

UCH-FC
Biotecnología
066
C.1

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

**EFFECTO NEUROPROTECTOR DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL
ALFA (TNF- α) FRENTE A LA NEUROTOXICIDAD DE CDK5 INDUCIDA POR
EL PEPTIDO BETA AMILOIDE. PAPEL DEL COMPLEJO CDK5/P35**

Memoria de Título

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular

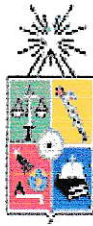
por

Daniel Ignacio Orellana Riquelme

Mayo, 2006

Santiago-Chile

Director de Tesis: Dr. Ricardo B. Maccioni Baraona



**“Efecto Neuroprotector del Factor de Necrosis Tumoral alfa
(TNF- α) Frente a la Neurotoxicidad de CDK5 inducida por el
Peptido Beta Amiloide. Papel del Complejo CDK5/P35**

”

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

DANIEL IGNACIO ORELLANA RIQUELME.

Dr. Ricardo Maccioni Baraona
Director Seminario de Título

Firma manuscrita en azul del Dr. Ricardo Maccioni Baraona, sobre una línea horizontal.

Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dra. María Rosa Bono Merino
Presidente Comisión

Firma manuscrita en azul de María Rosa Bono Merino, sobre una línea horizontal.

Dr. Christian González-Billaault
Corrector

Santiago de Chile, Junio de 2006

DEDICATORIA

A mi padre, madre y hermanos.

Por su amor y cariño.

¿Se Puede?...Sí, sí se puede.

| | |
|---|----|
| 2.5. Inmunoprecipitación y medición de la actividad quinasa de cdk5 | 13 |
| 2.6 Extracción RNA, ensayo RT-PCR y PCR. | 14 |
| 2.7 Ensayo de agregación neuronal | 15 |
| 2.8 Análisis estadísticos. | 15 |
| III. Resultados | 16 |
| 1. TNF- α no afecta la viabilidad celular de las neuronas hipocampales | 16 |
| 2. Efectos de TNF- α sobre cdk5 | 21 |
| 3. TNF- α no modifica los niveles del activador p35 | 25 |
| 4. TNF- α previene la hiperfosforilación de tau inducida por A β . | 26 |
| 5. TNF- α induce la agregación de neuronas corticales | 30 |
| Discusión | 33 |
| Conclusiones | 40 |
| Referencias | 42 |

INDICE DE FIGURAS

| N° Figura | | Página |
|--------------|---|--------|
| 1 | Transducción de señales inducida por TNF- α | 8 |
| 2 | Cultivos de neuronas de hipocampo tratadas con diferentes estímulos | 16 |
| 3 | Cuantificación de la fluorescencia obtenida por el kit MitoCapture TM | 17 |
| 4 | Efecto de TNF- α en la viabilidad neuronal | 19 |
| 5 | TNF- α no afecta la viabilidad de neuronas hipocampales al aumentar su concentración | 20 |
| 6 | TNF- α protege de la neurotoxicidad inducida por el péptido A β 1-42. | 21 |
| 7 | TNF- α disminuye los niveles de la proteína cdk5 | 22 |
| 8 | TNF- α no induce cambios en los niveles del mRNA de cdk5 | 23 |
| 9 | TNF- α disminuye la actividad quinasa de cdk5 inducida por A β | 25 |
| 10 | TNF- α no altera los niveles de p35 | 26 |
| 11 | TNF disminuye los niveles de tau hiperfosforilada reconocida con AT8 | 27 |
| 12 | TNF disminuye los niveles de tau hiperfosforilada reconocida con PHF1 | 28 |
| 13 | TNF incrementa los niveles de tau desfosforilada reconocidos por Tau1 | 30 |
| 14 | TNF- α incrementa la agregación de neuronas corticales | 32 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------|---|
| A β | Beta Amilode |
| APP | Proteína Precursora del Amiloide |
| ATP | Adenosin Trifosfato |
| Ca ²⁺ | Ion Calcio |
| cdk5 | Ciclina dependiente de quinasa 5 |
| DIV | Días in vitro |
| EA | Enfermedad de Alzheimer |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de Hidrogeno |
| HS | Suero de Caballo |
| IL-1 α | Interleuquina 1 alfa |
| IL-1 β | Interleuquina 1 beta |
| IL-6 | Interleuquina 6 |
| kDA | Kilo Dalton |
| MAPK | Proteína quinasa activada por mitogeno |
| MEF2 | Factor Inductor de Míocitos 2 |
| MTT | 3-[4,5-dimetiazol-2-li]-2,5-difeniltetrazolio bromuro; azul de tiazolil |
| mRNA | Acido Ribonucleico mensajero |
| NMDA | N-metil-D-aspartato |
| NF- κ B | Factor nuclear kappa B |
| ONFs | Ovillos Neurofibrilares |

| | |
|---------------|-------------------------------------|
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| PS | Placas Seniles |
| PHFs | Filamentos Pareados Helicoidales |
| RT-PCR | Trascrición Reversa por PCR |
| SNC | Sistema Nervioso |
| TNF- α | Factor de Necrosis Tumoral alfa |
| TNFR1 | Receptor de TNF- α 1 |
| TNFR2 | Receptor de TNF- α 2 |

RESUMEN

Estudios recientes en nuestro laboratorio demostraron que el tratamiento de neuronas hipocampales de rata con el péptido beta amiloide ($A\beta$) induce cambios en los patrones de fosforilación de la proteína tau, acompañado de una progresiva muerte neuronal. La hiperfosforilación de la proteína tau y posterior muerte neuronal, está mediado por la desregulación del complejo cdk5-p35 inducido por el tratamiento con el péptido $A\beta$. Por otra parte, se ha descrito que el pre-tratamiento de neuronas hipocampales con la citoquina $TNF-\alpha$ protege a estas neuronas de la muerte celular inducida por el péptido $A\beta$. Sin embargo, los efectos de $TNF-\alpha$ sobre el sistema cdk5/p35, y su posible acción neuroprotectora en contra de la muerte por $A\beta$ se mantiene aún sin dilucidar. Para abordar este problema, se estudiaron los cambios en la expresión y actividad de la proteína cdk5 en cultivo de neuronas hipocampales, los cuales, fueron pre-tratados con $TNF-\alpha$ y expuestos a $A\beta_{1-42}$. El pre-tratamiento de $TNF-\alpha$ produjo una disminución en los niveles de esta proteína. De manera interesante, $TNF-\alpha$ redujo substancialmente el aumento en la actividad de cdk5 de las células hipocampales, inducido por el péptido $A\beta$. Además, $A\beta$ indujo una fosforilación tipo Alzheimer de la proteína tau. Esta modificación anómala fue bloqueada por el tratamiento de las células con $TNF-\alpha$. Este fenómeno sugiere que la respuesta inflamatoria debido al péptido $A\beta$ podría estar jugando un papel clave en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. No solo el complejo cdk5-p35, sino que también $TNF-\alpha$ podrían estar implicados en la etiopathogenesis de esta enfermedad neurodegenerativa.

ABSTRACT

It is known that treatments of rat hippocampal neurons with the amyloid- β peptide ($A\beta$) induces changes on the phosphorylation patterns of tau protein associated with a progressive neuronal death. This effect in tau hyperphosphorylation is mediated by the deregulation of the cdk5-p35 system, as induced by the $A\beta$ peptide. On the other hand, it is known that pretreatment of hippocampal neurons with the pleiotropic cytokine TNF- α protects these neurons from the $A\beta$ -induced cell death. The effects of TNF- α over cdk5 and its possible neuro-protective role against $A\beta$ peptide remain elusive. In order to address this issue, the cdk5 protein was studied in hippocampal neurons which were pretreated with TNF- α and then exposed to $A\beta$ 1-42 peptide. TNF- α pretreatment significantly reduced the pathological increase of cdk5 activity by the effects of $A\beta$. Also, $A\beta$ induces phosphorylations of tau protein at Alzheimer's epitopes, modifications which were decreased by the pretreatment with TNF- α . These phenomena suggest that the inflammatory response due to $A\beta$ could play a key role in the development of Alzheimer's disease. Moreover, not only cdk5-p35 complex but also TNF- α could be also implicated in Alzheimer's etiopathogenesis.

INTRODUCCION

1.1 La enfermedad de Alzheimer.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo que afecta preferentemente a personas de edad avanzada. Es el principal y más común tipo de demencia senil entre los adultos mayores. Esta enfermedad afecta al 12% de las personas mayores de 65 años, lo que corresponde a cerca de 20 millones de personas en el mundo (De Felice y cols., 2004). Actualmente no hay un tratamiento clínico aceptado y que sea efectivo para tratar esta enfermedad. La EA se caracteriza por la formación masiva de dos principales agregados proteicos en el cerebro de los pacientes: las placas seniles (PS) y los ovillos neurofibrilares (ONFs). Las PS o placas neuríticas están formadas por la deposición extracelular del péptido beta amiloide ($A\beta$) (Liu y cols., 1991). El péptido $A\beta$ es derivado de la proteína precursora del amiloide APP (Glennner y cols., 1984). Este péptido es generado por el clivaje de la proteína APP por β y γ -secretasas (Walsh y Selkoe, 2004). El APP es clivado primero por la β -secretasa. Esto genera un fragmento soluble ($sAPP_{\beta}$) y un fragmento unido a membrana (CTF_{β} ó C99). La γ -secretasa actúa luego sobre C99 y genera el péptido $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$ soluble (Gandy, 2005).

Los otros agregados proteicos característicos de la EA son los ONFs. Estos están formados por estructuras anómalas generadas por la autoagregación de formas hiperfosforiladas de la proteína tau, las cuales forman una red filamentosa y compacta de proteínas denominada filamentos pareados helicoidales (PHFs) (Kurt y cols., 1997, Maccioni y cols., 2001). La tau es una proteína que se encuentra

normalmente asociada a microtúbulos y cumple una función importante en el ensamble de éstos. Participa en la estabilización de los microtúbulos contra su inestabilidad dinámica y la unión de éstos a otros filamentos del citoesqueleto (Maccioni y cols., 1995; Maccioni y cols., 2001). La generación de estos dos agregados proteicos, las PS y los ONFs son entre otros los principales eventos moleculares que producen la degeneración neuronal en los pacientes con la EA (Hardy y Selkoe, 2002).

1.2 Enfermedad de Alzheimer y la proteína cdk5.

Una de las principales proteínas involucradas en la EA es la quinasa dependiente de ciclina 5 (cdk5) (Alvarez y cols., 1999; Dhavan y Tsai., 2001). Cdk5 es un miembro de la familia de serina/treonina quinasas dependientes de ciclina (CDKs). La mayoría de las CDKs participan en el control del ciclo celular. Cdk5 tiene un 60% de homología con CDC2 y CDK2, proteínas involucradas en el control del ciclo celular. Se ha encontrado que cdk5 actúa en el control del ciclo celular, siendo indispensable para detener el ciclo en las neuronas y facilitar su posterior diferenciación (Cicero y cols., 2005). Cdk5 participa en el desarrollo del SNC y en la estructuración de la cito-arquitectura de las neuronas. Ratones “*knockout*” para cdk5 presentan defectos en la laminación de la corteza y muerte perinatal (Ohshima y cols., 1996). También se ha encontrado que cdk5 participa a nivel celular en regular el citoesqueleto, guía axonal, transporte de membranas, y transmisión sináptica. Por otra parte está involucrada en mecanismos farmacológicos de adicción a las drogas y en la génesis del dolor (Dhavan y Tsai., 2001; Pareek y cols., 2006). Otra característica de la cdk5 es que su actividad no es dependiente de una ciclina como

las mayorías de las CDKs, sino que de proteínas específicas que actúan como activadores. A pesar de que se ha demostrado que cdk5 puede unirse a ciclina D, esta unión no activa la quinasa (Xiong y cols., 1992). Actualmente se sabe que la función de cdk5 es regulada por dos activadores neuroespecíficos, p35 (Tsai y cols., 1994) y p39 (Humbert y cols., 2000). Ratones doble mutante para los activadores p35 y p39 presentan un fenotipo indistinguible del “*knockout*” de cdk5 (Chae y cols., 1997; Ko y cols. 2001).

Como ya se comentó, la falta de cdk5 ó ambos activadores es destructiva para el SNC. Por otro lado, un aumento en la actividad de cdk5 es toxica para las neuronas. Diferentes insultos neurotóxicos pueden desregular la actividad de cdk5 incrementándola. La activación de cdk5 produce la fosforilación y activación de receptores NMDA, lo que induce muerte de células hipocampales por un aumento en la concentración de Ca^{2+} citosólico (Wang y cols., 2003). Neuronas de ratones deficientes en APP presentan un aumento en la actividad de cdk5 y un incremento en los niveles de tau fosforilada con la posterior muerte neuronal (Han y cols., 2005), indicando que APP prevendría la activación de cdk5. Se conoce además el papel de cdk5 y su activador p35 en la apoptosis neuronal mediada por el péptido A β . Se ha demostrado que el péptido A β induce un incremento de la actividad de cdk5 acompañado de una anormal hiperfosforilación de la tau en neuronas hipocampales de ratas (Alvarez y cols., 1999). La inhibición de la activación de cdk5 mediante el uso de diferentes inhibidores como butirolactona I, sondas antisentido en contra de cdk5, y un péptido inhibitorio de cdk5 (CIP) fueron capaces de revertir la hiperfosforilación de la tau y la muerte de neuronas inducida por A β (Alvarez y cols.,

1999; Zheng y cols., 2005), indicando que la inhibición de la fosforilación de tau previene la muerte neuronal inducida por A β .

