



**Universidad de Concepción**  
**Facultad de Ciencias Biológicas**  
**Magister en neurobiología**

**DETERMINACIÓN DE POTENCIALES INTERACCIONES DE PROTEÍNAS  
CON LA PrP<sup>C</sup> EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de  
Concepción para optar al grado de Magister en Neurobiología

**POR: PAULINA ANDREA SAAVEDRA SIEYES**

**Profesor Guía:** Dra. Carola Muñoz Montesino

**Profesor Co- Guía:** Dra. Coralia Rivas Rocco

Agosto, 2021

Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.



Esta tesis fue realizada en el Departamento de fisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción

Profesores integrantes de comité evaluador:

Profesor Guía:

---

Dra. Carola Muñoz-Montesino  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía:



---

Dra. Coralia Rivas Rocco  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

---

Dra. Marcela Torrejón  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

---

Dra. Valentina Echeverría  
Ciencias de la Salud  
Universidad San Sebastián

Director(s) Programa:

---

Dr. Gonzalo Yevenes Crisóstomo  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

## INDICE DE CONTENIDOS

<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	7
<b>INDICE DE TABLAS</b> .....	<b>9</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	10
<b>RESUMEN</b> .....	11
<b>ABSTRACT</b> .....	13
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	15
Descubrimiento de la Proteína priónica celular .....	15
Proteína priónica celular (PrP <sup>C</sup> ) y proteínas relacionadas.....	16
La función fisiológica de la proteína priónica celular .....	20
PrP <sup>C</sup> como transductor de señales extracelulares .....	22
PrP <sup>C</sup> y su posible rol en la Enfermedad de Alzheimer .....	23
Planteamiento del problema .....	31
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	32
OBJETIVO GENERAL.....	33
OBJETIVO ESPECÍFICOS .....	33
<b>METODOLOGÍA</b> .....	35
Predicciones docking proteína-proteína:.....	35
Caracterización de los complejos generados: .....	36

Cultivo celular células CAD (ECACC 08100805).....	37
Curva de Muerte G418 .....	37
Preparación de oligómeros solubles del péptido A $\beta$ 1-40 (OS-A $\beta$ 1-40) .....	38
Transfección estable en células CAD .....	38
Diferenciación de células CAD (ECACC 08100805) a un fenotipo “tipo neuronal” .....	39
Estandarización de crosslinkg con el reactivo EGS.....	40
Crosslinkg con el reactivo EGS .....	40
Co-inmunoprecipitación .....	41
Inmunocitoquímica.....	41
<b>RESULTADOS</b> .....	44
Búsqueda de estructuras y desarrollo de estrategias de análisis de los complejos PrP <sup>C</sup> -APP. ....	44
Análisis de los complejos interacción PrP <sup>C</sup> -APP .....	48
Desarrollo de modelos de estudios .....	61
Colocalización de PrP <sup>C</sup> y APP en células CAD diferenciadas tratadas con oligómeros solubles del péptido A $\beta$ 1-40 (OS-A $\beta$ 1-40): .....	65
Generación de líneas estables en células CAD que sobreexpresan la proteína de fusión APP <sub>wt</sub> -GFP o APP <sub>SWE</sub> -GFP.....	68
Estandarización de crooslinking con EGS en células CAD sin diferenciar. ...	73
Ensayo de co-inmunoprecipitación entre PrPC y APP .....	75

DISCUSIÓN.....	81
CONCLUSIONES Y PROYECCIONES .....	87
REFERENCIAS .....	88
ANEXOS.....	98



## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Organización de la proteína priónica celular.....	18
Figura 2. Estructuras de los fragmentos de la proteína precursora amiloide. 45	
Figura 3. Estructura proteína priónica celular entre los aminoácidos 121 y 230 (1QM2).....	47
Figura 4. Complejo obtenido entre la proteína priónica celular (1QM2) y el dominio E2 de la proteína APP (3NLY).....	51
Figura 5. Evaluaciones energéticas de los complejos obtenidos de los diferentes dominios de APP y PrP <sup>C</sup> .....	52
Figura 6. Complejo obtenido entre la proteína priónica celular (1QM2) y el dominio E1 de la proteína APP(4PWQ).....	54
Figura 7. Complejo obtenido entre la proteína priónica celular (1QM2) y el dominio Kunitz de la proteína APP(1AAP). ....	56
Figura 8. Complejo obtenido entre la proteína priónica celular (1QM2) y el dominio intracelular de la proteína APP (2LP1).....	58
Figura 9. Caracterización de los complejos de APP y PrP <sup>C</sup> .....	59
Figura 10. Expresión de PrP <sup>C</sup> y APP en neuronas hipocampales de 10 días de cultivo de ratón C57BL/6.....	63
Figura 11. Inmunocitoquímica células CAD para los marcadores neuronales MAP2 y Tau-5.....	64

Figura 12. Colocalización de PrP <sup>C</sup> (6D11) y APP en células CAD diferenciadas tratadas con OS-A $\beta$ <sub>1-40</sub> .....	66
Figura 13. Colocalización de PrP <sup>C</sup> (G12) y APP en células CAD diferenciadas tratadas con OS-A $\beta$ <sub>1-40</sub> .....	67
Figura 14. Transfección a 48 horas en las células CAD no diferenciadas. C. ...	69
Figura 15. Células CAD transfectadas establemente sin y con diferenciar .....	70
Figura 16. Expresión mediante western blot de PrP <sup>C</sup> y APP en las líneas estables CAD.....	72
Figura 17. Estandarización de la concentración de EGS en células CAD nativas y en la línea APP-GFP.....	74
Figura 18. Co-inmunoprecipitación en neuronas Hipocampales y corticales de PrP <sup>C</sup> con APP .....	76
Figura 19. Co- inmunoprecipitación en células CAD nativas diferenciadas.....	79
Figura 20. Co-inmunoprecipitación en las líneas estables APP-GFP y APPSWE- GFP diferenciadas.....	80

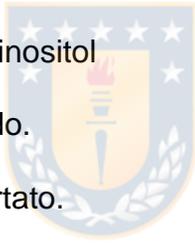
## INDICE DE TABLAS

Tabla 1 : Anticuerpos primarios utilizados: .....	43
Tabla 2: Anticuerpos secundarios utilizados: .....	43
Tabla 3: Estructuras seleccionadas para los principales dominios de APP. ....	44
Tabla 4. Selección de pares de residuos en interacción para complejo 1QM2-3NLY.....	49
Tabla 5. Residuos obtenidos mediante el esquema de filtración de residuos en interacción. La lista es el resultado del cruce de los datos obtenidos tanto de PRODIGY como InterProSurf. ....	50



## ABREVIATURAS

A $\beta$ <sub>1-40</sub> :	Péptido $\beta$ -amiloide 1-40
A $\beta$ <sub>1-42</sub> :	Péptido $\beta$ -amiloide 1-42
AICD:	Dominio intracelular amiloide
EGS:	Ethylene Glycol bis (succinimidyl succinate)
APP:	Proteína Precursora Amiloide
APP <sub>Swe</sub> :	Proteína Precursora Amiloide con mutación Swedish
GFP:	Proteína fluorescente verde
GPI:	Glicosilfosfatidilinositol
DMSO:	Di-metil-sulfóxido.
NMDA:	N-metil-D-aspartato.
NMR:	Resonancia magnética nuclear
OS-A $\beta$ <sub>1-40</sub> :	Oligómeros solubles péptido $\beta$ -amiloide 1-40
PDB:	Protein Data Bank
PrP <sup>C</sup> :	Proteína priónica celular



## RESUMEN

La proteína priónica celular (PrP<sup>C</sup>), ha sido implicada en la señalización fisiopatológica que lleva a la pérdida sináptica inducida por el péptido  $\beta$ -amiloide en el contexto de la enfermedad de Alzheimer. Se ha sugerido que PrP<sup>C</sup>, el que se ubica en la cara externa de membrana plasmática de neuronas unido a ella por un anclaje GPI, podría actuar como receptor mediador de la toxicidad inducida por el péptido A $\beta$ . Varios estudios muestran que la interacción de PrP<sup>C</sup> con oligómeros de A $\beta$  activaría una vía de transducción de señales, que debido a la ausencia de dominios transmembrana en PrP<sup>C</sup> debe ser mediada por una proteína transmembrana no conocida. Una proteína transmembrana interesante de analizar como transductor de señales de PrP<sup>C</sup> inducidas por oligómeros de A $\beta$ , corresponde a la proteína precursora amiloide (APP). La interacción entre PrP<sup>C</sup> y APP ha sido sugerida en algunos estudios del interactoma de ambas proteínas. Sin embargo, aún falta evidencia para demostrar su interacción directa, y si esta interacción tiene un carácter funcional. Debido a esto, el presente trabajo propone buscar interacciones entre PrP<sup>C</sup> y APP en el contexto de la enfermedad de Alzheimer, utilizando aproximaciones bioinformáticas de docking proteína - proteína y ensayos de colocalización y coinmunoprecipitación. Los análisis de docking revelaron cerca de 35 pares de residuos que conformarían los puntos de interacción entre ambas proteínas, los cuales fueron encontrados en diferentes dominios de APP. Hay que destacar el dominio E2

(3NLY) arrojó 12 pares de residuos en interacción con PrP<sup>C</sup> con excelentes valores energéticos. Además, fueron realizados diferentes ensayos de colocalización los cuales resultaron positivos para PrP<sup>C</sup> y APP. Todas las coinmunoprecipitaciones resultaron positivas para interacción, pero los controles realizados para APP revelaron la coinmunoprecipitación de un fragmento de 55kDa que podría ser un fragmento previamente reportado. Finalmente, con todos estos resultados nuestro trabajo da lugar a las primeras directrices para determinar la interacción entre ambas proteínas. Toda esta información permitirá el desarrollo de diferentes experimentos a futuro para definir la interacción y para luego analizar las consecuencias funcionales de la interacción PrP<sup>C</sup>-APP.



## ABSTRACT

Cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) has been implicated in the pathophysiological cell signalling induced by  $\beta$ -amyloid peptide (A $\beta$ ) that leads to synaptic dysfunction in the context of Alzheimer's disease (AD). It has been suggested that PrP<sup>C</sup>, which is located in the external face of the plasma membrane of neurons attached by a GPI anchor, acts as a receptor mediating A $\beta$ -induced cell toxicity. Several studies show that the interaction between PrP<sup>C</sup> and A $\beta$  oligomers activate a signal transduction pathway which, due to the absence of transmembrane domains in PrP<sup>C</sup>, must be mediated by and an unknown transmembrane protein with. An interesting transmembrane protein to analyze as a possible PrP<sup>C</sup> signal transducer induced by Abeta oligomers is the Amyloid Precursor Protein (APP). Interaction between PrP<sup>C</sup> and APP has been suggested by few interactome studies focused on either APP or PrP. Nevertheless, there is still a lack of information to show a direct interaction and if this interaction is functional. Due to this, our present work proposes to look for interactions between PrP<sup>C</sup> and APP in the context of AD, using first, bioinformatic tools to study protein-protein docking, and second, colocalization and co-immunoprecipitation studies. Docking analyses revealed around 35 pairs of residues that could act as a binding site in the interaction points between both proteins, which were found in different domains of APP. The E2 domain (3NLY) should be highlighted, which yielded 12 pairs of residues in interaction with PrP<sup>C</sup> and with excellent energetic values. Different colocalization tests were carried out which were positive for PrP<sup>C</sup> and

APP. In addition, all the immunoprecipitations' results suggest an interaction between these proteins were positive for interaction. Finally, with all these results, our work gives the needed evidence and experimental bases for future experiments will allow to define the interaction with experiments that generate robust results to define the functional consequences of the PrP<sup>C</sup> -APP interaction.



## INTRODUCCIÓN

### Descubrimiento de la Proteína priónica celular

En el año 1982 Stanley Prusiner descubrió el agente causal de las encefalopatías raras de origen desconocido en ovejas y cabras, que fue caracterizada por un temblor inusual llamado “scrapie” [Prusiner, 1982]. Mediante experimentos, basado en la irradiación con luz de ultravioleta a extractos de cerebros de ratones infectados, se observó un nuevo componente infeccioso de bajo peso molecular, el cual no requería una unidad genética canónica para su replicación y capacidad infectiva [Griffith, 1967]. Posteriormente esta molécula infecciosa fue aislada y se determinó que correspondía a una proteína de aproximadamente 30kDa, la cual se denominó PRION [Prusiner, 1982] [Bolton *et al.*, 1982].

Luego, diversos estudios revelaron que la capacidad de propagación de los priones estaba dada por un proceso de replicación a través de templado, utilizando como sustrato la proteína priónica celular (PrP<sup>C</sup>) [Spagnolli *et al.*, 2020]. De este modo, PrP<sup>C</sup>, una proteína normalmente expresada en mamíferos, fu asociada a las enfermedades priónicas, un grupo de proteinopatías donde PrP<sup>C</sup> adquiere una conformación alterada, denominada PrP<sup>Sc</sup>, la cual se propaga neurona a neurona convirtiendo toda la proteína normal PrP<sup>C</sup> en la forma PrP<sup>Sc</sup> [Soto and Estrada, 2008]. PrP<sup>Sc</sup> es extremadamente insoluble, resistente a digestión con proteasas y con un alto contenido de hojas beta en su estructura, a diferencia de la proteína PrP<sup>C</sup> normal, que presenta un alto contenido de alfa

hélices [Riesner, 2003]. Además, PrP<sup>Sc</sup> cuenta con la capacidad de transferir su fenotipo estructural patogénico proteína a proteína, utilizando como sustrato PrP<sup>C</sup>, razón por la cual se le categoriza infecciosa [Harris and True, 2006].

### **Proteína priónica celular (PrP<sup>C</sup>) y proteínas relacionadas.**

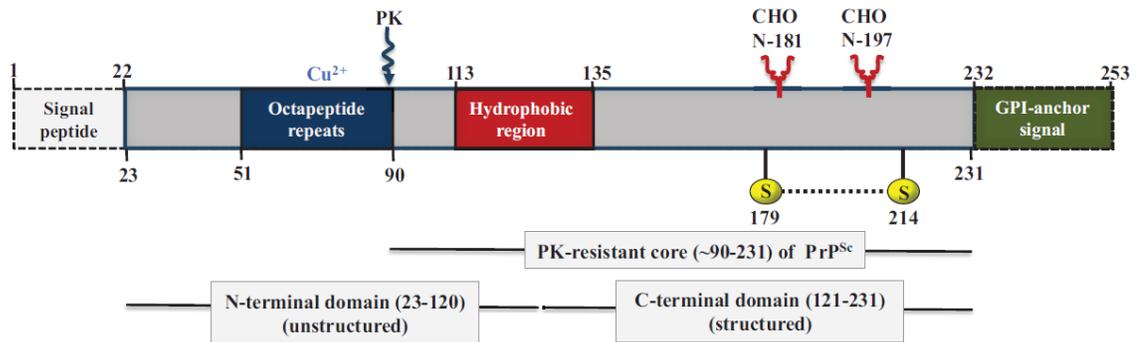
La proteína priónica celular es una glicoproteína de 253 aminoácidos con un peso molecular de aproximadamente 35kDa, que está localizada en la membrana celular anclada por un grupo glicosilfosfatidilinositol (GPI) [Hirsch *et al.*, 2017].

PrP<sup>C</sup> Codificada en el gen *PRNP* de 20kb de longitud y localizado en el cromosoma 20 en humanos y 2 en ratón. Además, en el cromosoma 20 se encuentran los genes homólogos *PRND* y *PRNT* de 55kb, región a la que se le denomina el locus de PrP<sup>C</sup> [Mehrpour and Codogno, 2010]. *PRND* codifica a una proteína llamada Doppel de 179 aminoácidos. Esta proteína es similar a PrP<sup>C</sup> tanto en estructura como topología, compartiendo un 25% en la identidad de secuencia aminoacídica con el C-terminal globular de PrP<sup>C</sup>. Su sobreexpresión causa ataxia y degeneración del cerebelo [Westaway *et al.*, 2011].

*PRNT* codifica para 3 mensajeros de ARN por *splicing* alternativo y se expresa exclusivamente en testículo. Se piensa que este gen no codifica para ninguna proteína. El otro miembro de la familia del gen de PrP<sup>C</sup>, es Shadoo que codifica una proteína del mismo nombre y presenta un patrón de expresión exclusivo en el cerebro [Westaway *et al.*, 2011].

En términos estructurales la proteína priónica consta de un N-terminal no estructurado y flexible de unos 100 aminoácidos, mientras que su C-terminal es globular con otros 100 aminoácidos. La porción N-terminal contiene un péptido de señal (residuos 1-22), cinco regiones en las cuales se repite una secuencia de 8 aminoácidos (PHGGGWGQ) llamados “octarepeats” (residuos 51-91), un dominio central y una región hidrofóbica altamente conservada (Figura 1).





**Figura 1. Organización de la proteína priónica celular.** PrP<sup>C</sup> no procesado consta de 253 aminoácidos los cuales incluyen el péptido de señal (1-22), cinco octapeptide repeats, una región hidrofóbica (113-135), un enlace disulfuro entre residuos de cisteínas (179-214), dos sitios de N-glicosilación (residuos 187 y 197) y un anclaje GPI en su extremo C-terminal. Los residuos indicados corresponden a la secuencia de PrP<sup>C</sup> humana. Extraído de [Acevedo-Morantes and Wille, 2014].

El extremo C-terminal de PrP<sup>C</sup> está compuesto por tres estructuras alfa hélice, además de dos hojas beta plegadas antiparalelas y en su porción final residuos 231-253 una secuencia de señal para el anclaje GPI que es escindida para la incorporación de esta [Sarnataro *et al.*, 2017].

Adicionalmente, PrP<sup>C</sup> posee dos sitios para N-glicosilación ubicados en las asparaginas 181 y 197 en PrP humano. Por ello PrP<sup>C</sup> se encuentra de manera fisiológica en tres estados: no glicosilado, monoglicosilado o diglicosilado [Castle and Gill, 2017]. Además, existe la formación del enlace disulfuro entre las cisteínas 179 y 214 conectando las hélices alfa 2 y 3, que es esencial para el plegamiento de la proteína. Otra modificación en PrP<sup>C</sup> es la hidroxilación de la prolina 44 que es importante en el tráfico subcelular de la proteína para finalmente ser traslocada a la membrana [Biasini *et al.*, 2012].

En la biogénesis de la proteína priónica celular, han sido descritas dos topologías que representan un porcentaje bajo dentro de su síntesis en el retículo PrP<sup>C</sup>, una donde la porción N-terminal esta hacia el lumen del N<sup>tm</sup>PrP y la segunda donde el C-terminal está en el lumen del RE C<sup>tm</sup>PrP.

La proteína priónica celular puede ser clivada por dos vías proteolíticas, por la llamada  $\alpha$ -cleavage, que ocurre en el cerebro entre las histidinas 110 y metionina 111, dando origen a dos fragmentos: un péptido soluble con el N-terminal de 9kDa y otro de 17kDa del extremo C-terminal que sigue unido a la membrana a través del GPI [Mangé *et al.*, 2004]. Las proteínas que realizan esta función de corte son miembros de la familia de metaloproteasas ADAM [Vincent *et al.*, 2001].

PrP<sup>C</sup> puede ser internalizado de manera constante de la membrana plasmática a través de mecanismos dependientes de clatrina. Se ha reportado que concentraciones micromolares de cobre estimulan la endocitosis de PrP<sup>C</sup>, saliendo de las balsas lipídicas [Peters *et al.*, 2003].

Por otro lado, las histidinas contenidas en los octarepeats tienen una alta afinidad por iones de cobre por lo que se sugiere que PrP<sup>C</sup> juega un papel importante en el metabolismo del cobre, que es esencial para la actividad de una gran cantidad de enzimas. También se ha propuesto la afinidad de la proteína priónica para iones de Zinc (Zn<sup>2+</sup>) participando en los influjos de zinc en células neuronales [Salzano *et al.*, 2019].

En términos funcionales, no existe evidencia de que PrP<sup>C</sup> tenga segmentos transmembrana. Es por esta razón que para realizar sus funciones requiere de otras proteínas transmembrana que le permitan la activación de vías de señalización intracelulares.

### **La función fisiológica de la proteína priónica celular**

PrP<sup>C</sup> es una glicoproteína expresada en diferentes tipos celulares, especialmente en el sistema nervioso central y periférico. Para caracterizar su función fisiológica la estrategia utilizada inicialmente fue el desarrollo de animales *knockout* (KO) para PrP<sup>C</sup>. Los primeros KO desarrollados fueron llamados Zurich y Npu, donde ambos animales no desarrollaron fenotipos llamativos y en ambos se previno

completamente la transmisión por priones al no estar la proteína priónica expresada [Bühler *et al.*, 1992] [Manson *et al.*, 1994]. Otros a posterior como Zurich II, Ngsk y Rcm0, desarrollaron ataxia tardía debido a la degeneración de las neuronas de Purkinje [Sakaguchi *et al.*, 1996]. Además, en estos modelos se observó la sobreexpresión de Doppel (Dpl) y sería esta proteína la que estaría causando la muerte de este tipo de neuronas por neurotoxicidad y no por la falta de PrP<sup>C</sup>. Igualmente, se ha establecido de manera *in vitro* que la sobreexpresión de Dpl es tóxica solo cuando PrP<sup>C</sup> no está expresado, por lo cual se sugiere una interacción entre ambas proteínas para mediar fenómenos de toxicidad [Sakudo *et al.*, 2005].



Por otro lado, en condiciones fisiológicas en el sistema nervioso se ha reportado que PrP<sup>C</sup> está mediando funciones como crecimiento celular, neuritogénesis, formación de lamelipodios, etc. Esto lo realiza a través de diferentes proteínas como NCAM y laminina para promover el crecimiento neurítico a través de la activación de Fyn quinasa [Santuccione *et al.*, 2005] [Schmitt-Ulms *et al.*, 2001].

