

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



CONTROL DE SUPERVIVENCIA -MUERTE CELULAR EN LA
PATOLOGÍA DE ALZHEIMER

ESTUDIOS EN CÉLULAS EXTRANEURALES

TESIS DOCTORAL DE:

FERNANDO BARTOLOMÉ ROBLEDO

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

ÁNGELES MARTÍN REQUERO

Madrid, 2009

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE BIOLOGÍA
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular



**CONTROL DE SUPERVIVENCIA/MUERTE
CELULAR EN LA PATOLOGÍA DE ALZHEIMER.
ESTUDIOS EN CÉLULAS EXTRANEURALES**

Memoria presentada por
Fernando Bartolomé Robledo
para optar al grado de doctor en Biología

Directora de tesis:
Ángeles Martín Requero

Madrid, 2009



MINISTERIO
DE CIENCIA E
INNOVACIÓN



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES
BIOLÓGICAS

ÁNGELES MARTÍN REQUERO, Investigadora Científica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Informa que:

El trabajo de la tesis titulada:

“Control de supervivencia/muerte celular en la patología de alzhéimer. Estudios en células extraneurales”.

Presentado por **FERNANDO BARTOLOMÉ ROBLEDO**, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Fisiopatología Celular y Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC y, en mi opinión, reúne los requisitos necesarios para optar al grado de doctor en Biología.

Para que así conste, firmo la presente en Madrid a 30 de abril de 2009

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Fisiopatología Celular y Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC con recursos aportados por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (01/1194) yPI04/0312 del Ministerio de Sanidad y Consumo, por el Ministerio de Educación y Ciencia, (SAF2007-62405), por Caja Segovia Obra Social y por la Fundación E. Rodríguez Pascual. Parte de esta tesis ha sido publicada:

- **Bartolome F**, de Las Cuevas N, Munoz U, Bermejo F, Martin-Requero A (2007) Impaired apoptosis in lymphoblasts from Alzheimer's disease patients: cross-talk of Ca²⁺/calmodulin and ERK1/2 signaling pathways. *Cell Mol Life Sci* 64:1437-1448.
- Sala SG, Munoz U, **Bartolome F**, Bermejo F, Martin-Requero A (2008) HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin inhibits cell cycle progression at the G1/S checkpoint in immortalized lymphocytes from Alzheimer's disease patients independently of cholesterol-lowering effects. *J Pharmacol Exp Ther* 324:352-359.
- **Bartolome F**, Munoz U, Esteras N, Esteban J, Bermejo-Pareja F, Martin-Requero A (2009) Distinct regulation of cell cycle and survival in lymphocytes from patients with Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *Int J Clin Exp Pathol* 2:390-398.

Además ha dado lugar a las siguientes comunicaciones en congresos nacionales e internacionales:

- U. Muñoz, N. Cuevas, **F. Bartolomé** A. Martín-Requero. "Enhanced proteasome-dependent degradation of the CDK inhibitor p27kip1 in immortalized lymphocytes from Alzheimer's dementia patients". 30th FEBS Congress and 9th IUBMB Conference. Budapest.
- **F. Bartolomé**, N. de las Cuevas, U. Muñoz, A. Martín-Requero. "Papel de Ca²⁺/Calmodulina en el control de supervivencia/muerte celular en linfocitos inmortalizados de pacientes de Alzheimer". XXVIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM). Zaragoza, 2005.
- Martín-Requero, **F. Bartolomé**, U. Muñoz, F. Bermejo. "Ca²⁺/Calmodulin-mediated modulation of ERK1/2 activation regulates survival of lymphoblasts from patients with Alzheimer dementia". 10th Internacional Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders (ICAD). Madrid, 2006.
- U. Muñoz, **F. Bartolomé**, S. Sala, A. Martín-Requero. "Papel de la interacción entre las vías de señalización Ca²⁺/Calmodulina, PI3K/Akt y ERK1/2 en el

control de supervivencia/muerte celular en linfoblastos de pacientes de Alzheimer". XXXI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM). Elche (Alicante), 2006.

- Úrsula Muñoz, **F. Bartolomé**, F. Bermejo y A. Martín-Requero. "PPAR gamma-independent inhibition of PI3K/Akt by 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 increases p27^{kip1} protein levels in immortalized lymphocytes from Alzheimer's disease patients". III Meeting on the molecular mechanisms of Neurodegeneration. Milán, 2007.
- **F. Bartolomé**, U. Muñoz, N. Esteras, J. Esteban, F. Bermejo-Pareja y A. Martín-Requero. "Alteraciones en los mecanismos de regulación de supervivencia/muerte de células periféricas de pacientes de alzhéimer y de esclerosis lateral amiotrófica". XXIX Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM). Bilbao, 2008.

ÍNDICE

I. ABREVIATURAS	2
II. INTRODUCCIÓN	6
Apuntes históricos	7
1-. DIAGNÓSTICO Y ETIOLOGÍA DE LA EA	9
2-. NEUROBIOLOGÍA Y NEUROPATHOLOGÍA DE LA EA	13
2.1-. Placas neuríticas	14
2.2-. Ovillos neurofibrilares	16
3-. MUERTE NEURONAL	18
4-. MECANISMOS DE NEURODEGENERACIÓN EN LA EA	22
4.1-. β -Amiloide	22
3.2-. Colesterol	26
3.3-. Hiperfosforilación de tau	28
3.4-. Estrés oxidativo	29
3.5-. Inflamación	31
3.6-. Excitotoxicidad	34
3.7-. Ciclo celular	35
4-. PRESENTE Y FUTURO EN EL TRATAMIENTO DE LA EA	41
5-. MODELOS DE ESTUDIO DE LA EA	46
III. OBJETIVOS DE LA TESIS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL	49
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	53
1.- MATERIALES	54
2-. OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA Y ESTABLECIMIENTO DE LÍNEAS LINFOBLÁSTICAS	54
2.1-. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica	54
2.2-. Aislamiento de Linfocitos B	55
2.3-. Establecimiento de líneas celulares linfoblásticas	57

2.3.1-. Producción del virus Epstein-Barr	57
2.3.2-. Transformación de linfocitos	58
3-. MÉTODOS ANALÍTICOS	58
3.1-. Análisis del ciclo celular	58
3.2-. Determinación de la proliferación y la viabilidad celular	59
3.3-. Determinación de la apoptosis celular	60
3.3.1-.Incorporación de Ioduro de Propidio	60
3.3.2-. Inclusión/exposición de Ioduro de Propidio y Fosfatidilserina	61
3.3.3-. Detección de muerte celular por TUNEL (<i>Terminal transferase mediated dUTP- nick end labelling</i>)	61
3.4-. Construcciones de plásmidos y transfecciones	62
3.5-. Análisis de la expresión de Calmodulina3	62
3.6-. Inmunodetección	63
3.6.1-. Preparación de extractos celulares y nucleares	63
3.6.2-. Western Blotting	64
3.6.3-. Inmunoprecipitación y ensayo de la actividad quinasa del complejo ciclina E/CDK2	65
4-. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	66
V. RESULTADOS	67
1-. ESTABLECIMIENTO DE LÍNEAS LINFOBLÁSTICAS	68
1.1-. Descripción de los individuos donantes de sangre	68
2-. ACTIVIDAD PROLIFERATIVA DE LINFOBLASTOS PROCEDENTES DE DONANTES CONTROLES Y DE PACIENTES CON EA	71
2.1-. Efecto del suero sobre proliferación celular	71
2.2-. Fosforilación de la proteína pRb y actividad quinasa del complejo ciclina E/CDK2	72
2.3-. Expresión de proteínas reguladoras del tránsito de G1 a S del ciclo celular	73
2.4-. Regulación del contenido celular de p21 y p27	74
2.4.1-. Determinación de la vida media de p21 y p27 en	

linfoblastos controles y de EA	74
2.4.2-. Papel de la vía ubiquitín-proteasoma en la degradación de p21 y p27	76
2.5-. Influencia de la perturbación de la señalización a través de Ca ²⁺ /Calmodulina (CaM) en la actividad proliferativa de linfoblastos controles y de enfermos de alzhéimer	77
3-. ESTUDIO DE LA VULNERABILIDAD CELULAR FRENTE A LA RETIRADA DE SUERO EN LINFOBLASTOS DE INDIVIDUOS CONTROLES Y DE PACIENTES CON EA	78
3.1-. Mecanismos moleculares implicados en la muerte celular inducida por la privación de suero	78
3. 2-. Influencia de la perturbación en la señalización a través de Ca ²⁺ /CaM sobre la muerte celular inducida por la ausencia de factores tróficos	83
4-. ESTUDIO DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN EL CONTROL DE SUPERVIVENCIA/MUERTE DE LINFOBLASTOS CONTROLES Y DE EA	86
4.1-. Implicación de PI3K/Akt y Erk1/2 en el control de la actividad proliferativa	86
4.2-. Estudio de las vías de señalización que controlan la respuesta celular a la privación de suero	91
4.2.1-. Efecto de la retirada de suero en la activación de Erk1/2	92
4.2.2-. Papel de la activación de Erk1/2 en la apoptosis inducida por la retirada de suero	93
4.3-. Contenido celular de CaM en linfoblastos controles y de EA	94
5-. PROLIFERACIÓN Y SUPERVIVENCIA EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (CMSPs) Y EN LINFOCITOS B	95
6-. EFECTO DE SIMVASTATINA EN LA RESPUESTA CELULAR A LA PRESENCIA O AUSENCIA DE SUERO	98
6.1-. Efecto de simvastatina en la proliferación celular	100
6.1.1-. Dosis-respuesta	100

6.1.2-. Efecto de simvastatina sobre la actividad proliferativa de linfoblastos controles y de EA	102
6.1.3-. El efecto de simvastatina es independiente de los niveles de colesterol	103
6.1.4-. Efecto de simvastatina en la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular	104
6.1.5-. Regulación de los niveles de p21 y de p27 por simvastatina en los linfoblastos de EA	108
6.1.6-. Efecto de simvastatina sobre la activación de PI3K/Akt	110
6.2-. Efecto de simvastatina sobre la vulnerabilidad celular a la retirada del suero	111
6.2.1-. Efecto de simvastatina sobre la actividad de Erk1/2 tras la privación de suero	114
7-. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA RESPUESTA CELULAR DE LINFOBLASTOS DE PACIENTES DE EA Y DE ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA)	115
7.1. Selección de pacientes	115
7.2. Actividad proliferativa de linfocitos inmortalizados de pacientes de EA y de ELA	115
7.3. Efecto de la privación de suero en linfoblastos de individuos controles y pacientes de EA y ELA	118
7.4. Actividad de PI3K/Akt y Erk1/2 en linfoblastos controles y de pacientes de EA o ELA	119
VI. DISCUSIÓN	122
1-. CARACTERIZACIÓN DE LAS LÍNEAS LINFOBLÁSTICAS DE EA	123
2-. MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN/MUERTE CELULAR DE LINFOBLASTOS CONTROLES Y DE EA	125
2.1-. Alteración en la actividad proliferativa de linfoblastos de pacientes con EA	125

2.2-. Respuesta celular a la retirada del suero en linfoblastos de individuos controles y pacientes con EA	127
2.3-. Papel de Ca ²⁺ /CaM en el control de proliferación/muerte celular en la EA	128
2.4-. Interacción de la vía Ca ²⁺ /CaM con las cascadas de señalización intracelular PI3K/Akt y MAPK	130
2.5-. Alteraciones en las vías de señalización PI3K/Akt y Erk1/2 en el SN de pacientes de EA	133
3-. EFECTOS DE SIMVASTATINA SOBRE LA RESPUESTA DE LINFOBLASTOS CONTROLES Y DE EA AL SUERO	135
4-. COMPARACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD PROLIFERATIVA Y VULNERABILIDAD CELULAR EN LINFOBLASTOS DE PACIENTES DE ELA Y DE EA	138
VII. CONCLUSIONES	141
VIII. BIBLIOGRAFÍA	143
ANEXOS	184

Abreviaturas

ABREVIATURAS

A β : β -amiloide	CaM: calmodulina
Ach: acetilcolina	CaMKII: calmodulina quinasa II
ADN: ácido desoxirribonucleico	CaMKK: calmodulina quinasa quinasa
ADRDA: asociación de Alzheimer y enfermedades relacionadas	CDK: quinasa dependiente de ciclina
AICD: dominio intracelular de APP	CDKI: inhibidor de quinasa dependiente de ciclina
AIF: factor inductor de apoptosis	CEAFA: Confederación Española de Familiares de Enfermos de Alzheimer
AINEs: antiinflamatorios no esteroideos	CHSA: estudio canadiense de salud y envejecimiento
ALZAS: del inglés “ <i>Alzheimer Associated Protein</i> ”	CMSPs: células mononucleares de sangre periférica
AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propionato	CMZ: calmidazolium
ANOVA: análisis de varianza	COX: ciclooxigenasa
ApoE: apolipoproteína E	DAPI: 4',6-Diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro
APP: proteína precursora de amiloide	DCL: deterioro cognitivo leve
ARN: ácido ribonucleico	DMSO: dimetilsulfóxido
ATM: proteína quinasa ataxia telangiectasia mutada	DSM III-r: del inglés “ <i>Diagnostic Statistical Manual III, revised</i> ”
ATP: adenosín trifosfato	DTT: ditioneitol
AV-FITC: anexina V acoplada a fluoresceína	EA: enfermedad de alzhéimer
α 2M: α -2 macro globulina	EAF: enfermedad de alzhéimer familiar
BACE: enzima β -secretasa	EBV: virus de Epstein-Barr
BAPTA-AM: ácido 1,2-bis (o-aminofenoxi) etano-N,N,N',N'-tetracético	ECL: del inglés “ <i>enhanced chemiluminiscent</i> ”
BCHE: butirilcolinesterasa K	EEG: electroencefalograma
BrdU: bromo deoxiuridina	EDTA: ácido etilen diamino tetracético
BSA: albúmina de suero bovino	EGF: factor de crecimiento endotelial

EGTA: ácido etilenglicol tetracético	KOH: hidróxido de potasio
ELA: esclerosis lateral amiotrófica	LCR: líquido cefalorraquídeo
Erk: quinasas reguladas por señales extracelulares	LRP: receptor de lipoproteínas de baja densidad
FAST: del inglés “ <i>Functional Assesment Staging</i> ”	MgCl ₂ : cloruro magnésico
FBS: suero fetal bovino	MAP: proteínas asociadas a microtúbulos
FDA: del inglés “ <i>Food and Drug Administration</i> ”	MAPK: quinasas activadas por mitógenos
FOX: del inglés “ <i>forkhead box</i> ”	MARK: quinasa reguladora de la afinidad del microtúbulo
FPP: farnesil pirofosfato	MEK: proteína quinasa que fosforila a Erk
FISH: fluorescencia de hibridación in situ	M-CSF: factor estimulante de macrófagos
FITC: isotiocianato de fluoresceína	MEV: mevalonato
GD3: gangliósido 3	MG132: del inglés “ <i>N-(benzyloxycarbonyl)</i> ”; inhibidor del proteasoma
GFP: proteína verde fluorescente	MMLV: virus de leucemia murina de Moloney
GGPP: geranil geranil pirofosfato	MMSE: test mini mental
GSK3β: glucógeno sintasa kinasa 3β	MTT: bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazolium
G ₁ : gap (fase) 1	NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
G ₂ : gap (fase) 2	NaCl: cloruro sódico
HCl: ácido clorhídrico	NaF: fluoruro sódico
Hepes: N-[2-hidroxietil] piperacina-N’-[2-ácido etanosulfónico]	Na ₂ HPO ₄ : fosfato ácido de sodio
HMG-CoA: 3-hidroxi 3-metilglutaril coenzima A	NFTs: ovillos neurofibrilares
IL: interleuquina	NINCDS: Instituto Americano de enfermedades neurológicas, cognitivas e infarto
IP: Ioduro de Propidio	
KCl: cloruro potásico	
KClO ₄ : perclorato de potasio	
KH ₂ PO ₄ : Fosfato diácido de potasio	
KN-62: 1-(N-O-bis[5-isoquinolinesulfonil]-N-metil-L-tirosil)-4-fenilpiperacina)	

NMDA: N-metil-D-aspartato
 NP-40: Nonidet P-40
 6-OHDA: 6-hidroxi dopamina
 PAK3: quinasa 3, activada por p21
 PBS: tampón fosfato salino
 PCNA: del inglés "*proliferating cell nuclear antigen*"
 PCR: reacción en cadena de la polimerasa
 PET: tomografía por emisión de positrones
 PFA: paraformaldehído
 PHF: filamentos helicoidales emparejados
 PM: peso molecular
 PMSF: fluoruro fenilmetilsulfonil
 PPAR γ : receptor activador de proliferación peroxisoma
 pRb: proteína de retinoblastoma
 PS: presenilina
 PTPC: complejo del poro de permeabilidad transitoria
 PTEN: del inglés "*phosphatase and tensin homolog*"
 PVDF: poli fluoruro de vinilidene
 PWM: mitógeno pokeweed
 RAGE: receptor de productos finales de glicosilación avanzada
 Rb: retinoblastoma
 ROS: especies reactivas de oxígeno
 RT-PCR: retrotranscripción y PCR
 S (fase): fase de síntesis de ADN
 SAPKs: quinasas activadas por estrés
 SDS: sodio dodecil sulfato
 SIM: simvastatina
 SNC: sistema nervioso central
 SNPs: del inglés "*single nucleotide polymorphism*"
 SQ: escualeno.
 SV40: del inglés "*simian virus 40*"
 TAC: tomografía axial computarizada
 TBI: del inglés "*traumatic brain injury*"
 TLR: del inglés "*Toll-like-receptor*"
 Tg: transgénico
 TNF: factor de necrosis tumoral
 TUNEL: del inglés *Terminal transferase dUTP-nick end labeling*
 W7: N-(6-aminohexil)-5- cloro-1-naftalensulfonamida
 z-VAD-fmk: del inglés "*benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone*"

Introducción

Hace poco más de cien años, el médico alemán Alois Alzheimer dio nombre al trastorno neurodegenerativo progresivo causante de la demencia más común entre individuos de mediana y avanzada edad, el cual da lugar a un deterioro cognitivo generalizado y a trastornos de conducta en la persona. La enfermedad cursa con una pérdida de memoria, de lenguaje y de otras cualidades mentales, incapacitando al paciente a hacer razonamientos y a resolver problemas y, provocando, en algunos casos, síntomas psicóticos, como paranoia y alucinaciones. Su duración media suele ser, aproximadamente, de diez años, aunque puede variar de un paciente a otro.

El principal factor de riesgo de la enfermedad de Alzheimer (EA) es la edad avanzada. El aumento de la esperanza de vida y el descenso de la natalidad ocurridos desde principios del siglo XX hasta hoy, han producido un aumento progresivo del envejecimiento de la población. Por estos motivos la EA es una enfermedad cada vez más frecuente. En la actualidad la EA afecta al 7-10% de los individuos mayores de 65 años y, aproximadamente, al 40% de los que sobrepasan los 80 años de edad.

Apuntes históricos

En 1907 A. Alzheimer describió el primer caso de la enfermedad pero ha sido en los últimos 30 o 40 años cuando realmente se han producido grandes avances en la investigación y en el conocimiento de la enfermedad. Paralelamente, aumentó exponencialmente el número de publicaciones sobre la EA. Solamente en el primer trimestre de 2009, se pueden encontrar 3.278 referencias en la base de datos Medline.

La evaluación médica y descripción original de A. Alzheimer hacía referencia a la presencia de agregaciones proteicas anormales en el cerebro de una mujer de 53 años, fallecida tras una corta enfermedad, cuyos principales síntomas fueron demencia, trastornos de lenguaje, alteraciones de memoria y celopatía.

Desde la descripción de A. Alzheimer hasta finales de los años sesenta, la enfermedad era considerada como un tipo raro de demencia presenil. A partir de entonces, se confirmó, de forma inequívoca y constante, la presencia de los agregados proteicos denominados *ovillos neurofibrilares* (NFTs) y *placas neuríticas* en ancianos

con deterioro cognitivo, genéricamente diagnosticados de demencia senil (Blessed y cols., 1968). Desde este momento, la enfermedad de Alzheimer pasó de ser considerada una rareza, a ser reconocida como la principal causa de demencia en personas de edad avanzada y uno de los principales problemas de salud de nuestro tiempo a la vez que se empezaron a desarrollar criterios estrictos para su diagnóstico clínico (McKhann y cols., 1984).

Cuando la enfermedad pudo ser estudiada a nivel microscópico, se dio a conocer la ultraestructura de los agregados proteicos por parte de los investigadores M. Kidd y R. D. Terry (Kidd, 1963; Terry, 1963). Los dos coincidieron en la descripción de los *filamentos helicoidales emparejados* (PHF), presentes en los ovillos neurofibrilares y, más adelante, Terry, demostró que el núcleo de las placas neuríticas estaba constituido por material amiloide fibrilar (Terry, 1978). Con posterioridad a estos descubrimientos, se conoció que los ovillos neurofibrilares están constituidos por una proteína altamente fosforilada, la proteína “ τ ” (tau), y que el material amiloide fibrilar que constituye el núcleo de las placas neuríticas era mayoritariamente un péptido de 40-42 aminoácidos llamado β -amiloide (A β) (Glennner y Wong, 1984a, b; Goedert y cols., 1991).

En los años 70, los estudios de cerebros *postmortem* de pacientes con EA condujeron a varias conclusiones: se observó una entrada reducida de colina, liberación disminuida de acetilcolina (Ach) y pérdida de neuronas colinérgicas en los núcleos basales de Meynert, confirmando un déficit sustancial colinérgico presináptico, en concreto de Ach, cuya disponibilidad depende de las enzimas colinesterasa y acetil colina transferasa (hipótesis del déficit colinérgico) (White y cols., 1977; Francis y cols., 1999). Este descubrimiento contribuyó a sentar bases para el desarrollo de la primera intervención terapéutica sobre la EA y, tras ser aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA), empezaron a utilizarse análogos de Ach e inhibidores del enzima colinesterasa como tratamiento para los enfermos de EA.

Los avances en genética molecular y el desarrollo de modelos experimentales para el estudio de la enfermedad, han supuesto una contribución importante para el conocimiento de la misma. A pesar de ello, hasta el momento todas las opciones farmacológicas para el tratamiento de la EA, así como las alternativas terapéuticas sobre los síntomas psicológicos y trastornos del comportamiento son insuficientes y, por ello, todavía es necesario desarrollar métodos eficaces de diagnóstico precoz y tratamientos

que no sean únicamente paliativos. Los pronósticos para el año 2025 indican que el número de personas diagnosticadas con demencia será el doble que en 1980 en los países desarrollados y cuatro veces más en los países del Tercer Mundo. Sobre este aspecto, en 1998 se realizó un estudio en el que se estimó que para el año 2050 podría reducirse el número de pacientes con EA en un 50% si se consiguiera retrasar la aparición de la enfermedad en tan sólo 5 años (Brookmeyer y cols., 1998). En nuestro país, la enfermedad afecta aproximadamente a 400.000 personas y las expectativas son que esta cifra se doblará en el año 2020. Constituye ya la décima causa de mortalidad en España.

1-. DIAGNÓSTICO Y ETIOLOGÍA DE LA EA.

El diagnóstico de la EA, a día de hoy, atiende al examen neurológico, a los cuestionarios neuropsicológicos y a las imágenes tomadas del cerebro de pacientes.

En la actualidad, los parámetros utilizados para predecir la EA atienden a los criterios del Instituto Americano de Enfermedades Neurológicas, Cognitivas e Infarto y de la Asociación de Alzheimer y Enfermedades Relacionadas (National Institute of Neurologic, Communicative Disorders and Stroke - Alzheimer's Disease and Related Disorders Association; NINCDS-ADRDA) establecidos en 1984 (McKhan y cols., 1984). Estos, junto con el diagnóstico neuropsicológico de demencia, tomografía axial computarizada (TAC), espectroscopía de resonancia magnética, tomografía por emisión de positrones (PET), electroencefalograma, etc., permiten descartar otras causas de deterioro mental y otras demencias. Previo al estadio de enfermedad aparece el deterioro cognitivo leve (DCL) en el que se ven alteradas una o varias funciones cognitivas pero no es calificado como demencia. Sin embargo, se estima que el 55% de los casos con DCL manifiesta en un plazo de 4,5 años, demencia tipo alzhéimer (Ávila y cols., 2004).

El nivel de precisión del diagnóstico de EA *in vivo*, con los criterios actuales, sólo puede aproximarse a “probable”. Únicamente la detección mediante estudios de cerebros de pacientes *postmortem* de los dos principales marcadores neuropatológicos de EA (las placas seniles y los ovillos neurofibrilares), permite hacer un diagnóstico definitivo que excluye a la EA de otros tipos de demencia (Bacsikai y cols., 2002; Chui y cols., 1993; Mori, 2000). Normalmente, la EA se clasifica de manera arbitraria de

acuerdo con la edad a la que se diagnostica en el individuo. Cuando la enfermedad ocurre antes de los 65 años se habla de *EA de aparición precoz o presenil*, a diferencia de la *EA de aparición tardía*, que tiene lugar en individuos mayores de 65 años. A partir de muchas investigaciones, se ha determinado que la EA precoz es de tipo *familiar*, con un patrón de herencia mendeliana, la cual sólo aparece en una minoría de casos de EA con una clara historia familiar (entre el 1% y el 5% de los casos) (Shastry y Giblin, 1999). El otro tipo de EA es esporádica, y representa a la mayoría de pacientes. A día de hoy, son tres los genes identificados cuyas mutaciones dan cuenta de los casos de EA familiar (EAF), mostrando una penetrancia cercana al 100% con herencia autosómica dominante. Los genes son de la proteína precursora de amiloide (APP; en el cromosoma 21), de la proteína presenilina-1 (PS1; en el cromosoma 14) y de la proteína presenilina-2 (PS2; en el cromosoma 1) (Schellenberg, 1995). Diferente a esta forma de EAF, es la forma esporádica cuya etiología es más compleja porque atiende a una suma de factores ambientales y genéticos que, tomados aisladamente, no serían suficientes para desarrollar la enfermedad. El gen de la apolipoproteína E (ApoE) está reconocido como el principal factor de riesgo de esta EA compleja, esporádica, de aparición tardía (Lusis y cols., 1986; Corder y cols., 1993). Otro gen identificado como factor de riesgo para la EA esporádica mediante análisis de ligamiento genético es el gen α -2 macroglobulina (α -2M). Aparte de ApoE y α -2M, existen otros genes de susceptibilidad, con formas polimórficas que parecen estar asociadas con un mayor riesgo de padecer EA y, como tales, podrían estar involucrados en la patología (Shastry y Giblin, 1999). En la mayoría de los casos esporádicos de EA, probablemente algunos de los factores genéticos interactúen con otros factores ambientales o con condiciones patológicas o fisiológicas ejerciendo un efecto patogénico sinérgico que aumenta la probabilidad de aparición de la enfermedad. Este modelo de dicotomía genética para la EA también se aplica a otras enfermedades relacionadas con la edad y que tienen un componente genético, tales como enfermedades cardiovasculares, diabetes y cáncer (Tanzi, 1999). La tabla I muestra los genes involucrados en la EAF así como genes de susceptibilidad propuestos para la EA esporádica.

TABLA I
Genes involucrados en el diagnóstico temprano familiar de la EA (en negrita) y genes de susceptibilidad para la EA (tomado de Rochi y cols., 2003).

Nombre del gen	Localización cromosómica	Diagnóstico	Familiar (F) y/o esporádica (E)	Implicación en la EA
APP	21q21.3–q22.05	Temprano	F	Conocida
PS1	14q24.3	Temprano	F	Conocida
PS2	1q31–q42	Temprano	F	Conocida
<i>APOE</i>	19q32.2	Tardío	E y F	Conocida
<i>α2M</i>	12p	Tardío	E	Incierta
<i>LRP</i>	12	Tardío	E	Incierta
<i>LBP-1c/CP2/LSF</i>	12	Tardío	E	Incierta
<i>ACE</i>	17q23	Tardío	E	Incierta
<i>VLDL-R</i>	9pter–p23	Tardío	E	Incierta
<i>BChE</i>	3q26.1–q26.2	Tardío	E	Incierta
<i>ACT</i>	14q32.1	Tardío	E	Incierta
<i>IDE</i>	10q23–q25	Tardío/Temprano	E y F (¿?)	Incierta
<i>TfC2</i>	3q21	Tardío	E	Incierta
<i>catD</i>	11p15.5	Tardío/Temprano	E y F	Incierta
<i>BH</i>	17q11.1–q11.2	Tardío/Temprano	E	Incierta
<i>TGF-β1</i>	19q13.1–q13.3	Tardío	E	Incierta
<i>5-HTT</i>	17q11.1–q12	Tardío	E	Incierta
Promotor de <i>APOE</i>	19q32.2	Tardío/Temprano	E	Incierta
<i>NOS3</i>	7q35	Tardío	E	Incierta
<i>CST3</i>	20p11.2	Tardío	E	Incierta
Promotor de <i>PS1</i>	14q24	Temprano	E y F	Incierta

Los factores ambientales como el tabaquismo, la diabetes, la hipertensión arterial, las dietas ricas en grasas, leves intoxicaciones, etc., pueden favorecer el desarrollo de la EA en personas portadoras de alguno de estos genes de susceptibilidad, pero ninguno de ellos por separado, provoca la enfermedad. Por su naturaleza, estos factores pueden ser controlables a lo largo de la vida del individuo. Otro factor que parece estar implicado en la aparición de la EA es la capacidad cognitiva, ya sea natural o adquirida, en la que el individuo activa y utiliza progresivamente redes neuronales en respuesta a su demanda cognitiva (reserva cognitiva) compensando, si las hay, algunas lesiones histopatológicas (Stern, 2006). Aparentemente, en los individuos con mayor reserva cognitiva, los síntomas de la enfermedad aparecen más tarde que en los individuos con menor reserva cognitiva, aún presentando lesiones cerebrales similares.

