang L, Fernandez SJ, Gong Y, Viola KL, Lambert MP, Velasco PT, Bigio EH, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (2004) Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *J Neurosci* **24**(45): 10191-10200
- Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, Clemente AS, Velasco PT, Wood M, Viola KL, Klein WL (2007) Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci* **27**(4): 796-807
- Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(11): 6448-6453
- Lau CG, Zukin RS (2007) NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* **8**(6): 413-426
- Levine ES, Crozier RA, Black IB, Plummer MR (1998) Brain-derived neurotrophic factor modulates hippocampal synaptic transmission by increasing N-methyl-D-aspartic acid receptor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(17): 10235-10239
- Liu L, Wong TP, Pozza MF, Lingenhoehl K, Wang Y, Sheng M, Auberson YP, Wang YT (2004) Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science* **304**(5673): 1021-1024
- Madden DR (2002) The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat Rev Neurosci* **3**(2): 91-101
- Marsal J, Tigyi G, Miledi R (1995) Incorporation of acetylcholine receptors and Cl⁻ channels in *Xenopus* oocytes injected with Torpedo electroplaque membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(11): 5224-5228

- Massey PV, Johnson BE, Moulton PR, Auberson YP, Brown MW, Molnar E, Collingridge GL, Bashir ZI (2004) Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in cortical long-term potentiation and long-term depression. *J Neurosci* **24**(36): 7821-7828
- McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI, Masters CL (1999) Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* **46**(6): 860-866
- Meguro H, Mori H, Araki K, Kushiya E, Kutsuwada T, Yamazaki M, Kumanishi T, Arakawa M, Sakimura K, Mishina M (1992) Functional characterization of a heteromeric NMDA receptor channel expressed from cloned cDNAs. *Nature* **357**(6373): 70-74
- Miledi R, Eusebi F, Martinez-Torres A, Palma E, Trettel F (2002) Expression of functional neurotransmitter receptors in *Xenopus* oocytes after injection of human brain membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(20): 13238-13242
- Miyamoto E (2006) Molecular mechanism of neuronal plasticity: induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus. *J Pharmacol Sci* **100**(5): 433-442
- Morales A, Aleu J, Ivorra I, Ferragut JA, Gonzalez-Ros JM, Miledi R (1995) Incorporation of reconstituted acetylcholine receptors from Torpedo into the *Xenopus* oocyte membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(18): 8468-8472
- Mothet JP, Parent AT, Wolosker H, Brady RO, Jr., Linden DJ, Ferris CD, Rogawski MA, Snyder SH (2000) D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(9): 4926-4931
- Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Johnson-Wood K, McConlogue L (2000) High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci* **20**(11): 4050-4058
- Nimmrich V, Grimm C, Draguhn A, Barghorn S, Lehmann A, Schoemaker H, Hillen H, Gross G, Ebert U, Bruehl C (2008) Amyloid beta oligomers (A beta(1-42) globulomer) suppress spontaneous synaptic activity by inhibition of P/Q-type calcium currents. *J Neurosci* **28**(4): 788-797
- Rao VR, Finkbeiner S (2007) NMDA and AMPA receptors: old channels, new tricks. *Trends Neurosci* **30**(6): 284-291
- Reichardt LF (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**(1473): 1545-1564
- Reinhard C, Hebert SS, De Strooper B (2005) The amyloid-beta precursor protein: integrating structure with biological function. *EMBO J* **24**(23): 3996-4006

Roselli F, Tirard M, Lu J, Hutzler P, Lamberti P, Livrea P, Morabito M, Almeida OF (2005) Soluble beta-amyloid1-40 induces NMDA-dependent degradation of postsynaptic density-95 at glutamatergic synapses. *J Neurosci* **25**(48): 11061-11070

Rycroft BK, Gibb AJ (2004) Inhibitory interactions of calcineurin (phosphatase 2B) and calmodulin on rat hippocampal NMDA receptors. *Neuropharmacology* **47**(4): 505-514

Sandoval M, Sandoval R, Thomas U, Spilker C, Smalla KH, Falcon R, Marengo JJ, Calderon R, Saavedra V, Heumann R, Bronfman F, Garner CC, Gundelfinger ED, Wyneken U (2007) Antagonistic effects of TrkB and p75(NTR) on NMDA receptor currents in post-synaptic densities transplanted into *Xenopus* oocytes. *J Neurochem* **101**(6): 1672-1684

Schagger H (2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc* **1**(1): 16-22

Seidah NG, Benjannet S, Pareek S, Chretien M, Murphy RA (1996a) Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases. *FEBS Lett* **379**(3): 247-250

Seidah NG, Benjannet S, Pareek S, Savaria D, Hamelin J, Goulet B, Laliberte J, Lazure C, Chretien M, Murphy RA (1996b) Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochem J* **314** (Pt 3): 951-960

Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D, Sinha S, Schlossmacher M, Whaley J, Swindlehurst C, et al. (1992) Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature* **359**(6393): 325-327

Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL (2007) Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci* **27**(11): 2866-2875

Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ (2008) Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med*

Shelat PB, Chalimoniuk M, Wang JH, Strosznajder JB, Lee JC, Sun AY, Simonyi A, Sun GY (2008) Amyloid beta peptide and NMDA induce ROS from NADPH oxidase and AA release from cytosolic phospholipase A2 in cortical neurons. *J Neurochem* **106**(1): 45-55

