



Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado

Facultad de Ciencias Biológicas -Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas

Área Biología Celular y Molecular

EL AUMENTO DE LA ACTIVIDAD TRANSAMIDANTE DE TG2 POTENCIA LA VÍA AMILOIDOGÉNICA EN MODELOS DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Área Biología Celular y Molecular

JESSICA DANIELA PANES FERNANDEZ

CONCEPCIÓN-CHILE

2023

Profesor Guía: Jorge Fuentealba Arcos

Dpto. de Fisiología Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

Dr. Jorge Fuentealba Arcos
Profesor Guía
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Francisco Nualart
Profesor Evaluador Interno
Facultad de Ciencias Biológicas

Dra. Patricia Burgos
Profesor Evaluador Externo
Universidad San Sebastián

Dr. Ariel Castro
Profesor Evaluador Interno
Facultad de Ciencias Biológicas

Presentación

La presente tesis de doctorado fue dirigida por el Dr. Jorge Fuentealba en el Laboratorio de Fisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción. A partir de la investigación desarrollada en esta tesis se realizaron las siguientes actividades y se generaron los siguientes productos:

Presentaciones a congresos nacionales e internacionales:

XL MEETING OF THE CHILEAN SOCIETY OF PHARMACOLOGY. SO-AB induces a change in intracellular distribution of phosphorylated SIRT1 that alters the PGC-1alpha function on hippocampal neurons” **Panes-Fernandez, J** 1, Godoy, PA1, Ramírez, OG1, Silva-Grecchi, T1, Mennickent, D.1, Gavilan,J.1, Muñoz-Molina, N.1, Muñoz-Montecino, C.1, Fuentealba, J.1

49TH ANNUAL MEETING SOCIETY FOR NEUROSCIENCE. **J. Panes-Fernandez**, J. Gavilan, P.A. Godoy, O. Ramirez-Molina, T. Silva-Grecchi, N. Munoz-Molina, C. Munoz-Montecino, J. Fuentealba (2019). Synaptic failure and mitochondrial dysfunction are induced after direct interaction of soluble oligomers of beta amyloid with mitochondrial membranes.

XLI MEETING OF THE CHILEAN SOCIETY OF PHARMACOLOGY. **J. Panes-Fernandez**, J. Gavilan 1, P.A. Godoy, O. Ramirez- molina, T. Silva-Grecchi, N. Munoz-Molina, C. Munoz-Montecino, J. Fuentealba. Amyloid beta oligomers induce mitochondrial dysfunction by its direct interaction with mitochondrial membranes on hippocampal slices.

51TH ANNUAL MEETING SOCIETY FOR NEUROSCIENCE. **J. Panes-Fernandez**¹, J. A. Gavilan¹, P. A. Godoy Rivera¹, O. Ramirez-Molina¹, A. M. Marileo¹, C. F. Burgos¹, C. Munoz-Montesino¹, G. E. Yevenes¹, G. Moraga-Cid¹, P. A. Castro¹, L. Guzman¹, J. Fuentealba¹. Impact of Transglutaminase type 2 transamidating activity on Amyloid beta aggregation and mitochondrial function in Alzheimer disease models. Chicago, IL. EEUU, 8-11 November 2021.

FENS FORUM 2022. **Jessica Panes**, Ana María Marileo, Javiera Gavilan, Oscar Ramirez, Robinson Duran, Patricio Castro, Carlos Felipe Burgos, Gonzalo Yévenes, Gustavo Moraga-Cid, Carola Munoz Montesino, Jorge Fuentealba. TG2 promotes a fast A β peptide aggregation, disrupts ER-Mitochondria Contact Sites and neuronal function in cellular and animal models of Alzheimer disease. Paris, France , 9-13 July 2022.

ALZHEIMER'S ASSOCIATION INTERNATIONAL CONFERENCE 2023. **Jessica Panes**, Thi Kim Oanh Nguyen, Huanyao Gao, Trace A. Christensen, Andrea Stojakovic, Sergey Trushin, Jeffrey L. Salisbury, Jorge Fuentealba & Eugenia Trushina. Partial Inhibition of Complex I Restores Mitochondrial Morphology and Mitochondria-ER Communication in Hippocampus of APP/PS1 Mice. July 16-20, 2023. Amsterdam, Netherlands.

Publicaciones

PANES JD, GODOY PA, SILVA-GRECCHI T, CELIS MT, RAMIREZ-MOLINA O, GAVILAN J, MUÑOZ-MONTECINO C, CASTRO PA, MORAGA-CID G, YÉVENES GE, GUZMÁN L, SALISBURY JL, TRUSHINA E, FUENTEALBA J. CHANGES IN PGC-1A/SIRT1 SIGNALING IMPACT ON MITOCHONDRIAL HOMEOSTASIS IN AMYLOID-BETA PEPTIDE TOXICITY MODEL. **FRONT PHARMACOL.** 2020 MAY 21;11:709. DOI: 10.3389/FPHAR.2020.00709. PMID: 32523530; PMCID:PMC7261959.

JESSICA D. PANES, ALINE WENDT, OSCAR RAMIREZ-MOLINA , PATRICIO A. CASTRO , JORGE FUENTEALBA. DECIPHERING THE ROLE OF PGC-1A IN NEUROLOGICAL DISORDERS: FROM MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION TO SYNAPTIC FAILURE. **NEURAL REGENERATION RESEARCH.** 2021. VOL 16, DOI: 10.4103.

PANES, J. D., SAAVEDRA, P., PINEDA, B., ESCOBAR, K., CUEVAS, M. E., MORAGA-CID, G., FUENTEALBA, J., RIVAS, C. I., REZAEI, H., & MUÑOZ-MONTESINO, C. (2021). PRP C AS A TRANSDUCER OF PHYSIOLOGICAL AND PATHOLOGICAL SIGNALS. **FRONTIERS IN MOLECULAR NEUROSCIENCE**, 14, 762918. DOI: 10.3389/fnmol.2021.762918. PMID: 34880726; PMCID: PMC8648500.

PANES J, NGUYEN TKO, GAO H, CHRISTENSEN TA, STOJAKOVIC A, TRUSHIN S, SALISBURY JL, FUENTEALBA J, TRUSHINA E. PARTIAL

INHIBITION OF COMPLEX I RESTORES MITOCHONDRIAL MORPHOLOGY AND MITOCHONDRIA-ER COMMUNICATION IN HIPPOCAMPUS OF APP/PS1 MICE. **Cells**. 2023 Apr 8;12(8):1111. doi: 10.3390/cells12081111. PMID: 37190020; PMCID: PMC10137328.

PANES-FERNANDEZ J, GODOY PA, GAVILAN J, RAMÍREZ-MOLINA O, BURGOS CF, MARILEO A, FLORES-NÚÑEZ O, CASTRO PA, MORAGA-CID G, YÉVENES GE, MUÑOZ-MONTESINO C, FUENTEALBA J. TG2 PROMOTES AMYLOID BETA AGGREGATES: IMPACT ON ER-MITOCHONDRIA CROSSTALK, CALCIUM HOMEOSTASIS AND SYNAPTIC FUNCTION IN ALZHEIMER'S DISEASE. **Biomed Pharmacother**. 2023 Jun;162:114596. doi: 10.1016/j.biopha.2023.114596. Epub 2023 Mar 28. PMID: 36989728.

Premios, Becas y Financiamiento

Premios

- Premio Fernando García Huidobro. Scientific version – XL meeting of the Chilean Society of Pharmacology 2018.
- Premio Lipschutz. Poster day - Universidad de Concepción 2018

Becas

Durante estos estudios de doctorado, la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT) otorgó las siguientes becas:

- Beca CONICYT (21141247) para Estudios de Doctorado en Chile.
CONICYT
- Beca CONICYT (21181247) de Estadías de Investigación en Clínica Mayo, USA

Financiamiento

Esta Tesis contó con las siguientes fuentes de financiamiento:

- Proyectos FONDECYT 1161078 y 1200908 al Dr. Jorge Fuentealaba
- National Institutes of Health (RF1AG55549) a la Dra. Eugenia Trushina

Agradecimientos

Agradezco a mi director de tesis, Dr Jorge Fuentealba por su permanente respaldo y excelente guía durante estos años de esfuerzo. Igualmente valoro la contribución de los miembros de la Comisión, Dra. Patricia Burgos, Dr. Francisco Nualart, y Dr. Ariel Castro, por sus agudos comentarios y excelente disposición para mi formación académica.

Al financiamiento otorgado por los proyectos Fondecyt 1161078 y 1200908 y CONICYT 21141247.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio, quienes nunca han dejado de brindarme su cariño y colaboración. Su pensamiento crítico y a la vez festivo aún acompañan todos mis pasos. De manera especial, agradezco al Dr Cesar Lara, Dra. Scarlet Gallegos, Dra Victoria San Martín, Dr Anibal Araya, por su permanente apoyo y amistad, indispensable para mi salud mental. También destaco el apoyo de la Srta. Ixia Cid, y Jocelin González por su imprescindible apoyo técnico, así como su maravillosa calidad humana. Además, agradezco al Dr. Gonzalo Yévenes, Dr. Gustavo Moraga, Dr. Felipe Burgos, Dra. Carola Muñoz, Dr. Eduardo Fernández y al Dr. Luis Aguayo, por su colaboración y apoyo en el Departamento de Fisiología.

Destaco al Srta. Javiera Gavilán, Sr. Oscar Ramírez, Dr. Francisco Sáez y a la Dra. Pamela Godoy por su permanente apoyo y buena disposición en nuestro grupo de trabajo, sin duda imprescindible en la experimentación realizada.

Agradezco a mi familia, a mis padres, Héctor Panes y Roxana Fernández, por su amor incondicional y soporte durante toda mi vida. Especialmente le agradezco a mi madre Roxana por ser la persona que ha estado siempre en mi formación personal y profesional, le dedico mi tesis y todos mis logros profesionales siempre. Mis hermanos Andrés y Héctor, que siempre me apoyan en todas mi aventuras. A mi tío Mario y mi prima Andrea por su cariño y apoyo. También destaco a mis sobrinos, Sofia e Ignacio, que me han llenado de alegría. A mis amigas Lisette Alarcón, Andrea Catalán, Patricia Velázquez y sin duda a Felipe Aurelia y Diego Medina, amigos quienes constantemente me han apoyado, y me han ayudado a ser una persona mejor y más feliz. No menos importante, hago una mención a mis gatos, Don Gato, Cuervo, y Patricia.

Una mención honrosa a las mitocondrias, que me han apasionado desde que comencé mi carrera y me han permitido realizarme como científica.

Finalmente, agradezco de manera especial a mi pareja, Dra Ana Marileo, por su amor irrestricto que me permite salir adelante ante toda situación.

INDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
I. Resumen	xx
I. Abstract	xxiii
II. Introducción:	1
II.1 Generalidades de la Enfermedad de Alzheimer	1
II.2 Clasificación de la Enfermedad de Alzheimer según etiología.....	4
II.3 Procesamiento de la proteína precursora amiloide en la EA.....	6
II.4 Agregación del péptido A β	9
II.5 Roles biológicos de la transamidasa tisular tipo 2.....	15
II.6 Agregación del péptido A β inducida por la actividad TGasa de la TG2	18
III. Hipótesis.....	22
IV. Objetivos:.....	23
V. Metodología:.....	24
Cultivos primarios de neuronas hipocampales.....	24
Cortes de hipocampo de animales wild type y J20.....	24
Agregación de A β <i>in vitro</i>	26
Análisis <i>in silico</i>	26
Ensayo enzimático de la actividad transamidante	27
Ensayo de unión de Tioflavina T	28
Microscopio de transmisión electrónica para agregados del péptido A β	28
Electrofisiología.....	29
Microfluorimetría Ca ²⁺	31
Viabilidad celular.	32
Inmunocitoquímica	33
Inmunohistoquímica	34
Evaluación de contacto ER-mitocondria usando PLA.....	35
Mediciones de potencial de membrana mitocondrial.....	36

Ratones y tratamiento crónico <i>in vivo</i> con CP2 en el modelo animal APP/PS1	37
Segmentación de imágenes y análisis morfométrico mediante AMIRA.....	40
Western blot	42
Secuenciación de ARN de próxima generación.....	44
Análisis de datos.....	45
VI. Resultados:.....	47
1. 1. Aumento en niveles de TG2 en diferentes modelos animales y celulares de toxicidad amiloide.....	47
1. 2. Aumento en actividad transamidante de TG2 en el modelo J20.....	54
2.1 La actividad transamidante de TG2 potencia el proceso de agregación del péptido A β <i>in vitro</i>	56
2.2 Los agregados de A β _{TG2} promueven un aumento de el acoplamiento del complejo IP3R-VDAC1 en neuronas de hipocampo.	62
2.3 Los agregados de A β _{TG2} promueven una alteración de la función mitocondrial en las células neuronales	66
3.1 El tratamiento agudo de los agregados de A β _{TG2} incrementan la generación de los potenciales de acción, induciendo hiperexcitabilidad en cultivo de neuronas hipocampales.....	70
3.2 El tratamiento crónico de los agregados de A β _{TG2} disminuye la frecuencia de las corrientes miniatura excitatorias y el marcador de presinapsis SV2 en cultivo de neuronas hipocampales.	75
4.1. En dendritas de hipocampo de animales APP/PS1 se observa una alteración de la dinámica mitocondrial, la cual es revertida mediante el uso del compuesto CP2...78	
4.2. CP2 revierte el incremento en la formación de MAMs en animales APP/PS1	84
VII. Discusión:	89
VIII. Conclusión.....	101
IX Bibliografía.....	102

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Alteraciones en complejos proteicos que participan en la regulación de la función mitocondria y del RE en modelos animales de la EA.....	14
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

FIG. 1 Principales eventos anatómicos, celulares y moleculares en la patología de la EA	3
FIG. 2 Ilustración de los genes y mutaciones implicadas en la ea familiar y esporádica.	5
FIG. 3 Procesamiento proteolítico de la proteína precursora amiloide(APP)	8
FIG. 4 Agregación del péptido A β en la EA.....	10
FIG. 5 Efectos tóxicos de los A β O en función mitocondrial	13
FIG. 6 Función celular de la transamidasa tisular TG2.....	17
FIG. 7 Rol de la transamidasa tisular en el proceso de agregación del péptido A β	20
FIG. 8 Aumento de TG2 después del tratamiento crónico con A β O en células del hipocampo de ratones.....	49
FIG. 9 Aumento de TG2 en hipocampo de ratones J20.	51
FIG. 10 Sobreexpresión de tg2 de ratones app/ps1	53
FIG. 11 La actividad transamidante de TG2 aumenta en el hipocampo de animales J20.....	55
FIG. 12 La actividad transamidante de TG2 in vitro incrementa la agregación del péptido A β	59
FIG. 13 Análisis bioinformático de acoplamiento molecular entre TG2 y el péptido A β	61

FIG. 14 Los agregados de $A\beta_{TG2}$ inducen la formación de MAMs en modelos neuronales.....	63
FIG. 15 Los agregados de $A\beta_{TG2}$ afectan la homeostasis del Ca^{+2} en modelos neuronales.....	65
FIG. 16 Los agregados $A\beta_{TG2}$ alteran la función mitocondrial en modelos neuronales.....	69
FIG. 17 Los agregados de $A\beta_{TG2}$ incrementan la excitabilidad en neuronas de hipocampo a tiempos agudos.	72
FIG. 18 Los agregados de $A\beta_{TG2}$ incrementan las corrientes espontáneas excitatorias a tiempos agudos.....	74
FIG. 19 Los agregados de $A\beta_{TG2}$ inducen silenciamiento sináptico a tiempos crónicos	77
FIG. 20 En dendritas de hipocampo del modelo animal APP/PS1 se observa un incremento de fenotipos mitocondriales alterados obtenidos mediante la reconstrucción 3DEM.....	81
FIG. 21 En fracciones mitocondriales de hipocampo del modelo animal APP/PS1 se observa un incremento del marcador de fisión pDRP1.	83
FIG. 22 Evaluación de MAMs en muestras de ratones sintomáticos APP/PS1.	86
FIG. 23 Evaluación de las proteínas MAMs en fracciones mitocondriales de hipocampo de ratones sintomáticos APP/PS1.	88

FIG. 24 Modelo propuesto del rol funcional de la actividad transglutaminasa de la TG2 en la vía amiloidogénica. 100

LISTA DE ABREVIATURAS.

$\Delta\psi_m$: Potencial mitocondrial

A β : Péptido beta amiloide

A β Os: Oligómeros de A β

A β _{TG2}: Interacción entre TG2 y A β

AICD : Dominio intracelular Carboxi terminal de APP

AMPA : α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

APH1 : Anterior Pharynx-Defective-1

APP : Proteína Precursora Amiloide

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ATP: Adenosín trifosfato

BACE : Enzima clivadora de sitio β de APP

BiP: Proteína de unión a inmunoglobulinas

BSA : Albúmina de suero bovino

Ca²⁺: Iones de calcio

CaCl₂ : Cloruro de Calcio

CAV1: Caveolina 1

CP2: Compuesto pirona tricíclico dos

EA: Enfermedad de Alzheimer

ETC: Cadena de transporte de electrones

AP: Potencial de acción

APP: Proteína precursora de amiloide beta

APP/PS1: APPSWE/PS1 Δ E9

Bap31: Proteína 31 asociada al receptor de células B

CAA: Angiopatía amiloide cerebral

CAD: Línea celular catecolaminérgica

DIV : Días in vitro

DJ1: Deglucasa de proteína

DMEM : Medio Dulbecco modificado por Eagle

DMSO : Dimetil Sulfóxido

DTT : (2S,3S)-1,4-bis(sulfanyl)butane-2,3-diol

EC₅₀ : Concentración efectiva para obtener el 50% de la respuesta máxima

GABA : 4-aminobutanoic acid

KCl : Cloruro de Potasio

KO : Knock-Out

SNC: Sistema nervioso central

DG: Giro dentado

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ER: Retículo endoplásmico

FIS1: Proteína 1 de fisión mitocondrial

GRP75: Proteína 75 regulada por glucosa

IP₃: Inositol 1,4,5-trifosfato

IP₃R : Receptor de inositol 1,4,5-trifosfato tipo

Ft: Fluorescencia en un momento dado

HD: Enfermedad de Huntington

HSPA5: Miembro 5 de la familia de proteínas de choque térmico A (Hsp70)

J20: Ratón transgénico con las mutaciones APPSw y APPInd

LTP: Potenciación a largo plazo (Long-Term Potentiation)

mEPSC: Corrientes postsinápticas miniaturas

mA : Mili Amperes

MAMs: Membranas asociadas a las mitocondrias

MAP2 : Proteína asociada a microtubulos 2

mEPSC : Corriente excitatoria post-sináptica en miniatura

MERCs: Sitios de contacto mitocondria-retículo endoplásmico

MgCl₂ : Cloruro de Magnesio

mIPSC : Corriente inhibitoria post-sináptica en miniatura

MΩ : Mega Ohm

mOsm : Mili Osmoles

mRNA : RNA mensajero

MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

mV : Mili Volts

MCI: Complejo I mitocondrial

MFN1/2: Mitofusina 1/2

MOAB-2: Anticuerpo anti-beta amiloide

MTT salt: Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio

N/C: Núcleo/Citoplasma

nAChR : Receptor Nicotínico de Acetilcolina

NaCl : Cloruro de Sodio

NCBI : Centro Nacional de información biotecnológica

nm : Nano metro

nM : Nano Molar

NMDAR : del inglés (2R)-2-(Methylamino)butanedioic acid receptor

NTG: No transgénico

P2X: Receptor ionotrópico purinérgico

PACS-2: Proteína 2 de clasificación de clúster ácido de fosforina

PDB: Banco de datos de proteínas

PDZD8: Proteína 8 que contiene el dominio PDZ (PDZ domain-containing protein 8)

PGC-1 α : Coactivador 1 alfa del receptor gamma activado por proliferadores de peroxisomas

PS1 : Presenilina 1

PS2 : Presenilina 2

PSS1: Fosfatidilserina sintasa 1

pTau: Proteína Tau hiperfosforilada (hyper-phosphorylated Tau protein)

RT: Temperatura ambiente

RAB4/6: Proteína relacionada a Ras Rab-4^a

ROS: Especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species)

RyR: Receptor de Rianodina

Sig1R : Sigma-1 receptor

TAR: Respuesta de transactivación

TCA: ciclo del ácido tricarboxílico

TEM: Microscopía electrónica de transmisión

TG2: Transamidante tipo 2

ThT: Tioflavina T

TOM20: Homólogo 20 de la translocasa de la membrana externa mitocondrial

tTG: Transamidante tisular

TTX : Tetrodotoxina

μl : Micro litro

VDAC1: Canal aniónico dependiente de voltaje 1

I. Resumen

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la principal forma de demencia que afecta a los adultos mayores. Se caracteriza por una muerte neuronal progresiva en zonas de hipocampo, corteza y amígdala. Se postula que uno de los principales agentes tóxicos responsables de la neurodegeneración es la agregación tóxica del oligómeros del péptido β -amiloide (A β Os), ya que inducirían los principales eventos celulares con los que cursa esta patología, tales como dishomeostasis del Ca⁺², disfunción mitocondrial, y la falla sináptica.

TG2 es una enzima ubicua cuya función principal es la formación de enlaces isopeptídicos entre proteínas o péptidos, cuyo sitio catalítico se activa frente a concentraciones micromolares de Ca²⁺. Se ha descrito un aumento de la transcripción de TG2 en diferentes modelos transgénicos de la EA, así como en corteza de pacientes con EA.

En esta tesis doctoral se evaluaron cambios en los niveles de TG2 en distintos modelos de la EA, y el efecto de la función transamidante de la enzima TG2 en la agregación del péptido A β , y sus principales efectos tóxicos en la función mitocondrial y neuronal. Observamos que los niveles de TG2 en el hipocampo de ratones J20 de 10 meses estaban aumentados ($246 \pm 17\%$), y que la actividad transamidante estaba potenciada ($159 \pm 20\%$), en comparación con animales WT de la misma edad. Observamos un aumento significativo de la expresión de TG2 en lisado total de hipocampo ($286 \pm 5 \%$), y en fracción mitocondrial ($313 \pm 4 \%$)

de ratones APP/PS1, en comparación con los ratones WT de la misma edad. Además, neuronas del hipocampo tratadas de forma crónica con oligómeros de A β (A β O, 0.5 μ M) mostraron un aumento de la inmunoreactividad de TG2 (146 \pm 17%) en comparación con células no tratadas.

Conjuntamente, evaluamos la capacidad de TG2 para promover los procesos de agregación del péptido A β , comparándola con la formación “autocatalítica” previamente estandarizada por nuestro grupo de investigación. La conversión amiloide inducida por TG2, mostró seguir una cinética hiperbólica exponencial, y fue capaz de inducir agregados con un tamaño medio de 7-13 unidades (~28, 40, 52 kDa) que presentaban una alta citotoxicidad (85 \pm 3 %). En tanto que, la formación autocatalítica mostró seguir una cinética sigmoide, formando agregados más pequeños de tamaño de medio de 7 unidades (~28 kDa) que presentaban una menor citotoxicidad (69 \pm 3 %). El tratamiento agudo con A β _{TG2} indujo una rápida sobrecarga de Ca²⁺ citosólico (300 \pm 22%) y Ca²⁺ mitocondrial (335 \pm 43%). Utilizando la técnica de PLA, observamos que la formación del complejo IP₃R/VDAC1 aumentó en las neuronas expuestas a A β _{TG2} bajo tratamientos crónicos (220 \pm 12%). Mediante registros de patch clamp, observamos un aumento en la actividad neuronal (30 min, 257 \pm 14%), que disminuyó bajo tratamientos crónicos (A β _{TG2} 24h: 30 \pm 5%). Nuestros análisis *in silico* mostraron que el dominio catalítico de TG2 puede interactuar con el péptido A β en la región N-terminal (Δ G: -10.9, K_d: 9.754e-006, Energía del complejo: -1504).

De forma complementaria, quisimos evaluar la expresión de TG2 frente a la inhibición parcial del complejo mitocondrial I (MCI) con el fármaco CP2 (25 mg/kg/day) en ratones APP/PS1 sintomáticos de 24 meses, tratados durante 15 meses. Observamos que CP2 fue capaz de revertir la sobreexpresión de TG2 en animales APP/PS1 en comparación a los animales no tratados. Finalmente, quisimos correlacionar estos cambios con marcadores de función mitocondrial utilizando los mismos modelos animales. Demostramos que CP2 restaura la morfología mitocondrial, y la comunicación retículo-mitocondria, utilizando reconstrucciones tridimensionales de volúmenes obtenidas por microscopía electrónica en serie.

En conjunto, nuestros resultados indican que cambios en la formación de agregados de A β en modelos de la EA estaría asociada a un incremento de la actividad transamidante de TG2, por lo que puede ser un potencial blanco para el desarrollo de estrategias farmacológicas en el tratamiento de la EA, y respaldan adicionalmente el desarrollo de inhibidores de TG2 como una estrategia para prevenir la agregación amiloide observada en la EA. Se requerirá avanzar en estudios adicionales, que profundicen en los mecanismos que regulan la transcripción de TG2, y los elementos involucrados en la aceleración de la vía amiloidogénica durante la progresión de la EA.

I. Abstract

Alzheimer's Disease (AD) is the primary form of dementia affecting older adults. It is characterized by progressive neuronal death in the hippocampus, cortex, and amygdala regions. It is postulated that one of the main toxic agents responsible for neurodegeneration is the toxic aggregation of β -amyloid peptide oligomers (A β O $_n$), as they are believed to induce the major cellular events associated with this condition, such as Ca^{2+} dishomeostasis, mitochondrial dysfunction, and synaptic failure.

TG2 is a ubiquitous enzyme whose main function is the formation of isopeptide bonds between proteins or peptides, and its catalytic site is activated in response to micromolar concentrations of Ca^{2+} . An increase in TG2 transcription has been described in various transgenic models of AD, as well as in the cortex of AD patients.

This doctoral thesis evaluated changes in TG2 levels in different AD models and the effect of TG2's transamidase function on A β peptide aggregation, as well as its main toxic effects on mitochondrial and neuronal function. We observed that TG2 levels in the hippocampus of 10-month-old J20 mice were increased ($246 \pm 17\%$), and transamidase activity was enhanced ($159 \pm 20\%$), compared to age-matched WT animals. There was a significant increase in TG2 expression in the total hippocampal lysate ($286 \pm 5\%$) and the mitochondrial fraction ($313 \pm 4\%$) of APP/PS1 mice, compared to age-matched WT mice. Furthermore, hippocampal

neurons treated chronically with A β oligomers (A β Os, 0.5 μ M) showed increased TG2 immunoreactivity ($146 \pm 17\%$) compared to untreated cells.

We also assessed TG2's ability to promote A β peptide aggregation and compared it with the previously standardized "autocatalytic" formation by our research group. TG2-induced amyloid conversion followed a hyperbolic exponential kinetics and was able to induce aggregates with a mean size of 7-13 units (\sim 28, 40, 52 kDa) that exhibited high cytotoxicity ($85 \pm 3\%$). In contrast, autocatalytic formation followed a sigmoidal kinetics, resulting in smaller aggregates with a mean size of 7 units (\sim 28 kDa) and lower cytotoxicity ($69 \pm 3\%$). Acute treatment with A β _{TG2} induced a rapid overload of cytosolic Ca²⁺ ($300 \pm 22\%$) and mitochondrial Ca²⁺ ($335 \pm 43\%$). Using the PLA technique, we observed an increase in the IP₃R/VDAC1 complex formation in neurons exposed to chronic A β _{TG2} treatments ($220 \pm 12\%$). Patch clamp recordings showed an increase in neuronal activity (30 min, $257 \pm 14\%$), which decreased under chronic A β _{TG2} treatments (A β _{TG2} 24h: $30 \pm 5\%$). Our in silico analyses showed that the catalytic domain of TG2 can interact with the A β peptide in the N-terminal region (Δ G: -10.9, Kd: 9.754e-006, Complex Energy: -1504).

Additionally, we wanted to evaluate TG2 expression in the context of partial inhibition of mitochondrial complex I (MCI) with the drug CP2 (25 mg/kg/day) in symptomatic 24-month-old APP/PS1 mice treated for 15 months. We observed that CP2 was able to reverse the overexpression of TG2 in APP/PS1 animals

compared to untreated animals. Finally, we aimed to correlate these changes with mitochondrial function markers using the same animal models. We demonstrated that CP2 restores mitochondrial morphology and ER-mitochondrial communication, using three-dimensional reconstructions of volumes obtained by serial electron microscopy.

In summary, our results suggest that changes in A β aggregation in AD models are associated with an increase in TG2 transamidase activity. This suggests that TG2 could be a potential target for pharmacological strategies in the treatment of AD and supports the development of TG2 inhibitors as a strategy to prevent amyloid aggregation observed in AD. Further studies are needed to delve into the mechanisms regulating TG2 transcription and the elements involved in accelerating the amyloidogenic pathway during AD progression.

II. Introducción:

II.1 Generalidades de la Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno de carácter cognitivo asociado a una pérdida neuronal progresiva (1). La EA es el principal tipo de demencia, correspondiendo al 60-70% de los casos, cuyos principales factores de riesgo son la edad, sexo, y la genética (2, 3). Las demencias se caracterizan por la pérdida gradual de habilidades mentales, incluyendo memoria y razonamiento (4). Otros tipos de demencia incluyen la demencia vascular, la demencia con cuerpos de Lewy, y la demencia frontotemporal (5).

La mayor sobrevivencia de la población y, particularmente, de adultos mayores, está asociada a un aumento en la calidad de vida y a una transformación socio-demográfica, lo que ha incidido en un aumento en el número de personas con EA; a nivel mundial se estima que el 10% de los adultos mayores sufren EA, dentro de los cuales un 5% correspondería a personas menores de 70 años, un 30% entre 70 y 80 años, y un 65% sobre 80 años (6). Otros factores de riesgo de la enfermedad incluyen antecedentes familiares, sexo, lesiones cerebrales traumáticas, diabetes y enfermedades cardiovasculares (7). En el caso de nuestro país, la EA corresponde a la quinta causa de muerte más prevalente (8). Se estima que en el año 2002, aproximadamente el 10,8% de la población correspondía a adultos mayores, y se proyecta que para el año 2050, este porcentaje alcance el 22% (8).