En cuanto a la identificación de las fases de la EA se han utilizado distintas escalas, en un intento de ayudar a los cuidadores y familias a entender las necesidades de los enfermos. Una de estas escalas, la denominada FAST (Functional Assessment Staging) fue desarrollada por Reisberg y cols., en 1982, y divide a la EA en 16 estadios

funcionales sucesivos, en los que se van perdiendo distintas habilidades funcionales en la vida ordinaria (Tabla II).

TABLA II
ESTADIOS FAST

ESTADIOS FAST	CARACTERÍSTICAS
1-. Adulto normal	Sin deterioro funcional
2-. Adulto normal	La persona percibe cierto declive
3-. EA Temprana	Déficit evidente para realizar ciertas tareas
4-. EA Leve	Se requiere ayuda en ciertas labores como el manejo de la economía doméstica
5-. EA Moderada	Se requiere ayuda para elegir las prendas adecuadas de vestimenta según la ocasión
6-. EA Moderada-Grave	6a Requiere ayuda para vestirse 6b Requiere ayuda para bañarse 6c Requiere ayuda para usar el WC 6d Incontinencia urinaria 6e Incontinencia fecal
7-. EA Grave	7a Lenguaje limitado a media docena de palabras 7b Lenguaje limitado a una palabra 7c Incapacidad de andar 7d Incapacidad para sentarse 7e Incapacidad para sonreír 7f Incapacidad de mantener la cabeza erguida

Trabajando con esta escala, el mismo grupo de investigadores encontró una correlación entre el deterioro funcional en la EA y el desarrollo de las funciones en la infancia, de manera que la EA revierte el proceso perdiéndose, en primer lugar y, sucesivamente, las habilidades que se adquirieron más tarde en la vida del individuo (Tabla III).

TABLA III
Niveles funcionales en la EA y edad de aparición de las funciones en el desarrollo

NIVEL FUNCIONAL	Estadio de la EA en que se produce la pérdida de función	Edad a la que aparece la función
Mantener la cabeza erguida	7f	1-3 meses
Sonreír	7e	3-4 meses
Sentarse sin ayuda	7d	6-10 meses
Caminar	7c	12 meses
Lenguaje limitado a una única palabra ininteligible	7b	12 meses
Lenguaje limitado a media docena de palabras	7a	15 meses
Control de defecación	6e	24-36 meses
Continencia urinaria	6d	36-54 meses
Asearse sólo	6c	48 meses
Bañarse sólo	6b	4 años
Vestirse sólo	6a	5 años
Elegir la ropa adecuada para la ocasión	5	5-7 años
Manejo de la economía doméstica	4	8-12 años
Compras, cocinar, trabajar, etc.	3	Adolescencia

2-. NEUROBIOLOGÍA Y NEUROPATOLOGÍA DE LA EA

Las zonas del cerebro afectadas por la EA son áreas de asociación cortical y áreas del sistema límbico, en concreto el hipocampo, la amígdala y la corteza entorrinal. Los marcadores histopatológicos que caracterizan a la EA son las placas neuríticas o seniles y los ovillos neurofibrilares. Ambas lesiones aparecen sobre todo en el sistema límbico y en la corteza de asociación heteromodal y en menor proporción, en las zonas sensoriales primarias, en las áreas motoras, en los ganglios basales y en el cerebelo (DeKosky, 2002). También existe cierta vulnerabilidad o pérdida de los sistemas de neurotransmisores, sobre todo en el sistema colinérgico aunque, dependiendo de la zona, se encuentra más o menos pérdida (Davies y Maloney, 1976).

2.1-. Placas neuríticas.

Las placas neuríticas, principales marcadores histopatológicos de la EA, son depósitos proteicos extracelulares, de morfología más o menos esférica y con un tamaño de entre 10 y 200 μm de diámetro (Alzheimer, 1907) (figura 1B, C y D).

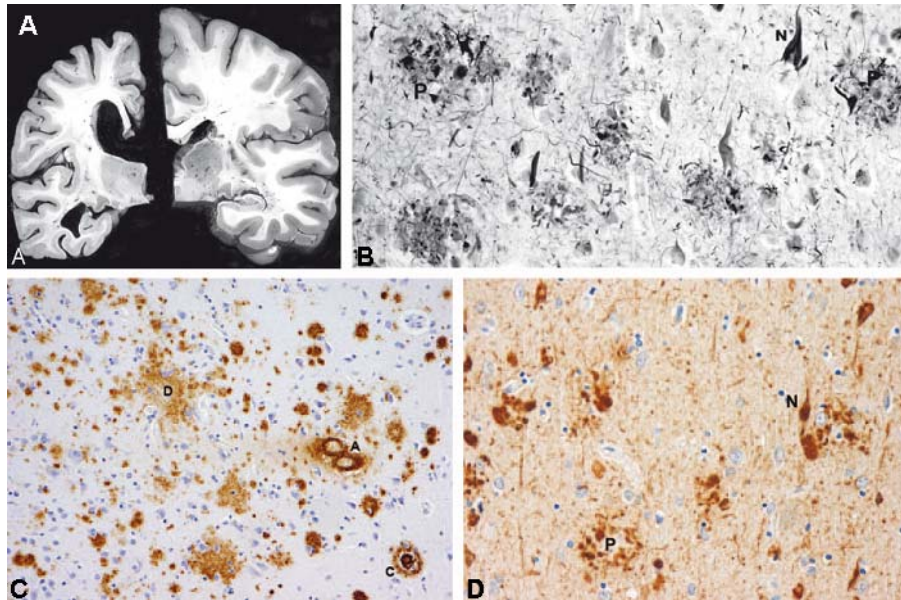


Figura 1. Características histopatológicas de la EA. A: Atrofia cerebral. En la izquierda, una sección de cerebro de un paciente con EA de 70 años que muestra una signos de atrofia, dilatación del ventrículo y un hipocampo reducido. A la derecha, la sección de un cerebro sano de edad aproximada. B: Ovillos neurofibrilares (N) y placas neuríticas (P) en el hipocampo. Tinción modificada de Bielschowsky/plata. C: β -amiloidosis en el lóbulo frontal: una placa difusa (D), una placa neurítica (cored plaque; C) y angiopatía amiloidea cerebral (A). Inmunohistoquímica contra β -amiloide (10D5). D: ovillos neurofibrilares (N) y placas neuríticas (P) en el lóbulo frontal. Inmunohistoquímica o fosforilación. Tomado de Wippold y cols., 2008.

Están constituidas principalmente por el péptido $A\beta$ que es un fragmento de 40-42 aminoácidos derivado de la proteólisis en la región de los aminoácidos 39-42 de la proteína precursora de amiloide que es una glicoproteína transmembranal con dominios extra- e intracelulares (figura 2) (Mott y Hulette, 2005; Goedert y Spillantini, 2006; Imbimbo y cols., 2005; Ellison y Love, 2004). Existen al menos 10 isoformas de APP dentro de un mismo individuo, lo que sugiere que esta proteína desempeñe un papel relevante en la fisiología de la célula (Imbimbo y cols., 2005; Hardy y Allsop, 1991; Drachman, 2006; Bayer y cols., 2001). El metabolismo de APP tiene lugar a través de la vía α -secretasa, principalmente, y β - y γ -secretasa, secundariamente (figura 2). La proteólisis de APP por α -secretasa da lugar a un fragmento extracelular, $sAPP_{\alpha}$, que podría tener importancia neuroprotectora (Mattson, 1997), y a otro fragmento proteico

de 83 carbonos (C83), que atraviesa la membrana. Cuando la proteólisis la realiza β -secretasa (BACE), se produce un residuo extracelular, $sAPP_{\beta}$, y un fragmento de 99 carbonos (C99) que atraviesa la membrana plasmática. C99 puede a su vez ser cortado por γ -secretasa, resultando por una parte, el péptido $A\beta$ (parte externa de C99) y por otra el fragmento del *dominio intracelular de APP* (AICD). $A\beta$ puede formar agregados neurotóxicos en forma de oligómeros y, más adelante, polimerizar originando grandes fibras y, en último lugar, las placas de amiloide (Imbimbo y cols., 2005; Armstrong, 2006; Drachman, 2006). Formando parte del complejo γ -secretasa están las proteínas presenilina 1 y 2 (PS1 y PS2) que regulan el procesamiento de APP (Goedert y Spillantini, 2006).

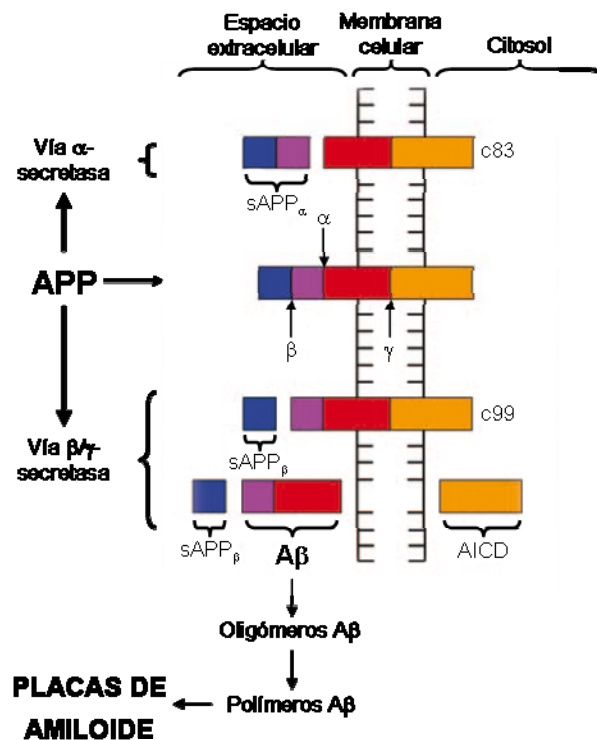


Figura 2. Esquema del procesamiento de APP. Por la vía α -secretasa (α) se genera el fragmento $sAPP_{\alpha}$ y el péptido C83. Por la vía β -secretasa la enzima (β) corta APP generando los fragmentos $sAPP_{\beta}$ y C99. Por otra parte, C99 es cortado por γ -secretasa (γ) dando lugar al péptido $A\beta$ y al fragmento intracelular AICD. Tomado de Wippold y cols., 2008.

Además del péptido $A\beta$, las placas también contienen otros componentes proteicos como ApoE, α -1-antiquimiotripsina, y proteoglicanos. Asociada a muchas de las placas es evidente la presencia de inflamación, astrocitosis, microglía y neuritas distróficas procedentes de neuronas destruidas y fragmentos dendríticos que contienen restos de lisosomas (Wippold y cols., 2006; Lowe y cols., 1988; Tomokane y cols.,

1991; Murayama y cols., 1992). En algunas de ellas se encuentran *filamentos helicoidales emparejados* que son agregados filamentosos de la proteína tau (Ellison y Love, 2004; Hardy y Allsop, 1991; Kidd, 1964).

Existen varios tipos de placas. Por un lado, existen las *placas difusas* que son acúmulos marginales de A β mal agregado, no fibrilar y que carecen de neuritas distróficas, no presentan reacción glial ni una estructura interna organizada (Mott y Hulette, 2005; Yamaguchi y cols., 1988). Otro tipo son las *placas neuríticas* que están compuestas por un núcleo central de A β fibrilar y están rodeadas de neuritas distróficas (Mott y Hulette, 2005; Ellison y Love, 2004; Yamaguchi y cols., 1988). Las placas neuríticas se presentan asociadas a la degeneración de las uniones sinápticas y están rodeadas de astrocitos reactivos y células de la microglía activadas (Mott y Hulette, 2005; Armstrong, 2006). También, con frecuencia se encuentran asociadas a factores del complemento e inmunoglobulinas y están rodeadas de un halo fibroso (Armstrong, 2006; Pearce, 2000). El tercer tipo de placas es lo que se conoce como *placas calcinadas* (del inglés burnt-out) que se componen de un núcleo condensado de A β sin asociación de neuritas y aparecen en los estadios últimos de la enfermedad (Ellison y Love, 2004). La mayor parte del A β fibrilar presente en las placas neuríticas está formado por el fragmento de 42 residuos (Jarret y cols., 1993) que es la forma más hidrofóbica y susceptible de formar agregados, aunque también se pueden encontrar fragmentos de A β 40 (Iwatsubo y cols., 1994). Aunque no existen evidencias directas, algunos investigadores coinciden en que en la progresión de la enfermedad, primero aparecen las placas difusas, que evolucionan a placas neuríticas y, finalmente, terminan siendo de tipo “burnt-out” (Ellison y Love, 2004; Sheng y cols., 1998). Las placas de amiloide aparecen en áreas de asociación del neocórtex, en el cíngulo posterior y en parte del sistema límbico (Mott y Hulette, 2005).

2.2.- Ovillos neurofibrilares.

Otra de las características neuropatológicas de la EA son los ovillos neurofibrilares (Alzheimer, 1907; Tonkonogy y Moak, 1988). Estas estructuras están compuestas mayoritariamente de proteína tau hiperfosforilada que se agrega formando filamentos proteicos lineales de unos 10 nm que se enrollan formando los filamentos helicoidales emparejados de unos 160 nm y que son fácilmente distinguibles de otras estructuras filamentosas de la célula (figura 1B, C, D) (Imbimbo y cols., 2005; Hardy y

Allsop, 1991; Pastorino y Lu, 2006). La proteína tau normal está involucrada en el ensamblaje de microtúbulos y contribuye, por tanto, organizando la arquitectura 3D de la neurona y asistiendo en el transporte de proteínas y vesículas esenciales para el mantenimiento y función de la célula (Delacourte, 2005). Por razones desconocidas, la proteína tau es hiperfosforilada y forma agregados dentro de las neuronas, los microtúbulos tienden a despolimerizarse y dejan de ejercer su función correctamente. Además, la proteína tau agregada puede, por sí misma, contribuir a la disfunción neuronal (Imbimbo y cols., 2005; Goedert y cols., 2006). Las causas de la fosforilación anormal de tau no son del todo conocidas, implicando alteraciones en la actividad de proteínas quinasas y fosfatasa, así como una deficiente adaptación al estrés celular o microambiental (Goedert y cols., 2006; Drachman, 2006). Inicialmente, la proteína tau se encuentra dispersa dentro de las neuronas. Cuando se encuentra formando filamentos definidos, la tinción de plata nos descubre los clásicos NFTs dentro de los cuerpos neuronales y en las dendritas (figura 1B). Los NFTs nos muestran un escenario de enfermedad típico que es usado como marcador histopatológico de la misma en la autopsia de cerebros de pacientes (Mott y Hulette, 2005; Braak y Braak, 1991; Price y cols., 1991; Price y Morris, 1999). Sólo cuando muere la célula se encuentran NFTs extracelulares liberados. Los pacientes con EA en estadios preclínicos presentan NFTs en la corteza entorrinal y según progresa la enfermedad aparecen en el sistema límbico (hipocampo, amígdala,...) y, eventualmente en el isocórtex (Braak y Braak, 1991; Price y cols., 1991; Price y Morris, 1999). Esta afectación regional bien definida sirvió para determinar varias etapas histopatológicas tempranas y tardías de la EA y como criterio neuropatológico para determinar la enfermedad (Braak y Braak, 1996) y correlaciona con la evolución clínica de la misma:

Estadios I y II o estados preclínicos, también llamados **transentorrinos**: escasa presencia de ovillos neurofibrilares en la región transentorrinal y moderada presencia en la región entorrinal e hipocampo.

Estadios III y IV: afectación severa de la capa superficial entorrinal (estadio III), y de la capa profunda de la región entorrinal (estadio IV). Se destruye la transmisión de la información desde el isocórtex al hipocampo y viceversa, y se interrumpen los circuitos límbicos.

Estadios V y VI o también llamados estadios **isocorticales**: deterioro progresivo del hipocampo y de las áreas de asociación. Alteración de la memoria y de las funciones cognitivas, funciones del lenguaje, motoras, visuales, etc.

La presencia de agregados de la proteína tau hiperfosforilada no es exclusiva de la EA. Los NFTs también se han encontrado en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos de parálisis supranuclear progresiva, demencia corticobasal, enfermedad de Pick, enfermedad de Parkinson, algunas formas familiares de demencia frontotemporal (revisado en Wippold y cols, 2008), todas ellas enfermedades neurodegenerativas pero, en ninguna de ellas, a diferencia de la EA, aparecen placas de amiloide (Goedert y Spillantini, 2006). También se encuentran en individuos con síndrome de Down (Lemere y cols., 1996).

3-. MUERTE NEURONAL.

La pérdida neuronal es otra característica de la EA que afecta de forma selectiva a determinadas áreas del cerebro. Pese a que han transcurrido más de cien años desde la descripción de la enfermedad, todavía se sabe poco acerca de los mecanismos moleculares implicados en la neurodegeneración. En el cerebro de pacientes de EA se ha observado que están activados múltiples sistemas proteolíticos incluyendo calpaínas, catepsinas y caspasas (Saito y cols., 1993; Grynspan y cols., 1997; Nixon y Cataldo, 2006) Se diferencian tres vías principales de muerte neuronal: *apoptosis*, muerte celular por *autofagia* y *necrosis* (Camins y cols., 2008). Mientras que la necrosis es un proceso irreversible y sin control alguno, la apoptosis y la autofagia son mecanismos fisiológicos finamente controlados.

La apoptosis o *muerte celular programada*, se postula como el principal mecanismo de muerte neuronal en la EA. Este proceso se caracteriza morfológicamente por la condensación de la cromatina, fragmentación del ADN y del núcleo de la célula, formación de cuerpos apoptóticos (Kerr, 2002; Lockshin y Zakeri, 2004) y activación de caspasas (Cribbs y cols., 2004). La integridad de las membranas celular y mitocondrial permanece intacta en los estadios iniciales. El periodo de tiempo entre la iniciación del proceso y la ejecución de apoptosis puede durar horas o días y los cuerpos apoptóticos son fagocitados rápidamente por las células adyacentes o por macrófagos. Por tanto, en

una enfermedad neurodegenerativa crónica, solo se detecta un número pequeño de neuronas apoptóticas en un momento dado (Ziegler y cols, 2004; Jellinger 2006).

Las evidencias experimentales que indican la participación de la apoptosis en la neurodegeneración en la EA incluyen la presencia de niveles elevados de proteínas apoptóticas y caspasas en neuronas que contienen ovillos neurofibrilares (Su y cols., 1994) y fragmentación de ADN asociada a los depósitos amiloideos y ovillos neurofibrilares (Lassmann y cols., 1995). También se han detectado daños en el ADN y niveles elevados de la proteína pro-apoptótica p53 en neuronas vulnerables en estadios tempranos de la enfermedad (Cenini y cols., 2008). Por otra parte, se ha descrito que las mutaciones en presenilinas hacen más vulnerables a las neuronas frente a la apoptosis inducida por la ausencia de factores tróficos o por otros factores de estrés (Guo y cols., 1997).

El proceso apoptótico se puede iniciar activando receptores de muerte en la membrana celular (vía extrínseca) o produciendo/activando ciertas proteínas como p53, Bax, etc., que son capaces de inducir cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial (vía intrínseca). La mitocondria libera citocromo c y AIF (del inglés *apoptosis-inducing factor*), dando lugar a la formación del complejo *apoptosoma* y la activación de las caspasas, como se recoge en el esquema de la figura 3. Ambas vías se han asociado a condiciones patológicas neurodegenerativas (Haass, 1999; Harada y Sugimoto, 1999; Zhang y cols, 2000).

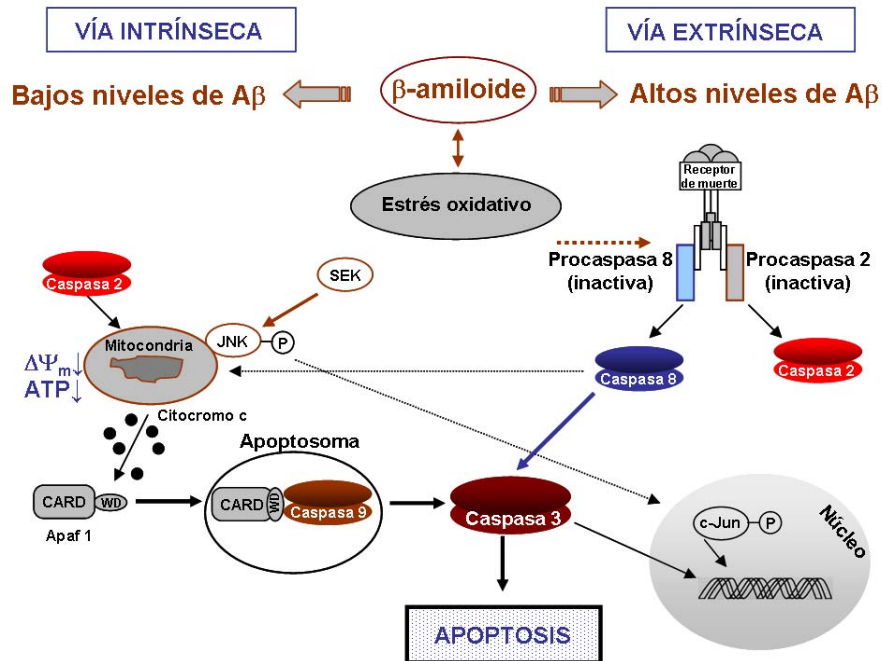


Figura 3. Modelo de las vías apoptóticas en la EA. Se muestra una secuencia hipotética de los hechos que conducen a la activación de caspasas (por ejemplo $A\beta$) tanto activando la vía intrínseca como la vía extrínseca de apoptosis. Tomado de Eckert y cols., 2003.

La activación de la cascada de las caspasas es el acontecimiento central del proceso apoptótico. Las caspasas son una gran familia de cisteína/aspartato proteasas, con funciones bien definidas en la muerte celular programada o apoptosis (Thornberry y Lazebnik, 1998). Con objeto de controlar el proceso apoptótico, las caspasas se expresan como precursores inactivos. Cuando las caspasas iniciadoras, caspasa 8 y caspasa 9, son activadas por oligomerización, son capaces de hidrolizar los precursores de las llamadas caspasas efectoras, caspasa 3, caspasa 6 y caspasa 7 (Salvesen y Dixit, 1997; Cryns y Yuan, 1998).

La caspasa-3 parece ser la principal enzima ejecutora implicada en la muerte neuronal (Stavrovskaya y Kristal, 2005; van Loo y cols., 2002; Shimohama, 2000; Stadelmann y cols., 1999; García-Calvo, y cols., 1998). Se ha visto que la activación de la caspasa-3 aparece en cerebros de pacientes con EA leve y que esta activación aminora a lo largo de la progresión de la enfermedad (Gastard y cols., 2003). Aparentemente, la caspasa-3 media la proteólisis de APP (Ayala-Grosso y cols., 2002), y también, se ha comprobado que en neuronas pretratadas con $A\beta$, las caspasas degradan la proteína tau propiciando más rápidamente la formación de agregados filamentosos de la proteína (Gamblin y cols., 2003; Cotman y cols., 2005). A pesar del

papel predominante de la caspasa-3 en la neurodegeneración en la EA, también se ha demostrado un incremento en la activación de la caspasa-9 y caspasa 6 en cerebros de pacientes de EA (Stavrovskaya y Kristal, 2005; van Loo y cols., 2002; Shimohama, 2000; Stadelmann y cols., 1999; García-Calvo, y cols., 1998; Rohn y cols.2002; Guo y cols., 2004).

Por otra parte, también se ha descrito la participación del retículo endoplasmático en la pérdida neuronal en la EA (LaFerla, 2002). Tanto en pacientes con EAF, como en ratones transgénicos portadores de la mutante humana PS1, como en cultivos celulares, se han encontrado diferencias en la vulnerabilidad de las neuronas como consecuencia de alteraciones en la respuesta al estrés y en la liberación de Ca^{2+} por el retículo endoplasmático (Mattson y Chan, 2003).

La apoptosis neuronal en EA puede implicar también mecanismos nucleares en respuesta a daños en el material genético o a la activación no deseada del ciclo celular implicando al complejo CDK5/p25 que se acumula en cerebros de pacientes y en neuronas cultivadas en presencia de $A\beta$ (van Leeuwen y cols., 1998).

A pesar de las evidencias a favor de la activación de apoptosis en cerebros de pacientes de EA y de otras enfermedades neurodegenerativas, se discute si el término apoptosis es adecuado para describir pérdida neuronal en este tipo de enfermedades (Zhu y cols., 2007; Jellinger, 2006). La polémica surge en torno al corto espacio de tiempo que se necesita para completar la apoptosis en cultivos neuronales y la naturaleza crónica de la patología neurodegenerativa. Se sabe que algunos de los mediadores de la cascada apoptótica pueden regular la apoptosis de forma bifuncional mostrando actividad pro- o anti-apoptótica. Por este motivo, algunos autores sugieren el término de “apoptosis abortiva” (también “abortosis”) (Raina y cols., 2001, 2003) para definir el hecho de que las proteínas reguladoras de apoptosis podrían retrasar la muerte neuronal, prolongando la supervivencia de las células nerviosas de forma aberrante y sin controlar el proceso de muerte celular programada.

La muerte por autofagia o *autofagocitosis* es un mecanismo altamente conservado que garantiza la homeostasis celular a través del recambio y la degradación de componentes intracelulares incluyendo proteínas y agregados proteicos patológicos, orgánulos y otras estructuras celulares en los lisosomas (Lockshin y Zakeri, 2004; Hara y cols., 2006; Komatsu y cols., 2006). La actividad autofágica está comprometida en enfermedades relacionadas con el envejecimiento y, en particular en la EA (Lockshin y Zakeri, 2004).

Están descritas tres vías de autofagia: *macroautofagia* en la que una membrana encierra una región de citosol y lo que en esta se encuentre, formándose el autofagosoma que después se fusionará con el lisosoma; la *microautofagia* en la que se produce una invaginación en el lisosoma encerrando una porción de citosol y sus componentes; la *autofagia mediada por chaperonas* en la que se reconocen determinadas proteínas citosólicas por chaperonas y, a través de la unión con receptores, entran en el lisosoma. En la EA se ha visto inducción de los mecanismos de macroautofagia en neuronas vulnerables en estadios tempranos de la enfermedad y también en ratones doble transgénicos APP/PS1 (Nixon y cols., 2005; Yu y cols., 2005a). En estas etapas, la regulación de la autofagia es necesaria para la eliminación satisfactoria de proteínas tóxicas y agregados (Nixon y cols., 2005) y conforme avanza la enfermedad, la eficacia del proteasoma y del sistema lisosomal disminuye (Yu y cols., 2005a). En consecuencia, se acumulan numerosas vesículas autofágicas dentro de las neuronas afectadas que, con el tiempo, liberarán las enzimas y productos tóxicos de su interior al citosol que pueden iniciar procesos apoptóticos o necróticos (Nixon, 2000; Boland y Campbell, 2004; Jellinger y Stadelmann, 2001). Un mecanismo propuesto recientemente indica que la presencia persistente de vesículas autofágicas en la célula puede ser transformada en una fuente interna de A β ya que las vesículas pueden contener APP y secretasas, contribuyendo al depósito de A β en la EA (Yu y cols., 2005a).

Se ha sugerido que la autofagia puede ser un mecanismo protector en las neuronas que reciben señales de apoptosis y presentan daños mitocondriales. Un número creciente de evidencias sugiere que existe una íntima asociación entre autofagia y apoptosis señalando tanto la posibilidad de que las alteraciones en autofagia puedan inducir muerte apoptótica en las neuronas afectadas en la EA (Brunk y Terman, 2002; Tolkovsky y cols., 2002) como que cuando se inhibe la vía de las caspasas, propia de apoptosis, la autofagia sea una vía alternativa de muerte (revisado en Camins y cols., 2008).