Asimismo, modula funciones con el receptor de factor de crecimiento (EGFR) para modificar el ciclo y crecimiento celular [Llorens *et al.*, 2013]. Otra proteína con la cual PrP<sup>C</sup> modula tantas funciones de neuritogenesis y neuroprotección es la proteína inducible por estrés (STI1), esta interacción lleva también a la activación de la vía de señalización pro-sobrevivencia de la proteína quinasa A (PKA) [Lopes *et al.*, 2005].

Otra función que ha sido reportada para PrP<sup>C</sup> es la protección frente al estrés oxidativo. Se ha determinado en células de neuroblastoma SH-SY5Y en donde se sobreexpresó PrP<sup>C</sup>, presentaron una mayor resistencia al estrés oxidativo frente a las que solo expresan niveles endógenos y además que esta protección estaría dada por el N-terminal de PrP<sup>C</sup> [Zeng *et al.*, 2003]. También, se ha determinado que PrP<sup>C</sup> participa en la homeostasis de la mielina en las células Schwann a través de la interacción con su N-terminal mediante los residuos 23-33 con el receptor GPCR 126 en la superficie de estas células [Küffer *et al.*, 2016].

### **PrP<sup>C</sup> como transductor de señales extracelulares**

Con todo lo antes visto, podemos sugerir que PrP<sup>C</sup> participa en diversas funciones al interior de la célula y debido a que no posee dominios transmembrana siempre se busca como está mediando estas funciones [Taylor and Hooper, 2006]. Se ha propuesto que PrP<sup>C</sup> actúe como transductor de señales externas a través de la interacción con distintas proteínas transmembrana para llevarlas a cabo. De hecho, su localización específica en la membrana es una zona donde se activan diversas vías de señalización. Estas zonas son descritas como microdominios ricos en colesterol y esfingolípidos, llamadas balsas lipídicas. En estas sitios también se localizan diferentes proteínas transmembrana implicadas en la traducción de señales [Taylor and Hooper, 2006]. En la cara citosólica de estas estructuras existen proteínas que median la señalización hacia el interior de la célula, un ejemplo de ello es la familia de las

proteínas Src, proteínas tirosina quinasa de las cuales una de las más descrita en el contexto de la enfermedad de Alzheimer es la proteína Fyn. Para esta enfermedad se ha reportado que la proteína priónica celular tiene diferentes funciones en los mecanismos patológicos que se dan en el desarrollo de esta enfermedad neurodegenerativa.

## **PrP<sup>C</sup> y su posible rol en la Enfermedad de Alzheimer**

### **a. La Enfermedad de Alzheimer**

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por una serie de eventos que mediante diferentes mecanismos concluyen en muerte celular en sitios específicos del sistema nervioso de manera progresiva e irreversible [Katsnelson *et al.*, 2016]. Dependiendo de la zona afectada, los síntomas generados pueden ser diversos, como problemas cognitivos, pérdida de memoria y/o problemas motores [Castellani *et al.*, 2010]. Una de las más prevalentes a nivel mundial es la enfermedad de Alzheimer, para la cual se han descrito dos proteínas que son claves en su patogenia: el péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) y la proteína Tau [Chu and Liu, 2019]. Durante el desarrollo de la enfermedad, ambas proteínas forman agregados y colaboran en procesos que llevan a muerte neuronal por diferentes mecanismos: el péptido  $A\beta$  induce activación de vías de transducción de señales asociadas a disfunción neuronal así como plasticidad neuronal [Echeverria *et al.*, 2007]. Por otro lado, Tau al hiperfosforilarse se desprende de los microtúbulos lo

que lleva a la desestabilización del citoesqueleto e interferencias en el transporte axonal [Rodríguez-Martín *et al.*, 2013]. Desde que se comenzó a estudiar esta enfermedad se han elaborado diversas teorías respecto al origen de la enfermedad. Una de las primeras en discutirse, hablan de componentes heterogéneos de la enfermedad, es la “hipótesis colinérgica”. Ésta señala que la enfermedad es causada por una disminución en la síntesis de acetilcolina, debido a alteraciones en su síntesis y degradación, que termina en la degeneración de neuronas colinérgicas [Contestabile, 2011]. Una segunda teoría que sigue vigente actualmente es la “hipótesis amiloide” que coloca al péptido A $\beta$  como el principal componente en las placas amiloides y el primer inductor en la cascada neuropatológica que produce la enfermedad, la que lleva a la formación de placas y a la formación de ovillos neurofibrilares de la proteína tau [Hardy and Higgins, 1992]. Si bien no hay claridad en que componente molecular es él que inicia todos los eventos, está reportado que el proceso se inicia en la corteza entorrinal, una región del cerebro próxima al hipocampo. Las neuronas de esta corteza inician el proceso de degeneración y muerte que se esparce al hipocampo, de ahí a las diferentes zonas del encéfalo, lo que provoca a nivel anatómico una disminución en el volumen del cerebro y agrandamiento de los ventrículos. Existen también factores genéticos que intervienen en su origen, existiendo factores de riesgo asociado a ciertas mutaciones presentes en algunos genes como el de la apolipoproteína E, la proteína precursora amiloide y genes de las presenilinas 1 y 2 [Selkoe, 2018].

## **b. Proteína Precursora Amiloide**

Uno de los eventos más importantes en la enfermedad de Alzheimer es el aumento de producción del péptido A $\beta$ , el que es producido a partir de la proteína precursora amiloide (APP). Esta es una proteína transmembrana, su gen se localiza en el brazo largo del cromosoma 21, conteniendo 18 exones de los cuales por *splicing* alternativo se generan diversas isoformas. Fuera del sistema nervioso es también expresada en el músculo, riñón, pulmón entre otros [Wilkins and Swerdlow, 2017]. Ésta posee una larga región N-terminal extracelular glicosilada que está compuesto por tres principales dominios: el E1, el E2 y el dominio inhibidor de proteasas Kunitz. El dominio E1 es de tipo globular rico en cisteínas y está dividido en dos subdominios, uno de unión a heparina (HBD) y el dominio de unión a cobre (CuBD). El dominio E2 es rico en hélices alfa y contiene un subdominio HBD y otro de unión a metales [Dawkins and Small, 2014]. Estos dominios están altamente conservados y junto al dominio intracelular son los responsables de llevar a cabo sus funciones fisiológicas. Este último dominio intracelular contiene varios sitios de fosforilación y un motivo YENPTY de internalización [Dawkins and Small, 2014]. Por otro lado, tiene un C-terminal corto hacia el sector intracelular [Chen *et al.*, 2017].

Por otro, lado se han descrito diferentes isoformas para esta proteína la APP695 es la expresada mayoritariamente en el cerebro, la cual carece del domino Kunitz en su porción extracelular. Además, para esta proteína han sido definidas

diferentes modificaciones postraduccionales dentro de las más destacadas son el proceso proteolítico de la APP. Para esto, existen dos vías para el procesamiento de APP: la “no amilodogénica” que ocurre mediante las  $\alpha$  y  $\gamma$  secretasas y la “amilodogénica” en la que participan tanto  $\beta$  y  $\gamma$  secretasas [Aguzzi and Connor, 2010]. Se han descrito 4 mutaciones características asociadas al Alzheimer: la primera es la de “Swedish (Swe)”, mutación que se caracteriza por una sustitución de la lisina (670) por una asparagina y además de la metionina (671) por una leucina, ambas sustituciones ocurren justo al lado del sitio de corte de la  $\beta$  secretasas, lo que da origen a un incremento en los niveles totales de producción del péptido  $A\beta$  [Mullan *et al.*, 1992]. También, esta mutación altera el transcriptoma de las neuronas donde se ven alterada la expresión de genes que son de suma importancia en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, por ejemplo, el aumento en la expresión de las quinasas glucógeno sintasa quinasa (GSK-3 $\beta$ ), ciclina dependiente de quinasa 5 (CDK5) entre otras proteínas que en conjunto, a la alteración de otras proteínas contribuyen al desarrollo de esta patología [Shin *et al.*, 2010]. La segunda es la mutación “London”, que ocurre por cambio en una valina por una isoleucina en la posición 717, se encuentra en el sitio de corte de la  $\gamma$  secretasa. La tercera, es la mutación “Dutch” caracterizada por una mutación en la posición 693 y una cuarta llamada “Flemish” en el codón 692 [Andreeva *et al.*, 2017].

Todas estas mutaciones afectan tanto la elaboración como capacidad de agregación del péptido  $A\beta$  que es una característica relevante en el desarrollo

de la enfermedad de Alzheimer. Posteriormente, por mecanismos no completamente dilucidados, el péptido A $\beta$  adquiere una conformación particular y se agrega formando oligómeros que inducen toxicidad [Smith and Strittmatter, 2017]. Se sabe que el péptido A $\beta$  induce la activación de vías de transducción de señales que gatilla la hiperfosforilación de Tau, evento relevante en la toxicidad inducida por oligómeros del péptido A $\beta$  [Nygaard, 2018].

### **c. PrP<sup>C</sup> como receptor de oligómeros de A $\beta$**

Dentro de las proteínas descritas como posibles receptor para los oligómeros de A $\beta$ , destaca la proteína priónica celular (PrP<sup>C</sup>). En el trabajo de Laurén *et al.*, 2009 demostraron que PrP<sup>C</sup>, es un receptor de alta afinidad para oligómeros de A $\beta_{1-42}$  (A $\beta$ O), y que el sitio de unión para oligómeros de A $\beta_{1-42}$  estaría en los aminoácidos 95-105. Esta unión PrP<sup>C</sup>- A $\beta$ O causa disrupción sináptica en rebanadas de hipocampo de ratones (C57Bl6j), y esta alteración puede ser rescatada por el uso de anticuerpos que bloquean el sitio de unión de oligómeros de A $\beta$  en PrP<sup>C</sup>. Reforzando esta idea se ha reportado que el tratamiento de neuronas hipocampales durante 24 horas con oligómeros de A $\beta_{1-42}$  existe una notable disminución en las transientes de calcio respecto al control y una disminución de la proteína sinaptofisina, lo que sugiere que el complejo PrP<sup>C</sup>-A $\beta_{1-42}$  lleva a la disrupción y finalmente disminución sináptica en neuronas hipocampales de ratón [Peters *et al.*, 2015]. Bajo esta premisa, se ha descrito

que PrP<sup>C</sup> jugaría un rol importante en eventos tempranos en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer [Puig *et al.*, 2014].

Además, en diferentes reportes describen que la interacción de PrP<sup>C</sup> y monómeros de A $\beta$ , presenta una afinidad menor que por los oligómeros de A $\beta$  [Freir *et al.*, 2011]. En este sentido, se ha definido que en el extremo N-terminal de PrP<sup>C</sup> existen dos sitios de interacción, uno entre los residuos 23-27 y otro entre los residuos 90-110 de PrP<sup>C</sup>. En el extremo C-terminal globular de PrP<sup>C</sup> se han descrito que ciertas zonas que sirven para identificación de monómeros no estructurados de A $\beta$  y para inhibir la elongación de fibras de A $\beta$  [Bove-Fenderson *et al.*, 2017]. El resultado de la interacción PrP<sup>C</sup>-A $\beta$ , se basa en la modulación de la agregación en ambas especies, donde se ha descrito que PrP<sup>C</sup> inhibe la formación de fibras de A $\beta$ , A $\beta$ O<sub>1-40</sub> y A $\beta$ O<sub>1-42</sub> [Nieznanski *et al.*, 2014].

Una importante proteína asociada a la cara citosólica de las balsas lipídicas es Fyn quinasa que pertenece a familia de las proteínas Src que son proteínas tirosina quinasa que tienen un rol importante en la enfermedad de Alzheimer. Luego de producirse la activación del receptor PrP<sup>C</sup>, Fyn es activada fosforilando a otras proteínas con funciones relevantes para la adhesión, sinapsis y citoesqueleto [Málaga-Trillo and Ochs, 2016]. Por otro lado, el receptor NMDAR es fosforilado a través de Fyn producto de la interacción PrP<sup>C</sup> con oligómeros de A $\beta$ , lo que provoca la hiperactivación del canal provocando excitotoxicidad del glutamato que es uno de los fenómenos recurrentes en Alzheimer [Málaga-Trillo

and Ochs, 2016]. Asimismo, análisis bioquímicos de co-inmunoprecipitación han demostrado que PrP<sup>C</sup> y el receptor de glutamato metabotrópico 5 (mGluR5) interaccionan directamente, lo que provoca la activación de Fyn quinasa que promoviendo la fosforilación de eEF2 que termina en la pérdida de espinas neuríticas [Um *et al.*, 2013].

Es importante señalar que Fyn fosforila directamente a la proteína Tau lo que estimula la propagación de la enfermedad en el cerebro. El incremento de este tipo de modificaciones post-transduccionales en la proteína Tau provoca que aumente el número de ovillos neurofibrilares al interior de las neuronas, propagación de neurona a neurona y el progreso de la enfermedad. Por este motivo la activación de Fyn es un punto clave en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer [Sanders *et al.*, 2014] [Goedert *et al.*, 2017].

La principal función de las balsas lipídicas es mediar la transducción de señales, y se han descrito una gran cantidad de proteínas que participan en estos procesos. Un ejemplo de ellas es la proteína precursora amiloide (APP), la que juega un rol esencial en Alzheimer [Deyts *et al.*, 2016]. Se ha reportado, en estudios de interactoma de APP que interactúa con diversos tipos de proteínas incluyendo 4 cuatro proteínas GPI (Thy-1, Contactina, NCAM1-GPI y PrP<sup>C</sup>) [Bai *et al.*, 2008]. Por otro lado, se ha determinado que PrP<sup>C</sup> tiene un rol inhibiendo el clivaje de la  $\beta$ -secretasa, lo que influye directamente en los niveles del péptido A $\beta$  [Parkin *et al.*, 2007]. Además, el interactoma de PrP<sup>C</sup> revela la interacción con

un alto número de proteínas una de ellas es la proteína precursora amiloide (APP) [Ulbrich *et al.*, 2018]. Finalmente, el trabajo de Kaiser *et al.* 2012, realizando una co-inmunoprecipitación en células de neuroblastoma (N2a) transfectadas de manera transiente con APP y PrP<sup>C</sup> humano, logro establecer que existe una interacción física entre ambas proteínas.



## Planteamiento del problema

La evidencia demuestra de forma contundente que PrP<sup>C</sup> es una proteína receptora para oligómeros solubles del péptido A $\beta$ , y por ende, tiene relevancia en la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, al ser PrP<sup>C</sup> una proteína sin dominios transmembrana, no hay claridad con respecto al mecanismo mediante el cual transduce señales al interior de la célula. Si bien algunas proteínas, como mGluR5 y NMDAR, han sido propuestas como posibles vías de transducción de señales de PrP<sup>C</sup>, es posible que este mecanismo se lleve a cabo por interacción con más de una proteína.

Como PrP<sup>C</sup> y APP se localizan en un mismo contexto, ambas ubicadas en balsas lipídicas, es importante evaluar si la unión de oligómeros solubles del péptido A $\beta$  a la proteína priónica celular aumenta su interacción con APP.

Por esta razón es importante realizar estudios que permitan definir si la interacción de ambas proteínas puede estar desencadenando mecanismos patológicos que aún siguen sin ser comprendidos en la enfermedad del Alzheimer. Para esto, nos proponemos determinar si la interacción APP y PrP<sup>C</sup> es inducida por la unión de oligómeros solubles del péptido A $\beta$ , teniendo un rol en las vías de señalización patológicas en la enfermedad de Alzheimer.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En la enfermedad de Alzheimer, se ha descrito a PrP<sup>C</sup> como receptor para oligómeros de A $\beta$  y activar vías de transducción patológicas asociadas a la toxicidad del péptido A $\beta$ . Sin embargo, al carecer de dominios transmembrana, la acción de PrP<sup>C</sup> debe estar vinculada con una proteína transmembrana que le permita ejercer esta función señalizadora hacia el interior de la célula. Estudios del interactoma de PrP<sup>C</sup> lo relacionan con una diversidad de proteínas, entre las que destaca proteína precursora amiloide (APP).



Nuestra hipótesis de investigación es:

“La interacción de oligómeros solubles del péptido A $\beta$  con la proteína priónica celular promueve la interacción de su porción C-terminal con el extremo N-terminal de la proteína precursora amiloide”.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar si la porción del C-terminal de la proteína priónica celular interacciona con el N-terminal de la proteína precursora amiloide en respuesta a oligómeros de A $\beta$ .

## OBJETIVO ESPECÍFICOS

**OBJETIVO 1:** Determinar interacciones entre la estructura C-terminal de PrP<sup>C</sup> con estructuras del N-terminal de APP mediante el desarrollo de una estrategia *insilico*



### *Actividades*

- 1.1. Búsqueda estructuras para C-terminal PrP<sup>C</sup> y el N-terminal de APP en PDB.
- 1.2. Generación de predicciones de docking proteína – proteína mediante estructuras cristalográficas de la proteína priónica celular y la proteína precursora amiloide (Schrödinger, LLC, NY).
- 1.3. Caracterización estructural y energética de los complejos (Schrödinger, LLC, NY).

**OBJETIVO 2:** Determinar interacciones de PrP<sup>C</sup> en respuesta a oligómeros de A $\beta$ <sub>1-40</sub> mediante el desarrollo de líneas celulares que sobreexpresen APP-GFP y APP<sub>Swe</sub>-GFP a través de ensayos de co-inmunoprecipitación con el agente EGS

*Actividades*

- 1.1. Generación de líneas estables que sobreexpresen APP-GFP, APP con la mutación de *Swedish* y GFP en la línea celular CAD. Realización de colocalización con la proteína priónica celular incluyendo tratamientos con oligómeros de A $\beta$ <sub>1-40</sub>.
- 1.2. Co-inmunoprecipitación de PrP<sup>C</sup> y APP utilizando el agente crosslinkeante EGS



## METODOLOGÍA

**OBJETIVO 1:** Determinar interacciones entre PrP<sup>C</sup> y APP mediante el desarrollo de una estrategia *insilico*

### **Predicciones docking proteína-proteína:**

Mediante simulaciones *in silico* fueron evaluadas las capacidades de interacción entre porciones de APP con el extremo C-terminal de PrP<sup>C</sup>. Por ello, fueron realizadas predicciones de docking proteína – proteína usando las estructuras obtenidas desde PDB. Las estructuras utilizadas para APP fueron para región del Dominio E1(4PQW), dominio E2 (3NLY), Kunitz (1AAP) y dominio intracelular (2LP1). Para la proteína priónica celular se utilizó una estructura con cobertura para el C-terminal (1QM2). Inicialmente, todas las proteínas fueron preparadas para agregar cadenas laterales faltantes, creación de enlaces disulfuro, adición de hidrógenos y estados de protonación a pH  $7 \pm 0,2$  (Propka) usando Maestro Protein Preparation Wizard (Schrödinger, LLC, NY). Asimismo, se realizó una minimización de energía de las estructuras utilizando el programa Macromodel (Schrödinger, LLC, NY) en un gradiente conjugado de energía Polak-Ribiere hasta una convergencia de 0,05 kJ/mol, usando para este proceso el campo de fuerza OPLS3 en solvente acuoso.

Las predicciones de docking proteína – proteína fueron realizadas con Piper (Schrödinger, LLC, NY) con una configuración de alta precisión, sin restricciones para las zonas de interacción. Todos los complejos generados fueron

caracterizados estructuralmente a través sus valores de docking score, y energéticamente utilizando Prime (Schrödinger, LLC, NY) que calculó sus energías de interacción.

### **Caracterización de los complejos generados:**

Los análisis de los complejos se realizaron mediante 3 software disponibles. Para determinar los aminoácidos que están participando en la interfase de los complejos, se usó como estrategia dos filtros de selección. Primero a través del servidor-web PRODIGY (<https://wenmr.science.uu.nl/prodigy/>) [Xue *et al.*, 2016]. el cual analiza la interfase y aplica un filtro para el numero de contactos de residuos intramoleculares a 5Å de distancia, el cual arroja una lista contactos interfaciales (residuos) del complejo. Además, permitió el cálculo de  $\Delta G$  y constante de disociación ( $K_d$ ). Luego se utilizó el servidor-web InterProSurf (<http://curie.utmb.edu/usercomplex.html>) [Negi *et al.*, 2007], el que realizó una predicción de los sitios más probables de interacción, calculando además la superficie accesible al solvente. Para definir los residuos que interactúan más fuerte y con mayor probabilidad, se agregó a este análisis un filtro a los datos obtenidos por PRODIGY, donde se descartó de manera arbitraria bajo el valor 40 del índice “complex area”, a los residuos interfaciales que participan en la interacción.

Adicionalmente, para los complejos se calculó el potencial electroestático y la energía de solvatación usando PBEQ-Solver (<http://www.charmm->

[gui.org/input/pbeqsolver](http://gui.org/input/pbeqsolver)) [Jo *et al.*, 2008]. Finalmente, la visualización y generación de las imágenes requeridas fueron realizadas con PyMOL (Schrödinger, LLC, NY).

**OBJETIVO 2:** Determinar interacciones de PrP<sup>C</sup> en respuesta a oligómeros de A $\beta$ <sub>1-40</sub> mediante el desarrollo de líneas celulares que sobreexpresen APP-GFP y APP<sub>Swe</sub>-GFP a través de ensayos de co-inmunoprecipitación con el agente EGS

#### **Cultivo celular células CAD (ECACC 08100805)**

Las células CAD (tumor neuronal catecolaminérgico), fueron cultivadas en frascos de 25cm<sup>2</sup> (Falcón) con 4ml medio de cultivo Opti-MEM™ (Reduced Serum Media, Thermo Fisher Scientific) con suero fetal bovino al 10% (Hyclone), suplementado con 1% de glutamina y penicilina/estreptomicina (Corning), e incubados a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Cuando presentaron 80% de confluencia las células fueron disociadas mecánicamente, previo un lavado con 3ml de PBS1X (Gibco), para todos los experimentos.