Si bien la etiología de la EA no ha sido completamente determinada, se ha descrito que esta patología muestra afectaciones principalmente a nivel anatómico, celular y molecular (Figura 1). Por una parte, a nivel anatómico, estudios de resonancia magnética de neuroimagen de pacientes con EA muestran una disminución considerable del volumen cerebral (Figura 1A), además de un incremento del volumen ventricular, a lo que se suma una atrofia progresiva de los lóbulos frontotemporales, corteza parietal, y entorrinal (9-11). A nivel celular se ha descrito falla de la red neuronal a nivel pre- y postsináptico (Figura 1B) (12). Además, se ha observado una disfunción glial mediada por la activación de vías de inflamación a partir de la microglía y el astrocito, resultando en el aumento de la producción de citoquinas proinflamatorias, hiperexcitabilidad, disminución en la producción de acetilcolina, y una disfunción glutamatérgica (13, 14). A nivel molecular se reconoce la presencia de 2 marcadores histopatológicos en muestras de pacientes *post mortem* que han sido utilizadas clásicamente como criterio de diagnóstico clínico para la confirmación de EA (Figura 1C) (15). A nivel extracelular, han sido identificadas la presencia de placas seniles amiloides, conformadas principalmente por agregados fibrilares del péptido beta amiloide ($A\beta$), rodeadas de neuritas distróficas, células microgliales activadas y astrocitos (15). En tanto que a nivel intracelular han sido identificados los ovillos neurofibrilares e hilos de neuropilos conformados por depósitos de la proteína hiperfosforilada p-tau (16).

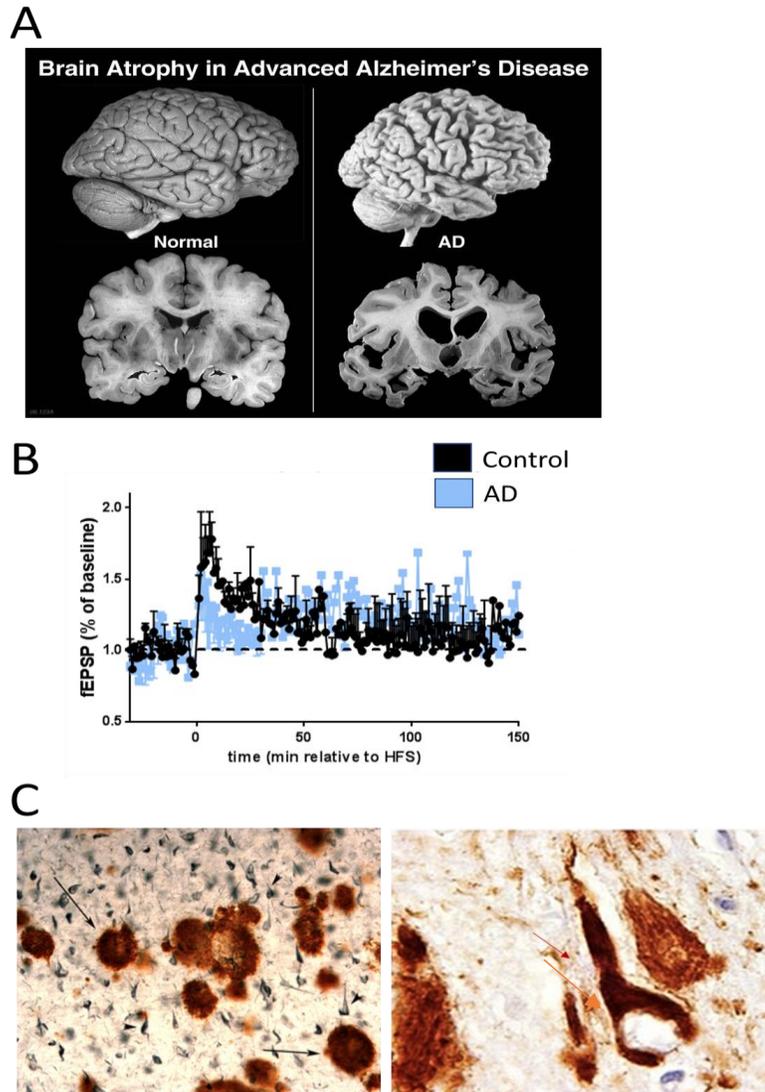


FIG. 1 PRINCIPALES EVENTOS ANATÓMICOS, CELULARES Y MOLECULARES EN LA PATOLOGÍA DE LA EA. (A) A nivel anatómico se observa una atrofia cerebral, acompañada de un aumento ventricular. Imagen tomada de Bagard et al., RJPBCS 2013. (B) A nivel celular la transmisión sináptica está alterada en hipocampo de pacientes con EA. Imagen tomada de Stojakovic et al., Commun Biol 2021. (C) A nivel molecular se observa la presencia de placas neuríticas (flecha negra) y ovillos neurofibrilares (flecha roja) vistos al microscopio. Geriatrics Aging© 2008 1453987 Ontario. Ltd.

II.2 Clasificación de la Enfermedad de Alzheimer según etiología.

La EA puede dividirse en diferentes tipos según la edad de inicio y la predisposición genética; la EA esporádica (SAD) o de inicio tardío, y la EA de inicio temprano o familiar (FAD) (Figura 2) (17). En el caso de FAD, esta corresponde sólo a entre 1% y 5% de los casos totales, y generalmente se manifiesta antes de los 60 años (18). Es causada por mutaciones en genes relacionados a la producción del péptido A β , incluida la proteína precursora amiloide (APP), y para las presinilinas 1 y 2 (PSN1, PSN2) (19). Entre las principales mutaciones de APP asociadas a la EA, se encuentran la mutación "Swedish (Swe)" (20), "London" (21), "Dutch" (21), "Flemish" (21). Estas mutaciones heredadas están asociadas a un incremento en la agregación amiloide y en la neurodegeneración (18).

En el caso de los pacientes con SAD, representa más del 95% de los casos, y comienza después de los 65 años (22). Está mediada por alteraciones en el metabolismo del colesterol, inflamación, así como trastornos en el reciclaje de vesículas (22). Entre estas variantes se encuentra la Apolipoproteína E4 (ApoE4), que desempeña un papel esencial en el metabolismo de los lípidos (23). El gen APOE tiene tres alelos principales: ApoE2, ApoE3 y ApoE4 (24). Se estima que las personas con una copia del alelo ApoE4 tienen aproximadamente tres veces más riesgo de desarrollar la EA (25). Otras variantes incluyen genes que codifican para la clusterina, fosfatidil-inositol, receptor de la proteína del complemento C3b, SORL1, y genes relacionados con la síntesis de colesterol (33).

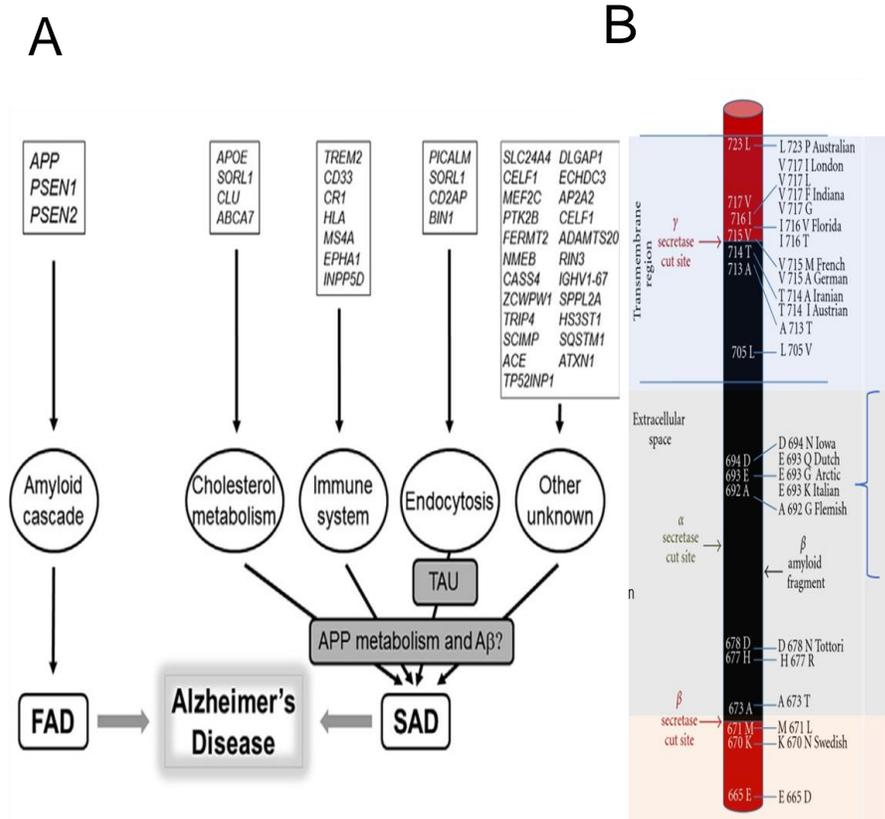


FIG. 2 ILUSTRACIÓN DE LOS GENES Y MUTACIONES IMPLICADAS EN LA EA FAMILIAR Y ESPORÁDICA. (A) Genes implicados en la enfermedad de Alzheimer familiar (mutaciones) y esporádica (factores de riesgo). Imagen tomada de Medina M, et al., *Alzheimers Dement* (N Y). 2017. (B) Esquema de APP con las principales mutaciones encontradas asociadas a la EA. Imagen modificada de Barber, *Scientifica*, 2012.

II.3 Procesamiento de la proteína precursora amiloide en la EA

el péptido A β es generado a partir del clivaje proteolítico de APP (26); APP es una proteína transmembrana que puede ser procesada por 3 complejos enzimáticos (26), y presenta 2 vías de procesamiento (Figura 3A):

La vía no amiloidogénica, involucra la participación de α -secretasa, enzima perteneciente a la familia de metaloproteasas ADAM, que genera el fragmento transmembrana C83, y el fragmento APP soluble α (15). Posteriormente C83, es clivado por el complejo enzimático γ -secretasa, dando origen a los fragmentos AICD y el péptido p3 (27). Se postula que estos fragmentos tendrían función trófica, participarían en neuritogénesis y en el desarrollo de la sinapsis (28).

La vía amiloidogénica parte con el clivaje de APP por la enzima β -secretasa, generando la liberación de un fragmento soluble llamado APPs β , y un fragmento de APP transmembrana denominado C99 (28). La actividad de γ -secretasa resulta en la formación de diversos fragmentos de A β , los cuales varían según el lugar donde ocurre el sitio de corte (ver Figura 3B). La isoforma más prevalente, representando aproximadamente el 90% del total, es A β ₁₋₄₀ (26). El segundo péptido más abundante es A β ₁₋₄₂, constituyendo alrededor del 9% del total de A β generado (26). Otras especies de A β representan menos del 1% restante, tales como A β ₁₋₃₇, A β ₁₋₃₈, A β ₁₋₃₉, A β ₁₋₄₁, (15). Un desequilibrio en la función de estas enzimas pueden aumentar la producción de A β y favorecer la formación de diferentes formas agregadas y placas amiloides (29). Un aspecto crucial en este

contexto es la medición de la razón $A\beta_{42}/A\beta_{40}$, que corresponde a la proporción entre los péptidos $A\beta_{1-42}$ y $A\beta_{1-40}$, generados en el procesamiento de APP (30). Dada la mayor hidrofobicidad del péptido $A\beta_{1-42}$ para formar agregados tóxicos, un incremento de este isotipo generaría una mayor formación de placas amiloides en el cerebro (30). Numerosos estudios han informado que la medición del ratio es un mejor predictor de pacientes con deterioro cognitivo, que la medición individual del isotipo $A\beta_{1-42}$ (31, 32).

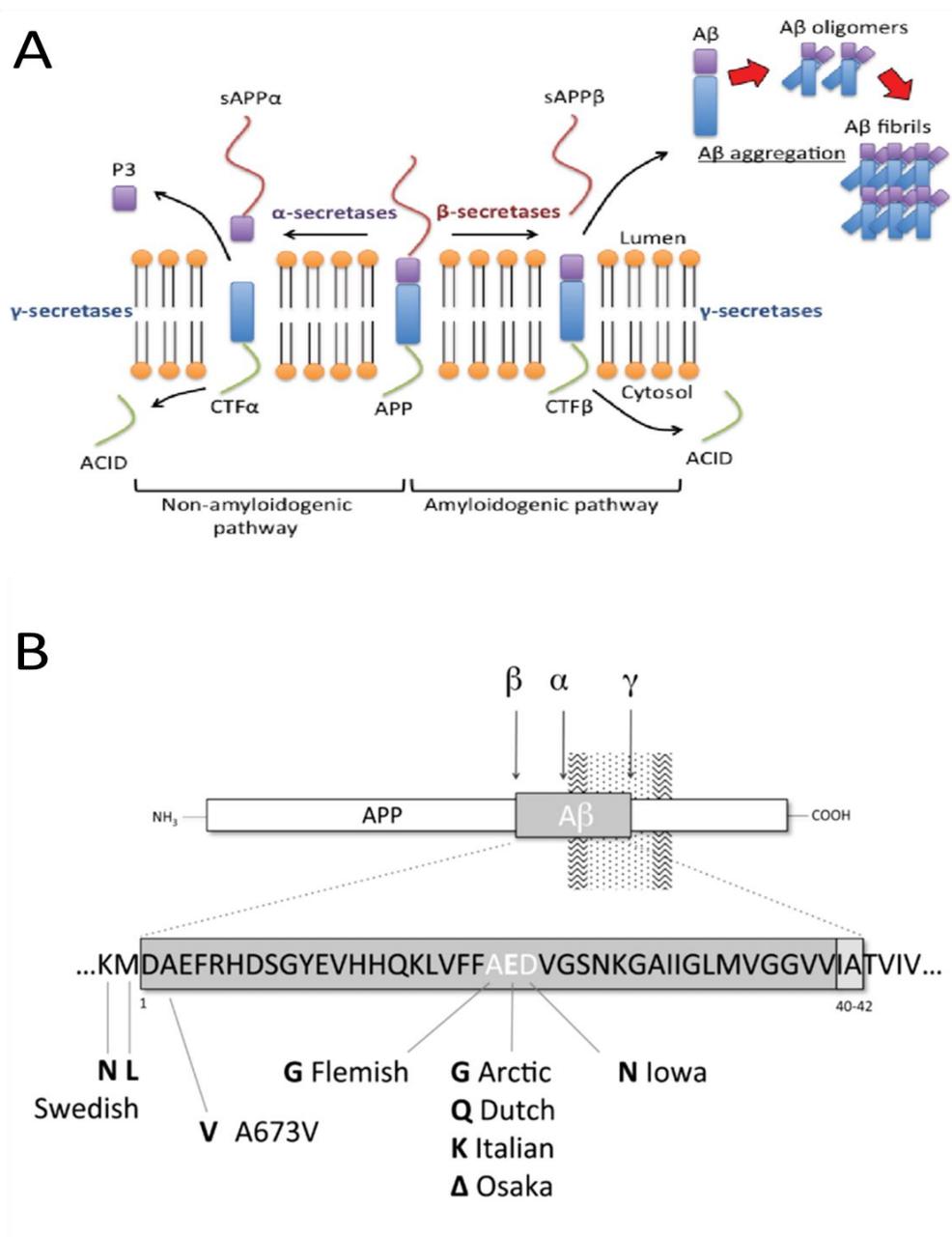


FIG. 3 PROCESAMIENTO PROTEOLÍTICO DE LA PROTEÍNA PRECURSORA AMILOIDE (APP). (A) La proteólisis secuencial de APP puede ocurrir mediante dos vías, la amiloidogénica y la no amiloidogénica. Imagen tomada de Cheung TS, Et al., Curr Med Chem. 2015; (B) Secuencia del péptido Aβ1-42 y localización de mutaciones de APP. Imagen modificada de J Clin Neurol. 2011.

II.4 Agregación del péptido A β

La agregación del péptido A β es crucial en la EA, y sus agregados tienen diversas formas y tamaños, tales como dímeros, trímeros, oligómeros, protofibrillas, fibrillas y placas seniles, lo que contribuye a la variabilidad de los efectos observados en los pacientes. (33). El péptido A β principalmente adopta una estructura α -hélice o "random coil", pero puede cambiar a una conformación β -plegada, que es más propensa a formar agregados tóxicos en forma de oligómeros y fibrillas amiloides insolubles (Figura 4A) (43).

Se han descrito diferentes tipos de cinética comúnmente observadas en la agregación *in vitro* del péptido A β (Figura 4B): la cinética sigmoide, caracterizada por una fase de nucleación seguida de crecimiento rápido y una fase estacionaria; y la cinética hiperbólica, asociada con una agregación acelerada que no presenta fase de nucleación (34). Se ha postulado que las complejas dinámicas de agregación del péptido A β están asociadas a su neurotoxicidad (35) y por lo tanto, es de gran relevancia su estudio durante la progresión de la EA.

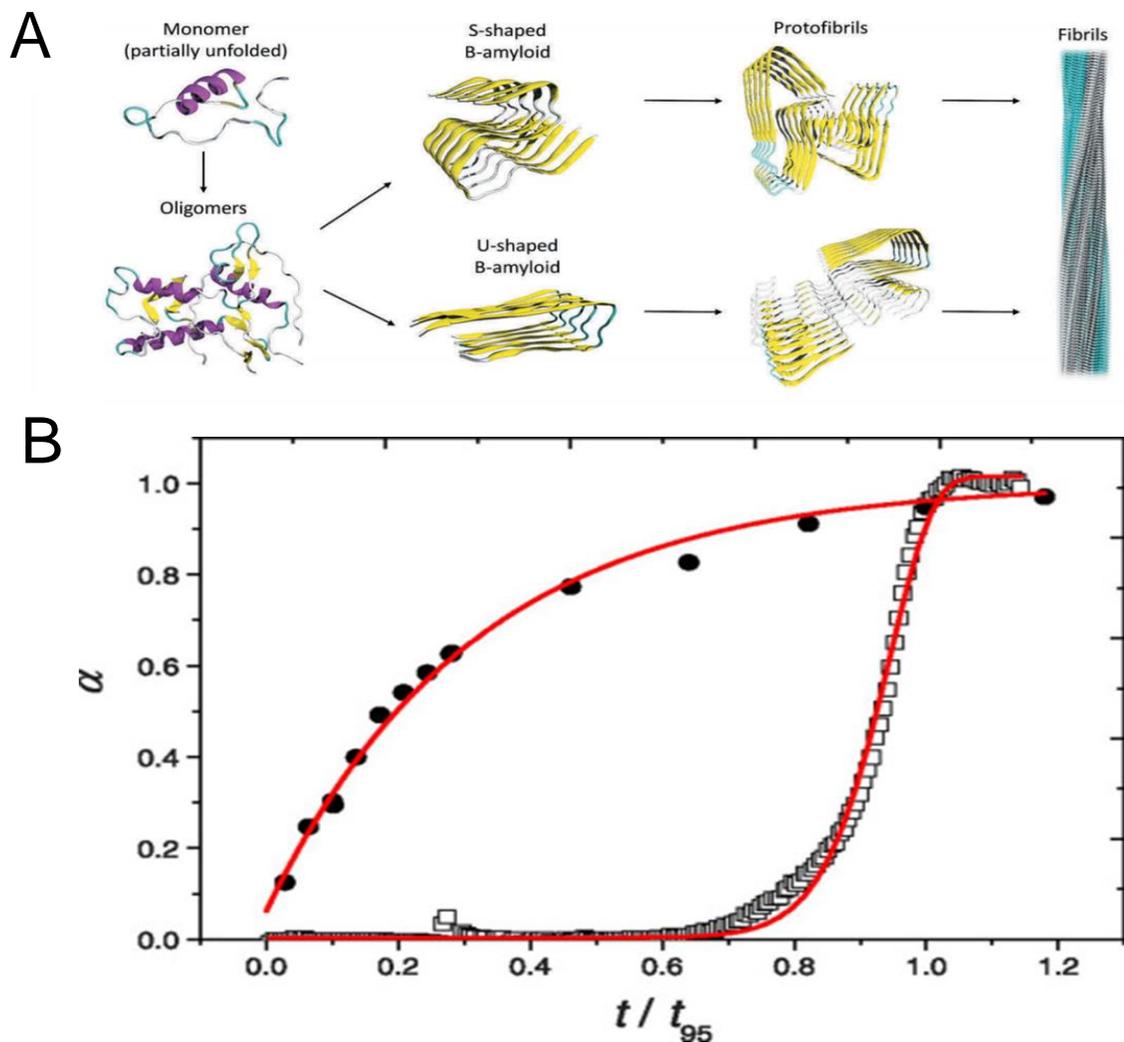


FIG. 4 CINÉTICA DE AGREGACIÓN DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE . (A) Representación estructural del monómero A β , oligómero, A β en forma de S, A β en forma de U, protofibrillas de A β . Imagen tomada de Tachi Y, et al., Biophys Physicobiol. 2022 (B) Señal de fluorescencia normalizada que representa la cinética de agregación típica sigmoidea (símbolos abiertos) e hiperbólica (símbolos cerrados) de las proteínas amiloides durante la amiloidogénesis. Imagen tomada de Crespo, et al, s, Advances in Physics 2012.

II.5 Principales efectos tóxicos de los oligómeros del péptido A β asociados a la dishomeostasis del Ca²⁺ a nivel intracelular.

Diversos estudios han sugerido que los agregados amiloides solubles (A β O_s) serían los principales responsables de la toxicidad amiloide y muerte celular (Figura 5A) (36-38). Los A β O_s son altamente polimórficos y de tamaño estable que depende del método de preparación, pudiendo alcanzar tamaños entre los 8-70kDa (39). Uno de los principales efectos de toxicidad inducidos por los A β O_s es su capacidad para inducir dishomeostasis del Ca²⁺ (36). En este contexto, se ha descrito que el influjo masivo de Ca²⁺ es capaz de desencadenar una serie de eventos asociados a una pérdida de la función mitocondrial, estrés crónico del RE, y en la alteración de la comunicación RE-mitocondria (33, 40, 41).

La disfunción mitocondrial puede llevar a una falta de energía en las neuronas, contribuyendo al daño y muerte celular (42). Las mitocondrias son organelos dinámicos que cambian su forma y distribución en respuesta a las necesidades energéticas y ambientales (42). La dinámica mitocondrial implica procesos de fisión y fusión, regulados por proteínas como Mitofusina, OPA1, DRP1 y Fis1 (42, 43). En la EA, se observa particularmente que los A β O_s son capaces de inducir desbalance en los procesos de fisión y fusión que induce un fraccionamiento de mitocondrias; particularmente un aumento de la fracción fosforilada de proteínas de fisión pDRP1 616 (38, 44).

Adicionalmente, se ha observado que los A β O_s son capaces de inducir un aumento en la transferencia de Ca²⁺ desde el RE hacia las mitocondrias, asociada a una mayor interacción entre los canales IP₃R-VDAC1 (41, 45). En este contexto, otro componente importante en la homeostasis del Ca²⁺ intracelular son las "membranas asociadas a mitocondrias" (MAMs), regiones ricas en colesterol donde las membranas de las mitocondrias se localizan de forma continua con las membranas del RE en distancias menores a los 40nm (46), consenso que ha sido tomado en la literatura como un parámetro de descripción para identificar estas estructuras. Las MAMs son consideradas como "plataformas bioquímicas" que facilitan el intercambio de Ca²⁺ y de lípidos, entre el RE y las mitocondrias, regulan la función mitocondrial, y la respuesta al estrés del RE (46).

Como se mencionó anteriormente, uno de los principales efectos de los A β O_s como agente estresor se relacionan con su capacidad para desencadenar estrés oxidativo y la activación crónica de la respuesta al estrés en el RE (UPR) mediante la sobrecarga del Ca²⁺ intracelular mediado por la activación de canales glutamatérgicos (47, 48). Esto resulta en un aumento en la liberación de Ca²⁺ desde el RE hacia el citoplasma a través de los canales RyR e IP₃R, así como en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y una falla en la función de la mitocondria (47, 49). En este contexto, se han observado alteraciones en múltiples complejos proteicos que participan en la regulación de la función mitocondria y del RE en modelos animales de la EA (Tabla 1).

Por lo cual, el aumento en la transferencia de Ca^{2+} asociada a los procesos de disfunción mitocondrial y estrés crónico del RE resultante, desempeñarían un papel significativo en la patogénesis de la EA.

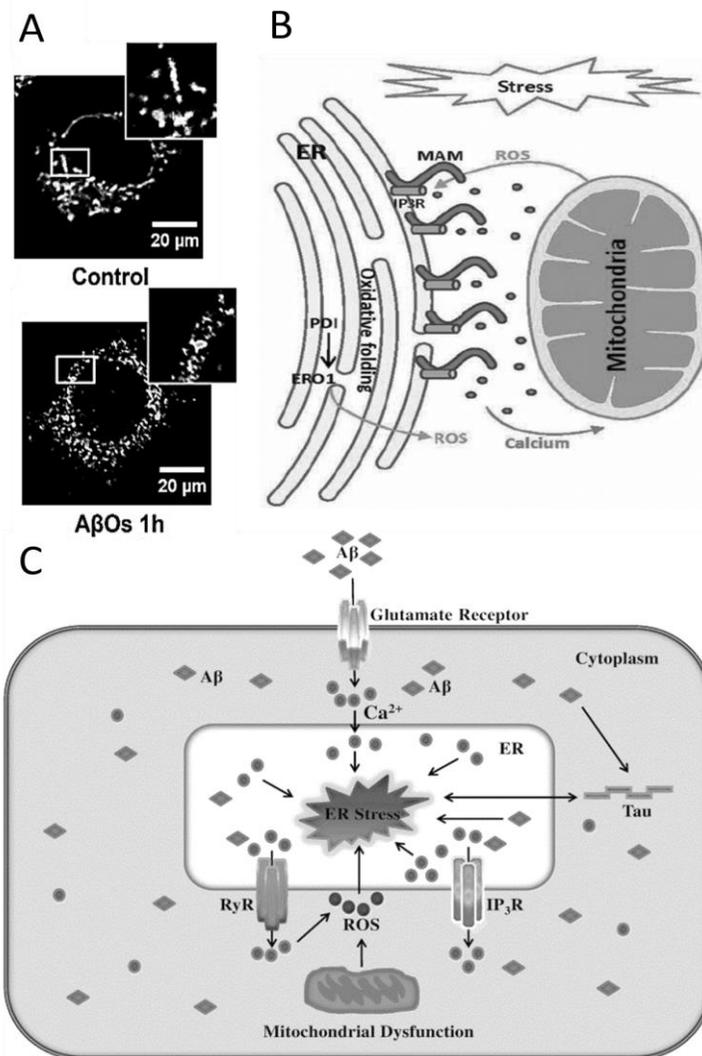


FIG. 5 PRINCIPALES EFECTOS TÓXICOS DE LOS ABOS ASOCIADOS A LA DISHOMEOSTASIS DEL CALCIO A NIVEL DE MITOCONDRIA Y RETICULO ENDOPLÁSMICO. (A) En neuronas tratadas con AβOs se observa una falla en la dinámica mitocondrial. Panes et al., Front Pharmacol. 2020. (B) Alteraciones en la comunicación RE- mitocondria es un evento clave en la inducción de la muerte celular. Dandekar et al., Stress Responses, 2015. (C) Los AβOs son capaces de inducir estrés del RE.. Uddin, M.S., et al., Mol Neurobiol, 2020.

Tabla 1. Alteraciones en complejos proteicos que participan en la regulación de la función mitocondria y del RE en modelos animales de la EA

Proteína	Alteración	Modelo de estudio
MFNs	Polimorfismo	Pacientes con EA
	↓MFN2 & MFN1 (proteínas y mRNA)	Cerebro con EA (hipocampo & corteza frontal) & células N2a APP ^{swe}
	↑MFN2	Células híbridas (cíbridas) citoplasmáticas MCI
	↑MFN2↔PS2 (FAD), ↑MAMs	MFN2 KO MEFs Animales FAD PS2 (N141I)
IP ₃ R-Grp75-VDAC	↑VDAC	Animales Tg2576 and J20
	Aβ↔VDAC	animals APP, APP/PS1, 3xTgAD & cerebros de pacientes con EA (tejido cortical)
	pTau↔VDAC	
	↑VDAC, ↑IP ₃ R actividad, ↑MAMs	Neuronas del hipocampo tratadas con Aβ
	VDAC defosforilación	Cerebros EA
	↓Grp75	Cerebros EA (corteza parietal y temporal)
	FAD PS1/2↔IP ₃ R	Células Sf9
PACS2-PSS1	↑PACS2, ↑PSS1	Animales APP ^{swe} /LDN corteza pacientes EA
BAP31-FIS1-DRP1	↑Fis1, ↑Drp1	cerebros de pacientes con EA (corteza frontal)
	↑Drp1↔Fis	Neuronas tratadas con Aβ42, fibroblastos SAD/FAD, N2a "OE" APP ^{swe} y ratones 5xTgAD
	pTau↔Drp1	Cerebros AD, ratones APP, APP/PS1 y 3xTgA. <i>Drosophila</i> "OE" Tau R406W
	↓Drp1 mito localización	Cerebros AD (corteza frontal)
	Aβ↔Drp1	
VAPB-PTPIP51	↓VAPB, ↓PTPIP51	Cerebros AD (subiculares con neuronas GVB) Cerebros AD (corteza)
	↓VAPB↔PTPIP51	
Sig-1R-Grp78	↓Sig-1R	cerebros con AD
	Sig-1R polymorfismo	pacientes con AD
	↑Grp78	Modelo de estreptozotocina, ratones APP/PS1 y ratas tratadas con Aβ25-35
	↓Grp78 mRNA =Grp78 expresión	AD cerebros (FAD PS1) ratones 5xFAD
PERK	↑vía PERK	Cerebros AD Ratones 5xFAD Ratones APP/PS1, APP(SL)/PS1 KI y rTg4510 Ratones APOE4
IRE1α	↑ vía IRE1α, ↑↓XBP1s	Cerebros AD y ratones 5xFAD SH-SY5Y y CHO "OE" tratados con Aβ42o APPLDN
S1T	↑S1T	Cerebros AD, SHSY-5Y "OE"APP ^{swe} o tratados con AβOs

Estas alteraciones incluyen expresiones reducidas (↓), aumentadas (↑), sin cambios (=) o interacciones (↔) entre proteínas observadas en modelos de estudio de AD y muestras derivadas de seres humanos. Imagen tomada de Int J Mol Sci. 2020.