4-. MECANISMOS DE NEURODEGENERACIÓN EN LA EA

4.1-. β -Amiloide

Aunque hoy no sabemos con exactitud la causa exacta de la EA, la hipótesis de A β es, de momento, el marco conceptual mejor definido y considerado. La presencia de

las placas de A β , se considera la característica definitoria de la EA. Principalmente, la hipótesis de amiloide, que se propuso en los inicios de los años 90 (Hardy y Higgins, 1992; Selkoe, 1991), dice que un incremento en la producción de A β o una disminución en su eliminación, inician los procesos que desencadenan la EA. La acumulación de las formas hidrofóbicas de los péptidos A β 40 y A β 42, da lugar a la formación de placas insolubles que son iniciadoras de cambios que acaban provocando la muerte neuronal y, por tanto la EA (figura 4). Desde distintas áreas de la biología son numerosas las evidencias que apoyan la hipótesis del amiloide (Crouch y cols., 2008; Hardy y Selkoe, 2002; Price y cols., 1998; Wakabayashi y De Strooper, 2008; Walsh y Selkoe, 2007; Yankner y Lu, 2009). Por una parte, las mutaciones en PS1, PS2 y APP, que dan cuenta de la mayoría de casos de la EAF parecen incrementar la generación de A β o los niveles de A β 42. Por otro lado, estudios *in vitro* han demostrado la naturaleza tóxica de los péptidos amiloideos al inducir muerte neuronal por apoptosis y pérdida dendrítica y sináptica. Los mismos hechos se observaron *in vivo* al inyectar en cerebros de ratones A β fibrilar (revisado en Pimplikar, 2009). En animales, en los que se han utilizado terapias (inmunes y no inmunes) contra A β , se ha visto una reducción en la carga de placas amiloideas así como mejoras en las funciones cognitivas y de memoria (Radde y cols., 2008).

Con el tiempo, la hipótesis inicial de la cascada de amiloide ha sido sometida a cambios y variaciones, fundamentalmente en lo que se refiere a que A β sea el iniciador de los cambios que originan la enfermedad (figura 4).

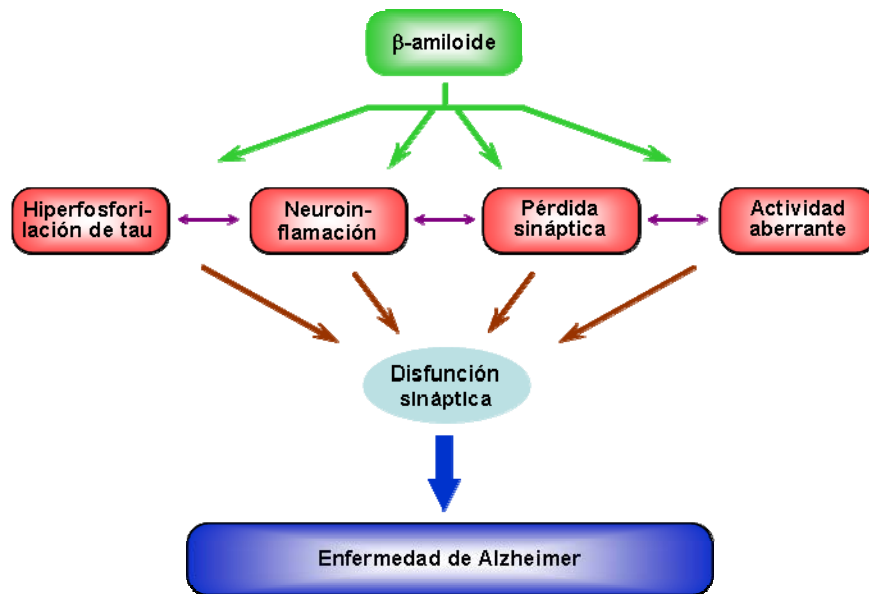


Figura 4. Hipótesis de β -amiloide. En este esquema se representa la visión clásica de la hipótesis que concede al $A\beta$ la posición inicial como causa de la EA. El bloqueo de los efectos de $A\beta$ por encima de los otros hechos que ocurren en la EA evitaría la enfermedad. Tomado de Pimplikar y cols., 2009.

La idea original de que las placas de $A\beta$ son patogénicas está en contraposición con el hecho de que la cantidad de placas en enfermos no correlaciona con su grado de demencia (Terry y cols., 1991) y muchos pacientes con EA, con severos déficits de memoria, no presentan placas de $A\beta$. Por otro lado, un gran número de modelos de ratones de EA, muestran déficits de memoria meses antes de encontrarse placas en sus cerebros (Lesne y cols., 2008) y en otros estudios con modelos de ratones para la EA que presentan un número elevado de placas y déficits de memoria, se ha visto que al introducir una mutación adicional en la cola citoplásmica de APP, se producía una mejora en el déficit de memoria sin reducción en la carga de placas amiloideas (Galvan y cols., 2006). En tercer lugar, aunque se habían visto en estudios postmortem, las recientes técnicas de neuroimagen *in vivo* de tomografía por emisión de positrones utilizando agentes de contraste, han permitido visualizar la presencia de placas sólidas de $A\beta$ en individuos cognitivamente normales (Nordberg, 2008; Villemagne y cols., 2008) y, aunque es posible que este conjunto de individuos pudiera ser susceptible de desarrollar la EA, los resultados, al menos, sugerían que la presencia de placas no era equiparable a los déficits de memoria de los individuos. Esta observación llevó a pensar que quizás las placas insolubles no inician los eventos patológicos sino que podrían ser beneficiosas o protectoras (Caughey y Lansbury, 2003). En último lugar, estudios recientes en pacientes vacunados contra $A\beta$ mostraron que la eliminación de las placas

no se acompañaba de una mejora en el déficit cognitivo de los enfermos (Holmes y cols., 2008).

Estas discrepancias en relación a la hipótesis de amiloide quizás se deban a que no se sabe con precisión que tipo de los agregados posibles de A β tienen verdaderamente efectos tóxicos. Inicialmente, se propuso que el incremento en los niveles del péptido A β 42 podrían iniciar la cascada de eventos deletéreos que dan lugar a la enfermedad ya que se encontraron niveles más elevados de A β 42 en pacientes con EA (Younkin, 1995), en muchos casos causados por las mutaciones en APP y en PS1. Pero también se observó que algunas mutaciones de PS1 no incrementaban los niveles de A β 42 sino que más bien disminuían los niveles del péptido A β 40 (revisado en Pimplikar, 2009). Esta observación llevó a proponer que un incremento en el cociente A β 42/A β 40, más que los niveles absolutos de A β 42, podría ser realmente el iniciador de los hechos que conducen a la EA. Esto también se apoya en la observación de que el incremento en este cociente está generalmente relacionado con la edad de diagnóstico de la EA (Bentahir y cols., 2006).

Por otra parte, la idea de que agregados solubles de A β (oligómeros) pueden ser agentes patogénicos causantes de la enfermedad, ha despertado gran interés dentro del campo de estudio de la EA (Glave, 2005; Klein y cols., 2001; Walsh y Selkoe, 2004, 2007), descartando que sean el A β fibrilar o las formas monoméricas los responsables de la interrupción de la plasticidad sináptica, ya que en algunos estudios *in vivo* e *in vitro*, estas conformaciones no indujeron muerte neuronal ni pérdida dendrítica (revisado en Pimplikar, 2009). Además, muchos grupos han demostrado la toxicidad en sistemas modelo (cultivos neuronales y animales) de algunos oligómeros de A β , bien aislados de cerebros de modelos murinos de EA (Lesne y cols., 2006) o bien procedentes de cerebros de pacientes con la enfermedad (Shankar y cols., 2008).

Las investigaciones sobre la implicación de A β en la EA no son concluyentes para aceptar la hipótesis del amiloide tal como se presentó inicialmente, otorgando a A β un papel principal en el inicio de la cascada de eventos deletéreos como causa original de la EA (figura 4). Esta visión clásica concede a otros hechos característicos de la EA como la hiperfosforilación de la proteína tau, la neuroinflamación, la pérdida sináptica, etc., una posición por debajo del efecto de A β y, con el tiempo, estos hechos contribuirían a la disfunción sináptica causando la muerte neuronal. Además, propone que bloqueando los efectos de A β se evitarían los efectos colaterales de la EA y se

prevendría la enfermedad. En cambio, una revisión de la literatura apoya otra hipótesis en la que $A\beta$, en lugar de actuar por encima, ejercería sus efectos al mismo nivel que los otros hechos característicos de la enfermedad que a su vez podrían ser consecuencia de otros factores distintos de $A\beta$ (figura 5).

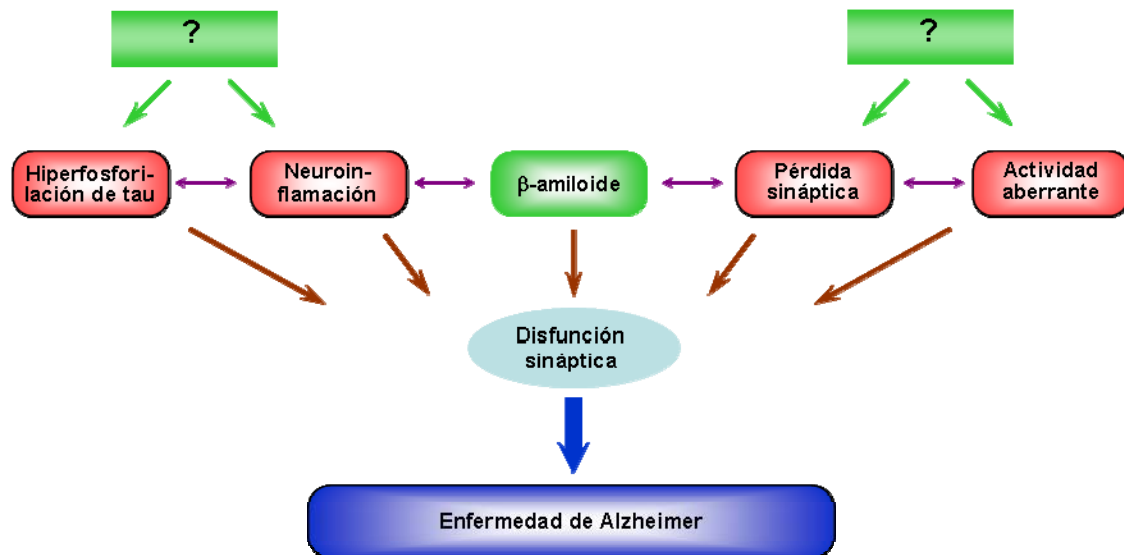


Figura 5. Hipótesis de β -amiloide revisada. En este esquema se representa una visión de la hipótesis de $A\beta$ más acorde con los datos que se dispone actualmente. Esta hipótesis revisada sugiere que los eventos deletéreos que conducen a la EA son causados tanto por $A\beta$ como por otros factores no amiloideos y el bloqueo de los efectos de $A\beta$ sólo será efectivo en algunos casos de la EA. Tomado de Pimplikar, 2009.

3.2.- Colesterol

Algunos autores, basándose en estudios *in vitro* y con animales, afirman que niveles elevados de colesterol promueven la producción de $A\beta$ (Kuller, 2007) y conceden al colesterol cierta relevancia en el desarrollo de la EA (Simons y cols., 2001; Wolozin y cols., 2004). También, se ha constatado una relación entre EA e hipercolesterolemia en casos de hipertensión y enfermedades coronarias (Kalback y cols., 2004). Diversos estudios clínicos y experimentales han sugerido que alteraciones vasculares y hemodinámicas cerebrales pueden desempeñar un papel importante en la progresión de la EA (Skoog y Gustafson, 2002). Por otra parte, se ha visto que la regulación en la homeostasis del colesterol parece estar perturbada en la EA, así como el alelo $\epsilon 4$ de ApoE (principal lipoproteína del cerebro) ha sido identificado como un importante factor de riesgo de la EA (Selkoe, 2001; Papassotiropoulos y cols., 2005). El 25% del colesterol del cuerpo se encuentra en el sistema nervioso central (SNC),

contenido en las membranas plasmáticas de las neuronas y en las vainas de mielina axonales (Dietschy y Turley, 2001). Las alteraciones en los mecanismos homeostáticos que mantienen los niveles de colesterol (perfil genético, ambiente, envejecimiento, dieta,...) pueden contribuir a un deterioro en la función celular y a la aparición de la enfermedad (Maxfield y Tabas, 2005). En la EA, el complejo γ -secretasa cataliza la proteólisis de APP en la región de la proteína que se encuentra dentro de la bicapa lipídica hidrofóbica de la membrana plasmática. Por tanto, cualquier perturbación en los niveles, el tráfico y la localización del colesterol que desorganice la estructura de la bicapa podría contribuir o acelerar la producción de $A\beta$. En algunos estudios con animales se ha visto que presentan elevados niveles de $A\beta$ en el cerebro cuando han sido sometidos a dietas ricas en colesterol y estos niveles remitían cuando la alimentación fue normal (Sparks y cols., 1994; Sparks, 1996; Refolo y cols., 2000). En estudios *in vitro* se ha visto que existe una correlación entre niveles altos de colesterol celular y una elevada producción de $A\beta$ (Fassbender y cols., 2001; Simons y cols., 1998). Adicionalmente, se ha visto que al reducir los niveles de colesterol se inhibe la producción de péptidos $A\beta$ en neuronas del hipocampo (Simons y cols., 1998) al mismo tiempo que se aumenta la actividad de α -secretasa en células en cultivo (Kojro y cols., 2001; Bodovitz y Klein, 1996). A pesar de las evidencias que aportan estos estudios, la forma por la que el colesterol puede modular el procesamiento de APP aún no está muy clara. Intentando elucidar los mecanismos que subyacen a esta modulación, se sugirió que el uso de drogas que disminuyen los niveles de colesterol como las estatinas, utilizadas ya en el tratamiento de enfermedades coronarias e hipercolestolemia (Athiros y cols., 2008; Nassief y Marsh, 2008; Mazighi y cols., 2007), podrían aportar algunas claves para su entendimiento ya que se observó en algunos trabajos de tipo epidemiológico, clínico y experimental que estas drogas disminuían el riesgo de EA (Jick y cols., 2000; Wolozin y cols., 2000, 2004; Wolozin, 2004; Rockwood y cols., 2002; Blain y Poirier, 2004; Finch, 2005). Las estatinas constituyen una familia de fármacos que son inhibidores competitivos de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa, que cataliza la etapa limitante en la síntesis del colesterol (Sviridov y cols., 2007; Zipp y cols., 2007). El uso de las estatinas también se ha propuesto para el tratamiento de procesos inflamatorios, cáncer, diabetes e incluso como drogas cardioprotectoras y neuroprotectoras. Se considera que la terapia con estatinas tiene pocos efectos secundarios y por ello puede ser bien tolerada por los

ancianos. Se administran como un precursor, lactona, inactivo, que se convierte después en el hígado en su forma activa (Cohen y cols., 2000; Davidson, 2001). Según datos del CSHA (Canadian Study of Health and Aging), el tratamiento con estatinas redujo en un 74% el riesgo de desarrollar EA en comparación con la población en general (Rockwood y cols., 2002). En otros estudios, también se observó una disminución del riesgo de contraer la enfermedad entre pacientes tratados con estatinas y otros que recibían otro tipo de terapia para la función cardiovascular (Wolozin y cols., 2000). En los resultados se apreció que el tratamiento se asociaba a una reducción significativa de la incidencia de demencia en sujetos de 65 ó más años de edad. Contrariamente, también existen resultados de estudios epidemiológicos longitudinales que no han podido demostrar una reducción en el riesgo de EA para individuos a los que se les administraron estatinas (Jick y cols., 2000).

3.3-. Hiperfosforilación de tau

La hiperfosforilación de la proteína tau es un hecho característico de un conjunto de enfermedades neurodegenerativas llamadas *taupatías* que incluyen a la EA (Buee y cols., 2000). Tau es una proteína asociada a microtúbulos (MAP) que se expresa principalmente en el cerebro, aunque también se ha descrito su expresión en células no neuronales, como es el caso de fibroblastos humanos. Esta proteína es hidrofílica y posee una estructura filamentosa (Hirokawa y cols., 1988). Se han observado diferentes polipéptidos de tau gracias al análisis de proteínas procedentes de extractos cerebrales como consecuencia del procesamiento alternativo de ARN (Himmler, 1989) y debido a la existencia de diferentes niveles de fosforilación de la proteína (Goedert y cols., 1992). La función normal de la proteína tau es ensamblar y estabilizar los microtúbulos manteniendo la estructura del citoesqueleto íntegra (Lee y cols., 2001), aunque también puede jugar un papel regulador de procesos como el transporte axonal (Mandelkow y cols., 2004). El funcionamiento correcto de la proteína tau depende de su estado de fosforilación controlado a su vez por la acción de quinasas y de fosfatasas. Una hiperactividad de quinasas al mismo tiempo que una reducción en la actividad de fosfatasas (en concreto PP2A y PP2B), inclina la balanza hacia una mayor fosforilación cuyo último escalón es la aparición de la patología. Se han propuesto al menos 77 sitios posibles de fosforilación de tau, en residuos de serina o de treonina. Estos sitios de fosforilación se dividen en dos grupos principales: los que pueden ser modificados por

quinasas dirigidas por prolinas, como es el caso de la quinasa glucógeno sintasa 3 (GSK3), quinasa dependiente de ciclina (CDK5), quinasas activadas por mitógenos (MAPK), como p38 o JNK y también, las quinasas activadas por estrés (SAPKs). En el otro grupo están aquellos sitios que pueden ser modificados por quinasas independientes de prolinas, tales como quinasa reguladora de la afinidad del microtúbulo (MARK) o la proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+} y calmodulina (CaMKII) (Imahori y Uchida, 1997; Goedert y cols., 1997; Correas y cols., 1992; Drewes y cols., 1992; Scott y cols.; 1993; Hanger y cols., 1992; Lucas y cols.; 2001).

La fosforilación anormal de tau en enfermedades neurodegenerativas esta asociada a sitios de fosforilación en residuos de serina/treonina dirigidos por prolina (Lee y cols., 2001). Se cree que las quinasas que inician este proceso de hiperfosforilación son CDK5 y GSK3 β (Hanger y cols., 1992; Ishiguro y cols., 1992; Mandelkow y cols., 1992; Paudel y cols., 1993). CDK5 se encuentra localizada en depósitos filamentosos de tau y, su actividad, está incrementada en algunas taupatías entre las que se incluye la EA (Shelton y cols., 2004). Del mismo modo, GSK3 β , se localiza en agregados de tau hiperfosforilada (Ishizawa y cols., 2003). También, se ha podido demostrar que A β , actuando como antagonista de receptores de insulina, produce un aumento en la actividad de GSK3 β (Xie y cols., 2002) y, por tanto, en la hiperfosforilación de tau (Álvarez y cols., 1999).

La hiperfosforilación de tau en el fenómeno de neurodegeneración es un hecho fácilmente visible, debido a que provoca su disociación de los microtúbulos y su agregación en forma de PHF. La disociación de tau de los microtúbulos produce una desestabilización del citoesqueleto y alteraciones en la geometría celular, en el transporte intracelular y, finalmente, en la viabilidad neuronal (Smale y cols., 1995; Troncoso y cols., 1996; Evans y cols., 2000).

3.4.- Estrés oxidativo

Existen numerosos estudios realizados en cerebros humanos postmortem que relacionan los procesos de envejecimiento y muerte neuronal con el estrés oxidativo y, más concretamente, con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Zhu y cols., 2004c, 2005; Moreira y cols., 2004; Castellani y cols., 2004). Así, se ha visto un incremento en varios biomarcadores de estrés oxidativo en regiones afectadas de tejido

cerebral postmortem de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad del prión, enfermedad de Huntington y parálisis supranuclear progresiva (Andersen, 2004; Barnham y cols., 2004). El análisis de necropsias de pacientes con EA ha revelado, igualmente, la existencia de marcadores de estrés en zonas afectadas por la enfermedad junto con abundante presencia de placas neuríticas y ovillos neurofibrilares (Sayre y cols., 2001). También se han encontrado signos de estrés oxidativo en células extraneurales de pacientes con EA (Mecocci y cols., 1998). Asimismo, se han visto estos marcadores gracias al estudio de cerebros postmortem de algunos individuos con síndrome de Down. Los individuos con esta enfermedad desarrollan demencia tipo alzhéimer y tienen una expectativa de vida corta, probablemente debido a un exceso de producción de ROS en su cerebro (Stefanis, 2005). Estas observaciones sugieren que el estrés oxidativo no es una mera consecuencia de la enfermedad, sino que puede estar determinado genéticamente (Eckert y cols., 2003). Algunos autores han sugerido que las alteraciones en la función mitocondrial y el estrés oxidativo son eventos iniciales en la patogénesis de la EA (Castellani y cols., 2002; Nunomura y cols., 2001).

La conexión entre las alteraciones mitocondriales con el estrés oxidativo y la muerte neuronal podría ser que el aumento en los niveles de Ca^{2+} en el citoplasma aumenta la cantidad de ROS y la liberación de proteínas proapoptóticas desde la mitocondria al dispararse los mecanismos de apertura del poro mitocondrial de permeabilidad transitoria (PTPC) (Hynd y cols., 2004; Zhu y cols., 2004b). Esta hipótesis se apoya en la observación de que varios agentes neurotóxicos como el glutamato o el $\text{A}\beta$ inducen apoptosis a través de incrementos en los niveles de Ca^{2+} citoplásmico (Harada y Sugimoto, 1999; Jordan y cols., 1997). Además, en experimentos de sobreexpresión de mutantes humanas de APP, PS1 o PS2 en cultivos celulares, se han visto alteraciones en la función mitocondrial, y un aumento en los niveles de anión superóxido asociados con el proceso apoptótico (Guo y cols., 1999; Perry y cols., 2002). Resultados similares se han obtenido con células neurales y extraneurales procedentes de animales modificados genéticamente para sobreexpresar mutaciones en APP o PS (Guo y cols., 1999; Matsuoka y cols., 2001; Eckert y cols., 2001a, 2001b, 2003). También, se ha visto en estudios *in vitro* que los quelantes de Ca^{2+} , BAPTA-AM y EGTA, poseen capacidad neuroprotectora ante varios estímulos neurotóxicos (Guo y cols., 2004). Es importante resaltar que el cerebro es altamente sensible al daño producido por ROS debido a su baja capacidad antioxidante y a que es un tejido rico en ácidos grasos. Según el sustrato, un aumento en la producción de ROS,

puede dar lugar a oxidación de proteínas, daños en el ADN y peroxidación lipídica. Existe un modelo de muerte celular neuronal que está basado en la hipótesis de que el incremento en los niveles cerebrales del aminoácido excitatorio glutamato, juega un importante papel en la neurodegeneración (Hynd y cols., 2004). Este proceso implica incrementos en los niveles de Ca^{2+} intracelulares, producción de ROS en la mitocondria y, finalmente, apoptosis.

Ya que la producción de ROS puede ser un mecanismo fundamental en gran variedad de enfermedades neurodegenerativas, actualmente, se investiga el papel de algunos antioxidantes como agentes terapéuticos (Nakashima y cols., 2004; Behl, 2000; Feng y Zhang, 2004a, 2004b). Los antioxidantes son compuestos que reaccionan con ROS inactivándolas. Existe un gran número de resultados acerca de los efectos de algunos antioxidantes sobre la EA. De todos ellos, los más significativos son los que hacen referencia a la vitamina E, retrasando la progresión de la enfermedad e incrementando moderadamente la supervivencia de los pacientes tratados (Castellani y cols., 2004; Zhu y cols., 2004b; Behl, 2000). En un estudio realizado sobre el papel de la vitamina E en un modelo animal murino de taupatías se concluyó que el estrés oxidativo estaba involucrado en la neurodegeneración inducida por la proteína tau y que la vitamina E tenía un importante papel neuroprotector (Nakashima y cols., 2004). Por otra parte, en estudios *in vitro* se ha visto que algunos antioxidantes proporcionan neuroprotección y tienen un efecto antiapoptótico contra el daño neuronal producido por $\text{A}\beta$ aunque su eficacia en ensayos clínicos todavía no es muy clara (Feng y Zhang, 2004a, 2004b; Dhitavat y cols., 2002).

3.5.- Inflamación

Otro marcador clave de la EA es la presencia de inflamación crónica, algo común a otras enfermedades neurodegenerativas (Hoozemans y O'Banion, 2005; Patrignani y cols., 2005; Minghetti, 2004; Vasto y cols., 2006, 2007, 2008). La inflamación es una respuesta inespecífica para eliminar la causa de un daño original producido sobre un órgano o tejido. Si el tejido inicialmente sano no se restablece en respuesta al daño, la inflamación se convierte en una condición crónica que puede afectar también a otros tejidos adyacentes. Este daño puede persistir durante largos periodos de tiempo, sin causar síntomas, hasta que finalmente se produce un deterioro severo del tejido afectado. En el cerebro de pacientes de alzhéimer, no aparecen los hechos característicos de una inflamación aguda (tumefacción, rubor, calor y dolor) y,

por tanto, en la EA se habla de inflamación crónica (Akiyama y cols., 2000). Un hecho característico de este tipo de inflamación es un incremento en la presencia de monocitos y macrófagos derivados de monocitos (por ejemplo, células de microglía en el SNC) (Akiyama y cols., 2000).

En regiones del cerebro del paciente con EA, patológicamente vulnerables, aparece un aumento en la expresión de proteínas de fase inflamatoria aguda, activación de microglía y citoquinas proinflamatorias, marcadores casi nunca presentes en el cerebro sano (Griffin y Mrak, 2002; Cacquevel y cols., 2004; Mrak y Griffin, 2005; Finch y Morgan, 2007). Entre ellos destacan las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α , así como las quimioquinas IL-8, proteína inflamatoria de macrófagos-1 α y proteína quimioatrayente de monocitos-1 y otras proteínas relacionadas con el proceso inflamatorio (Mrak y cols., 1995; Griffin y cols., 1998; Akiyama y cols., 2000; Town y cols., 2005; Tuppo y Arias, 2005). Comparando la expresión de genes en regiones vulnerables de pacientes de EA y donantes controles de edad aproximada, se ha confirmado un aumento en la expresión de genes relacionados con procesos inflamatorios, tales como IL-1 α , IL-1 β , COX-2 o NF- κ B (Blalock y cols., 2005; Colangelo y cols., 2002). Por otra parte, se ha visto mayor presencia en casos de EA de algunos polimorfismos funcionales, principalmente de tipo SNPs, en la región promotora o en otras regiones no traducidas, de genes codificadores de mediadores inflamatorios o las enzimas implicadas en sus vías de señalización. Las respuestas primarias son mediadas por receptores de reconocimiento de patógenos como, por ejemplo, *Toll-like-receptor* (TLR), citoquinas proinflamatorias como TNF α , IL-1 e IL-6 y citoquinas antiinflamatorias como IL-10 y eicosanoides (Imahara y O'Keefe, 2004; Vasto y cols, 2007). Algunos trabajos muestran que la variación genética inflamatoria puede contribuir a la susceptibilidad en la EA, fortaleciendo la hipótesis del papel de la inflamación en la enfermedad. Revisando la literatura podemos encontrar que los genotipos proinflamatorios aparecen de forma más significativa en pacientes con EA, al contrario que los genotipos antiinflamatorios (Candore y cols., 2006, 2007; Vasto y cols., 2007) apuntando a que un estudio genético individual podría mostrar la existencia de una predisposición hacia la inflamación, contribuyendo hacia su resolución crónica o total (revisado en Vasto y cols., 2008).