#### **Curva de Muerte G418**

Fue realizada una curva de dosis repuesta con el antibiótico G418 (Corning) en el rango de 400-1200µg/ml. Fueron sembradas 150000 células CAD en placas de 24 pocillos, posterior a las 24 horas de siembra, fue incorporado al medio de cultivo las concentraciones de antibiótico G418 (Gibco). Luego de 10 días de

cultivo se eligió el pocillo en la cual todas estaban muertas a la menor concentración del antibiótico.

### **Preparación de oligómeros solubles del péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> (OS-A $\beta$ <sub>1-40</sub>)**

Fue reconstituido el péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub>(GenicBio, Shanghai, China) a una concentración de 2,3 mM en DMSO (Sigma Aldrich). Luego fueron preparadas alícuotas a 80 $\mu$ M en un volumen final 57,5 $\mu$ l en PBS 1x (Phosphate-Buffered Saline, Corning,USA), en agitación vertical a 500 RPM a temperatura ambiente por 4 horas. Las concentraciones usadas a volumen final de medio de cultivo serán 0.1, 0.5 y 1  $\mu$ M [Panés *et al.*, 2020].



### **Transfección estable en células CAD**

Fueron generadas tres líneas de transfección estable con los plásmidos pEGPFN-1-APP, pEGPFN-1-APPsw y pEGPFN-1. Posteriormente, se hicieron las transfecciones bajo las siguientes condiciones para cada pocillo: se preparó por separado 1 $\mu$ g de plásmido en 100 $\mu$ l de medio Opti-MEM™ (Reduced Serum Media, Thermo Fisher Scientific) sin suero y 2  $\mu$ l de Lipofectamine 3000(invitrogen, Thermo Fisher Scientific) en 100 $\mu$ l de medio Opti-MEM™ (sin suero ni P/E) a temperatura ambiente, por separado por 5 minutos luego mezclados e incubados por 20 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el medio y fue agregada la mezcla de transfección a cada y se dejó incubando por 16h a 37°C, pasado este tiempo se realizó cambio de medio con suero al 10%.

48 horas más tarde todos los pocillos fueron disociados mecánicamente y transferidos a un frasco de cultivo de 25cm<sup>2</sup> con medio Opti-MEM™ al 10% FBS, pasadas 24 horas se realizó un cambio de medio donde fue incorporado G418 como estímulo de selección por 10 días de cultivo con cambios de medio cada 3 días.

### **Diferenciación de células CAD (ECACC 08100805) a un fenotipo “tipo neuronal”**

Luego de ser disociadas mecánicamente las células fueron homogenizadas en medio de cultivo completo para ser contadas por método de exclusión de tripán en una cámara de Neubauer. La densidad utilizada para sembrar las células fue de 20.000 células/ml en placas de 6, 12 y 24 pocillos. Para estas últimas, las cuales tenían cubreobjetos de 12mm estos fueron tratados previamente con UV por ambas caras por 15 minutos luego pasados a las placas, a los cuales se les agregó 40µl aproximadamente de poli-L-lisina diluida 1/10 en PBS estéril se realizó una incubación de dos horas a 37°C luego se quitó el exceso y se efectuaron dos lavados con agua destilada calidad cultivo celular (Gibco).

A las 24 horas postsembrado se realizó cambio de medio sin suero fetal bovino, a cuatro días de cultivo *in vitro* se hicieron los tratamientos con el OS-Aβ<sub>1-40</sub> por 24 horas. Para las células que no fueron diferenciadas a las 24 horas postsembrados fueron realizados los tratamientos con OS-Aβ<sub>1-40</sub> por 24 horas. Para luego ser fijadas con paraformaldehído al 4% y/o lisadas con RIPA más

inhibidores de proteasas 1x (Pierce, Thermo Scientific) según corresponda [Li *et al.*, 2005] [Li *et al.*, 2007].

### **Estandarización de crosslinkg con el reactivo EGS**

Para la estandarización del reactivo EGS se realizó en placas de 6 pocillos con células CAD sin diferenciación. Fueron utilizadas concentraciones crecientes de EGS 0; 0.1; 0.5; 1; 3; 5 mM. Esto fue preparado a partir de una preparación inicial de EGS (Pierce, Thermo Fisher) en DMSO a 100mM de concentración. Para verificar y elegir la concentración adecuada se efectuó un western blot con 50µg de proteína para cada condición [Lipton and Pasa-Tolic, 2009]



### **Crosslinkg con el reactivo EGS**

En placas de 6 pocillos con células CAD diferenciadas por 5 días y tratadas con OS-A $\beta$ <sub>1-40</sub> (0.1, 0.5 y 1µM) por 24 horas fueron utilizadas para los ensayos de crosslinkg. Se eliminó el medio de cultivo y se hicieron dos lavados con PBS 1X. Se agregó EGS en 1 ml de PBS a cada uno de los pocillos. Se incubó en hielo por una hora. Inmediatamente de esto se agregó 50 µl de glicina 1M por 15 minutos. Para remover el exceso de EGS se hicieron dos lavados con PBS 1X y luego se procedió a la lisis con 300µl de buffer RIPA más inhibidores de proteasas y fosfatasa por pocillo, luego se centrifugó a 13000RPM por 20' a 4°C fue extraído el sobrenadante y cuantificado por BCA (Pierce).

## **Co-inmunoprecipitación**

Con 500µg de proteína total fueron incubados en agitación a 4°C toda la noche con 1µg de anticuerpo a elección. Luego fue agregado 100 µl de Proteína Sefarosa G (Pierce), e inmediatamente dejada en agitación a temperatura ambiente por dos horas. Terminada el tiempo, a la mezcla se agregan 500 µl de buffer IP (25mM Tris, 150mM NaCl pH 7.2), fue homogenizado y centrifugado por 3 minutos a 2500g, se eliminó el sobrenadante y el proceso fue repetido 3 veces. Para eluir, el sobrenadante es eliminado completamente y se agregaron 50 µl de buffer de elución (0.2M Glicina pH 2.5) con una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente luego fue centrifugado por 3 minutos a 2500g, el sobrenadante se pasa a un microtubo nuevo y se repite el proceso una vez. A los 100 µl eluidos se le agregan 10 µl de buffer neutralización (1M Tris pH 7.6). Para finalizar, la muestra fue concentrada en el equipo Concentrador plus (Eppendorf) a 40µl, para realizar los experimentos de western blot siguientes.

## **Inmunocitoquímica**

Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% (Merck) por 20 minutos a temperatura ambiente. Luego se realizaron 2 lavados con PBS 1X, para luego ser incubadas con tritón 0.1% por 10 minutos. El bloqueo se realizó con BSA al 2% en PBS1x por una hora. El anticuerpo primario se incubó por 16h en una cámara húmeda a 4°C y luego se hicieron 3 lavados con PBS 1x, posteriormente el anticuerpo secundario fue incubado por una hora a temperatura ambiente en cámara húmeda, asociados a fluoróforos Alexa Fluor 488 y Cy3 (Jackson Inmuno

Research). Previo al montaje las muestras son lavadas 3 veces con PBS 1X y luego una vez con agua destilada, se usaron 8µl de medio de montaje “FLUOROMOUNT G with Dapi” (Electron Microscopy Sciences). La observación de la fluorescencia fue ejecutada en el microscopio confocal OLYMPUS IX81. Todo el procesamiento de las imágenes se hará con el software FIJI (NHI) y los análisis de estadísticos con el software GraphPad Prism, LLC.

### **Western Blot**

Se prepararon geles de poliacrilamida al 10%(SDS-PAGE), luego las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa 0,45 µM (Santacruz biotechnologies) usando un equipo semidrive transblot (Bio-Rad) a 25v por 40 minutos, posteriormente bloqueadas con leche descremada al 5%, el anticuerpo primario (en TBS 1X, leche 2% y Tween 20 0.1%; diluido según Tabla 1) fue incubado durante toda noche en agitación a 4°C, a continuación fueron realizados 3 lavados con TBS 1x (más Tween 20 0.1% y SDS 0.01%) de 10 minutos cada uno, a continuación el anticuerpo secundario (en TBS 1X, leche 2% y Tween20 0.1%; diluido según Tabla 2) se trató por una hora a temperatura ambiente. Luego de 3 lavados con TBS 1x (más Tween 20 0.1% y SDS 0.01%) de 10 minutos cada uno. La inmunoreactividad de las bandas se obtendrá con el sistema de detección Li-Cor CLx Imaging system (LI-COR, Biosciences).

**Tabla 1 :** Anticuerpos primarios utilizados:

<b>Anticuerpo</b>	<b>Marca</b>	<b>Catalogo</b>	<b>Especie</b>	<b>Dilución</b>
<b>PrP (G12), C-terminal</b>	Santa Cruz	sc-398451	Mouse	1/400 IHC, 1/200 WB
<b>PrP (5B2), N-terminal</b>	Santa Cruz	Sc-47730	Mouse	1/400 IHC, 1/200 WB
<b>PrP 6D11, N-terminal</b>	Santa Cruz	Sc-58581	Mouse	1/1200 IHC, 1/2000 WB
<b>APP (Y188), N-terminal</b>	Abcam	ab32136	Rabbit	1/1200 IHC, 1/5000 WB
<b>MAP2 (H-300)</b>	Santa Cruz	sc-20172	Rabbit	1/500
<b>Tau 5</b>	Santa Cruz	sc58860	Mouse	1/1000

**Tabla 2:** Anticuerpos secundarios utilizados:

<b>Anticuerpo</b>	<b>Marca</b>	<b>Catalogo</b>	<b>Dilución</b>
<b>Alexa Fluor 488 anti- mouse</b>	Jackson Inmunoresearch	715-546-151	1/500
<b>Cy3 Donkey anti-mouse</b>	Jackson Inmunoresearch	715-165-150	1/500
<b>Alexa Fluor 488 anti rabbit</b>	Jackson Inmunoresearch	711-546-152	1/500
<b>Cy3 Donkey anti rabbit</b>	Jackson Inmunoresearch	711-166-152	1/500
<b>Alexa Fluor 790 anti- mouse</b>	Jackson Inmunoresearch	715-655-150	1/30000
<b>Alexa Fluor 790 anti- rabbit</b>	Jackson Inmunoresearch	711-625-152	1/30000

## RESULTADOS

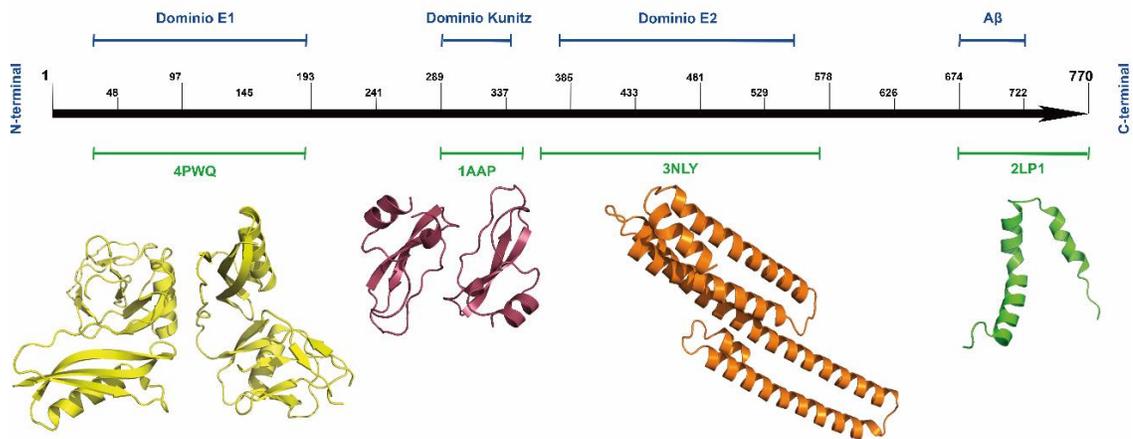
### Búsqueda de estructuras y desarrollo de estrategias de análisis de los complejos PrP<sup>C</sup>-APP.

La primera estrategia para iniciar esta investigación fue realizar una búsqueda de todas las estructuras de APP humano disponibles para los principales dominios de esta proteína, que están almacenados en el “Protein Data Bank” (PDB, <https://www.rcsb.org/>) (Tabla 3). Dado que para esta proteína no se dispone de la estructura completa, el análisis se realizó por segmentos que abarcan gran parte de APP focalizado en sus principales dominios (Figura 2).



**Tabla 3:** Estructuras seleccionadas para los principales dominios de APP.

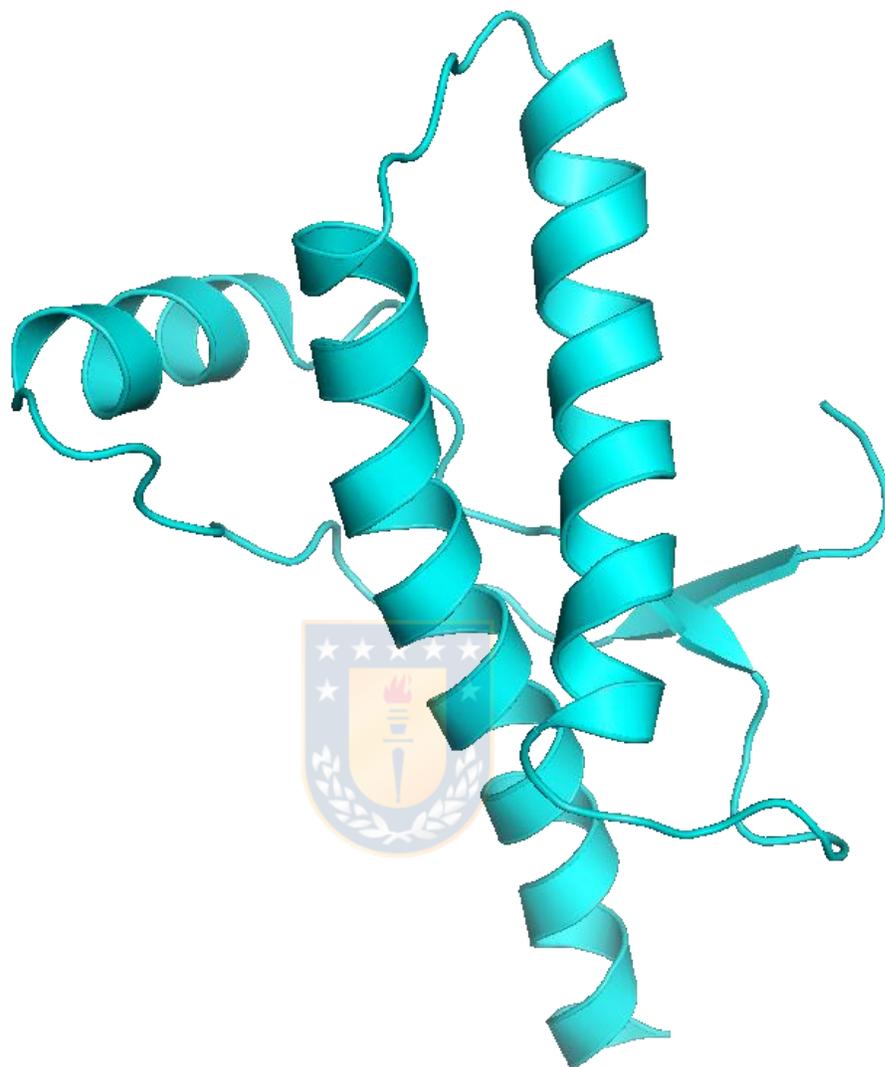
<b>Dominio</b>	<b>N° PDB</b>	<b>Método obtención</b>	<b>Referencia</b>
<b>E1</b>	4PWQ	X-ray, 1,4 Å	[Hoefgen <i>et al.</i> , 2014]
<b>E2</b>	3NLY	X-ray, 2,8 Å	[Wang and Ha, 2004]
<b>Kunitz</b>	1AAP	X-ray, 1,5 Å	[Hynes <i>et al.</i> , 1990]
<b>Intracelular</b>	2LP1	NMR	[Barrett <i>et al.</i> , 2012]



**Figura 2 Estructuras de los fragmentos de la proteína precursora amiloide.** Se muestran en azul los principales dominios de APP y en verde las coberturas de los dominios elegidos con sus correspondientes estructuras. El dominio E1 (4PWQ) en amarillo, el dominio Kunitz (1AAP) en magenta, el dominio E2 (3NLY) en naranja y finalmente el fragmento de la porción intracelular (2LP1) en verde. Estos colores se mantuvieron a lo largo del trabajo.

A continuación, se realizó la búsqueda de la estructura de la proteína priónica celular, para la cual se encontró una estructura de PrP<sup>C</sup> (1QM2) con una cobertura completa de la porción C-terminal de esta proteína (aminoácidos: 121-230) que fue obtenida en NMR (Figura 3) [Zahn *et al.*, 2000].

Se realizaron todos los docking proteína-proteína para las 4 estructuras de APP y PrP<sup>C</sup>, con una configuración de alta precisión y sin restricciones para zona de interacción. La configuración se ejecutó para 70.000 rotaciones entre ambas estructuras y arrojando 10 poses diferentes clusterizadas y luego ranqueadas según su docking score. Fueron seleccionadas las poses con menor docking score ya que indican una mejor capacidad de interacción entre las proteínas utilizadas.



**Figura 3. Estructura proteína priónica celular entre los aminoácidos 121 y 230 (1QM2).** Esta estructura fue utilizada para todos los ensayos de docking proteína-proteína y para facilitar su identificación mantiene el color cian en todas las figuras [Zahn *et al.*, 2000].

## **Análisis de los complejos interacción PrP<sup>C</sup>-APP**

El complejo generado con el dominio E2 (3NLY) de APP para el cual se obtuvo un docking score de -190.9, que describe la unión estructural y los potenciales de interacción entre ambas proteínas, resultó ser favorable. Además, se pudo corroborar a través del cálculo de la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) que resultó de -10.2 kcal/mol, propicio para la generación espontánea y favorable termodinámicamente del complejo 1QM2-3NLY (Figura 5, A-B). Por otro lado, fueron calculadas la energía total del complejo llegando a -17816.4 kcal/mol y el potencial electrostático de 93.68 kcal/mol (Figura 5, C-D). Igualmente, se calcularon la energía de solvatación -5826.2 kcal/mol, una constante de disociación de  $3.2 \times 10^{-08}$  M y el área accesible al complejo de 18559.5 Å<sup>2</sup>, los cuales son parámetros que describen detalladamente el complejo formado por la generación de interacciones entre residuos (Figura 9 A-C).

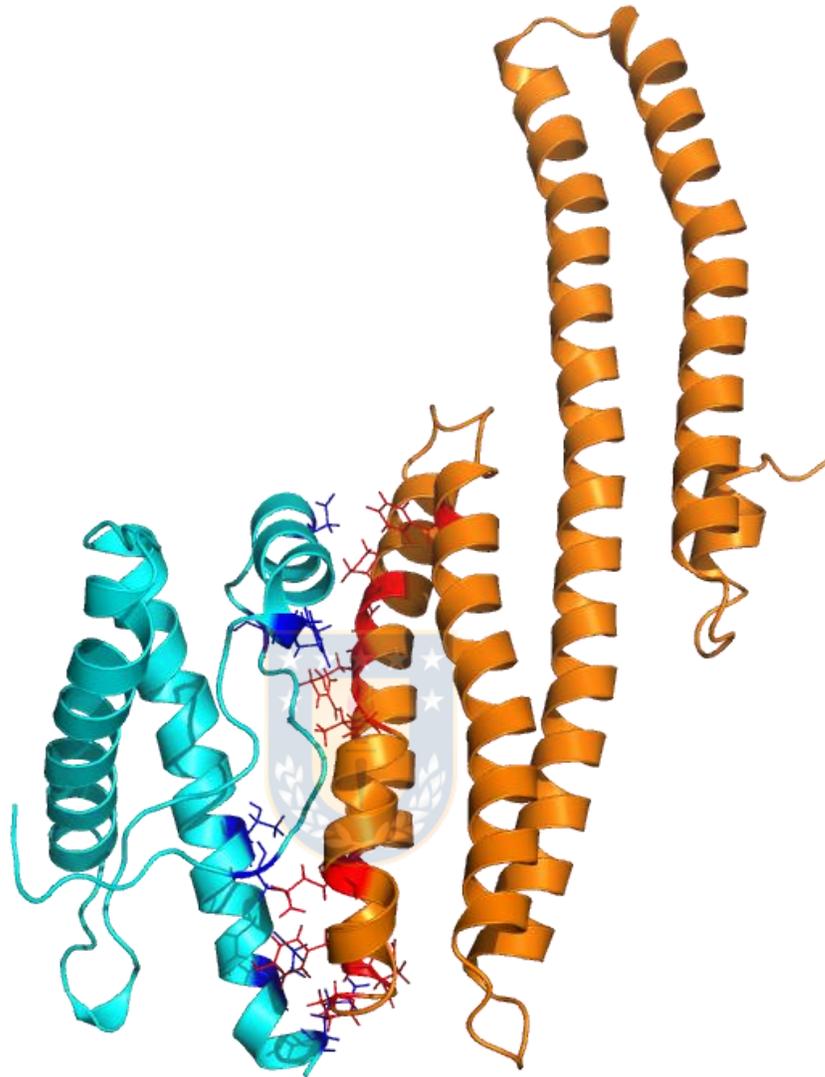
Fueron realizados dos filtros de selección mediante dos servidores web InterProSurf y PRODYGY (Tabla 4), se obtuvieron doce pares de residuos en la interfase de 1QM2-3NLY, los cuales son mostrados en la Tabla 5. Vale destacar a la metionina 512 y la tirosina 530 de 3NLY la cual interacciona con dos residuos diferentes en la estructura de PrP<sup>C</sup> y en este último destacan histidina 140 y glutamina 227 que tienen interacción con tres residuos de la estructura 3NLY (Tabla 5 y Figura 4).