Sheng M (2001) Molecular organization of the postsynaptic specialization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(13): 7058-7061

Shenolikar S, Nairn AC (1991) Protein phosphatases: recent progress. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **23**: 1-121

Small DH, Maksel D, Kerr ML, Ng J, Hou X, Chu C, Mehrani H, Unabia S, Azari MF, Loiacono R, Aguilar MI, Chebib M (2007) The beta-amyloid protein of Alzheimer's disease binds to membrane lipids but does not bind to the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. *J Neurochem* **101**(6): 1527-1538

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**(1): 76-85

Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, Nairn AC, Salter MW, Lombroso PJ, Gouras GK, Greengard P (2005) Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci* **8**(8): 1051-1058

Sotthibundhu A, Sykes AM, Fox B, Underwood CK, Thangnipon W, Coulson EJ (2008) Beta-amyloid(1-42) induces neuronal death through the p75 neurotrophin receptor. *J Neurosci* **28**(15): 3941-3946

St George-Hyslop PH (2000) Piecing together Alzheimer's. *Sci Am* **283**(6): 76-83

Susen K, Blochl A (2005) Low concentrations of aggregated beta-amyloid induce neurite formation via the neurotrophin receptor p75. *J Mol Med* **83**(9): 720-735

Takahashi H, Shin Y, Cho SJ, Zago WM, Nakamura T, Gu Z, Ma Y, Furukawa H, Liddington R, Zhang D, Tong G, Chen HS, Lipton SA (2007) Hypoxia enhances S-nitrosylation-mediated NMDA receptor inhibition via a thiol oxygen sensor motif. *Neuron* **53**(1): 53-64

Teng KK, Hempstead BL (2004) Neurotrophins and their receptors: signaling trios in complex biological systems. *Cell Mol Life Sci* **61**(1): 35-48

Tong L, Thornton PL, Balazs R, Cotman CW (2001) Beta -amyloid-(1-42) impairs activity-dependent cAMP-response element-binding protein signaling in neurons at concentrations in which cell survival is not compromised. *J Biol Chem* **276**(20): 17301-17306

Toyomoto M, Inoue S, Ohta K, Kuno S, Ohta M, Hayashi K, Ikeda K (2005) Production of NGF, BDNF and GDNF in mouse astrocyte cultures is strongly enhanced by a cerebral vasodilator, ifenprodil. *Neurosci Lett* **379**(3): 185-189

Vargas J, Alarcon JM, Rojas E (2000) Displacement currents associated with the insertion of Alzheimer disease amyloid beta-peptide into planar bilayer membranes. *Biophys J* **79**(2): 934-944

Venkitaramani DV, Chin J, Netzer WJ, Gouras GK, Lesne S, Malinow R, Lombroso PJ (2007) Beta-amyloid modulation of synaptic transmission and plasticity. *J Neurosci* **27**(44): 11832-11837

- Walsh DM, Selkoe DJ (2007) A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem* **101**(5): 1172-1184
- Wang HY, Lee DH, D'Andrea MR, Peterson PA, Shank RP, Reitz AB (2000a) beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem* **275**(8): 5626-5632
- Wang HY, Lee DH, Davis CB, Shank RP (2000b) Amyloid peptide Abeta(1-42) binds selectively and with picomolar affinity to alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurochem* **75**(3): 1155-1161
- Westphal RS, Tavalin SJ, Lin JW, Alto NM, Fraser ID, Langeberg LK, Sheng M, Scott JD (1999) Regulation of NMDA receptors by an associated phosphatase-kinase signaling complex. *Science* **285**(5424): 93-96
- Woo NH, Teng HK, Siao CJ, Chiaruttini C, Pang PT, Milner TA, Hempstead BL, Lu B (2005) Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat Neurosci* **8**(8): 1069-1077
- Wyneken U, Smalla KH, Marengo JJ, Soto D, de la Cerda A, Tischmeyer W, Grimm R, Boeckers TM, Wolf G, Orrego F, Gundelfinger ED (2001) Kainate-induced seizures alter protein composition and N-methyl-D-aspartate receptor function of rat forebrain postsynaptic densities. *Neuroscience* **102**(1): 65-74
- Xia Z, Dudek H, Miranti CK, Greenberg ME (1996) Calcium influx via the NMDA receptor induces immediate early gene transcription by a MAP kinase/ERK-dependent mechanism. *J Neurosci* **16**(17): 5425-5436
- Yaar M, Zhai S, Panova I, Fine RE, Eisenhauer PB, Blusztajn JK, Lopez-Coviella I, Gilchrest BA (2007) A cyclic peptide that binds p75(NTR) protects neurones from beta amyloid (1-40)-induced cell death. *Neuropathol Appl Neurobiol* **33**(5): 533-543
- Yaar M, Zhai S, Pilch PF, Doyle SM, Eisenhauer PB, Fine RE, Gilchrest BA (1997) Binding of beta-amyloid to the p75 neurotrophin receptor induces apoptosis. A possible mechanism for Alzheimer's disease. *J Clin Invest* **100**(9): 2333-2340
- Yang T, Knowles JK, Lu Q, Zhang H, Arancio O, Moore LA, Chang T, Wang Q, Andreasson K, Rajadas J, Fuller GG, Xie Y, Massa SM, Longo FM (2008) Small molecule, non-peptide p75 ligands inhibit Abeta-induced neurodegeneration and synaptic impairment. *PLoS ONE* **3**(11): e3604