A pesar de estas evidencias, es difícil discriminar si el proceso inflamatorio aparece antes de la patología o es una reacción compensatoria al proceso

neurodegenerativo. Hay que tener en cuenta, además, que muchos de los factores inmunes y proteínas inflamatorias tienen múltiples funciones y su mera presencia no indica si tiene efectos beneficiosos o perjudiciales. Una de las aportaciones que contribuyó a responder esa pregunta fue la demostración de que A β activa el complemento (Rogers y cols., 1999; Eikelenboom y Stam, 1982), aunque de forma distinta a la activación clásica por anticuerpos (Webster y cols., 1999) y dando lugar a la producción de toxinas anafilácticas que a su vez amplifican el proceso inflamatorio. Por otra parte, A β participa en el proceso neuroinflamatorio a través de varios mecanismos: a) activación de factores de transcripción como, por ejemplo NF- κ B y AP-1 (Ferrer y cols., 1997; Tang y cols., 2004); b) mediante la activación del receptor CD40 (Tan y cols., 1999; Townsend y cols., 2005); y c) mediante el receptor γ activador de proliferación de peroxisomas (PPAR γ) (Sun y cols., 2002; Townsend y Praticò, 2005). Los depósitos extracelulares de A β pueden ser iniciadores del proceso inflamatorio representando un estímulo crónico que el sistema inmune innato intenta hacer desaparecer (Town y cols., 2005). Las células de la glía activadas de forma crónica, pueden provocar la muerte de las neuronas adyacentes mediante la liberación de productos altamente tóxicos como ROS, óxido nítrico, enzimas proteolíticas, factores del complemento o aminoácidos excitatorios (Halliday y cols., 2000). Estos mediadores inflamatorios y algunas condiciones de estrés aumentan la producción de A β 42 al tiempo que se impide la producción de la fracción soluble de APP y su efecto protector neuronal (Del Bo y cols., 1995; Ringheim y cols., 1998; Fassbender y cols., 2000; Misonou y cols., 2000; Atwood y cols., 2003). Simultáneamente, A β puede inducir la expresión de citoquinas proinflamatorias en células de la glía dando lugar a un mecanismo de retroalimentación (Griffin y cols., 1998; Lindberg y cols., 2005).

Como se ha mencionado anteriormente, la inflamación puede ser un efecto compensatorio en los procesos neurodegenerativos crónicos. La activación de la microglía parece facilitar la eliminación de placas de A β (Wilcock y cols., 2004). Basándose en estudios previos, unos que demostraban reducciones en la presencia de placas amiloideas en ratones transgénicos que expresan mutaciones en la APP humana tras su inmunización con anticuerpos anti-A β (Monsonogo y Weiner, 2003) y, otros, en los que se observaba la aparición de depósitos de A β en el parénquima cerebral de ratones carentes del factor estimulante de macrófagos (M-CSF) (Kaku y cols., 2003), se desarrolló la primera vacuna contra la EA mediante inmunización de pacientes con

A β 42 (AN-1792, Elan Pharmaceuticals Inc) (Nicoll y cols., 2003). Aunque la vacuna fue eficaz eliminando las placas seniles en el ensayo clínico realizado a 400 pacientes, también tuvo consecuencias negativas porque algunos de ellos desarrollaron inflamación de las meninges y encefalitis.

La activación de la microglía puede ser debida a inflamación local o sistémica. De hecho, un fuerte estímulo local inflamatorio como es una contusión craneal, es un factor de riesgo para la EA (Wilson, 2003). Pero, por otra parte, en varios estudios epidemiológicos, se ha visto claramente que el aumento de los niveles en sangre de proteínas de la fase inflamatoria aguda, puede ser un factor de riesgo para desarrollar deterioros cognitivos y demencia (Schmidt y cols., 2002). Además, en estudios realizados con animales de experimentación, se ha comprobado que la respuesta inflamatoria sistémica crónica, inducida al administrar lipopolisacárido (LPS), también induce activación de la glía (Sheng y cols., 2003).

La importancia de la inflamación en la EA está ampliamente reforzada por los datos que muestran que el uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) disminuyen el riesgo de desarrollar EA. En un estudio realizado por B. A. int' Veld y cols., se obtuvo como resultado una menor incidencia de EA para los individuos a los que les administraron AINEs durante dos años frente a los que el tratamiento fue de menos de un mes (int' Veld y cols., 2001). En otros estudios realizados *post hoc*, se redujo la incidencia de alzhéimer alrededor de un 13% con aspirina y un 28% con AINEs (McGeer y cols., 1996; Breitner, 2003; Etminan y cols., 2003). También, en modelos murinos de EA, se ha observado la eficacia de estas drogas reduciendo las placas de A β , la activación de la microglía y disminuyendo los niveles locales de IL-1 α (Morgan y cols., 2000). Debido a la disparidad de resultados obtenidos en humanos y en ratones transgénicos con el uso de AINEs, se piensa que estas drogas pueden tener efectos pro- y anti-inflamatorios dependiendo de su especificidad con la proteína diana (COX-1, COX-2 u otras).

3.6-. Excitotoxicidad

La excitotoxicidad es la muerte celular apoptótica producida por una activación excesiva de los receptores ionotrópicos (Mayer, 2005). El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del cerebro y desempeña un papel principal en la fisiología del mismo. Realiza sus efectos a través de la interacción con dos tipos de receptores: los

ionotrópicos y los metabotrópicos (Mayer, 2005; Palmer y cols., 2005; Wang y Shuaib, 2005). Estudios realizados en cultivos celulares han demostrado que el glutamato media la muerte celular a través de la activación de los receptores ionotrópicos N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propionato (AMPA) y kainato. Concentraciones fisiológicas de glutamato son necesarias para el desarrollo de funciones de aprendizaje y memoria, pero una estimulación excesiva de los receptores NMDA por glutamato se ha vinculado con la muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas (Wang y Shuaib, 2005; Arundine y Tymianski, 2003). En condiciones de no activación, el receptor NMDA está bloqueado por Mg^{2+} . Cuando es activado por un agonista como glutamato se produce una despolarización de la membrana celular, se libera el Mg^{2+} y se permite la entrada en la célula de iones como Ca^{2+} . Si la concentración de glutamato extracelular es elevada, se producirá una entrada masiva de Ca^{2+} al citoplasma que, en último término, produce muerte celular. Se piensa que este mecanismo induce daño neuronal en condiciones tales como ictus, episodios epilépticos y neurotrauma (Van Den Bosch y cols., 2006). En contraste con este tipo de excitotoxicidad, existe la excitotoxicidad leve, en la que las concentraciones de glutamato son las fisiológicas pero se produce muerte neuronal por apoptosis debido a alteraciones mitocondriales sobrevenidas por los procesos de envejecimiento o por debilitamiento de la neurona, la cual no puede mantener el bloqueo por Mg^{2+} del receptor NMDA y queda constantemente activado (Van Den Bosch y cols., 2006; Lancelot y Beal, 1998). El daño mitocondrial produce una disminución en los niveles de ATP, necesarios para una correcta despolarización de la membrana e induce un aumento en la producción de ROS. Acto seguido, se produce activación de caspasas, liberación de AIF y, finalmente, la muerte de la célula por apoptosis (Hara y cols., 2005; Wenk, y cols., 2006). Este tipo de excitotoxicidad se produce en enfermedades neurodegenerativas crónicas tales como Parkinson, EA y ELA (Van Den Bosch y cols., 2006; Koutsilieri y Riederer, 2007).

3.7-. Ciclo celular

Hace años, los conceptos de división y muerte celular parecían dos procesos separados y totalmente opuestos pero, últimamente, se ha mostrado que existe una fuerte relación entre ciclo celular y muerte de neuronas maduras, apuntando a que el proceso neurodegenerativo pudiera ser el resultado de alteraciones o modificaciones en

el ciclo celular (Arendt y cols., 1996; Giovanni y cols., 1999; Copani y cols., 2001a, 2001b, 2002a, 2002b; Hou y cols., 2000; Yang y cols., 2001; Jordan-Sciutto y cols., 2002).

El ciclo celular consiste en una serie de eventos que conducen al crecimiento de la célula, replicación del ADN, segregación cromosómica y, finalmente, la obtención de dos células hijas de una célula madre original. Consta de cuatro fases: G₁, S, G₂ y M. La fase G₁ es la fase del crecimiento y preparación. Sigue la fase S, en la que la maquinaria sintética del ADN replica el material genético en la célula y se dobla el número de cromosomas. Después, en la fase G₂, la célula se prepara para la división. Finalmente, en la fase M, los cromosomas se condensan y se dirigen a los polos opuestos de la célula y se escinde el citoplasma, obteniendo dos células hijas. En la progresión del ciclo, existen una serie de moléculas reguladoras que actúan a lo largo del mismo: las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). Su activación varía con las fases del ciclo de acuerdo a su estado de fosforilación. Al mismo tiempo, existen una serie de inhibidores del ciclo celular que actúan conjuntamente regulándolo y contribuyendo al control del proceso evaluando posibles daños y deteniendo el progreso del ciclo en alguno de los puntos de control establecidos (Grana y Reddy, 1995).

En el desarrollo del SNC, los neuroblastos (células progenitoras de las neuronas) abandonan la zona ventricular o la zona subventricular y, finalmente, se convierten en neuronas maduras que conservarán un estado postmitótico permanente hasta que el individuo muere. Estas neuronas se integrarán en redes sinápticas sustentadas por una serie de señales celulares que al mismo tiempo mantienen a las neuronas en estado quiescente diferenciado (Arendt, 2003). Pero si por cualquier causa, una neurona madura es forzada a volver a entrar en ciclo celular, ésta muere (Yang y Herrup, 2007). Sobre este aspecto, uno de los primeros ejemplos que demostró la conexión entre ciclo celular y muerte en neuronas maduras fue el trabajo realizado por Feddersen y cols., en 1992. Los autores, expresaron en ratones el oncogén antígeno T del virus SV40 utilizando el promotor del gen *pcp-2*, específico de células de Purkinge. Observaron que los ratones desarrollaban ataxia cerebelosa cuya causa era la muerte de un gran número de células de Purkinge. El oncogen había provocado la entrada con éxito en ciclo celular de estas neuronas pero por alguna causa desconocida no podían completar su división (Feddersen y cols., 1992). Un experimento reciente realizado con ratones que expresan de manera inducible el mismo oncogen de SV40, confirmó la degeneración neuronal tras la activación del ciclo celular (Park y cols., 2007), descartando que las

observaciones se debieran a fallos en el desarrollo del SNC. En el mismo año que Feddersen y cols., otros autores demostraron que la ausencia de la proteína del retinoblastoma (pRb), implicada en la regulación de la progresión del ciclo, producía una masiva muerte celular durante el desarrollo del SNC de estos ratones deficientes en pRb (Clarke y cols., 1992; Jacks y cols., 1992; Lee y cols., 1992).

Desde la realización de estos primeros experimentos en los que se demostró una relación causal entre ciclo celular y muerte neuronal, se han realizado otros estudios que han confirmado las consecuencias de la activación del ciclo en neuronas diferenciadas. Concretamente, se ha mostrado esta asociación en trabajos realizados en cultivos celulares (Greene y cols., 2004; Park y cols., 1996, 1997; Appert-Collin, 2006; Giovanni y cols., 1999). Stefanis y cols., demostraron activación de CDKs tras el tratamiento de los cultivos con camptotecina, una droga que induce daños en el ADN (Stefanis y cols., 1999). Por otra parte, Padmanabhan y cols., vieron que la apoptosis inducida por privación de potasio en células granulares del cerebelo estaba mediada por un incremento en la expresión de proteínas relacionadas con el ciclo celular (Padmanabhan y cols., 1999). En un trabajo posterior vieron que la retirada de potasio en cultivos de neuronas de ratones deficientes en E2F inducía un aumento en la supervivencia neuronal (O'Hare y cols., 2000). Asimismo, examinaron el papel de E2F en la muerte neuronal inducida por excitotoxicidad, provocada por ácido kaínico, y comprobaron que el flavopiridol y la roscovitina, dos inhibidores de CDKs, impedían los efectos apoptóticos de la droga (Park y cols., 2000).

Otros autores propusieron una relación entre la activación del ciclo celular, apoptosis y daño en el ADN de neuronas producido por compuestos genotóxicos, descartando la activación del ciclo por otros estímulos sólo apoptóticos (colchicina, estaurosporina, etc.) (Kruman y cols., 2004). En este contexto, sugirieron un papel relevante como modulador de la re-entrada del ciclo celular, para la proteína quinasa ataxia telangiectasia mutada (ATM). Al suprimir la función de ATM, redujeron la activación del ciclo celular y la apoptosis inducidas por los compuestos genotóxicos, y no por estaurosporina o colchicina (Kruman y cols., 2004).

También es evidente la relación entre muerte y activación aberrante de ciclo celular en otros modelos animales como en los ratones con la mutación *staggerer* en los que algunas poblaciones neuronales presentaban niveles elevados de CDK4, PCNA e incorporación de Bromodeoxiuridina (BrdU) (Herrup y Busser, 1995), los ratones con la mutación *harlequin* (Klein y cols., 2002) y los creados recientemente con la expresión

inducible de c-Myc que, además de mostrar que la entrada en ciclo celular produce muerte neuronal, presentaban gliosis y déficits cognitivos (Lee y cols., 2009). En el cerebro de ratones tratados con ácido kaínico, Park y cols. observaron un incremento en la expresión de CDK4 y ciclina D1. Asimismo, el uso de oligonucleótidos antisentido de CDK4 y ciclina D1 protegió al cerebro de ratas contra la muerte neuronal inducida por excitotoxicidad (Park y cols., 2000; Kasten y Giordano, 1998).

En la EA, la hipótesis de que la muerte neuronal es el resultado de alteraciones o modificaciones en el ciclo celular está basada en estudios realizados sobre tejido cerebral postmortem de pacientes, en los cuales se ha visto un elevado incremento en la expresión de varias ciclinas como ciclina D, E y B, kinasas como CDK4, CDK6 y cdc2, otras proteínas como E2F, PCNA y pRb, inhibidores de CDKs como p16, p21, p27, p105, todas ellas relacionadas con la regulación del ciclo celular (Masliah y cols., 1993; Vincent y cols., 1996, 1997; Arendt y cols., 1996, 1998; Nagy y cols., 1997; McShea y cols., 1997; Busser y cols., 1998; Smith y cols., 1999; Luth y cols., 2000; Hoozemans y cols., 2002; Yang y cols., 2001, 2003). Pero todos estos trabajos daban lugar a la pregunta de si realmente lo que se observaba era una verdadera progresión del ciclo celular en neuronas o si, por el contrario, era el resultado de una desregulación global e inespecífica de la síntesis de proteínas. La respuesta vino de la mano del grupo de Yang y cols., que mediante la utilización de técnicas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH), demostraron que neuronas del hipocampo de pacientes de EA, prácticamente habían completado la fase S del ciclo celular pero sin llegar a iniciar el proceso mitótico, pues vieron replicación de ADN en 4 loci de 3 cromosomas distintos (Yang y cols., 2001). Ninguno de estos hechos fue visible en zonas del cerebro de los mismos individuos no afectadas por la enfermedad ni en cerebros de individuos no dementes. Estos autores también demostraron la expresión de proteínas relacionadas con el ciclo celular en estadios tempranos de la EA, cuando sólo existe un deterioro cognitivo leve (Yang y cols., 2003) y concluyeron que estas alteraciones del ciclo podrían ser marcadores tempranos de neurodegeneración. La correlación entre la expresión de proteínas del ciclo celular y apoptosis en la EA, se ha demostrado en experimentos *in vitro* en los que se trataron neuronas de la corteza cerebral con A β (Giovanni y cols., 1999, 2000). Asimismo, Copani y cols., también sugirieron que determinadas proteínas del ciclo celular, desempeñaban un papel apoptótico, demostrando reentrada en el ciclo celular y síntesis de ADN en neuronas tratadas con A β (Copani y cols., 2002a, 2002b). En otras investigaciones realizadas por este mismo grupo, se indicó que el gangliósido

GD3 y las CDKs ejercen funciones importantes en los mecanismos que conducen a la muerte neuronal en la EA (Copani y cols., 2001a, 2002b). Además, A β podría ser un estímulo oncogénico neuronal que activaría la ADN polimerasa- β induciendo la síntesis de ADN, a través de la expresión del factor de transcripción E2F (Hou y cols., 2000).

En otras enfermedades neurodegenerativas, también se han encontrado evidencias de la entrada en ciclo de división celular de ciertas neuronas. Así por ejemplo, en cerebros de pacientes con enfermedad de Parkinson, se ha demostrado un incremento en los niveles de expresión de proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular (Jordan-Sciutto y cols., 2003), además de cambios en la expresión de E2F y fosforilación de pRb (Hoglinger y cols., 2007). Igualmente, Nakamura y cols., implicaron al complejo CDK5/p35 en la formación de cuerpos de Lewy encontrados en cerebros postmortem de pacientes con enfermedad de Parkinson (Nakamura y cols., 1997). La inyección intraestriatal de la neurotoxina 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) en ratas, un modelo experimental utilizado para la enfermedad de Parkinson, indujo apoptosis en la sustancia nigra, incorporación de BrdU y dio lugar a la sobreexpresión de CDK1 (Hou y cols., 2000, 2001). Esta fue la primera evidencia *in vivo* de la expresión de marcadores propios de las fases S y G₂ del ciclo celular en neuronas dopaminérgicas postmitóticas, antes de la inducción de apoptosis. El tratamiento con 6-OHDA se relacionó con la expresión del factor de transcripción E2F, que actuaba como señal apoptótica (Hou y cols., 2001).

Otra enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por una pérdida selectiva de neuronas motoras en la médula espinal y en la corteza cerebral y cuyo resultado final es parálisis es la esclerosis lateral amiotrófica. En estudios realizados sobre muestras tomadas de médula y de corteza cerebral de pacientes con ELA, se demostró un incremento en la expresión de ciclina D así como cambios en la localización de E2F en el citoplasma de las neuronas motoras otorgando a este factor de transcripción un papel modulador en apoptosis (Ranganathan y cols, 2001; Ranganathan y Bowser, 2003).

Los modelos *in vitro* de EA y de otras enfermedades neurodegenerativas, apuntan a que la activación del ciclo en neuronas postmitóticas es una condición necesaria y suficiente para producir su muerte. Sin embargo, en los modelos animales no ha sido fácil demostrar esta relación causa-efecto. Algunos de estos modelos, reproducen las mutaciones genéticas encontradas principalmente en la EAF como los ratones transgénicos que expresan las formas mutantes humanas de APP y APP/PS que exhiben placas neuríticas y difusas en una cantidad similar a la encontrada en los casos

avanzados de la enfermedad. También, presentan activación de microglía, astrocitosis, cambios en algunas proteínas del citoesqueleto neuronal incluido la proteína tau y, algunos de ellos, déficits significativos en el aprendizaje y la memoria (Lamb, 1995; Hsiao y cols., 1996; Holcomb y cols., 1998; Chen y cols., 1998, Lovasic y cols., 2005; Westerman y cols., 2002; Schenk, 2002; Games y cols., 1995; Stalder y cols., 1999; Sturchler-Pierrat, 1997). A pesar de las similitudes con las condiciones patológicas de la enfermedad, en ninguno de ellos se ha conseguido ver la formación de los ovillos neurofibrilares típicos de la EA humana y en pocos casos se ha visto una pérdida neuronal significativa (revisado por Hock y Lamb en 2001). Por estas razones, la posible relación entre la re-activación del ciclo celular y el proceso patogénico de la EA no se había estudiado en modelos murinos hasta hace muy poco tiempo.

Recientemente, sin embargo, el laboratorio de F. M. LaFerla ha obtenido un cuadro patológico más completo en un ratón triple transgénico (Oddo y cols., 2003; LaFerla y Oddo, 2005) y, son de destacar los trabajos del laboratorio de K. Herrup, con tres modelos diferentes de ratones transgénicos para la EA, en los que observaron que la aparición de las alteraciones del ciclo celular eran ya evidentes a los 6 meses de vida de los ratones (Yang y cols., 2006). Al igual que ocurre en la EA, la expresión de proteínas del ciclo celular aparece solamente en las zonas definidas como vulnerables (corteza, hipocampo) y no en otras zonas (*substancia nigra*) (Yang y cols., 2006). La figura 6 muestra algunas de las evidencias de entrada en ciclo celular en pacientes con EA y en modelos murinos de la enfermedad.

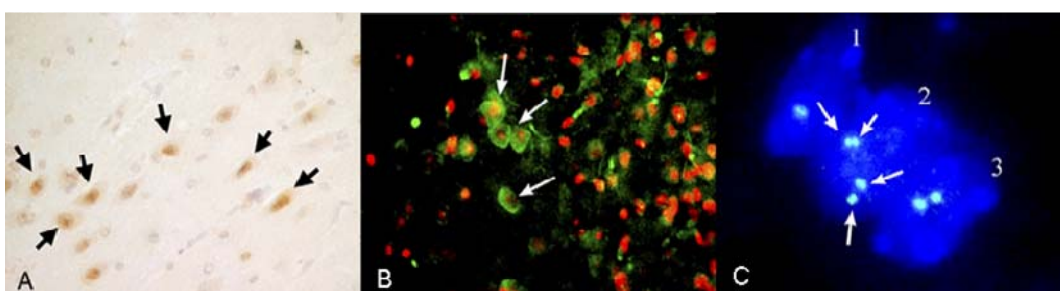


Figura 6. Ciclo celular en la EA. A: Inmunohistoquímica ciclina B positiva de una neurona del hipocampo de un paciente con EA (tomado de Yang y cols., 2003). B: En neuronas corticales del ratón transgénico R1.40 se re-expresa el marcador del ciclo celular ciclina A (flechas) (tomado de Yang y Herrup, 2007). C: El análisis de FISH muestra cuatro puntos de hibridación de un único locus en el genoma del ratón R1.40, indicando que se ha producido replicación del ADN en la neurona del hipocampo (tomado de Yang y cols., 2006).

Los trabajos del laboratorio de Herrup también indicaban que la aparición de proteínas reguladoras del ciclo celular tenía lugar antes de la aparición de placas de amiloide o de la activación de la microglía (Yang y cols., 2006). Esto apuntaba a que ninguno de estos procesos por sí mismo, podría desencadenar la patología. En ninguno de los ratones utilizados en estos trabajos se producía una pérdida neuronal considerable. Esto llevó a plantear la cuestión de que la activación del ciclo celular es un primer paso necesario pero no suficiente para inducir la muerte de neuronas en la EA, al menos en ratones. Dicho de otro modo, la reentrada en el ciclo celular y subsiguiente replicación del ADN, continúa en un periodo de tiempo (meses en el caso de los ratones) en que las neuronas aneuploides persisten en un “estado funcional”. El proceso de neurodegeneración sería el resultado de la consecución lenta de un complejo programa de muerte celular y guardaría consonancia con los trabajos de Busser y cols. (1998) y Yang y cols. (2001), realizados en cerebros de pacientes con EA. También cabe la posibilidad de que los hechos relacionados con el ciclo celular que se observan en neuronas, sean en realidad respuestas de la célula ante condiciones de estrés, obteniendo un beneficio al tener varias copias de cada alelo, como ocurre en algunos momentos del desarrollo de organismos complejos y de diferenciación celular (Claycomb y Orr-Weaver, 2005). El resultado final de la reentrada en ciclo celular neuronal es la muerte de las células pero el lapso de tiempo entre el inicio del ciclo celular y la muerte sugiere que *in vivo* hay otros factores involucrados en el proceso de muerte, al igual que en cáncer. Así concluyen Zhu y cols., en el trabajo en el que proponen la “hipótesis del doble impacto” (Zhu y cols., 2004a, 2007), afirmando que el estrés oxidativo junto con una desregulación mitogénica, son causas necesarias y suficientes para la EA, es decir, para que tenga lugar la muerte de la neurona, se precisa de otro “impacto”. Aquí entrarían a actuar posibles estímulos ambientales de naturaleza física o química como la inflamación crónica, la hipoxia y/o daño en el ADN, el estrés oxidativo, la excitotoxicidad, etc., sobre una neurona que ya está sometida al estrés de la reentrada en ciclo celular, provocando finalmente su muerte.

4-. PRESENTE Y FUTURO EN EL TRATAMIENTO DE LA EA.

Las características de la EA la convierten en un problema no sólo sanitario sino también social. La EA tiene un gran impacto no sólo sobre el enfermo, sino también sobre el entorno familiar y social. La economía familiar se resiente por el coste derivado del cuidado del enfermo. Según datos recientes de la Confederación Española de

Familiares de Enfermos de Alzheimer (CEAFA), se calcula que los gastos directos o socio-sanitarios que ocasiona un enfermo oscilan entre 7.860 y 14.492 €/año, mientras que los indirectos, los de atención por familiares u otros cuidadores se sitúan entre 14.882 y 21.000 €/año. No cabe duda, pues, en considerar a esta enfermedad uno de los mayores problemas de salud pública en la actualidad. A pesar de los esfuerzos científicos, en este momento no se dispone de opciones terapéuticas efectivas para la prevención y el tratamiento de demencias y, en concreto, de la EA.

Las drogas actualmente utilizadas en el tratamiento de la EA son, principalmente, inhibidores de colinesterasa (previenen los déficits de Ach) como **tacrina**, cuyo uso se aprobó en 1993, **donepezilo** (en 1996), **rivastigmina** (en 2000) y **galantamina** (en 2001). Desde 2007, rivastigmina también está aprobada para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson en la cual el déficit de Ach es mayor que en la EA (Emre y cols., 2007). El uso de tacrina se ha limitado debido a que presenta considerables reacciones adversas y muchos pacientes no toleran las dosis terapéuticas. Además de su uso como drogas que aminoran los efectos de la EA en pacientes, los inhibidores de colinesterasas empiezan a utilizarse en el tratamiento de demencias en general pues se ha visto que también mejoran los síntomas neuropsiquiátricos como alucinaciones, delirios y apatía (Trinh y cols., 2003; Wild y cols., 2003).

Otra droga utilizada actualmente en la terapia contra la EA desde 2003 es la **memantina** que es un antagonista con afinidad del receptor de glutamato NMDA y desempeña en el mismo una función similar al Mg^{2+} . Su eficacia clínica (en EA moderada y severa) parece ser algo menor que la observada para los inhibidores de colinesterasa (McShane y cols., 2004). Sin embargo, se utiliza como terapia coadyuvante de los inhibidores de colinesterasa ofreciendo mejores resultados clínicos que por separado (Grossberg y cols., 2006; Tariot y cols., 2004).

Para el tratamiento futuro de la EA, están cobrando importancia las terapias en estudio y otras en fase de ensayos clínicos basadas en la hipótesis de amiloide, que otorga el principal papel como causa de la EA a la acumulación patológica de $A\beta$ en el cerebro de los pacientes. Las líneas marcadas por la hipótesis de amiloide para la prevención o el tratamiento de la EA son: i) disminuir la producción de $A\beta$; ii) estimular la eliminación de $A\beta$; iii) prevenir la agregación de $A\beta$ formando placas amiloideas. Otra opción sería prevenir la inflamación y la neurotoxicidad causadas por $A\beta$. Gracias a la inhibición (BACE, γ -secretasa), modulación (γ -secretasa) o estimulación (α -

secretasa) de la actividad de las enzimas involucradas en la proteólisis de APP se conseguiría una disminución en la producción de A β . En estos procesos, los AINES han mostrado resultados prometedores actuando sobre BACE y γ -secretasa (Sastre y cols., 2006; Watson y cols., 2005; Risner y cols., 2006; Strum y cols., 2007). En cuanto a la actuación aumentando la eliminación de A β , debería hacerse antes de su acumulación como oligómeros tóxicos y podría llevarse a cabo mediante inmunoterapia (Gilman y cols., 2005; Wilcock y cols., 2007; Pfeifer y cols., 2002; Rakover y cols., 2007; Yamamoto y cols., 2007; Tobinick y cols., 2006; Dodel y cols., 2004), por degradación enzimática mediada por metalo-endoproteasas (neprilisina, enzima degradadora de insulina, enzima convertidora de endotelina, ...) (Saito y cols., 2005; Eckman y cols., 2006; Kehoe y Wilcock, 2007; Hemming y cols., 2007; Hemming y Selkoe, 2005) y/o aumentando el transporte a través de la barrera hematoencefálica con el estímulo del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP) o con la inhibición del receptor de productos finales de glicosilación avanzada (RAGE) (Deane y Zlokovic, 2007; Donahue y cols., 2006; Deane y cols., 2003, 2004). Finalmente, el intento de la inhibición de la agregación de A β se basa en el estudio de componentes que prevengan su acumulación formando oligómeros tóxicos, como los quelantes de Zn y Cu (Rogers y Lahiri, 2004; Dedeoglu y cols., 2004; Caragounis y cols., 2007; Aisen y cols., 2006).

Otras drogas en fase de ensayo clínico para el tratamiento de la EA son el **dimebon**, que bloquea simultáneamente la colinesterasa y el receptor NMDA (Bachurin y cols., 2001), el **ácido docosahenoico**, que es el ácido graso más abundante en el cerebro y cuya ingesta se asocia con una reducción en el riesgo de padecer EA (Kalmijn y cols., 2004), los **estrógenos**, hasta ahora no eficaces (Mulnard y cols., 2000) y las **estatinas**, que reducen los niveles de colesterol inhibiendo la enzima HMG-CoA reductasa, participante inicial en el metabolismo del colesterol, reducen la producción de A β y disminuyen la inflamación (Kuller, 2007; Jick y cols., 2000; Deane y cols., 2004).