**Tabla 4. Selección de pares de residuos en interacción para complejo 1QM2-3NLY.** A. Lista de áreas accesibles de los residuos en la cara interfacial del complejo obtenidos desde InterProSurf, en rojo están los residuos que fueron seleccionados en conjunto a la lista obtenida por PRODIGY.

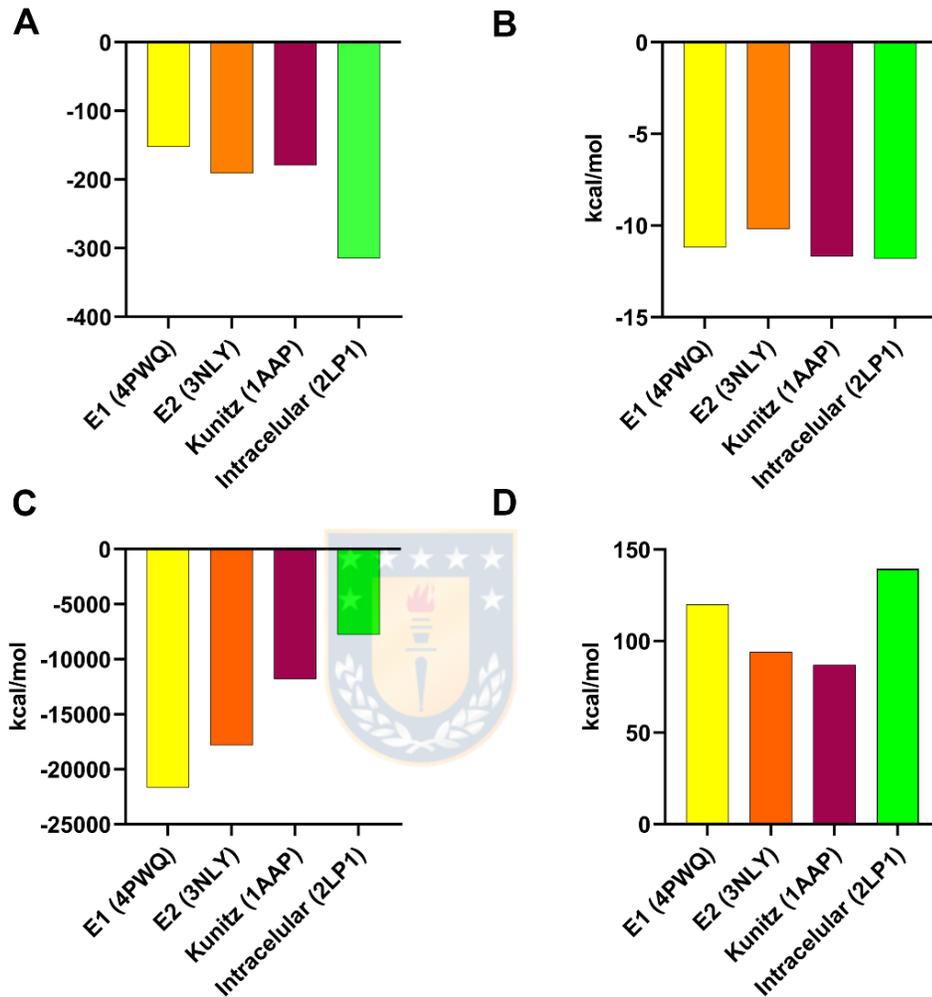
PrP <sup>C</sup> (1QM2)			APP, Dominio E2 (3NLY)		
Numero residuo	área complejo	Código residuos	Numero residuo	área complejo	Código residuos
132	50.42	SER	490	55.81	LEU
133	3.38	ALA	493	51.52	PHE
134	3.78	MET	494	106.99	GLU
135	1.55	SER	512	82.05	MET
136	18.00	ARG	513	72.84	THR
137	17.01	PRO	515	28.49	LEU
138	6.18	ILE	516	124.57	ARG
140	58.26	HIS	519	98.83	TYR
144	69.36	ASP	520	83.96	GLU
147	7.30	ASP	523	91.93	ASN
148	39.06	ARG	526	35.09	LEU
151	12.41	ARG	527	76.01	SER
154	12.91	MET	529	22.86	LEU
155	141.02	HIS	530	185.74	TYR
159	23.53	ASN	531	90.09	ASN
160	39.61	GLN	533	96.06	PRO
216	42.54	THR	540	102.04	GLN
220	16.77	ARG	543	24.39	VAL
221	29.48	GLU	544	101.88	ASP
223	68.74	GLN			
224	31.66	ALA			
227	58.73	GLN			

**Tabla 5. Residuos obtenidos mediante el esquema de filtración de residuos en interacción.** La lista es el resultado del cruce de los datos obtenidos tanto de PRODIGY como InterProSurf.

<b>APP (3NLY) - PrP<sup>C</sup> (1QM2)</b>			
PHE	493	ASP	144
MET	512	ASP	144
MET	512	HIS	140
THR	513	HIS	140
ARG	516	HIS	140
PRO	533	GLN	227
SER	527	THR	216
TYR	530	GLN	223
TYR	530	GLN	227
ASN	531	GLN	227
GLN	540	SER	132
LEU	547	HIS	155



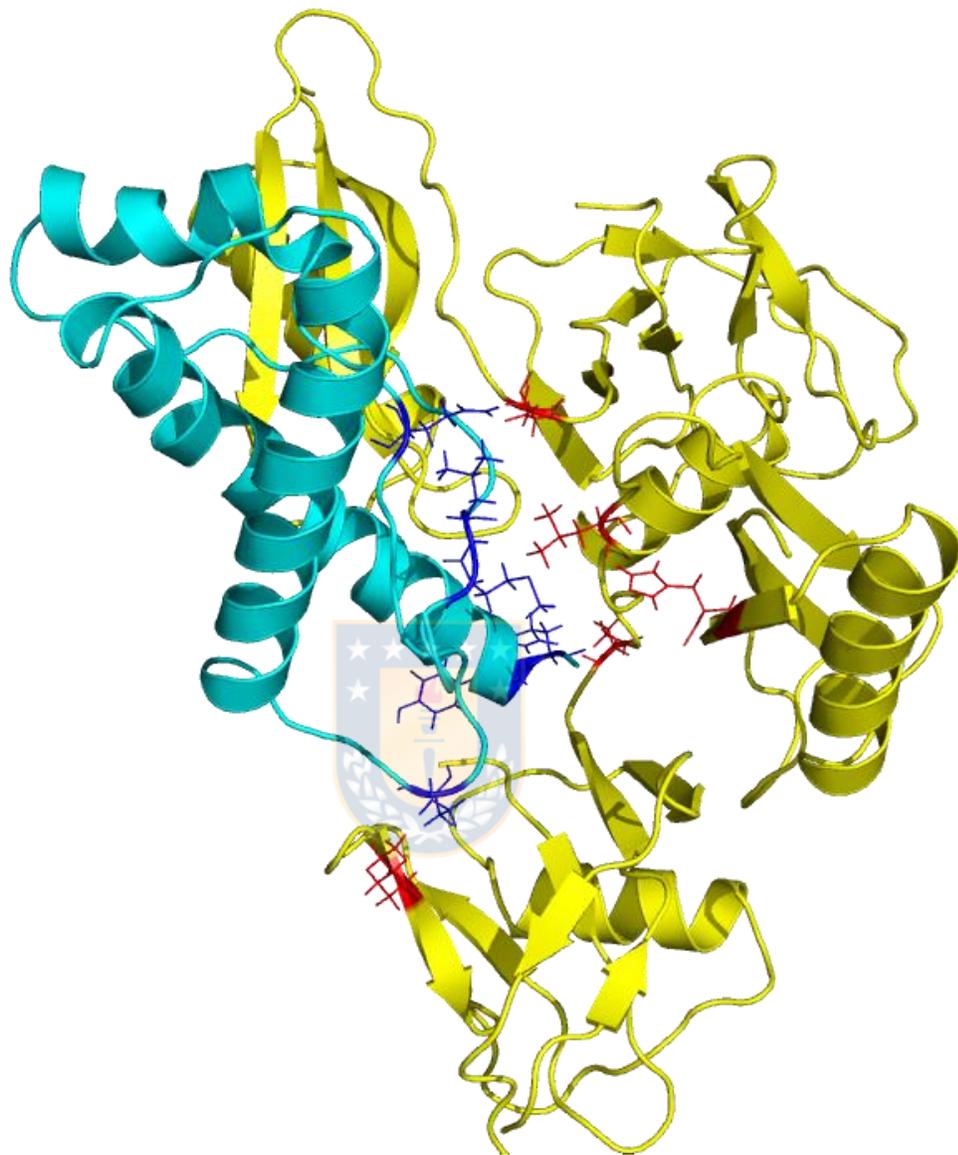
**Figura 4. Complejo obtenido entre la proteína priónica celular (1QM2) y el dominio E2 de la proteína APP (3NLY).** La estructura del complejo 1QM2-3NLY fue modificada en el software Pymol, los residuos de la interfase están destacados en rojo en APP y azul en PrPC.



**Figura 5. Evaluaciones energéticas de los complejos obtenidos de los diferentes dominios de APP y PrP<sup>C</sup>. A. Docking score, B. Energía de Gibbs ( $\Delta G$ ) y C. Energía total de los complejos. D. Potencial electrostático complejos.**

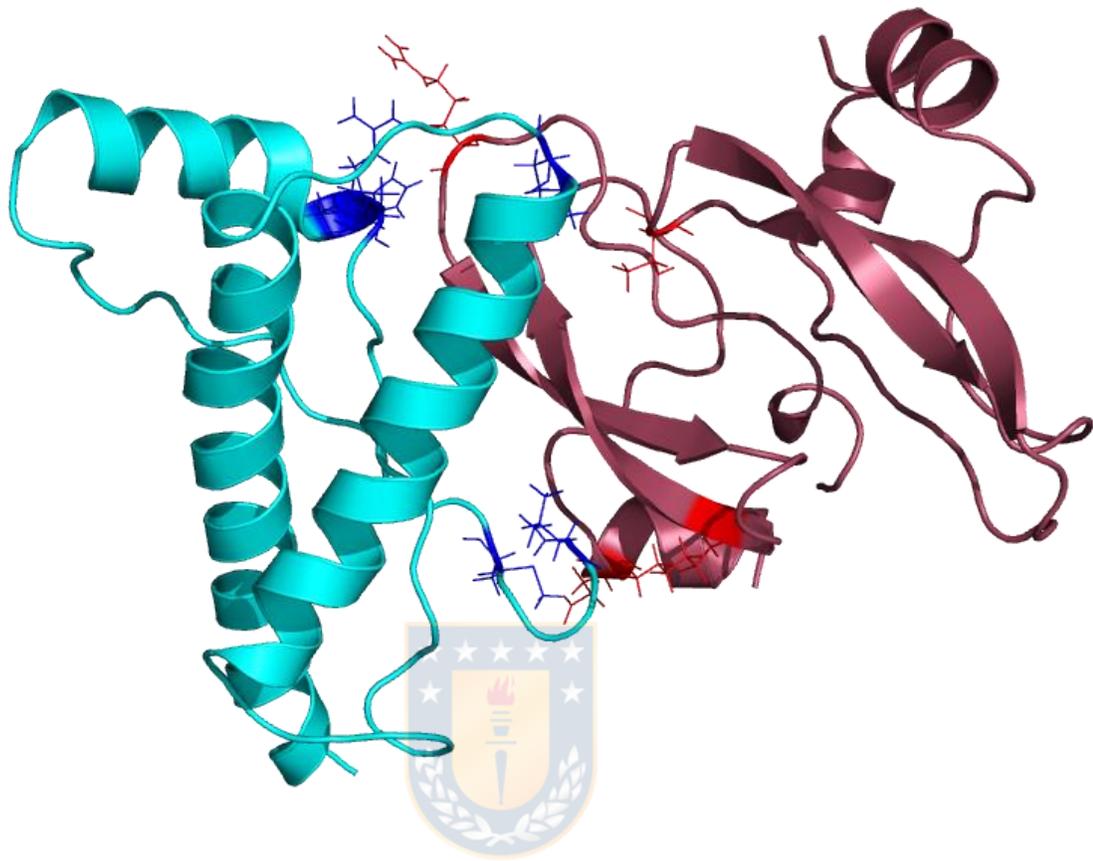
El segundo complejo estudiado fue el obtenido con el dominio E1 (4PWQ) para el cual se obtuvieron valores favorables tanto en términos estructurales como energético con un docking score de -152.2 y un  $\Delta G$  de -11.2 kcal/mol (Figura 5, A-B). También, fue calculada la energía total del complejo -21661.6 kcal/mol y el potencial electrostático de 120.1 kcal/mol. (Figura 5, C-D). Igualmente, fueron calculadas la energía de solvatación -6194.6 kcal/mol, la constante de disociación de  $6.3E^{-09}$  M y el área accesible al complejo que resultó la mayor entre complejos de  $21853.8 \text{ \AA}^2$  (Figura 9, A-C).

Posterior al filtro de selección ocupado, fueron obtenidos siete pares de residuos en la interfase del complejo 1QM2-4PWQ (Anexo 1), cabe mencionar que la metionina 129 en PrP<sup>C</sup> interacciona con dos residuos diferentes en la cadena B del dominio E1 (Anexo 4). En este último destacan el ácido glutámico 129 y leucina 128 que interactúan ambas con dos residuos de PrP<sup>C</sup> (Figura 6).



**Figura 6. Complejo obtenido entre la proteína priónica celular (1QM2) y el dominio E1 de la proteína APP(4PWQ). Los aminoácidos en contacto están destacados en rojo en APP y azul en PrP<sup>C</sup>.**

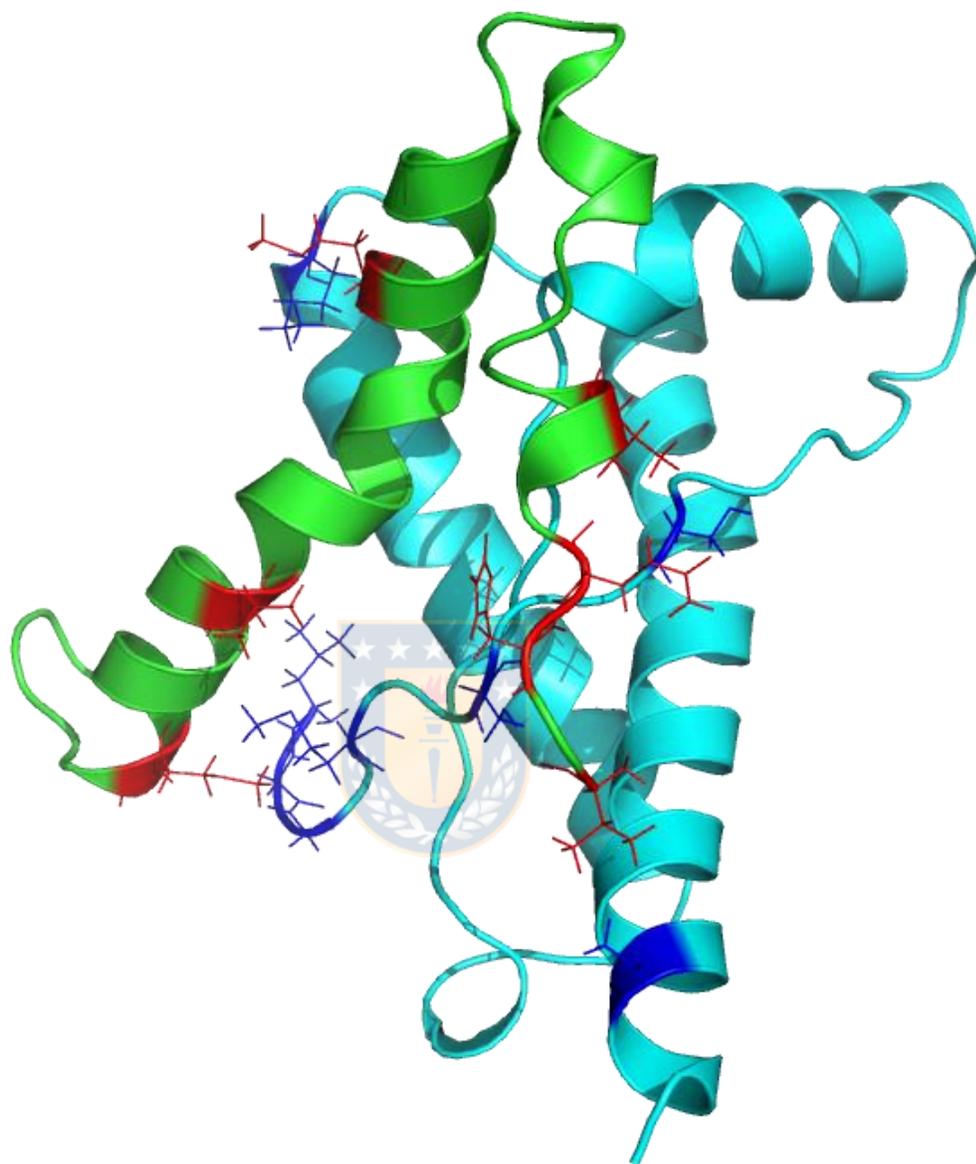
La tercera estructura examinada fue con el dominio Kunitz (1AAP), todos sus parámetros energéticos y estructurales fueron favorables para la generación de interacciones con PrP<sup>C</sup>. Los primeros parámetros evaluados fueron el docking score de -179.1 con un delta G de -11.7 kcal/mol (Figura 5, A-B). También fue incluido en el análisis la energía total del complejo de -11797.6 kcal/mol y el potencial electrostático de 93.7 kcal/mol (Figura 5, C-D). Al mismo tiempo, se calcularon la energía de solvatación -3519.8 kcal/mol, la constante de disociación de  $2.6E^{-09}$  M y el área accesible al complejo que resulto de 12437.9 Å<sup>2</sup> (Figura 9 A-C). Posteriormente, fue realizado el análisis de filtración de residuos entre los dos servidores web, se obtuvieron los valores visualizados en el Anexo 2. A través de esta selección se obtuvo seis parejas de residuos en la interfase del complejo 1QM2-1AAP (Anexo 4), destacando la arginina 15 en 1AAP y la lisina 194 los cuales interaccionan con dos residuos diferentes en la estructura de PrP<sup>C</sup> (Figura 7).



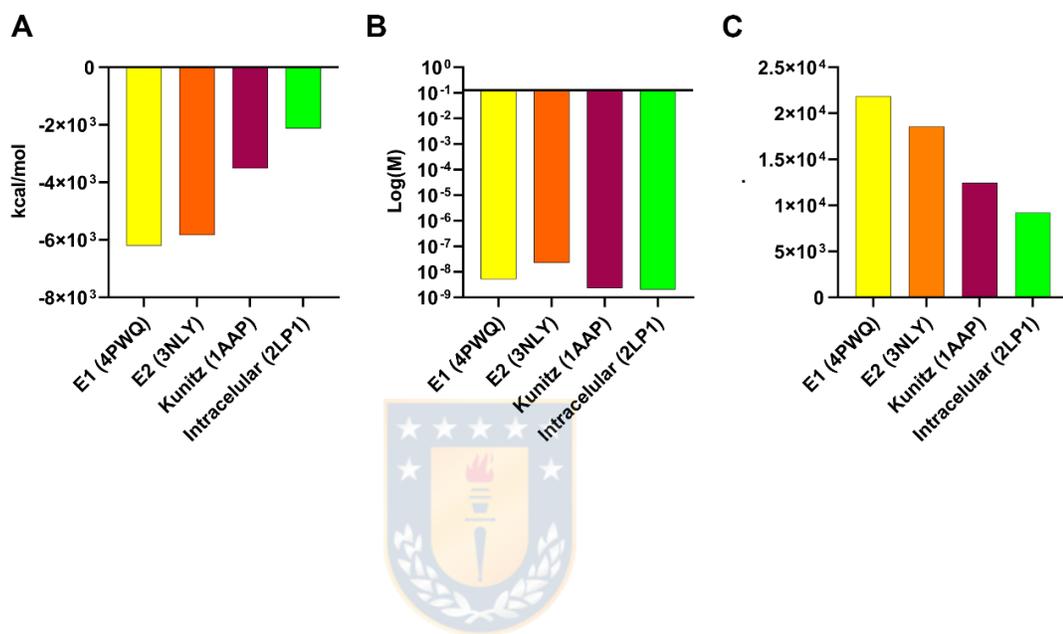
**Figura 7. Complejo obtenido entre la proteína priónica celular (1QM2) y el dominio Kunitz de la proteína APP(1AAP). Los aminoácidos en contacto están destacados en rojo en APP y azul en PrP<sup>C</sup>.**

El dominio intracelular de APP fue analizado mediante la estructura (2LP1), el complejo obtenido entre 2LP1-1QM2 fue el que obtuvo el valor más bajo de docking score de -314.8 y menor energía de Gibbs -11.8 kcal/mol entre todas las estructuras analizadas (Figura 5, A-B). Fueron incluidos en los estudios la energía total del complejo de -7783.7 kcal/mol y el potencial electrostático de 139.5 kcal/mol (Figura 5, C-D). Además, se calcularon la energía de solvatación -2122.7 kcal/mol, la constante de disociación de  $2.2E^{-09}$  M y el área accesible al complejo que resulto de  $9225.6 \text{ \AA}^2$  (Figura 9 A-C).

A través de los filtros de selección utilizados fueron encontradas once pares de residuos en la interfase de la interacción 2LP1-1QM2, destacando la metionina 722 de 2LP1 la cual interactúa con 4 residuos de 1QM2 y la valina 683 que lo hace con otros dos (Anexo 3). En PrP<sup>C</sup> tanto la metionina 129, serina 132 y 135 interactúan con dos residuos de 2LP1 (Anexo 4).