La familia de factores de transcripción MEF2 (isoformas A-D) participa en diversos procesos incluyendo protección neuronal (Mao y cols., 1999; Okamoto y cols., 2000, 2002; Gong y cols., 2003). MEF2 es un sustrato fosforilado por cdk5. El incremento en la actividad de cdk5 inducido por la acción de neurotóxicos produce la fosforilación de MEF2 inhibiendo su activación y causando muerte neuronal (Gong y cols., 2003; Tang y cols., 2005; Smith y cols., 2006).

Así la desregulación de cdk5 ligada al incremento en su actividad es determinante en la muerte neuronal, y juega un importante papel en la vía neurodegenerativa gatillada por insultos neurotóxicos (Weishaupt y cols., 2003).

1.3 Inflamación y Enfermedad de Alzheimer.

Los procesos inflamatorios inducidos por citoquinas están activamente relacionados con la aparición de diversos desórdenes neurodegenerativos como lo es la EA, ya que conducen a una pérdida de la capacidad funcional de las neuronas (Wyss-Coray y Mucke, 2003). El origen de estas citoquinas puede deberse a dos fuentes: (1) Desde el sistema inmune y atravesando la barrera hemato-encefálica hacia el cerebro; ó (2) Pueden ser producidas por células gliales (astrocitos y microglia) o ciertas neuronas. Hasta el momento se conoce que diferentes insultos extracelulares, como lo son por ejemplo el péptido A β y estrés oxidativo, inducen que la microglia, astrocitos y neuronas produzcan citoquinas pro-inflamatorias tales como IL-1 α , IL-1 β , IL-6 y TNF- α (Li y cols., 2000; Li y cols., 2003; Quintanilla y cols., 2004). Estudios en pacientes con EA evidencian niveles cerebrales aumentados

de estas citoquinas, los cuales se cree que podrían afectar los procesos normales de las neuronas (Jia y cols., 2005; Flirski y Sobow, 2005). Estas citoquinas pueden cumplir funciones disímiles en la patogénesis de la EA. La IL-6 induce una fosforilación de la proteína tau debido a la desregulación de la vía cdk5/p35, aumentando su actividad y los niveles de su activador p35 (Quintanilla y cols., 2004). La IL-1 α produce un aumento de la hiperfosforilación de la proteína tau en neuronas corticales a través de la vía p38-MAPK (Li y cols., 2003). En general se ha postulado que citoquinas pro-inflamatorias (por ejemplo TNF- α , IL-1 β) participan en procesos neurodegenerativos, mientras que citoquinas anti-inflamatorias (como IL-4, IL-10) promueven regeneración y protección neuronal (Viviani y cols., 2004). Las múltiples funciones que presentan estas citoquinas hacen que cumplan diferentes papeles en promover o prevenir el daño neuronal.

1.4 TNF- α y enfermedad de Alzheimer.

El TNF- α es una citoquina pleiotropica que ejerce distintas funciones dependiendo del blanco o tipo celular en la cual esta actúe. El gen de TNF- α está ubicado en el cromosoma 6 dentro de la región clase III del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). TNF- α es producido como un precursor inactivo pro-TNF- α de 26 kDA que se encuentra unido a la membrana y debe ser procesado por la enzima TACE (TNF- α “*converting enzyme*”) para producir la forma soluble y activa de TNF- α de 17 kDA (Perry y cols., 2001). El TNF- α se autoagrega y forma trímeros que son la forma en que esta citoquina ejerce su función.

Esta citoquina ejerce sus funciones biológicas a través de dos receptores, el receptor de TNF- α 1 (TNFR1 ó p55TNF-R) y el receptor de TNF- α 2 (TNFR2 ó

p75TNF-R) y ambos receptores pueden inducir la activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1 (Baud y Karin, 2001; Viviani y cols., 2004) (Fig. 1). El gen del TNFR1 esta ubicado en el cromosoma 12 y codifica para un receptor de membrana de 55/60 kDA. El gen del TNFR2 esta ubicado en el cromosoma 1 y codifica para un receptor de membrana de 75/80 kDA (Perry y cols., 2001).

Bajo condiciones normales TNF- α y sus receptores son expresados en muchas células del SNC, lo que sugiere una función fisiológica de esta citoquina (Perry y cols., 2002; Beattie y cols., 2002; Stellwagen y Malenka, 2006). TNF- α también es importante en limitar y terminar el proceso de inflamación, y en revertir el daño inducido en los tejidos durante el proceso inflamatorio (Bruce y cols., 1996; Marino y cols., 1997). Sin embargo, el papel de TNF- α no esta claro aun. Esto se debe, a discrepancias que existen con respecto a la acción que esta citoquina tendría como mediador de neurodegeneración o neuroprotección en el SNC.

Los trímeros de TNF- α se unen a sus receptores TNFR1 ó TNFR2 y causan la trimerización del receptor, y el reclutamiento intracelular de proteínas específicas a los dominios citoplasmáticos de los receptores (Saha y Pahan, 2003). El TNFR1 es conocido como el receptor de señalización de apoptosis debido a que presenta los dominios de muerte (DD, “*death domains*”). La señalización vía TNFR1 requiere la unión de la proteína asociada a los dominios de muerte, TRADD (“*TNFR1-associated death domain protein*”). Esta proteína puede reclutar a la proteína RIP1 (*receptor interacting protein-1*) o FADD (*Fas-associated death domain protein*). A pesar de poseer estos DD el TNFR1 también puede inducir señales de sobrevivencia debido a que la unión de RIP1 ó FADD va a desencadenar ya sea una señal de apoptosis, vía activación de caspasas; ó de sobrevivencia, vía activación del factor

NF- κ B (Saha y Pahan, 2003). TNFR2 es conocido como el receptor de sobrevivencia ya que carece de los DD. La señalización vía TNFR2 requiere la unión de la proteína TRAF2. La unión de TRAF2 induce la activación de la vía NF- κ B. Sin embargo también puede inducir señales de apoptosis (Saha y Pahan, 2003).

A pesar de sus conocidas propiedades neurotóxicas, se ha propuesto una gran variedad de efectos neuroprotectores para esta citoquina. Por ejemplo, TNF- α protege contra el daño producido por la deprivación de glucosa y contra la toxicidad inducida por aminoácidos excitatorios (Cheng y cols., 1994). TNF- α protege neuronas y astrocitos contra la acidosis y la toxicidad inducida por calcio (Mattson y cols., 1995). Cultivos primarios de hipocampos pretratados con TNF- α son protegidos contra la toxicidad inducida por A β (Barger y cols., 1995; Kaltschmidt y cols., 1999). TNF- α disminuye la apoptosis al aumentar los niveles de Bcl-2 y Bcl-XL en cultivos primarios de neuronas (Tamatani y cols., 1999). Adicionalmente, ratones que carecen de los receptores para TNF- α son más susceptibles al daño neuronal (Bruce y cols., 1996; Gary y cols., 1998; Sullivan y cols., 1999; Thompson y cols., 2004; Turrin y cols., 2006). De esta forma se ha propuesto que la inflamación puede jugar un papel clave en el desarrollo de la EA, no solamente colaborando en los mecanismos de neuroprotección, sino que también, protegiendo al SNC contra el daño del estrés oxidativo inducido por el péptido A β (Cheng y cols., 1994; Barrer y cols., 1995; Bruce y cols., 1996; Mattson y cols., 1997; Glazner y cols., 2000).

Tomando en cuenta los antecedentes presentados anteriormente, esta tesis se enfocó al estudio de los posibles efectos reguladores de la citoquina TNF- α sobre el complejo cdk5/p35, y el papel que TNF- α juega en el proceso neurodegenerativo involucrado en la enfermedad de Alzheimer.

Transducción de señales inducida por TNF- α

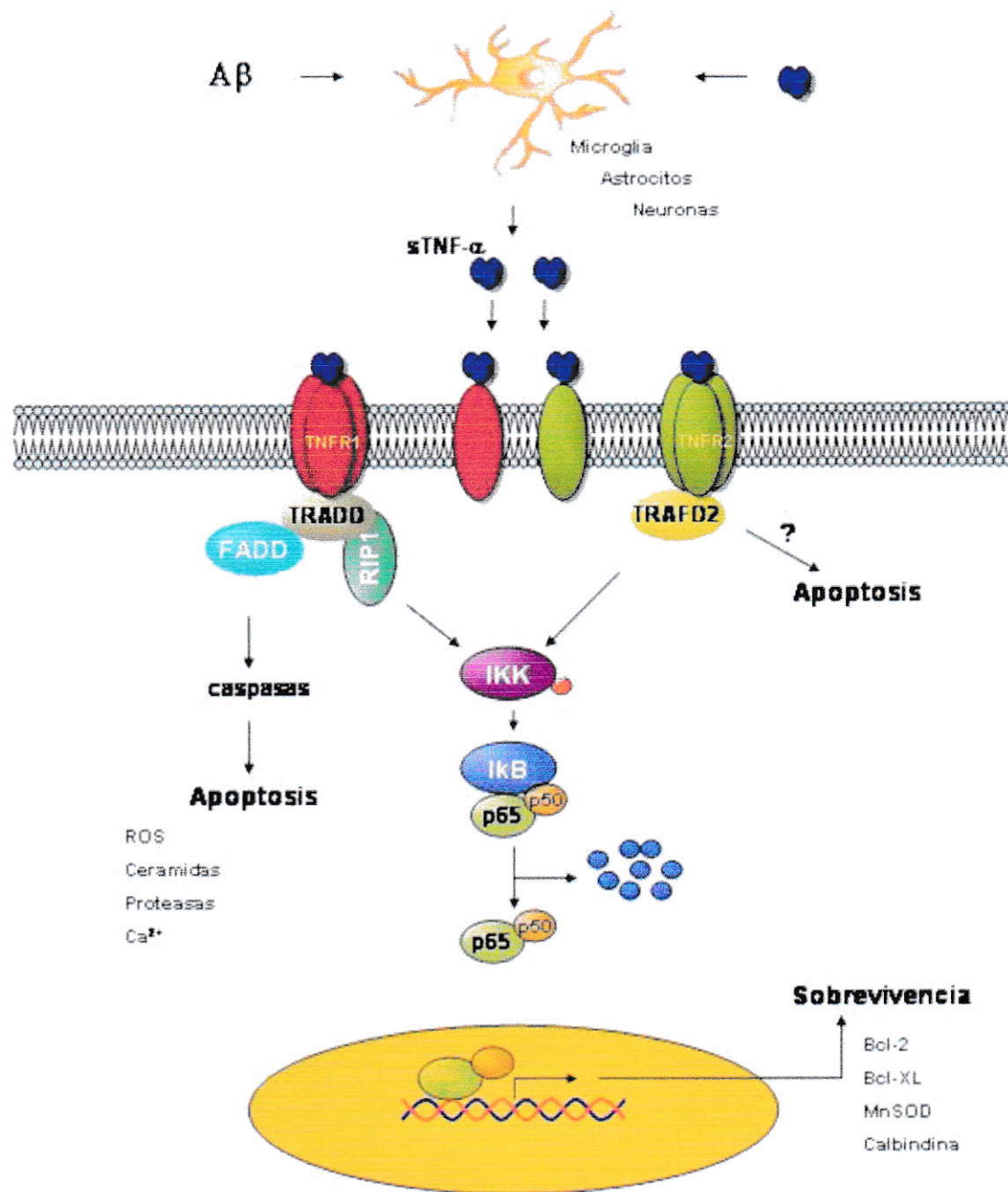


Figura 1. Esquema-resumen que muestra las vías de señalización inducidas por TNF- α . Trómeros solubles de la citoquina producidos por microglia, astrocitos o neuronas, producen la trimerización de los receptores de TNF- α . Esto produce a su vez, la activación de las señales de transducción intracelulares inducidas por TNF- α .

1.5 Hipótesis

El TNF- α protege a las neuronas del hipocampo de la muerte celular inducida por el péptido A β 1–42, a través de la modulación en la actividad de cdk5.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo General

Evaluar el papel neuroprotector de TNF- α , en neuronas hipocampales expuestas a la acción neurotóxica del péptido A β 1–42.

1.6.2 Objetivos Específicos

1.- Analizar los efectos producidos por TNF- α y por el péptido A β sobre la viabilidad celular en cultivos hipocampales de embriones de rata.

2.- Evaluar el papel de TNF- α sobre la expresión y actividad del complejo cdk5/p35.

3.- Estudiar los efectos de TNF- α sobre los patrones de fosforilación de la proteína tau, utilizando anticuerpos específicos contra fosfo-epitopos tipo Alzheimer.