II.6 Roles biológicos de la transamidasa tisular tipo 2

La transamidasa tisular tipo 2 (TG2) es un miembro de la familia de enzimas transamidantes (TG) dependientes de Ca^{2+} , que comprenden una familia de 8 proteínas, incluidas el factor XIII (FXIII), TG1, TG2, TG3, TG4, TG5, TG6 y TG7 (50). El gen que codifica para la TGM2 se localiza en el cromosoma 20q11-12 y consiste en 40 kb, los cuales se transcriben en un ARN primario de 5 kb que contiene 13 exones y 12 intrones (51). La TG2 se expresa abundantemente en el cerebro humano, incluidas las neuronas, vasos y capilares (110). La mayor parte de la proteína se encuentra en el citoplasma, la membrana plasmática y la matriz extracelular (110). Adicionalmente, se ha encontrado porciones de TG2 en el núcleo y la mitocondria (52).

La TG2 exhibe múltiples dominios funcionales que están reguladas de manera independiente. incluida la actividad transamidante (TGasa), proteína disulfuro isomerasa, proteína quinasa y la GTPasa (Figura 6A) (53). Estructuralmente, TG2 se compone de cuatro dominios: un sándwich β NH₂-terminal que contiene sitios de unión de integrina, un dominio central catalítico que contiene una tríada catalítica (Cys277, His335 y Asp358) para la reacción de transferencia de acilo, y dos COOH-terminales. β -barriles (Figura 6 B) (54).

La actividad de la TGasa está regulada por la apertura del dominio central catalítico, cuyo cambio conformacional hacia una conformación “abierta” está determinado principalmente por la concentración de Ca^{2+} y GTP (54). Se ha

observado que los niveles intracelulares de Ca^{2+} libre (sub-microM) y GTP (~100-150 mM) mantienen a la TG2 en un estado latente (55). Se ha observado que cambios en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} son suficientes para inducir su estado activo (55). También la actividad TGasa es sensible al estrés oxidativo, donde un es capaz de aumentar su actividad frente a incrementos en la producción de ROS y de óxido nítrico (56). Además, el estado redox intracelular y extracelular regula la activación de la TG2, donde la alta concentración de Ca^{2+} en el espacio extracelular está asociada a una actividad constitutiva, sin embargo, en ambientes oxidante, la TG2 puede sufrir una inactivación como resultado de la formación de enlaces disulfuro intramoleculares (57).

A nivel intracelular, se ha correlacionado un desbalance en la conformación abierta/cerrada de la TG2, hacia un incremento de la actividad TGasa, con procesos de muerte celular frente estímulos excitotoxicos por glutamato y desacoplantes de la cadena transportadora de electrones (50, 58). Uno de los mecanismo que respaldan esta hipótesis podría estar relacionado con la modificación de proteínas específicas en condiciones de estrés celular por la TGasa, tales como p53 y NF- κ B (58). En resumen, la regulación de la actividad TGasa se ve influenciada por los niveles locales de Ca^{2+} , GTP y el estado redox, lo que subraya la complejidad de su modulación en diferentes contextos fisiológicos y patológicos.

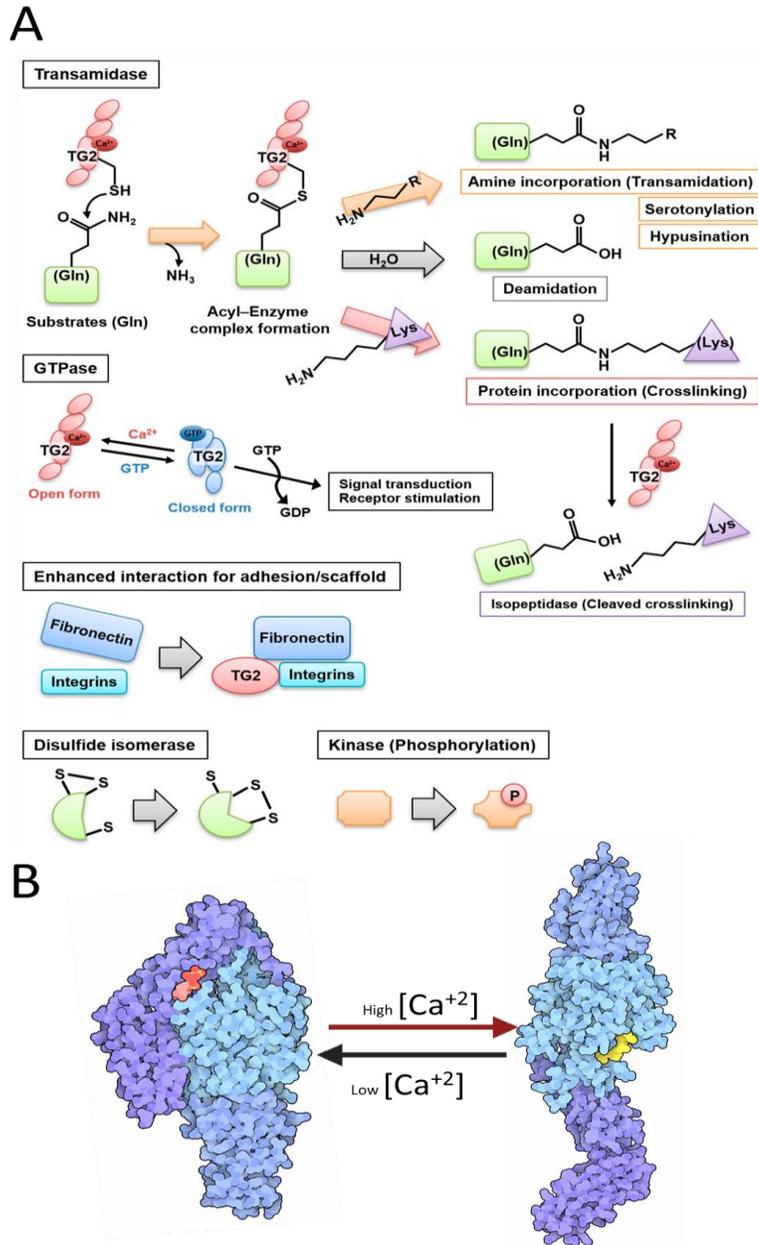


FIG. 6 FUNCIÓN CELULAR DE LA TRANSAMIDASA TISULAR TIPO 2 (A) TG2 contribuye a la modificación postraduccional de proteínas a través de múltiples mecanismos; transamidasa, GTPasa, proteína de adhesión, disulfuro isomerasa y quinasa. Imagen tomada de Tatsukawa H, Hitomi K. Cells. 2021. (B) Estados conformacionales cerrado y abierto de la TG2 mediado por la concentraciones de Calcio. Imagen modifica de Odii BO and Coussons P, The Scientific World Journal. 2014.

II.7 Agregación del péptido A β inducida por la actividad TGasa de la TG2

Estudios *in vitro* han utilizado técnicas bioquímicas y espectroscópicas para investigar los cambios conformacionales y las modificaciones post-traduccionales que sufre el péptido A β durante su proceso de agregación (59). Sin embargo, para que este proceso ocurra, se requieren concentraciones muy altas de A β , del orden de micromolar; estas concentraciones exceden significativamente los niveles normales presentes en el cerebro de personas con EA, que se encuentran en el rango de concentraciones nanomolares (60). En este contexto, se ha investigado la posible implicación de diversas chaperonas intracelulares que podrían propiciar en el proceso de agregación del péptido A β a las concentraciones fisiológicas (35), donde encontramos la ApoE, las Hsp70, y la transglutaminasa tisular (tTG o TG2) (61).

La actividad TGasa permite la generación de enlaces isopeptídicos γ -glutamil- ϵ -lisina, que pueden afectar la conformación y estabilidad de la proteína, y generar heterocomplejos proteicos altamente estables (50). Se ha establecido que la actividad TG2 está determinada por su capacidad de adoptar una conformación "cerrada" catalíticamente inactiva y una conformación "abierta" dependiente de Ca²⁺ (58). La conformación "abierta" da como resultado la accesibilidad del sitio activo, que es necesario para que se produzca la reacción de reticulación o entrecruzamiento de proteínas (Figura 7B) (58).

En la EA, tanto los niveles como la actividad de TG2 están elevados en la corteza de cerebros post mortem de pacientes con EA (62), y se ha detectado la presencia de enlaces isopéptidos de ϵ -(γ -glutamil)lisina elevados en el LCR (63). En el modelo animal APP23, se encontró que una porción de la TG2 catalíticamente activa colocaliza con placas de A β y A β vascular (64). En el mismo modelo, se observó que la delección del gen TG2 (APP23/TG2^{-/-}), redujo la formación de depósitos amiloide, pero no de los agregados solubles con estructura beta plegada (Figura 7A) (65).

Por otra parte, estudios *in vitro*, usando la enzima recombinante humana (rhTG2) previamente activada por Ca²⁺, mostraron que los péptidos A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₂ son sustratos para el entrecruzamiento de la actividad TGasa (Figura 7B) (63). Estos enlaces cruzados dan como resultado la formación de oligómeros/fibrillas de A β estables y resistentes a la proteasa Neprilisina (66), lo que sugiere un mecanismo por el cual la TG2 puede influir en la acumulación de agregados del péptido A β en el cerebro.

Estos hallazgos subrayan la importancia y el papel que podría tener la actividad TGasa de TG2 en el proceso de agregación y toxicidad de A β , y podrían contribuir a proporcionar una mayor comprensión de los mecanismos involucrados durante la progresión de la EA.

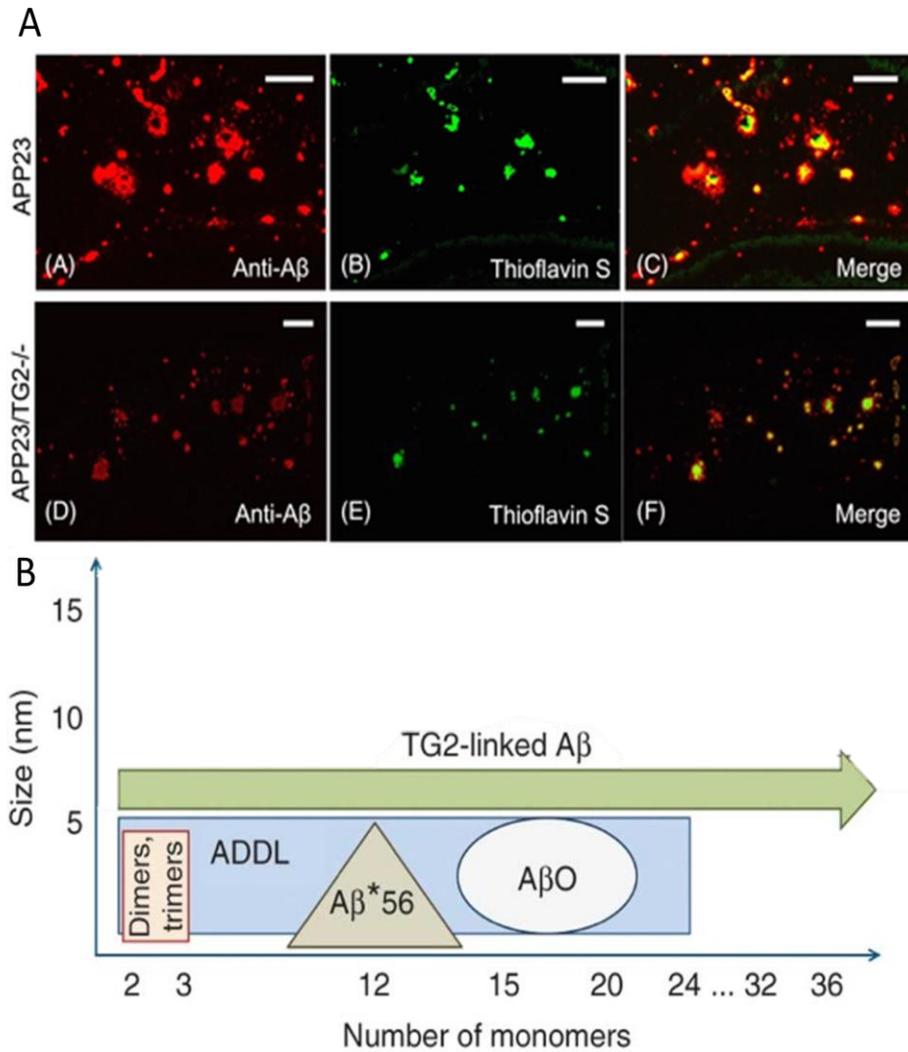


FIG. 7 ROL DE LA TRANSAMIDANTE TISULAR EN EL PROCESO DE AGREGACIÓN DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE. (A) La ausencia de transglutaminasa tisular reduce la deposición beta amiloide en ratones APP23. Wilhelmus MMM, et al., *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2022. (B) TG2 genera una amplia gama de oligómeros A β . Benilova, et al., *Nat Neurosci* 15, 2012

En base a lo discutido previamente y a resultados previos de nuestro grupo de trabajo, nos proponemos estudiar la implicancia de TG2 en la patogénesis de la EA. El establecimiento de un nuevo modelo enzimático de agregación de A β mediada por TG2 (A β _{TG2}) que induce fallas neuronales y mitocondriales, podría incrementar el conocimiento en los procesos celulares que puede llevar a la muerte neuronal. Los cambios conformacionales inducidos por Ca²⁺ que modulan TG2 y su interacción con A β , presentan un potencial mecanismo en los eventos tóxicos asociados a progresión de la EA.

Esta propuesta de investigación plantea varias preguntas fundamentales. Entre ellas se encuentran: (1) ¿Cuál es la actividad transamidante específica de la enzima TG2 en el hipocampo? (2) ¿Cómo influye en el comportamiento funcional y cinético de la enzima TG2 en la agregación del péptido A β ? (3) ¿Cuál es el impacto de los agregados de A β inducidos por TG2 en la función las mitocondrias, y en la actividad neuronal? (3) ¿Cuál es la correlación de la activación de TG2 con los procesos de disfunción mitocondrial en la EA?

Estas cuestiones son fundamentales para comprender los mecanismos subyacentes a la neurodegeneración y podrían arrojar luz sobre la posible implicación de la enzima TG2 en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas, como la EA.

III. Hipótesis

“El incremento de la actividad transamidante de TG2 potencia la agregación y la generación de especies tóxicas del péptido beta amiloide, induce disfunción mitocondrial y la falla sináptica en modelos neuronales de la Enfermedad de Alzheimer”

IV. Objetivos:

Objetivo general: Evaluar el rol de la actividad transamidante de TG2 en el mecanismo de toxicidad del péptido A β en la EA, centrándose en la disfunción mitocondrial y la falla sináptica como eventos clave de la EA.

Objetivos específicos:

Objetivo específico 1: Evaluar cambios en la actividad transamidante y los niveles de TG2 en modelos celulares y animales de la EA.

Objetivo específico 2: Caracterizar los efectos de la actividad transamidante de TG2 en el proceso de agregación y toxicidad del péptido A β , evaluando parámetros de función mitocondrial en neuronas de hipocampo.

Objetivo específico 3: Determinar los efectos de los agregados de A β inducidos por actividad transamidante de TG2 en la actividad sináptica en neuronas de hipocampo.

Objetivo específico 4: Evaluar cambios en marcadores clave de función mitocondrial en el modelo animal APP/PS1, sometido a un tratamiento crónico con el compuesto CP2.

V. Metodología:

Cultivos primarios de neuronas hipocampales.

Se utilizaron cultivos primarios de hipocampo de ratón. Los cultivos primarios de hipocampo se obtuvieron por disección de embriones de ratones C57BL WT de 18.5 días de gestación, sembrando las células obtenidas a una densidad de 4×10^5 células/ml. Las primeras 24 h las neuronas se mantienen en medio DMEM suplementado con 10% suero de caballo, 4 $\mu\text{g/ml}$ de DNasa y L-Glutamina 2 mM; pasado este tiempo se cambia el medio de cultivo por medio DMEM, el cual contiene suero de caballo (5%), suero bovino fetal (5%) y N3 (0,5%), un suplemento que contiene BSA (1 mg/ml), Apo-transferrina (20 mg/ml), putrescina (4 mg/ml), insulina (1,25 mg/ml), selenito de sodio (1 $\mu\text{g/ml}$), TH3 (2 $\mu\text{g/ml}$), progesterona (1,25 $\mu\text{g/ml}$) y Corticosterona (4 $\mu\text{g/ml}$); este medio es reemplazado cada tres días por medio fresco con la misma composición pero sin DNasa. Las neuronas fueron utilizadas entre 10 y 12 días *in vitro*.

Cortes de hipocampo de animales wild type y J20.

Los ratones transgénicos J20 se consideran un modelo animal altamente relevante y ampliamente utilizado para estudiar la EA debido a su capacidad para expresar dos formas mutantes de la proteína precursora de amiloide (APP_{sw}/APP_{ind}) humana (177). Estas mutaciones específicas en la APP

conducen a un aumento significativo en los niveles de péptido A β en el cerebro de estos ratones, donde la acumulación de placas amiloides en el cerebro de los ratones J20 generalmente comienza a ser detectable a partir de los 6-9 meses de edad (177, 178).

Los cortes de cerebro se obtuvieron de ratones C57BL WT y transgénicos J20 (Laboratorios Jackson). Todos los animales fueron procesados cumpliendo con las regulaciones éticas establecidas por los NIH y la Universidad de Concepción, y bajo los criterios 3B (basados en las pautas para el cuidado y uso de animales de la comunidad ética, bioética y de bioseguridad de la Universidad de Concepción). El número de aprobación ética para este estudio es CE667-2020. Se realizó una perfusión intracardiaca después de 24 h de una dieta líquida y bajo anestesia de Ketamina/Xilazina. Primero, se realizó una perfusión con solución salina (NaCl al 0,9%), y se utilizó una solución fijadora (paraformaldehído al 4%). Los cerebros de ratones fueron disectados y fijados *in situ* mediante perfusión vascular. Se cortaron secciones de 30 micrones del hipocampo utilizando un criostato y se suspendieron en PBS tamponada con 30 mM de sacarosa durante toda la noche.

Agregación de A β *in vitro*

Para la obtención de oligómeros de A β , se utilizó péptido sintético (rPeptide, Bogart, GA, USA) en su forma A β ₁₋₄₀, el cual se solubilizó en DMSO a una concentración de 2,3 mM; y se guardaron alícuotas de 2 μ l, las cuales se diluyeron en agua estéril para alcanzar una concentración de 80 μ M, las que posteriormente se sometieron a agitación vertical (800 rpm, 37 °C) por 120 min; la concentración final de trabajo de A β fue de 0,5 μ M en los cultivos. Para la obtención de agregados de A β (80 μ M) inducidos por TG2, se agregó 1 μ g/mL de TG2 humana recombinante (hTG2, Zedira) a la solución tampón que contiene 10 mM de Tris, 10 mM de ditioneitol (DTT), y 5 mM de CaCl₂, ajustado a pH 7,5, y se incubó durante 30 min a 37 °C. La concentración final de trabajo de A β fue de 0,5 μ M en los cultivos, misma concentración que el control con agitación. Como control de la reacción se utilizó un inhibidor de TG2 (ZDON, 30 nM, Zedira), la reacción se detuvo con EDTA (50 mM).

Análisis *in silico*

El ensayo de acoplamiento molecular *in silico* de los ensamblajes de A β con TG2 se realizó mediante el programa para acoplamiento de proteína-ligando ClusPro 2.0 (67), utilizando diferentes estructuras de péptido A β (1-42) obtenidas del Protein DataBank; Monómero A β (código PDB: 1IYT), dímero A β (código PDB:

5AEF), trímero A β (código PDB: 5HOX). Para TG2, usamos su conformación abierta para todos los acoplamientos (código PDB: 2Q3Z). Las fuerzas de atracción repulsivas (att) y las interacciones se midieron mediante análisis de acoplamiento molecular. Todas las imágenes se crearon con PyMol (versión 1.5, DeLano Scientific LLC).

Ensayo enzimático de la actividad transamidante

La actividad transamidante se refiere a la capacidad de la enzima transamidante de formar enlaces isopeptídicos entre un residuo de glutamina y una amina primaria. Los enlaces isopeptídicos resultantes permiten cuantificar de forma indirecta la actividad de TG2. Se utilizaron homogeneizados de proteína obtenidos a partir de 50 μ L de muestras de hipocampo de cada cerebro de animal por pocillo. En condiciones estándar, la actividad enzimática de la transamidante se cuantificó mediante un ensayo colorimétrico (Novus Biologicals # NBP1-37008). En breve, el protocolo consistió en los siguientes pasos (Figura 11A); (1) Las muestras se incubaron con 50 μ L de tampón de reacción que contiene los péptidos biotinilados (BiotinpepT26 /DTT/ CaCl₂) durante 30 minutos a 37 °C en pocillos de placas de microtitulación que contienen el sustrato de amina unido covalentemente. Se utilizó EDTA (50 mM) como control negativo. (2) Posteriormente, las placas se lavan con Tris-HCl y se incubaron con 100 μ L de Streptavidina-HRP (1:2000) durante 15 minutos a temperatura ambiente. (3) Se

agregaron 100 μL de 0,01% de H_2O_2 y TMB (tretametil bencidina) para la revelación. La reacción se detuvo con $2\text{NH}_2\text{SO}_4$. (4) La absorbancia se midió utilizando un lector de microplacas (96 pocillos, NOVOstar Labtech) y una longitud de onda de 450 nm.

Ensayo de unión de Tioflavina T

La agregación de $\text{A}\beta$ se realizó en una placa de 96 pocillos con 20 μM de Thioflavin T (ThT, Sigma-Aldrich). El proceso de agregación se siguió mediante mediciones de fluorescencia del complejo Thioflavin T- $\text{A}\beta$ (ex: 440 nm, em: 485 nm). Se realizó el ensayo de ThT con el péptido $\text{A}\beta_{1-40}$ para probar la autoagregación como se publicó anteriormente (38), y con TG2 (Thioflavin T- $\text{A}\beta$, Thioflavin T- $\text{A}\beta$ +Z-DON) incubado en tampón DPBS a 37 °C durante 24 h. Para $\text{A}\beta_{1-40}$ que no mostró tiempo de retardo, se realizó un ajuste de curva utilizando la ecuación $y(t) = a[1 - \exp(-kt)]$.

Microscopio de transmisión electrónica para agregados del péptido $\text{A}\beta$

Se aplicaron diez microlitros de $\text{A}\beta_{1-40}$ a una concentración de 80 μM en rejillas de Formvar recubiertas de carbono. Las muestras se fijaron con una solución al 2% de glutaraldehído durante 5 minutos y se expusieron a un anticuerpo coloidal contra el beta amiloide (MOAB-2, 1:50, 1 hora) y partículas de oro (10 nm) conjugadas con un anticuerpo secundario (ratón, 1:500). Los agregados se tiñeron con 5 μl de ácido fosfotungstico al 0.2% (p/v), y la rejilla se secó al aire.

Las muestras se examinaron utilizando un microscopio electrónico JEOL 1200 EX II.

Electrofisiología

La técnica de patch clamp de célula entera es un método altamente precisa y versátil que permite el estudio de corrientes iónicas en una célula. Consiste en colocar un microelectrodo de vidrio en contacto directo con la membrana celular, formando un sello hermético llamado "patch". Esto permite medir y controlar con precisión las corrientes eléctricas que fluyen a través de los canales iónicos presentes en la membrana, proporcionando información detallada sobre la función y propiedades de estos canales en la célula a nivel pre y postsináptico. Para la realización de todos los experimentos de electrofisiología, se utilizó el amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments, EE. UU.). Para comenzar, se realizaron incubaciones con $A\beta_{TG2}$ y $A\beta_{TG2+Z-DON}$ a 37 °C en cultivos primarios de hipocampo, tratados a diferentes tiempos (30min, 1-24h). Posteriormente, se utilizó la configuración whole-cell y se fijó el voltaje de la membrana a -60 mV, de esta manera la apertura de los receptores provoca una disminución en la resistencia de la membrana y, por lo tanto, de acuerdo con la ley de Ohm, el equipo debe "inyectar" una corriente eléctrica proporcional para mantener el potencial de membrana fijo. Para los experimentos de actividad sináptica en miniatura, se utilizaron distintos bloqueadores específicos para aislar los

componentes inhibitorios; de esta forma se utiliza tetrodotoxina (TTX, 50 nM) para bloquear canales de sodio voltaje dependientes e inhibir los potenciales de acción, bicuculina (5 μ M) para inhibir receptores de GABA y aislar corrientes postsinápticas excitatorias (mEPSC).

Para mantener una corriente eléctrica neta igual a cero para la modalidad de "voltaje clamp", se utiliza una solución externa de composición fija (en mM: NaCl 150; KCl 5,4; CaCl₂ 2; MgCl₂ 1; Glucosa 10; HEPES 10; pH 7,4; osmolaridad 300 mOsm), en tanto que los microelectrodos de patch se llenan con solución interna de composición definida en mM: KCl 120; MgCl₂ 4; HEPES 10; ATP 2; GTP 0,5; pH 7,4; osmolaridad 300 mOsm). Para la modalidad de "current clamp", la solución externa y la solución interna son preparadas con diferentes concentraciones de iones para simular las condiciones fisiológicas normales. Por la cual, los microelectrodos de patch se llenan con solución interna de composición definida en mM: 114 KGluconate, 4 KCl, 4 MgCl₂, 10 BAPTA, y 10 HEPES (pH 7.4 ajustado con KOH, 290 mOsm/L) para la modalidad de "current clamp"; y tienen una resistencia aproximada de 4-6 M Ω . Para estudiar el potencial de membrana (V_m), se evocaron los potenciales de acción (PA) utilizando una serie de pulsos de corrientes continuos aplicados durante 300 ms (de -300 pA a +275 pA, aumentando en pasos de 25 pA).

La cuantificación de las corrientes miniatura y PAs se realizó con la ayuda del software Clampfit 10.1, en el caso de las corrientes miniatura se detectaron los eventos de forma semi-automática y se registró su amplitud y otros parámetros cinéticos (tau, frecuencia, densidad de corriente); los cuales fueron posteriormente evaluados para analizar diferencias entre las diferentes condiciones. Las PAs se analizaron de manera similar, donde se obtienen los valores de Rheo base y número de APs total.

Microfluorimetría Ca^{2+}

Para los análisis de dinámicas de Ca^{2+} intracelular, se utilizó la técnica de microfluorimetría. Se usaron las sondas FLUO-4-AM™ 5 μM (Invitrogen, MA, USA) y Rhod-2 AM 3 μM (Thermo Fisher Scientific) con espectros de excitación/emisión 480nm/520nm, y 552/581 nm, respectivamente.

La sonda Rhod-2 AM es una molécula sensible al Ca^{2+} que se acumula selectivamente en las mitocondrias. Una vez dentro de las células, la Rhod-2 AM se desacetila por las enzimas intracelulares y se une al Ca^{2+} , generando una señal fluorescente proporcional a la concentración de Ca^{2+} presente en las mitocondrias (68). En tanto Fluo-4 se carga en las células y se une al Ca^{2+} citosólico, generando una señal fluorescente proporcional a los niveles de Ca^{2+} en el citosol (69).

Se incubaron las sondas durante 20 min en PBS utilizando condiciones de incubación estándar. Posteriormente, las células se lavaron 20 min con PBS y 3 veces con solución externa normal (SEN), y luego se montaron en un microscopio invertido.

Se utilizó un microscopio invertido Nikon Eclipse TE2000-U (Nikon, Tokio, Japón) acoplado a una cámara EMCCD Ixon+ (Andor, Belfast, Irlanda); el control de iluminación fue realizado por medio de un Shutter Lambda 10-B (Sutter Instrument Co, Novato, CA, USA), la fuente de iluminación fue una lámpara de Arco de mercurio, utilizando un filtro de excitación de 480 nm y un filtro de emisión de 520 nm. La adquisición de datos, manejo de cámara y shutter, y análisis de fluorescencia se llevaron a cabo con el programa Imaging Workbench 6.0 (Indec BioSystems, Santa Clara, CA, USA). En los experimentos la fluorescencia se midieron cada 30 s, con 200 ms de exposición, para un total de 3000 s; y los valores se expresaron como $\Delta F/F_0$. ΔF es la diferencia entre la fluorescencia medida en un tiempo específico y la fluorescencia basal (F_0).

Viabilidad celular.

Para evaluar cambios en la viabilidad celular se utilizó la técnica de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), la cual mide la capacidad reductora de las mitocondrias por medio de la acción de succinato deshidrogenasa, la que reduce la sal de MTT a formazán;

como una forma de medir la capacidad redox y el número de células metabólicamente activas. Para los ensayos se sometieron a las células a las distintas condiciones experimentales y posteriormente se adicionó el reactivo MTT (1mg/ml) disuelto en PBS y se incubó durante 30 min a 37 °C. Posteriormente la sal de formazán se solubilizó con 100 µl de 2-propanol. Finalmente, se utilizó un multi-lector de placas NovoStar (BMG Labtech, Offenburg, Alemania) que lee la absorbancia a 620 nm (formazán) y 560 nm (MTT), a la absorbancia de formazán se le resta la absorbancia de MTT).

Inmunocitoquímica

Las células fueron lavadas con PBS1X y fijadas con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,1% y se bloquearon con suero de caballo al 10% durante 30 minutos a TA. Las muestras se incubaron durante 1 hora a TA con los anticuerpos primarios: anti-TG2 (Cell signaling, 1:200, D11A6, conejo), anti-MAP1B (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Cat# sc-8970, RRID: AB_649156, cabra), anti-SV2 (119 002, SYSY), y anti-A β (1:200, MOAB-2, NBP2-13075 Novus, USA, ratón). Luego de lavar por triplicado con PBS, se incubaron los correspondientes anticuerpos conjugados con Cy3, Cy5 o Alexa Fluor 488 durante 45 minutos. Luego, las muestras se incubaron con tinción nuclear DAPI de 300 nM durante 10 minutos y se montaron utilizando el medio de montaje de

inmunofluorescencia DAKO (Dako, Glostrup, Dinamarca). Las imágenes se adquirieron utilizando un microscopio confocal LSM780 NLO (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Alemania), un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse TE2000-U y equipo Zeiss SR-SIM (modelo Elyra S1), que estaba equipado con un láser DPSS de diodo (488 y 561 nm de excitación). Se utilizó un objetivo de inmersión en aceite 63X/1.4 NA con una lente adicional de 1.6X, lo que explica el aumento total de 1008X. Las imágenes se procesaron, cuantificaron con Image J (NIH, Bethesda, MD, USA) y se deconvolucionaron considerando los siguientes parámetros: índice de refracción del aceite de inmersión (1,518), apertura numérica del objetivo (1,4) y longitud de onda (510 nm).