**Figura 8.** Complejo obtenido entre la proteína priónica celular (1QM2) y el dominio intracelular de la proteína APP (2LP1). Los aminoácidos en contacto están destacados en rojo en APP y azul en PrP<sup>C</sup>.



**Figura 9. Caracterización de los complejos de APP y PrP<sup>C</sup>. A.** Energía de solvatación, **B.** Constante de disociación y **C.** Área accesible total del complejo.

Al analizar en conjunto los resultados obtenidos a partir de las predicciones de docking es posible sugerir que el potencial sitio de unión para PrP<sup>C</sup> es a través del dominio E2 de APP, el cual se obtuvo con las estructuras 3NLY-1QM2. Esto debido a que es uno de los complejos con mejores índices estructurales y energéticos entre los cuatro estudiados. Además, esto se ratificó ya que fue el complejo con mayor número de pares residuos en la cara interfacial del complejo 3NLY-1QM2.



## Desarrollo de modelos de estudios

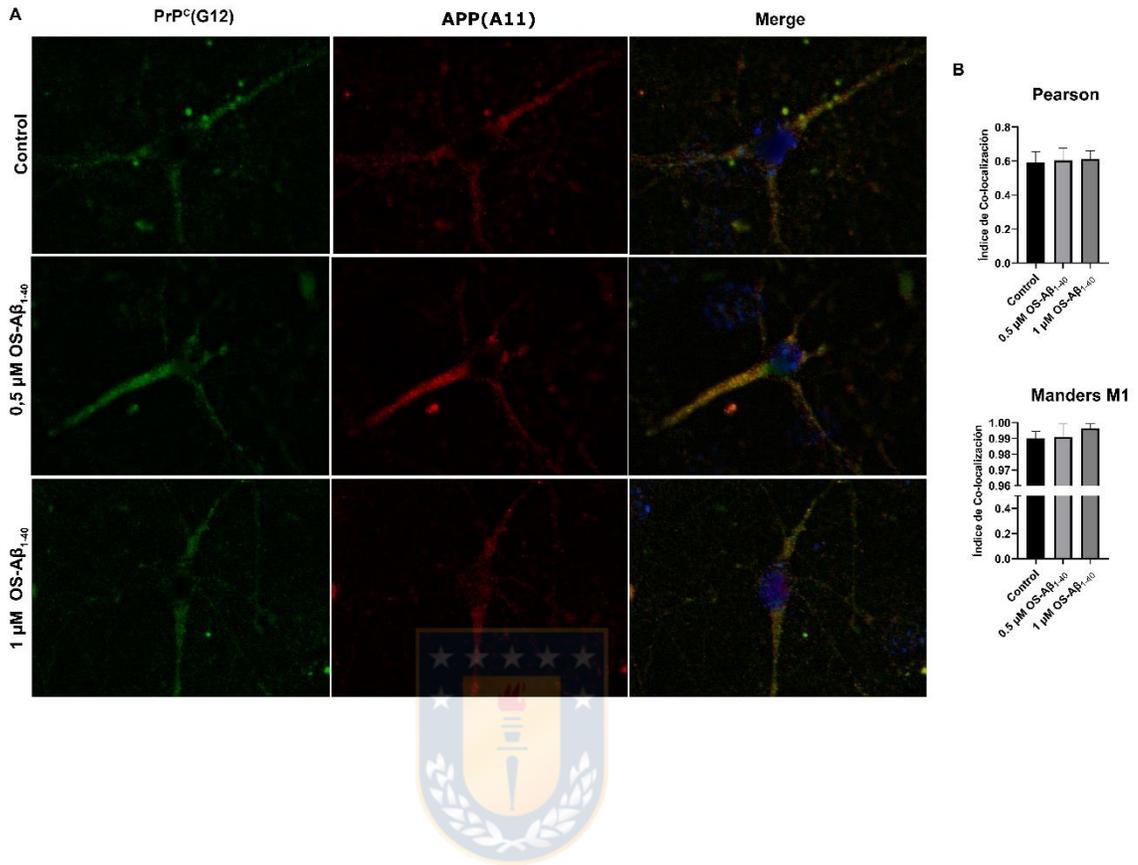
Para el desarrollo del segundo objetivo, se utilizó oligómeros solubles del péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> la metodología utilizada había sido previamente estandarizada en el departamento de fisiología donde se había determinado y caracterizado la formación de oligómeros solubles de A $\beta$ <sub>1-40</sub> [Panés *et al.*, 2020].

Fueron utilizados dos modelos celulares: cultivo primario de neuronas y la línea celular tipo neuronal CAD. Esta última puede diferenciarse en tipo neuronal al cultivarlas en ausencia de suero durante 5 días. En ensayos de inmunofluorescencia realizados en neuronas hipocampales de 10 días, las cuales fueron tratadas con oligómeros solubles de A $\beta$ <sub>1-40</sub> a 0.5 y 1  $\mu$ m. Se observó la expresión en todas las condiciones tanto para PrP<sup>C</sup> como APP, con los tratamientos de OS-A $\beta$ <sub>1-40</sub> no se obtuvieron diferencias en la expresión (Figura 10 - A). Además, se analizó la colocalización de PrP<sup>C</sup> con APP la cual fue positiva para todas las condiciones analizadas lo que fue ratificado mediante los índices de Pearson y Manders (Figura 10- B).

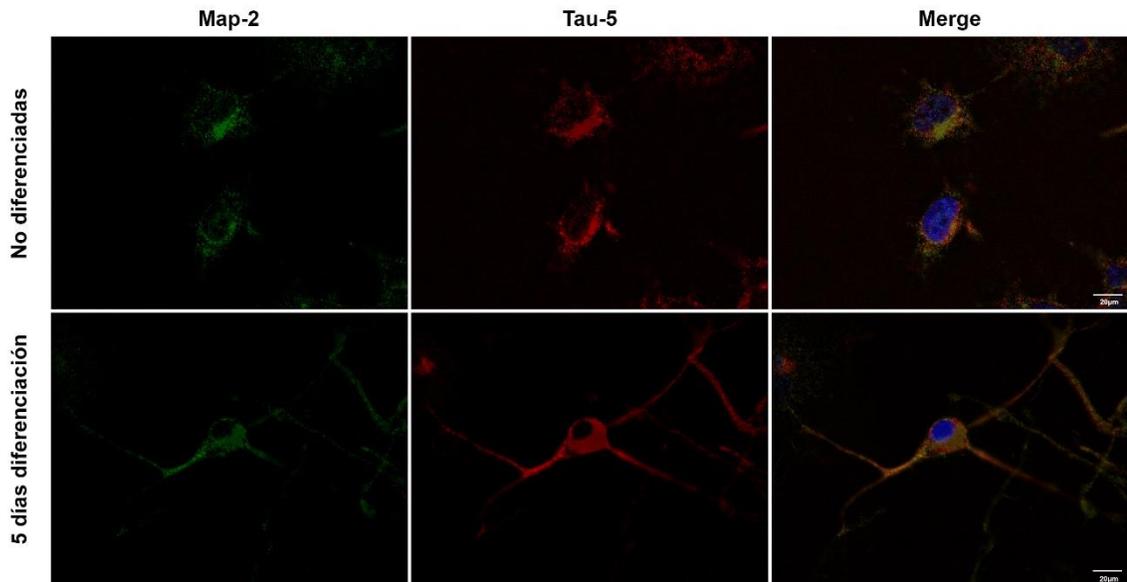
Debido a la complejidad y variabilidad de los cultivos primarios neuronales se utilizó como modelo de estudio la línea celular CAD para la cual se estandarizó un protocolo según literatura y ajustado a las condiciones del laboratorio. Las diferenciaciones de estas células se realizaron sembrando 20.000 células /mL, luego de 24 horas postsembrado fueron incubadas por 5 días sin suero fetal bovino, periodo en el cual alcanzan un fenotipo tipo neuronal. En la Figura 11, se

puede apreciar el cambio en el fenotipo que experimentan estas células luego de 5 días de diferenciación, además los marcadores Map-2 y Tau5 se identifican en ambas condiciones. Las células desarrollan procesos, varicosidades y se puede observar como el cuerpo celular adquiere mayor tamaño, morfología que hace referencia a neuronas.





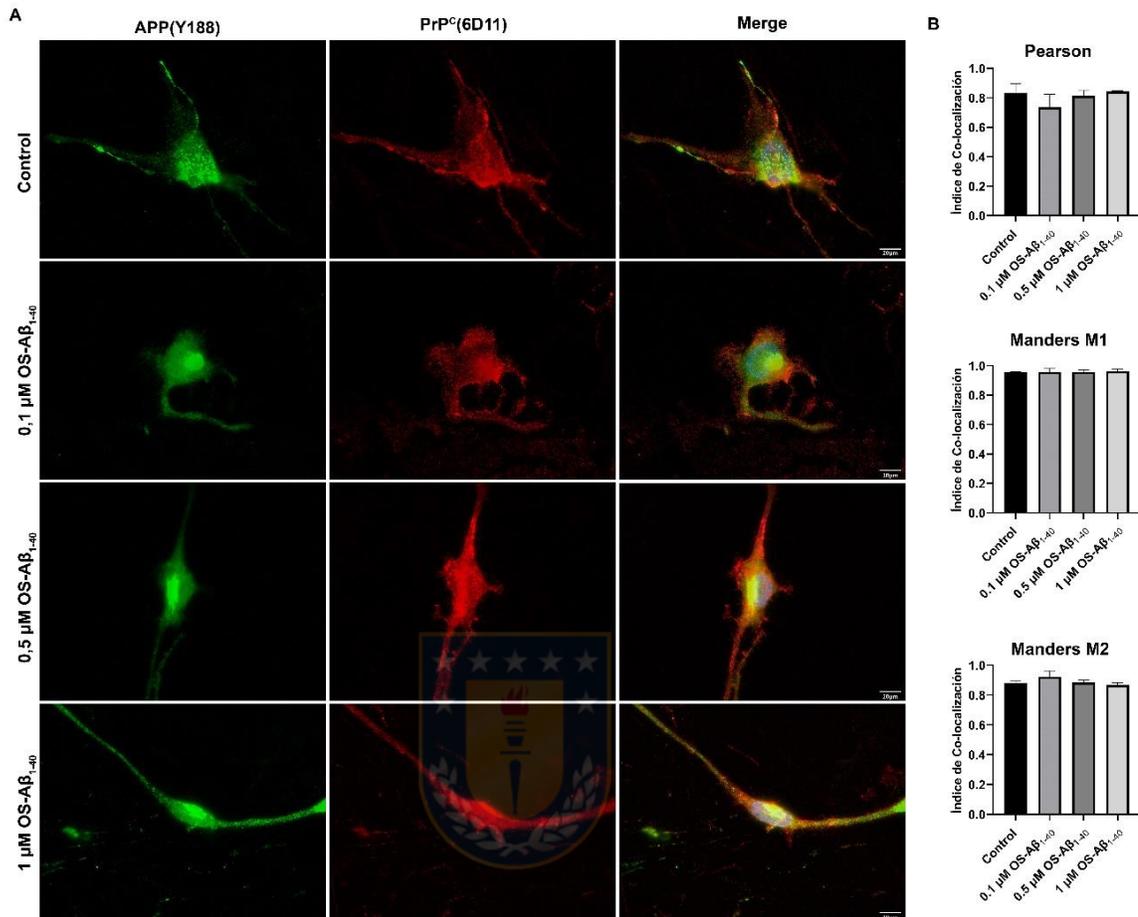
**Figura 10. Expresión de PrP<sup>C</sup> y APP en neuronas hipocámpales de 10 días de cultivo de ratón C57BL/6. A.** Los paneles muestran la expresión de PrP<sup>C</sup> usando el anticuerpo G12 (verde) y en rojo la proteína precursora amiloide (APP) A11(extremo N-terminal). **B.** Índices de colocalización Pearson y Manders M1. Todas las imágenes fueron tomadas con el aumento 60X en el microscopio confocal OLYMPUS IX8.



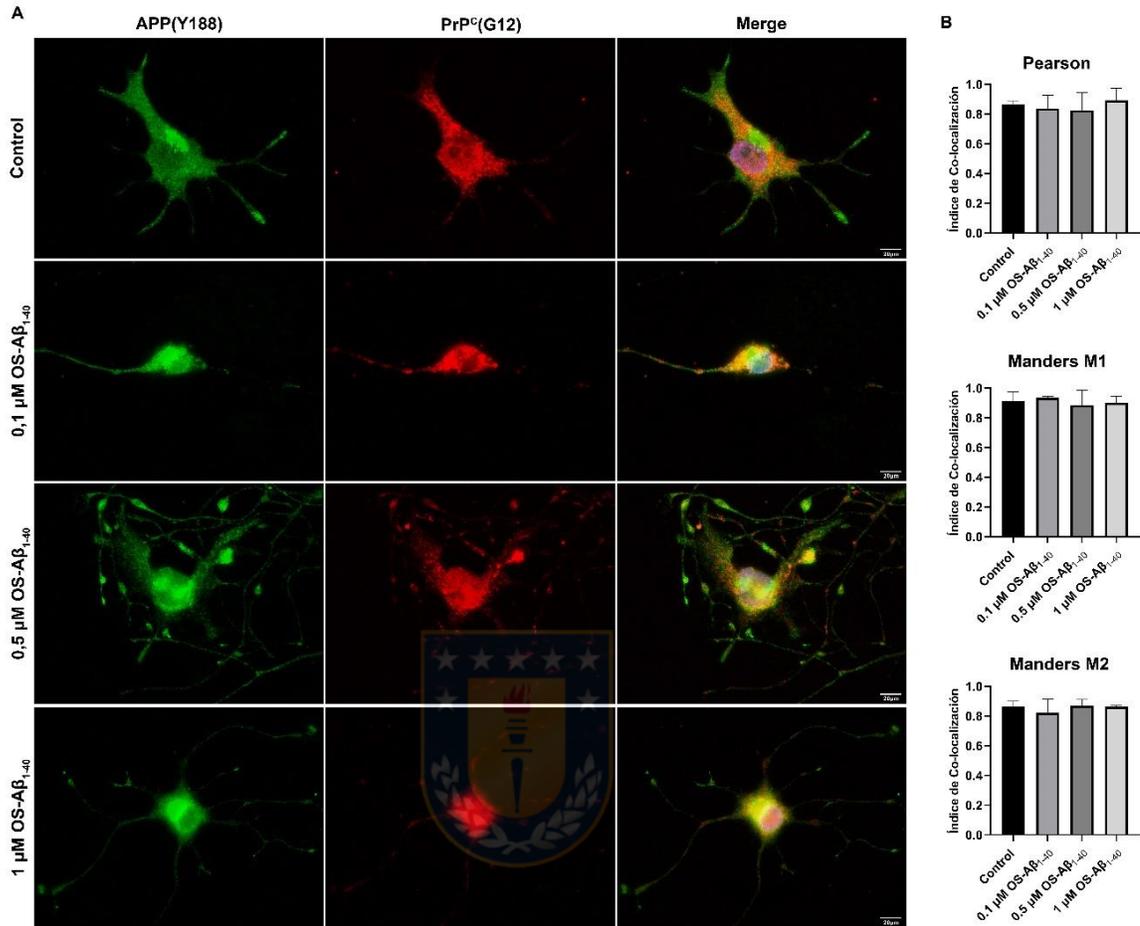
**Figura 11. Inmunocitoquímica células CAD para los marcadores neuronales MAP2 y Tau-5.** La expresión de MAP2 en verde y Tau-5 y la superposición de ambos canales. En la parte superior se observan las células sin diferenciación y en el inferior estas células con 5 días de diferenciación

**Colocalización de PrP<sup>C</sup> y APP en células CAD diferenciadas tratadas con oligómeros solubles del péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> (OS-A $\beta$ <sub>1-40</sub>):**

Luego de determinar la expresión de marcadores neuronales en la línea celular CAD, se procedió a analizar la expresión de PrP<sup>C</sup> y APP en estas células y determinar su colocalización. Se realizaron 3 experimentos independientes, en donde las células fueron tratadas con 3 concentraciones de OS-A $\beta$ <sub>1-40</sub> (0.1, 0.5 y 1 $\mu$ M), además del control con el vehículo. Por cada tratamiento se analizaron 3 células independientes para los cálculos de los índices de colocalización en el software FIJI (NHI). Además, fueron utilizados dos anticuerpos diferentes para la proteína priónica celular, el primero para la zona N-terminal (6D11) Figura 12, A-B, en la cual para las cuatro condiciones analizadas se observa una alta superposición de los canales lo cual se ve corroborado con el cálculo de todos los índices. Los análisis entre tratamientos no arrojaron significancia estadística luego de realizar el test estadístico de Kruskal-Wallis. Para la región C-terminal de PrP<sup>C</sup> se utilizó el anticuerpo G12 el cual mostró el mismo patrón que el análisis con 6D11, arrojando una alta superposición de los canales rojo y verde (Figura 13, A). También los coeficientes de colocalización coincidieron con esta observación y los análisis estadísticos no lanzaron significancia estadística.



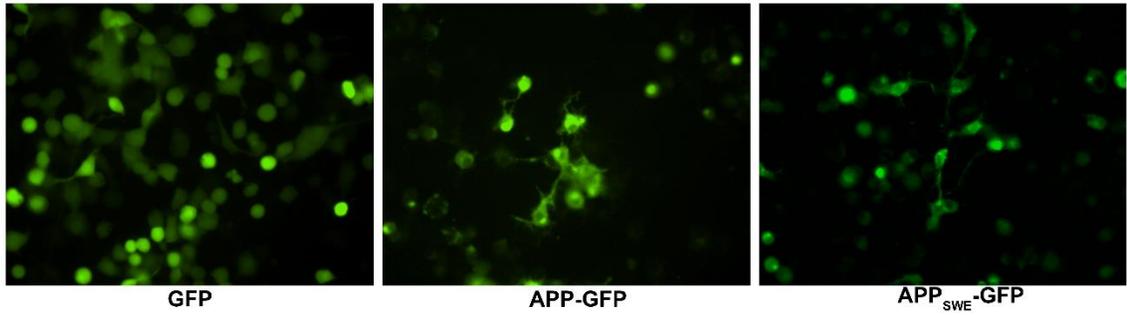
**Figura 12. Colocalización de PrP<sup>C</sup>(6D11) y APP en células CAD diferenciadas tratadas con OS-Aβ<sub>1-40</sub>.** **A.** Expresión de APP en verde (Y188, C-terminal) y PrP<sup>C</sup> en rojo con un anticuerpo que reconoce la porción N-terminal (6D11), además la superposición de ambos canales o “Merge”. **B.** Cuantificación según índices de colocalización Pearson, Manders (M1 y M2). Fue realizado el test estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis el cual no arrojó ninguna significancia para las condiciones analizadas.



**Figura 13. Colocalización de PrP<sup>C</sup>(G12) y APP en células CAD diferenciadas tratadas con OS-Aβ<sub>1-40</sub>.** **A.** Expresión de APP en verde (Y188, C-terminal) PrP<sup>C</sup> en rojo con un anticuerpo que reconoce la porción C-terminal (G12), además la superposición de ambos canales o “Merge”. **B.** Cuantificación según índices de colocalización Pearson, Manders (M1 y M2). Fue realizado el test estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis el cual no arrojó ninguna significancia para las condiciones analizadas.

**Generación de líneas estables en células CAD que sobreexpresan la proteína de fusión APP<sub>wt</sub>-GFP o APP<sub>SWE</sub>-GFP.**

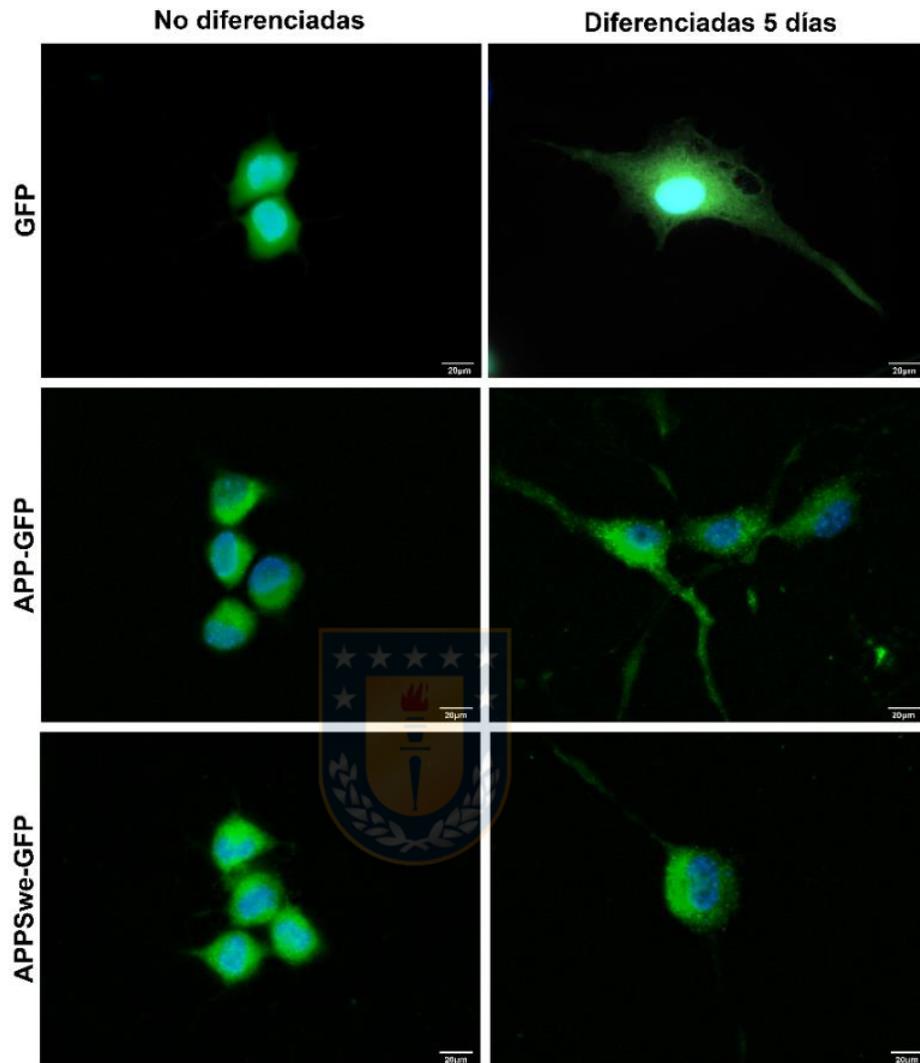
Luego de la estandarización del modelo de diferenciación, se generaron 3 líneas estables transfectadas con plásmidos conteniendo APP<sub>wt</sub>-GFP, APP<sub>SWE</sub>-GFP y GFP. Se utilizó el vector de expresión pEGFP-N1, con el cual se generan proteínas de fusión en el extremo N-terminal de la proteína fluorescente verde (GFP). En este plásmido se insertó la secuencia nativa para APP o APP con la mutación de Swedish, y como control se dejó el vector vacío (Figura 14). Para la línea celular CAD se realizó una curva de muerte con el antibiótico G418 para determinar la mínima concentración de uso a la cual mueren todas las células. De manera cualitativa, luego de 7 días de cultivo, con este antibiótico se logró determinar que usando 1000 µg/µl de G418 todas las células del cultivo estaban muertas. Las células luego fueron transfectadas con los plásmidos y luego sometidas a selección con G418. Luego de la generación de estas líneas estables, realizamos la caracterización mediante microscopia confocal para verificar la sobreexpresión de estas proteínas detectándolas por la emisión de fluorescencia de GFP. En la Figura 15 podemos observar las 3 líneas sin y con diferenciación. La diferenciación de los tres cultivos no se vio alterada con la sobreexpresión de las proteínas.