MATERIALES Y METODOS

2.1. Cultivo primario de neuronas hipocampales de rata.

El hipocampo de embriones de ratas Sprague-Dawley de 18 días de preñez (E-18), fue diseccionado y los cultivos primarios de hipocampo fueron preparados según lo descrito previamente por Banker y Cowan (Banker y Cowan, 1977), con algunas modificaciones como se describe en Quintanilla y cols. (2004). Brevemente, los cerebros fueron removidos, las meninges fueron retiradas, los hipocampos fueron disectados y mantenidos en una solución salina balanceada de medio Hanks 1X libre de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (HBBSS). Los hipocampos fueron incubados con tripsina 0,5 mg/mL a 37 °C por 5 minutos. Luego, se sometieron a 3 lavados con HBBSS y se resuspendieron en medio mínimo MEM suplementado con 10% de HS (MEM-10). La disociación de tejido hipocampal fue realizada mediante trituración mecánica con pipeta Pasteur. Las células hipocampales fueron sembradas en placas de Petri de 60 mm tratadas previamente con polilysina (0,5 mg/mL) y mantenidas inicialmente en medio MEM-10 a 37°C con 5%CO₂/95%O₂. Luego de 1 h el medio fue removido y cambiado por MEM suplementado con B-27 (MEM/B-27) más penicilina, estreptomicina y mantenidas en atmósfera húmeda a 37°C con 5%CO₂/95%O₂. Las neuronas fueron contadas y sembradas a una densidad de 1x10⁶ cell/60mm. Después de 4 días en cultivo *in-vitro* (4DIV) las células fueron tratadas con TNF- α recombinante humana (US Biological) a una concentración de 5 ng/mL por 48 h ó con 10 μM de péptido A β 1-42 (Global Peptide) soluble por 24h. Cultivos sin tratamiento fueron usados como control.

2.2 Preparación del péptido beta amiloide.

El péptido sintético A β 1-42 (>70%HPLC) fue disuelto en 1 ml de agua estéril doblemente desionizada. La solución fue guardada a -20°C . A β 1-42 soluble fue agregado a los cultivos de neuronas hipocampales a una concentración de 10 μM por 24 h. Se usaron estas condiciones basados en resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio (Alvarez y cols., 1999) los cuales favorecen una alta formación de especies oligoméricas en comparación con las fibras de amiloide (Gandy, 2005).

2.3. Análisis de viabilidad celular.

La viabilidad celular fue medida por medio del método colorimétrico del 3-[4,5-dimetiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio bromuro; azul de tiazolil (MTT). Brevemente, las neuronas fueron sembradas en placas de 96 pocillos, previamente tratadas con polilysina (0.1 mg/ml) a una densidad de 20.000 células por pocillo en medio Neurobasal/B-27, sin rojo fenol. Luego las neuronas fueron tratadas con TNF- α (5ng/ml), A β 1-42 (10 μM) ó ambos tratamientos. Luego de los respectivos tratamientos se agregó a los cultivos el MTT durante 4 horas a 37°C , agregando después del tratamiento solución de lisis modificada (50 % v/v dimetil formamida, 20 % p/v SDS, pH 7,4) incubándose las células durante 2-4 horas a 37°C . Una vez terminado el tiempo se procedió a la lectura de absorbancia en un lector de ELISA con filtros de 550 y 650 nm. Los valores para 550-650nm fueron expresados como porcentaje del control.

Adicionalmente se analizó la viabilidad celular con el kit para detección de apoptosis MitotoCapture[™] Apoptosis detection (Calbiochem). Este kit entrega un

método basado en fluorescencia para distinguir entre células vivas y apoptóticas al detectar cambios en el potencial de membrana de la mitocondria. Células vivas emiten fluorescencia roja. Por el contrario, células apoptóticas emiten fluorescencia verde. Se cuantificó la fluorescencia y el resultado se expresó como una razón entre la fluorescencia roja sobre la verde. Las células fueron sembradas en cubreobjetos de 96 mm, en una densidad de 2.0×10^4 células/100 μ l y mantenidas en medio MEM/B-27. Luego las células fueron tratadas con TNF- α (5ng/mL), A β 1-42 (10 μ M) y ambos, respectivamente. Después de la incubación con los tratamientos la solución MitoCapture fue agregada a las células y estas fueron incubadas a 37°C 5%CO₂/95%O₂ por 15-20 min. La cuantificación de fluorescencia y las imágenes fueron adquiridas con el microscopio confocal Zeiss LSM 510 META.

2.4. Ensayos de inmunodetección.

La reactividad inmunológica de las proteínas contenidas en los extractos obtenidos de los cultivos de hipocampo tratados y no tratados fue medida por la técnica de Western blots, usando los siguientes anticuerpos: cdk5 J3 y cdk5 C8 (St. Cruz); p35 C19 (St. Cruz); AT8 (Immogenetics), PHF1 (donado por el Dr. Peter Davis); Tau1 y Tau5 (gentilmente donado por el Dr. Lester Binder). Los extractos hipocampales fueron preparados según los siguientes pasos: Las células fueron lavadas en PBS1X frío. Posteriormente raspadas y homogenizadas en presencia de buffer RIPA [50mM Tris(pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 0.5% deoxycolato de sodio, 0.1% SDS, más inhibidores de proteasas: leupeptina (2 μ M), pepstatina (1 μ g/ml), aprotinina (2 μ g/ml) y PMSF (100 μ g/ml)]. Las muestras fueron cuantificadas usando la técnica de Bradford para medir proteínas, usando albumina

de bovino como estándar. Luego el homogenizado fue disuelto en buffer Laemmli SDS, denaturado por calor, reducido por la adición de 5% de β -mercaptoetanol. Las muestras fueron corridas en minigeles SDS-PAGE al 10%. Las proteínas luego de ser separadas por electroforesis fueron transferidas por electroblot hacia una membrana de nitrocelulosa por 1h a 100V. La carga de proteína para todos los carriles fue determinada por marcaje reversible con Ponceau-S. Después de bloquear los sitios de unión no específicos en la membrana por incubación con PBS-5% leche, la expresión de proteínas fue determinada por inmunoblot usando los anticuerpos cdk5, p35, AT8, PHF1, Tau1 y Tau5 mediante el sistema de detección por ECL (Amersham). La cuantificación de los blots fue llevada a cabo mediante la densitometría de las membranas de nitrocelulosa utilizando el software Kodak digital Science Densitometry Program (Kodak). Como estándar de peso molecular se uso estándar Bio-Rad.

2.5. Inmunoprecipitación y medición de la actividad quinasa de cdk5.

El procedimiento se realizó de acuerdo a lo publicado por Alvarez y cols. (Alvarez y cols., 2001). Cultivos de neuronas hipocampales fueron sembrados a una densidad de 1×10^6 células/cm² en placas de 60 mm tratadas con polilysina. Luego de exponer los cultivos a los tratamientos, las células fueron lisadas en tampón RIPA más inhibidores de proteasas y fosfatasas. 200 μ g de proteína total, medida por Bradford, se inmunoprecipitó con un anticuerpo monoclonal anti-cdk5 J-3 (Santa Cruz Biotechnology) usado a una dilución 1:50. Luego, el complejo antígeno-anticuerpo fue capturado usando proteína A (Sigma) acoplado a agarosa. Para los ensayos de actividad *in vitro*, los inmunoprecipitados se lavaron 3 veces con buffer

RIPA y una vez con buffer quinasa (50 mM Hepes, 10Mm MgCl₂, 5Mm MnCl₂, 1Mm DTT) más 1μM de ATP frío. Las esferas de agarosa se incubaron con tampón quinasa más 2,5 μg de histona H1 como sustrato a fosforilar y 5 μCi [γ -³²P] ATP en un volumen final de 50 μL durante 30 min a 30°C. Luego de la incubación las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE y auto radiografía. La cuantificación fue llevada a cabo mediante Molecular Imager FX (Bio-Rad).

2.6. Extracción RNA, ensayo RT-PCR y PCR.

Cultivos de hipocampos tratados con TNF- α , TNF- α más A β y A β 1-42, se usaron para extraer RNA total mediante el uso de TRIZOL (Gibco BRL) según las especificaciones del fabricante. La cantidad de RNA total fue cuantificada mediante cuantificación por espectrometría a 260nm. Para los experimentos de RT-PCR, 3 μg de RNA total fueron amplificados en presencia de 100ng de random primers a un volumen final de 12μl. Luego las muestras fueron incubadas por 10 min a 70°C y luego se agregó 4μl de buffer de transcripción 5X, 2μl de DTT 0.1mM, 1 μl de dNTP 10mM y 200 U de la enzima Superscript II (Gibco BRL). La mezcla fue incubada a 42°C por 50 min a un volumen final de 20μl. Para el ensayo de PCR, cDNA fueron amplificados con partidores específicos para cdk5 y actina. Productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 2% teñidos con Br-Et. Los partidores usados fueron:

| | | |
|--|------------------|----------|
| cdk5 forward: 5'GCATTGAGTTTGGGCACGACA3', | reverse: | |
| 5'AAAACCGGGAAACCCATGAGA3'; | β -actina, | forward: |
| 5'TCTACAATGAGCTGCGTGTG3', | reverse: | 5' |
| TACATGGCTGGGGTGTGAA3'. | | |

2.7. Ensayo de Agregación Neuronal.

Neuronas corticales de embriones de ratas Sprague-Dawley de 18 días de preñez (E-18), fueron disociadas y lavadas con PBS estéril a 37°C. Luego, 1×10^7 células fueron resuspendida en 2 mL de medio MEM y sembradas en placas de 60mm conteniendo medio de cultivo con EGTA (1mM), TNF- α (5ng/mL), CaCl₂ (1mM). Las placas fueron puestas en agitación a 37°C por 30 min. Luego los agregados fueron transferidos a cubreobjetos previamente tratados con polilisina. Pasado 30 min los agregados fueron fijados 10 min en paraformaldehido (4%). Luego se lavo 1 vez con PBS a 37°C, se permeabilizaron con Triton X-100 (0.1%) por 5 min. Luego se lavó con PBS y se agregó Azul de Tripan 0.1%. Se midió la superficie de 10-20 agregados por cada condición.

2.8. Análisis estadísticos.

Los análisis estadísticos fueron realizados usando el software Sigma STAT Plot (Jandel). Diferencias significativas se consideraron cuando el discriminante p fue menor o igual a 0.05 ($p \leq 0.05$) usando el test t de Student de dos colas.

RESULTADOS

1. TNF- α no afecta la viabilidad celular de las neuronas hipocampales.

Para determinar si los tratamientos de células del hipocampo con TNF- α (5ng/ml) y con A β 1-42 (10 μ M) tienen un efecto directo en la viabilidad de las neuronas hipocampales, cultivos primarios fueron preparados de fetos de ratas en E18 y sujetas a una administración directa de estos tratamientos. Luego, se cuantificó la viabilidad celular por medio del ensayo de reducción de MTT y por el uso del kit MitoCaptureTM. Midiendo viabilidad celular y usando el kit MitoCaptureTM (n=3), no se observaron diferencias evidentes en la viabilidad de las neuronas, entre aquellas células tratadas con la citoquina y células control sin tratamiento(Fig.2).

Cultivos de neuronas de hipocampo tratadas con diferentes estímulos.

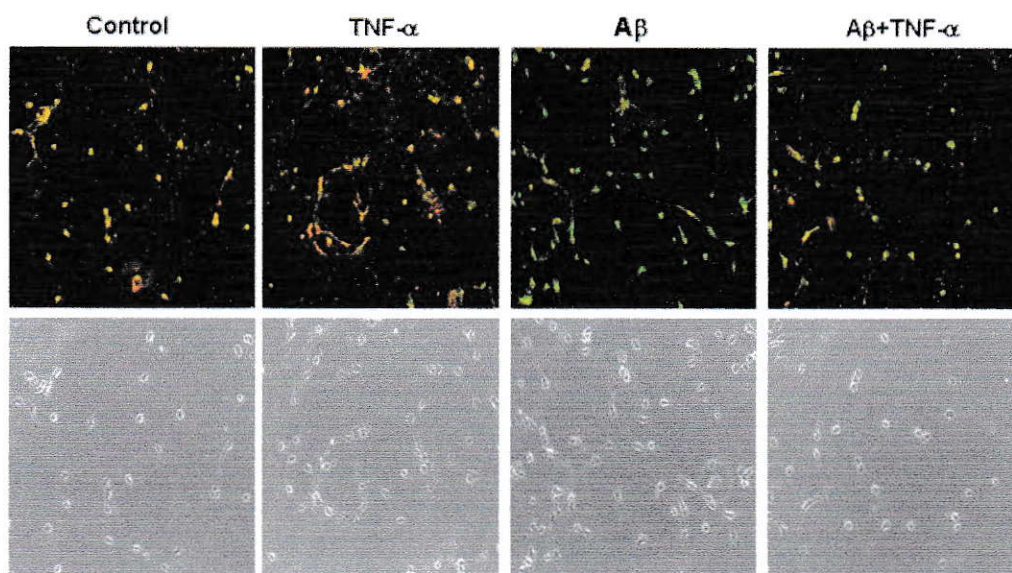


Figura 2. Neuronas hipocampales fueron tratadas por 48h con TNF- α (5ng/ml) y por 24h con el péptido A β 1-42 (10 μ M). La viabilidad celular fue medida por fluorescencia con el kit MitoCapture (n=3). Células vivas emiten fluorescencia roja, células apoptóticas emiten fluorescencia verde. No se observan diferencias entre neuronas controles y aquellas tratadas con TNF- α . Una disminución en la fluorescencia roja puede ser observada en aquellas células expuestas al péptido A β . La muerte neuronal inducida por el péptido A β fue prevenida en aquellos cultivos pretratados con la citoquina.