La hipótesis del ciclo celular ha generado ideas para el desarrollo de nuevas terapias. La hipótesis propone que la señalización mitogénica y/o el control del ciclo celular están alterados en neuronas de individuos afectados por la EA (Zhu y cols., 2004d; Nagy, 2005). Por tanto, cualquier fármaco dirigido contra estos procesos podría, en principio, actuar contra la neurodegeneración. Además, y puesto que las neuronas que han entrado en un ciclo de división abortivo están metabólicamente y funcionalmente

comprometidas, la reversión de este proceso debería producir un alivio sintomático. Algunas de las señales mitogénicas para las neuronas en la EA son bien conocidas, como por ejemplo la excitotoxicidad o la inflamación (Nagy, 2005, 2007; Verdaguer y cols., 2002). Por tanto, antagonistas de glutamato o antiinflamatorios podrían actuar, al menos parcialmente, impidiendo la entrada en ciclo de ciertas neuronas (Woods y cols., 2007). De acuerdo con la hipótesis del ciclo celular, las neuronas en EA abandonan la quiescencia y progresan a desde la fase G_0 a G_1 del ciclo celular. Cualquier tratamiento que impidiera este progreso, evitaría que las neuronas entraran en la fase S, anulando las consecuencias de cambios en la dosis génica y, más tarde, la neurodegeneración. Para el diseño de estrategias terapéuticas dirigidas a impedir el progreso de las neuronas a través del ciclo, sería deseable tener un conocimiento más preciso del llamado “ciclo neuronal”. Mientras tanto cabe pensar en drogas de las que ya se conoce su eficacia revertiendo el tránsito G_0 a G_1 en otros tejidos. En la tabla IV se muestran algunos componentes que se sabe producen arresto en la transición de G_0 a G_1 . Con algunos de ellos se ha visto neuroprotección en modelos de neurodegeneración aguda. Estos componentes, con propiedades antiproliferativas y antitumorales, tienen capacidad de arresto del ciclo celular en estadios tempranos lo que sugiere que pudieran ser eficaces como neuroprotectores en la EA (tabla IV).

TABLA IV
Drogas conocidas que producen arresto en la progresión de G₀ a G₁ y proporcionan neuroprotección. Tomado de Woods y cols., 2007.

Compuesto	Acción	Neuroprotección	Referencia
Ácido Retinóico (vitamina A)	Arresto de G ₀ a G ₁ y expresión de proteínas de G ₀ (p62 y p56)	Activa en un modelo de infarto en rata	Lamkin y cols., 2006; Wainwright y cols., 2001; Harvey y cols., 2004, Wu y cols., 2001.
Calcitriol (vitamina D)	Arresto de G ₀ a G ₁ y otras regulaciones del ciclo	Activa en un modelo de infarto en rata	Johnson y cols., 2006; Losem-Heinrichs y cols., 2004; Trump y cols., 2004.
Flavopiridol	Ras, MAPK, Apt y arresto de G ₀ a G ₁	Activa en un modelo de TBI en rata	Pepper y cols., 2003; Di Giovanni y cols., 2005.
Glucocorticoides	La dexametasona aumenta la respuesta de la vitamina D y arresto de G ₀ a G ₁	Activa en un modelo de TBI en rata	Johnson y cols., 2006; Yang y cols., 2005; Goya y cols., 1993.
Interferón- α PD0332991	Arresto de G ₀ a G ₁ Arresto en G ₁ vía inhibición de CDK4/6	No determinada No determinada	Sangfelt y cols., 1999. Fry y cols., 2004; Baughn y cols., 2006.
Inositol hexafosfato (IP6)	Arresto de G ₀ a G ₁	No determinada	Sharma y cols., 2003.
N6-isopenteniladenosina	Arresto de G ₀ a G ₁ vía inhibición de la farnesil difosfato sintasa	No determinada	Laezza y cols., 2006.
Simvastatina	Arresto de G ₀ a G ₁	Activa en un modelo de infarto en rata	Murakami y cols., 2001; Cimino y cols., 2005.
Taurina	Arresto de G ₀ a G ₁	Activa en un modelo de infarto en rata	Chen y cols., 2004; Saproinov y cols., 2006.
TGF β 1	Arresto de G ₀ a G ₁ induciendo a los inhibidores cip/kip y la familia INK4	Activa en un modelo de infarto en ratón	Wu y cols., 1996.
Interleukina-1 Inhibidores de farnesiltransferasa U0126, PD98059	Arresto de G ₀ a G ₁ Arresto de G ₀ a G ₁ vía regulación de Ras	No determinada No determinada	Morinaga y cols., 1990. Vogt y cols., 1997.
Esfingosina y ceramida L-796, 449, Rosiglitazona	Arresto de G ₀ /G ₁ vía defosforilación de pRb Arresto de G ₀ a G ₁ por agonismo de PPAR γ	Activa en un modelo de infarto en rata Activa en un modelo de infarto en rata	Dbaibo y cols., 1995; Furuya y cols., 2001. Heaney, 2003; Pereira y cols., 2006; Chaffer y cols., 2006; Luo y cols., 2006.
SJ749	Arresto de G ₀ /G ₁ antagonista de la integrina α 5 β 1	No determinada	Maglott y cols., 2006.

Respecto a los inhibidores de CDKs, hay que decir que aunque son capaces de producir el arresto del ciclo celular inducido por A β en neuronas (Copani y cols., 2008) y de prevenir la fosforilación de tau (Knockaer y cols., 2002), no está claro cuales serían las consecuencias de inhibir la acción de las CDKs en el desarrollo de la EA. Alguno de estos compuestos como el flavopiridol o la roscovitina, aunque tienen efectos neuroprotectores, producen también efectos no deseados como por ejemplo, la

expresión de la proteína proapoptótica p53. Este efecto está mediado por mecanismos independientes de la inhibición de la progresión a través del ciclo celular (Demidenko y Blagosklonny, 2004). Estas observaciones han puesto en cuestión su utilidad en tratamientos largos, pues es muy posible que pudieran tener secuelas neurotóxicas. Además, los efectos secundarios, típicamente vómitos, náuseas y diarrea limitan sus posibilidades como drogas neuroprotectoras.

5-. MODELOS DE ESTUDIO DE LA EA.

La mayor parte del conocimiento que tenemos hoy de la EA proviene de estudios realizados sobre material de autopsias, casi siempre de casos terminales con patología avanzada, lo cual dificulta el estudio de procesos patológicos iniciales a nivel celular y/o molecular. En estos casos, es imposible separar aquellos eventos casuales de otros, inespecíficos, o que se deriven de la destrucción celular que provoca la enfermedad.

Afortunadamente, la disponibilidad de modelos animales para el estudio de la EA ha permitido grandes avances en el conocimiento de algunos aspectos de la enfermedad. En los últimos 10 años se han desarrollado numerosos modelos murinos que en mayor o menor medida reproducen los cambios bioquímicos e histopatológicos de la enfermedad (formación de placas de amiloide y presencia de tau hiperfosforilada). Algunos de estos modelos muestran pérdida neuronal y sináptica y déficits en la memoria, en el conocimiento, en la función global, comportamiento y actividades de la “vida diaria”. En los modelos de ratones se han usado una gran variedad de mutantes APP, presenilinas o proteína tau. A pesar de estos paralelismos con la enfermedad humana, en ninguno de estos modelos se ha mostrado la agregación de la proteína tau en los típicos ovillos neurofibrilares ni una pérdida significativa de cuerpos neuronales (Hock y Lamb, 2001). Aunque estos estudios han ayudado a comprender la función de algunos genes en el desarrollo de la EA y han servido para estudiar el papel de A β , para evaluar los efectos de numerosas aproximaciones terapéuticas incluyendo γ -secretasas (Ohno, 2006), agonistas muscarínicos (Fisher y cols., 2003), inhibidores de BACE, inmunoterapia de A β y vacunas (Morgan y cols., 2000; Janus y cols., 2000), aún no existe un modelo que desarrolle fielmente todas las alteraciones propias de la patología.

Lo ideal es buscar animales que desarrollen todos los síntomas típicos de la EA, lo cual sería muy valioso para establecer un orden y una jerarquía en las alteraciones, saber cual es causa o consecuencia de otras, además de permitir estudiar la enfermedad

desde su inicio, y poder probar nuevas terapias, comprobando sus efectos en cada fase de la patología.

También han sido muy útiles los modelos celulares consistentes en líneas establecidas neuronales o extraneurales, así como cultivos primarios de neuronas y astrocitos, fundamentalmente de roedores, que sobreexpresan las formas mutantes humanas de los genes APP, PS1 y PS2 que se sabe son causa de la EA (Mattson, 1997; Mattson y cols., 2001).

Una estrategia alternativa y complementaria es el uso de tejidos periféricos de pacientes con EA. Numerosas evidencias experimentales hacen pensar que la EA, como otras enfermedades del sistema nervioso, puede manifestarse a nivel sistémico, aunque sus repercusiones clínicas sean de menor grado (Nagy y cols., 2002; Gibson y Huang, 2002; Eckert y cols., 1994). El uso de células extraneurales ofrece ventajas comunes a otros modelos celulares y, además, permite la posibilidad de estudiar procesos patológicos a cualquier nivel de progresión de la enfermedad. La utilización de células extraneurales (CMSPs, monocitos, linfocitos, plaquetas y fibroblastos) (revisado por Echeberrygaray e Ibarreta, 2001), así como plasma, sangre total y líquido cefalorraquídeo (revisado en Gasparini y cols., 1998; Bailey, 2007), ha permitido la identificación de un buen número de alteraciones celulares y moleculares que mimetizan fenómenos comparables a los ocurridos en el cerebro de individuos afectados por la EA. En la actualidad, se están utilizando ampliamente para la búsqueda de biomarcadores, que pudieran servir para el diagnóstico precoz de esta enfermedad, así como para la monitorización de posibles tratamientos terapéuticos.

La tabla V recoge los principales trabajos en los que se han utilizado células o tejidos extraneurales para el estudio de la EA.

TABLA V
Estudios extraneurales en la EA

Localización extracelular	Alteración encontrada	Referencia
Sangre, plasma, CMSPs, linfocitos, plaquetas	Alteración de procesos inflamatorios/disfunción en la regulación de proteínas inflamatorias	Alvarez y cols., 1996; Speciale y cols., 2007; Kassner y cols., 2008; Bermejo y cols., 2008; Richartz-Salzbunger y cols., 2007; Kong y cols., 2002; Hye y cols., 2006; Pirttilä y cols., 1992; Bonotis y cols., 2008
Linfocitos	Alteración en la proteólisis de PS1	Takahashi y cols., 1999
Sangre, eritrocitos, linfocitos, plaquetas	Alteraciones del sistema colinérgico	Inestrosa y cols., 1994; Rakonczay y cols., 2005
Plaquetas, linfocitos, fibroblastos	Alteraciones en el canal de K ⁺	Bondy y cols., 1996; Eckert y cols., 1996; Bhagavan y cols., 1998; Kim y cols., 1995; Etcheberrigaray y cols., 1993, 1994
Linfoblastos, fibroblastos, sangre, linfocitos eritrocitos y plaquetas	Alteraciones en el estado redox/implicaciones mitocondriales	Cecchi y cols., 2002; Gibson y cols., 2000; Naderi y cols., 2006; Uberti y cols., 2002; de Lustig y cols., 1994; Serra cols., 1994; Moreira y cols., 2007; Wang y cols., 2008; Zana y cols., 2006; Leutner y cols., 2005; Marcourakis y cols., 2008; Leuner y cols., 2007; Begni y cols., 2004; Mecocci y cols., 2002
Plaquetas	Alteraciones en el procesamiento de APP	Borroni y cols., 2002a, 2003; Podovani y cols., 2001a, 2001b; Zainaghi y cols., 2007; Cattabeni y cols., 2004; Li y cols., 1999
Fibroblastos, CMSPs, linfocitos, plaquetas, linfoblastos	Alteraciones en la homeostasis de Ca ²⁺	Peterson y cols., 1988; Palotás y cols., 2002a, 2002b, 2004; Ibarreta y cols., 1997; Bondy y cols., 1994; Hartmann y cols., 1994; Eckert y cols., 1996; Adunsky y cols., 1991; Le y cols., 1993; Hirashima y cols., 1996; Ito y cols., 1994
Linfoblastos, fibroblastos	Deficiencias en los sistemas de reparación del ADN/daños ADN, ARN, proteínas	Bradley y cols., 1989; Robison y cols., 1987; Nijhuis y cols., 1996; Mórocz y cols., 2002
Sangre, CMSPs, plasma, monocitos, linfocitos, plaquetas, linfoblastos, mastocitos, fibroblastos	Diferencias en la expresión de genes relacionados con la homeostasis celular/funciones celulares/producción de Aβ/procesamiento de tau- ensamblaje de microtúbulos	Kvetnoi y cols., 2003; Krawczun y cols., 1990; Gibson y cols., 1996; Palotás y cols., 2001; Palotás y cols., 2002b; Mhyre y cols., 2008; Mattila y Frey, 1995; Kong y cols., 2002; Ciccocioppo y cols., 2008; Miscia y cols., 2009; Menedez-González y cols., 2008a, 2008b; Kassner y cols., 2008; Paccalin y cols., 2006; Cazzaniga y cols., 2008; Reale y cols., 2004, 2005, 2008; Mahieux y cols., 2006; Bonotis y cols., 2008; Iarlori y cols., 2005; Gambi y cols., 2004; Kusdra y cols., 2000; Cecchi y cols., 1999; Schipper y cols., 2000; Bongioanni y cols., 1996; Vignini y cols., 2007
Sangre, plasma	Diferencias en la expresión del gen ALZAS	Jellinger y cols., 2008; Kienzl, 2002
Linfocitos, plaquetas, linfoblastos	Diferencias en la regulación del ciclo celular y en los procesos de supervivencia/muerte celular	de las Cuevas y cols., 2003, 2005; Muñoz y cols., 2005, 2008a, 2008b; Bartolomé y cols., 2007, 2009; Urcelay y cols., 2001; Sala y cols., 2008; Stieler y cols., 2001; Tacconi y cols., 2004; Nagy y cols., 2002; Casoli y cols., 2008
Fibroblastos, CMSPs	Diferencias en la señalización celular	Zhao y cols., 2002, 2003; Khan y Alkon, 2006, 2008; Castri y cols., 2007; Mazzola y Sirover, 2003; Jong y cols., 2002
Plasma	Diferencias en los niveles de Aβ40/Aβ42	Graff-Radford y cols., 2007; Blasko y cols., 2008
CMSPs, fibroblastos	Expresión de mutantes de p53/menor vulnerabilidad hacia apoptosis	Lanni y cols., 2007; 2008a, 2008b; Racchi y cols., 2008; Uberti y cols., 2002, 2006, 2008
CMSPs, plasma, linfocitos	Expresión génica y proteómica	Maes y cols., 2007; Ray y cols., 2007; Hye y cols., 2006; Yu y cols., 2003; Palotás y cols., 2004b
Sangre, linfocitos, fibroblastos	Otras alteraciones	Bellucci y cols., 2007; Borroni y cols., 2002b; Cataldo y cols., 2008; Begni y cols., 2004; Zivkovic y cols., 2006; Spremo-Potparevic y cols., 2004, 2008; Zhao y cols., 2002; Jong y cols., 2002

*Objetivos de la tesis y planteamiento
experimental*

El objetivo fundamental de esta tesis ha sido desvelar la posible contribución de fallos en el control de los mecanismos que regulan la supervivencia/muerte celular a la neurodegeneración en la enfermedad de alzhéimer. Este campo de investigación se inició hace solamente unos pocos años, pero hoy en día se admite que una entrada aberrante en ciclo celular, por parte de ciertas neuronas es una de las causas más importantes de la pérdida neuronal por apoptosis. La originalidad de nuestra propuesta experimental radica en la utilización de células extraneurales, en concreto líneas linfoblásticas, de sujetos aquejados de EA y donantes controles, asumiendo que las enfermedades que afectan al sistema nervioso central, tienen también manifestaciones sistémicas y por tanto, su estudio puede aportar algunas claves sobre el proceso neurodegenerativo. Hemos pretendido demostrar la validez de este tipo de células en el estudio de enfermedades que afectan al sistema nervioso. La innovación de esta propuesta viene dada por la oportunidad de encontrar alteraciones celulares y/o moleculares que puedan servir como biomarcadores específicos de la demencia de alzhéimer.

En trabajos previos de nuestro laboratorio, realizados en linfocitos inmortalizados de pacientes de EA de aparición tardía, y donantes controles de edad aproximada, se pudieron detectar alteraciones en la homeostasis de Ca^{2+} y de H^+ (Ibarreta y cols., 1997, 1998) que se asociaron a una mayor respuesta proliferativa de las células de pacientes de EA (Urcelay y cols., 2001). La perturbación de la vía de señalización Ca^{2+}/CaM parece ser responsable de estas alteraciones, controlando los niveles de p27, un inhibidor de los complejos CDK, y facilitando la fosforilación de proteínas de la familia de retinoblastoma, la activación del factor de transcripción E2F y el tránsito de las células desde G_1 a la fase S del ciclo celular (de las Cuevas y cols., 2003; Muñoz y cols., 2005, 2008a). Resultados recientes de nuestro laboratorio, indican que la activación de la ruta dependiente de Ca^{2+}/CaM puede jugar también un papel relevante en la vulnerabilidad celular frente a situaciones de estrés, controlando la activación transcripcional de NF- κ B (de las Cuevas y cols., 2005).

En base a estos antecedentes nos propusimos profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares que subyacen a la mayor actividad proliferativa y resistencia a la

muerte celular, inducida por la privación del suero de linfoblastos de pacientes de EA de aparición tardía.

Los objetivos concretos planteados para el desarrollo de esta tesis han sido los siguientes:

1. Estudios de la interacción entre Ca^{2+} /CaM y las vías dependientes de MAP kinasas (específicamente, Erks y p38) y PI3K/Akt, en el control de supervivencia/muerte celular.

Justificación: estas cascadas de señalización han sido consideradas tradicionalmente como las principales responsables del control de los procesos de supervivencia y muerte en la mayoría de los tipos celulares. Además, existen numerosas evidencias en la literatura, de que su actividad puede ser modulada directa o indirectamente por CaM en muchos tipos celulares, incluyendo neuronas.

2. Analizar la modulación de la actividad proliferativa y la vulnerabilidad celular frente a la retirada del suero por estatinas.

Justificación: Dado que los mecanismos de control del ciclo celular y apoptosis son más o menos ubicuos, nos interesaba demostrar la utilidad de este modelo experimental para el seguimiento de distintas terapias o para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas. Elegimos estudiar el efecto de simvastatina porque existen evidencias de tipo epidemiológico, clínico y experimental que indican que las estatinas reducen el riesgo de contraer la EA. Además de la acción de las estatinas inhibiendo la síntesis de colesterol, se conocen otros efectos no relacionados con el metabolismo lipídico, destacando los efectos sus propiedades anti-inflamatorias, así como antiproliferativas y proapoptóticas. Estas características confieren a estas drogas un potencial beneficio para el tratamiento del alzhéimer.

3. Estudiar la especificidad de estas alteraciones en relación a otros trastornos neurodegenerativos.

Justificación: El interés de estudiar si las alteraciones en los mecanismos de control del ciclo celular y/o supervivencia están implicadas específicamente en la enfermedad de Alzheimer, o si es un fenómeno más general vinculado a los procesos neurodegenerativos, radica en la posibilidad de encontrar alguna alteración que pueda servir como biomarcador de la EA.

Material y métodos

1.- MATERIALES

Para los estudios de la actividad proliferativa y de supervivencia de las líneas linfoblásticas de individuos controles y pacientes con EA, el inhibidor de la síntesis de proteínas, cicloheximida, el inhibidor del proteasoma, MG132, los antagonistas de Calmodulina (CaM), Calmidazolium (CMZ) y W7, el sustituyente de suero (*serum replacement*), el inhibidor de Calmodulina quinasa II (CaMKII), KN-62, y los quelantes de Ca^{2+} , EGTA y BAPTA-AM, se adquirieron de Sigma (Sigma-Aldrich, Alcobendas, España). El inhibidor general de caspasas, z-VAD-fmk, y los inhibidores de PI3K/Akt, Erk1/2 y p38, Ly294002, PD98059 y SB202190, respectivamente, fueron de Calbiochem (Calbiochem, USA). En el estudio del efecto de la simvastatina (SIM) sobre los procesos de supervivencia/muerte celular de los linfoblastos controles y de EA la SIM se adquirió de Calbiochem (Calbiochem, USA) y los intermediarios mevalonato (MEV), geranyl-geranylpirofosfato (GGPP), farnesilpirofosfato (FPP) y escualeno (SQ), fueron de Sigma (Sigma-Aldrich, Alcobendas, España).

2.- OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA Y ESTABLECIMIENTO DE LÍNEAS LINFOBLÁSTICAS.

2.1.- Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica.

La obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se realizó utilizando gradientes de densidad en Ficoll-Isopaque (LymphoprepTM 1077. Axix-Shield Po CAS, Oslo Noruega) con sangre total, según el procedimiento descrito por Seigneurin y cols., en 1988. Este método permite separar las células mononucleares que tienen una densidad inferior a la de las células polimorfonucleares (granulocitos) y eritrocitos. La separación en un medio isosmótico de densidad igual a 1,077g/ml, permite que los eritrocitos y granulocitos sedimenten a través del medio y que se forme una banda claramente visible que contiene las células mononucleares entre la muestra y la interfase medio/muestra, como puede observarse en la figura 6. Según este

procedimiento, en primer lugar, se diluyeron 10ml de sangre en el mismo volumen de tampón fosfato salino (PBS) y se añadieron 10-12ml de Lymphoprep en el fondo del tubo, evitando la rotura de la interfase creada al añadir el Lymphoprep. A continuación, la muestra se centrifugó a 1400r.p.m durante 45 minutos, desactivando el freno. Tras centrifugar, se recogió del tubo la fase con las células mononucleares (capa blanca), y se realizaron varios lavados con PBS (1300r.p.m., 10 minutos) para eliminar los restos de Lymphoprep, que puede resultar tóxico para las células, y de plaquetas. Finalmente, las células aisladas se cultivaron en suspensión, a una concentración inicial de 1×10^6 células $\times \text{ml}^{-1}$ en frascos de cultivo de 25cm^2 , en posición vertical. El medio de cultivo utilizado fue RPMI-1640, suplementado con L-glutamina 2mM, 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS), 100 $\mu\text{g/ml}$ de penicilina/estreptomicina, y 5 $\mu\text{g/ml}$ del mitógeno Pokeweed (PWM) (Sigma-Aldrich, Alcobendas, España), específico de células B. Los cultivos se mantuvieron en un incubador húmedo, con 5% de CO_2 y a 37°C. El FBS, la penicilina, la estreptomicina y el medio de RPMI se adquirieron de Invitrogen (Gatithersburg, Maryland, USA).

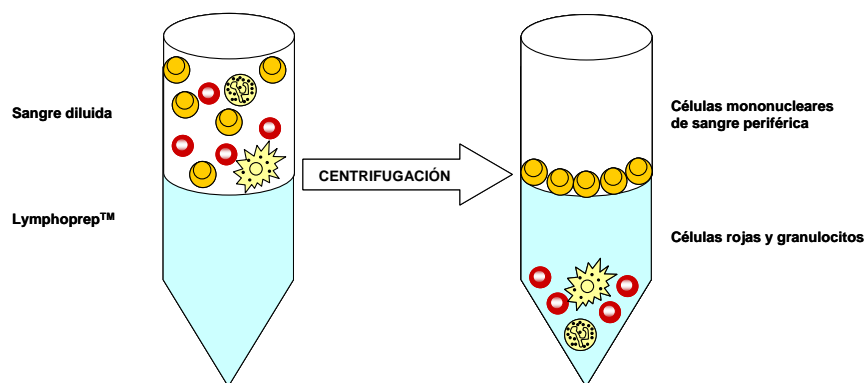


Figura 6. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica.

2.2-. Aislamiento de Linfocitos B.

Para separar los linfocitos B de la población total de CMSPs, se utilizó un sistema de selección positiva que consistió en el paso a través de una columna de separación magnética (MS, Separation columns, Miltenyi Biotec, Berglisch Gladbach, Alemania)

de una suspensión de bolas paramagnéticas que llevan pegado el anticuerpo monoclonal y marcador de superficie de células B anti-CD19 (MACS Microbeads, Miltenyi Biotec, Berglisch Gladbach, Alemania). La unión específica de los linfocitos B al anticuerpo monoclonal anti-CD19, hace que sólo los linfocitos B queden retenidos en la columna cuando pasan a través de ella debido a las fuerzas de atracción magnética entre las bolas y la columna. Según indican las recomendaciones del producto, la población de CMSP procedente de 10 ml de sangre periférica, se resuspendió en PBS suplementado con 0,5% BSA y 2mM EDTA (pH 7,2) y se incubó con las bolas paramagnéticas marcadas con anti-CD19 en la proporción 20µl de bolas por cada 10^7 células, durante 15 minutos a 4°C. Pasado el tiempo de incubación, se recogieron las células, se lavaron con PBS y se centrifugaron a 1400r.p.m durante 10 minutos. Después se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 500µl de PBS suplementado. La mezcla de células resuspendidas se hizo pasar por la columna de separación magnética en la que quedaron retenidas las células unidas a anti-CD19 hasta que se retiró el campo magnético de la columna, momento en que se recogieron sólo las células marcadas, tal y como se muestra esquemáticamente en la figura 7. El número de linfocitos B obtenidos fue, aproximadamente, de 1×10^6 , los cuales, fueron incubados a la concentración de 1×10^6 células \times ml⁻¹ en medio RPMI-1640, con L-glutamina 2mM, 100µg/ml de penicilina/estreptomicina, 10% (v/v) de FBS y 5µg/ml de PWM.

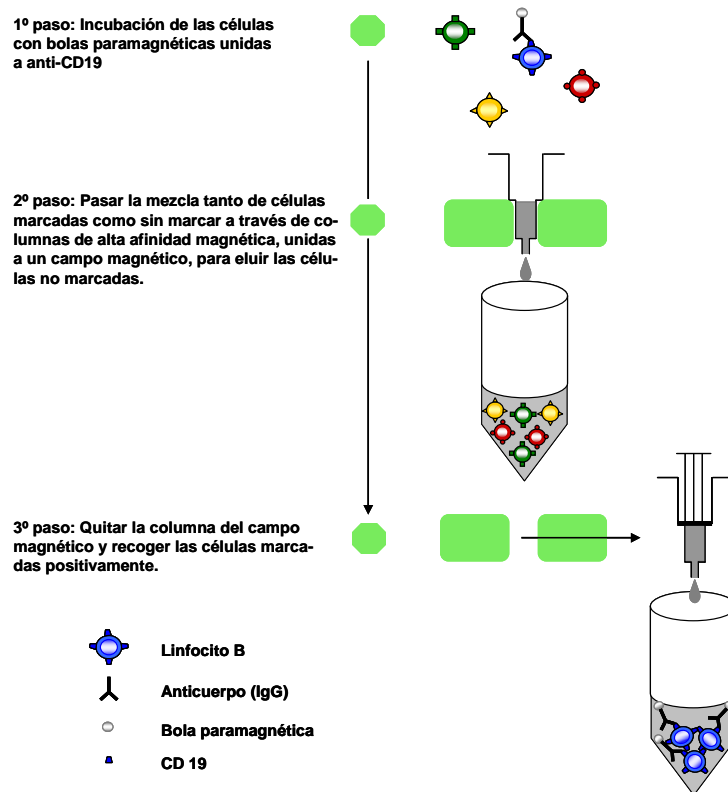


Figura 7. Selección positiva de linfocitos B.

2.3-. Establecimiento de líneas celulares linfoblásticas.

El establecimiento de las líneas celulares linfoblásticas se realizó en el laboratorio siguiendo el procedimiento descrito por Koistinen en 1987, infectando linfocitos de sangre periférica con el virus de Epstein-Barr (Koistinen, 1987).

2.3.1-. Producción del virus Epstein-Barr.

El virus de Epstein-Barr utilizado en las transformaciones se obtuvo a partir de una línea celular de linfoma de Burkitt (B-95-6) cedida por Longina Akhtar (National Institute of Alcohol and Abuse Disorders, NIH, Bethesda, USA). En primer lugar, las células se cultivaron en monocapa y, tras unos días en cultivo, se recogió el sobrenadante y se centrifugó para eliminar restos celulares se pasándolo a través de un filtro de 0,2µm. En condiciones normales, un porcentaje de las células cultivadas sufre una infección lítica que libera el virus al medio de cultivo. Realizados estos pasos, el

virus se conservó en alícuotas de 1ml a -80°C para su uso posterior en transformaciones linfoblásticas.