Inmunohistoquímica

Las muestras fueron fijadas en PFA-PBS al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de ser enjuagadas en PBS y luego incubadas en Solución de Bloqueo/Permeabilización (0,3-0,5% Tritón X-100 + 10% Suero de Caballo + PBS) durante 1 hora. Se incubaron anticuerpos anti-TG2 (Cell signaling, 1:200, D11A6), anti-MAP1B (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Cat# sc-8970, RRID: AB_649156) y anti-beta amiloide (Novus Biologicals, 1:200, MOAB-2) durante la noche a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Después de los lavados por triplicado con PBS, las láminas se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios conjugados con AF488 o Cy5 (1:200;

Jackson Immuno Research, PA, USA) y el tinte fluorescente nuclear To-pro-3. Posteriormente, las muestras fueron lavadas 5 veces durante 3 minutos, y montadas con medio de montaje fluorescente DAKO. Las secciones y células fueron analizadas con un microscopio láser confocal LSM780 NLO Zeiss.

Evaluación de contacto ER-mitocondria usando PLA

El ensayo de proximity ligation assay (PLA) *in situ* Duolink II (Olink Bioscience) permite evaluar la proximidad de dos proteínas y su interacción potencial (<40 nm) como un punto fluorescente individual bajo el microscopio. Se trataron las células durante 24h con taspigargina 2 μM y $\text{A}\beta_{\text{TG2}}$ 0.5 μM . La fijación celular y la permeabilización se realizaron de manera similar a la del experimento de inmunofluorescencia. El bloqueo se realizó con Triton X-100 al 0,1 % en PBS con BSA al 5 % durante 1 h a temperatura ambiente. Incubaciones con los anticuerpos (VDAC1 e IP_3R -1, 1:100 en Triton X-100 al 0,1 % en PBS con BSA al 5 %) se realizaron durante la noche a 4 °C en una cámara húmeda. Se usaron las sondas de PLA secundarias PLUS y MINUS, conjugadas a inmunoglobulinas de conejo diluidas en Triton X-100 al 0,1 % en PBS con BSA al 5 %, durante 1 hora a 37 °C. Los portaobjetos se incubaron con la mezcla de ligadura Duolink durante 30 min a 37 °C, y se aplicó la mezcla de amplificación Duolink a los portaobjetos durante 100 min a 37 °C. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Las secciones y células fueron analizadas con un microscopio láser confocal LSM780

NLO Zeiss, y las señales se cuantificaron usando el software BlobFinder y se expresaron como el porcentaje de gotas por núcleo en comparación con los controles.

Mediciones de potencial de membrana mitocondrial

Las neuronas hipocampales se incubaron con la sonda JC-1 (Invitrogen), que permite evaluar el estado del potencial de membrana mitocondrial en las células. El mecanismo de acción de la sonda JC-1 se basa en su capacidad para acumularse selectivamente en las mitocondrias y cambiar su fluorescencia en función del potencial de la membrana mitocondrial (70). La sonda fue incubada durante 15 min a 37 °C y 5 % de CO₂ y luego se lavaron tres veces con una solución externa normal. Para medir los cambios en el potencial de membrana, se utilizaron placas de 96 pocillos y se registró la relación entre la emisión roja (590 nm) y la emisión verde (520 nm) utilizando un lector de placas llamado NOVOstar de la marca BMG Labtech. Esta relación entre las emisiones roja y verde puede proporcionar información sobre el estado del potencial de membrana en las neuronas. Posteriormente, las células fueron tratadas con A β _{TG2} (0.5 μ M), Z-DON (un compuesto específico) o una combinación de ambos, y se registraron los cambios en la fluorescencia durante un período de 30 minutos.

Ratones y tratamiento crónico *in vivo* con CP2 en el modelo animal

APP/PS1

Los ratones transgénicos APPPS1 son un modelo animal altamente relevante y ampliamente utilizado para estudiar la Enfermedad de Alzheimer (EA) debido a que expresan mutaciones en el gen de la proteína precursora de amiloide (APP) en conjunto con la proteína presenilina 1 (PS1). Estas mutaciones combinadas (APP^{swe} y PS1^{ΔE9}) desencadenan un aumento significativo en los niveles de péptido A β en el cerebro de estos ratones (71).

CP2 fue sintetizado por la compañía de biotecnología Nanosyn, Inc. y purificado mediante HPLC. Se utilizaron los siguientes ratones hembra: doble transgénico APP/PS1 y sus compañeras de camada no transgénicos (NTG) (72). A los ratones hembra NTG y APP/PS1 (n = 16–21 por grupo) se les administró CP2 (25 mg/kg/día en polietilenglicol [PEG] al 0,1 % disuelto en agua potable ad lib) o agua que contenía vehículo (0,1 % PEG) a partir de los 9 meses de edad.. La concentración de CP2 se ajustó semanalmente en función del peso del ratón/consumo de agua. Grupos independientes de ratones fueron tratados continuamente durante 14 meses hasta la edad de 23 a 24 meses. Después de sacrificar los ratones, se recolectó tejido cerebral para análisis de Western, secuenciación de ARN y examen de microscopía electrónica.

Microscopía electrónica de barrido de cara de bloque en serie (SBFSEM)

Los ratones NTG (n = 3), APP/PS1 (n = 3), APP/PS1 + CP2 (n = 3) fueron sacrificados mediante dislocación cervical y procesadas para la técnica de SBF utilizando el siguiente protocolo: (1) Desde el cerebro completo la región CA1 fue disectado rápidamente (<2 minutos), cortada en piezas de 2 mm³ y transferida inmediatamente a una placa con fondo de vidrio que contiene glutaraldehído al 1% + paraformaldehído al 4% en buffer fosfato 0.1 M (fijador de Trump). (2) Después de 24 h de fijación, los tejidos se colocaron en buffer fosfato 0.1 M y se almacenaron a 4 °C hasta su procesamiento para SBFSEM. (3) Las muestras se enjuagaron 4 veces durante 3 minutos en buffer de cacodilato 0.1 M + CaCl₂ 2 mM. (4) Las muestras se incubaron en tetróxido de osmio al 2% en buffer de cacodilato 0.15 M durante 1.5 h rotando a temperatura ambiente. (5) Posteriormente se incubaron en tetróxido de osmio al 2% + ferrocianuro potásico al 2% en buffer de cacodilato 0.1 M durante 1.5 h rotando a temperatura ambiente. (6) Luego, se enjuagaron en H₂O 4 veces durante 3 minutos (7) Las muestras se incubaron en tio-carbohidrazida al 1% (TCH) durante 45 minutos a 50 °C. (8) Luego se enjuagaron en H₂O 4 veces durante 3 minutos. (9) Posteriormente se incubaron en tetraóxido de osmio al 2% fresco en H₂O durante 1.5 h rotando a temperatura ambiente. (10) Luego se enjuagaron en H₂O 4 veces durante 3 minutos. (11) Posteriormente se incubaron en acetato de uranilo acuoso al 1% durante la noche a 4 °C, y durante 1 hora a 50 °C. (13) A continuación se enjuagaron en H₂O 4 veces durante 3 minutos. (14) Luego se

incubaron en aspartato de plomo durante 1 hora a 50 °C. (13) Nuevamente se enjuagaron en H₂O 4 veces durante 3 minutos. (15) Posteriormente se deshidrataron mediante una serie de etanol (60, 70, 80, 95, 100, 100%) durante 10 minutos cada uno. (16) Luego de realizaron dos enjuagues con en acetona al 100% durante 10 minutos cada uno, y resina Durcapan (EMS, Hatfield, PA) 1:2, 1:1, 3:1 en acetona durante 0.5 h, 1 h, 2 h, y durante la noche en resina al 100%. (17) El tejido se recortó de toda la resina circundante y se adhirió a pines de aluminio de 8 mm (Ted Pella Inc., Redding, CA) utilizando epoxi de plata EpoTek (EMS, Hatfield, PA). (18) Se recortó una torre cuadrada (0.5 mm) del tejido utilizando una cuchilla ultratrim Diatome (EMS, Hatfield, PA) y se recubrió todo el pin con oro paladio. (19) Después del recubrimiento, el bloque se recortó a una superficie plana utilizando una cuchilla de diamante y el pin se montó en el microtomo SEM. (20) Las imágenes de bloque de corte serial se adquirieron utilizando un Volumescope Thermo Fisher (Thermo Fisher, Inc., Waltham, MA) a profundidades de sección de 50 nm, con una tensión de aceleración del detector de 1.5 kV.

Para cada región de interés (ROI), se obtuvieron, registraron y filtraron 300-400 secciones por muestra. Todas las imágenes utilizadas para el análisis se ajustaron a una magnificación de $\times 5000$. Las imágenes para las reconstrucciones 3D de EM se obtuvieron utilizando un microscopio electrónico ApreoVolumeScope (Thermo Fisher Scientific) que combina un microtomo de

bloque de corte serial integrado (SBF) y una alta resolución de imágenes de barrido de emisión de campo (SEM).

Segmentación de imágenes y análisis morfométrico mediante AMIRA

La segmentación y el análisis tridimensional se realizaron utilizando el software Reconstruct (SynapseWeb) y Amira 6.4 (Thermo Fisher, Inc., Waltham, MA). Las dendritas, mitocondrias, ER y MAMs se segmentaron manualmente. Se utilizaron las herramientas “Pincel” y “Lazo” en el modo de segmentación de Amira para seleccionar cada objeto. Se tomaron entre 62 y 100 mitocondrias en el análisis para cada grupo. Múltiples conjuntos de datos se renderizaron en volumen simultáneamente, y a cada estructura celular se le asignó un color diferente durante el proceso de segmentación utilizando la selección basada en el umbral 3D.

El análisis cuantitativo de la morfología mitocondrial se llevó a cabo utilizando las funciones de la herramienta de medición y análisis de etiquetas en la vista del proyecto Amira para obtener parámetros relacionados con la forma mitocondrial (longitud, volumen, relación de aspecto, esfericidad). La longitud se estimó usando el ícono de la regla en la vista del Proyecto Amira, en función de la distancia entre los dos puntos más distantes en un objeto 3D. El volumen se estimó utilizando medidas predeterminadas en Amira Native Measurements y se midió en μm^3 . La relación de aspecto (AR) se calculó como [(eje mayor) / (eje

menor)], que refleja la "relación de largo a ancho". La SA para cada objeto se estimó automáticamente y se midió utilizando los parámetros nativos de Amira basados en el área total de todas las caras mitocondriales.

La siguiente clasificación para los tipos mitocondriales observados en las dendritas se adaptó de (73): Tipo I: forma redonda, no más de 0,5 μm ; Tipo II: de tamaño medio, con un túbulo mitocondrial de 0,5 a 5 μm de longitud pero no mayor de 5 μm ; Tipo III: alargado, con un túbulo mitocondrial de 5 μm o más; Tipo IV: mitocondrias en una cuerda (MOAS), orgánulos alargados interconectados con más de una mitocondria en forma de lágrima ($\sim 0,5$ μm de diámetro) conectadas por una membrana doble delgada que se extiende hasta 5 μm de largo (uniformemente ~ 65 nm en diámetro). La longitud y el volumen de MAMs se establecieron utilizando la herramienta de medición en la vista del proyecto Amira. La distancia máxima entre cualquier segmento del RE y una mitocondria se fijó en 25 nm para que se considere un área yuxtapuesta de la interfaz mitocondria-RE. Para medir la longitud del contacto, se dibujó una línea a mano alzada desde el principio hasta el final del contacto mitocondria-ER que se consideró antes. Estos valores luego se promediaron para generar la longitud de los sitios de contacto para una muestra dada. Para estimar la cobertura mitocondrial con MAMs, calculamos el porcentaje de perímetro mitocondrial cubierto por el área de MAMs individual.

Western blot

Se determinaron los niveles de proteínas en la región hipocampal de cerebro o en fracciones enriquecidas de mitocondrias obtenidas de las regiones hipocampales del cerebro (n = 3-4 ratones por grupo). Las muestras fueron homogeneizadas y lisadas utilizando buffer RIPA 1x más inhibidores. Los lisados de proteínas totales (20 µg) se separaron en volúmenes iguales en geles de proteínas Mini-PROTEAN TGX™ 4-20% (Bio-Rad, Hercules, CA, USA, cat. # 4561096) y se transfirieron a una membrana de PVDF (cat. # 1620177). Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: Drp1 (1:1000, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), fosfo-Drp1 S616 (1:1000, Cell Signaling, Danvers, MA, USA, cat. #3455), OPA1 (1:1000, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, cat. #BDB612607), Mfn1 (1:1000, EMD Millipore, Burlington, MA, USA, cat. #ABC41-M), Mfn2 (1:1000, Sigma, Burlington, MA, USA, cat. # M6444-200UL), Vdac1 (1:1000, Proteintech, Rosemont, IL, cat. #55259-1-AP), Tfam (1:1000, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA, cat. # AV36993), Tfeb (1:500, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA, cat. # PA5-75572), LC3b (1:1000, Novus Biologicals, Centennial, CO, USA, cat. # NB100-2220), Pink1 (1:1000, Novus Biologicals, cat. #BC100-494), Parkin (PRK8) (1:1000, Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA, cat. #sc-32282), Anti-TG2 (Cell signaling, 1:200, D11A6) y β-Actina (1:5000, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA, cat. # A5316). Se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios: Anticuerpo secundario de cabra Anti-Conejo IgG peroxidasa (HRP) (H+L) (dilución 1:5000, Jackson ImmunoResearch, West

Grove, PA, USA, cat. #111-035-003); y Anticuerpo secundario de cabra Anti-Ratón IgG peroxidasa (HRP) (H+L) AffiniPure (dilución 1:5000, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA, cat. #115-035-003). La cuantificación de las bandas se realizó utilizando el sistema de imagen ChemiDoc de Bio-Rad. El análisis de datos se realizó utilizando el software Image J.

Fraccionamiento mitocondrial

Este protocolo fue adaptado de (74) con algunas modificaciones. Se añadieron inhibidores de proteasa y fosfatasa al tampón para evitar la degradación y desfosforilación de proteínas. La región de hipocampo fue lavada con solución salina tamponada con fosfato (PBS) helada para eliminar el exceso de sangre. El tejido se suspendió en tampón de aislamiento mitocondrial (MIBA) que contenía Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM, D-manitol 0,2 M, sacarosa 0,05 M, ortovanadato de sodio 0,5 mM, fluoruro de sodio 1 mM y proteasa completa 1x, y cóctel inhibidor de fosfatasa (Roche, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, EE. UU., nº de catálogo 1169749800), y se homogeneizó con 10-20 golpes usando un mortero de teflón (velocidad del motor de 100). La fracción de núcleos crudos (CN) se sedimentó a partir del lisado mediante centrifugación a 500 x g a 4 °C durante 5 min. El sobrenadante restante se centrifugó a 500 x g a 4 °C durante 5 min para eliminar el debris nuclear. Luego, el sobrenadante se centrifugó a 8000 x g durante 10 min a 4 ° C, lo que produjo fracciones pesadas mitocondriales (sedimento MT) y citoplasmáticas (sobrenadante CY). El sedimento de MT se

lavó dos veces con tampón MIBA enfriado con hielo antes de resuspenderlo en el tampón de lisis. Se tomaron tres ratones de cada grupo experimental para su análisis.

Secuenciación de ARN de próxima generación

El tejido cerebral, que comprende la región hipocampal, se lisó en QIAzol (Qiagen, cat. # 79306) seguido de un aislamiento de ARN utilizando miRNeasy (Qiagen, cat. # 217004) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cantidad y calidad del ARN se midieron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop y el Bioanalizador Agilent 2100, respectivamente. Todos los RIN (números de integridad del ARN) tuvieron un valor mayor a ocho. Se utilizó ARN total (200 ng) para generar bibliotecas utilizando el kit de preparación de bibliotecas de ARN TruSeq v2 (Illumina). Todas las muestras se secuenciaron en el Mayo Clinic Medical Genome Facility (MGF) Sequencing Core mediante Illumina HiSeq 4000 con una longitud de lectura de extremo pareado de 101 pb. Se adquirieron aproximadamente 50 millones de lecturas de fragmentos individuales por muestra. Se utilizó MAP-RSeq v2.1.1, un completo conjunto de herramientas computacionales desarrollado, para analizar los datos de ARN-secuenciación. El paquete bioinformático R DeSeq2 se utilizó para el análisis de expresión génica diferencial.

Para el análisis de vías específicas, utilizamos un umbral flexible de cambio de \log_2 veces $\geq 0,2$ y valores de $p \leq 0,05$ como punto de corte. El enriquecimiento

de funciones génicas se determinó utilizando la base de datos DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, v. 6.8). Los factores de transcripción del ratón se descargaron de la base de datos genómica de Riken y se asignaron a nuestra lista de genes diferenciales de ARN-seq. Los mapas de calor de agrupamiento se generaron en función de un agrupamiento jerárquico no supervisado utilizando la distancia de correlación de Pearson. La mayoría de los gráficos se generaron utilizando programas personalizados de R. Disponibilidad de los datos de ARN-seq: (el ID de acceso GEO es GSE149248). Los diagramas de código de barras se generaron usando el paquete limma. Disponibilidad de datos de RNA-seq: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE149248> (el ID de acceso de GEO es GSE149248).

Análisis de datos

Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el software GraphPad Prism 6. La normalidad se verificó utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov o la prueba de Shapiro-Wilk, dependiendo del tamaño de la muestra. La significancia estadística se determinó utilizando la prueba t de Student no emparejada (para dos grupos) o el ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett (para comparaciones de múltiples grupos). Todos los datos experimentales se expresaron como media \pm SEM (a menos que se indique lo

contrario), donde n corresponde a réplicas independientes. Se utilizaron valores de p, grados de libertad (dF), valores F y/o t para cada gráfico. Se consideraron estadísticamente significativos los siguientes resultados: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. control, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ vs. la condición Z-DON o EDTA, ns: no significativo.

VI. Resultados:

1. 1. Aumento en niveles de TG2 en diferentes modelos animales y celulares de toxicidad amiloide.

En esta primera parte del objetivo evaluamos cambios en los niveles de TG2 en un modelo neuronal tratados de forma exógena con A β O s (Figura 8). Previamente hemos documentado que el tratamiento con los A β O s es capaz de replicar los aspectos clave de la enfermedad, incluyendo la disfunción mitocondrial, la alteración de la homeostasis del Ca $^{2+}$ y el deterioro sináptico (38). Por consiguiente, decidimos utilizar este modelo de toxicidad en neuronas hipocampales de ratón expuestas a tratamientos agudos, subcrónicos y crónicos con A β O s (0,5 μ M).

Mediante la técnica de Western blot en lisados celulares, detectamos una banda alrededor de 78 kDa correspondiente al tamaño de la proteína TG2 (Figura 8A). Esta banda fue detectada mediante el anticuerpo anti-TG2 (ver materiales y metodos) en condiciones de control, así como en neuronas expuestas a A β O s durante diferentes periodos (1, 6 y 24 h) (Figura 8B). Al analizar la inmunoreactividad de bandas correspondiente a TG2 en los lisados celulares tratados con A β O s crónicamente (24 h), observamos un aumento significativo de aproximadamente un 46% en comparación con las condiciones de control (Figura

8B). Sin embargo, en períodos de tiempo más cortos (1 h) o subcrónicos (6 h), se observó que esta proteína no aumentaba de manera significativa, lo que sugiere que el aumento de TG2 estaría asociado a una exposición prolongada a la injuria celular. Posteriormente, mediante la técnica de inmunocitoquímica (Figura 8C) observamos un incremento de la inmunorreactividad de TG2 en neuronas hipocámpales tratadas crónicamente con A β O $_2$ en comparación con las células control, utilizando MAP2 como marcador neuronal ($34\% \pm 1$, Figura 8D). Estos hallazgos respaldan la idea de que la exposición prolongada a A β O $_2$ está relacionada con un aumento en los niveles de TG2 en este modelo neuronal.

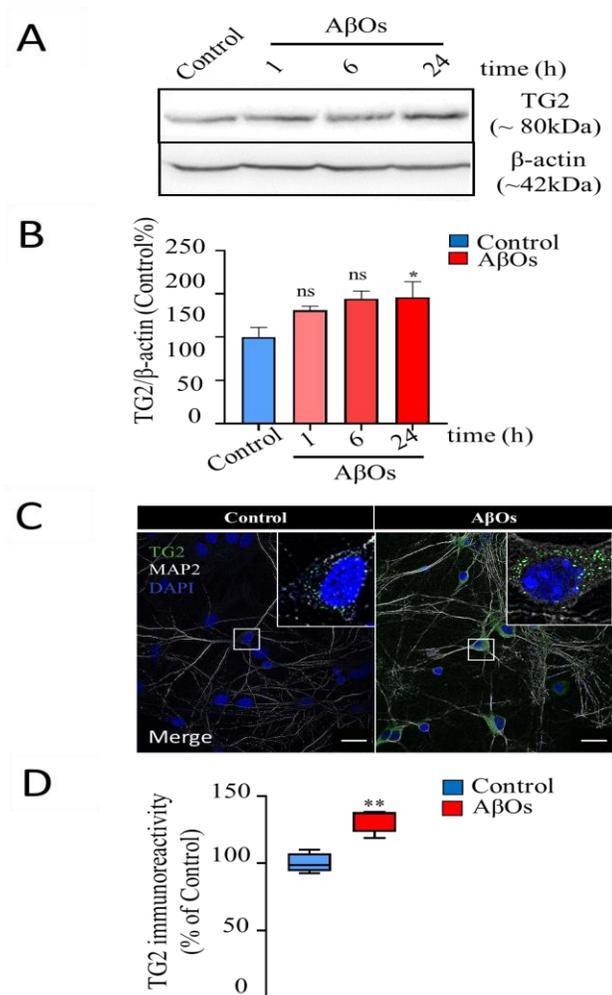


FIG. 8 AUMENTO DE TG2 DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON AβOs EN CÉLULAS DEL HIPOCAMPO DE RATONES. (A-B) Western blots de TG2 en neuronas hipocámpales incubadas con AβOs (0.5 μM) durante 1, 6 y 24 h, y su cuantificación (n=4, B). (C-D) Imágenes confocales de TG2 en neuronas hipocámpales con anticuerpos TG2 (verde), MAP-2 (gris) y DAPI (azul, núcleos) tratadas con AβOs (0.5 μM, 24h, inferior), y su cuantificación (D). Datos son media ± SEM, t de Student no pareada, n=4.

Para verificar la relevancia de estas observaciones en relación con los efectos patológicos del péptido Aβ, evaluamos si era posible que los niveles de TG2 en hipocampo en ratones transgénicos J20 y APP/PS1, estuviesen también

elevados, ya que ambos son modelos ampliamente utilizado para estudiar la sobreexpresión del péptido A β (Figura 9 y 10).

Utilizando modelos de rebanadas de hipocampo de ratón en animales J20 y WT de 10 meses de edad, medimos la inmunoreactividad de TG2 áreas clave del hipocampo; Giro Dentado (GD), CA1 y CA3 de ratones transgénicos (Figura 9 A-C). La inmunoreactividad de TG2 del hipocampo animal J20 estaba incrementada en las áreas de GD, CA1 y CA3 (GD:326 \pm 8%, CA1: 234 \pm 5 % y CA3: 271 \pm 10 %, Figura 9 D). Para complementar estos hallazgos, usamos la técnica de western blot como un enfoque experimental complementario para corroborar estas observaciones en lisado totales de hipocampo de ratones J20 de 10 meses (Figura 9D). Observamos un aumento significativo de la expresión de TG2 en los lisados de hipocampo (320 \pm 5 %,) ratones J20, en comparación con los ratones NTG de la misma edad (Figura 9 E). Es importante, destacar que los niveles de inmunoreactividad de TG2 en el hipocampo de ratones NTG endógenos fueron muy bajos.

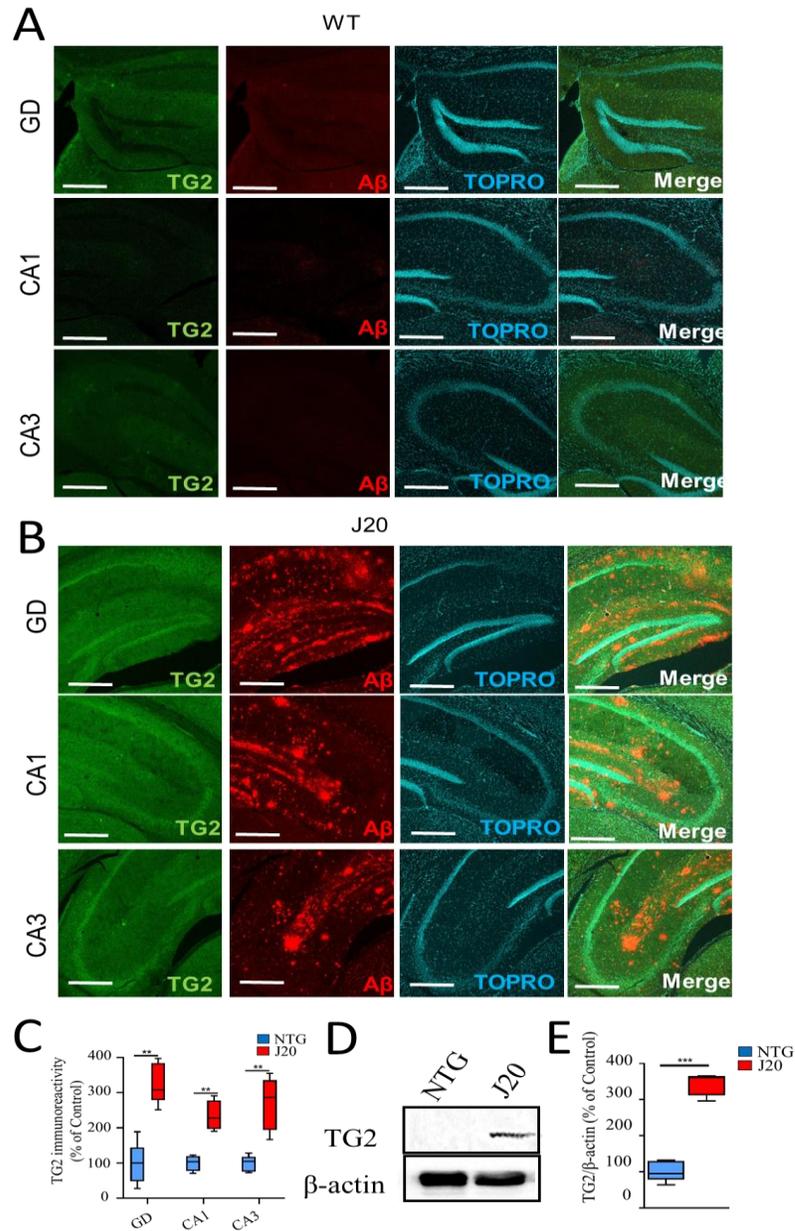


FIG. 9 AUMENTO DE TG2 EN HIPOCAMPO DE RATONES J20. (A) Inmunoreactividad del péptido Aβ en el modelo J20 y wild type (WT) de 10 meses, n=3 por grupo. (B) Tinción de doble inmunofluorescencia para TG2 (rojo), Aβ (verde) y To-pro (cyan) en secciones de hipocampo CA1, CA3 y GD (giro dentado). n=3 por grupo Escala: 50 μm y su cuantificación (C). (D) Western blot de TG2 y β-actina para normalización, en secciones de hipocampo de ratones WT y J20 (10 meses, n=3). (E) Análisis de densitometría normalizado a β-actina.

Para complementar estos hallazgos, usamos el animal transgénico APP/PS1 de 24 meses como un enfoque experimental adicional (Figura 10 A). Evaluamos los niveles de TG2 en lisado total y en fracciones mitocondriales de hipocampo, donde desempeña un papel crucial en procesos de estrés oxidativo en la mitocondria (Figura 10 B). Observamos un aumento significativo de la expresión de TG2 en lisado total de hipocampo ($286 \pm 5 \%$), y en fracción mitocondrial ($313 \pm 4 \%$), de ratones APP/PS1, en comparación con los ratones NTG de la misma edad (Figura 10 C). Para investigar más a fondo los cambios en la transcriptómica de TG2 en el modelo APP/PS1, utilizamos los datos de secuenciación de ARN de próxima generación (RNA-seq, ver materiales y métodos). En el heatmap de ratones APP/PS1 observamos un aumento en la expresión relativa del gen *tgm2* que codifica para TG2 (Figura 10D).

En conjunto, pudimos observar que existe un incremento de TG2 en diferentes modelos animales y celulares de la EA. Este hallazgo sugiere la posible implicación de TG2 en los procesos relacionados con la agregación tóxica del péptido A β y falla sináptica.