Es conocido que TNF- α protege células hipocampales contra la toxicidad inducida por el péptido A β (Barger y cols., 1995). Para confirmar esta propiedad, cultivos de neuronas fueron pretratados con TNF- α (5ng/ml por 48h) y posteriormente se les trató con el péptido A β 1-42 (10 μ M por 24h). Neuronas tratadas solamente con el péptido A β 1-42 mostraron una disminución en la viabilidad celular. Así, se observó un aumento en la fluorescencia de color verde, y una reducción en la fluorescencia roja, al comparar con respecto al control y aquellos cultivos tratados con TNF- α (Fig.2). En la cuantificación de la fluorescencia tampoco se observaron diferencias significativas entre el control y los cultivos tratados con TNF- α (control: $1,633\pm 0,044$; TNF- α : $1,719\pm 0,18$) (Fig.3).

Cuantificación de la fluorescencia obtenida por el kit MitoCapture™

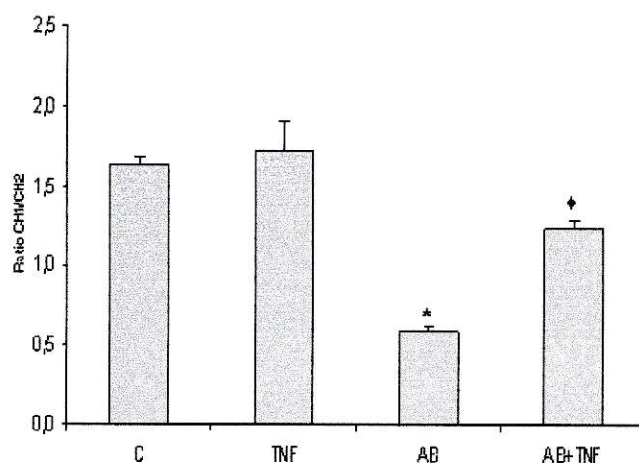


Figura 3. Cuantificación de la fluorescencia en neuronas hipocampales. La fluorescencia fue cuantificada usando el microscopio confocal Zeiss LSM 510 META y se expreso como la razón entre fluorescencia roja sobre la verde. Una notable disminución en la razón se observo en aquellos cultivos tratados con A β 1-42(10 μ M por 24h). Sin embargo, el tratamiento con TNF- α (5ng/ml por 48h) es capaz de revertir esa disminución. El asterisco (*) indica diferencia significativa entre TNF y A β , $p<0.001$. El asterisco (♦) indica diferencia significativa entre A β y A β +TNF, $p<0.001$.

La cuantificación mostró diferencias significativas entre los cultivos tratados con TNF- α y aquellos tratados con el péptido A β (TNF- α : $1,719\pm 0,18$; A β :

0,588±0,03; $p < 0.001$) (Fig.3). Al comparar los cultivos usados como control, los tratados con TNF- α , y aquellos tratados con TNF- α en presencia de A β , no se observaron variaciones estadísticamente significativas en la razón de la fluorescencia (Fig.3). Sin embargo, al comparar aquellas neuronas tratadas con el péptido A β y aquellas tratadas con TNF- α en presencia de A β , se observa una diferencia significativa en los niveles de fluorescencia. Hay un aumento en la razón de fluorescencia en aquellas tratadas con TNF- α más A β (Fig.2). La cuantificación mostró diferencias significativas entre ambos tratamientos (A β : 0,588±0,03; TNF- α + A β : 1,229±0,06; $p < 0.001$) (Fig.3).

La viabilidad celular también fue medida usando el ensayo de reducción de MTT, y fue representada mediante porcentaje de células vivas ($n=5$). El tratamiento de neuronas con TNF- α por 48h no afectó la viabilidad celular de neuronas hipocampales (Fig. 4). Solo un 10% de neuronas mueren cuando estas fueron cultivadas en presencia de TNF- α (5ng/ml por 48h). La adición de A β 1-42 (10 μ M por 24h) afectó la viabilidad neuronal, como se demuestra por un significativo incremento en la muerte celular a un 40% después de que las neuronas son expuestas al péptido por 24h (Fig.4). Finalmente, pretratamientos de neuronas hipocampales con TNF- α antes del tratamiento con A β reafirma el efecto neuroprotector de TNF- α frente a la toxicidad inducida por A β . Estas células pretratadas con la citoquina antes de ser sometidas al péptido, solo presentan un 10% de muerte celular, medida por MTT (Fig.4).

Efecto de TNF- α en la viabilidad neuronal.

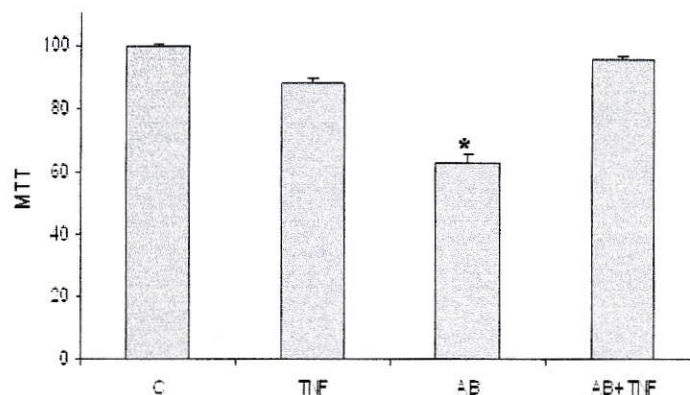


Figura 4. La viabilidad celular fue evaluada usando el ensayo de reducción de MTT (n=5). Células sin tratamiento (Control), células tratadas con 5ng/ml de TNF- α (TNF), células tratadas con 10 μ M del péptido A β 1-42 (A β), células tratadas con A β en presencia de TNF- α (A β +TNF- α). El TNF- α previene la muerte neuronal inducida por el péptido A β . El asterisco (*) denota diferencia significativa p<0.05, entre las células tratadas con A β y aquellas tratadas con A β +TNF.

Con el fin de determinar si al aumentar las concentraciones de TNF- α y A β se presentaba algún efecto sobre la viabilidad neuronal, se realizó una curva de concentraciones para TNF- α en presencia de una concentración constante de 10 μ M del péptido A β 1-42 (n=3). Lo mismo se hizo para el péptido A β 1-42, pero manteniendo constante la concentración de la citoquina a 5ng/ml (n=4). Se usaron distintas concentraciones de TNF- α , las cuales variaron entre 5 a 100ng/ml. A medida que se aumentó la concentración de la citoquina no se observaron efectos sobre la viabilidad de las neuronas hipocámpales, la cual fue medida por el ensayo de reducción de MTT (Fig.5). Durante todo el rango de concentraciones de citoquina usadas (5-100ng/ml), el TNF- α siguió manteniendo su efecto protector frente a la neurotoxicidad inducida por 10 μ M del péptido A β 1-42. Las neuronas tratadas en ausencia de A β se comportaron de forma semejante a aquellas neuronas tratadas con 10 μ M de A β pero en presencia de TNF- α (Fig.5).

TNF- α no afecta la viabilidad de neuronas hipocampales al aumentar su concentración.

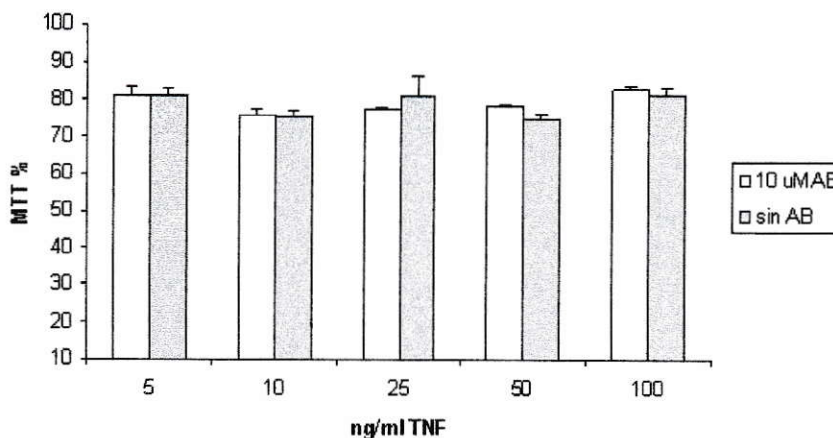


Figura 5. TNF- α no afecta la viabilidad de neuronas hipocampales. La viabilidad fue medida mediante el ensayo de reducción de MTT (n=3). Al aumentar la concentración de la citoquina no se observaron efectos sobre la viabilidad neuronal y la citoquina siguió manteniendo su efecto protector sobre la muerte inducida por el péptido A β .

Para la curva de concentraciones realizada para el péptido A β , se varió la concentración entre 10 a 25 μ M del péptido. A medida que se aumentó la concentración del péptido la viabilidad neuronal fue disminuyendo desde 78% hasta un 70% de viabilidad con respecto al control (Fig.6). Los cultivos que fueron tratados en presencia de TNF- α mostraron una muerte menor comparada a aquellos cultivos tratados solamente en presencia del péptido (Fig.6). La concentración de TNF- α usada en los experimentos siguió mostrando un efecto neuroprotector frente a las mayores concentraciones del péptido A β .

TNF- α protege de la neurotoxicidad inducida por el péptido A β 1-42.

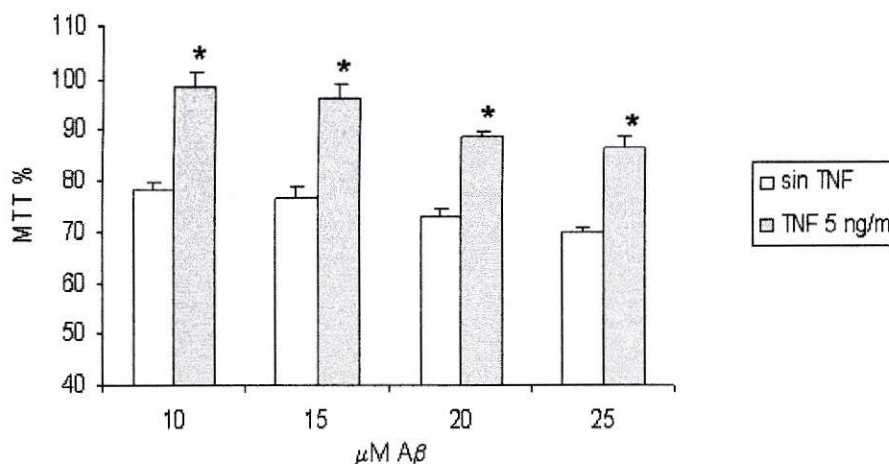


Figura 6. El efecto neuroprotector de TNF- α se mantiene al aumentar las concentraciones de A β . Concentraciones crecientes del péptido A β 1-42 aumentaron la muerte neuronal medida mediante el ensayo de reducción de MTT (n=3). Sin embargo, el TNF- α (5ng/ml) fue capaz de proteger de la muerte neuronal inducida por las distintas concentraciones del péptido A β . El asterisco (*) denota diferencia significativa $p < 0.05$, entre las células tratadas sin TNF- α y aquellas tratadas en presencia de TNF- α .

2. Efectos de TNF- α sobre cdk5

Es conocido que un incremento en la actividad de cdk5 es un factor importante en la muerte neuronal en procesos neurodegenerativos. (Alvarez y cols., 1999; Patrick y cols., 1999; Nguyen y cols., 2003; Bu y cols., 2002; Gong y cols., 2003; Wang y cols., 2003; Quintanilla y cols., 2004; Zheng y cols., 2005). Isquemia, daño por estrés oxidativo, A β u otro insulto neurotóxico son factores claves en incrementar la actividad de cdk5 (Lee y cols., 2000; Maccioni y cols., 2001; Town y cols., 2002; Liu y cols., 2004; Cruz y cols., 2004). Así, como A β es capaz de promover un incremento en la actividad de cdk5, se decidió estudiar si TNF- α es capaz de modificar este incremento de la actividad de cdk5. Células de hipocampo (4DIV) fueron pretratadas con TNF- α (5ng/ml por 48h) y luego tratadas con A β 1-42

(10 μ M por 24h). Los niveles de la proteína cdk5 y su actividad fueron determinados por Western blot y ensayos de actividad respectivamente. Análisis densitométricos de Western blots (n=5) de neuronas hipocampales expuestas a TNF- α mostraron una disminución en los niveles de cdk5 con respecto al control y al tratamiento con A β (control: 106,72 \pm 6,63; TNF- α : 69,13 \pm 12,22; p<0.05) (Fig.7). El tratamiento con A β 1-42 no produjo cambios significativos en los niveles de la proteína con respecto al control. Sin embargo, el pre-tratamiento de las neuronas hipocampales con TNF- α antes del tratamiento con A β también logró disminuir los niveles de la proteína al comparar con respecto al control y A β (A β : 115,48 \pm 17,54; TNF- α + A β : 73,77 \pm 16,09; p<0.05) (Fig.7). Diferencias significativas se observaron entre las células tratadas sin TNF- α y aquellas células tratadas con TNF- α .

TNF- α disminuye los niveles de la proteína cdk5.