2.3.2-. Transformación de linfocitos.

La población de CMSPs obtenida como se ha descrito anteriormente se puso en cultivo y, se le añadió, una alícuota de 1ml de virus de Epstein-Barr y 1µg/ml de ciclosporina, para evitar la activación de los linfocitos T, presentes en la población, que pudieran impedir la proliferación inicial de los linfocitos B infectados. Al cabo de 6 o 7 días, se retiró la mitad del medio del cultivo, sustituyéndolo por medio de cultivo nuevo. En las siguientes 3 ó 4 semanas, se vigiló el cultivo cambiando el medio una o dos veces por semana. Transcurrido este tiempo, comenzaron a aparecer los primeros clones linfoblásticos. Una acidificación importante del medio constituye un excelente marcador de la transformación. Transformadas las células, se dividieron creciendo en suspensión, para obtener un número suficiente de ellas. Las líneas linfoblásticas creadas se congelaron en nitrógeno líquido, resuspendidas en 1ml del medio ya descrito, con un 7,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) el cual, evita rupturas celulares por la formación de hielo. Para trabajar con las líneas linfoblásticas, las células se descongelaron en, aproximadamente, 8ml de medio RPMI-1640, que contenía L-glutamina 2mM, 100µg/ml de penicilina/estreptomicina y, a menos que se indique otra cosa, 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS). El crecimiento de los linfoblastos transcurría en suspensión, en frascos de cultivo de 25cm², dispuestos en posición vertical. Los cultivos se mantuvieron en un incubador húmedo, con 5% de CO₂ y a 37°C. El medio de cultivo se cambió dos o tres veces por semana, según conviniera, aspirándolo sobre las células y añadiendo un volumen igual de medio nuevo.

3-. MÉTODOS ANALÍTICOS.

3.1-. Análisis del ciclo celular.

El análisis del ciclo celular se realizó mediante citometría de flujo, midiendo la incorporación de yoduro de propidio (IP) al ADN celular (Krishan, 1975). Para ello, se

sembraron células a una concentración inicial de 1×10^6 células \times ml⁻¹, y se tomaron alícuotas a los tiempos requeridos por el experimento a realizar. Una vez recogidas, las células se lavaron con PBS, se fijaron en etanol al 75% y se almacenaron a 4°C, hasta que estuvieron procesadas todas las muestras. En el momento de hacer el análisis, las células se centrifugaron para eliminar los restos de etanol y se incubaron en 0,5 ml de PBS con 1µg/ml de ARNasa (Roche, Mannheim, Alemania) y 1% de Nonidet P-40 (NP-40) durante 20 minutos, a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron 25 µg/ml de IP. La proporción de IP incorporado se midió en un citómetro de flujo EPICS-XL (Beckman Coulter, Florida, USA), utilizando una longitud de onda de excitación de 488nm y recogiendo la emisión del IP a 620nm. Los datos fueron analizados mediante el programa de ordenador Expo32 ADC (Beckman Coulter). Las fases del ciclo celular se estimaron por análisis computarizado de las distribuciones del contenido de ADN. La duración de la fase G₁ se estimó según lo descrito en la bibliografía (Merrill, 1998).

3.2-. Determinación de la proliferación y la viabilidad celular.

Tanto para determinar proliferación como viabilidad celular se utilizaron los ensayos de reducción de MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide] y el recuento de células en la cámara Neubauer o hemocitómetro, indistintamente. El ensayo MTT se basa en la capacidad de las mitocondrias funcionalmente activas para convertir el MTT en formazán, cuya cantidad es directamente proporcional al número células vivas. La determinación de la proliferación celular en las distintas condiciones experimentales se realizó incubando las células con 1mg/ml de MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) en un volumen de reacción de 200 µl. Tras 2 horas de incubación, las células se centrifugaron, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 200µl de DMSO para disolver los cristales de formazán. La absorbancia se midió a 570nm con 630nm como longitud de onda de referencia, en un espectrofotómetro Labsystems iEMS Reader MF.

Otro método utilizado para la determinación de la proliferación celular fue la medida de la incorporación de 5'-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), usando un kit de Roche (Madrid, España) cuyo fundamento esta basado en un inmunoensayo enzimático.

Para ello se recogieron un total de 105 células por pocillo en una placa de 96 pocillos por triplicado. A las células se les añadió BrdU 10 μ M durante 4 horas. Después se recogieron, se fijaron en una mezcla de etanol 70% y HCl 0,5M (a -20°C) durante 30 minutos a -20°C y se incubaron con una solución de nucleasas siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras esta incubación, se añadió el anticuerpo anti-BrdU conjugado con peroxidasa durante 30 minutos a 37°C. El exceso de anticuerpo se eliminó lavando las células 3 veces y, a continuación, se añadió la solución sustrato. Finalmente, se midió la absorbancia en el lector de placas Labsystems iEMS Reader MF a 405nm con una longitud de onda de referencia de 492nm.

Por otra parte, el recuento de células en la cámara Neubauer o hemocitómetro, se realizó tomando una alícuota (10ml) del cultivo y diluyéndola según la densidad del mismo. Finalmente, se añadió el colorante vital azul de Tripán, que permite distinguir las células vivas de las células no viables y se hizo el recuento de células en un microscopio invertido de contraste de fase.

3.3-. Determinación de la apoptosis celular.

Para la detección de apoptosis se usaron dos métodos alternativos: la medida de la incorporación de Ioduro de Propidio y la inclusión-exposición de Ioduro de Propidio-Fosfatidilserina, respectivamente.

3.3.1.-Incorporación de Ioduro de Propidio.

Mediante citometría de flujo, se determinó la cantidad de células que se encontraban en la zona sub G₁ del ciclo, correspondiente a células apoptóticas del mismo modo que en el apartado 3.1.

3.3.2.- Inclusión/exposición de Ioduro de Propidio y fosfatidilserina.

Se utilizó un kit de Pharmigen (San Diego, USA). Utilizando como marcadores la AnexinaV acoplada a un fluoróforo y el IP se detectan células apoptóticas y necróticas (Anthony y cols., 1998). La AnexinaV se une a la fosfatidilserina que en células viables se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática, y sólo se expone en la cara externa en células apoptóticas. El IP es un colorante vital, sólo entra en células con la membrana intacta. Se analizó la exposición de fosfatidilserina y la exclusión de IP tras teñir las células con AnexinaV-fluoresceína (AV-FITC) e IP. La proporción de AV-FITC/IP incorporado se midió por citometría de flujo.

3.3.3.- Detección de muerte celular por TUNEL (*Terminal transferase mediated dUTP- nick end labelling*)

Este ensayo permitió detectar la fragmentación de ADN que se produce en apoptosis. La técnica consiste en la adición de nucleótidos marcados con fluoresceína (FITC) a los extremos 3'-OH libres del ADN fragmentado mediante la enzima Telómero transferasa Terminal TdT (Gavrieli y cols., 1992). Se utilizó el kit *DeadEnd Fluorimetric TUNEL System* (Promega, Madison, USA). Las células se sembraron inmovilizadas en un portaobjetos con cámaras para cultivos con 15µg/ml de poliornitina, y se mantuvieron durante 72 horas en medio RPMI sin suero. Luego se lavaron con PBS filtrado, con PBS con 0,1% tritón X-100 durante 30 minutos, para permeabilizar las células, y otra vez con PBS. A continuación, se mantuvo el porta en el tampón de equilibrado del kit durante 20 minutos, y se añadió la mezcla de TUNEL para la reacción, que contenía 9,8% de mezcla de nucleótidos con FITC, 1,9% de TdT y el tampón de reacción del kit. Después de 1 hora a 37°C, se neutralizó la reacción con solución salina SSC (150mM NaCl, 15mM citrato sódico) y se volvió a lavar con PBS. Finalmente, se añadieron 2mg/ml de DAPI (Dihydrochloride 4',6-Diamidino-2-phenylindole) como control del número de células, se cubrió el portaobjetos con un cubreobjetos, y se selló para su visualización, en microscopio de fluorescencia. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 364 nm y 454 nm respectivamente, para DAPI y, 488 nm y 515 nm para la fluoresceína.

3.4.- Construcciones de plásmidos y transfecciones.

El vector pcDNA3 que contenía la forma constitutivamente activa de MEK1 fue proporcionado por la Dra. Carme Caelles (IRB-PCB, Barcelona, España). El vector pcDNA3 vacío y el vector pcDNA3-MEK1 se introdujeron en los linfoblastos procedentes de 2 líneas celulares distintas con el sistema de nucleofección (Nucleofector system, Amaxa Biosystems GMBH, Cologne, Germany). Para ello se resuspendieron 2×10^6 células en 100ml de Solución V de línea celular según la recomendación del fabricante y se mezclaron con 5mg de ADN plasmídico. Para evaluar la eficacia de la transfección se transfectó el mismo número de células con la construcción pmaxGFP que expresa la proteína GFP (Amaxa Biosystems). Las nucleofecciones se llevaron a cabo con el aparato Nucleofector II de Amaxa y con el programa P-16, según aconseja el fabricante para linfoblastos. La viabilidad celular y la eficacia de la transfección se evaluó pasadas 16 horas de la transfección por análisis por citometría de flujo, sobre 5×10^5 células nucleofectadas con GFP, marcadas con IP. La eficacia de la transfección fue aproximadamente de un 20%. El experimento de retirada de suero se realizó 16 horas después de la nucleofección. Tras 24 horas sin suero, se recogieron las células para extractos para western blotting y para la determinación de la viabilidad celular.

3.5.- Análisis de la expresión de Calmodulina3.

La determinación de los niveles relativos de expresión de Calmodulina3 (CaM3) se realizó mediante RT-PCR semicuantitativa en condiciones establecidas de número de ciclos y cantidad de mensajero en los que la reacción entre los niveles de amplificación y número de ciclos es lineal. En primer lugar, se extrajo el ARN total de las líneas celulares linfoblásticas mediante el procedimiento del tiocianato de guanidinio (Chomczynsky y Sacy, 1987). Para la reacción de RT-PCR se partió de 2µg de ARN, con los que se obtuvo la hebra de ADN complementario y la enzima usada fue la transcriptasa inversa MMLV (*virus de leucemia murina de Moloney*).

Para el análisis de la expresión del gen Calmodulina3 (CaM3) en los transcritos de linfoblastos se diseñaron los siguientes oligonucleótidos:

forward 5'CTTGATCCCCGTGCTCCGGA-3'

reverse 5'-TGTTGAAGAGAGTGCCGGC-3',

consiguiendo con ellos un fragmento de 518 pares de bases. Para normalizar las cantidades de ARN, se realizó en paralelo la amplificación del ADN complementario de la integrina β 3. Para ello se diseñaron los oligonucleótidos

forward 5'-GGGATACGCTTAGGCTTGCT-3'

reverse 5'-AACCTGGGTGTGTGCAACTCT-3',

con los que se consiguió un fragmento de 198 pares de bases del exón III de la integrina. Finalmente, los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa (Pronadisa, España) al 1%, teñido con bromuro de etidio (Sigma, Alcobendas, España) y se cuantificaron las bandas por densitometría con el densitómetro GS-800 y el programa Quantity One 4.3.1 de BioRad.

3.6-. Inmunodetección.

3.6.1-. Preparación de extractos celulares y nucleares.

Para la obtención de extractos celulares se lavaron las células recogidas con PBS en frío, y luego se lisaron durante 20 minutos en hielo, en tampón de lisis (50mM Tris pH 7,4, 150mM NaCl, 50mM NaF, 1% Nonidet P-40) al cual se le añadió ortovanadato sódico 1 mM, PMSF 1mM, pirofosfato sódico 1mM y una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete Mini Mixture, Roche Mannheim, Alemania). Tras una centrifugación, para eliminar los restos de membranas (precipitado), se guardaron los extractos celulares a -80°C.

La concentración de proteínas totales en cada muestra, se determinó con los kits de análisis de proteínas Bio-Rad (Hercules, USA) y BCATM (Illinois, USA).

3.6.2-. Western Blotting.

Los geles de separación y concentración utilizados fueron del 7,5% ó 12% y 4% de poliacrilamida, respectivamente. Se cargaron 20-100µg de proteína total de cada extracto mezclada con tampón de carga (Tris-HCl 100mM, pH 7.4, SDS 4%, azul de bromofenol 0,2%, β-mercaptoetanol 5% y glicerol 20%) y la mezcla se calentó a 90°C durante 10 minutos. En una de las calles se cargó un estándar de peso molecular. La electroforesis se realizó a voltaje constante (100-130 voltios) y el tiempo varió en función de la proteína a determinar. Una vez separadas, las proteínas se transfirieron a una membrana de Poly vinylidene fluoride (PVDF) (Immobilon-P) de BioRad. La cantidad de proteína y la calidad de la transferencia se verificaron tiñendo la membrana con una solución de Ponceau (Ponceau 0,1%, Sigma y ácido acético glacial 5%, Merck) durante unos segundos y, después, se lavó con TBS-T (TBS con Tween-20 0,05%). La membrana se bloqueó en una solución de TBS-T/BSA (TBS-T con BSA 1%) durante una hora a temperatura ambiente y luego se incubó con el anticuerpo primario correspondiente, a la concentración indicada en la tabla VI, diluido en la misma solución de bloqueo hasta el día siguiente, a 4°C, en agitación. Pasado el tiempo de incubación, la membrana se lavó 3 veces con TBS-T durante 10 minutos cada lavado, y para amplificar la señal del anticuerpo primario se incubó con un anticuerpo secundario específico para cada especie conjugado con peroxidasa, a la concentración indicada en la tabla VII, disuelto en una solución TBS-T/leche (TBS-T con 5% leche desnatada) durante una hora. Tras lavar 3 veces con TBS-T durante 10 minutos, se reveló con el sistema detección de sustrato quimioluminiscente, ECL, (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Inglaterra). Posteriormente la membrana se lavó con TBS-T y se trató con un tampón de “stripping” (Pierce, Rockford, USA) durante 20 minutos a 60°C para eliminar los restos de anticuerpos primario y secundario, y a continuación se expuso a un nuevo anticuerpo primario. La cuantificación de las bandas se realizó mediante el estudio densitométrico de los autorradiogramas con un densitómetro GS-800 y el programa Quantity One 4.3.1 de BioRad.

TABLA VI
Anticuerpos primarios utilizados.

Anticuerpo	Dilución	Especie de origen	Casa comercial
Anti-pRb (sc-500)	1:500	Policlonal de conejo	Santa Cruz (Madrid, España)
Anti-ciclina E (sc-198)	1:500	Policlonal de conejo	Santa Cruz (Madrid, España)
Anti-CDK2 (sc-748)	1:500	Policlonal de conejo	Santa Cruz (Madrid, España)
Anti-p21 ^{cip1} (sc-397)	1:500	Policlonal de conejo	Santa Cruz (Madrid, España)
Anti-p27 ^{kip1} (sc-528)	1:500	Policlonal de conejo	Santa Cruz (Madrid, España)
Anti-Bcl-2 (sc-509)	1:2000	Monoclonal de ratón	Santa Cruz (Madrid, España)
Anti-Bax (sc-493)	1:5000	Policlonal de conejo	Santa Cruz (Madrid, España)
Anti-fosfo-Akt (ser473)	1:2000	Policlonal de conejo	Cell Signaling (Beberly, Massachussets)
Anti-Akt (c-20)	1:2000	Policlonal de cabra	Santa Cruz (Madrid, España)
Anti-p44/p42 MAPK (Erk1/2)	1:2000	Policlonal de conejo	Cell Signaling (Beberly, Massachussets)
Anti-fosfo-p44/p42 (thr202/tyr204) MAPK (Erk1/2)	1:500	Policlonal de conejo	Cell Signaling (Beberly, Massachussets)
Anti-β-actina (A 2066)	1:5000	Policlonal de conejo	Sigma Aldrich (Alcobendas, España)
Anti-CaM1 (sc-5537)	1:500	Policlonal de conejo	Sigma Aldrich (Alcobendas, España)

TABLA VII
Anticuerpos secundarios utilizados

Anticuerpo	Dilución	Casa comercial
Anti-IgG de cabra (IgG-HRP)	1:5000	Santa Cruz (Madrid, España)
Anti-IgG de ratón (IgG-HRP)	1:5000	Biorad (Hercules, USA)
Anti-IgG de conejo (IgG-HRP)	1:5000	Biorad (Hercules, USA)

3.6.3-. Inmunoprecipitación y ensayo de la actividad quinasa del complejo ciclina E/CDK2.

Para determinar la actividad quinasa del complejo ciclina E/CDK2, los linfoblastos se sembraron a una concentración inicial de 1×10^6 células \times ml⁻¹. Las células se privaron de suero durante 24 horas. Al día siguiente se estimularon, añadiendo al medio, FBS 10% y se incubaron durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se realizaron extractos celulares (500µg) que fueron incubados con un

anticuerpo contra ciclina E durante 2 horas a 4 °C en rotación, seguido de la incubación con 20µl de proteína G-sefarosa durante 2 horas. Las muestras se lavaron posteriormente en tampón quinasa (50mM KCl, 8mM MgCl₂, 1mM DTT, 3mM ATP, 50 mM HEPES, pH 7,4). Los inmunocomplejos se resuspendieron en 40µl de tampón quinasa al que se le añadió previamente histona H1 (Sigma, Alcobendas, España) (0,2µg/µl), que fue utilizada como sustrato y [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP (10µCi). Después de una hora en agitación a 37°C, la reacción se paró añadiendo 10µl de tampón SDS 6X. Después de hervir las muestras, se resolvieron en un gel de electroforesis SDS-poliacrilamida al 12% y la histona H1 fosforilada se visualizó por autorradiografía. Las cantidades de histona H1 se detectaron mediante tinción del gel con Comassie.

4-. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

A menos que se especifique otra cosa, todos los datos representan los valores medios \pm el error estándar. El análisis estadístico se ha realizado con el programa Data Desk® 4.0 para Macintosh. La significación estadística se estimó, cuando fue necesario, con el análisis de varianza (ANOVA) para medidas repetidas y análisis “post hoc”, o por *prueba t* de Student. Las diferencias se consideraron significativas a un nivel de $p < 0,05$.

Resultados

1-. ESTABLECIMIENTO DE LÍNEAS LINFOBLÁSTICAS.

1.1-. Descripción de los individuos donantes de sangre.

Para llevar a cabo este estudio se han utilizado líneas linfoblásticas derivadas de 20 individuos diagnosticados de probable enfermedad de alzhéimer de aparición tardía, en grado moderado-grave siguiendo los criterios NINCDS-ADRDA (*National Institute of Neurological and Communicative Diseases and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*) (tabla VIII).

TABLA VIII
CRITERIOS NINCDS-ADRDA PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA EA (McKahn y cols, 1984).

A) CRITERIOS PARA EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE POSIBLE EA

1. Demencia con variaciones en su inicio, en la presentación o en el curso clínico, inusuales en la EA, pero para la que no hay explicación alternativa.
2. Presencia de un trastorno secundario sistémico o cerebral capaz de producir demencia del enfermo.
3. Existencia de un déficit gradual progresivo de las funciones cognoscitivas.

B) CRITERIOS PARA EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE PROBABLE EA:

1. Déficit cognoscitivo demostrado mediante examen clínico y documentado con tests y escalas validados.
2. Déficit en dos o más áreas cognoscitivas (memoria, juicio, cálculo, etc.).
3. Empeoramiento PROGRESIVO de la memoria y de otras funciones cognoscitivas.
4. Ausencia de trastornos de la conciencia (delirium).
5. Inicio entre los 40 y 90 años.
6. Sin evidencia de otras enfermedades cerebrales o sistémicas que pudiesen justificar el cuadro.

Apoyan el diagnóstico de EA probable:

7. Presencia de afasia, apraxia, agnosia.
8. Alteración de patrones de conducta e incapacidad para realizar tareas cotidianas
9. Historia familiar.
10. Exámenes complementarios: examen de LCR normal, enlentecimiento inespecífico o anomalía en el EEG, y signos de atrofia cerebral progresiva en estudios seriados de TAC cerebral.

C) CRITERIOS PARA EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO DEFINITIVO EA:

1. Cumplir los criterios clínicos de EA probable.
2. Evidencias histopatológicas obtenidas por biopsia o necropsia.

De esta selección de pacientes de EA, 15 de ellos, eran mujeres y 5, eran varones. La media de edad fue de 74 ± 2 y la media de puntuación obtenida en el test *Mini Mental State Examination* (MMSE) fue de $9 \pm 1,5$. Las comparaciones del estudio se han realizado en paralelo sobre un grupo control de 23 individuos sanos (la media de edad fue de 72 ± 2), de los cuales 13, eran mujeres y 10, eran varones. Ninguno de estos

individuos presentaba síntomas clínicos de demencia, y sus edades eran comparables con las de los enfermos. Estas y otras características de los sujetos controles, así como de los pacientes con EA, se muestran en las tablas IX y X.

TABLA IX
LÍNEAS CELULARES DE CONTROLES SANOS UTILIZADAS EN LOS EXPERIMENTOS.

LÍNEAS	EDAD	SEXO	DIAGNÓSTICO	HISTORIAL CLÍNICO
C10	78	V	sano	-
C11	77	V	sano	-
C12	73	V	sano	-
C14	58	M	sano	-
C18	67	M	sano	-
C33	82	V	sano	Enfermedad pulmonar
C34	88	M	sano	Anemia
C36	79	M	sano	Angor
C37	57	M	sano	Bronco-espasmos
C38	69	V	sano	Enfermedad pulmonar
C40	89	V	sano	-
C41	79	M	sano	Fibrilación auricular
C42	82	M	sano	Infarto
C43	46	M	sano	-
C46	68	V	sano	-
C47	80	V	sano	-
C48	42	M	sano	-
C49	81	M	sano	-
C50	77	M	sano	-
C51	86	V	sano	-

TABLA X
LÍNEAS CELULARES LINFOBLÁSTICAS DE ENFERMOS DE ALZHEIMER UTILIZADAS EN LOS EXPERIMENTOS.

LÍNEAS	EDAD	SEXO	AÑOS DE EVOLUCIÓN	DIAGNÓSTICO PROBABLE	HISTORIA CLÍNICA ADICIONAL
A10	81	M	1	tardía	-
A12	78	M	1	tardía	-
A13	86	M	2	tardía	-
A23	82	V	3	tardía	-
A24	74	V	2	tardía	-
A25	79	M	5	tardía	-
A27	91	V	1	tardía	-
A32	79	M	1	tardía	-
A33	72	V	3	tardía	-
A34	82	M	3	tardía	-
A36	74	M	6	tardía	-
A40	74	M	2	tardía	-
A42	69	V	0	tardía	-

A43	69	M	3	tardía	-
A46	74	M	4	tardía	-
A54	79	M	2	tardía	Hipertensión
A66	83	M	4	tardía	-
A67	80	M	5	tardía	Hipertensión
A71	74	M	6	tardía	-
A73	84	M	4	tardía	-

Para la realización del estudio comparativo de la respuesta celular de linfoblastos de pacientes con EA y Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) (apartado 7) se generaron, adicionalmente, líneas linfoblásticas de 10 pacientes con ELA y 20 nuevas líneas linfoblásticas de pacientes de EA y donantes controles sin síntomas de demencia para evitar posibles diferencias con las líneas de nuestro repositorio, sobrevenidas por la transformación con diferentes preparaciones del virus de Epstein Barr. El diagnóstico de ELA lo realizó el Dr. Jesús Esteban y el de EA lo llevó a cabo el Dr. Félix Bermejo, así como la selección de donantes controles. Los pacientes de EA fueron diagnosticados atendiendo a criterios DSM-III-r (*Diagnostic Statistical Manual III*, revisado) con grado de EA leve, moderada o grave y con puntuaciones MMSE de entre 18-24, entre 10-18, y menores de 10, respectivamente.

El diagnóstico, la selección y la extracción de sangre de todos los enfermos así como de todos los individuos controles, se practicó en el Servicio de Neurología del Hospital Doce de Octubre de Madrid, previa firma del consentimiento informado por parte de los donantes o de sus familiares, cuando las circunstancias lo requirieron (tabla XI).

TABLA XI
CONSENTIMIENTO INFORMADO DE CESIÓN DE MUESTRA DE SANGRE

Con la firma del presente documento, acepto que una muestra de mi sangre sea guardada en el banco de muestras de sangre y tejidos neurológicos del Hospital "12 de Octubre" de Madrid. Esta donación de mi sangre podrá ser utilizada ahora o en el futuro para la investigación médica (básica, clínica o epidemiológica) siguiendo la normativa del comité ético de dicho Hospital (acorde con la legislación española e internacional al respecto). Esta incluye la confidencialidad (anonimato) de los datos sobre mi muestra de sangre o tejido.

En el momento que desee puedo retirar tanto este consentimiento como mi muestra de sangre e, incluso, por mí mismo o por un representante designado por mí puedo conocer la situación de los estudios que se realicen con la muestra de mi sangre.

Si no manifestara mi deseo de conocer la investigación no será informado de la misma a no ser que de ella se derive una utilidad clara para las enfermedades que yo padezca o mis familiares.

En Madrid, a de de 20.....

Nombre del donante:

Firma del donante

Firma de familiar o testigo
(Exigible en caso de deterioro cognitivo del donante)

Firma del médico o personal entrenado que realiza la extracción y que garantiza haber explicado los fines y riesgos de la extracción de sangre.

2-. ACTIVIDAD PROLIFERATIVA DE LINFOBLASTOS PROCEDENTES DE DONANTES CONTROLES Y DE PACIENTES CON EA.

Estas líneas celulares han sido utilizadas previamente en nuestro laboratorio y caracterizadas funcionalmente. En concreto, se ha descrito una alteración en la homeostasis de Ca^{2+} y de H^+ en las líneas celulares de pacientes de EA (Ibarreta y cols., 1997, 1998; Urcelay y cols., 2001), así como una respuesta celular diferente de los controles dependiendo de la disponibilidad de factores tróficos. El hecho es que, en presencia de suero, los linfoblastos de EA tienen una mayor tasa de proliferación celular que los individuos controles (de las Cuevas y cols., 2003, 2005; Muñoz y cols., 2005, 2008a, 2008b; Sala y cols., 2008) y, en ausencia de factores tróficos, ofrecen mayor resistencia a la muerte celular (Cuevas y cols., 2005; Bartolomé y cols., 2007). Ambos procesos son revertidos en presencia de antagonistas de CaM, sugiriendo que la disfunción de la cascada de señalización dependiente de Ca^{2+} /CaM, juega un papel relevante en la EA, al menos, a nivel sistémico.

El principal objetivo de esta tesis ha sido estudiar los mecanismos moleculares implicados en el control de la proliferación y supervivencia/muerte celular y su alteración en la EA.

2.1-. Efecto del suero sobre proliferación celular.

En la figura 9, se recoge un análisis pormenorizado de la proliferación experimentada por los linfoblastos de cada uno de los individuos controles y con EA al cabo de 72 horas, donde puede observarse que en la mayoría de los casos de pacientes con EA, la tasa de proliferación ha sido significativamente mayor que la de los donantes controles. En esta misma figura, también se muestran los valores promedio de estos experimentos correspondientes a cada uno de los grupos de individuos.

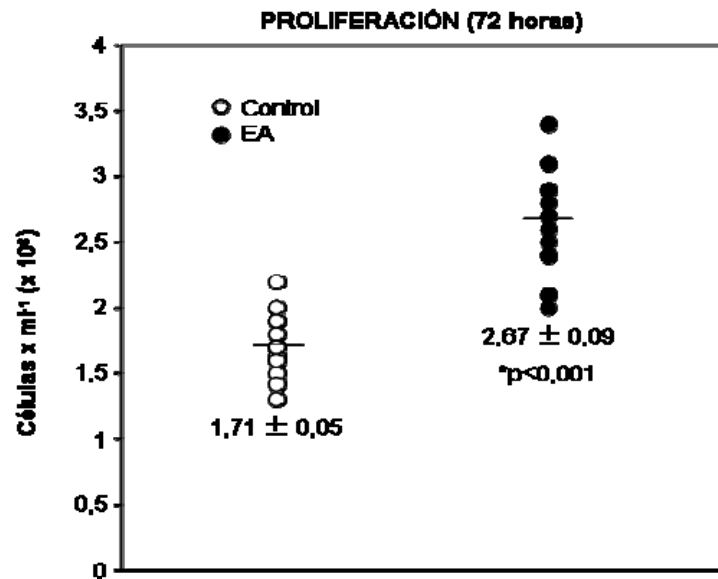


Figura 9. Diagrama de dispersión comparativo de la actividad proliferativa de linfoblastos de individuos controles y de pacientes con EA. Los linfocitos inmortalizados de individuos controles y pacientes con EA se sembraron a una concentración inicial de 1×10^6 células x ml⁻¹, en medio RPMI con 10% de FBS. Al cabo de 72 horas, se recogieron muestras de cada uno de los individuos para su recuento en la cámara Neubauer. Cada punto de la figura corresponde a un individuo y se recoge el valor medio \pm el error estándar de cada grupo (Control y EA). *p<0,001: diferencias estadísticamente significativas.