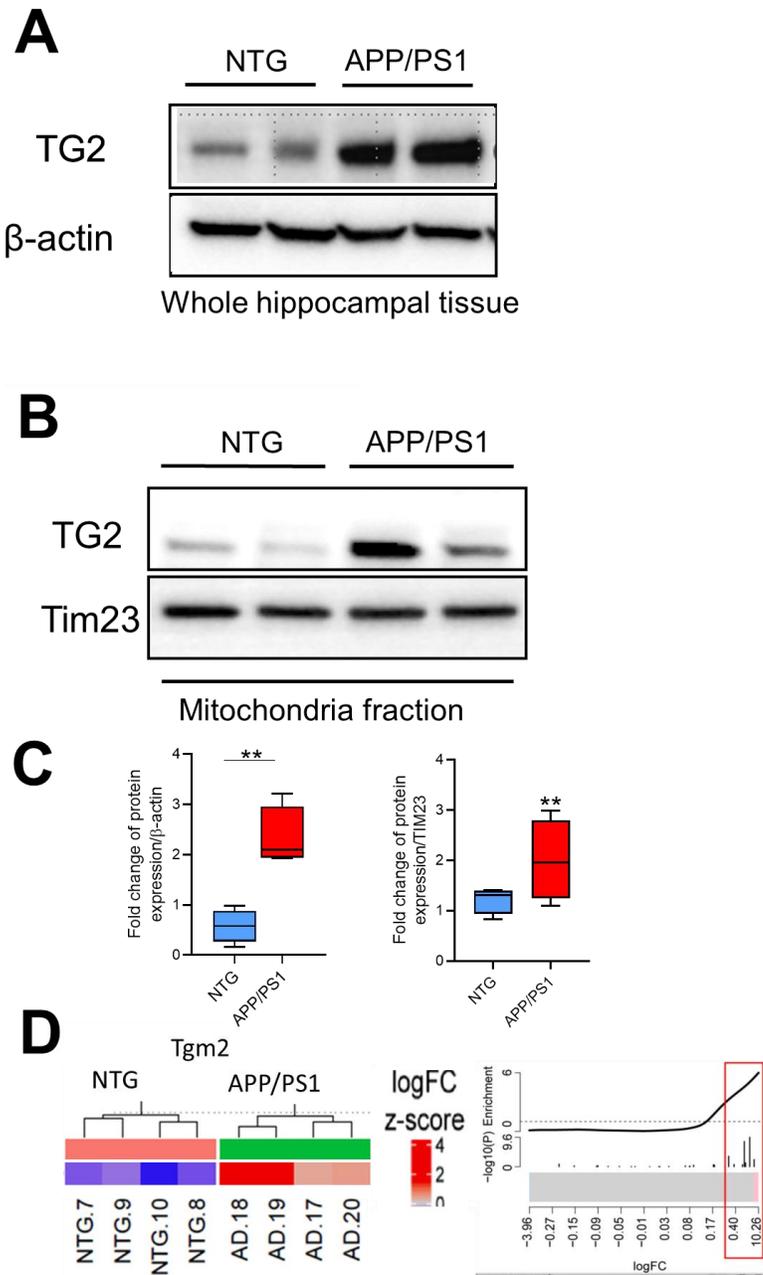


FIG. 10 SOBREEXPRESIÓN DE TG2 DE RATONES APP/PS1. (A-B) Western blot de TG2 y β -actina para normalización, en secciones de hipocampo total y fracción mitocondrial de ratones WT y APP/PS1 (24 meses, n=3). (C) Análisis de densitometría normalizado a β -actina y TIM23, respectivamente. (D) Cambios transcriptómicos del gen *tgm2* en hipocampo de ratones NTG y APP/PS1, visualizados en heatmaps. La expresión de cada gen se estandarizó con z-score; el color indica el z-score (panel derecho).

1. 2. Aumento en actividad transamidante de TG2 en el modelo J20

Considerando los resultados obtenidos, nuestro siguiente objetivo fue evaluar la actividad transamidante de TG2 en rebanadas de hipocampo del modelo J20 mediante métodos *ex vivo* para evaluar la formación de enlaces isopéptidos por parte de TG2 presente en hipocampo (Figura 11A). Observamos un aumento significativo en la actividad de TG2 en el homogeneizado de ratones J20 de 10 meses en comparación con los ratones WT de la misma edad ($259 \pm 4\%$, Figura 11 B). Como control de la reacción se usó el quelante EDTA, que logró detener la reacción, lo que indica que la actividad transamidante es dependiente de Ca^{2+} .

Como parte de nuestro estudio, también llevamos a cabo la evaluación de la actividad de TG2 en rebanadas de hipocampo de ratón utilizando los péptidos biotinilados de $\text{A}\beta$ y T26 como sustratos putativos donante de acilo (ver materiales y métodos). Pudimos observar que la actividad transamidante de las muestras condujo a la formación de enlaces covalentes biotin-pep- γ -glutamil lisina para los péptidos $\text{A}\beta$ y T26 biotinilados (Figura 11 C). En conjunto, estos resultados indican que la actividad transamidante de la TG2 en el hipocampo induce la formación de enlaces isopéptidicos, y potencialmente la agregación amiloide. Este hallazgo sugiere que dicha TG2 podría intensificar la toxicidad de $\text{A}\beta$ en la patología de la EA.

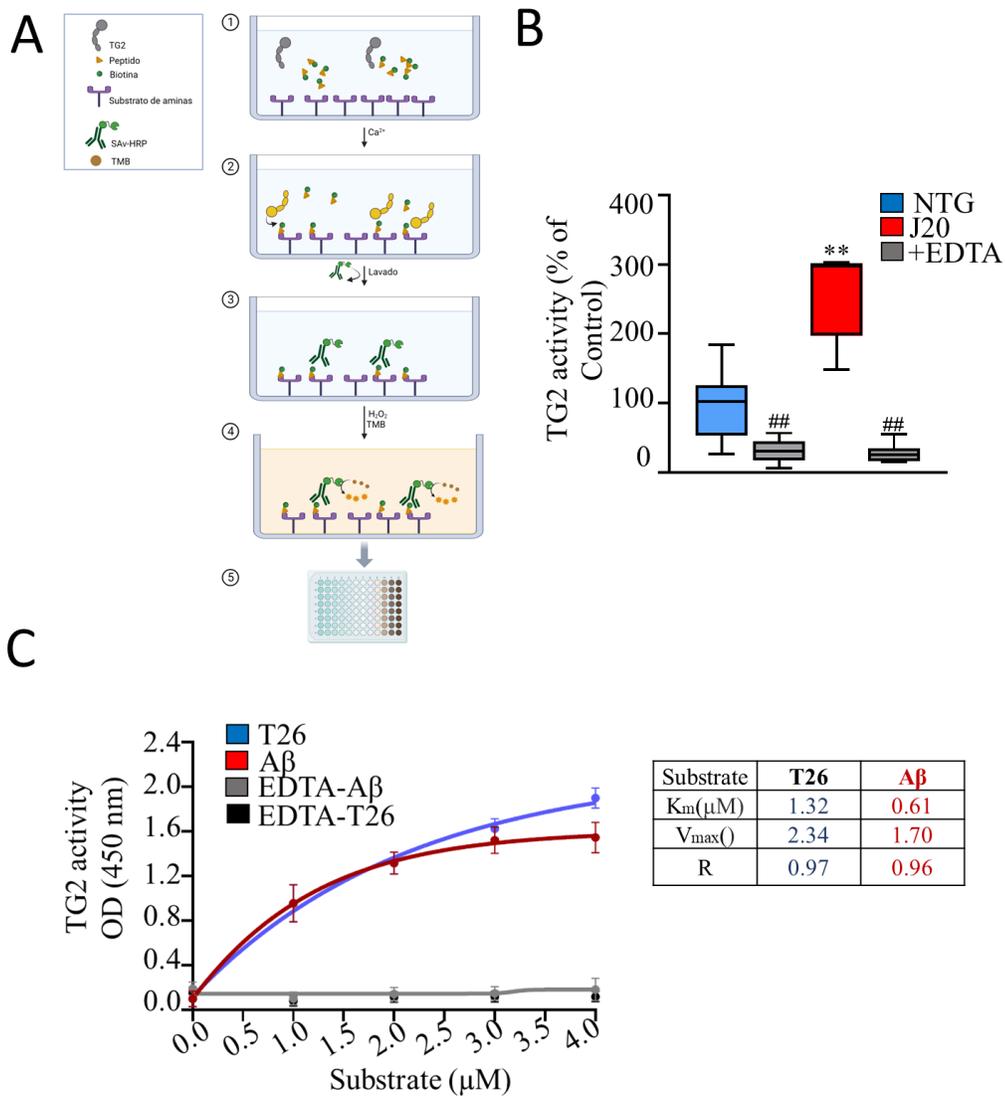


FIG. 11 LA ACTIVIDAD TRANSAMIDANTE DE TG2 AUMENTA EN EL HIPOCAMPO DE ANIMALES J20. (A) Esquema representativo del ensayo para evaluar la actividad transamidasa. (B) Actividad de transamidación de TG2 en ratones J20 y NTG de 10 meses, n=5. (C) Evaluación ex vivo de la actividad transamidante de TG2 con (a) péptido Aβ y (b) péptido T26 (0-5 μM) n=3. La curva muestra absorbancias medias a diferentes concentraciones de sustrato. Km y Vmax se muestra a la derecha.

2.1 La actividad transamidante de TG2 potencia el proceso de agregación del péptido A β *in vitro*.

Con base en estos antecedentes, como primera parte de este segundo objetivo nos propusimos caracterizar el potencial impacto de los agregación y toxicidad del péptido A β inducidos por la actividad transamidasa de TG2 (TGasa).

Nuestra primera exploración se centró en determinar si la actividad transamidante de TG2 podría estar relacionada con la inducción de hojas beta en el péptido A β e formación de agregados tóxicos. Por lo cual realizamos estudios de cinética de los agregados amiloides inducidos por TG2 (A β _{TG2}) mediante técnicas de fluorescencia ThT, microscopía electrónica, viabilidad celular por MTT y western blot. Utilizamos los agregados formados por "autocatálisis", previamente estandarizados en nuestro grupo de investigación (38), como modelo de comparación para evaluar ambas formas de agregación (Figura 12A). Empleamos el inhibidor irreversible de la conformación "abierta" de TG2 (Z-DON, 150nM) como control de la actividad transamidante de TG2.

El proceso de agregación de A β , que fue monitoreado mediante el uso de ThT, se dividió en tres fases distintas; (1) La fase de retraso (0-60 min) corresponde a la etapa de adaptación en la cual tiene lugar la nucleación. Durante esta fase, el péptido A β puede encontrarse en una conformación de espiral aleatoria o hélice α . (2) La fase exponencial (60-240 min) en la que ocurre la nucleación y el péptido A β comienza a agregarse formando estructuras de láminas β . (3) La fase

estacionaria (240 min), en la cual predominan las conformaciones de hoja β en estructuras fibrilares (75).

Se observó que el péptido $A\beta_{TG2}$ alcanzó una etapa de agregación constante después de 4 h, donde las conformaciones de hoja β eran predominantes (240 minutos). La aplicación de Z-DON resultó en una reducción de alrededor del 70% en la fase estacionaria de agregación en comparación con el grupo de $A\beta_{TG2}$. La curva de ThT mostró perfiles temporales de la cinética hiperbólica de agregación de $A\beta$ inducida por TG2 (40 μ U/ml), en tanto que la agitación *in vitro* mostró una cinética sigmoideal (Figura 12A). Esto podría indicar que los factores *in vitro* como la agitación por autocatálisis, tienen un efecto más inmediato en la fase de nucleación y crecimiento de los agregados de $A\beta$ en comparación con la actividad enzimática de TG2.

Los resultados de los análisis de los geles de revelaron la presencia de una bandas correspondiente al peso molecular agregados de $A\beta_{TG2}$ con un tamaño medio de 7-13 unidades (\sim 28, 40, 52 kDa, Figura 12B). En tanto que la agitación *in vitro* mostró principalmente agregados de tamaño de medio de 7 unidades (\sim 28 kDa). Esto sugiere que la enzima TG2 promueve la formación de agregados de $A\beta$ con una distribución más amplia de tamaños, lo que podría deberse a la capacidad de la TG2 para catalizar la unión cruzada entre las moléculas de $A\beta$.

Evaluamos el efecto de estos agregados en la toxicidad celular (Figura 12C), mediante el ensayo MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), utilizado como indicador indirecto de la función mitocondrial y la viabilidad celular (76).

Tratamos las neuronas hipocampales con agregados de $A\beta_{TG2}$ a una concentración de 0.5 μ M durante 24 y 48 h. Observamos que la viabilidad celular disminuyó de manera dependiente del tiempo, mostrando una reducción de aproximadamente un 62% después de 24 h y un 85% después de 48 h de tratamiento con $A\beta_{TG2}$ en comparación con el control y Z-DON. En tanto que el tratamiento con la agitación *in vitro* de $A\beta$ mostró una reducción de aproximadamente un 44% después de 24 h y un 69% después de 48 h de tratamiento (Figura 12C). Los resultados obtenidos en este estudio indican claramente que el tratamiento con $A\beta_{TG2}$ tiene un impacto significativamente mayor en la viabilidad celular en comparación con la agitación *in vitro* de $A\beta$.

Estos hallazgos son coherentes con la literatura existente que sugiere que los agregados de $A\beta$ inducidos por diferentes métodos pueden tener diferentes niveles de toxicidad y capacidad para afectar la viabilidad celular (77).

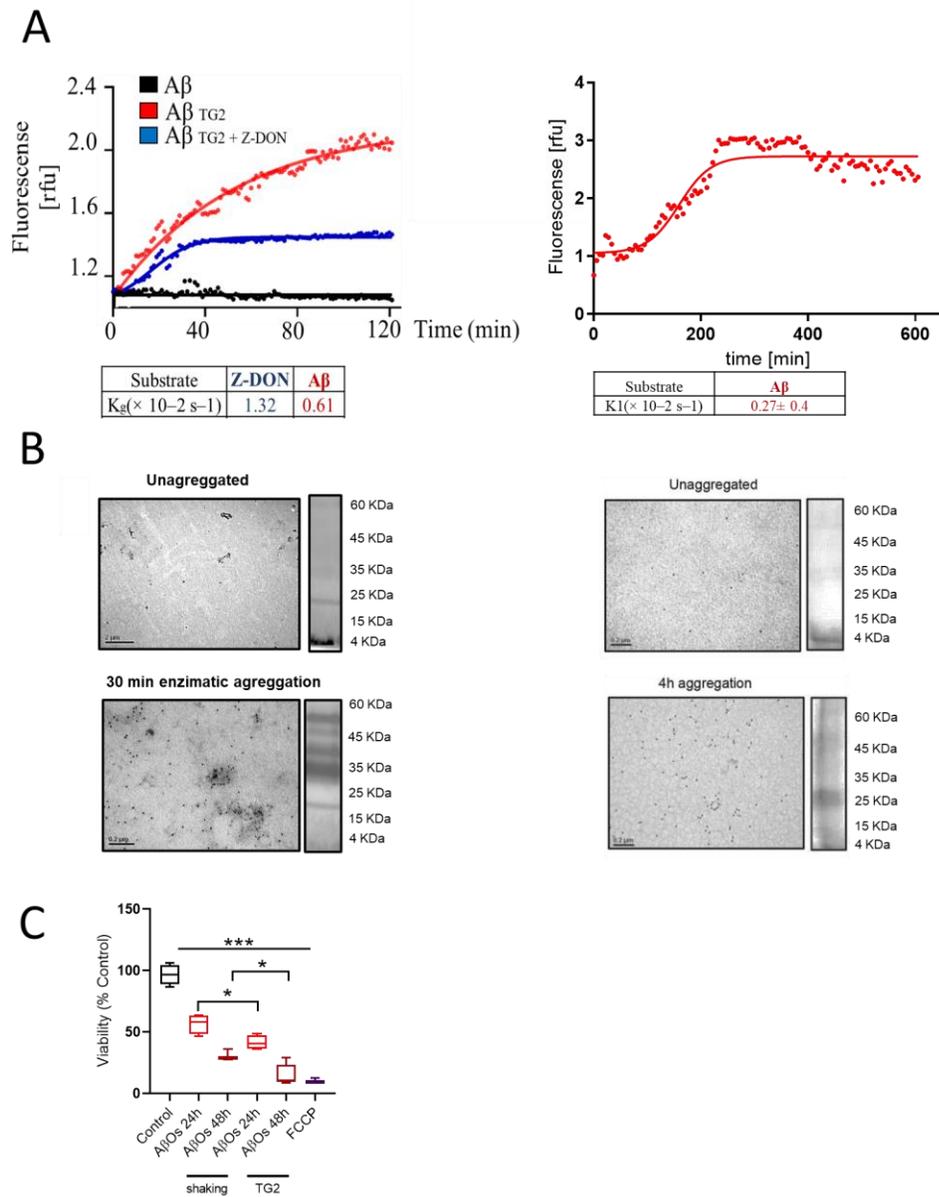


FIG. 12 LA ACTIVIDAD DE LA TRANSAMIDANTE IN VITRO INCREMENTA LA AGREGACIÓN DEL PÉPTIDO Aβ. (A) Cinética de inserción de ThT en los agregados de Aβ₁₋₄₀ (80 μM) inducida por TG2 (40 μU/mL, 30min, 37°C panel izquierdo) vs agitación *in vitro* (panel derecho). Se usó Z-DON como control de la actividad transamidasa (150nM, n=6) (B) La agregación del péptido Aβ₁₋₄₀ formados por transamidación (panel izquierdo) y agitación *in vitro* (panel derecho) se puede visualizar mediante microscopía electrónica y western blot utilizando un anticuerpo anti- Aβ (MOAB-2) n=4. Kg: constante de velocidad de crecimiento. K1: constante de nucleación. (C) Porcentaje de viabilidad celular evaluado mediante el ensayo MTT en neuronas del hipocampo expuestas a Aβ por agitación enzimática e *in vitro* (0.5 μM) durante 24 y 48 h, presentado como porcentaje del grupo de control. n = 3–6.

A continuación, utilizamos una aproximación *in silico* basado en un análisis de acoplamiento molecular entre TG2 y el péptido A β (Figura 13). Empleamos diversas estructuras clave involucradas en las fases de agregación del péptido A β : monómero, dímero y trímero (Figura 13A). Los resultados mostraron que el complejo TG2-A β presenta una interacción favorable con todas las estructuras de A β (Figura 13 B, K_d : 2.2e-008, ΔG : -10.9, $E_{complex}$: -1402.3), lo que sugiere que TG2 participa en las fases iniciales de la agregación de A β y desempeña un papel crucial en la formación de especies tóxicas y de hojas beta (Figura 13 C). Al comparar las interfaces de TG2-A β , los aminoácidos conservados fueron principalmente 313IEYFR317, 327SEMIWNF333, 3EFRHDSGY10, 14H, 17LV18, correspondientes al sitio catalítico de TG2 (Figura 13D). Identificamos que la región de interacción del péptido A β corresponde a la secuencia 1DAEFRHDSGYEVHH14, que abarca la porción N-terminal. Esta región está involucrada en la estabilización de especies tóxicas de A β (78). En conjunto, estos resultados respaldan la noción de que la actividad transamidante de TG2 desempeña un rol fundamental en la patogénesis y toxicidad de los agregados amiloides del péptido A β en el contexto de la EA.

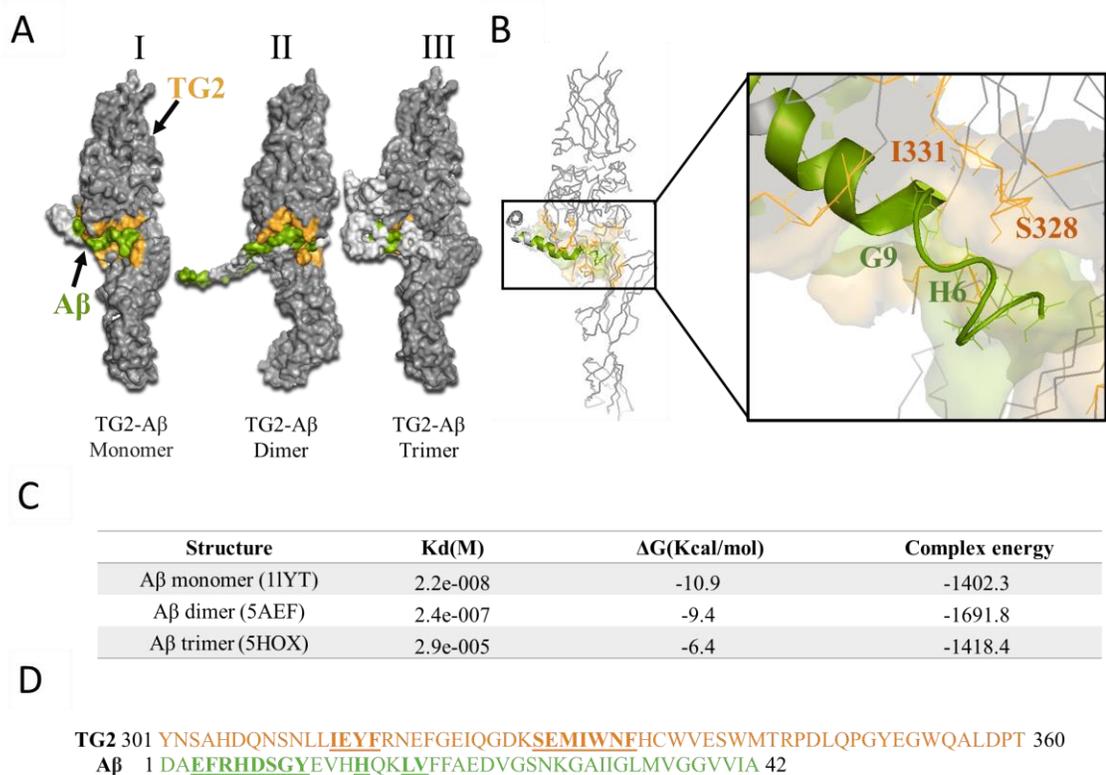


FIG. 13 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE ACOPLAMIENTO MOLECULAR ENTRE TG2 Y EL PÉPTIDO A β . (A) Representación en vista de superficie del acoplamiento molecular para modelar la interacción entre TG2 y diferentes estructuras del péptido A β : monómeros (I), dímeros (II) y trímeros (III). (B) Se muestran las interacciones intermoleculares entre el péptido A β y TG2 en una conformación abierta, destacando los residuos clave implicados en el complejo. Los sitios de interacción se representan en naranja y verde para TG2 y A β , respectivamente. (C) Se obtuvieron la afinidad de unión (ΔG), la energía del complejo y la constante de disociación (Kd) a partir del acoplamiento molecular de TG2 (PDB: 2Q3Z). (D) Se presentan las secuencias de consenso de los sitios catalíticos de TG2 y el péptido A β , señalando los sitios de interacción en negrita y subrayados para cada secuencia usando el programa Prodigy.

2.2 Los agregados de $A\beta_{TG2}$ promueven un aumento de el acoplamiento del complejo IP₃R-VDAC1 en neuronas de hipocampo.

Nuestro objetivo principal se centró en estudiar cómo los agregados de $A\beta_{TG2}$ podrían influir en el formación del complejo IP₃R-VDAC1, una asociación crucial en la regulación del flujo de Ca^{2+} desde el ER hacia las mitocondrias. (79).

Para ello, utilizamos la técnica de PLA (del inglés Proximity Ligation Assay, Figura 14), una técnica ampliamente validada en la última década para estudiar las interacciones entre proteínas (80). Se decidió evaluar el efecto del tratamiento crónico de $A\beta_{TG2}$ en los puntos de contacto ER-mitocondria en neuronas hipocampales (0.5 μ M, 24 h) empleando anticuerpos específicos para las proteínas MAMs IP₃R y VDAC1 (Figura 14 A). Utilizamos como control positivo la taspigargina, un inhibidor específico de la ATPasa de Ca^{2+} en el retículo endoplasmático, que provoca una liberación aguda de Ca^{2+} desde el retículo hacia el citosol, imitando así el aumento del Ca^{2+} intracelular característico del estrés reticular (81). Observamos un aumento significativo de aproximadamente un 220% en los puntos de señal de PLA IP₃R/VDAC1 después del tratamiento con $A\beta_{TG2}$ en comparación con las condiciones de control y con el inhibidor de TG2, Z-DON (150nM, Figura 14 B).

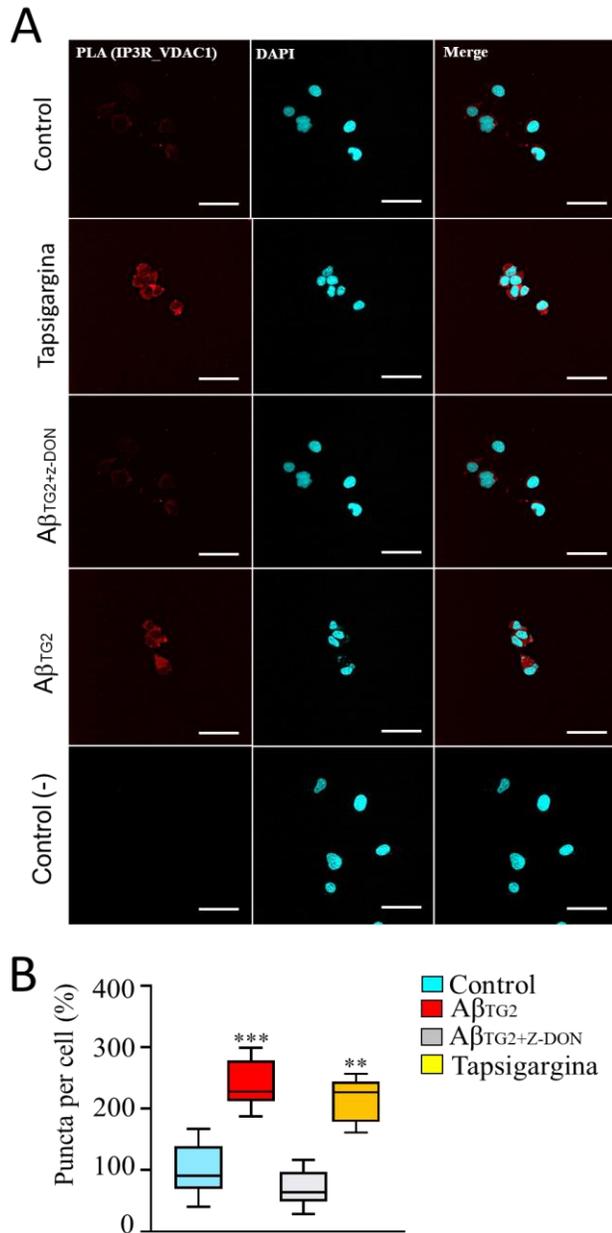


FIG. 14 LOS AGREGADOS DE Aβ_{TG2} INDUCEN LA FORMACIÓN DE MAMS EN MODELOS NEURONALES. (A) Imágenes representativas de la técnica PLA in situ que detectó las interacciones IP3R-VDAC1 en neuronas tratadas con Aβ_{TG2} (24 h, 0,5 μM). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Escala, 5 μm. (B) Cuantificación de los puntos PLA por célula presentados como porcentaje del grupo de control (C: 100 ± 15%, Aβ_{TG2} 24 h: 240 ± 13%). n = 5 por condición.

Para complementar nuestros resultados, estudiamos el efecto de $A\beta_{TG2}$ sobre la homeostasis de Ca^{2+} , utilizando microfluorimetría de Ca^{2+} mediante el uso de la sonda mitocondrial Rhod-2 AM en neuronas del hipocampo (Figura 15 A). Al cuantificar el influjo de iones de Ca^{2+} dirigido hacia las mitocondrias como respuesta al tratamiento agudo con los agregados $A\beta_{TG2}$, se reveló un aumento considerable del influjo de Ca^{2+} hacia las mitocondrias, alcanzando aproximadamente un incremento del 213 % en comparación con las neuronas control y tratadas con Z-DON (Figura 15 B).

Para comprobar si este incremento se correlacionaba con cambios en el Ca^{2+} citosólico, evaluamos el efecto agudo de los agregados $A\beta_{TG2}$ en los niveles citosólicos de Ca^{2+} utilizando la sonda FLUO-4AM en neuronas del hipocampo (0.5 mM, 1 h, Figura 15 C). Al evaluar el efecto agudo de $A\beta_{TG2}$ en los niveles de Ca^{2+} citosólico, observamos un incremento rápido y progresivo de las transitorias de Ca^{2+} citosólico de ~150% en comparación a neuronas control y tratadas con Z-DON (Figura 15 D). Estos resultados sugieren que los agregados $A\beta_{TG2}$ inducen una alteración en el balance de Ca^{2+} intracelular mediado por el incremento del acoplamiento IP_3R -VDAC, induciendo una sobrecarga de Ca^{2+} hacia las mitocondrias.