**Figura 14. Transfección a 48 horas en las células CAD no diferenciadas.**

Con los tres plásmidos usados, las fotos fueron tomadas con aumento 4X.



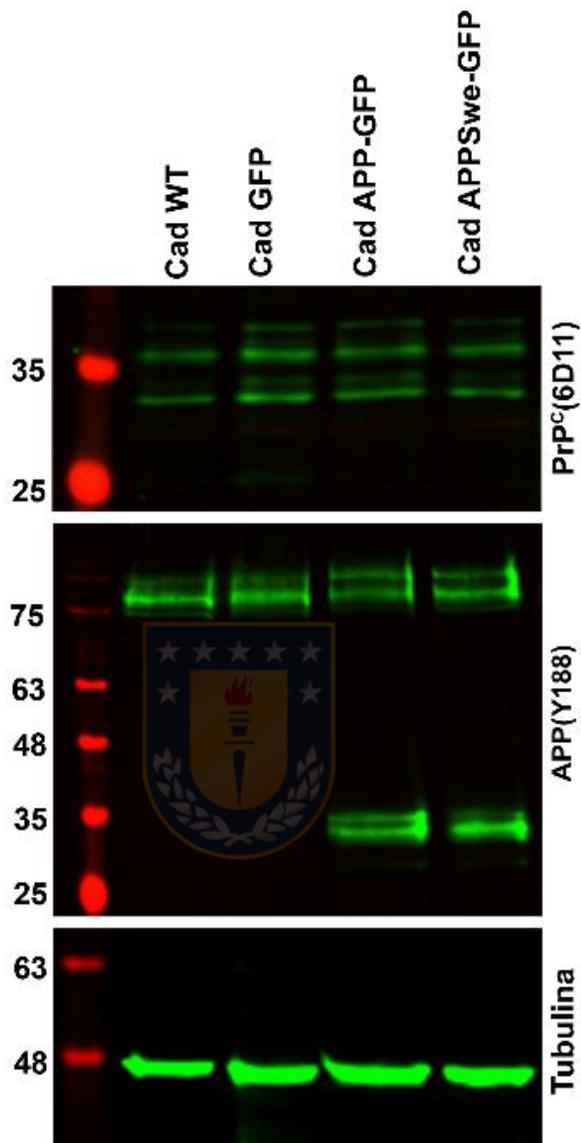


**Figura 15. Células CAD transfectadas establemente sin y con diferenciar.**

Las fotos fueron tomadas a 60X de aumento.

Posteriormente, las células CAD establemente transfectadas con APP<sub>wt</sub> o APP<sub>SWE</sub> en fusión con GFP, fueron analizadas mediante WB. Se utilizó tubulina como control de carga. Para la detección de APP se utilizó el anticuerpo Y188 que reconoce un sitio en la porción intracelular de APP. Se observan bandas cercanas a 100 kDa para todas condiciones, pero en el caso de las que están sobreexpresando APP se aprecian además bandas cercanas a 35 KDa. Por otro lado, se detectó la expresión de la proteína priónica celular sin alteraciones aparentes, esto se realizó con el anticuerpo 6D11 que reconoce la porción N-terminal fueron observadas 3 bandas sobre 30kDa que es un patrón característico para esta PrP<sup>C</sup>.

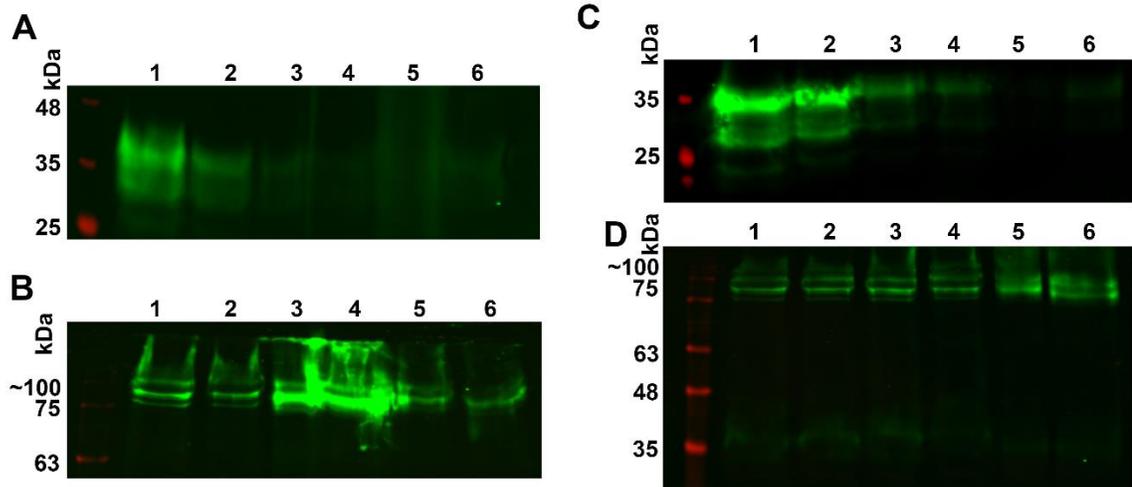




**Figura 16. Expresión mediante western blot de PrP<sup>C</sup> y APP en las líneas estables CAD.** Para la expresión de PrP<sup>C</sup> se utilizó el anticuerpo 6D11 se utilizó tubulina como control de carga.

### **Estandarización de crosslinking con EGS en células CAD sin diferenciar.**

Antes de proceder al ensayo de co-inmunoprecipitación, se realizó una estandarización de un protocolo de crosslinking para el reactivo EGS el cual une covalentemente a proteínas a  $16.1\text{\AA}$ , para determinar la concentración óptima, para la línea celular CAD nativa y la línea estable APP-GFP, a la cual este reactivo genera su acción sin degradar las proteínas de interés. Se realizó una curva desde 0.1- 5 mM de EGS por una hora, luego se extrajeron proteínas totales de las condiciones y se realizaron WBs para PrP<sup>C</sup> y APP. En éste se pudo observar que a medida que se aumentó la concentración de EGS la proteína se fue degradando para ambas líneas. Mientras para APP se sugiere una disminución en su expresión a concentraciones mayores. Finalmente, los datos permitieron decidir utilizar la concentración de 0.1mM para realizar los ensayos posteriores, ya que a esta concentración ninguna proteína ve alterada su expresión (Figura 17)



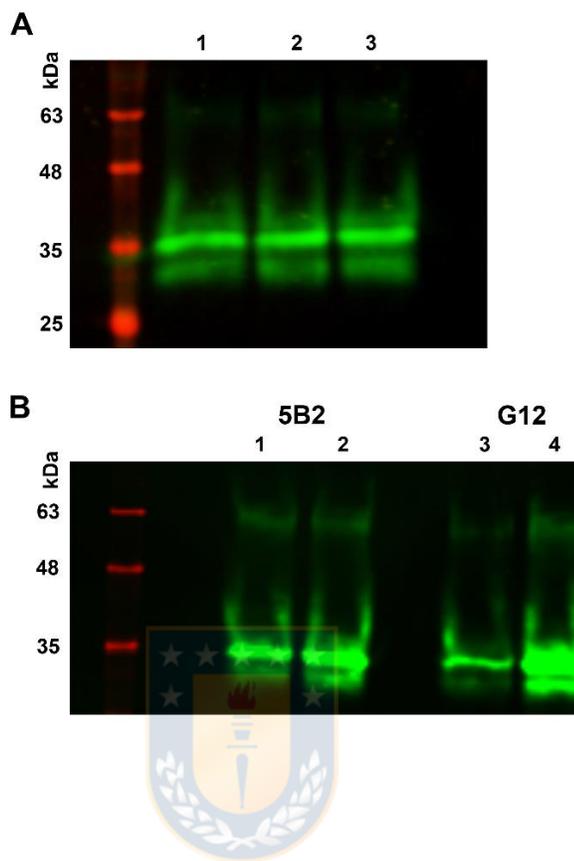
**Figura 17. Estandarización de la concentración de EGS en células CAD nativas y en la línea APP-GFP. A.** Expresión de PrP<sup>C</sup> en CAD nativas. **B.** Expresión de APP en CAD nativas **C.** Expresión de PrP<sup>C</sup> en la línea APP-GFP. **D.** Expresión de APP en la línea APP-GFP. Concentraciones usadas de EGS; 1:0(C-), 2:0.1 mM, 3:0.5 mM, 4: 1 mM, 5: 3 mM, 6: 5 mM.

## Ensayo de co-inmunoprecipitación entre PrP<sup>C</sup> y APP

En una primera aproximación, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación con lisados provenientes de neuronas hipocampales y corticales tratadas con oligómeros solubles del péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub>.

En la Figura 18 en la parte A podemos ver la co-inmunoprecipitación en lisados de neuronas hipocampales utilizando el anticuerpo G12 contra PrP<sup>C</sup> que reconoce la porción C-terminal de la proteína. Posteriormente, el inmunoblot se realizó con el anticuerpo Y188 para detectar si APP precipitaba con un anticuerpo contra PrP<sup>C</sup>. Efectivamente, al menos parte de la proteína APP precipita, observando una banda bajo los 63kDa y otras cercana a 35kDa.

En la parte B de la figura 17, se observa una coIP para lisados de neuronas corticales, en los carriles 1 y 2 la co-inmunoprecipitación. Esta fue realizada con el anticuerpo 5B2 que reconoce la porción N-terminal de PrP<sup>C</sup>. En los carriles 3 y se puede observar la co-inmunoprecipitación realizada con el anticuerpo G12 que reconoce la porción C-terminal de PrP<sup>C</sup>. En ambos casos se pueden apreciar el mismo patrón de bandas una menor a 63kDa y otras cercanas a 35kDa.



**Figura 18. Co-inmunoprecipitación en neuronas Hipocampales y corticales de PrP<sup>C</sup> con APP.** **A.** CoIP en lisados de neuronas hipocampales, fue utilizado el anticuerpo para PrP<sup>C</sup> G12 en la inmunoprecipitación y el western blot el anticuerpo Y188 para APP, **1:** Control, **2:** 0.5μM OS-Aβ<sub>1-40</sub>, **3:** 1μM OS-Aβ<sub>1-40</sub>. **B.** CoIP en lisados de neuronas corticales, fueron utilizados dos anticuerpos diferentes para PrP<sup>C</sup> (5B2- G12) en la inmunoprecipitación y el western blot el anticuerpo Y188 para APP. **1:** Control; **2:** 0.5μM OS-Aβ<sub>1-40</sub>, **3:** Control, **4:** 0.5μM OS-Aβ<sub>1-40</sub>.

La primera CoIP en las células CAD nativas diferenciadas se efectuó sin el tratamiento del reactivo EGS. En Figura 19-A, se muestra una CoIP en la cual la inmunoprecipitación se realizó utilizando el anticuerpo contra APP (Y188) y el inmunoblot se realizó con el anticuerpo 6D11 para PrP<sup>C</sup>. Primero, en el control sin anticuerpo, no se observan bandas y en todos los demás tratamientos se observa una banda por sobre 35kDa reconocida por el anticuerpo anti-PrP<sup>C</sup>. En la parte B de la Figura 19-B se realizó la co-inmunoprecipitación previo a un tratamiento con EGS. La inmunoprecipitación fue ejecutada con el anticuerpo contra APP (Y188) y el inmunoblot con el anticuerpo 6D11 contra PrP<sup>C</sup>. Como control para la inmunoprecipitación se realizó un western blot con el anticuerpo Y188 para APP, en los productos obtenidos. En el inmunoblot para la CoIP vemos en todas las condiciones analizadas bandas cercanas a 35kDa, salvo en los controles negativos donde no se observa nada. Para el control positivo panel inferior en la B, vemos una banda tenue sobre 35kDa y dos bandas entre 48 y 63 kDa.

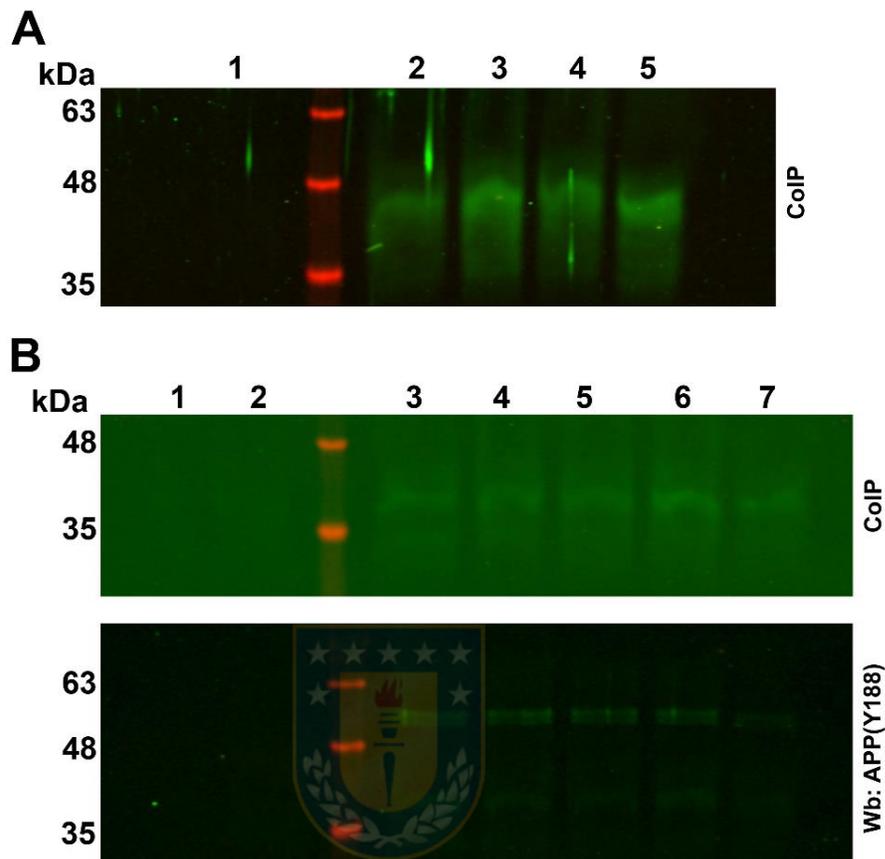
Para las líneas estables se realizó el mismo procedimiento para la CoIP que el realizado en la Figura 19 - B. Lo que se pudo observar en la línea APP-GFP en panel superior vemos bandas sobre 35kDa, menos en los controles negativos (Figura 20 - A). Para el western blot de control vemos dos bandas cercanas a un peso de 48 y 63kDa (Figura 20 – B).

Para la línea APP<sub>SWE</sub>-GFP podemos ver en la Figura 20 - B, en panel superior vemos bandas sobre 35kDa, menos en los controles negativos. Para el western blot de control vemos una banda sobre 35kDa y dos bandas entre 48 y 63 kDa.

Respecto al uso del agente EGS para unir covalentemente a las proteínas en interacción no obtuvimos diferencias significativas frente a los controles.

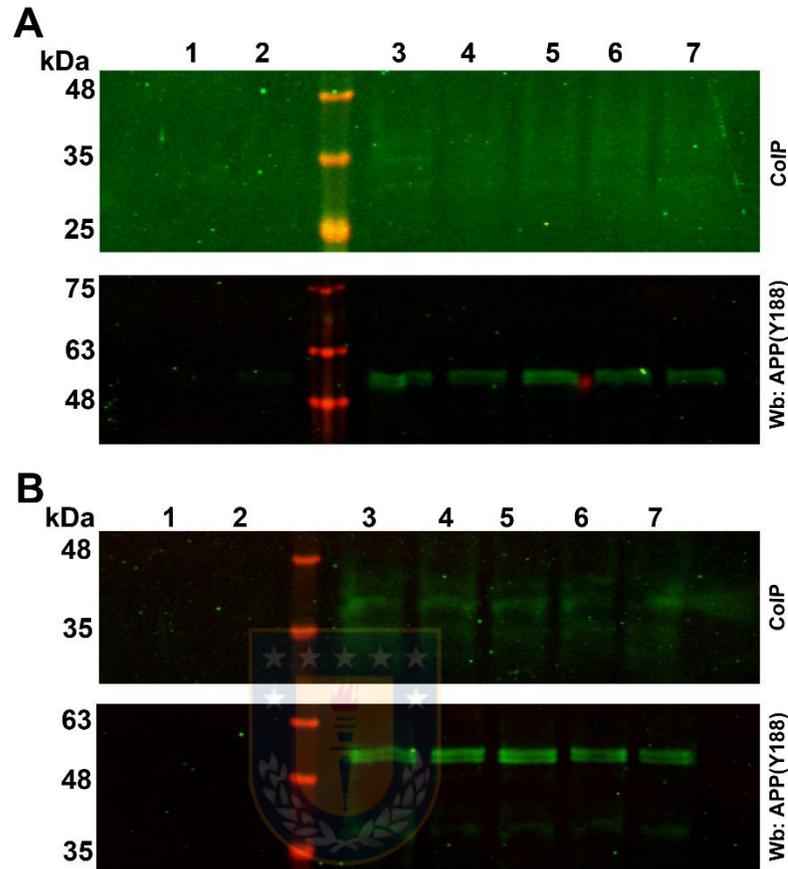
Con todos los datos obtenidos a partir de las coimmunoprecipitaciones realizadas podemos sugerir que existiría una parte de APP que interacciona con PrP<sup>C</sup>.





**Figura 19. Co- inmunoprecipitación en células CAD nativas diferenciadas.**

**A.** CoIP sin el tratamiento de EGS. **1:** Control sin anticuerpo, **2:** Control sin oligómeros A $\beta_{1-40}$ , **3:** 0.1  $\mu$ M OS-A $\beta_{1-40}$ , **4:** 0.5  $\mu$ M OS-A $\beta_{1-40}$ , **5:** 1  $\mu$ M OS-A $\beta_{1-40}$ . **B.** CoIP con el tratamiento de EGS, panel inferior muestra un western blot control con el anticuerpo Y188. **1:** Control sin lisado, **2:** Control sin anticuerpo, **3:** Control sin OS-A $\beta_{1-40}$  y sin EGS, **4:** Control sin OS-A $\beta_{1-40}$ . **5:** 0.1  $\mu$ M OS-A $\beta_{1-40}$ , **6:** 0.5  $\mu$ M OS-A $\beta_{1-40}$ , **7:** 1  $\mu$ M OS-A $\beta_{1-40}$ . Para ambas inmunoprecipitaciones fue utilizado el anticuerpo para APP Y188 y el western blot el anticuerpo para PrP<sup>C</sup> 6D11.



**Figura 20. Co-inmunoprecipitación en las líneas estables APP-GFP y APP<sub>SWE</sub>-GFP diferenciadas. A.** CoIP para la línea APP-GFP con el tratamiento de EGS. **B.** CoIP para la línea APP<sub>SWE</sub>-GFP con el tratamiento de EGS. **1:** Control sin lisado, **2:** Control sin anticuerpo, **3:** Control sin OS-A $\beta$ <sub>1-40</sub> y sin EGS, **4:** Control sin OS-A $\beta$ <sub>1-40</sub>, **5:** 0.1 $\mu$ M OS-A $\beta$ <sub>1-40</sub>, **6:** 0.5 $\mu$ M OS-A $\beta$ <sub>1-40</sub>, **7:** 1 $\mu$ M OS-A $\beta$ <sub>1-40</sub>. Para ambas CoIP fue utilizado el anticuerpo para APP Y188 en la inmunoprecipitación y para el western blot el anticuerpo para PrP<sup>C</sup> 6D11. Como control se realizó a los productos de las CoIP un inmunoblot con el anticuerpo Y188.

## DISCUSIÓN

En los últimos años el rol de la proteína priónica celular en la enfermedad de Alzheimer ha resultado de gran interés existiendo una diversidad de estudios. Como esta proteína no presenta sitios transmembrana se ha estudiado su interacción con otras proteínas para mediar fenómenos fisiológicos como patológicos, con esa idea se han reportado en estudios del interactoma de PrP<sup>C</sup> que interactúa con la proteína precursora amiloide la cual tiene un rol fundamental en esta enfermedad. A lo largo de la literatura, solo un reporte existe de una co-inmunoprecipitación de ambas proteínas en la línea celular N2a [Kaiser *et al.*, 2012].