2.2.- Fosforilación de la proteína pRb y actividad quinasa del complejo ciclina E/CDK2.

Trabajos previos de nuestro laboratorio, demostraron la existencia de una perturbación en el paso de la fase G₁ a la fase S del ciclo celular en linfoblastos procedentes de enfermos de alzhéimer, habiéndose encontrado cambios en el estado de fosforilación de las proteínas de la familia de retinoblastoma (pRb, p107, p130) y en la actividad del factor de transcripción E2F (de las Cuevas y cols., 2003; Muñoz y cols., 2005). La función de pRb es reprimir la activación de la familia de factores de transcripción E2F, cuyo papel es regular el tránsito entre las fases G₁ y S del ciclo celular. Cuando pRb es fosforilada, disminuye su afinidad por E2F, permitiendo a estos factores de transcripción su unión a las secuencias de ADN presentes en los promotores de los genes correspondientes (Luo y cols., 1998). En este trabajo se ha valorado la actividad quinasa del complejo ciclina E/CDK2 responsable de la fosforilación de pRb en linfoblastos controles y de pacientes con EA. La figura 10 muestra, a las 24 horas de la estimulación con suero, un aumento en los niveles y en el estado de fosforilación de pRb (las formas hipo e hiperfosforilada pueden distinguirse por su movilidad electroforética) en los linfoblastos de EA en relación a los controles. De igual forma, la

actividad kinasa del complejo ciclina E/CDK2 es, considerablemente, más alta en las células de pacientes de EA (figura 10).

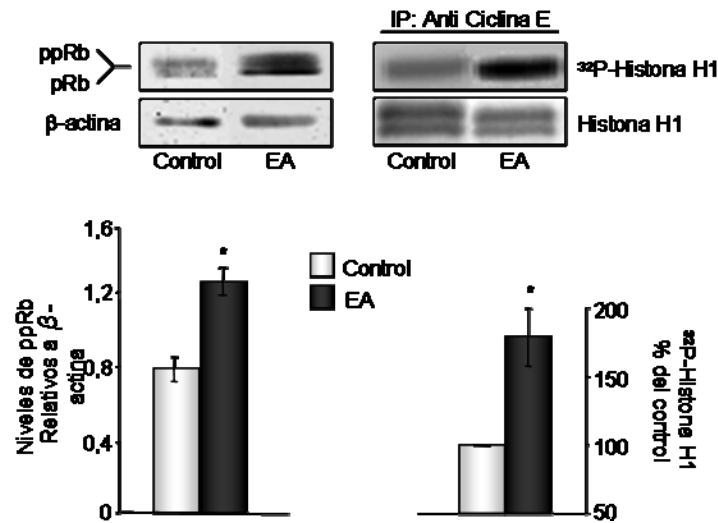


Figura 10. Estado de fosforilación de pRb y actividad kinasa del complejo ciclina E/Cdk2 en linfoblastos de individuos controles y de EA. Los linfoblastos de individuos controles y de EA se sembraron a una densidad inicial de 1×10^6 células \times ml^{-1} , durante 24 horas, en medio RPMI 1640, con 10% de FBS. Los niveles de pRb hipo- e hiperfosforilada (pRb y ppRb, respectivamente) se determinaron mediante western blotting. En la parte superior izquierda de la figura, se muestran experimentos representativos y debajo se presentan los valores medios \pm el error estándar de la densitometría de las bandas normalizadas con β -actina, correspondiente a 4 experimentos distintos. La medida de la actividad kinasa de ciclina E/CDK2 se realizó inmunoprecipitando los extractos celulares con el anticuerpo anti-ciclina E. Después, se cuantificó la actividad kinasa utilizando como sustrato la proteína histona H1. Los niveles de histona se determinaron mediante la tinción de los geles de electroforesis con Coomassie. En la parte superior derecha de la figura, se muestra un experimento representativo mientras que, en la parte inferior, se presenta el análisis densitométrico. Los resultados son la media \pm el error estándar de 4 experimentos. * $p < 0,05$: respecto a las células controles.

2.3.- Expresión de proteínas reguladoras del tránsito de G₁ a S del ciclo celular.

A pesar de este aumento inducido por suero en la actividad kinasa de ciclina E/CDK2 y en la fosforilación de pRb en las células de EA, la figura 11 demuestra que no existen diferencias significativas en el contenido celular de CDK2 y de ciclina E entre los dos grupos. Dado que la actividad de las CDKs depende también de la presencia de proteínas inhibidoras (CDKIs), se analizaron las posibles diferencias en los niveles de expresión de p21^{cip} (p21) y p27^{kip} (p27), que pudieran explicar los cambios en la fosforilación de pRb en los linfoblastos de pacientes de EA. La figura 11 confirma resultados previos de nuestro laboratorio al mostrar una disminución considerable en los niveles de p27 en las células procedentes de enfermos de alzhéimer (de las Cuevas y

cols., 2003; Muñoz y cols., 2005, 2008a). Al mismo tiempo, la figura 11, amplía estos resultados, ya que, también, se observa menor contenido de la proteína p21 en las células derivadas de los pacientes.

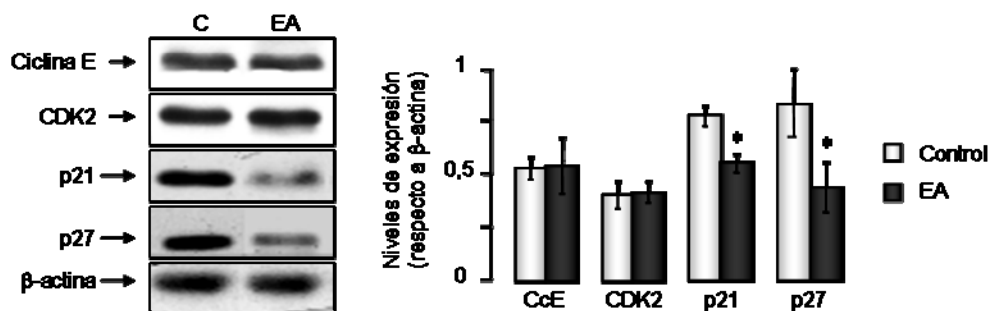


Figura 11. Niveles de expresión de las proteínas ciclina E, Cdk2, p21 y p27 en linfoblastos de individuos controles y de EA. A. Los linfoblastos de individuos controles y de EA, se sembraron a una concentración de 1×10^6 células \times ml^{-1} , en medio RPMI 1640 con 10% de FBS. Tras 24 horas, las células se recogieron para hacer extractos para western blotting y medir así los niveles de expresión de cada una de las proteínas. A la izquierda de la figura se muestran experimentos representativos de los niveles de expresión de ciclina E, CDK2, p21 y p27 y, en la derecha, se muestra el análisis densitométrico de las bandas. Los resultados son la media \pm el error estándar de 4 a 6 experimentos. * $p < 0,05$: respecto a las células controles.

2.4-. Regulación del contenido celular de p21 y p27.

La regulación del contenido celular de los CDKIs, p21 y p27, se realiza por diversos mecanismos, bien controlando su expresión (el-Deiry y cols., 1993; Parker y cols., 1995; Polyak y cols., 1994) o bien su degradación por el proteasoma o mediante caspasas (Blagosklonny y cols., 1996; Levkau y cols., 1998; Nakayama y cols., 2001).

Al menos en lo que se refiere a p27, se cree que el mecanismo más importante de regulación de sus niveles celulares es, generalmente, el control de la degradación (Nakayama y cols, 2001), por tanto, se ha intentado aquí elucidar si existen diferencias en la degradación de p27 y p21 entre los linfoblastos de individuos controles y de EA.

2.4.1-. Determinación de la vida media de p21 y p27 en linfoblastos controles y de EA.

Para la determinación de la vida media de p21 y de p27, las células se incubaron en presencia del inhibidor de síntesis de proteínas, cicloheximida, con el objetivo de detener la síntesis *de novo* y, después, medir el tiempo de desaparición de la proteína preexistente mediante Western Blotting. En linfoblastos humanos, como en otros tipos celulares (Dash y el-Deiry, 2005), p21 es una proteína con una vida media corta. La

figura 12 muestra cómo, 2 horas después de inhibir la síntesis de proteínas, los niveles de p21 se han reducido en más del 50%. Puede observarse también, que la velocidad de degradación de p21 es mayor en los linfoblastos de EA que en los procedentes de sujetos controles, estimándose la vida media de la proteína en las células de EA en $0,9 \pm 0,04$ horas frente a $1,7 \pm 0,12$ horas en células controles.

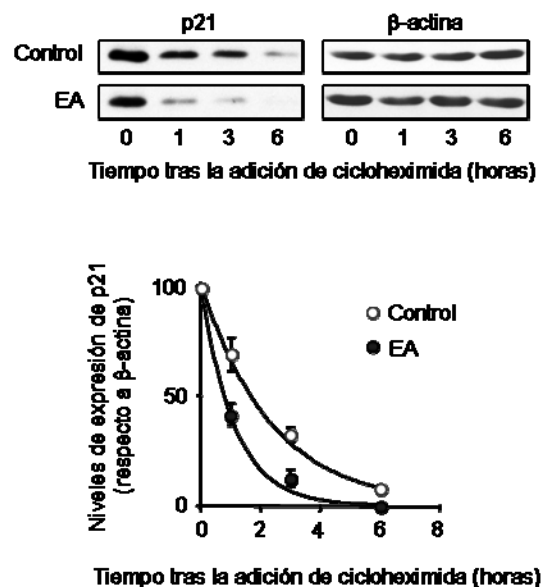


Figura 12. Vida media de p21, en linfoblastos de individuos controles y de EA. Inicialmente, las células se sembraron en medio RPMI 1640, con 10% de FBS. Tras 24 horas en cultivo, se añadieron 20 μ g/ml de cicloheximida y se recogieron extractos para la detección de p21, por western blotting, a los tiempos indicados en la figura. En la parte superior se muestra un experimento representativo. En la parte inferior de la figura, se muestran los resultados del análisis de la desaparición de p21 en función del tiempo de 5 experimentos. La vida media de p21 se estimó en $1,7 \pm 0,12$ horas y $0,9 \pm 0,04$ horas en linfoblastos controles y de EA, respectivamente.

La proteína p27 muestra una vida media mucho más larga (figura 13). De igual manera y, de acuerdo con resultados previos del laboratorio (Muñoz y cols., 2008a), la velocidad de degradación de p27 aumenta en los linfoblastos de EA, de forma que la vida media de la misma es casi la mitad en células de EA que la de células controles ($12 \pm 0,4$ horas frente a $22 \pm 1,3$ horas).

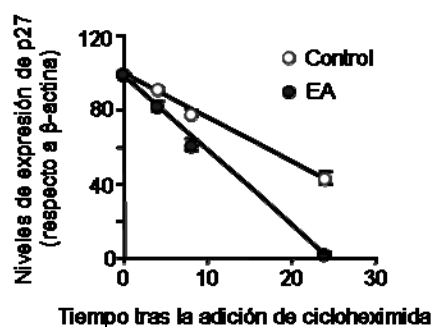
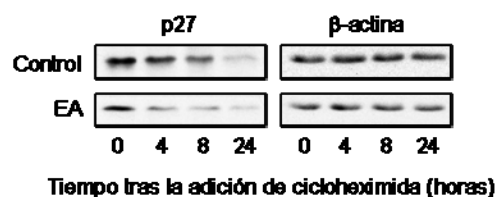


Figura 13. Vida media de p27, en linfoblastos de individuos controles y de EA. Inicialmente, las células se sembraron en medio RPMI 1640, con 10% de FBS. Tras 24 horas en cultivo, se añadieron 20 μ g/ml de cicloheximida y se recogieron extractos para la detección de p27, por western blotting, a los tiempos indicados en la figura. En la parte superior se muestra un experimento representativo. En la parte inferior de la figura, se muestran los resultados del análisis de la desaparición de p27 en función del tiempo de 5 experimentos. La vida media de p27 se estimó en $22 \pm 1,3$ horas y $12 \pm 0,4$ horas en linfoblastos controles y de EA, respectivamente.

2.4.2.- Papel de la vía ubiquitin-proteasoma en la degradación de p21 y p27.

Con el objetivo de saber que vía está implicada en la degradación de p21 y p27, se determinaron los niveles de estas proteínas mediante western blotting, tras haber incubado las células, por una parte, con el inhibidor del proteasoma, MG132 y, por otra, con el inhibidor general de caspasas, z-VAD-fmk.

Como se observa en la figura 14, los niveles de p21 y de p27 solamente aumentan en presencia de MG132 y no en presencia de z-VAD-fmk, indicando que la degradación de estas proteínas se produce en el proteasoma y no a través de la vía de las caspasas (figura 14).

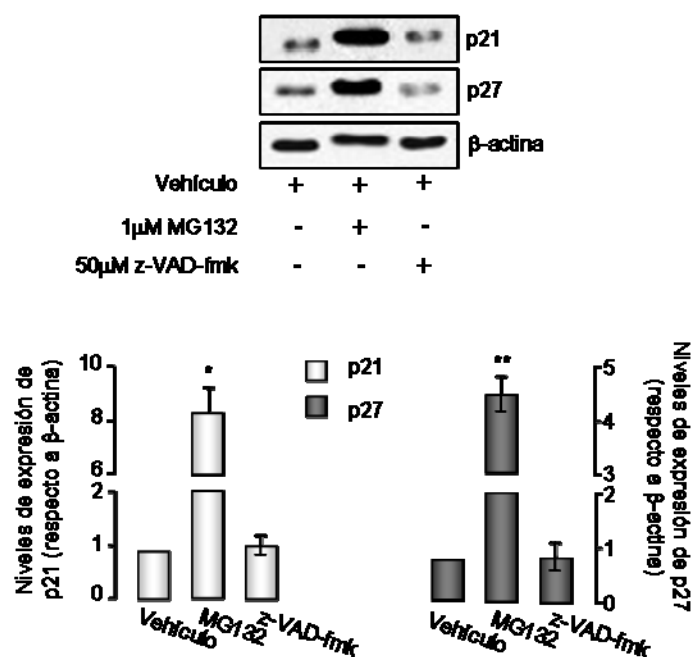


Figura 14. Efecto de MG132 y z-VAD-fmk, sobre los niveles de expresión de las proteínas p21 y p27 en linfoblastos de pacientes con EA. Las células de EA se incubaron a una concentración de 1×10^6 células \times ml^{-1} , durante 24 horas, en medio RPMI 1640, con 10% de FBS, en ausencia o en presencia de $1\mu\text{M}$ de MG132, y en ausencia o en presencia de $50\mu\text{M}$ de z-VAD-fmk. Transcurrido ese tiempo, se recogieron para hacer extractos y medir por western blotting los niveles de p21 y p27. La parte superior de la figura muestra experimentos representativos de cada una de las proteínas, mientras que en la parte inferior, se muestran los valores medios \pm el error estándar del análisis densitométrico de cada una de las proteínas, correspondiente a un número de entre 6 y 8 experimentos independientes. * $p < 0,01$ y ** $p < 0,05$: respecto a las células no tratadas.

2.5.- Influencia de la perturbación de la señalización a través de Ca^{2+} /Calmodulina (CaM) en la actividad proliferativa de linfoblastos controles y de enfermos de alzhéimer.

Como ya se ha mencionado, trabajos previos de nuestro laboratorio pusieron de manifiesto una mayor actividad de la vía de señalización dependiente de Ca^{2+} /CaM (Urcelay y cols., 2001; de las Cuevas y cols., 2003). En la figura 15, se muestra que el tratamiento con dos antagonistas de CaM, no relacionados estructuralmente, como son el CMZ y el W7 inhiben selectivamente el incremento de la proliferación celular inducido por suero en linfoblastos de pacientes de EA y no afectan a la tasa basal de proliferación de las células controles. Al mismo tiempo, puede apreciarse que los antagonistas de CaM previenen parcialmente la fosforilación de pRb en los linfoblastos de EA y revierten la disminución de los niveles de p27 (figura 15).

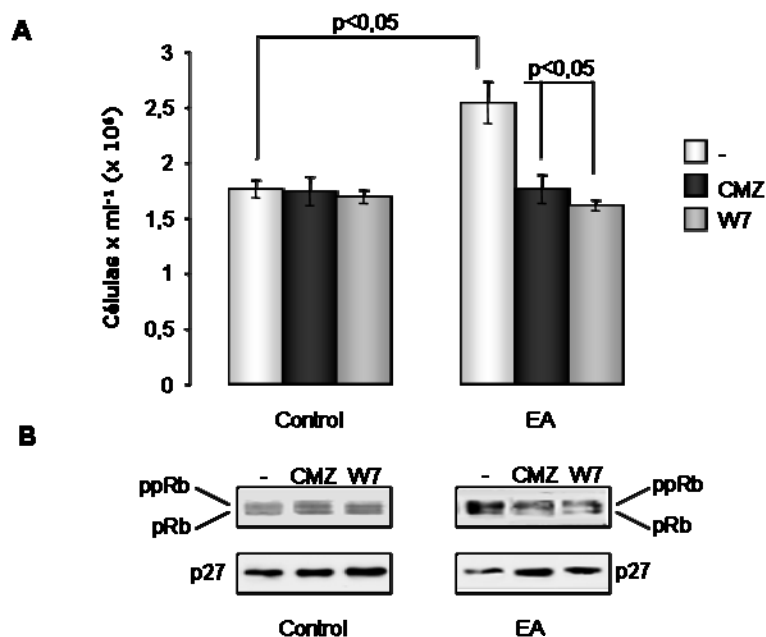


Figura 15. Efecto del tratamiento con antagonistas de CaM sobre la actividad proliferativa y contenido celular de p21 y p27. Los linfoblastos de individuos controles y de EA, se sembraron a una densidad inicial de 1×10^6 células \times ml⁻¹ y se cultivaron durante 72 horas en medio RPMI con 10% de FBS, en ausencia y en presencia de calmidazolium (CMZ) 1 μ M o W7 1 μ M. El panel A muestra la actividad proliferativa a las 72 horas de la estimulación. Los valores son la media \pm el error estándar de 6 experimentos distintos. El panel B muestra un experimento representativo de inmunoblotting a las 24 horas de la estimulación.

3.- ESTUDIO DE LA VULNERABILIDAD CELULAR FRENTE A LA RETIRADA DE SUERO EN LINFOBLASTOS DE INDIVIDUOS CONTROLES Y DE PACIENTES CON EA.

3.1.- Mecanismos moleculares implicados en la muerte celular inducida por la privación de suero.

De acuerdo con estudios previos realizados en nuestro laboratorio, las células procedentes de individuos con EA experimentan una mayor resistencia a la muerte celular inducida por la ausencia de factores tróficos (de las Cuevas y cols., 2005; Bartolomé y cols., 2007). Este hecho ha sido reproducido tal y como se muestra en la figura 16, donde se midió la supervivencia celular de un grupo de líneas controles y un grupo de líneas de pacientes con EA, al cabo de 72 horas de privación de suero. Se puede comprobar que el porcentaje de supervivencia celular del conjunto de individuos con EA ($90 \pm 3\%$), supera la supervivencia celular del conjunto de individuos controles ($60 \pm 3\%$).

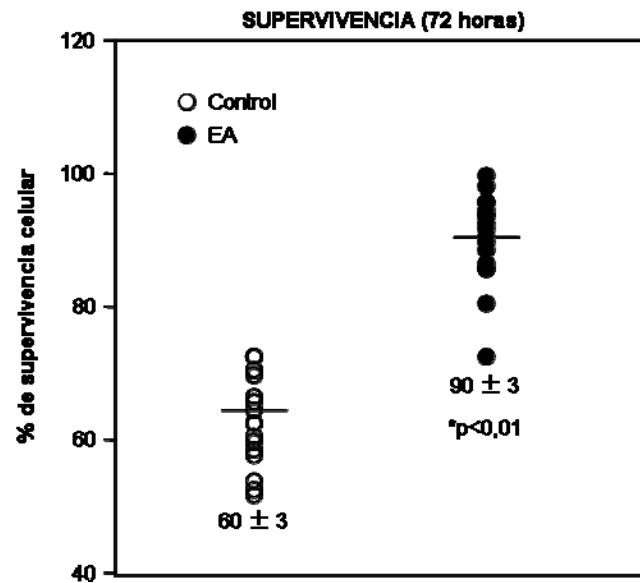


Figura 16. Diagrama de dispersión comparativo entre la supervivencia celular tras la retirada de suero de linfoblastos de individuos controles y pacientes de EA. Los linfoblastos de individuos controles y de pacientes de EA se sembraron, inicialmente, a una densidad de 1×10^6 células ml^{-1} , en medio RPMI sin suero, durante 72 horas. La viabilidad celular se determinó mediante recuento de células que excluían azul de Tripán. Los valores están expresados como el porcentaje relativo al número inicial de células a día 0. * $p < 0,01$: significativamente distinto de las células controles.

Para descartar la posibilidad de que estas diferencias en supervivencia pudieran ser consecuencia de la mayor actividad proliferativa observada en linfoblastos de pacientes con EA (figura 9), se determinó la tasa de síntesis de ADN midiendo la incorporación de BrdU en un grupo y otro de individuos, en presencia de suero o en presencia de un sustituyente del mismo (serum replacement). Tal y como se esperaba, la incorporación de BrdU por las células de pacientes de EA fue significativamente mayor que la incorporación por parte de las células controles en presencia de 10% de suero (figura 17). Sin embargo, cuando las células se incubaron sin el aporte de factores tróficos, no se observaron diferencias en la síntesis de ADN y, por tanto, en la proliferación, entre los individuos controles y los pacientes con EA.

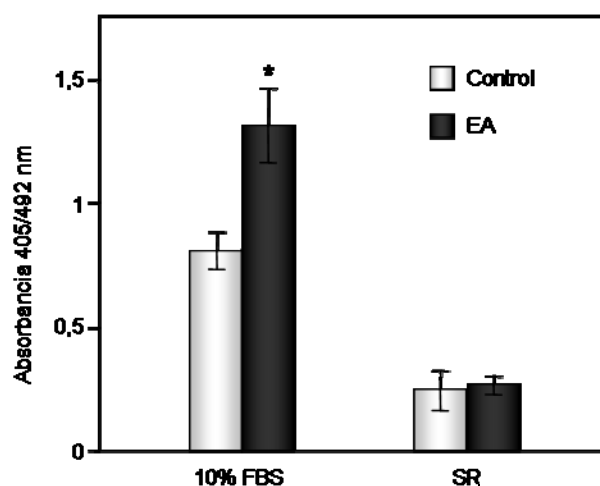


Figura 17. Respuesta proliferativa de linfoblastos de individuos controles y de pacientes con EA. Inicialmente, se sembraron linfoblastos de individuos controles y de EA en medio RPMI con 10% de suero en un caso o con el sustituyente de suero (SR) en otro caso, en una placa de 96 pocillos, a una concentración de 1×10^6 células \times ml^{-1} (1×10^5 células por pocillo). Tras 72 horas, se dio un pulso durante 4 horas con BrdU $10\mu\text{M}$. De esta forma, la síntesis de ADN se midió mediante la incorporación de BrdU, siguiendo las instrucciones del fabricante. La proliferación se expresa como la resta entre la absorbancia obtenida en las células estimuladas menos la obtenida en los cultivos no estimulados. En la figura, cada barra representa el valor medio \pm el error estándar de 3 experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. * $p < 0,05$: significativamente distinto que las células controles.

Tomados en conjunto, estos resultados apuntan a que el incremento en la supervivencia celular ante la retirada del suero, es un hecho que distingue a los linfoblastos de pacientes con EA de los de individuos controles y que no está relacionado con su mayor actividad proliferativa.

Partiendo de la observación de que la retirada de suero indujo muerte celular en condiciones normales (células controles), fue importante determinar qué mecanismo de muerte celular (necrosis o apoptosis) estaba implicado en la disminución de la viabilidad celular tras la retirada de suero. Para ello, se realizaron una serie de pruebas encaminadas a descartar una u otra posibilidad de muerte. En primer lugar, se analizó el contenido celular de ADN en cada una de las fases del ciclo celular mediante citometría de flujo, tras la retirada de suero, en linfoblastos controles y de pacientes con EA (figura 18A). El análisis mostró un mayor número de células con un contenido de ADN menor de $2n$ (núcleos hipodiploides) en las células procedentes de individuos controles. Un hecho característico de la muerte celular por apoptosis es la fragmentación del ADN en los núcleos de las células que experimentan este tipo de muerte. Por este motivo, en segundo lugar, se detectó la fragmentación del ADN mediante la tinción conjunta de TUNEL, que es específica para ADN fragmentado y, DAPI, que tiñe todos los núcleos

presentes en la preparación (figura 18B). Como se observa en el experimento representativo de la figura, el número de células positivas para TUNEL fue mayor en los cultivos de células controles que en los de células de pacientes con EA.

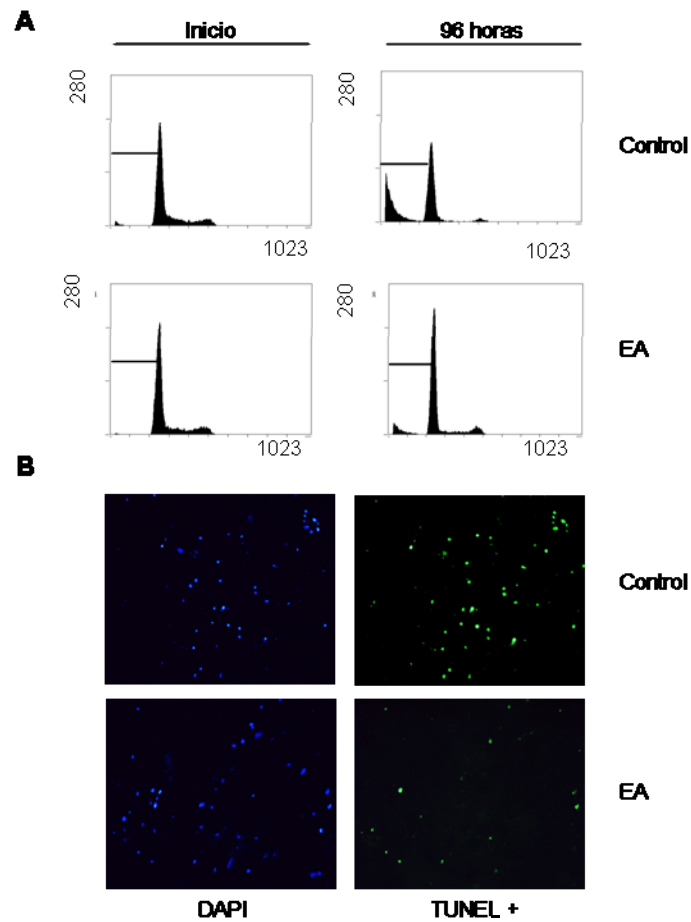


Figura 18. Efecto de la retirada de suero sobre la distribución de células en el ciclo celular y fragmentación del ADN de linfoblastos de individuos controles y de pacientes con EA. Panel A: las células se sembraron a una concentración inicial de 1×10^6 células \times ml^{-1} en medio RPMI sin suero. Tras 96 horas de la retirada de suero, las células se recogieron, se fijaron y, mediante citometría de flujo, se analizó el ciclo celular tal como se describe en “material y métodos”. Las marcas que aparecen en la figura muestran la fase sub- G_0/G_1 . Panel B: las células se incubaron con medio sin suero en portaobjetos con cámaras para cultivos con poliornitina, durante 96 horas. Después se visualizaron con el marcaje TUNEL. Las células con fragmentación de ADN positiva (núcleos TUNEL positivos) muestran fluorescencia verde sobre la tinción con fluoresceína. En la figura se muestran experimentos representativos. Para identificar los núcleos se utilizó como señal 4' 6'-Diamino-2-penylindol (DAPI).

La figura 19 muestra cómo el tratamiento de las células con un inhibidor general de caspasas, z-VAD-fmk, previene la muerte celular de los linfoblastos controles a las 72 horas de la retirada de suero.