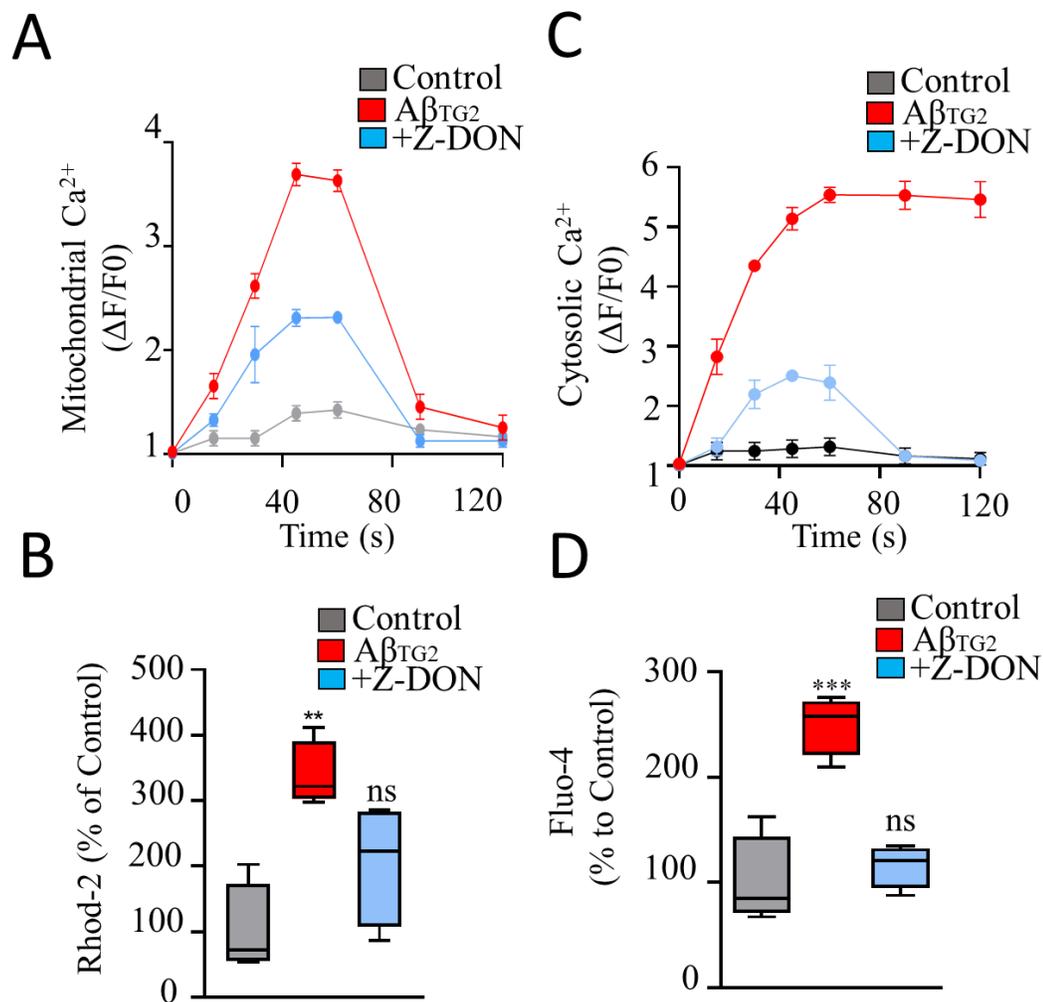


FIG. 15 LOS AGREGADOS DE Aβ_{TG2} AFECTAN LA HOMEOSTASIS DEL Ca²⁺ EN MODELOS NEURONALES (A) Trazos representativos que ilustran la captación mitocondrial de Ca²⁺ inducida por Aβ_{TG2} en células neuronales del hipocampo, utilizando el indicador de calcio específico de mitocondrias Rhod-2 AM (5 Mm, ver materiales) en condiciones de tratamiento con Aβ_{TG2} y después de la inhibición de TG2 (Z-DON, 30 nM). n = 4. (B) Cuantificación del área bajo la curva (AUC) de fluorescencia para todas las condiciones, presentada como porcentaje del grupo de control, n = 4. (C) Trazos representativos de la captación de Ca²⁺ citosólico inducida por Aβ_{TG2} en células neuronales del hipocampo utilizando las sonda Fluo-4 (5 μM) en condiciones de tratamiento con Aβ y después de Z-DON. Los datos se muestran como medias y SEM de n = 4 experimentos independientes. (D) Cuantificación del AUC de fluorescencia presentada como porcentaje del grupo de control. n=4

2.3 Los agregados de A β _{TG2} promueven una alteración de la función mitocondrial en las células neuronales

Se ha documentado que las disrupciones en la homeostasis del Ca²⁺ podrían desencadenar el desacoplamiento de las mitocondrias y, en última instancia, conducir a la apoptosis y la muerte celular (82). Por lo tanto, decidimos evaluar si la inhibición de TG2 podría mitigar la toxicidad inducida por A β _{TG2} en la funcionalidad mitocondrial (Figura 16). En primer lugar, usamos la sonda JC-1 para medir los cambios en el potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) inducidos por tratamientos crónicos con A β _{TG2} (24h, 0,5 μ M). En condiciones basales, el $\Delta\Psi_m$ se encuentra en el rango de -120 mV, y JC-1 forma agregados fluorescentes, que emiten una señal de fluorescencia roja. Cuando el potencial de la membrana mitocondrial se reduce, JC-1 no puede acumularse en las mitocondrias y se dispersa en el citosol como monómeros, lo que resulta en una señal de fluorescencia verde (70).

La Figura 16A muestra la evaluación del potencial de membrana medido con JC-1 en células tratadas con A β _{TG2} (0,5 μ M) o su coaplicación con Z-DON (150nM). Usamos como control positivo el compuesto FCCP (del inglés carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazine), ampliamente usado como desacoplante mitocondrial (76). Al cuantificar los cambios fluorescencia 527/590 entre las distintas condicionales, fue posible observar que A β _{TG2} indujo una fuerte pérdida

del $\Delta\psi_m$ mitocondrial de un 60%. La co-incubación con Z-DON produjo una prevención del efecto tóxico de $A\beta_{TG2}$ (Figura 16A, C: $100 \pm 11\%$, $A\beta_{TG2}$: $40 \pm 14\%$, $A\beta_{TG2+Z-DON}$: $86 \pm 15\%$). Sin embargo, Z-DON no logró inhibir la despolarización inducida por FCCP ($10 \mu\text{M}$), lo que sugiere que los efectos protectores observados por la inhibición de TG2 contra $A\beta_{TG2}$ podrían estar mediados por un mecanismo distinto de las propiedades desacoplantes de la cadena transportadora de electrones.

Posteriormente, evaluamos el efecto de esta interacción en la viabilidad celular, mediante el ensayo MTT (Figura 16B). Tratamos las neuronas hipocampales con agregados de $A\beta_{TG2}$ a una concentración de $0.5 \mu\text{M}$ durante 24 y 48 h. Observamos que la viabilidad celular disminuyó de manera dependiente del tiempo, mostrando una reducción de aproximadamente un 58% después de 24 h y un 82% después de 48 h de tratamiento con $A\beta_{TG2}$ en comparación con el control. El tratamiento con el inhibidor de la actividad transamidante Z-DON logró prevenir efecto tóxico de los $A\beta_{TG2}$ a las 24h de tratamiento, sin embargo, a las 48h logró prevenirlo parcialmente a una reducción de aproximadamente un 28% (Figura 16B). Posteriormente, evaluamos una de las proteínas más importantes relacionadas con la dinámica mitocondrial: DRP1, con tratamientos crónicos con $A\beta_{TG2}$ (24 h) y el co-tratamiento con Z-DON (150nM) utilizando Western blot (Figura 16C). Los análisis de Western blot mostraron que DRP1 aumentó significativamente después de los tratamientos crónicos con $A\beta_{TG2}$ en

comparación con el control y Z-DON (Figura 16D, C: $100 \pm 14\%$, $A\beta_{TG2}$: $42 \pm 8\%$, $A\beta_{TG2+Z-DON}$: $109 \pm 11\%$).

En resumen, nuestros hallazgos sugieren que la inhibición de TG2 podría ofrecer protección contra la toxicidad inducida por $A\beta_{TG2}$ en la viabilidad celular, funcionalidad mitocondrial, el acoplamiento del complejo IP_3R -VDAC1, y la homeostasis del Ca^{2+} , lo que respalda el papel perjudicial de los agregados de $A\beta_{TG2}$ en el contexto de la EA. Adicionalmente, estos resultados nos permitieron establecer el rango de concentración de $A\beta_{TG2}$ ($0.5 \mu M$) para la evaluación de la excitabilidad neuronal, factor esencial en la función sináptica y comunicación neuronal, cuya alteración podría tener implicaciones significativas en procesos cognitivos y la patología de Alzheimer.

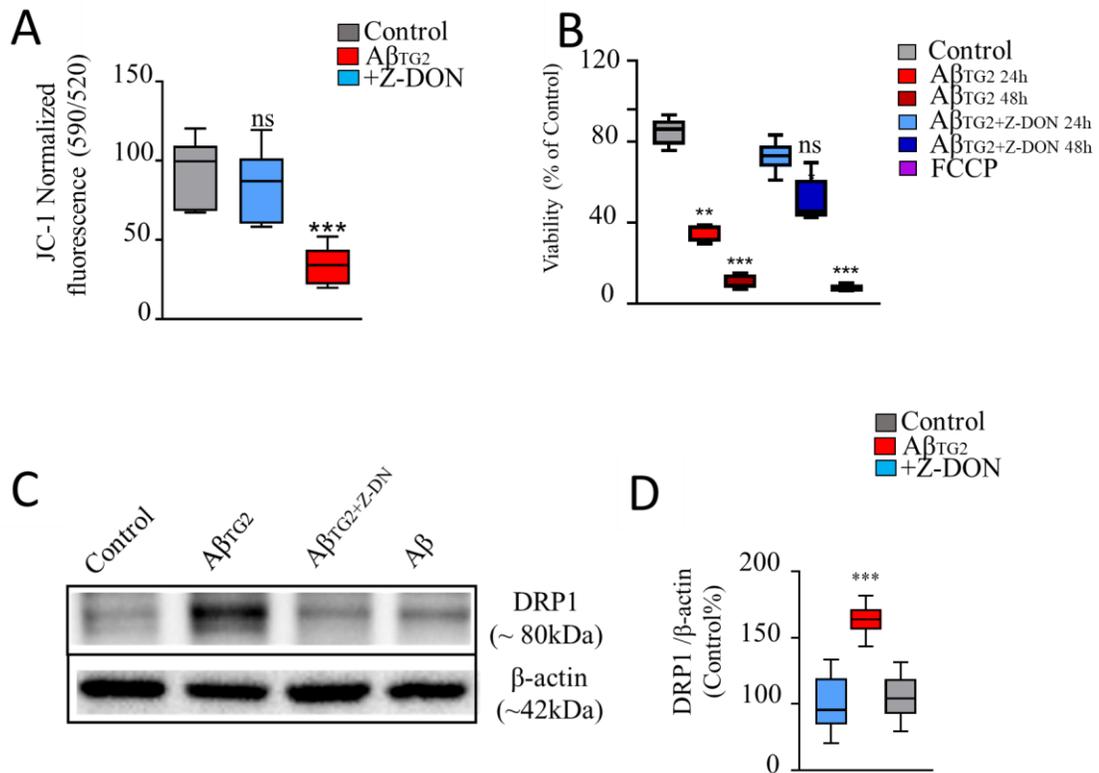


FIG. 16 LOS AGREGADOS A β _{TG2} ALTERAN LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL EN MODELOS NEURONALES. (A) Efectos de Z-DON en la despolarización mitocondrial inducida por A β _{TG2} en neuronas del hipocampo. Promedio de despolarizaciones registradas con JC-1 en neuronas del hipocampo bajo diferentes condiciones: A β _{TG2} (0.5 μ M, 24 h), o en combinación con Z-DON, presentado como porcentaje del grupo de control. n = 4. (B) Porcentaje de viabilidad celular evaluado mediante el ensayo MTT en neuronas del hipocampo expuestas a A β _{TG2} (0.5 μ M) durante 24 y 48 h, presentado como porcentaje del grupo de control. n = 3–6. (C-D) Western blots de DRP1 en neuronas hipocampales incubadas con A β _{TG2} (0.5 μ M) 24 h, comparadas con el control y Z-DON (150nM), seguidos de cuantificación (D) mediante ANOVA. n=4. Las barras de error indican el error estándar de la media (SEM). ns: no significativo, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 en comparación con el grupo de control. Se utilizaron pruebas de ANOVA de una vía con la prueba de comparaciones múltiples de Dunn para todos los análisis estadísticos

3.1 El tratamiento agudo de los agregados de $A\beta_{TG2}$ incrementan la generación de los potenciales de acción, induciendo hiperexcitabilidad en cultivo de neuronas hipocampales.

El Ca^{2+} es esencial en neuronas para la liberación de neurotransmisores, plasticidad sináptica y regulación de excitabilidad. Facilita la fusión de vesículas, modula canales iónicos y contribuye a funciones cognitivas claves (83). En base a nuestros resultados previos que proporcionan evidencia que respalda la hipótesis de que $A\beta_{TG2}$ induce una disfunción en la homeostasis intracelular del Ca^{2+} , en este objetivo nos propusimos investigar los efectos de $A\beta_{TG2}$ en la actividad neuronal utilizando la técnica de patch clamp (Figura 17A). Esta técnica permite el registro preciso de la actividad eléctrica de una célula individual, lo que proporciona información invaluable sobre los mecanismos subyacentes de la transmisión sináptica (84).

Utilizamos registros electrofisiológicos en modo de corriente constante (ver materiales y métodos), que nos permitió inyectar corriente eléctrica controlada en las neuronas y medir su respuesta eléctrica en tiempo real. En primer lugar, evaluamos el efecto agudo de $A\beta_{TG2}$ en la activación de los potenciales de acción (APs) (Figura 17B), los cuales son el resultado de despolarizaciones transitorias a nivel postsináptico debido a la potenciación de la neurotransmisión excitatoria.

Observamos un desplazamiento hacia la izquierda en la curva de estímulo-respuesta, indicando una mayor excitabilidad neuronal en presencia de $A\beta_{TG2}$ (Figura 17C). Además, el número de APs aumentó aproximadamente un 140% respecto de neuronas control, en tanto que la Rheo base, que representa el umbral de excitación de la célula, disminuyó un 40% respecto de neuronas control (Figura 17D).

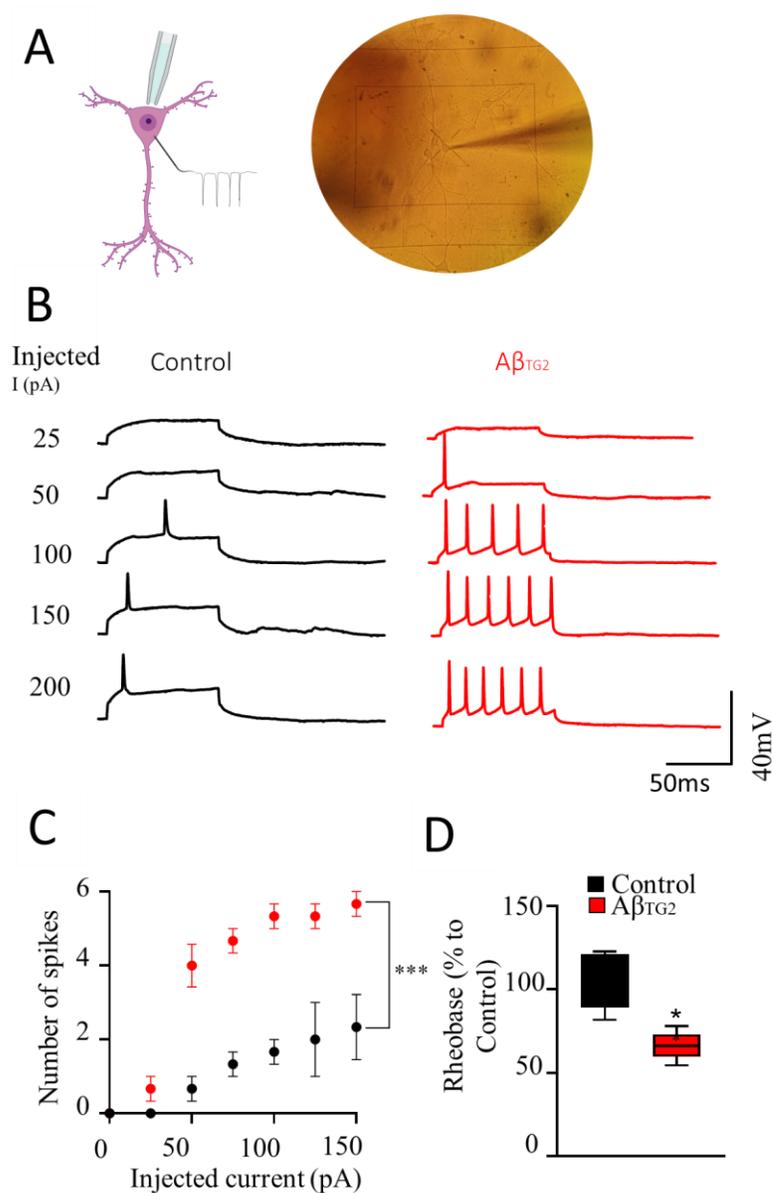


FIG. 17 LOS AGREGADOS DE $A\beta_{TG2}$ INCREMENTAN LA EXCITABILIDAD EN NEURONAS DE HIPOCAMPO A TIEMPOS AGUDOS. (A) Modelo ilustrativo para registros electrofisiológicos en cultivos de neuronas primarias (panel izquierdo) e imagen de neurona del hipocampo cultivada en registros de corrientes por patch clamp. (B) Registros representativos del disparo de potenciales de acción (PA) en neuronas primarias del hipocampo en ausencia y presencia de $A\beta_{TG2}$ (0,5 μ M, 30 min), obtenidos con el método de fijación de corriente (ver materiales). n = 3. (C-D) Cuantificación de la relación entre el número de disparos de PA y la intensidad de corriente inyectada y constante de reobase (D), presentada como porcentaje del grupo de control. n = 5-6.

Posteriormente, exploramos la posible correlación entre estos hallazgos y los cambios en la actividad sináptica, especialmente en el tono excitatorio. Utilizamos la técnica de voltaje clamp para medir las corrientes miniatura, lo cual nos permitió estudiar los eventos de apertura y cierre de los canales iónicos excitatorios (Figura 18 A, B). Para aislar las corrientes postsinápticas excitatorias miniatura (mEPSC), aplicamos inhibidores de la transmisión sináptica, como tetrodotoxina (TTX) para bloquear los canales de sodio dependientes del voltaje y bicuculina para bloquear los receptores de GABA inhibitorios (ver materiales y métodos). Observamos que el tratamiento agudo con $A\beta_{TG2}$ aumentó aproximadamente un 158% la amplitud y un 220% de las mEPSC respecto de neuronas control (Figura 19 C, D). Estos resultados indican que $A\beta_{TG2}$ puede aumentar la excitabilidad de las neuronas al facilitar la generación de potenciales de acción y reducir el umbral necesario para su activación.

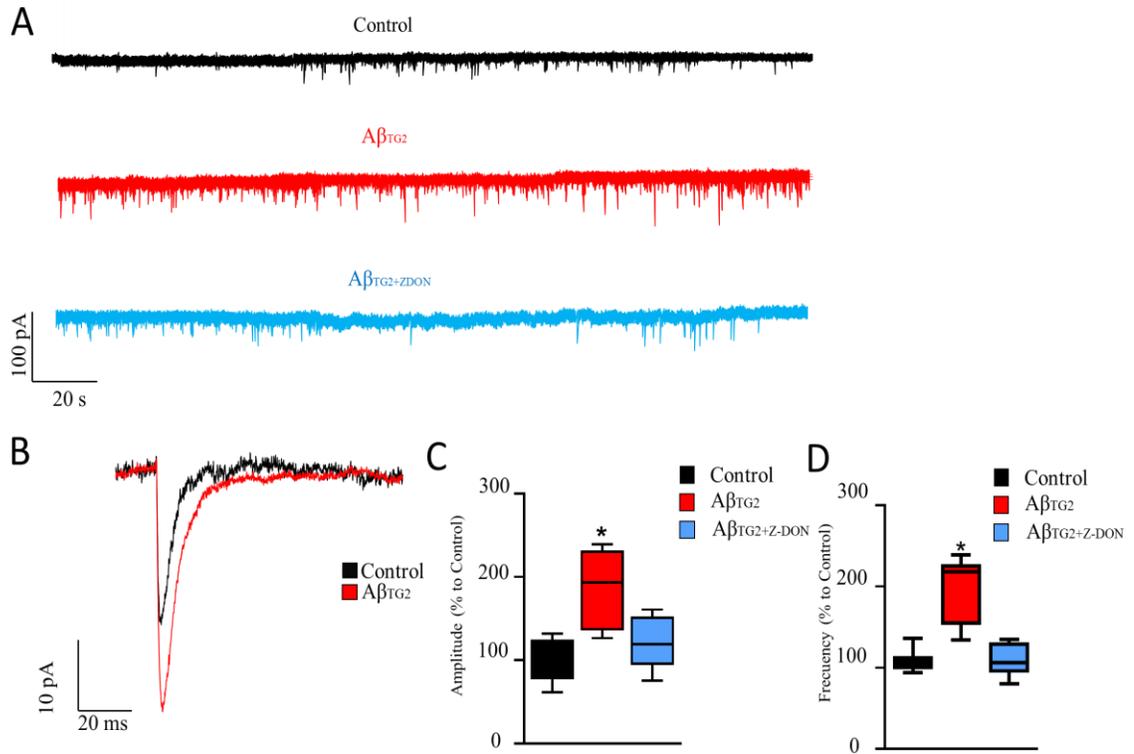


FIG. 18 LOS AGREGADOS DE $A\beta_{TG2}$ INCREMENTAN LAS CORRIENTES ESPONTÁNEAS EXCITATORIAS A TIEMPOS AGUDOS. (A-B) Trazos representativos de corrientes espontáneas en miniatura excitatoria (mEPSC, ver materiales y métodos) en la condición control y en presencia de $A\beta_{TG2}$ ($0,5\ \mu\text{M}$, 30 min), en modalidad voltaje constante (-70mV). Trazo representativo para la condición Control $A\beta_{TG2}$ utilizando el software Minianálisis a una escala de 10 pA(B). (C-D) Cuantificación de la amplitud y frecuencia presentada como porcentaje del grupo de control. Los datos se representan como media \pm SEM. * $p < 0.05$ en comparación con el grupo de control. Se utilizó la prueba t de Student seguida de la prueba t no pareada para $n = 6-8$ por condición.

3.2 El tratamiento crónico de los agregados de $A\beta_{TG2}$ disminuye la frecuencia de las corrientes miniatura excitatorias y el marcador de presinapsis SV2 en cultivo de neuronas hipocampales.

La hiperexcitabilidad prolongada inducida por $A\beta_{TG2}$ puede llevar a una sobreestimulación de las neuronas, lo que resulta en una liberación excesiva de neurotransmisores excitatorios y un desequilibrio en la homeostasis neuronal. Este desequilibrio puede causar daño neuronal y eventualmente inducir silenciamiento sináptico (36). Para confirmar esta hipótesis, llevamos a cabo tratamientos crónicos con $A\beta_{TG2}$ y con el inhibidor de TG2 Z-DON en neuronas del hipocampo, utilizamos la técnica de voltaje clamp para medir corrientes miniatura (Figura 19 A).

Los resultados mostraron que los agregados de $A\beta_{TG2}$ (24h, 0,5 μ M) indujeron una disminución progresiva en la frecuencia de los eventos postsinápticos excitatorios en miniatura (mEPSC) en un 70% en comparación con las células control y Z-DON (150nM, Figura 19 B). Además, por la técnica de western blot se evaluaron cambios en la proteína vesicular 2 (SV2), la cual está involucrada en la carga y el almacenamiento de neurotransmisores en las vesículas sinápticas (Figura 19 C). Se observó una disminución significativa en los niveles de SV2 de un 58% en comparación al control y la coincubación con Z-DON (Figura 19 D).

Estos hallazgos sugieren que la disfunción sináptica causada por la exposición prolongada a $A\beta_{TG2}$ conduce al agotamiento de las vesículas de neurotransmisión y al silenciamiento sináptico. La coincubación de $A\beta_{TG2}$ con el inhibidor de la actividad transamidante de TG2, Z-DON, previno el silenciamiento sináptico inducido por $A\beta_{TG2}$. Estos resultados respaldan la idea de que la agregación de $A\beta_{TG2}$ tiene un impacto perjudicial en la actividad sináptica y la función neuronal. En conjunto, los resultados obtenidos indican que la acción prolongada de $A\beta_{TG2}$ en las sinapsis neuronales resulta en una disfunción sináptica, agotamiento de las vesículas de neurotransmisión y silenciamiento sináptico. Estos hallazgos contribuyen a nuestra comprensión de los efectos tóxicos de la agregación del péptido $A\beta$ inducida por TG2, y podrían abrir nuevas vías para el desarrollo de estrategias terapéuticas destinadas a prevenir o retrasar estos efectos perjudiciales en pacientes con EA.

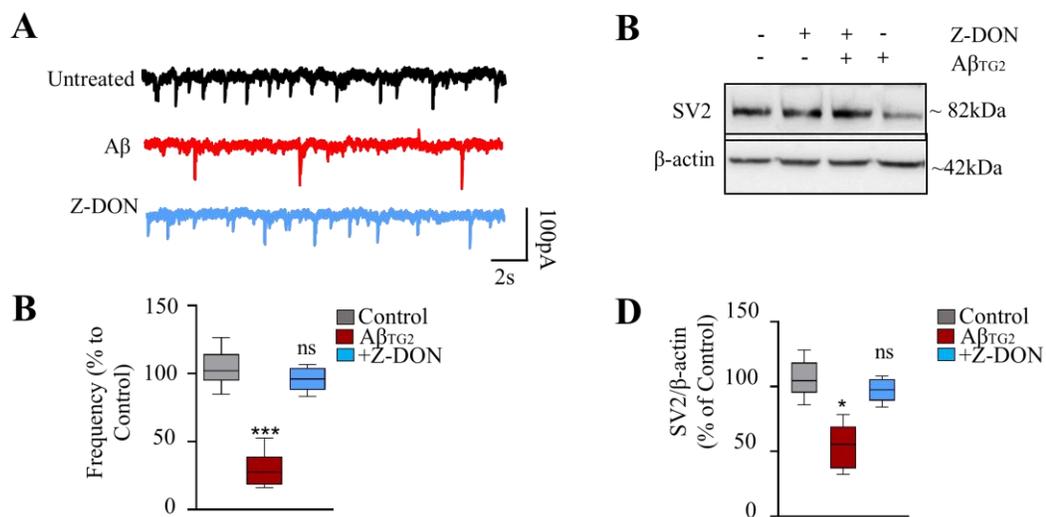


FIG. 19 LOS AGREGADOS DE Aβ_{TG2} INDUCEN SILENCIAMIENTO SINÁPTICO A TIEMPOS CRÓNICOS (A) Trazos representativos de mEPSCs registrados en la condición control y en presencia de Aβ_{TG2} (0,5 μM, 24 h) y Z-DON (150nM). (B) Cuantificación de la frecuencia presentada como porcentaje del control. n = 7–8. (C) Western blots representativos de SV2 y β-actina, que fue utilizada para normalizar, en lisados de hipocampo, en condiciones de control e incubadas con Aβ_{TG2} (0,5 μM, 24h) y un inhibidor de TG2 (Z-DON, 30 nM) durante 24 h. (D) El gráfico muestra la cuantificación de SV2 normalizado a β-actina, presentado como porcentaje del grupo control. Los datos se representan como media ± SEM. ns: no significativo. n = 5–7.

4.1. En dendritas de hipocampo de animales APP/PS1 se observa una alteración de la dinámica mitocondrial, la cual es revertida mediante el uso del compuesto CP2.

En base a los resultados obtenidos, donde observamos un incremento en los niveles de TG2 en fracciones mitocondriales de hipocampo del modelo animal APP/PS1, en este objetivo nos planteamos si este incremento estaba correlacionado con cambios en marcadores moleculares clave de la función mitocondrial (Figura 20 y 21).

Para ello, utilizamos un fármaco que induce una respuesta adaptativa al estrés asociada con la inhibición parcial del complejo mitocondrial 1 denominado CP2, recientemente descrito por sus potenciales efectos beneficiosos en la reducción de la producción de ROS y el consumo de glucosa en el modelo animal APP/PS1 de la EA, lo que sugiere un papel importante en la reducción del estrés oxidativo asociado con la patología de la enfermedad (85).

Nuestro cuarto objetivo fue determinar el efecto del tratamiento de CP2 sobre la morfología de las mitocondrias dendríticas en el hipocampo a través de cortes de cerebro consecutivos generados mediante la técnica de SBFSEM (del inglés serial block face electron microscopy (Figura 20 A). Se recopilaron datos de ratones hembra NTG y APP/PS1 tratadas con vehículo o CP2 durante 15 meses a partir de los 9 meses de edad (25mg/kg/día, ver materiales y métodos). La

selección del hipocampo como área de evaluación se fundamentó en la evidencia de que esta región es una de las más afectadas en la EA (86). La reconstrucción del volumen se focalizó en las dendritas mediante la presencia de espinas dendríticas (Figura 20B). Por lo cual, este estudio involucró reconstrucciones de dendritas, mitocondrias y RE en diferentes tipos de ratones, NTG, APP/PS1 y APP/PS1+CP2 (Figura 20C). Para proporcionar una evaluación cuantitativa de la morfología mitocondrial, las mitocondrias se clasificaron en cuatro tipos distintos en función de su relación de aspecto 3D (largo/ancho) y volumen (Figura 20C). El tipo I representa mitocondrias redondas con un diámetro inferior a 1 μm . El tipo II incluye mitocondrias con forma alargada y una longitud de 1 a 5 μm . El tipo III consta de orgánulos alargados de más de 5 μm , y el tipo IV representa MOAS, orgánulos alargados interconectados con más de una mitocondria en forma de lágrimas ($\sim 0.5 \mu\text{m}$ de diámetro) conectadas por una delgada membrana doble que se extiende hasta 5 μm , previamente reportado como un fenotipo mitocondrial alterado en muestras de pacientes con EA (87).

En mitocondrias dendríticas de ratones NTG se pudo observar que eran predominantemente del tipo II (70%), con respecto al tipo I (5 %) y III (15 %) (Figura 20D). Los ratones NTG no presentaban MOAS en el hipocampo. Por otro lado, los ratones APP/PS1 tratados con vehículo mostraron un aumento significativo en la formación de MOAS y de mitocondrias tipo I (2%). No observamos mitocondrias tipo III en ratones APP/PS1. Estos hallazgos respaldan

la evidencia previa de una disfunción mitocondrial en la EA (85), donde se observaba que los ratones APP/PS1 tratados con vehículo presentaban un incremento de las MOAS (80% del total de mitocondrias) y del tipo I (30 %) (85). Por su parte, el tratamiento con CP2 tuvo un efecto beneficioso al restaurar el fenotipo mitocondrial normal, reduciendo la formación de MOAS (24%) y normalizando la proporción de mitocondrias de diferentes tipos respecto al ratones control, reduciendo la cantidad de orgánulos de tipo I de forma redonda (19%), y aumentó la cantidad de mitocondrias de tipo II (49%) y III (9%). Estos datos sugieren que la formación de MOAS y mitocondrias fragmentadas ocurre en respuesta al estrés energético asociado con la EA. El tratamiento con CP2 se revela como una estrategia prometedora para restaurar la morfología mitocondrial y reducir la formación de MOAS en los animales APP/PS1.