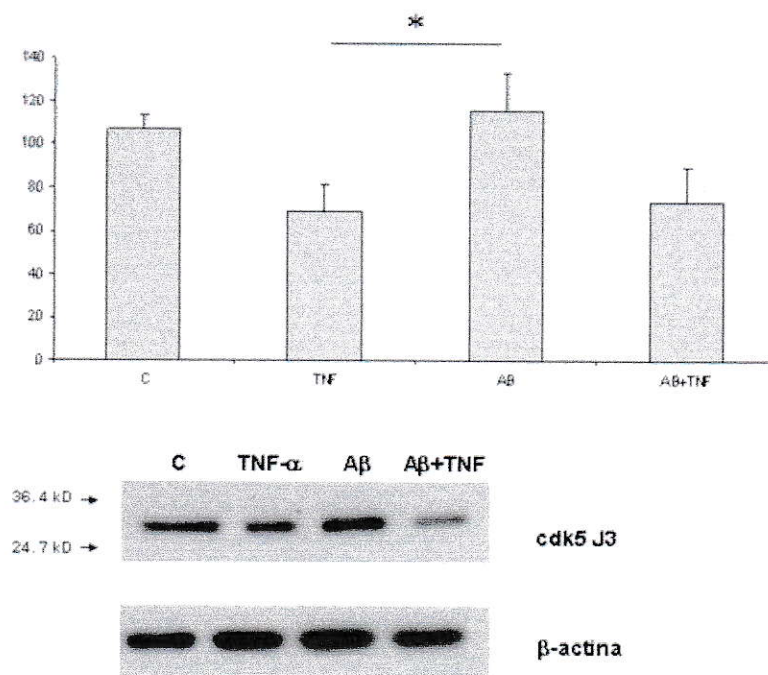


Figura 7. Western blot de neuronas hipocampales analizados con el anticuerpo monoclonal anti cdk5 (J3). El gráfico muestra un análisis densitométrico de 5 experimentos diferentes. El tratamiento con la citoquina disminuye los niveles de la proteína cdk5, analizados por Wb. El asterisco (*) denota diferencia significativa p<0.05.

Debido a que se encontró una disminución en los niveles de la proteína se evaluó cual sería el efecto de TNF- α sobre la transcripción de cdk5. Para esto se realizaron cultivos de hipocampo de neuronas de rata los cuales fueron pre-tratados con la citoquina y luego tratados con A β . Posteriormente, se extrajo el RNA total y a través de análisis de RT-PCR y ensayos de PCR se midieron los niveles de cdk5. El pre-tratamiento con TNF- α logró levemente disminuir los niveles de cdk5 (Fig 8), pero no existe una diferencia significativa en esta disminución (n=4). Como control se midieron los niveles de actina los cuales no variaron en los tratamientos con respecto al control.

TNF- α no induce cambios en los niveles del mRNA de cdk5.

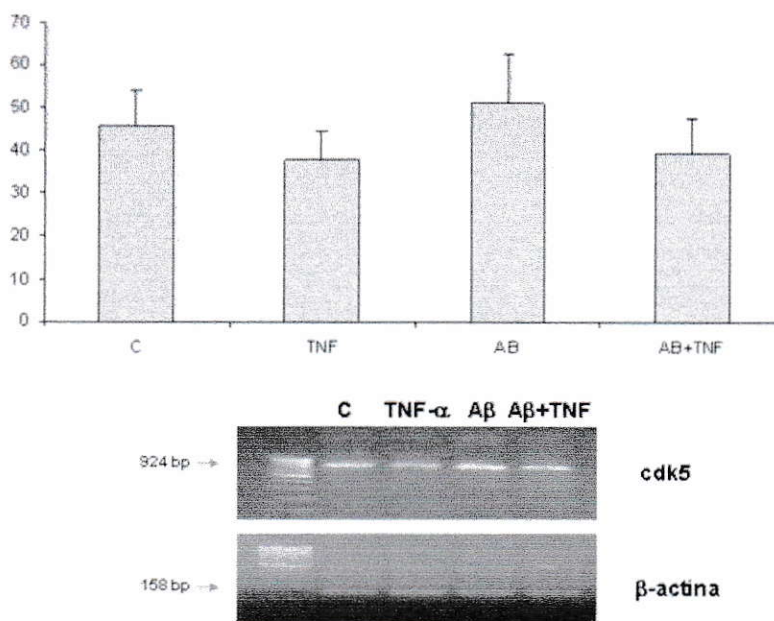


Figura 8. Análisis de PCR para cdk5. Muestra los niveles de cdk5 levemente disminuidos en neuronas hipocampales tratados con TNF- α (5ng/mL), pero esta disminución no es estadísticamente significativa. Como estandar se uso 100bp leader.

Estudios previos han demostrado que diferentes estímulos neurotóxicos, tales como A β 1-40, H₂O₂ ó IL-6 son capaces de modificar la actividad de cdk5 (Alvarez y cols., 1999; Gong y cols., 2003; Zambrano y cols., 2004; Quintanilla y cols., 2004). El paso siguiente fue determinar si el tratamiento con TNF- α es capaz de modificar la actividad de la proteína cdk5. Para esto se realizó un ensayo quinasa *in-vitro*. Cultivos hipocampales (4DIV) fueron tratados con TNF- α (5ng/ml), A β 1-42(10 μ M) ó ambos. Para realizar el ensayo quinasa, la proteína quinasa cdk5 fue inmunoprecipitada utilizando el anticuerpo monoclonal J3. Como sustrato a fosforilar con ATP- γ ³² se uso histona H1. Los ensayos de actividad (n=4) mostraron que el tratamiento de neuronas hipocampales con TNF- α disminuye la actividad de cdk5 con respecto al control (control: 121,06 \pm 12,46; TNF- α : 97,93 \pm 2,88; p<0.05) (Fig.9). También existen diferencias significativas entre el tratamiento de TNF- α y A β (** p<0.05, Fig.9). Además, el pre-tratamiento de neuronas hipocampales con la citoquina es capaz de revertir el aumento observado en la actividad de la quinasa cdk5 inducida por tratamientos con el péptido A β 1-42 (A β : 150,63 \pm 10,18; TNF- α + A β : 112,55 \pm 9,73; * p<0.05) (Fig.9). Análisis densitométricos de los ensayos quinasa (n=4) mostraron diferencias significativas en aquellas neuronas tratadas con la citoquina. Como control se midieron los niveles de cdk5 utilizando el anticuerpo anti cdk5 C8.

TNF- α disminuye la actividad quinasa de cdk5 inducida por A β

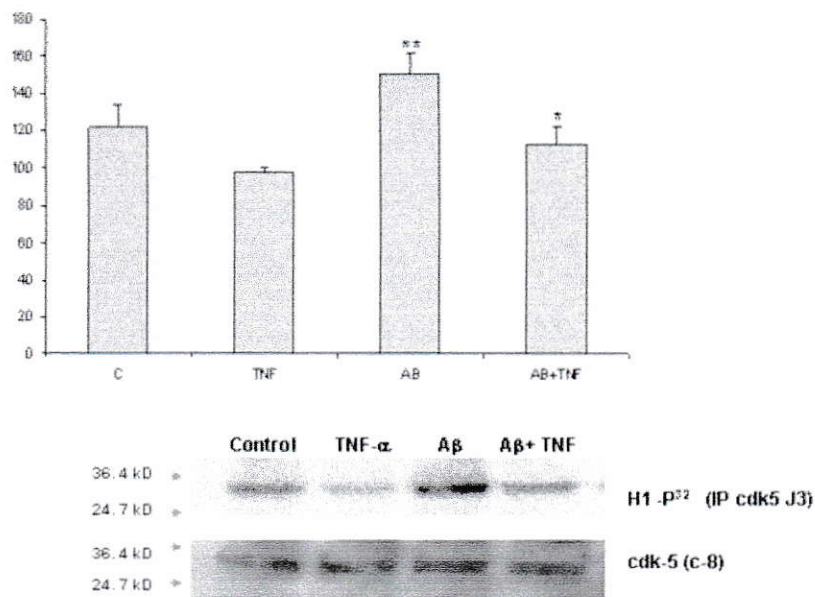


Figura 9. La actividad de cdk5 es disminuida en aquellas neuronas tratadas con TNF- α . Ensayo de actividad quinasa en neuronas de hipocampo expuestas a TNF- α (5ng/ml) versus células controles y células tratadas con A β 1-42(10 μ M). El ensayo quinasa fue llevado a cabo en presencia de ATP- γ ³² usando histona H1 como sustrato. Los niveles de enzima precipitada fueron equivalentes en todos los carriles. Análisis densitométrico de 4 ensayos, indican la disminución en la actividad de cdk5. El asterisco (*) denota diferencias significativas $p < 0.05$ entre A β y A β +TNF. El doble asterisco (**) denota diferencia significativa $p < 0.05$, entre TNF y A β .

3. TNF- α no modifica los niveles del activador p35

Debido a que la actividad quinasa de cdk5 puede también depender de sus activadores, se midieron los niveles de uno de los activadores de esta proteína, p35. Cultivos de hipocampo (4DIV) fueron tratados con TNF- α (5ng/ml), A β 1-42(10 μ M) ó ambos. Los niveles de la proteína p35 fueron medidos por Western blot en extractos proteicos obtenidos de los cultivos hipocampales. Los análisis mostraron que los niveles del activador p35 no varían significativamente en ninguno de los tratamientos realizados en los cultivos hipocampales (Fig.10).

TNF- α no altera los niveles de p35

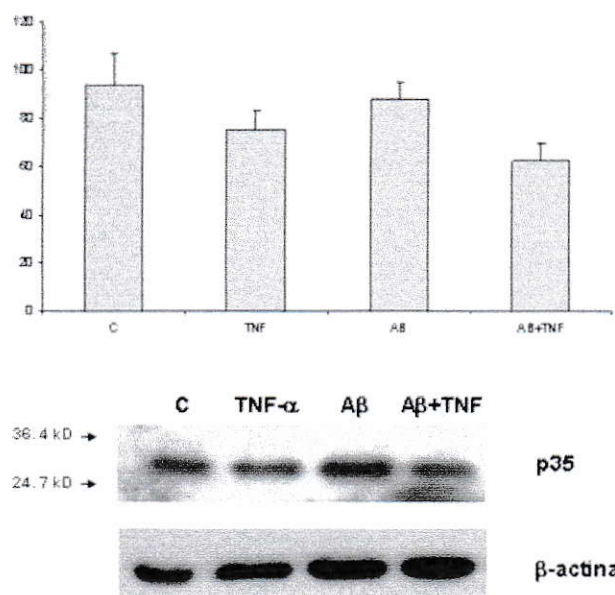


Figura 10. Western blot de neuronas hipocámpales analizados con el anticuerpo monoclonal anti p35 C-19. El gráfico muestra un análisis densitométrico de 4 experimentos diferentes. El tratamiento con la citoquina no induce diferencias significativas en los niveles del activador de la proteína cdk5.

4. TNF- α previene la hiperfosforilación de tau inducida por A β .

Una de las características patológicas de la EA es la acumulación intracelular anormal de formas fosforiladas de la proteína asociada a microtubulos tau. Estudios previos han demostrado que el péptido A β induce un desbalance en la cantidad de tau fosforilada debido a una desregulación del complejo cdk5-p35 (Alvarez y cols., 2001; Liu y cols., 2004; Han y cols., 2005). Por lo tanto, como se menciono previamente, ya que el pre-tratamiento induce una disminución en la actividad de cdk5 inducida por A β , se evaluó el posible papel de TNF- α sobre la hiperfosforilación de la proteína tau inducida por A β . Así, cultivos celulares (4DIV) fueron pretratados con TNF- α (5ng/ml por 48h) y luego tratados con A β 1-42 (10 μ M por 24h). Luego, se analizó la cantidad relativa de formas fosforiladas de la proteína

tau reconocida por los anticuerpos AT8 y PHF1 (n=3). El anticuerpo AT8 reconoce epitopos fosforilados de tau en Ser²⁰² y Thr²⁰⁵. El anticuerpo PHF1 reconoce los epitopos fosforilados de la proteína tau en Ser³⁹⁶ y Thr⁴⁰⁴.

El tratamiento con TNF- α indujo una disminución en los niveles de proteína tau fosforilada reconocida por el anticuerpo AT8 al compararlo con respecto al control (control: 38,19 \pm 4,4; TNF- α : 29,32 \pm 1,9; * p \leq 0.05) (Fig.11). El tratamiento con el péptido A β produce un gran incremento en los niveles de tau hiperfosforilada medidos con el anticuerpo AT8 (control: 38,19 \pm 4,4; A β : 59,2 \pm 9,8; p<0.05) (Fig.11). Este incremento es disminuido cuando las neuronas fueron pretratadas con TNF- α antes del tratamiento con A β (A β : 59,2 \pm 9,8; TNF- α + A β : 23,64 \pm 10; • p<0.05).