Este trabajo tuvo como objetivo principal indagar en la interacción PrP<sup>C</sup>-APP. La primera estrategia abordada fue un enfoque bioinformático para lo cual se realizaron diferentes docking proteína-proteína para los dominios más importantes de APP y la porción C-terminal de PrP<sup>C</sup>. Para la proteína APP no existe hasta la fecha una estructura cristalizada que tenga una cobertura total de la proteína y sólo están disponibles fragmentos o dominios principales, e incluso existen zonas para las cuales no hay estructuras disponibles. Esto impidió que las predicciones de docking se hayan realizado con la estructura completa del APP. Se analizaron todas las estructuras descritas en el Uniprot para APP humano y fueron seleccionadas cuatro que representaban cobertura para los principales dominios que se utilizaron para todos los análisis (Figura 2)

En este primer estudio se realizaron filtros de selección para identificar los principales residuos de la interfase que participan en la interacción. El dominio E2 de APP a través de la estructura 3NLY fue el dominio para el cual se centraron los análisis, desde este complejo 3NLY-1QM2 se encontraron el mayor número de pares de residuos en interacción en la interfase llegando a doce. Además, este tuvo valores energéticos favorables para la generación de la interacción y es la interacción que tiene más sentido biológico debido a que se localiza en la porción extracelular al igual que PrP<sup>C</sup>. La combinación de los datos generados requiere una validación o respaldo biológico. Esto queda de manifiesto al analizar lo que ocurre con el dominio intracelular de APP y la formación del complejo 2LP1-1QM2 que si bien fue la que obtuvo mejores parámetros energéticos y fueron obtenidos 11 pares de residuos, hasta el momento no existe un sustento biológico o literatura que lo reporte, además de su localización celular, por lo cual se evaluó su comportamiento ya que la estructura 2LP1 es la más pequeña de todas las analizadas por lo que en el docking tiene más posibilidades de arrojar resultados favorables.

Como todos los docking realizados tuvieron valores favorables cabe hacer una discriminación en razón a su sentido biológico en conjunto a los datos que logramos obtener en el laboratorio a través de las coimmunoprecipitaciones. El dominio E1 a través de la estructura 4PWQ, para el cual se logró identificar 7 pares de residuos que estarían interactuando en la cara interfacial del complejo formado con PrP<sup>C</sup>. Si bien los parámetros energéticos obtenidos desde el docking

resultaron favorables para el dominio E1 no existen evidencias biológicas que den sustento a la interacción entre PrP<sup>C</sup> con este dominio sin que APP sea cortado proteolíticamente por los diferentes sitios de corte que se ubican corriente abajo que se pueden generar en APP [Yuksel and Tacal, 2019]. Para el dominio Kunitz (1AAP), este complejo también presentó valores favorables para beneficiar interacción con PrP<sup>C</sup>, pero de momento no existen valoraciones biológicas que den importancia a la interacción de este dominio de APP con la proteína priónica celular.

En términos generales a lo largo de las 4 estructuras analizadas de APP con PrP<sup>C</sup>, todos los complejos tuvieron valores propicios para la generación de interacciones, esto se vio corroborado al encontrar 35 pares de residuos que participan en la interfase de los complejos de interacción a lo largo de toda la estructura de APP. Además, con los filtros de selección aplicado estas parejas de residuos cuentan con altas probabilidades de interacción e índices energéticos favorables. Con estos datos, se puede generar una matriz de estudio a posterior, para determinar la influencia de estos residuos interfaciales y como estarían afectando la interacción en determinado momento para favorecer o mediar funciones en un contexto tanto fisiológico como patológico.

Estrategias similares de docking proteína-proteína son usadas rutinariamente para evaluar nuevas moléculas como potenciales blancos terapéuticos para enfermedades. Al ser de fácil acceso y con rápida obtención de resultados que sirven para complementar y armar una plataforma para estrategias

experimentales en el estudio de interacción proteína- proteína [Kaczor *et al.*, 2018].

Los resultados *insilico* muestran que el dominio E2 sería la región con mejores parámetros para la interacción, esto se relaciona con que este dominio media la interacción con heparán sulfato proteoglicanos anclados a membrana(HSPGs) [Reinhard *et al.*, 2013], por ello nuestros resultados resultan viables para que la interacción de PrP<sup>C</sup> ocurriera a través del dominio E2 de APP.

Como modelo de estudio fue utilizado la línea celular CAD, la cual al privarlas de suero desarrollan un fenotipo neuronal el cual está ampliamente categorizado como un modelo de estudio para el sistema nervioso [Li *et al.*, 2007]. En este modelo se logró colocalizar PrP<sup>C</sup> y APP bajo cuatro condiciones experimentales diferentes, una como control y tres representaban tratamientos con oligómeros solubles del péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub>. A través de los índices de Pearson y Manders M1-M2 pudimos corroborar la colocalización con un alto rango de precisión. Todos los índices estudiados arrojaron un alto porcentaje de colocación de ambas proteínas, además los tratamientos con OS-A $\beta$ <sub>1-40</sub> no arrojaron diferencias significativas respecto al control tampoco entre ellas. Además, se verificó esta colocalización positiva con dos anticuerpos diferentes para PrP<sup>C</sup> obteniendo resultados similares entre ambos sin diferencias detectables.

Para generar modelos tipo Alzheimer en estas células, fueron generadas dos líneas que establemente sobreexpresaban APP nativa y APP con la mutación de Swedish que es ampliamente usada para estudios de Alzheimer familiar. Con

estas herramientas se realizaron ensayo de coimmunoprecipitación. Pudimos indagar sobre la interacción PrP<sup>C</sup> y APP, pero obtención de un fragmento de aproximadamente 55kDa genera dudas respecto a su identidad. En la literatura existe un solo reporte de Huttunen *et al.* 2009, el cual en la línea celular AC29 se pudo registrar un nuevo sitio de corte proteolítico para APP vía esterol dependiente, el que ocurre después del ácido glutámico 281 generando un fragmento de 55kDa. Este proceso estaría ocurriendo además después de que APP es internalizado [Huttunen *et al.*, 2009]. Para reforzar los experimentos presentados en este trabajo faltó desarrollar experimentos de biotilación de proteínas para asegurar que esta interacción ocurre solamente en la membrana, de momento este corte parece la única alternativa a los resultados obtenidos que estaría ocurriendo durante el proceso de coimmunoprecipitación. Además, destacar que este fragmento solo fue identificado con un anticuerpo para APP para C-terminal tal cual como el que fue usado en el presente trabajo (Y188) [Huttunen *et al.*, 2009].

De momento con los resultados de las COIP no tenemos certezas del origen del cambio en peso molecular para la proteína precursora amiloide, podemos presumir que la disminución en el tamaño se debería a un corte proteolítico para esta proteína o algo en el procesamiento con la matriz usada para la inmuprecipitación.

Con todo lo analizado tanto *in silico* como en los análisis experimentales podemos sugerir que ambas proteínas, APP y PrP<sup>C</sup>, interaccionan entre sí. Sin embargo,

no se observa un efecto directo de los oligómeros solubles de A $\beta$  ni sobre la colocalización, ni tampoco la co-inmunoprecipitación, por lo que existe una baja probabilidad que APP sea el transductor de señales recibidas por PrP<sup>C</sup> en respuesta a A $\beta$  oligomérico. A pesar de esto, y como perspectiva, nos parece importante destacar que, si se llega a corroborar que ambas proteínas interaccionan, sería relevante definir el rol celular de esta interacción, lo que queda como pregunta abierta para futuras investigaciones.



## CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

En esta tesis fueron mostradas evidencias tanto bioinformáticas como biológicas para la interacción de PrP<sup>C</sup> y APP. A través de ensayos de bioinformática se pudo corroborar que a través de toda la estructura de APP existen residuos que pueden interactuar con la proteína priónica celular. Estos resultados serán fundamentales para estudios a posterior para lograr determinar cuánto influyen estos residuos en un contexto experimental, quedaría a posterior realizar ensayos de mutagénesis sitio dirigida para determinar cuán importante serían para la interacción estos residuos. Además, faltaría poder definir que el fragmento de 55kDa es efectivamente un artefacto que ocurre por algunos de los componentes usados en la matriz de la proteína G usada en estos ensayos, para ello la realización de ensayos con biotilación de proteínas sería importante evaluar a futuro. Además, poder tomar estos complejos generados en las COIP y realizar estudios de espectrometría de masas para poder definir la identidad de este fragmento de 55kDa sería un punto realmente interesante para estudios a posterior.

Por otro lado, todos los antecedentes experimentales obtenidos sirven como base para otro tipo de experimentos que generen resultados más robustos para demostrar la interacción de PrP<sup>C</sup>- APP.

## REFERENCIAS

1. Acevedo-Morantes CY, Wille H. 2014. The structure of human prions: From biology to structural models — considerations and pitfalls. *Viruses* 6(10):3875–3892.
2. Aguzzi A, Connor TO. 2010. Protein aggregation diseases : pathogenicity and therapeutic perspectives. <https://doi.org/10.1038/nrd3050>.
3. Andreeva T V., Lukiw WJ, Rogaev EI. 2017. Biological basis for amyloidogenesis in Alzheimer'S disease. *Biochem* 82(2):122–139.
4. Bai Y, Markham K, Chen F, Weerasekera R, Watts J, Horne P, Wakutani Y, Bagshaw R, Mathews PM, Fraser PE, Westaway D, George-Hyslop P St., Schmitt-Ulms G. 2008. The in Vivo Brain Interactome of the Amyloid Precursor Protein . *Mol Cell Proteomics* 7(1):15–34.
5. Barrett PJ, Song Y, Horn WD Van, Hustedt EJ, Schafer JM, Hadziselimovic A, Beel AJ, Sanders CR. 2012. The amyloid precursor protein has a flexible transmembrane domain and binds cholesterol. *Science* (80- ) 336(6085):1168–1171.
6. Biasini E, Turnbaugh JA, Unterberger U, Harris DA. 2012. Prion protein at the crossroads of physiology and disease. *Trends Neurosci* 35(2):92–103.
7. Bolton DC, McKinley MP, S.B. P. 1982. specific relation between this protein and the infectious particle.'For this reason,. *Sci Mag* 218(December):1309–1311.

8. Bove-Fenderson E, Urano R, Straub JE, Harris DA. 2017. Cellular prion protein targets amyloid- $\beta$  fibril ends via its C-terminal domain to prevent elongation. *J Biol Chem* 292(41):16858–16871.
9. Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA. 2010. Alzheimer Disease. *YMDA* 56(9):484–546.
10. Castle AR, Gill AC. 2017. Physiological functions of the cellular prion protein. *Front Mol Biosci* 4(APR):1–25.
11. Chen G, Xu T, Yan Y, Zhou Y, Jiang Y, Melcher K, Xu HE. 2017. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Nat Publ Gr* 38(9):1205–1235.
12. Chu D, Liu F. 2019. Pathological changes of tau related to Alzheimer's disease. *ACS Chem Neurosci* 10(2):931–944.
13. Contestabile A. 2011. The history of the cholinergic hypothesis. *Behav Brain Res* 221(2):334–340.
14. Dawkins E, Small DH. 2014. Insights into the physiological function of the  $\beta$ -amyloid precursor protein: Beyond Alzheimer's disease. *J Neurochem* 129(5):756–769.
15. Deyts C, Thinakaran G, Parent AT. 2016. APP Receptor? To Be or Not to Be. *Trends Pharmacol Sci* 37(5):390–411.
16. Echeverria V, Berman D, Arancio O. 2007. Oligomers of  $\beta$ -Amyloid Peptide Inhibit BDNF-Induced Arc Expression in Cultured Cortical Neurons. *Curr Alzheimer Res* 4(5):518–521.

17. Freir DB, Nicoll AJ, Klyubin I, Panico S, Mc Donald JM, Risse E, Asante EA, Farrow MA, Sessions RB, Saibil HR, Clarke AR, Rowan MJ, Walsh DM, Collinge J. 2011. Interaction between prion protein and toxic amyloid  $\beta$  assemblies can be therapeutically targeted at multiple sites. *Nat Commun* 2(1).
18. Goedert M, Eisenberg DS, Crowther RA. 2017. Propagation of Tau Aggregates and Neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci* 40(1):189–210.
19. Griffith JS. 1967. Self-replication and scrapie. *Nature* 216:615–616.
20. H.Bühler, M.Fischer, Y.Lang, H.Bluethmann, H.P.Lipps, S.J.DeArmond, S.B.Prusiner, M.aguet and CW, Büeler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp H-P, Dearmond SJ, Prusiner SB, Aguet M, Weissmann C. 1992. Normal behaviour of mice lacking the neuronal cell-surfacePrP protein. *Nature* 359:150–152.
21. Hardy JA, Higgins GA. 1992. Alzheimer ' s Disease : The Amyloid Cascade Hypothesis 256(5054):3–4.
22. Harris DA, True HL. 2006. New Insights into Prion Structure and Toxicity Minireview 353–357.
23. Hirsch TZ, Martin-Lannerée S, Mouillet-Richard S. 2017. Functions of the Prion Protein. *Prog Mol Biol Transl Sci* 150:1–34.
24. Hoefgen S, Dahms SO, Oertwig K, Than ME. 2014. The amyloid precursor protein shows a pH-dependent conformational switch in its E1 domain. *J Mol Biol* 427(2):433–442.

25. Huttunen HJ, Puglielli L, Ellis BC, MacKenzie Ingano LA, Kovacs DM. 2009. Novel N-terminal cleavage of APP precludes A $\beta$  generation in ACAT-defective AC29 cells. *J Mol Neurosci* 37(1):6–15.
26. Hynes TR, Randal M, Kennedy LA, Eigenbrot C, Kossiakoff AA, Hynes TR, Randal M, Kennedy LA, Eigenbrot C, Kossiakoff AA. 1990. X-ray Crystal Structure of the Protease Inhibitor Domain of Alzheimer's Amyloid  $\beta$ -Protein Precursor. *Biochemistry* 29(43):10018–10022.
27. Jo S, Vargyas M, Vasko-Szedlar J, Roux B, Im W. 2008. PBEQ-Solver for online visualization of electrostatic potential of biomolecules. *Nucleic Acids Res* 36(Web Server issue):270–275.
28. Kaczor AA, Bartuzi D, Stępniewski TM, Matosiuk D, Selent J. 2018. Protein–protein docking in drug design and discovery. *Methods Mol Biol* 1762:285–305.
29. Kaiser DM, Acharya M, Leighton PLA, Wang H, Daude N, Wohlgemuth S, Shi B, Allison WT. 2012. Amyloid Beta Precursor Protein and Prion Protein Have a Conserved Interaction Affecting Cell Adhesion and CNS Development 7(12).
30. Katsnelson A, Strooper B De, Zoghbi HY. 2016. Neurodegeneration: From cellular concepts to clinical applications. *Sci Transl Med* 8(364):1–6.
31. Küffer A, Lakkaraju AKK, Mogha A, Petersen SC, Airich K, Doucerain C, Marpakwar R, Bakirci P, Senatore A, Monnard A, Schiavi C, Nuvolone M, Grosshans B, Hornemann S, Bassilana F, Monk KR, Aguzzi A. 2016. The prion protein is an agonistic ligand of the G protein-coupled receptor Adgrg6.

Nature 536(7617):464–468.

32. Li Y, Hou LX, Aktiv A, Dahlström A. 2005. Immunohistochemical characterisation of differentiated CAD cells: Expression of peptides and chromogranins. *Histochem Cell Biol* 124(1):25–33.
33. Li Y, Hou LX, Aktiv A, Dahlström A. 2007. Studies of the central nervous system-derived CAD cell line, a suitable model for intraneuronal transport studies? *J Neurosci Res* 85(12):2601–2609.
34. Lipton MS, Pasa-Tolic L. 2009. Chemical Cross-Linking for Protein–Protein Interaction Studies. *Methods Mol Biol* 492:283–293.
35. Llorens F, Carulla P, Villa A, Torres JM, Fortes P, Ferrer I, Río JA Del. 2013. PrPC regulates epidermal growth factor receptor function and cell shape dynamics in Neuro2a cells. *J Neurochem* 127(1):124–138.
36. Lopes MH, Hajj GNM, Muras AG, Mancini GL, Castro RMPS, Ribeiro KCB, Brentani RR, Linden R, Martins VR. 2005. Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. *J Neurosci* 25(49):11330–11339.
37. Málaga-Trillo E, Ochs K. 2016. Uncontrolled SFK-mediated protein trafficking in prion and Alzheimer's disease. *Prion* 10(5):352–361.
38. Mangé A, Béranger F, Peoc'h K, Onodera T, Frobert Y, Lehmann S. 2004. Alpha- and beta- cleavages of the amino-terminus of the cellular prion protein. *Biol Cell* 96(2):125–132.
39. Manson JC, Clarke AR, Hooper ML, Aitchison L, McConnell I, Hope J. 1994.

- 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol* 8(2–3):121–127.
40. Mehrpour M, Codogno P. 2010. Prion protein: From physiology to cancer biology. *Cancer Lett* 290(1):1–23.
41. Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L. 1992. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of  $\beta$ -amyloid. *Nat Genet* 1(5):345–347.
42. Negi SS, Schein CH, Oezguen N, Power TD, Braun W. 2007. InterProSurf: A web server for predicting interacting sites on protein surfaces. *Bioinformatics* 23(24):3397–3399.
43. Nieznanski K, Surewicz K, Chen S, Nieznanska H, Surewicz WK. 2014. Interaction between prion protein and A $\beta$  amyloid fibrils revisited. *ACS Chem Neurosci* 5(5):340–345.
44. Nygaard HB. 2018. Targeting Fyn Kinase in Alzheimer's Disease. *Biol Psychiatry* 83(4):369–376.
45. 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. 2020. Changes in PGC-1 $\alpha$ /SIRT1 Signaling Impact on Mitochondrial Homeostasis in Amyloid-Beta Peptide Toxicity Model. *Front Pharmacol* 11(May):1–17.
46. Parkin ET, Watt NT, Hussain I, Eckman EA, Eckman CB, Manson JC, Baybutt HN, Turner AJ, Hooper NM. 2007. Cellular prion protein regulates beta-

- secretase cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci* 104(26):11062–11067.
47. Peters C, Espinoza MP, Gallegos S, Opazo C, Aguayo LG. 2015. Alzheimer's A $\beta$  interacts with cellular prion protein inducing neuronal membrane damage and synaptotoxicity. *Neurobiol Aging* 36(3):1369–1377.
48. Peters PJ, Mironov A, Peretz D, Donselaar E Van, Leclerc E, Erpel S, DeArmond SJ, Burton DR, Williamson RA, Vey M, Prusiner SB. 2003. Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. *J Cell Biol* 162(4):703–717.
49. Prusiner SB. 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* (80- ) 216(4542):136–144.
50. Puig B, Altmeyden H, Glatzel M. 2014. The GPI-anchoring of PrP Implications in sorting and pathogenesis. *Prion* 8(1).
51. Reinhard C, Borgers M, David G, Strooper B De. 2013. Soluble amyloid- $\beta$  precursor protein binds its cell surface receptor in a cooperative fashion with glypican and syndecan proteoglycans. *J Cell Sci* 126(21):4856–4861.
52. Riesner D. 2003. Biochemistry and structure of PrP C and PrP Sc (ii):21–33.
53. Rodríguez-Martín T, Cuchillo-Ibáñez I, Noble W, Nyenya F, Anderton BH, Hanger DP. 2013. Tau phosphorylation affects its axonal transport and degradation. *Neurobiol Aging* 34(9):2146–2157.
54. Sakaguchi S, Katamine S, Nishida N, Moriuchi R, Shigematsu K, Sugimoto T, Nakatani A, Kataoka Y, Houtani T, Shirabe S, Okada H, Hasegawa S,

- Miyamoto T, Noda T. 1996. *Nature*.
55. Sakudo A, Lee DC, Nakamura I, Taniuchi Y, Saeki K, Matsumoto Y, Itohara S, Ikuta K, Onodera T. 2005. Cell-autonomous PrP-Doppel interaction regulates apoptosis in PrP gene-deficient neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 333(2):448–454.
56. Salzano G, Giachin G, Legname G. 2019. Structural Consequences of Copper Binding to the Prion Protein. *Cells* 8(8):770.
57. Sanders DW, Kaufman SK, DeVos SL, Sharma AM, Mirbaha H, Li A, Barker SJ, Foley AC, Thorpe JR, Serpell LC, Miller TM, Grinberg LT, Seeley WW, Diamond MI. 2014. Distinct tau prion strains propagate in cells and mice and define different tauopathies. *Neuron* 82(6):1271–1288.
58. Santuccione A, Sytnyk V, Leshchynska I, Schachner M. 2005. Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59<sup>fyn</sup> and to enhance neurite outgrowth. *J Cell Biol* 169(2):341–354.
59. Sarnataro D, Pepe A, Zurzolo C. 2017. Cell Biology of Prion Protein. *Prog Mol Biol Transl Sci* 150(February):57–82.
60. Schmitt-Ulms G, Legname G, Baldwin MA, Ball HL, Bradon N, Bosque PJ, Crossin KL, Edelman GM, DeArmond SJ, Cohen FE, Prusiner SB. 2001. Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein. *J Mol Biol* 314(5):1209–1225.
61. Selkoe DJ. 2018. Alzheimer ' s Disease : Genes , Proteins , and Therapy 81(2):741–766.