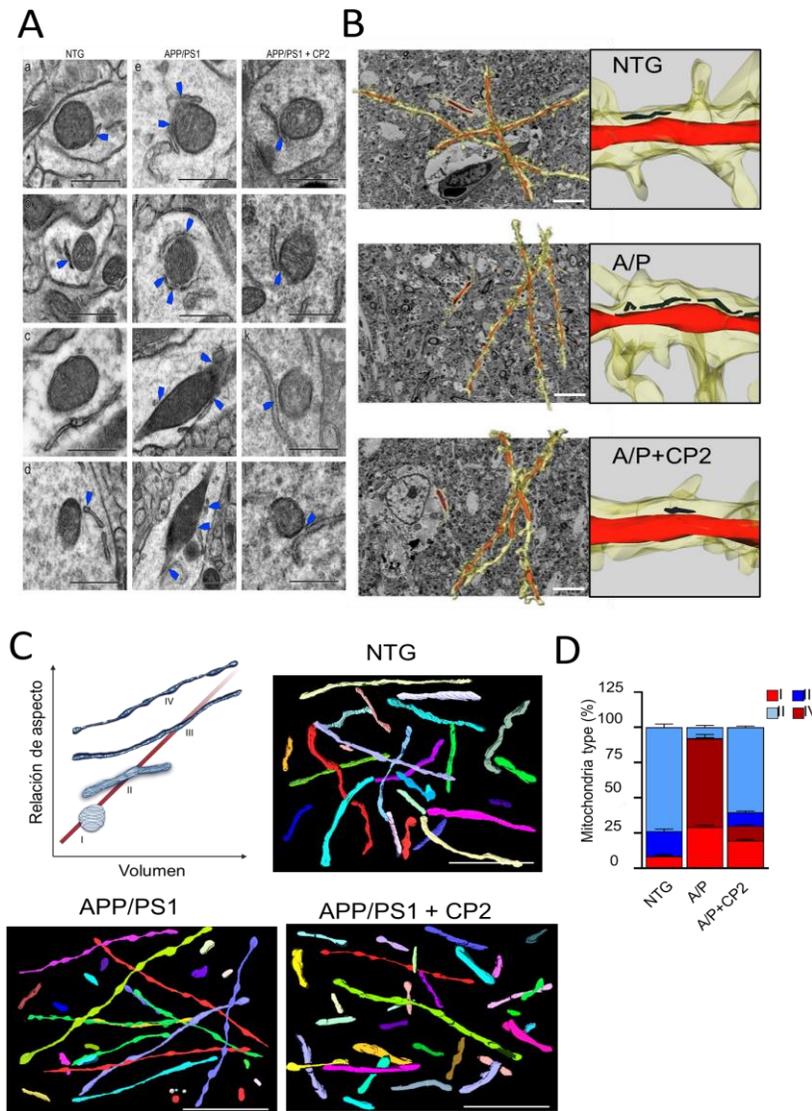


FIG. 20 En dendritas de hipocampo del modelo animal APP/PS1 se observa un incremento de fenotipos mitocondriales alterados obtenidos mediante la **reconstrucción 3DEM**. (A) Imágenes del área CA1 de hipocampo de animales NTG y APP/PS1 de 24 meses (fechas azules), n=3 animales por condición (B) Reconstrucción EM 3D de dendritas (amarillo), mitocondrias (rojo) y RE (azul) en la región del hipocampo CA1 utilizando el software Reconstruct y Amira. (C) Morfología mitocondrial obtenida en CA1 de hipocampos de ratones NTG y APPPS1. Barras de escala, 5 μ m. El análisis de mitocondrias (panel superior izquierdo) fue basado en una clasificaron según su morfología tridimensional; de forma redonda (i), ligeramente alargada (ii), altamente alargada (iii) y MOAS (iv). (D) Análisis morfométrico en la región cerebral CA1, incluyendo la distribución de mitocondrias (n=60-100 mitocondrias por grupo).

Para abordar la pregunta de si la formación de MOAS en el hipocampo de animales APP/PS1 estaba relacionada con cambios en la razón entre los procesos de fisión y fusión mitocondrial, observamos distintos marcadores de función mitocondrial, en fracciones mitocondriales de hipocampo de ratones NTG y APP/PS1 tratados con vehículo o CP2 (Figura 21A).

Pudimos observar en ratones APP/PS1, un aumento en la expresión del marcador de fisión DRP1 fosforilada en S616 (Figura 21B). Sin embargo, el tratamiento con CP2 no indujo un cambio significativo en ratones APP/PS1 en comparación con animales NTG. Interesantemente, encontramos mayores niveles de proteínas de fusión Mfn1 y Mfn2, inducidos por CP2. Estos resultados sugieren que CP2 podría potenciar la homeostasis mitocondrial mediante el incremento de marcadores la fusión y de eliminación de mitocondrias irreversiblemente dañadas, lo que previene la acumulación de orgánulos disfuncionales.

Los resultados indican que el aumento de las MOAS en ratones APP/PS1 se vincula con cambios en la dinámica mitocondrial, provocando una fisión anómala impulsada por la activación de DRP1. La administración de CP2 disminuye las MOAS y mejora la morfología mitocondrial, incluyendo fusiones, biogénesis y mitofagia. Sorprendentemente, esta mejora no parece estar relacionada con una reducción en la activación de DRP1 que induce fisión irregular. Las MAMs desempeñan un papel crucial en la regulación de la dinámica mitocondrial y su

estudio es fundamental para comprender las alteraciones en la morfología mitocondrial en la EA.

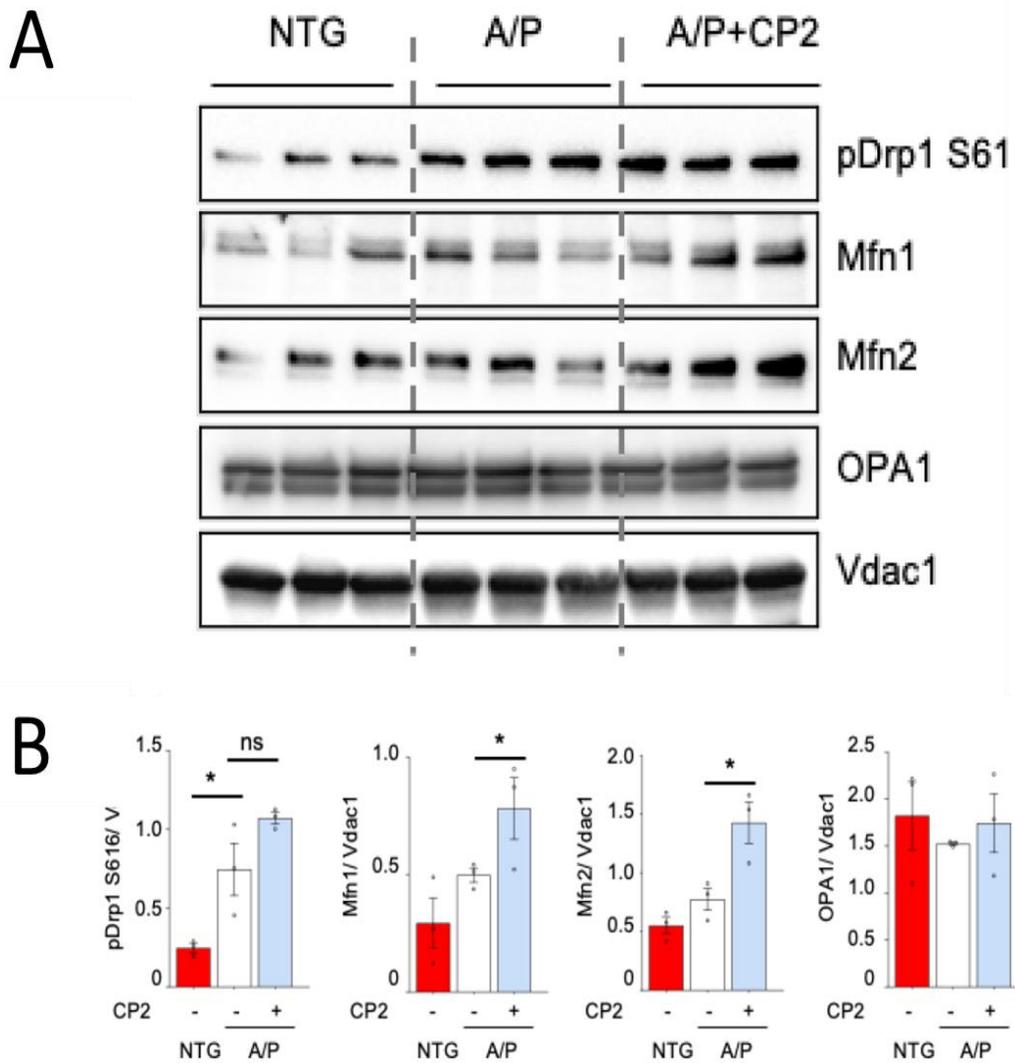


FIG. 21 En fracciones mitocondriales de hipocampo del modelo animal APP/PS1 se observa un incremento del marcador de fisión pDRP1. (A-B). Análisis de Western blot de lisados de fracciones mitocondriales aisladas del tejido hipocampal de ratones NTG, APP/PS1 y APP/PS1+CP2 de 24 meses (C-D) Cuantificación de la inmunorreactividad de las bandas específicas para las distintas proteínas mitocondriales de dinámica mitocondrial pDRP1, Mfn1-2, y OPA1. n = 3-4 ratones por condición.

4.2. CP2 revierte el incremento en la formación de MAMs en animales

APP/PS1

Estudios previos han señalado que la alteración en la formación de MAMs en la EA contribuye a la disfunción mitocondrial, y el desequilibrio en la homeostasis de Ca^{2+} (167). En primer lugar, definimos las MAMs como segmentos del RE que se encuentran a una distancia menor de 40 nm de distancia de las membranas mitocondriales, basándose en protocolos previamente publicados (164). Con el fin de investigar la relación entre los distintos tipos de morfología mitocondrial y la formación de MAMs, utilizamos el software Amira para visualizar y cuantificar la arquitectura de MAMs en el hipocampo de ratones NTG y APP/PS1 tratados con vehículo o CP2 (Figura 22).

Utilizando los parámetros previamente definidos para los cuatro tipos mitocondriales, se evidenció que la presencia de MAMs en los Tipos I-III era intermitente y no conformaba redes continuas. Sin embargo, se observó que estas estructuras se extendían ampliamente sobre las MOAS (Figuras 22A). El perímetro del RE que rodeaba las mitocondrias mostró extensiones similares entre el grupo de ratones NTG y APP/PS1, y las diferencias en longitud para los tipos I-III entre estos dos grupos no fueron significativo (~80 nm, Figura 22B-D). La longitud promedio de las MAMs en las MOAS alcanzó aproximadamente 200 nm (Figura 22E). Adicionalmente, el volumen de las MAMs vinculadas a los tipos I-III de mitocondrias se encontró significativamente incrementado en ratones

APP/PS1 en comparación con sus contrapartes NTG (Figura 22F), y esta amplificación fue aún más pronunciada en las MOAS (Figura 22G). La administración de CP2 redujo el volumen de las MAMs en todos los tipos de mitocondrias en ratones APP/PS1 (Figura 22B-F), enfocándose especialmente en la reducción de la longitud de las MAMs ligadas al fenotipo MOAS (Figura 22E). Los hallazgos sugieren una relación importante entre las MAMs y la dinámica mitocondrial en el contexto de la EA. Respecto a la administración de CP2, parece tener un impacto en la reducción del volumen de las MAMs y, especialmente, en la disminución de la longitud de las MAMs asociadas al fenotipo MOAS.

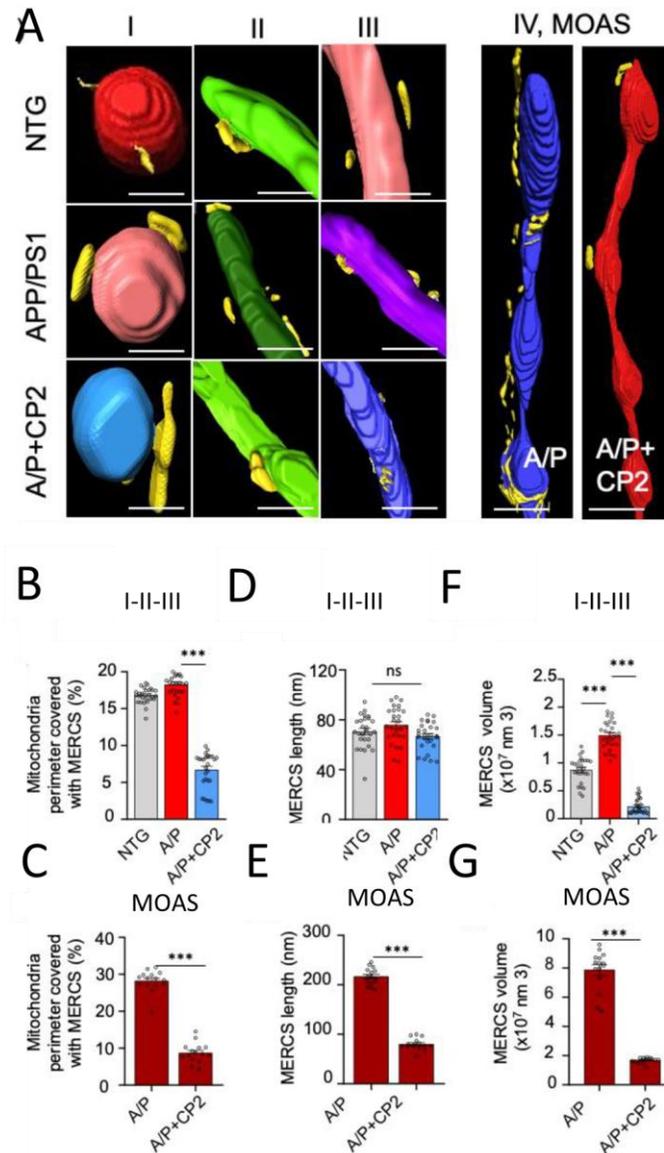


FIG. 22 EVALUACIÓN DE MAM_s EN MUESTRAS DE RATONES SINTOMÁTICOS APP/PS1. (A) Reconstrucciones 3D de MAMs en ratones NTG, APP/PS1 y APP/PS1+CP2 para los tipos mitocondriales I-IV. Las mitocondrias se muestran en colores variados, el RE en amarillo. Imágenes de SBFSEM del hipocampo CA1 se usaron para reconstrucciones en Amira (ver materiales). Escala, 0.5 μ m. (B-G) Análisis morfométricos revelan que CP2 reduce significativamente la cobertura (b, c), longitud (d, e) y volumen (f, g) de MAMs en los 4 tipos de mitocondrias. Se analizaron ~62-100 mitocondrias por grupo.

Para profundizar en el estudio de los mecanismo regulatorios que participaría en la formación de MAMs, nos propusimos estudiar cambios de las proteínas asociadas a la regulación del Ca^{2+} en las MAMs en fracciones mitocondriales de hipocampo de ratones NTG y APP/PS1 tratados con vehículo o CP2 (Figura 23). Estudiamos el complejo compuesto por las proteínas GRP75, IP_3R , TG2 y VDAC1 (Figura 23A), que participan en la transferencia bidireccional de Ca^{2+} , modulando procesos vitales como la regulación del metabolismo energético, la señalización celular y la respuesta adaptativa al estrés en la EA (Tabla 1) (88).

Pudimos observar un aumento en la expresión del marcador de MAMs TG2 e IP_3R en ratones APP/PS1 en comparación con ratones NTG (Figura 23B). El tratamiento con CP2 no indujo un cambio significativo en los niveles de IP_3R asociados con las mitocondrias en ratones APP/PS1; sin embargo, logró revertir el incremento en el marcador TG2 en fracciones mitocondriales del modelo APP/PS1 (Figura 23 C). Contrariamente, el marcador GRP75 disminuyó en ratones APP/PS1 en comparación con ratones NTG (Figura 23 D). En tanto que el tratamiento con CP2, indujo un incremento significativo en los niveles de GRP5 asociados con las mitocondrias en ratones APP/PS1. Mientras que no fue posible observar cambios en los niveles del canal de Ca^{2+} VDAC1 (Figura 23E).

En conjunto, estos resultados proporcionan nuevas perspectivas sobre las alteraciones moleculares en las MAMs en el contexto de la EA, subrayando el potencial del tratamiento con CP2 para modular la expresión de proteínas clave

de la vía IP₃R/TG2, y atenuar desequilibrios patológicos en la comunicación retículo-mitocondria y la homeostasis del Ca²⁺ en la EA (82).

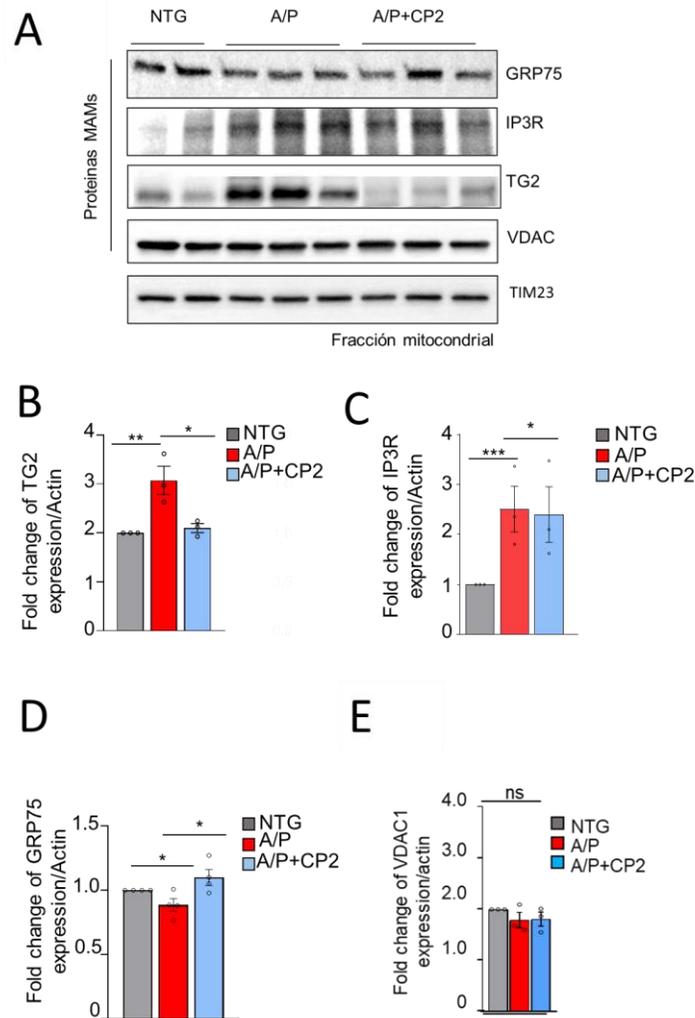


FIG. 23 EVALUACIÓN DE LAS PROTEÍNAS MAMS EN FRACCIONES MITOCONDRIALES DE HIPOCAMPO DE RATONES SINTOMÁTICOS APP/PS1.(A) Se llevó a cabo un análisis Western blot en fracciones mitocondriales del hipocampo de ratones NTG y APP/PS1, tratados con vehículo o CP2, para evaluar las proteínas MAMs: GRP75, IP3R, TG2 y VDAC1. Este complejo facilita la transferencia de Ca²⁺ desde el RE a través de IP3R y VDAC, formando microdominios de Ca²⁺. (B-E) Se realizó un análisis densitométrico normalizado respecto con la proteína mitocondrial TIM23, usando unidades relativas de luz (RLU), en tres experimentos independientes.

VII. Discusión:

Como se discutió en la introducción de este trabajo, a pesar de los significativos esfuerzos que se han realizado en las últimas décadas, el tratamiento contra la EA sigue siendo un desafío pendiente. El punto clave podría estar en la carencia de biomarcadores tempranos, y de blancos moleculares específicos, que permitiesen una estrategia terapéutica temprana, y que complica aún más la búsqueda de soluciones efectivas para esta enfermedad (89). Los medicamentos ya considerados tradicionales para la EA, tales como inhibidores de la colinesterasa y antagonistas de los NMDAR, sólo han ofrecido sólo una ralentización del deterioro cognitivo y no presentan un impacto significativo en la reversión de la enfermedad (90).

En este contexto, el péptido A β y su agregación, han sido ampliamente establecidos como un factor clave en la patogénesis de la EA (78). Nuevas estrategias dirigidas a interferir con la formación de las distintas conformaciones insolubles del péptido A β ha sido otro enfoque en la prevención y tratamiento de esta enfermedad (91). Sin embargo, lograr la inhibición total de la agregación de A β y la desintegración de sus diversas especies sigue siendo un desafío pendiente. Abordar las causas iniciales de esa presencia anormal de agregados del péptido A β , ha sido en parte la proyección de este trabajo de tesis.

En estos últimos 2 años, la FDA ha aprobado terapias de anticuerpos monoclonales como Aducanumab, Donanemab y Lecanemab, con el propósito de reducir la carga de amiloide cerebral; sin embargo, su eficacia y seguridad continúan siendo objeto de estudio (92, 93). Por lo cual, resulta esencial explorar nuevos aspectos, eventos y eventuales blancos moleculares que condicionen la producción de amiloide, para lograr una comprensión más integral de los procesos subyacentes al inicio y progresión de la EA. En este contexto, la enzima TG2 emerge como un factor interesante de estudiar y se perfila como un componente central en esta exploración, dado su papel en la modificación y estabilización de agregados de amiloides, así como su interacción con diversas proteínas y vías relacionadas con la patogénesis de la EA.

En este trabajo, nos enfocamos en explorar el rol de la actividad TGasa de TG2 en la formación enlaces isopeptídicos en el péptido A β . Establecimos un criterio para comparar entre los agregados del péptido A β obtenidos en nuestro laboratorio mediante autocatálisis (38) y aquellos agregados por la acción de la TG2 (Figura 12). Un hallazgo inesperado en este estudio radicó en la marcada potenciación ejercida por TG2 sobre la cinética de agregación del péptido A β , observada a una concentración de 40 μ U/ml. Pudimos observar que TG2 induce un perfil temporal de agregación de cinética hiperbólica, lo que sugiere una formación de agregados de manera rápida y progresiva, induciendo la formación de agregados de mayor tamaño y complejidad (7-13 unidades). mientras que la autocatálisis induce una cinética sigmoideal, con una fase de nucleación y

crecimiento más progresiva (4-7 unidades). Estos resultados sugieren que TG2 sería capaz de inducir una mayor agregación de estructuras tipo oligoméricas o pre-fibrilares, lo que se refuerza con la evidencia de que TG2 provoca el entrecruzamiento intramolecular en A β con los residuos Lys 16, induciendo oligómeros estables frente a los agentes reductores SDS, y particularmente resistentes al calor, y a proteasas intracelulares a concentraciones fisiológicas de A β en el rango nanomolar (53, 63).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo por medio de estrategias *in silico* e *in vitro* muestran que el dominio catalítico de TG2 (Figura 13), particularmente su triada catalítica Cys277-His335-Asp358, es capaz de interactuar con monómeros de A β en la porción N-terminal, promoviendo la generación de especies tóxicas al estabilizar los residuos 1 y 14 (94). Basándose en modelos de cristalización que describen la cinética de la formación de fibrillas de amiloides (95), nuestros resultados nos permiten postular que los cambios inducidos por TG2 son capaces de provocar alteraciones en la fase de nucleación, termodinámicamente desfavorable, por sobre los procesos “autocatalíticos”, ajustándose al modelo cinético de “Ockham's razor” de dos fases (k_1 , k_2), modelo reajustado del modelo de Finke-Watzky para proteínas amiloides con agregación sigmoidea (96). Por otra parte, estudios *in vitro* han demostrado que la fibrilación de A β consiste en un proceso de dos pasos que requiere primero la nucleación de una semilla, antes de la polimerización en fibrillas de amiloide (97). En conjunto, nuestro modelo enzimático podría ayudar a extrapolar observaciones

desde modelos de ratón con EA a humanos con EA, particularmente en lo que respecta a las pruebas preclínicas de terapias reductoras de la agregación de A β . En futuros trabajos se requerirá una caracterización adicional utilizando técnicas complementarias como microespectroscopia FT-IR para responder a este problema analítico.

Otro de los principales resultados observados en este trabajo, fue la alta excitotoxicidad inducida de forma aguda por los agregados de A β _{TG2}, lo que se alinea con informes anteriores que indican que estructuras de peso molecular medio (~ 3-14 unidades) son altamente tóxicas, capaces de inducir alteraciones a nivel pre y post-sináptico (94, 98, 99). Mientras que existe evidencia científica que muestra la capacidad de TG2 de inducir ensamblajes de A β tipo oligoméricas, capaces de inducir el deterioro de las LTP y la consecuente falla cognitiva (60).

El empleo de Z-DON (IC50: 150 nM), tiene un impacto significativo en la cinética de agregación de la A β _{TG2} en la fase estacionaria (Figura 12), lo que se alinea con los efectos protectores observados a nivel mitocondrial (Figura 14-16) y sinápticos (Figura 18) inducidos al inhibir la actividad TGasa de TG2. Estos hallazgos sugieren que Z-DON muestra un efecto beneficioso en la reducción de agregados tóxicos de A β , un evento clave en la patogénesis de la EA, como hemos discutido ampliamente en el desarrollo de esta tesis. Estos resultados son consistentes con investigaciones previas que han demostrado que Z-DON es

capaz de inhibir la actividad catalítica de TG2 y la formación de placas amiloides en el modelo animal APP/PS1 (64). Se complementan nuestras observaciones con estudios donde previamente, el uso de cystamina, otro inhibidor de la actividad TGasa de TG2, ha mostrado la capacidad de retrasar la edad de aparición de la disfunción motora, y sobrevida en un modelo animal de HD, y el déficit cognitivo en un modelo animal de la EA (100, 101). En conjunto, nuestros resultados sugieren que Z-DON podría representar una estrategia prometedora para reducir la agregación patológica de proteínas amiloide y mitigar los efectos excitotóxicos asociados con la neurodegeneración. Sin embargo, es importante destacar que se requieren estudios adicionales, tanto *in vitro* como *in vivo*, para evaluar la eficacia y seguridad de Z-DON como posible tratamiento para la EA, al mismo tiempo que a través de sus efectos, podemos proponer a TG2 como un elemento potencialmente clave en el inicio de la toxicidad por desbalance amiloide

Lo anterior se sustenta en nuestros resultados, pero también en la evidencia presente en la literatura que apunta a que el rol TGasa de TG2 es clave en la agregación de péptidos clave en enfermedades neurodegenerativas, tales como HD, PD, y tautopatías (58). Utilizando técnicas de espectroscopia de masas y análisis de péptidos se han logrado identificar residuos específicos de aminoácidos de Lys y Gly en tau (58), α -sinucleína (102), y Htt (103), que fueron modificados por la TG2. Estas modificaciones indujeron agregados altamente neurotóxicos menos susceptible a la hidrólisis, al igual que los agregados del

péptido A β reportados previamente (63), lo que sugiere un vínculo importante en la cascada de eventos que subyacen a diversas enfermedades neurodegenerativas.

Otro resultado relevante de en este trabajo fue el aumento TG2 en diferentes modelos animales de la EA en estadios tardíos de envejecimiento que presentaban placas amiloides (104). Pudimos observar que TG2 estaba incrementado en un modelo de toxicidad crónica con A β de neuronas hipocampales (24h, Figura 8), en el hipocampo de animales J20 (10 meses, Figura 9), y APP/PS1 (24 meses, Figura 10). Para ahondar aún más en estas evidencias, pudimos testear que la porción TGasa de la TG2 presente en hipocampo de animales J20 se encontraba incrementada y era capaz de formar enlaces isopeptídicos en el péptido A β (Figura 11). Estos resultados están en línea con reporten previos, que muestran la presencia de actividad catalítica de TG2 presente en el núcleo de placas seniles en muestras de pacientes con EA y en la región cortico-hipocampal del modelo transgénico de la EA APP23 (62, 63, 105). Otro estudio relevante realizado en animales ratones transgénicos P301L-tau, que desarrollan considerablemente ovillos neurofibrilares, mostró un incremento en la actividad de TG2 corteza, el rombencéfalo y la médula espinal (58). En conjunto, lo que sugiere que la actividad TGasa de TG2 desempeña un papel significativo en la formación de agregados amiloides, sin embargo, es importante destacar que, aún se requieren más datos y estudios adicionales *in vivo* en la formación de placas amiloides en estadios tempranos.

A nivel fisiopatológico, varios reportes concuerdan con nuestros hallazgos en que sugieren que la actividad TGasa está asociada a una alteración en la funcionalidad mitocondrial (54). En un modelo animal de la HD, la inducción de la TGasa induce la modificación de las histonas 3 (H3), lo que resulta en una regulación a la baja de la transcripción de genes clave para la función mitocondrial, tales como PPAR γ , PGC-1 α y Cyt C (106). Nuestros resultados muestran que la fracción mitocondrial de TG2 se encontraba incrementada en hipocampo de animales APP/PS1 (Figura 10 y 23). Este incremento se correlaciona con fenotipos mitocondriales alterados tipos MOAS y fragmentados (Figura 20), y con un incremento en las formación de MAMs (Figura 22), previamente postulado como evento clave en la fisiopatología de la EA (107). En suma, estas evidencias sugieren que, en un contexto fisiopatológico, la TG2 ejerce un efecto negativo sobre la función mitocondrial, sin embargo, será clave caracterizar la porción catalíticamente activa de la TG2 a nivel subcelular frente a estímulos estresores para soportar esta hipótesis, que sin duda abre nuevas líneas de investigación a partir de esta tesis.

Desde el punto de vista global, y considerando la alteración de la función mitocondrial observada en esta tesis, parecía interesante abordar otros aspectos que relacionasen la función mitocondrial con el contexto de la fisiopatología de la EA; es por ello, que en este trabajo, adicionalmente pudimos aportar nueva evidencia que muestra que la respuesta adaptativa al estrés asociada con la inhibición parcial de MCI con el fármaco CP2, resulta en la activación de múltiples

mecanismos asociados a función mitocondrial, incluidos la comunicación retículo-mitocondria, dinámica y biogénesis mitocondrial (108), y por lo tanto, ejerce efectos neuroprotectores y se postula como un elemento contribuyente al proceso de disfunción mitocondrial observado y discutido en la presente tesis. Así, nuestros resultados muestran que en el modelo transgénico APP/PS1, CP2 redujo la cobertura de las MAMs en dendritas de hipocampo. Además, en fracciones mitocondriales, CP2 fue capaz de prevenir la sobreexpresión de la vía IP₃R/TG2/SIGMAR1, responsable de potenciar el flujo de Ca²⁺ hacia las mitocondrias (46). Esto asociado a la evidencia que indica que un aumento en los MAMs estaría vinculado con el envejecimiento, y la promoción de la vía amiloidogénica (46, 109), podría indicar un posible efecto beneficioso del tratamiento también en ratones NTG envejecidos. Sin embargo, las rutas de señalización que regulan la formación de las MAMs y localización de TG2 durante condiciones de estrés y excitotoxicidad aún no están caracterizadas, por lo que es muy interesante plantear la posibilidad de que se necesaria más investigación en este punto que oriente, adecuadamente esta estrategia desde el punto de vista de los mecanismos que subyacen a estos efectos.