TNF- α disminuye los niveles de tau hiperfosforilada reconocida con AT8

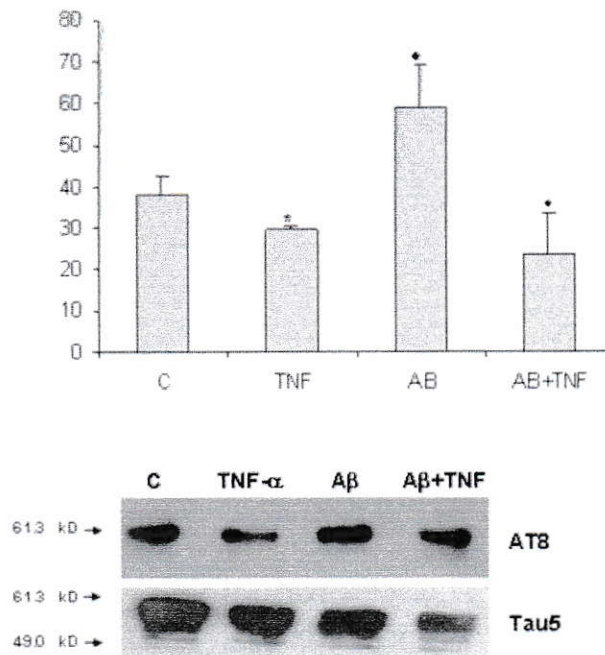


Figura 11. Western blot de neuronas hipocampales analizados con el anticuerpo monoclonal AT8. El gráfico muestra un análisis densitométrico de 3 experimentos diferentes. El tratamiento con la citoquina disminuye los niveles de la proteína tau fosforilada en epitopos tipo Alzheimer, analizados por Wb. El asterisco (*) denota diferencia significativa entre C y TNF p<0.05. El asterisco (♦) denota diferencia significativa entre TNF y A β . El círculo (•) denota diferencia significativa entre A β y A β +TNF.

Luego se midieron los niveles de tau fosforilada utilizando otro anticuerpo PHF1, el cual reconoce epitopos fosforilados de la proteína tau dependientes de cdk5 y otra importante quinasa, la GSK-3 β (Hernandez y cols., 2003). Al comparar con respecto a los niveles de tau control, TNF- α indujo una disminución en la cantidad de proteína tau fosforilada reconocida por el anticuerpo PHF1 (control: $67,2 \pm 10,95$; TNF- α : $43,62 \pm 7,3$; $p \leq 0.05$) (Fig.12). El tratamiento de neuronas hipocampales con el péptido A β no produjo cambios en los niveles de tau hiperfosforilada reconocidos por el anticuerpo PHF1 al comparar con respecto al control (Fig.12). Por el contrario, pretratamientos de neuronas de hipocampo con la citoquina antes de tratar las neuronas con A β 1-42 produjeron una disminución en los niveles de la tau fosforilada (A β : $78,52 \pm 8,82$; TNF- α + A β : $52,97 \pm 5,94$; $p < 0.05$) (Fig.12).

TNF- α disminuye los niveles de tau hiperfosforilada reconocida con PHF1

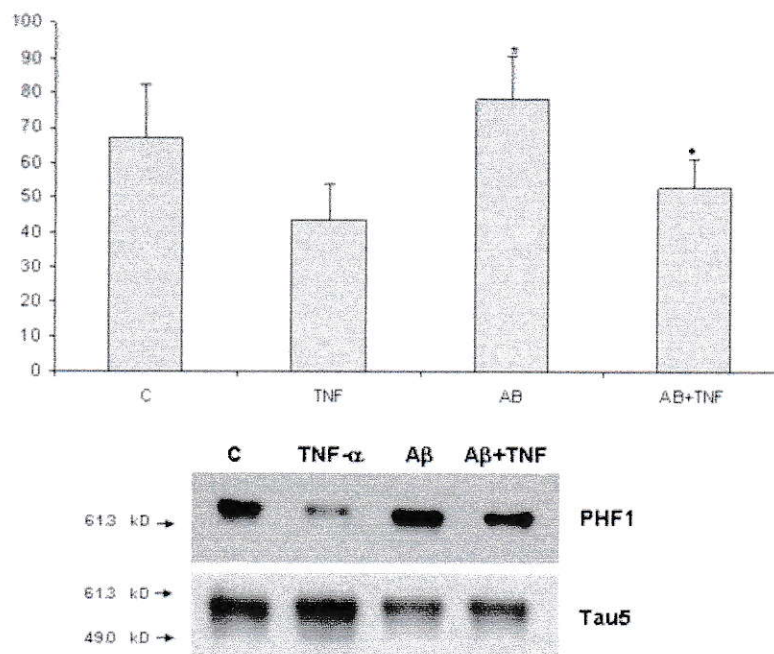


Figura 12. Western blot de neuronas hipocampales analizados con el anticuerpo monoclonal PHF1. El gráfico muestra un análisis densitométrico de 3 experimentos diferentes. El tratamiento con la citoquina disminuye los niveles de la proteína tau fosforilada en epitopos tipo Alzheimer, analizados por Wb. El asterisco (*) denota diferencia significativa ($p < 0.05$) entre TNF y A β . El círculo denota diferencia significativa ($p < 0.05$) entre A β y A β +TNF.

Por otra parte se midieron los niveles de la proteína tau desfosforilada utilizando el anticuerpo Tau1. Tau1 reconoce los mismos epitopos que reconoce el anticuerpo AT8, Ser²⁰² y Thr²⁰⁵, pero en estado desfosforilado. Los análisis mediante Western blots demostraron que los niveles de tau desfosforilada aumentan en aquellas neuronas que fueron tratadas con TNF- α , al compararla con los respectivos controles sin tratamientos (control: 44,73 \pm 1,49; TNF- α : 52,49 \pm 2,65; p<0.05) (Fig. 13). Neuronas tratadas con el péptido A β 1-42 mostraron una disminución en los niveles relativos de tau desfosforilada, utilizando el anticuerpo Tau1. En cambio, aquellas neuronas que fueron tratadas con TNF- α y luego expuestas al péptido A β mostraron un aumento en los niveles de tau desfosforilada, al compararla con aquellas neuronas tratadas solamente con el péptido (A β : 43,95 \pm 1,43; TNF- α + A β : 50,24 \pm 2,68; p<0.05) (Fig. 13).

Como control se midieron los niveles totales de la proteína tau utilizando el anticuerpo Tau5 que reconoce todas las formas de la proteína, independiente del estado de fosforilación que presente la proteína (Fig.13).

TNF- α incrementa los niveles de tau desfosforilada reconocida por Tau1

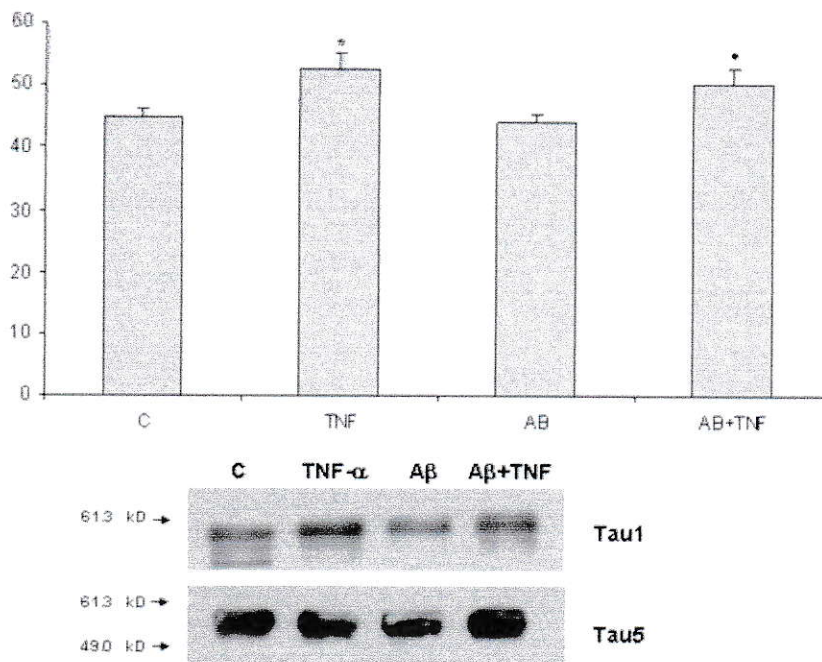


Figura 13. Western blot de neuronas hipocámpicas analizadas con el anticuerpo monoclonal Tau1 y Tau5. El gráfico muestra un análisis densitométrico de 3 experimentos diferentes. El tratamiento con la citoquina incrementa los niveles de la proteína tau desfosforilada en epitopes tipo Alzheimer, analizadas por Wb. Mientras que los niveles de Tau total medidos por el anticuerpo Tau5 se mantuvieron sin cambio. El asterisco (*) denota diferencia significativa $p < 0.05$.

5. TNF induce la agregación de neuronas corticales

Es conocido que cdk5/p35 participa en fenómenos de migración neuronal (Oshima y cols., 1996; Chae y cols., 1997). La migración neuronal depende de la presencia de una familia de moléculas de adhesión, las caderinas (Takeichi, 1990). La pérdida de la adhesión mediada por caderinas ha sido implicada en promover la migración en muchos sistemas (Takeichi, 1990; Kwon et al. 2000). En neuronas se encuentra presente la N-caderina. Se sabe que cdk5/p35 se encuentran formando un complejo con la molécula N-caderina, y que la pérdida de la actividad de cdk5 produce un incremento en la adhesión mediada por caderinas (Kwon et al. 2000). Basado en estos estudios, quisimos ver cual sería el efecto de TNF- α en la adhesión

mediada por cdk5. Para esto se extrajeron neuronas corticales de ratas en E18 las cuales fueron sometidas a un ensayo de agregación. Estas células fueron disgregadas, resuspendidas en PBS y tratadas con TNF- α (5ng/mL), EGTA (1mM), CaCl₂ (1mM) por 30min. El tratamiento de neuronas corticales con TNF- α indujo un notable incremento en el área de los agregados de neuronas corticales, al compararlos con respecto al control (control: 61,53 \pm 9,16; TNF- α : 544,57 \pm 66,28; p<0.01) (Fig. 14). Los agregados no se formaron en presencia de EGTA (1mM). En cambio en presencia de CaCl₂ hubo formación de agregados de neuronas corticales. Los agregados fueron mayores en presencia de CaCl₂ y TNF- α .

TNF- α incrementa la agregación de neuronas corticales.

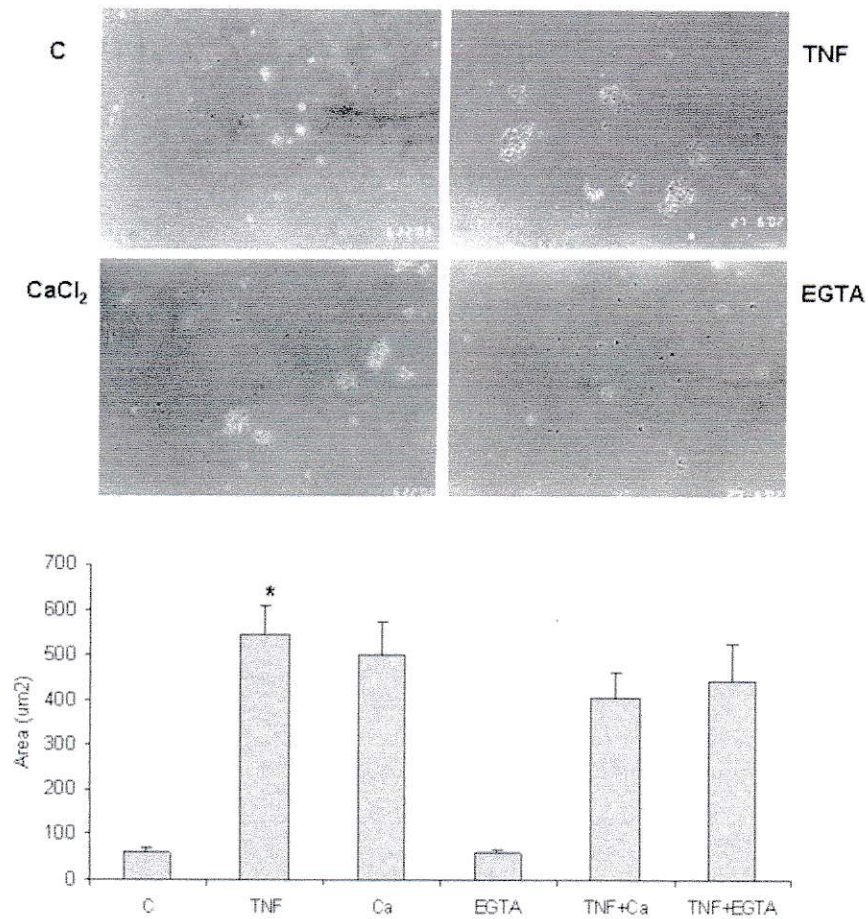


Figura 14. Agregación de neuronas corticales de rata. Neuronas corticales disociadas y sometidas a un ensayo de agregación en presencia de TNF- α (5ng/mL), CaCl₂ (1mM) y EGTA (1mM). Los agregados se formaron en presencia de TNF- α y CaCl₂. Las fotos fueron tomadas en microscopio por contraste de fase. El asterisco (*) denota diferencia significativa $p < 0.01$.