62. Shin J, Yu S-B, Yu UY, Jo SA, Ahn J-H. 2010. Swedish mutation within amyloid precursor protein modulates global gene expression towards the pathogenesis of Alzheimer ' s disease.
63. Smith LM, Strittmatter SM. 2017. Binding sites for amyloid- $\beta$  oligomers and synaptic toxicity. *Cold Spring Harb Perspect Med* 7(5).
64. Soto, Estrada. 2008. Protein misfolding and neurodegeneration. *Arch Neurol* 65(2):184–189.
65. Spagnolli G, Rigoli M, Novi Inverardi G, Codeseira YB, Biasini E, Requena JR. 2020. Modeling PrPSc Generation Through Deformed Templating. *Front Bioeng Biotechnol* 8(October):1–11.
66. Taylor DR, Hooper NM. 2006. The prion protein and lipid rafts (Review). *Mol Membr Biol* 23(1):89–99.
67. Ulbrich S, Janning P, Seidel R, Matschke J, Gonsberg A, Jung S, Glatzel M, Engelhard M, Winklhofer KF, Tatzelt J. 2018. Alterations in the brain interactome of the intrinsically disordered N-terminal domain of the cellular prion protein (PrPC) in Alzheimer's disease. *PLoS One* 13(5):1–15.
68. Um JW, Kaufman AC, Kostylev M, Heiss JK, Stagi M, Takahashi H, Kerrisk ME, Vortmeyer A, Wisniewski T, Koleske AJ, Gunther EC, Nygaard HB, Strittmatter SM. 2013. Metabotropic Glutamate Receptor 5 Is a Coreceptor for Alzheimer A $\beta$  Oligomer Bound to Cellular Prion Protein. *Neuron* 79(5):887–902.
69. Vincent B, Paitel E, Saftig P, Frobert Y, Hartmann D, Strooper B De, Grassi J,

- Lopez-Perez E, Checler F. 2001. The Disintegrins ADAM10 and TACE Contribute to the Constitutive and Phorbol Ester-regulated Normal Cleavage of the Cellular Prion Protein. *J Biol Chem* 276(41):37743–37746.
70. Wang Y, Ha Y. 2004. The X-ray structure of an antiparallel dimer of the human amyloid precursor protein E2 domain. *Mol Cell* 15(3):343–353.
71. Westaway D, Daude N, Wohlgemuth S, Harrison P. 2011. The PrP-Like Proteins Shadoo and Doppel David. *Pept Mater* 310(June 2011):1–26.
72. Wilkins HM, Swerdlow RH. 2017. Amyloid precursor protein processing and bioenergetics. *Brain Res Bull* 133:71–79.
73. Xue LC, Rodrigues JP, Kastritis PL, Bonvin AM, Vangone A. 2016. PRODIGY: A web server for predicting the binding affinity of protein-protein complexes. *Bioinformatics* 32(23):3676–3678.
74. Yuksel M, Tacal O. 2019. Trafficking and proteolytic processing of amyloid precursor protein and secretases in Alzheimer's disease development: An up-to-date review. *Eur J Pharmacol* 856(May):172415.
75. Zahn R, Liu A, Lührs T, Riek R, Schroetter C Von, Garcia FL, Billeter M, Calzolari L, Wider G, Wüthrich K. 2000. NMR solution structure of the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(1):145–150.
76. Zeng F, Watt NT, Walmsley AR, Hooper NM. 2003. Tethering the N-terminus of the prion protein compromises the cellular response to oxidative stress. *J Neurochem* 84(3):480–490.

## ANEXOS

### Anexo 1. Selección de pares de residuos en interacción para complejo

1QM2-4PWQ. Valores de InterProSurf, en rojo los residuos fueron elegidos.

PrP <sup>c</sup> (1QM2)			Dominio E1(4PWQ), cadena A			Dominio E1(4PWQ), cadena B		
Número residuo	área complejo	Código residuos	Número residuo	área complejo	Código residuos	Número residuo	área complejo	Código residuos
129	88.38	MET	60	73.94	LYS	30	4.16	ALA
130	74.36	LEU	65	52.29	THR	31	23.14	GLU
132	28.58	SER	67	30.26	GLU	32	0.94	PRO
133	7.22	ALA	70	2.03	LEU	33	5.24	GLN
134	0.00	MET	71	35.02	GLN	45	0.61	MET
135	15.13	SER	74	31.82	GLN	47	61.52	VAL
137	7.08	PRO	75	61.64	GLU	50	4.02	GLY
138	36.36	ILE	78	67.52	PRO	51	116.50	LYS
159	36.47	ASN	81	36.60	GLN	80	15.57	LEU
160	53.20	GLN	83	33.69	THR	118	3.59	LEU
166	31.98	MET	121	85.89	GLU	119	4.13	VAL
167	68.55	ASP	122	22.43	PHE	120	12.39	GLY
168	46.52	GLU	123	108.96	VAL	121	98.73	GLU
169	62.33	TYR	124	25.29	SER	122	19.35	PHE
170	37.10	SER	137	54.08	HIS	123	8.88	VAL
212	37.64	GLN	139	54.55	GLU	124	18.07	SER
215	41.22	ILE	141	38.50	MET	125	49.63	ASP
216	0.00	THR	144	19.40	CYS	126	60.84	ALA
219	46.99	GLU	171	14.30	LEU	127	13.03	LEU
220	35.19	ARG	172	0.57	LEU	128	57.75	LEU
223	59.78	GLN	173	5.51	PRO	135	48.70	PHE
224	30.92	ALA	174	0.00	CYS	137	49.25	HIS
225	34.76	TYR	175	11.17	GLY	141	83.83	MET
226	111.56	TYR	176	32.74	ILE	166	75.46	HIS
227	51.54	GLN	180	10.86	ARG	171	15.97	LEU
228	12.82	ARG				172	39.87	LEU

## Anexo 2. Selección de pares de residuos en interacción para complejo

1QM2-1AAP. Valores de InterProSurf, en rojo los residuos fueron elegidos.

PrP <sup>c</sup> (1QM2)			Dominio Kunitz (1AAP)		
Numero residuo	área complejo	Código residuos	Numero residuo	área complejo	Código residuos
2	144.65	ARG	125	64.41	LEU
6	14.72	SER	126	31.68	GLY
7	38.47	GLU	127	51.45	GLY
8	11.30	GLN	128	19.17	TYR
9	15.82	ALA	129	46.85	MET
10	21.48	GLU	130	13.00	LEU
11	17.95	THR	155	98.95	HIS
15	204.44	ARG	156	72.87	ARG
16	5.59	ALA	158	0.06	PRO
17	12.60	MET	159	26.73	ASN
18	44.69	ILE	162	0.16	TYR
19	0.50	SER	186	17.72	GLN
21	0.14	TRP	187	0.05	HIS
25	34.07	VAL	190	11.26	THR
26	114.53	THR	191	0.88	THR
29	79.92	LYS	193	39.08	THR
32	5.27	PRO	194	85.35	LYS
33	7.93	PHE			
34	0.00	PHE			
46	72.97	ASP			
47	33.04	THR			
48	23.88	GLU			
49	122.49	GLU			
2	141.60	ARG			
6	12.52	SER			
7	36.02	GLU			
8	12.46	GLN			
9	18.20	ALA			
10	19.55	GLU			
25	25.01	VAL			
26	44.24	THR			
27	93.30	GLU			

### Anexo 3. Selección de pares de residuos en interacción para complejo

1QM2- 2LP1. Valores de InterProSurf, en rojo los residuos fueron elegidos.

PrP <sup>c</sup> (1QM2)			Dominio intracelular (2LP1)		
Numero residuo	área complejo	Código residuos	Numero residuo	área complejo	Código residuos
2	144.65	ARG	125	64.41	LEU
6	14.72	SER	126	31.68	GLY
7	38.47	GLU	127	51.45	GLY
8	11.30	GLN	128	19.17	TYR
9	15.82	ALA	129	46.85	MET
10	21.48	GLU	130	13.00	LEU
11	17.95	THR	155	98.95	HIS
15	204.44	ARG	156	72.87	ARG
16	5.59	ALA	158	0.06	PRO
17	12.60	MET	159	26.73	ASN
18	44.69	ILE	162	0.16	TYR
19	0.50	SER	186	17.72	GLN
21	0.14	TRP	187	0.05	HIS
25	34.07	VAL	190	11.26	THR
26	114.53	THR	191	0.88	THR
29	79.92	LYS	193	39.08	THR
32	5.27	PRO	194	85.35	LYS
33	7.93	PHE			
34	0.00	PHE			
46	72.97	ASP			
47	33.04	THR			
48	23.88	GLU			
49	122.49	GLU			
2	141.60	ARG			
6	12.52	SER			
7	36.02	GLU			
8	12.46	GLN			
9	18.20	ALA			
10	19.55	GLU			
25	25.01	VAL			
26	44.24	THR			

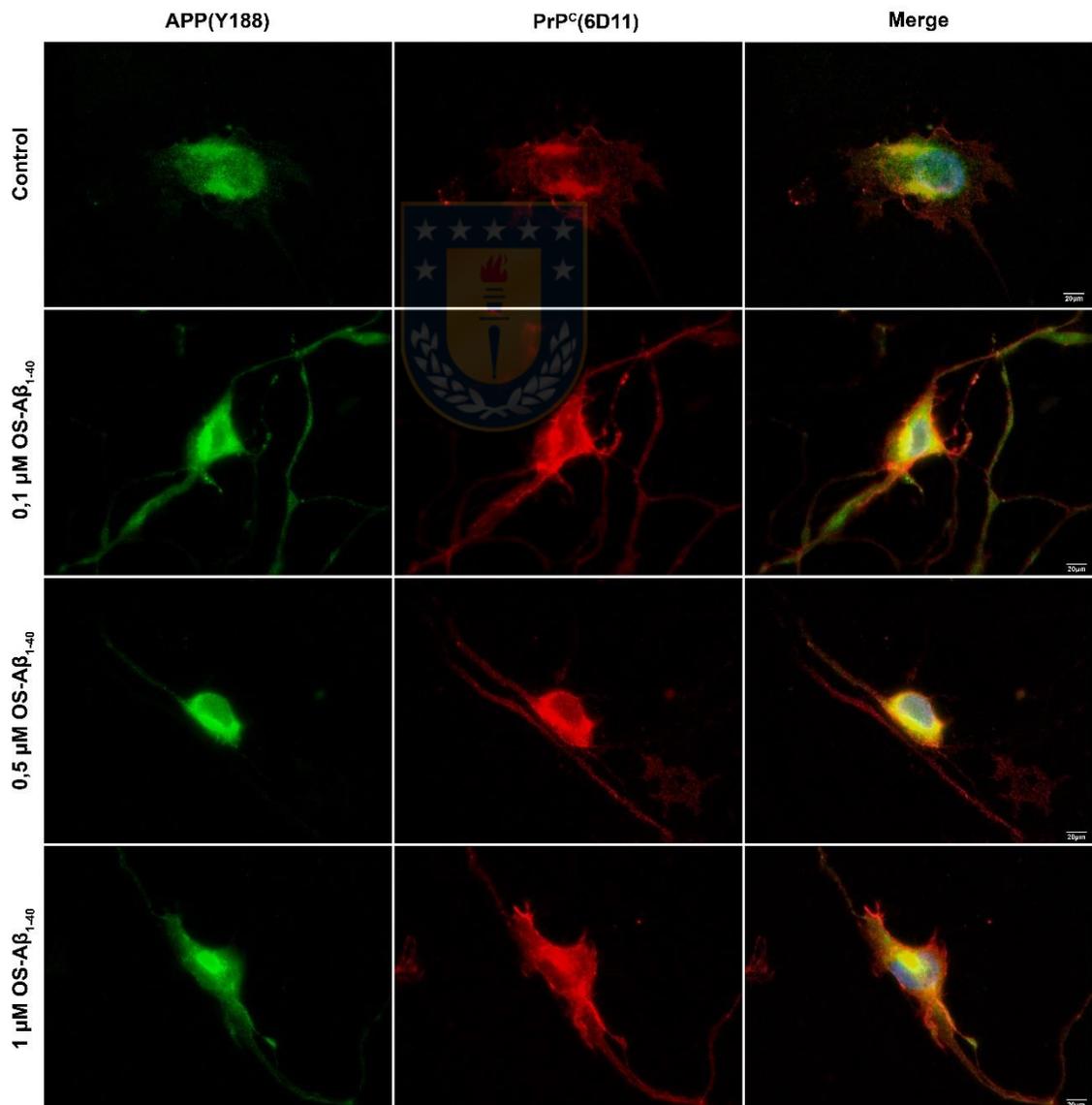
27	93.30	GLU
----	-------	-----

**Anexo 4. Resumen de pares de aminoácidos en interacción para los cuatro complejos realizados entre PrP<sup>C</sup>-APP.**

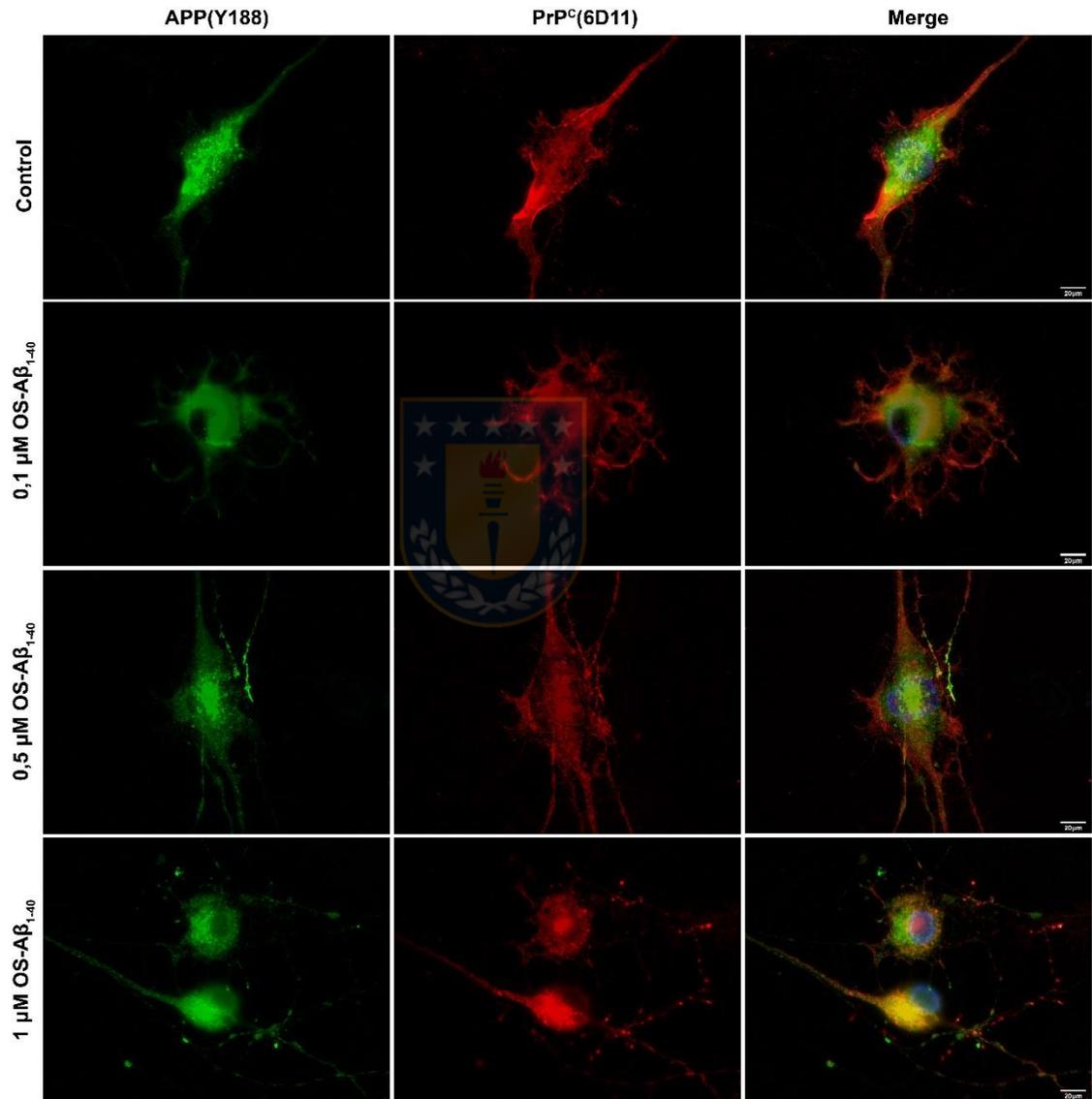
<b>APP (4PWQ) - PrP<sup>C</sup> (1QM2)</b>		<b>APP (2LP1) - PrP<sup>C</sup> (1QM2)</b>	
GLU 121 A	GLN 160 P	VAL 683	SER 132
LYS 51 B	GLU 168 P	VAL 683	ALA 224
GLU 121 B	TYR 226 P	HIS 685	SER 132
GLU 121 B	GLN 227 P	GLN 686	SER 135
LEU 128 B	MET 129 P	VAL 689	SER 135
LEU 128 B	LEU 130 P	MET 706	LYS 194
HIS 166 B	MET 129 P	VAL 715	MET 129
		MET 722	MET 129
<b>APP (3NLY) - PrP<sup>C</sup> (1QM2)</b>		MET 722	LEU 125
PHE 493	ASP 144	MET 722	GLY 127
MET 512	ASP 144	MET 722	GLY 126
MET 512	HIS 140		
THR 513	HIS 140		
ARG 516	HIS 140	<b>APP (1AAP) - PrP<sup>C</sup> (1QM2)</b>	
PRO 533	GLN 227	ARG 15	ARG 156
SER 527	THR 216	ARG 15	HIS 155
TYR 530	GLN 223	GLU 49	MET 129
TYR 530	GLN 227	LYS 29	LEU 125
ASN 531	GLN 227	THR 26	LYS 194
GLN 540	SER 132		
LEU 547	HIS 155		

**Anexo 5. Colocalización PrP<sup>C</sup> y APP en células CAD diferenciadas tratadas con oligómeros solubles del péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> (OS-A $\beta$ <sub>1-40</sub>). Con el anticuerpo 6D11 para la región N-terminal de PrP<sup>C</sup>. A y B. Representan experimentos independientes.**

**A.**

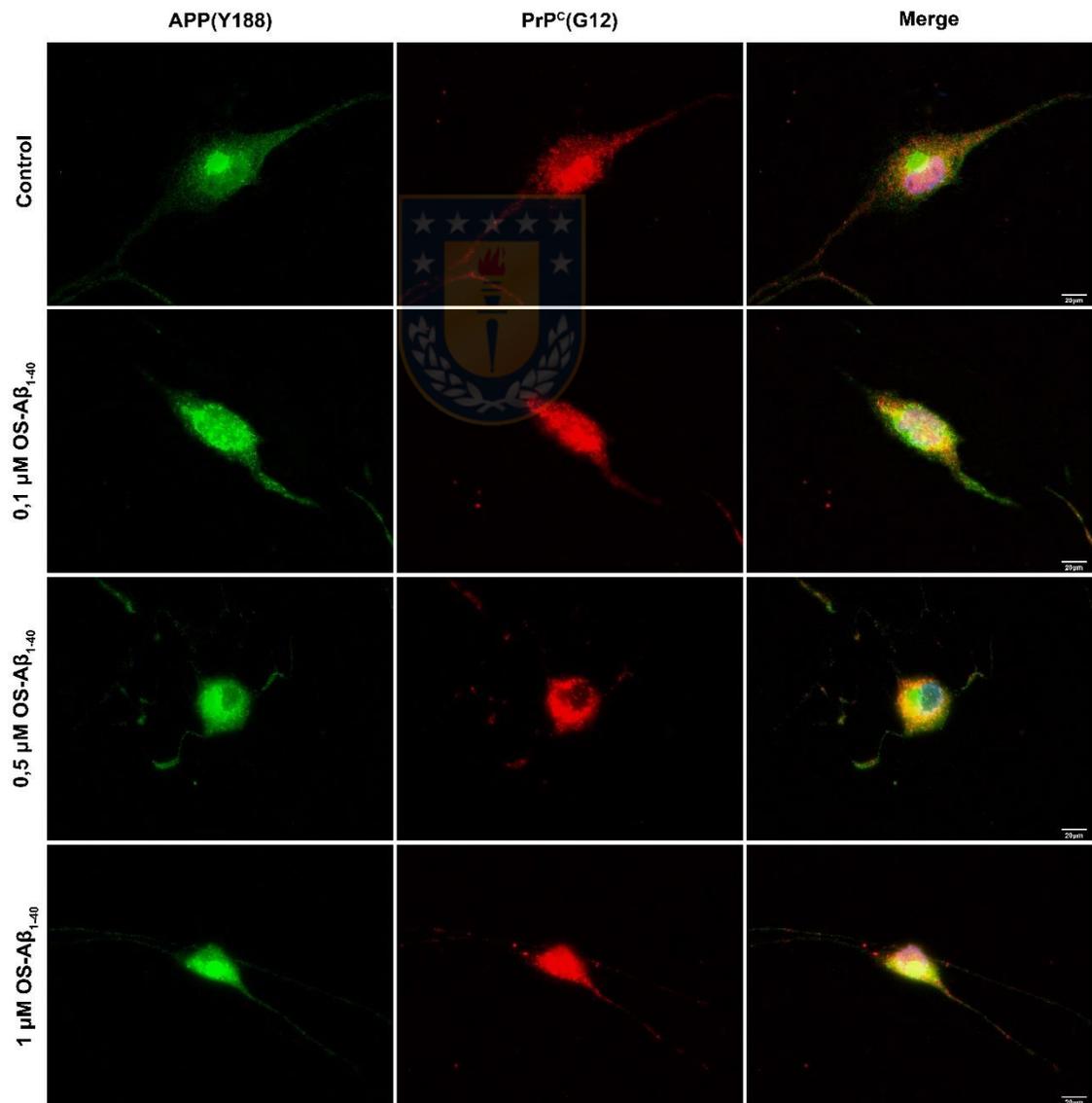


**B.**



**Anexo 6. Colocalización PrP<sup>C</sup> y APP en células CAD diferenciadas tratadas con oligómeros solubles del péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> (OS-A $\beta$ <sub>1-40</sub>). Con el anticuerpo G12 para la región C-terminal de PrP<sup>C</sup>. **A** y **B**. Representan experimentos independientes.**

**A.**



**B.**