La utilización de técnicas y tecnologías de alta resolución como la aplicación de SBFSEM y reconstrucciones de EM 3D permitieron observar que tanto la morfología mitocondrial, como los contactos entre el retículo endoplasmático y las mitocondrias en dendritas de hipocampo, están estrechamente coordinados. Esta sincronización es esperada, ya que ambas características influyen en la

capacidad mitocondrial de captar iones de Ca^{2+} , lo que impacta diversos procesos fisiológicos. En línea con reportes previos que han detectado la presencia de MOAS en cerebros de pacientes con EA (110), en este trabajo hemos detectado un incremento de las MOAS en muestras de hipocampo de animales APP/PS1 (Figura 20). Interesantemente, este fenotipo estaba asociado a una alta proporción de MAMs (Figura 22), lo que sugiere una posible correlación entre la formación de MOAS y las alteraciones en la formación de MAMs como mecanismo de supervivencia celular. Cabe destacar que, en este trabajo, nos centramos exclusivamente en las dendritas. Por lo tanto, queda por determinar estos cambios en la sinapsis, y en otras células cerebrales, para evaluar si es capaz de provocarse efectos beneficiosos similares, sobre la morfología mitocondrial y su consecuente correlación funcional con las MAMs.

Dado el importante papel que desempeñan las MAMs como centro regulador de proteínas de dinámica mitocondrial (111), es plausible postular que esta comunicación sea de importancia crucial para la formación de las MOAS detectada en muestras de animales APP/PS1, como un proceso que fomente la fisión alterada mediada por la fosforilación de DRP1 en las mitocondrias. Sin embargo, hasta ahora, no hay pruebas concluyentes que expliquen cómo DRP1 podría estar conectado al aumento de MAMs. Nuestros hallazgos concuerdan con otros estudios que postulan que el procesamiento de APP y formación del péptido $\text{A}\beta$ ocurriría en las MAMs, por lo cual, funcionaría como un centro

integrador durante la progresión de la EA (112, 113). Nuevos estudios que aborden el rol de la actividad TGasa en la potenciación de la vía amiloidogénica y el procesamiento de APP serán clave para reforzar estas hipótesis.

En conjunto, nos permitimos postular que existiría una estrecha interrelación entre los cambios en expresión y actividad de TG2, la formación de MAMs y la dinámica mitocondrial. Nuestro estudio reveló un hallazgo altamente innovador que puso en evidencia una serie de eventos importantes como que: (1) la exposición a $A\beta_{TG2}$ indujo una rápida hiperexcitabilidad, lo que eventualmente condujo a un agotamiento crónico de vesículas de neurotransmisores y a una disfunción sináptica prolongada. (2) Agregados de $A\beta_{TG2}$ estaría induciendo aumentos locales en los niveles citosólicos de Ca^{2+} , generados por la liberación de Ca^{2+} desde compartimentos intracelulares o por ingreso desde el exterior celular, induciendo alteraciones en la función neuronal y mitocondrial. Este fenómeno podría encontrar su explicación en las evidencias que sugieren que las proteínas priónicas (PrPc) o los receptores de glutamato NMDAR podrían actuar como receptores para los oligómeros de $A\beta$ en la membrana plasmática (99). (3) Esta interacción podría establecer un “circulo vicioso” en el que la exposición inicial a $A\beta$ Os induciría la expresión de TG2, lo que a su vez promovería una mayor agregación del péptido $A\beta$. Estos resultados están en línea con evidencias previas de la literatura que señala que los $A\beta$ Os pueden potenciar el procesamiento de la APP, lo que resulta en una mayor producción de $A\beta$ y su

acumulación en el interior de las células (40, 77). En conjunto, estas evidencias sugieren una interacción compleja entre la actividad de la TG2 y los oligómeros de A β , lo que podría contribuir a los mecanismos subyacentes de la patogénesis de la EA (40).

Para terminar, el esquema de la Figura 24 presenta el resumen de los resultados expuestos en esta tesis que nos permiten concluir que:

- ✓ La enzima TG2 clásicamente descrita como un agente reticulante de proteínas, se sobreexpresa de forma funcional en hipocampo de animales J20
- ✓ Durante la progresión de la EA, la actividad TGasa promovería la agregación amiloide
- ✓ TG2 mitocondrial participaría en los procesos de disfunción mitocondrial, donde participaría en el incremento del influjo de Ca²⁺.
- ✓ Existe una correlación directa entre la mayor formación de MAMs, la sobreexpresión de TG2 y el desbalance de los marcadores de fisión y, por lo tanto, contribuirían en los procesos de disfunción mitocondrial.
- ✓ Postulamos que la activación de TGasa es una propiedad que podría ser compartida entre diferentes enfermedades neurodegenerativas

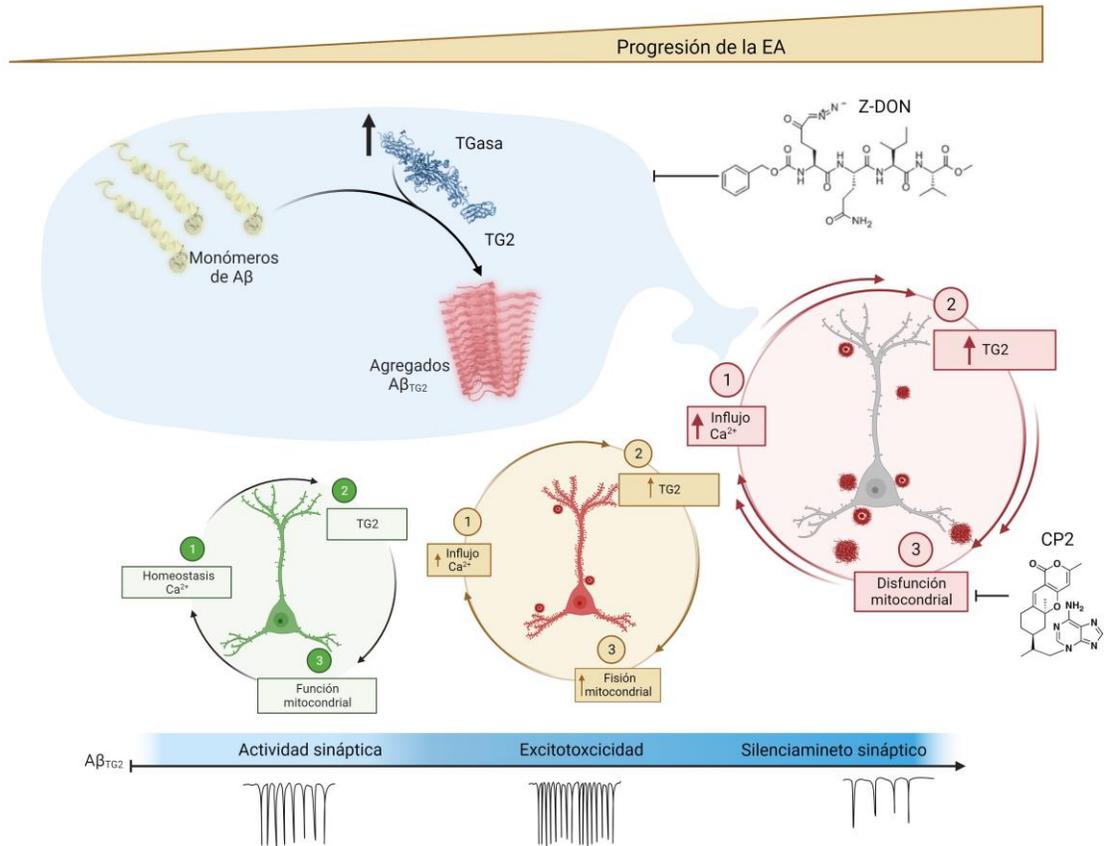


FIG. 24. MODELO PROPUESTO DEL ROL FUNCIONAL DE LA ACTIVIDAD TRANSGLUTAMINASA DE LA TG2 EN LA VÍA AMILOIDOGÉNICA. Nuestros resultados plantean que durante la progresión de la EA se induce la activación de la función transamidante de TG2 induce la formación de enlaces isopeptídicos del péptido Aβ. Los agregados de Aβ podrían promover (1) dishomeostasis del Ca²⁺, (2) disfunción mitocondrial, (3) aumento en los niveles de TG2, en un ciclo vicioso de toxicidad amiloide. Finalmente, los agregados de Aβ_{TG2} inducen excitotoxicidad, lo que conduce a un silenciamiento sináptico. Postulamos que los fármacos Z-DON y CP2 inducen efectos neuroprotectores para prevenir los principales efecto tóxicos observados en modelos animales de la EA.

VIII. Conclusión

Esta tesis representa el primer trabajo en donde se ha evidenciado el rol de TG2 en la agregación del péptido A β y su impacto en la función mitocondrial y actividad sináptica; por lo tanto, TG2, representa una nueva propuesta para estudiar los mecanismos celulares asociados a la progresión de la EA, que conectan la activación cerebral de la actividad TGasa de TG2, los incrementos iniciales en la señalización disfuncional de Ca⁺² y la toxicidad amiloide en la EA.

IX Bibliografía

1. A. Kumar, J. Sidhu, A. Goyal, J. W. Tsao, "Alzheimer Disease" in StatPearls. (StatPearls Publishing

Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC., Treasure Island (FL), 2023).

2. R. J. Castellani, R. K. Rolston, M. A. Smith, Alzheimer disease. *Dis Mon* **56**, 484-546 (2010).
3. J. Cummings, G. Lee, K. Zhong, J. Fonseca, K. Taghva, Alzheimer's disease drug development pipeline: 2021. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions* **7**, e12179 (2021).
4. S. A. Gale, D. Acar, K. R. Daffner, Dementia. *Am J Med* **131**, 1161-1169 (2018).
5. Anonymous, 2021 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* **17**, 327-406 (2021).
6. M. Prince *et al.*, Recent global trends in the prevalence and incidence of dementia, and survival with dementia. *Alzheimer's research & therapy* **8**, 23-23 (2016).
7. D. S. Knopman *et al.*, The National Institute on Aging and the Alzheimer's Association Research Framework for Alzheimer's disease: Perspectives from the Research Roundtable. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* **14**, 563-575 (2018).
8. A. M. Leiva *et al.*, Personas mayores en Chile: el nuevo desafío social, económico y sanitario del Siglo XXI. *Revista médica de Chile* **148**, 799-809 (2020).
9. C. Ballard *et al.*, Alzheimer's disease. *Lancet* **377**, 1019-1031 (2011).
10. S. Krumm *et al.*, Cortical thinning of parahippocampal subregions in very early Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **38**, 188-196 (2016).
11. S. Marino *et al.*, Longitudinal analysis of brain atrophy in Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *J Int Med Res* **47**, 5019-5027 (2019).
12. J. Bali *et al.*, Cellular basis of Alzheimer's disease. *Ann Indian Acad Neurol* **13**, S89-93 (2010).
13. S. Bandyopadhyay, Role of Neuron and Glia in Alzheimer's Disease and Associated Vascular Dysfunction. *Front Aging Neurosci* **13**, 653334 (2021).
14. L. M. Osborn, W. Kamphuis, W. J. Wadman, E. M. Hol, Astroglialosis: An integral player in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* **144**, 121-141 (2016).
15. G. Thinakaran, E. H. Koo, Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *The Journal of biological chemistry* **283**, 29615-29619 (2008).
16. J. Raskin, J. Cummings, J. Hardy, K. Schuh, R. A. Dean, Neurobiology of Alzheimer's Disease: Integrated Molecular, Physiological, Anatomical,

- Biomarker, and Cognitive Dimensions. *Curr Alzheimer Res* **12**, 712-722 (2015).
17. J. Dorszewska, M. Prendecki, A. Oczkowska, M. Dezor, W. Kozubski, Molecular Basis of Familial and Sporadic Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res* **13**, 952-963 (2016).
 18. L. Wu *et al.*, Early-onset familial Alzheimer's disease (EOFAD). *Can J Neurol Sci* **39**, 436-445 (2012).
 19. U. C. Müller, T. Deller, M. Korte, Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nature Reviews Neuroscience* **18**, 281-298 (2017).
 20. M. Mullan *et al.*, A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet* **1**, 345-347 (1992).
 21. T. V. Andreeva, W. J. Lukiw, E. I. Rogaev, Biological Basis for Amyloidogenesis in Alzheimer's Disease. *Biochemistry (Mosc)* **82**, 122-139 (2017).
 22. F. P. Perez *et al.*, Late-onset Alzheimer's disease, heating up and foxed by several proteins: pathomolecular effects of the aging process. *J Alzheimers Dis* **40**, 1-17 (2014).
 23. T. Kondo, Y. Yada, T. Ikeuchi, H. Inoue, CDiP technology for reverse engineering of sporadic Alzheimer's disease. *Journal of Human Genetics* **68**, 231-235 (2023).
 24. C. C. Liu, C. C. Liu, T. Kanekiyo, H. Xu, G. Bu, Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol* **9**, 106-118 (2013).
 25. S. Mishra *et al.*, The Alzheimer's gene SORL1 is a regulator of endosomal traffic and recycling in human neurons. *Cell Mol Life Sci* **79**, 162 (2022).
 26. R. J. O'Brien, P. C. Wong, Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci* **34**, 185-204 (2011).
 27. Y. H. Suh, F. Checler, Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol Rev* **54**, 469-525 (2002).
 28. S. Chasseigneaux, B. Allinquant, Functions of A β , sAPP α and sAPP β : similarities and differences. *J Neurochem* **120 Suppl 1**, 99-108 (2012).
 29. H. Hampel *et al.*, The Amyloid- β Pathway in Alzheimer's Disease. *Molecular Psychiatry* **26**, 5481-5503 (2021).
 30. V. Pérez-Grijalba *et al.*, Plasma A β 42/40 Ratio Detects Early Stages of Alzheimer's Disease and Correlates with CSF and Neuroimaging Biomarkers in the AB255 Study. *J Prev Alzheimers Dis* **6**, 34-41 (2019).
 31. E. Niemantsverdriet *et al.*, The Cerebrospinal Fluid A β 1-42/A β 1-40 Ratio Improves Concordance with Amyloid-PET for Diagnosing Alzheimer's Disease in a Clinical Setting. *J Alzheimers Dis* **60**, 561-576 (2017).
 32. P. Chatterjee *et al.*, Plasma A β 42/40 ratio, p-tau181, GFAP, and NfL across the Alzheimer's disease continuum: A cross-sectional and

- longitudinal study in the AIBL cohort. *Alzheimers Dement* **19**, 1117-1134 (2023).
33. E. N. Cline, M. A. Bicca, K. L. Viola, W. L. Klein, The Amyloid- β Oligomer Hypothesis: Beginning of the Third Decade. *J Alzheimers Dis* **64**, S567-s610 (2018).
 34. M. A. Dayeh, G. Livadiotis, S. Elaydi, A discrete mathematical model for the aggregation of β -Amyloid. *PLoS One* **13**, e0196402 (2018).
 35. A. Wentink, C. Nussbaum-Krammer, B. Bukau, Modulation of Amyloid States by Molecular Chaperones. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **11** (2019).
 36. J. Parodi *et al.*, Beta-amyloid causes depletion of synaptic vesicles leading to neurotransmission failure. *J Biol Chem* **285**, 2506-2514 (2010).
 37. F. J. Sepulveda, J. Parodi, R. W. Peoples, C. Opazo, L. G. Aguayo, Synaptotoxicity of Alzheimer beta amyloid can be explained by its membrane perforating property. *PLoS One* **5**, e11820 (2010).
 38. J. D. Panes *et al.*, Changes in PGC-1 α /SIRT1 Signaling Impact on Mitochondrial Homeostasis in Amyloid-Beta Peptide Toxicity Model. *Front Pharmacol* **11**, 709 (2020).
 39. B. P. Imbimbo, S. Ippati, M. Watling, Should drug discovery scientists still embrace the amyloid hypothesis for Alzheimer's disease or should they be looking elsewhere? *Expert Opin Drug Discov* **15**, 1241-1251 (2020).
 40. M. Rolland *et al.*, Effect of A β Oligomers on Neuronal APP Triggers a Vicious Cycle Leading to the Propagation of Synaptic Plasticity Alterations to Healthy Neurons. *J Neurosci* **40**, 5161-5176 (2020).
 41. M. Calvo-Rodriguez, E. Hernando-Perez, L. Nuñez, C. Villalobos, Amyloid β Oligomers Increase ER-Mitochondria Ca(2+) Cross Talk in Young Hippocampal Neurons and Exacerbate Aging-Induced Intracellular Ca(2+) Remodeling. *Front Cell Neurosci* **13**, 22 (2019).
 42. N. M. B. Yapa, V. Lisnyak, B. Reljic, M. T. Ryan, Mitochondrial dynamics in health and disease. *FEBS Lett* **595**, 1184-1204 (2021).
 43. A. Misrani, S. Tabassum, L. Yang, Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience* **13** (2021).
 44. L. Zhang *et al.*, Altered brain energetics induces mitochondrial fission arrest in Alzheimer's Disease. *Scientific Reports* **6**, 18725 (2016).
 45. L. Hedskog *et al.*, Modulation of the endoplasmic reticulum-mitochondria interface in Alzheimer's disease and related models. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 7916-7921 (2013).
 46. L. Barazzuol, F. Giamogante, T. Calì, Mitochondria Associated Membranes (MAMs): Architecture and physiopathological role. *Cell Calcium* **94**, 102343 (2021).
 47. A. Ajoalabady, D. Lindholm, J. Ren, D. Pratico, ER stress and UPR in Alzheimer's disease: mechanisms, pathogenesis, treatments. *Cell Death Dis* **13**, 706 (2022).

48. N. Soejima *et al.*, Intracellular accumulation of toxic turn amyloid- β is associated with endoplasmic reticulum stress in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* **10**, 11-20 (2013).
49. S. Maity *et al.*, Impact of ER Stress and ER-Mitochondrial Crosstalk in Huntington's Disease. *Int J Mol Sci* **23** (2022).
50. M. V. Nurminskaya, A. M. Belkin, Cellular functions of tissue transglutaminase. *Int Rev Cell Mol Biol* **294**, 1-97 (2012).
51. K. Mehta, A. Kumar, H. I. Kim, Transglutaminase 2: a multi-tasking protein in the complex circuitry of inflammation and cancer. *Biochem Pharmacol* **80**, 1921-1929 (2010).
52. P. G. Mastroberardino *et al.*, "Tissue" transglutaminase contributes to the formation of disulphide bridges in proteins of mitochondrial respiratory complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1757**, 1357-1365 (2006).
53. M. M. M. Wilhelmus, C. A. Jongenelen, J. Bol, B. Drukarch, Interaction between tissue transglutaminase and amyloid-beta: Protein-protein binding versus enzymatic crosslinking. *Anal Biochem* **592**, 113578 (2020).
54. T. S. Lai, C. J. Lin, Y. T. Wu, C. J. Wu, Tissue transglutaminase (TG2) and mitochondrial function and dysfunction. *Front Biosci (Landmark Ed)* **22**, 1114-1137 (2017).
55. F. Rossin, M. D'Eletto, D. Macdonald, M. G. Farrace, M. Piacentini, TG2 transamidating activity acts as a reostat controlling the interplay between apoptosis and autophagy. *Amino Acids* **42**, 1793-1802 (2012).
56. K. Mehta, J. Y. Fok, L. S. Mangala, Tissue transglutaminase: from biological glue to cell survival cues. *Front Biosci* **11**, 173-185 (2006).
57. B. O. Odii, P. Coussons, Biological Functionalities of Transglutaminase 2 and the Possibility of Its Compensation by Other Members of the Transglutaminase Family. *The Scientific World Journal* **2014**, 714561 (2014).
58. B. Min, K. C. Chung, New insight into transglutaminase 2 and link to neurodegenerative diseases. *BMB Rep* **51**, 5-13 (2018).
59. A. Balupuri, K. E. Choi, N. S. Kang, Aggregation Mechanism of Alzheimer's Amyloid β -Peptide Mediated by α -Strand/ α -Sheet Structure. *Int J Mol Sci* **21** (2020).
60. D. M. Hartley *et al.*, Transglutaminase induces protofibril-like amyloid beta-protein assemblies that are protease-resistant and inhibit long-term potentiation. *J Biol Chem* **283**, 16790-16800 (2008).
61. R. E. Lackie *et al.*, The Hsp70/Hsp90 Chaperone Machinery in Neurodegenerative Diseases. *Front Neurosci* **11**, 254 (2017).
62. M. M. Wilhelmus, M. de Jager, A. B. Smit, R. J. van der Loo, B. Drukarch, Catalytically active tissue transglutaminase colocalises with A β pathology in Alzheimer's disease mouse models. *Sci Rep* **6**, 20569 (2016).

63. M. M. Wilhelmus *et al.*, Transglutaminases and transglutaminase-catalyzed cross-links colocalize with the pathological lesions in Alzheimer's disease brain. *Brain Pathol* **19**, 612-622 (2009).
64. M. M. M. Wilhelmus, M. de Jager, A. B. Smit, R. J. van der Loo, B. Drukarch, Catalytically active tissue transglutaminase colocalises with A β pathology in Alzheimer's disease mouse models. *Scientific Reports* **6**, 20569 (2016).
65. M. M. M. Wilhelmus *et al.*, Absence of tissue transglutaminase reduces amyloid-beta pathology in APP23 mice. *Neuropathol Appl Neurobiol* **48**, e12796 (2022).
66. L. Lorand, R. M. Graham, Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 140-156 (2003).
67. D. Kozakov *et al.*, The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nat Protoc* **12**, 255-278 (2017).
68. R. I. Fonteriz *et al.*, Monitoring mitochondrial [Ca(2+)] dynamics with rhod-2, ratiometric pericam and aequorin. *Cell Calcium* **48**, 61-69 (2010).
69. F. Lu, J. Sun, T. Sun, H. Cheng, S. Yang, Fluorescence-Based Measurements of Store-Operated Ca(2+) Entry in Cancer Cells Using Fluo-4 and Confocal Live-Cell Imaging. *Methods Mol Biol* **1843**, 63-68 (2018).
70. F. Sivandzade, A. Bhalerao, L. Cucullo, Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe. *Bio Protoc* **9** (2019).
71. A. Stojakovic *et al.*, Partial inhibition of mitochondrial complex I ameliorates Alzheimer's disease pathology and cognition in APP/PS1 female mice. *Communications Biology* **4**, 61 (2021).
72. M. Yang *et al.*, Mitochondria-Associated ER Membranes - The Origin Site of Autophagy. *Front Cell Dev Biol* **8**, 595 (2020).
73. E. Garza-Lopez *et al.*, Protocols for Generating Surfaces and Measuring 3D Organelle Morphology Using Amira. *Cells* **11** (2021).
74. M. R. Wieckowski, C. Giorgi, M. Lebedzinska, J. Duszynski, P. Pinton, Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. *Nat Protoc* **4**, 1582-1590 (2009).
75. J. Fuentealba *et al.*, Synaptic failure and adenosine triphosphate imbalance induced by amyloid- β aggregates are prevented by blueberry-enriched polyphenols extract. *J Neurosci Res* **89**, 1499-1508 (2011).
76. J. Fuentealba *et al.*, Synaptic silencing and plasma membrane dyshomeostasis induced by amyloid- β peptide are prevented by *Aristotelia chilensis* enriched extract. *J Alzheimers Dis* **31**, 879-889 (2012).
77. M. Di Carlo, Beta amyloid peptide: from different aggregation forms to the activation of different biochemical pathways. *Eur Biophys J* **39**, 877-888 (2010).
78. V. H. Finder, R. Glockshuber, Amyloid-beta aggregation. *Neurodegener Dis* **4**, 13-27 (2007).

79. E. Tubbs *et al.*, Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM) integrity is required for insulin signaling and is implicated in hepatic insulin resistance. *Diabetes* **63**, 3279-3294 (2014).
80. M. S. Alam, Proximity Ligation Assay (PLA). *Curr Protoc Immunol* **123**, e58 (2018).
81. P. Lindner, S. B. Christensen, P. Nissen, J. V. Møller, N. Engedal, Cell death induced by the ER stressor thapsigargin involves death receptor 5, a non-autophagic function of MAP1LC3B, and distinct contributions from unfolded protein response components. *Cell Commun Signal* **18**, 12 (2020).
82. L. L. Walkon, J. O. Strubbe-Rivera, J. N. Bazil, Calcium Overload and Mitochondrial Metabolism. *Biomolecules* **12** (2022).
83. T. C. Südhof, Calcium control of neurotransmitter release. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, a011353 (2012).
84. C. L. Hill, G. J. Stephens, An Introduction to Patch Clamp Recording. *Methods Mol Biol* **2188**, 1-19 (2021).
85. E. Trushina, S. Trushin, M. F. Hasan, Mitochondrial complex I as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Acta Pharm Sin B* **12**, 483-495 (2022).
86. M. Llorens-Martín *et al.*, Selective alterations of neurons and circuits related to early memory loss in Alzheimer's disease. *Front Neuroanat* **8**, 38 (2014).
87. Antentor Hinton, Jr. *et al.*, A comprehensive approach to artifact-free sample preparation and the assessment of mitochondrial morphology in tissue and cultured cells. *bioRxiv* 10.1101/2021.06.27.450055, 2021.2006.2027.450055 (2022).
88. O. M. Shirokova, P. V. Pchelin, I. V. Mukhina, MERCs. The Novel Assistant to Neurotransmission? *Front Neurosci* **14**, 589319 (2020).
89. S. Y. Hung, W. M. Fu, Drug candidates in clinical trials for Alzheimer's disease. *J Biomed Sci* **24**, 47 (2017).
90. H. Hampel *et al.*, Revisiting the Cholinergic Hypothesis in Alzheimer's Disease: Emerging Evidence from Translational and Clinical Research. *J Prev Alzheimers Dis* **6**, 2-15 (2019).
91. Z. Ye *et al.*, Charged Tubular Supramolecule Boosting Multivalent Interactions for the Drastic Suppression of A β Fibrillation. *Nano Lett* **21**, 10494-10500 (2021).
92. I. S. Padda, M. Parmar, "Aducanumab" in StatPearls. (StatPearls Publishing

Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC., Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Mayur Parmar declares no relevant financial relationships with ineligible companies., 2023).

93. P. F. Høilund-Carlsen, M. E. Revheim, A. Alavi, J. R. Barrio, FDG PET (and MRI) for Monitoring Immunotherapy in Alzheimer Disease. *Clin Nucl Med* **48**, 689-691 (2023).
94. F. Amar *et al.*, The amyloid- β oligomer A β *56 induces specific alterations in neuronal signaling that lead to tau phosphorylation and aggregation. *Sci Signal* **10** (2017).
95. R. Crespo, F. A. Rocha, A. M. Damas, P. M. Martins, A Generic Crystallization-like Model That Describes the Kinetics of Amyloid Fibril Formation* \blacklozenge . *Journal of Biological Chemistry* **287**, 30585-30594 (2012).
96. A. M. Morris, M. A. Watzky, J. N. Agar, R. G. Finke, Fitting neurological protein aggregation kinetic data via a 2-step, minimal/"Ockham's razor" model: the Finke-Watzky mechanism of nucleation followed by autocatalytic surface growth. *Biochemistry* **47**, 2413-2427 (2008).
97. S. Burgold, S. Filser, M. M. Dorostkar, B. Schmidt, J. Herms, In vivo imaging reveals sigmoidal growth kinetic of β -amyloid plaques. *Acta Neuropathologica Communications* **2**, 30 (2014).
98. C. Sackmann, M. Hallbeck, Oligomeric amyloid- β induces early and widespread changes to the proteome in human iPSC-derived neurons. *Scientific Reports* **10**, 6538 (2020).
99. J. D. Panes *et al.*, PrP (C) as a Transducer of Physiological and Pathological Signals. *Front Mol Neurosci* **14**, 762918 (2021).
100. C. D. Bailey, G. V. Johnson, The protective effects of cystamine in the R6/2 Huntington's disease mouse involve mechanisms other than the inhibition of tissue transglutaminase. *Neurobiol Aging* **27**, 871-879 (2006).
101. B. D. Paul, S. H. Snyder, Therapeutic Applications of Cysteamine and Cystamine in Neurodegenerative and Neuropsychiatric Diseases. *Front Neurol* **10**, 1315 (2019).
102. J. Zhang *et al.*, Transglutaminase 2 Depletion Attenuates α -Synuclein Mediated Toxicity in Mice. *Neuroscience* **441**, 58-64 (2020).
103. P. G. Mastroberardino, M. Piacentini, Type 2 transglutaminase in Huntington's disease: a double-edged sword with clinical potential. *J Intern Med* **268**, 419-431 (2010).
104. T. Karl, S. Bhatia, D. Cheng, W. S. Kim, B. Garner, Cognitive phenotyping of amyloid precursor protein transgenic J20 mice. *Behav Brain Res* **228**, 392-397 (2012).
105. M. M. M. Wilhelmus *et al.*, The Transglutaminase-2 Interactome in the APP23 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Cells* **11** (2022).
106. S. J. McConoughey *et al.*, Inhibition of transglutaminase 2 mitigates transcriptional dysregulation in models of Huntington disease. *EMBO Mol Med* **2**, 349-370 (2010).
107. W. Yu, H. Jin, Y. Huang, Mitochondria-associated membranes (MAMs): a potential therapeutic target for treating Alzheimer's disease. *Clin Sci (Lond)* **135**, 109-126 (2021).

108. J. Panes *et al.*, Partial Inhibition of Complex I Restores Mitochondrial Morphology and Mitochondria-ER Communication in Hippocampus of APP/PS1 Mice. <http://dx.doi.org/10.3390/cells12081111>.
109. E. Area-Gomez *et al.*, A key role for MAM in mediating mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease. *Cell Death & Disease* **9**, 335 (2018).
110. M. A. Tyumentsev, N. A. Stefanova, E. V. Kiseleva, N. G. Kolosova, Mitochondria with Morphology Characteristic for Alzheimer's Disease Patients Are Found in the Brain of OXYS Rats. *Biochemistry (Mosc)* **83**, 1083-1088 (2018).
111. A. De Mario, R. Quintana-Cabrera, D. Martinvalet, M. Giacomello, (Neuro)degenerated Mitochondria-ER contacts. *Biochem Biophys Res Commun* **483**, 1096-1109 (2017).
112. E. Area-Gomez *et al.*, Upregulated function of mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease. *Embo j* **31**, 4106-4123 (2012).
113. A. Johri, A. Chandra, Connection Lost, MAM: Errors in ER-Mitochondria Connections in Neurodegenerative Diseases. *Brain Sci* **11** (2021).