DISCUSION

Histopatológicamente, la EA se caracteriza por la formación de estructuras anómalas formadas por agregados intracelulares proteicos de tau, conocidos como filamentos pareados helicoidales (PHFs), y agregados extracelulares del péptido beta amiloide ó A β (Hardy y Selkoe, 2002). Se sabe además que en la EA estas agregaciones anómalas ejercen un efecto neurotóxico sobre las neuronas, e inducen la producción de citoquinas pro-inflamatorias por parte de la microglia y astrocitos tales como IL-1 α , IL-1 β , IL-6 y TNF- α (Li y cols., 2000; Li y cols., 2003, Quintanilla y cols., 2004; Viviani y cols., 2004). Además producen un aumento en los niveles de Ca²⁺ intracelular en las neuronas y estrés oxidativo. Por otra parte diversos estudios han mostrado que el TNF- α protege de la muerte neuronal debida a diferentes insultos neurotóxicos (Cheng y cols., 1994; Barger y cols, 1995; Bruce, 1996; Mattson, 1997; Kaltschmidt y cols., 1999). Por lo tanto en esta tesis se analizó el posible efecto neuroprotector que el TNF- α estaría ejerciendo en regular la actividad de cdk5.

Para esto se realizaron cultivos primarios de neuronas hipocampales los cuales fueron pretratados con TNF- α (5ng/ml) antes de estimularlos con el péptido A β 1-42(10 μ M). Como controles se usaron neuronas sin tratamiento, y cultivos de neuronas tratados solamente con TNF- α ó con el péptido A β 1-42. La sobrevivencia de las neuronas tratadas con la citoquina no fue afectada, a la concentración usada, 5ng/ml. Este efecto se ha demostrado por experimentos en los cuales se determinó la viabilidad neuronal mediante el uso del “*kit*” para medir apoptosis MitoCapture y el

ensayo de reducción de MTT. Este resultado permitió llevar a cabo los experimentos bajo condiciones que garantizaban una alta viabilidad neuronal. A medida que se aumentó la concentración de la citoquina no se observaron aumentos en la muerte neuronal. Estos resultados concuerdan con estudios previos en los que se usaron concentraciones de TNF- α mayores a 5ng/ml (Barger y cols., 1995).

Tratamientos con el péptido A β 1-42 produjeron muerte neuronal en los cultivos hipocampales. El pre-tratamiento con TNF- α logró revertir la muerte neuronal inducida por el péptido A β . Este resultado concuerda con estudios previos (Barger y cols., 1995), en los cuales pretratamientos con la citoquina revertían el efecto neurotóxico inducido por A β 25-35 y por A β 1-40 en cultivos hipocampales. A diferencia de los experimentos realizados por Barger y cols., (Barger y cols., 1995), en los experimentos realizados en esta tesis se utilizó A β 1-42 que es mucho más agregable que el A β 1-40, debido a su alta hidrofobicidad, y mucho más tóxico que las otras formas del péptido A β (Gandy, 2005; Snyder y cols., 2005).

Es conocido que el uso de inhibidores en contra la proteína cdk5 logró revertir el efecto neurotóxico inducido por A β (Alvarez y cols., 1999; Zheng y cols., 2005).

Uno de los efectos más significativos encontrados en esta tesis fue que pretratamientos con TNF- α también fueron capaces de disminuir el incremento en la actividad de cdk5 inducida por el péptido A β 1-42. El tratamiento con A β 1-42 indujo un aumento en la actividad quinasa de cdk5, lo cual concuerda con estudios previos (Alvarez y cols., 1999; Town y cols., 2002; Liu y cols., 2004; Cruz y cols., 2004) en los cuales el péptido A β 1-40 incrementó la actividad de la quinasa. Este resultado

sugiere que TNF- α estaría actuando como un inhibidor de la citotoxicidad, por una disminución en el incremento de la actividad de cdk5.

Es conocido que la pérdida de la actividad de cdk5, usando inhibidores para cdk5, resulta en un incremento en la formación de agregados de neuronas corticales (Kwon y cols., 2000). Basados en estas evidencias, y como una evidencia adicional para probar la actividad de cdk5, se realizó un ensayo de agregación de neuronas corticales de rata en presencia de TNF- α . Los resultados demostraron que los tratamientos con TNF- α provocan un incremento en el área de los agregados neuronales. Por lo tanto estos resultados reforzarían el ensayo de actividad quínica de cdk5, demostrando una reducción en la actividad de cdk5 inducida por TNF- α .

A pesar de que la actividad de cdk5 está determinada por la unión a sus activadores p35 ó p39 (Tsai y cols., 1994; Humbert y cols., 2000), el tratamiento con TNF- α no logró inducir cambios significativos en los niveles del activador p35, al compararlo con respecto al control. Este resultado sugiere que la disminución en la actividad de cdk5 no es debida a cambios en los niveles del activador p35. El TNF- α estaría modulando los niveles de expresión de cdk5, presumiblemente a través de los factores de transcripción NF- κ B ó AP-1. Esto porque el promotor de cdk5 presenta sitios de unión para el factor AP-1 (Ishizuka y cols., 1995). Esto sugiere que TNF- α podría inducir los cambios en los niveles de cdk5 a través de variaciones en el factor de transcripción AP-1. Al disminuir la actividad de cdk5 disminuiría también el efecto de inhibición sobre el factor de transcripción MEF. Este factor participa en mecanismos celulares que controlan la maquinaria molecular de sobrevivencia y apoptosis neuronal (Mao y cols., 1999; Gong y cols., 2003). Por lo tanto, puede que

el efecto de TNF- α sobre cdk5 de alguna manera sea mediado en parte por MEF2, sin embargo más experimentos serían necesarios para dilucidar este efecto.

La activación de la vía NF- κ B es crucial para la protección frente al péptido A β , ya que la inhibición de NF- κ B potencia la muerte neuronal inducida por A β (Klatshmidt y cols., 1999). El pre-tratamiento con TNF- α estaría activando la vía NF- κ B reduciendo la muerte neuronal provocada por A β .

Existen muchos sustratos que pueden ser fosforilados por cdk5. Entre estos sustratos unos de los principales es la proteína tau, la cual se sabe que esta involucrada en la EA. Cdk5 es capaz de fosforilar anómalamente a la proteína tau (Lew y cols., 1994). Esto induce que esta forme agregados intracelulares de proteína hiperfosforilada conocidos como PHFs. Esta hiperfosforilación provocaría una neurodegeneración en las neuronas y posterior muerte celular (Hardy y Selkoe, 2002). Los resultados obtenidos sugieren que el tratamiento con TNF- α disminuye los niveles de fosforilación tipo Alzheimer de la proteína tau. Esto pudo observarse por una disminución en epitopos fosforilados de tau reconocidos por AT8 y PHF1, cuando las neuronas hipocampales fueron tratadas con TNF- α . El pre-tratamiento con TNF- α logro revertir el incremento en la fosforilación de la proteína tau observado con A β . Además, se observó un incremento en los niveles de Tau1, que reconoce epitopos no fosforilados, en aquellas neuronas tratadas con TNF- α .

Es conocido que las citoquinas pro-inflamatorias son capaces de modificar la actividad de cdk5 (Quintanilla y cols., 2004). IL-6 es capaz de modificar los patrones de fosforilación de la proteína tau a través de la desregulación de la actividad del complejo cdk5/p35 modificando los niveles de expresión del activador p35, por un

mecanismo dependiente del activador transcripcional Egr-1 (Quintanilla y cols., 2004; Harada y cols., 2003). Se sabe que citoquinas tales como IL-6 también incrementan los niveles de Ca^{2+} a través de los receptores NMDA (Qiu y cols., 1995; Qiu y cols., 1998, Li y cols., 2000; Orellana y cols., 2005). Es conocido que el incremento en la actividad de cdk5 ejerce un efecto neurotóxico en neuronas. Incrementos en la actividad de cdk5 producen muerte neuronal de neuronas hipocámpales al fosforilar y sobreactivar el receptor NMDA, el cual es permeable al ion Ca^{2+} (Wang y cols., 2003). El incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ producida por el péptido $\text{A}\beta$ 1-42 activa a la proteína calpaina la cual produce la conversión del activador p35 a una forma que aun mantiene su capacidad de activar a cdk5, el fragmento p25 (Lee y cols., 2000).

Cheng y cols.(1994) demostraron que el $\text{TNF-}\alpha$ es capaz de atenuar el incremento en los niveles de Ca^{2+} citosólico en cultivo de neuronas hipocámpales y corticales, inducidos por la privación de glucosa, al provocar un incremento en los niveles de la proteína que une calcio calbindina-D. Similares resultados fueron encontrados cuando neuronas hipocámpales fueron tratadas con el péptido $\text{A}\beta$ 25-35 y $\text{A}\beta$ 1-40, donde $\text{TNF-}\alpha$ protegió a las neuronas de la neurotoxicidad del $\text{A}\beta$ al disminuir el incremento de los niveles de Ca^{2+} citosólico y la generación de especies reactivas del oxígeno en el citoplasma de las neuronas (Barger y cols., 1995).

Ratones “*knock-out*” para el gen $\text{TNF-}\alpha$ se desarrollan normalmente y no presentan anomalías morfológicas, pero presentan una respuesta inflamatoria tardía frente a una infección con *C. parvum* y posteriormente desarrollan una respuesta inflamatoria descontrolada que lleva a muerte celular (Marino y cols., 1997). Ratones “*knock-out*” para ambos receptores de $\text{TNF-}\alpha$ mostraron un aumento

al daño neuronal e indicaron que TNF- α presenta una función neuroprotectora (Bruce y cols., 1996). Por lo tanto TNF- α presentaría una doble función: (1) Pro-inflamatoria en etapas tempranas de la respuesta inflamatoria a una infección y (2) Una función anti-inflamatoria en fases tardías de la respuesta inflamatoria con el fin de limitar la extensión y duración de la inflamación y promover la reparación del tejido dañado (Perry y cols., 2001).

En el sistema nervioso central esta citoquina normalmente participa regulando la actividad sináptica de las neuronas. Controla los niveles de expresión de los receptores AMPA (Beattie y cols., 2002; Stellwagen y cols., 2005) y controla la plasticidad sináptica (Stellwagen y cols., 2006).

Al parecer el tiempo y la concentración de la exposición a TNF- α , la presencia o no de glia en el cultivo, los niveles de expresión de los receptores de TNF α presentes en la neurona y la unión de TNF- α a sus receptores, parecen ser críticos en la dualidad que presenta esta citoquina y en las discrepancias observadas en los diferentes estudios. Los cultivos de hipocampo en esta tesis fueron llevados a cabo en presencia de Ara-C 10 μ M, esto eliminaría el posible efecto neurotóxico de la glia sobre los cultivos, al ser esta activada por A β o el mismo TNF- α . Por otro lado, el TNF- α usado en los experimentos es de origen humano. El TNF- α humano no activa el TNFR2 en roedores (Lewis y cols., 1991). Eso sugiere que el efecto neuroprotector observado por el TNF- α estaría mediado por el TNFR1 (Barger y cols., 1995; Gary y cols., 1998), el cual señalaría activando la vía NF- κ B (Kolesnick y Golde, 1994, Baker y Reddy, 1998; Baud y Karin, 2001; Perry y cols., 2001, MacEwan 2002; Saha y Pahan, 2003; Wajant y cols., 2003; Li y cols., 2004).

Además de estos efectos neuroprotectores reportados para TNF- α , este también ejercería un efecto en neuroprotección a través de cdk5 por un efecto en la disminución en la hiperfosforilación de la proteína tau. Por lo tanto, TNF- α estaría jugando un papel protector en las neuronas a través de 2 mecanismos. Primero, activando la vía NF- κ B, este último activaría genes envueltos en sobrevivencia. Segundo, disminuyendo los niveles de cdk5 y por ende disminuyendo la actividad quinasa de esta proteína en las neuronas, por lo que disminuiría la fosforilación de la proteína tau con la posterior neurodegeneración asociada al incremento de tau hiperfosforilada. Todos estos antecedentes y resultados obtenidos en esta tesis permiten proponer un papel neuroprotector para TNF- α en la enfermedad de Alzheimer, siendo la proteína cdk5 un nuevo blanco de la acción neuroprotectora de esta citoquina frente a la neurotoxicidad mediada por el péptido A β 1-42.

CONCLUSIONES

Sobre la base de los resultados obtenidos en esta tesis es posible concluir que el TNF- α jugaría un papel neuroprotector en la enfermedad de Alzheimer. Se observó que TNF- α regula la actividad de la proteína cdk5. Esto último puede estar relacionado con la protección que esta citoquina estaría jugando en el proceso neurodegenerativo de la enfermedad de Alzheimer, frente a la muerte neuronal inducida por el péptido A β .

Esto se debe a que pretratamientos con TNF- α son capaces de ejercer una protección frente a la neurotoxicidad inducida por el péptido A β 1-42. Esta protección se mantuvo al incrementar la concentración usada de la citoquina. Por lo que el efecto protector podría no solo ocurrir en etapas tempranas de la EA. El pretratamiento con TNF- α logro disminuir los niveles de la proteína cdk5. Este efecto fue acompañado por una disminución en la actividad quinasa de la proteína y un incremento en la adhesión de neuronas corticales. Por último, la disminución de la actividad quinasa se observó por una disminución en los niveles de fosforilación en epítopos tipo Alzheimer de uno de los principales sustratos de cdk5, la proteína tau.

En la literatura existen aún muchas discrepancias con respecto al papel que TNF- α representaría en los procesos neurodegenerativos. A pesar de haber sido descrito por primera vez como un factor que produce muerte celular, actualmente

existe mucha y muy sólida evidencia que también demuestra un efecto protector frente a la neurodegeneración neuronal. Este trabajo aporta las primeras evidencias de que el $\text{TNF}\alpha$ estaría protegiendo contra la neurotoxicidad inducida por $\text{A}\beta$ 1-42 al modificar la actividad quinasa de la proteína cdk5, unas de las principales proteínas envueltas en la EA. Esta tesis provee así de un mayor conocimiento de la bioquímica y aspectos celulares y reguladores acerca del papel de cdk5 en el sistema nervioso central y en la enfermedad de Alzheimer.

REFERENCIAS

Alvarez A, Munoz JP, Maccioni RB (2001) A Cdk5-p35 stable complex is involved in the beta-amyloid-induced deregulation of Cdk5 activity in hippocampal neurons. *Exp Cell Res* 264:266-274.

Alvarez A, Toro R, Caceres A, Maccioni RB (1999) Inhibition of tau phosphorylating protein kinase cdk5 prevents beta-amyloid-induced neuronal death. *FEBS Lett* 459:421-426.

Baker SJ, Reddy EP (1998) Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 17:3261-3270.

Banker GA, Cowan WM (1977) Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res* 126:397-342.

Barger SW, Horster D, Furukawa K, Goodman Y, Krieglstein J, Mattson MP (1995) Tumor necrosis factors alpha and beta protect neurons against amyloid beta-peptide toxicity: evidence for involvement of a kappa B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca²⁺ accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9328-9332.

Baud V, Karin M (2001) Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 11:372-377.

Beattie EC, Stellwagen D, Morishita W, Bresnahan JC, Ha BK, Von Zastrow M, Beattie MS, Malenka RC (2002) Control of synaptic strength by glial TNFalpha. *Science* 295:2282-2285.

Bruce AJ, Boling W, Kindy MS, Peschon J, Kraemer PJ, Carpenter MK, Holtzman FW, Mattson MP (1996) Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nat Med* 2:788-794.

Bu B, Li J, Davies P, Vincent I (2002) Deregulation of cdk5, hyperphosphorylation, and cytoskeletal pathology in the Niemann-Pick type C murine model. *J Neurosci* 22:6515-6525.

Chae T, Kwon YT, Bronson R, Dikkes P, Li E, Tsai LH (1997) Mice lacking p35, a neuronal specific activator of Cdk5, display cortical lamination defects, seizures, and adult lethality. *Neuron* 18:29-42.

Cheng B, Christakos S, Mattson MP (1994) Tumor necrosis factors protect neurons against metabolic-excitotoxic insults and promote maintenance of calcium homeostasis. *Neuron* 12:139-153.

Cicero S, Herrup K (2005) Cyclin-dependent kinase 5 is essential for neuronal cell cycle arrest and differentiation. *J Neurosci* 25:9658-9668.

Cruz JC, Tsai LH (2004) Cdk5 deregulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Mol Med* 10:452-458.

De Felice FG, Vieira MN, Saraiva LM, Figueroa-Villar JD, Garcia-Abreu J, Liu R, Chang L, Klein WL, Ferreira ST (2004) Targeting the neurotoxic species in Alzheimer's disease: inhibitors of Aβ oligomerization. *Faseb J* 18:1366-1372.

Dhavan R, Tsai LH (2001) A decade of CDK5. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:749-759.

Flirski M, Sobow T (2005) Biochemical markers and risk factors of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2:47-64.

Gandy S (2005) The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J Clin Invest* 115:1121-1129.

Gary DS, Bruce-Keller AJ, Kindy MS, Mattson MP (1998) Ischemic and excitotoxic brain injury is enhanced in mice lacking the p55 tumor necrosis factor receptor. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:1283-1287.

Gaur U, Aggarwal BB (2003) Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol* 66:1403-1408.

Glazner GW, Mattson MP (2000) Differential effects of BDNF, ADNF9, and TNFalpha on levels of NMDA receptor subunits, calcium homeostasis, and neuronal vulnerability to excitotoxicity. *Exp Neurol* 161:442-452.

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

Gong X, Tang X, Wiedmann M, Wang X, Peng J, Zheng D, Blair LA, Marshall J, Mao Z (2003) Cdk5-mediated inhibition of the protective effects of transcription factor MEF2 in neurotoxicity-induced apoptosis. *Neuron* 38:33-46.

Han P, Dou F, Li F, Zhang X, Zhang YW, Zheng H, Lipton SA, Xu H, Liao FF (2005) Suppression of cyclin-dependent kinase 5 activation by amyloid precursor protein: a novel excitoprotective mechanism involving modulation of tau phosphorylation. *J Neurosci* 25:11542-11552.

Harada T, Morooka T, Ogawa S, Nishida E (2001) ERK induces p35, a neuron-specific activator of Cdk5, through induction of Egr1. *Nat Cell Biol* 3:453-459.

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

Hernandez F, Lucas JJ, Cuadros R, Avila J (2003) GSK-3 dependent phosphoepitopes recognized by PHF-1 and AT-8 antibodies are present in different tau isoforms. *Neurobiol Aging* 24:1087-1094.

Humbert S, Dhavan R, Tsai L (2000) p39 activates cdk5 in neurons, and is associated with the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 113 (Pt 6):975-983.

Ishizuka T, Ino H, Sawa K, Suzuki N, Tatibana M (1995) Promoter region of the mouse cyclin-dependent kinase 5-encoding gene. *Gene* 166:267-271.

Jia JP, Meng R, Sun YX, Sun WJ, Ji XM, Jia LF (2005) Cerebrospinal fluid tau, Abeta1-42 and inflammatory cytokines in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurosci Lett* 383:12-16.

Kaltschmidt B, Uherek M, Wellmann H, Volk B, Kaltschmidt C (1999) Inhibition of NF-kappaB potentiates amyloid beta-mediated neuronal apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:9409-9414.

Ko J, Humbert S, Bronson RT, Takahashi S, Kulkarni AB, Li E, Tsai LH (2001) p35 and p39 are essential for cyclin-dependent kinase 5 function during neurodevelopment. *J Neurosci* 21:6758-6771.

Kolesnick R, Golde DW (1994) The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling. *Cell* 77:325-328.

Kurt MA, Davies DC, Kidd M (1997) Paired helical filament morphology varies with intracellular location in Alzheimer's disease brain. *Neurosci Lett* 239:41-44.

Kwon YT, Gupta A, Zhou Y, Nikolic M, Tsai LH (2000) Regulation of N-cadherin-mediated adhesion by the p35-Cdk5 kinase. *Curr Biol* 10:363-372.

Lee MS, Kwon YT, Li M, Peng J, Friedlander RM, Tsai LH (2000) Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature* 405:360-364.

Lew J, Huang QQ, Qi Z, Winkfein RJ, Aebersold R, Hunt T, Wang JH (1994) A brain-specific activator of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* 371:423-426.

Lewis M, Tartaglia LA, Lee A, Bennett GL, Rice GC, Wong GH, Chen EY, Goeddel DV (1991) Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:2830-2834.

Li R, Yang L, Lindholm K, Konishi Y, Yue X, Hampel H, Zhang D, Shen Y (2004) Tumor necrosis factor death receptor signaling cascade is required for amyloid-beta protein-induced neuron death. *J Neurosci* 24:1760-1771.

Li Y, Liu L, Barger SW, Griffin WS (2003) Interleukin-1 mediates pathological effects of microglia on tau phosphorylation and on synaptophysin synthesis in cortical neurons through a p38-MAPK pathway. *J Neurosci* 23:1605-1611.

Li Y, Liu L, Kang J, Sheng JG, Barger SW, Mrak RE, Griffin WS (2000) Neuronal-glia interactions mediated by interleukin-1 enhance neuronal acetylcholinesterase activity and mRNA expression. *J Neurosci* 20:149-155.

Liu T, Perry G, Chan HW, Verdile G, Martins RN, Smith MA, Atwood CS (2004) Amyloid-beta-induced toxicity of primary neurons is dependent upon differentiation-associated increases in tau and cyclin-dependent kinase 5 expression. *J Neurochem* 88:554-563.

Liu WK, Ksiezak-Reding H, Yen SH (1991) Abnormal tau proteins from Alzheimer's disease brains. Purification and amino acid analysis. *J Biol Chem* 266:21723-21727.

Maccioni RB, Cambiazo V (1995) Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. *Physiol Rev* 75:835-864.

Maccioni RB, Munoz JP, Barbeito L (2001) The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch Med Res* 32:367-381.

Maccioni RB, Otth C, Concha, II, Munoz JP (2001) The protein kinase Cdk5. Structural aspects, roles in neurogenesis and involvement in Alzheimer's pathology. *Eur J Biochem* 268:1518-1527.

MacEwan DJ (2002) TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal* 14:477-492.

Mao Z, Bonni A, Xia F, Nadal-Vicens M, Greenberg ME (1999) Neuronal activity-dependent cell survival mediated by transcription factor MEF2. *Science* 286:785-790.

Marino MW, Dunn A, Grail D, Inglese M, Noguchi Y, Richards E, Jungbluth A, Wada H, Moore M, Williamson B, Basu S, Old LJ (1997) Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8093-8098.

Mattson MP, Goodman Y, Luo H, Fu W, Furukawa K (1997) Activation of NF-kappaB protects hippocampal neurons against oxidative stress-induced apoptosis: evidence for induction of manganese superoxide dismutase and suppression of peroxynitrite production and protein tyrosine nitration. *J Neurosci Res* 49:681-697.

Mattson MP, Cheng B, Baldwin SA, Smith-Swintosky VL, Keller J, Geddes JW, Scheff SW, Christakos S (1995) Brain injury and tumor necrosis factors induce calbindin D-28k in astrocytes: evidence for a cytoprotective response. *J Neurosci Res* 42:357-370.

Nguyen MD, Boudreau M, Kriz J, Couillard-Despres S, Kaplan DR, Julien JP (2003) Cell cycle regulators in the neuronal death pathway of amyotrophic lateral sclerosis caused by mutant superoxide dismutase 1. *J Neurosci* 23:2131-2140.

Ohshima T, Ward JM, Huh CG, Longenecker G, Veeranna, Pant HC, Brady RO, Martin LJ, Kulkarni AB (1996) Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11173-11178.

Okamoto S, Krainc D, Sherman K, Lipton SA (2000) Antiapoptotic role of the p38 mitogen-activated protein kinase-myocyte enhancer factor 2 transcription factor pathway during neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:7561-7566.

Okamoto S, Li Z, Ju C, Scholzke MN, Mathews E, Cui J, Salvesen GS, Bossy-Wetzel E, Lipton SA (2002) Dominant-interfering forms of MEF2 generated by caspase cleavage contribute to NMDA-induced neuronal apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3974-3979.

Orellana DI, Quintanilla RA, Gonzalez-Billault C, Maccioni RB (2005) Role of the JAKs/STATs pathway in the intracellular calcium changes induced by interleukin-6 in hippocampal neurons. *Neurotox Res* 8:295-304.

Pareek TK, Keller J, Kesavapany S, Pant HC, Iadarola MJ, Brady RO, Kulkarni AB (2006) Cyclin-dependent kinase 5 activity regulates pain signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:791-796.

Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, de la Monte S, Dikkes P, Tsai LH (1999) Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* 402:615-622.

Perry RT, Collins JS, Wiener H, Acton R, Go RC (2001) The role of TNF and its receptors in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 22:873-883.

Perry SW, Dewhurst S, Bellizzi MJ, Gelbard HA (2002) Tumor necrosis factor- α in normal and diseased brain: Conflicting effects via intraneuronal receptor crosstalk? *J Neurovirol* 8:611-624.

Qiu Z, Parsons KL, Gruol DL (1995) Interleukin-6 selectively enhances the intracellular calcium response to NMDA in developing CNS neurons. *J Neurosci* 15:6688-6699.

Qiu Z, Sweeney DD, Netzeband JG, Gruol DL (1998) Chronic interleukin-6 alters NMDA receptor-mediated membrane responses and enhances neurotoxicity in developing CNS neurons. *J Neurosci* 18:10445-10456.

Quintanilla RA, Orellana DI, Gonzalez-Billault C, Maccioni RB (2004) Interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway. *Exp Cell Res* 295:245-257.

Wang J, Liu S, Fu Y, Wang JH, Lu Y (2003) Cdk5 activation induces hippocampal CA1 cell death by directly phosphorylating NMDA receptors. *Nat Neurosci* 6:1039-1047.

Weishaupt JH, Neusch C, Bahr M (2003) Cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) and neuronal cell death. *Cell Tissue Res* 312:1-8.

Wyss-Coray T, Mucke L (2002) Inflammation in neurodegenerative disease—a double-edged sword. *Neuron* 35:419-432.

Xiong Y, Zhang H, Beach D (1992) D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* 71:505-514.

Zambrano CA, Egana JT, Nunez MT, Maccioni RB, Gonzalez-Billault C (2004) Oxidative stress promotes tau dephosphorylation in neuronal cells: the roles of cdk5 and PP1. *Free Radic Biol Med* 36:1393-1402.

Zheng YL, Kesavapany S, Gravell M, Hamilton RS, Schubert M, Amin N, Albers W, Grant P, Pant HC (2005) A Cdk5 inhibitory peptide reduces tau hyperphosphorylation and apoptosis in neurons. *Embo J* 24:209-220.