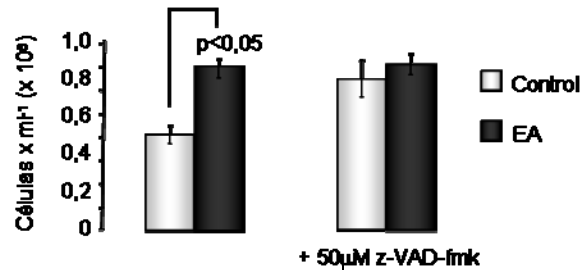


Figura 19. Efecto protector del inhibidor de caspasas z-VAD-fmk, sobre la apoptosis inducida por la retirada de suero. Los linfoblastos procedentes de individuos controles y de pacientes con EA se sembraron a una densidad inicial de 1×10^6 células $\times \text{ml}^{-1}$, en medio RPMI sin suero, durante 72 horas, en ausencia o en presencia del inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk $50 \mu\text{M}$. La viabilidad celular fue valorada mediante recuento de las células que excluían azul de Tripán en el microscopio invertido de contraste de fase. Los valores mostrados son el resultado de la media \pm el error estándar de 6 experimentos distintos realizados por duplicado. $p < 0,05$: significativamente distinto que las células controles.

Por último, la figura 20 muestra el efecto de la retirada del suero sobre los niveles de las proteínas Bcl-2 y Bax, cuyo balance determina la entrada de las células en apoptosis, en linfoblastos de individuos controles y pacientes con EA. Aparentemente, la proteína antiapoptótica Bcl-2, aumenta tras la retirada del suero en ambos tipos celulares. Este aumento es, probablemente, consecuencia de la activación transcripcional por el factor NF- κ B, ya que éste aumenta también en respuesta a la privación de suero (de las Cuevas y cols., 2005). Aunque los niveles de Bcl-2 son más bajos en los linfoblastos de EA, la relación Bcl-2/Bax resultó ser significativamente más alta que en los linfoblastos derivados de donantes controles (figura 20).

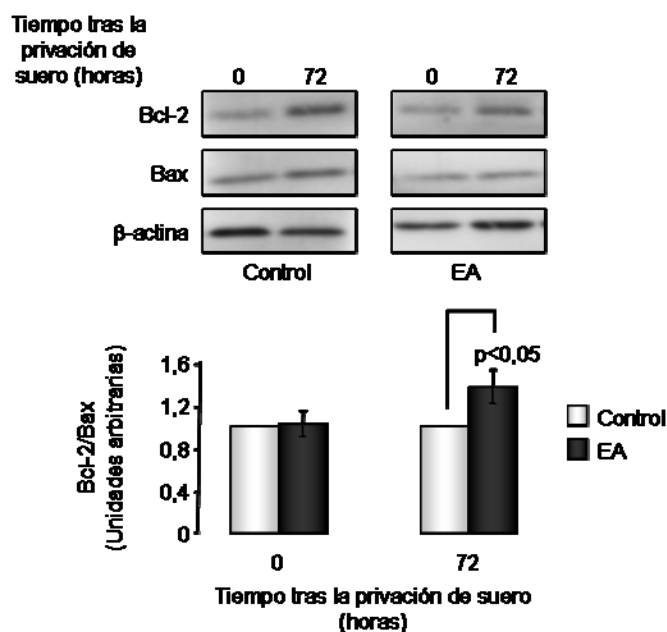


Figura 20. Niveles de expresión de las proteínas Bcl-2 y Bax de linfoblastos controles y de EA. Los linfoblastos controles y de EA se sembraron a una concentración de 1×10^6 células \times ml^{-1} en medio RPMI sin suero durante 72 horas. Las células se recogieron para hacer extractos para western blotting a tiempos 0 y 72 horas. La parte superior de la figura muestra algunos experimentos representativos mientras que la parte inferior muestra el análisis densitométrico promedio del cociente Bcl-2/Bax de 8 experimentos diferentes con distintos individuos. $p < 0,05$: significativamente distinto que las células controles.

En resumen, todos estos resultados (mayor cantidad núcleos hipodiploides, mayor número de células con ADN fragmentado, aumento de la supervivencia celular en presencia del inhibidor general de caspasas y menor cociente Bcl-2/Bax) obtenidos en células de sujetos controles, apuntan a que la muerte celular observada en estas células se produce vía apoptosis.

3. 2-. Influencia de la perturbación en la señalización a través de Ca^{2+} /CaM sobre la muerte celular inducida por la ausencia de factores tróficos.

En trabajos previos del laboratorio, se había puesto en evidencia la importancia de Ca^{2+} /CaM en el control de la respuesta celular a la privación del suero. En concreto, la mayor supervivencia de los linfoblastos de EA tras la retirada del suero, se asoció a una regulación a la baja de la actividad del factor de transcripción NF- κ B (de las Cuevas y cols., 2005), que podía recuperarse tras la administración de antagonistas de CaM, a las células de EA.

En los resultados que se resumen en la tabla XII, se ha analizado el efecto de alteraciones en los niveles intra- y extracelulares de Ca^{2+} , así como de antagonistas de CaM o inhibidores de CaMKII, en la respuesta de los linfoblastos controles o de EA a la retirada de suero. Puede observarse cómo el tratamiento de las células con el antagonista de CaM, CMZ, sensibilizó a las células procedentes de EA a la muerte celular inducida por la ausencia de factores tróficos, sin producir cambios en el porcentaje de supervivencia de las células controles (tabla XII). Los resultados de supervivencia obtenidos con el inhibidor de CaMKII, KN-62, sugieren que CaMKII mediaría la acción de CaM sobre la supervivencia celular de los linfoblastos de EA, ya que se observan valores de supervivencia similares a los obtenidos con el antagonista de CaM. También se muestra en la tabla XII, que la aplicación a los cultivos del quelante extracelular de Ca^{2+} , EGTA, disminuyó significativamente la supervivencia celular de los linfoblastos procedentes de pacientes con EA y más levemente, la de los controles, mostrando así una dependencia del Ca^{2+} extracelular por parte de los dos grupos de estudio. Sin embargo, al aplicar a los cultivos un quelante de Ca^{2+} intracelular, BAPTA-AM, se vio que apenas tuvo consecuencias para la supervivencia de las células procedentes de EA pero sí redujo aún más la viabilidad de las células de sujetos controles.

TABLA XII
IMPLICACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN Ca^{2+} /CALMODULINA EN LA MUERTE
CELULAR INDUCIDA POR LA RETIRADA DE SUERO

Tratamiento	CONTROL	EA
	% de supervivencia celular	
-	66±4	95±3 ^a
CMZ 1µM	60±3	61±6 ^b
KN-62 1µM	47±5	53±7 ^b
EGTA 1mM	48±6	64±5 ^b
BAPTA-AM 2,5µM	52±7	83±5 ^a

Los linfoblastos de sujetos controles y pacientes con Alzheimer, se incubaron en medio RPMI sin suero durante 72 horas en ausencia o en presencia del antagonista de CaM, Calmidazolium (CMZ), el inhibidor de CaMKII, KN-62 o los quelantes de calcio, EGTA y BAPTA-AM. Las células se contaron en la cámara Neubauer con el método de exclusión por azul de Tripán para obtener el valor de supervivencia celular. Los resultados se expresan como porcentaje del número de células viables respecto al día 0 y como valor medio ± error estándar de seis experimentos independientes. Diferencias estadísticas: ^ap<0,05, para linfoblastos de individuos controles; ^bp<0,05, para linfoblastos de EA no tratados.

Por otra parte, la figura 21 recoge un experimento representativo, en el que se valoró la influencia del antagonista CMZ sobre los procesos de apoptosis/necrosis en linfoblastos de individuos controles y de EA privados de suero. Para este fin, se analizó

por citometría de flujo la externalización de fosfatidilserina, característica de las células en apoptosis, mediante tinción con AnexinaV acoplada con FITC e IP. Puede observarse que la retirada de suero produjo en las células de individuos controles un aumento significativo de células apoptóticas (AnexinaV⁺/IP⁻) y necróticas (AnexinaV⁺/IP⁺) (figura 21, panel superior izquierdo), respecto a las células de pacientes con EA (figura 21, panel inferior izquierdo). El tratamiento de las células con CMZ no tuvo efecto sobre los linfoblastos de los sujetos controles (figura 21, panel superior derecho) pero incrementó el número de células AnexinaV⁺/IP⁻, correspondiente a estadios tempranos de apoptosis, en los cultivos de pacientes de EA (figura 21, panel inferior derecho), confirmando la dependencia de CaM en la supervivencia de los linfoblastos procedentes de individuos con alzhéimer.

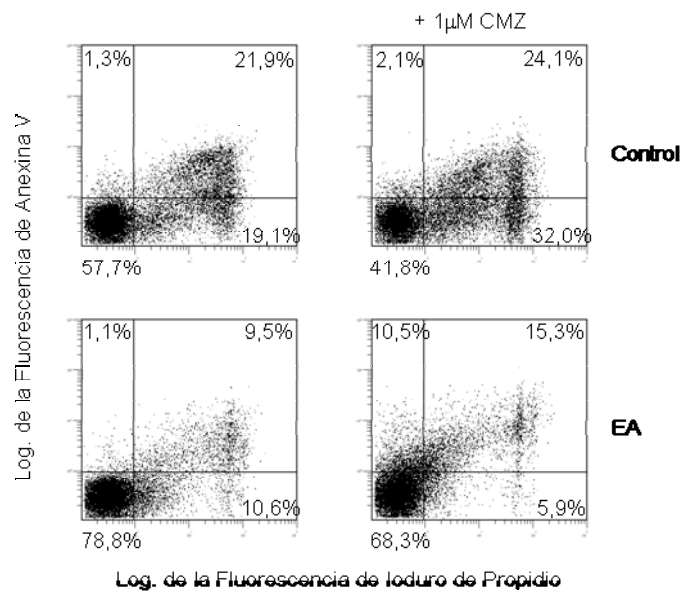


Figura 21. Influencia de CMZ sobre los procesos de apoptosis y necrosis en linfoblastos controles y de EA. Tras 72 en cultivo en medio RPMI sin suero y en presencia o en ausencia de CMZ 1µM, las células de linfoblastos controles y de pacientes con EA, se recogieron y se prepararon para el análisis por citometría de flujo de cada uno de los casos tal y como se describe en el apartado “métodos”. En la figura, se muestran los resultados representativos de uno de los experimentos de la medida de células viables (abajo izquierda), apoptóticas (arriba izquierda) y necróticas (arriba derecha). Los paneles de la derecha muestran los resultados en presencia de CMZ.

4-. ESTUDIO DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN EL CONTROL DE SUPERVIVENCIA/MUERTE DE LINFOBLASTOS CONTROLES Y DE EA.

4.1-. Implicación de PI3K/Akt y Erk1/2 en el control de la actividad proliferativa.

En muchos tipos de células, los procesos de proliferación y supervivencia celular, son controlados por PI3K/Akt y proteínas kinasas activadas por mitógeno (MAPKs) que son mediadores en la cascada de señalización activada por interacciones receptor-ligando (Cross y cols., 2000; Brazil y cols., 2002 y Johnson y Lapadat, 2002). La participación potencial de estas vías de señalización, se analizó, en primer lugar, determinando el efecto del suero en la activación de estas cascadas de señalización en linfoblastos controles y de EA. En segundo lugar, se ha analizado el efecto de los inhibidores farmacológicos específicos de estas vías en la respuesta diferencial al suero de linfoblastos controles y de EA. Por último, se ha considerado la posibilidad de que exista una interacción entre la vía de señalización dependiente de CaM y estas rutas de supervivencia/muerte celular, en base a trabajos previos de nuestro laboratorio, que indican que la actividad proliferativa y la vulnerabilidad celular de linfoblastos de pacientes de EA son sensibles a antagonistas de CaM (Urcelay y cols. 2001; de las Cuevas y cols., 2003, 2005).

La figura 22 muestra la cinética de activación de PI3K/Akt y Erk1/2, inducida por suero. La actividad de la vía PI3K/Akt puede determinarse indirectamente examinando la fosforilación de la molécula de Akt con anticuerpos fosfo-específicos. De forma similar, se valora la activación de Erk1/2. La figura 22A, muestra un aumento en la fosforilación de Akt en Ser473 a los 15 minutos de la estimulación por suero, que persiste durante al menos, 1 hora. En experimentos posteriores, se pudo demostrar que la activación es aún evidente a las 24 de la adición de suero. Por el contrario, la fosforilación de Erk1/2 alcanza un máximo a las dos horas de la estimulación, y disminuye, después, hasta los valores basales (figura 22B).

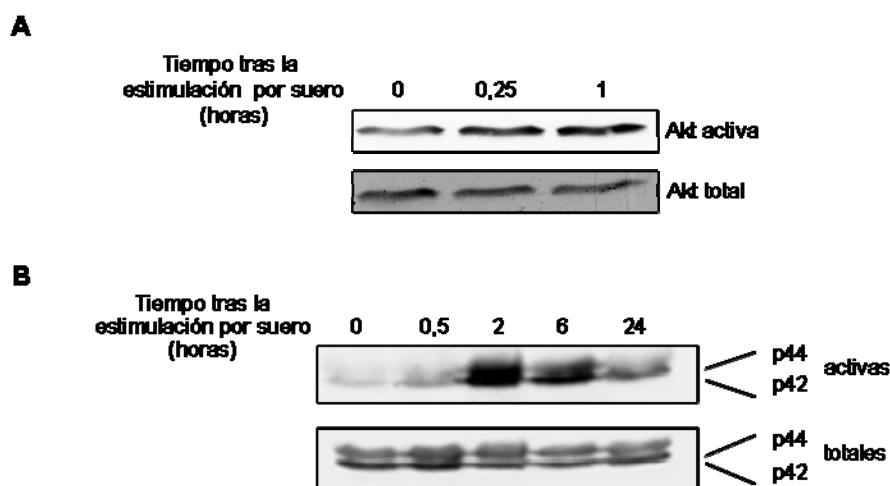


Figura 22. Activación por suero de las vías PI3K/Akt y Erk1/2 en linfoblastos de EA. Los linfoblastos procedentes de pacientes de EA se sembraron a una densidad inicial de 1×10^6 células \times ml^{-1} en RPMI. Tras 24 horas sin suero, se estimularon con 10% de FBS y se tomaron alícuotas a los tiempos indicados en la figura para la determinación de la activación de Akt y Erk1/2. Los niveles de activación de estas proteínas se midieron por western blotting utilizando anticuerpos fosfo-específicos (anti fosfo-Akt (ser473) y anti fosfo-Erk1/2 (thr202/tyr204)). Las mismas membranas se utilizaron para medir los niveles totales de Akt y de Erk1/2. La figura muestra sendos experimentos representativos.

La figura 23 muestra que aunque la adicción de suero produce un aumento en la fosforilación de Akt en linfoblastos controles y de EA, el efecto es considerablemente mayor en las células de pacientes de EA.

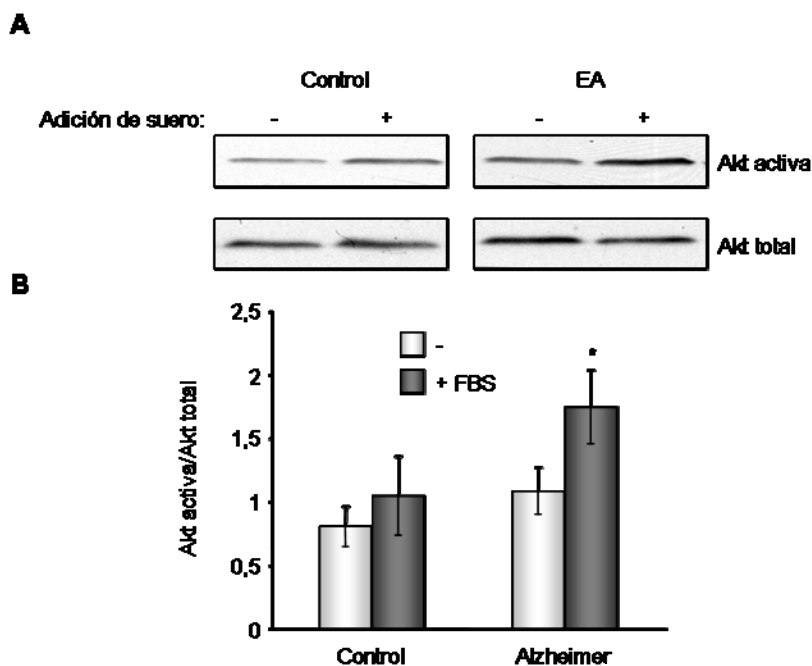


Figura 23. Activación de la vía PI3K/Akt en linfoblastos de individuos controles y de pacientes con EA. Los linfoblastos de individuos controles y de pacientes con EA se sembraron a una densidad inicial de 1×10^6 \times ml^{-1} en RPMI. Tras 24 horas sin suero, se estimularon con 10% de FBS

durante 15 minutos. Panel A: western blotting de fosfo-Akt (ser473) y Akt total, antes y después de la estimulación con suero. Panel B: se muestran los valores medios \pm el error estándar de 8 experimentos independientes. * $p < 0,05$: significativamente distinto.

La figura 24 muestra también la mayor activación de Erk1/2, inducida por el suero, en los linfoblastos de pacientes de EA.

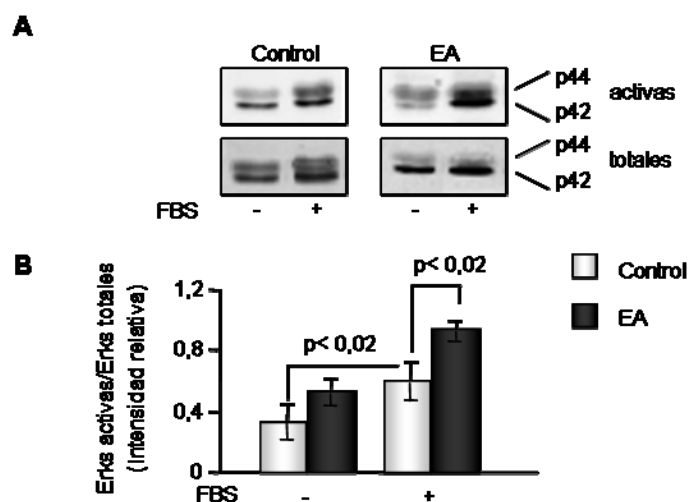


Figura 24. Activación de la vía de señalización Erk1/2 por suero en linfoblastos controles y de pacientes con EA. Los linfoblastos de controles y de pacientes con EA se sembraron a una densidad inicial de 1×10^6 células \times ml^{-1} en medio RPMI sin suero, durante 24 horas. Pasado este tiempo, se tomaron alícuotas, se estimularon con 10% de suero durante 2 horas y se recogieron las células restantes para medir la activación de Erk1/2 según se ha descrito en la figura 22. En el panel A, se muestra un experimento representativo y, en B, se muestra la representación gráfica de los valores medios \pm el error estándar del análisis densitométrico normalizado de las bandas de 5 experimentos independientes.

A pesar de que las dos rutas de señalización, PI3K/Akt y Erk1/2, son activadas por suero en linfoblastos controles y de EA, solamente la inhibición de PI3K/Akt por su inhibidor específico Ly294002 (Vlahos y cols., 1994) condujo a una inhibición acusada de proliferación (tabla XIII). Sin embargo, la inhibición de Erks, mediada por PD98059, inhibidor de MEK1/2, que fosforila a Erk1/2 (Dudley y cols., 1995), y la inhibición de p38 por SB202190 (Frantz y cols., 1998) no produjo disminución alguna en el crecimiento celular. Destaca de estos resultados la inhibición selectiva del antagonista de CaM, CMZ, sobre la proliferación celular en las células de pacientes de EA. La administración conjunta de CMZ y Ly294002 no tuvo efectos aditivos en los linfoblastos de pacientes. Este hecho, junto con la observación de que el antagonista de CaM no inhibe la proliferación de linfoblastos controles, sugiere que esta proteína

podiera activar la vía PI3K/Akt en linfoblastos de EA. En otras palabras, en los linfoblastos de EA podría haberse rebasado un umbral de actividad en la cascada de señalización dependiente de Ca^{2+} /CaM que permite la activación de PI3K/Akt.

TABLA XIII
INFLUENCIA DE DISTINTAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR DE LINFOBLASTOS CONTROLES Y DE PACIENTES CON EA

Tratamiento	% de inhibición de la proliferación celular	
	CONTROL	EA
+ 10% FBS	-	-
20 μ M Ly294002	35 \pm 3	41 \pm 5
20 μ M PD98059	2 \pm 4	8 \pm 5
20mM Sb202190	1 \pm 5	7 \pm 3
1 μ M CMZ	4 \pm 2	30 \pm 3*
1 μ M CMZ + 20 μ M Ly294002	33 \pm 4	36 \pm 5

Los linfoblastos de individuos controles y de pacientes con Alzheimer, se incubaron en medio RPMI con 10% suero, durante 72 horas. El recuento de células se realizó en un hemocitómetro, usando como colorante vital azul de Tripán. Los resultados se expresan como porcentaje del número de células a día 0 y como valor medio \pm error estándar de 6 experimentos. *: $p < 0,05$, respecto a los linfoblastos de individuos controles.

La figura 25 muestra, como comprobación, que la actividad de Akt y Erk1/2 disminuye, efectivamente, con las concentraciones utilizadas del correspondiente inhibidor, aún cuando sólo se observan cambios en la actividad proliferativa en presencia de Ly294002. Por otra parte, en la figura 25, puede también apreciarse que, en ningún caso, los niveles totales de Akt y Erk1/2, varían por la presencia de Ly294002 o PD98059.

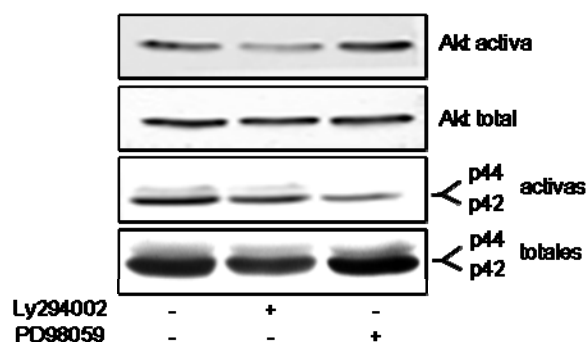


Figura 25. Efectos de Ly294002 y PD98059 sobre la actividad de PI3K/Akt y ERK1/2 en linfoblastos de pacientes con EA. Las células procedentes de pacientes de EA, se sembraron a una densidad inicial de 1×10^6 células \times ml^{-1} , privadas de suero, y se preincubaron durante 30 minutos en

presencia de Ly294002 20 μ M o de PD98059 20 μ M. Después, se estimularon con 10% suero. Tras 24 horas de estimulación, se recogieron las células para hacer extractos para western blotting. En la figura, se muestran inmunoblots representativos en los que se observa la inhibición de fosfo-Akt por Ly294002 y de fosfo-Erk1/2 por PD98059.

La mayor actividad de PI3K/Akt en linfoblastos de EA, parece estar directamente relacionada con el aumento en la degradación de p27. La figura 26 muestra cómo la cinética de cambios en la actividad de PI3K/Akt por Ly294002 se corresponde con el aumento de p27. Estos resultados están de acuerdo con trabajos previos que demostraron que la fosforilación de p27 en ciertos residuos por PI3K/Akt, facilita la degradación de p27 en el proteasoma (Nakayama y cols., 2001). Sin embargo, como se observa en la figura 26, la inhibición de PI3K/Akt por Ly294002, no da lugar a un aumento en los niveles de p21. Este resultado sugiere que la degradación de p21 no depende de la actividad de PI3K/Akt, si bien no puede descartarse que los efectos de PI3K/Akt sobre la transcripción de p21 (Oh y cols., 2002; Gao y cols., 2004; Liang y cols., 2003) impidan observar la acumulación de la proteína en estas condiciones experimentales.

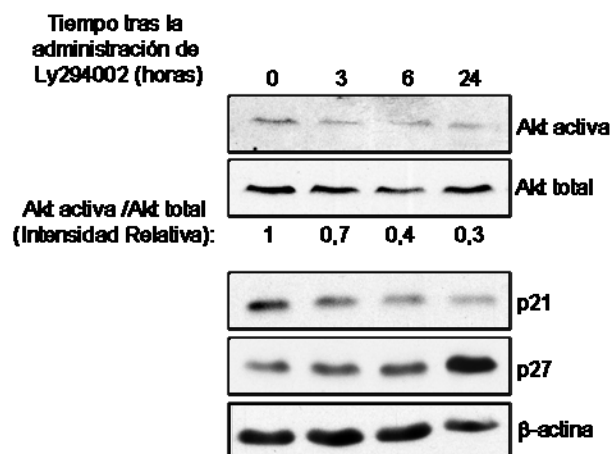


Figura 26. Cinética de los cambios inducidos por la inhibición de PI3K/Akt en la fosforilación de Akt y niveles celulares de p21 y p27. Los linfoblastos procedentes de pacientes de EA se sembraron a una densidad inicial de $1 \times 10^6 \times \text{ml}^{-1}$ en RPMI con 10% de suero en presencia de Ly294002 20 μ M. A los tiempos indicados, se tomaron alícuotas de los cultivos para el análisis y visualización de PI3K/Akt activa y total, p21 y p27 por western blotting. En la figura se muestra un experimento representativo.

4.2.- Estudio de las vías de señalización que controlan la respuesta celular a la privación de suero.

La figura 27A muestra el efecto CMZ, Ly294002, PD98059 y SB202190, inhibidor de p38 (Frantz y cols., 1998) en el porcentaje de células que sobreviven a la retirada de suero. El tratamiento de las células control con PD98059, inhibidor de Erk1/2, previene a los linfoblastos de la muerte celular inducida por la privación de suero, sin observarse este efecto en los casos en que se añadieron Ly294002 o SB202190. La inhibición de Erk1/2 no produjo efecto alguno en las células procedentes de pacientes de alzhéimer pero bloqueó los efectos de CMZ de inducir apoptosis en estas células (figura 19A). La figura 27B muestra que las concentraciones utilizadas de los distintos compuestos, fueron efectivas para inhibir la quinasa correspondiente. Estos resultados sugieren que la cascada de señalización de Erk1/2 está involucrada en la letalidad que se observa en las células controles cuando se retira el suero y que este mecanismo está alterado de forma dependiente de Ca^{2+}/CaM en las células de EA.

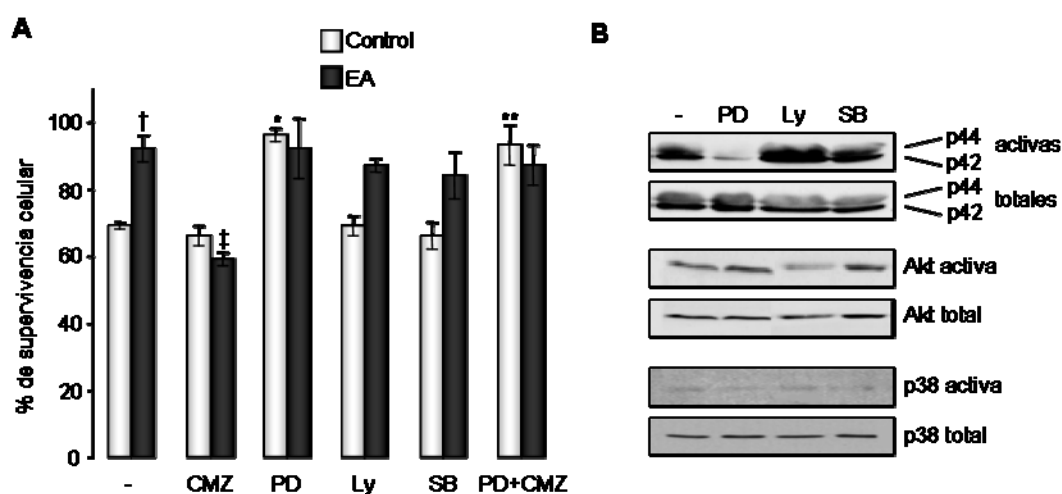


Figura 27. Efecto de inhibidores de quinasa y de calmidazolium en la viabilidad celular ante la retirada de suero en linfoblastos controles y de pacientes con EA. Los linfoblastos de sujetos controles y de pacientes con EA se sembraron a una densidad inicial de 1×10^6 células \times ml^{-1} en medio RPMI sin suero, en ausencia o en presencia de CMZ $1\mu M$, PD98059 $20\mu M$, Ly294002 $20\mu M$ y SB202190 $10\mu M$. Panel A: medida de la viabilidad celular por reducción del MTT y mediante recuento de células por exclusión de Azul Tripán en la cámara Neubauer. Se llevaron a cabo entre 3 y 9 experimentos independientes por duplicado. En la figura se muestran los valores medios \pm el error estándar de los mismos y están expresados como porcentaje respecto a los controles no tratados. * $p < 0,001$ y ** $p < 0,05$, son significativamente distintos de las células control sin inhibidores; + $p < 0,001$ es significativamente distinto de las células controles y ‡ $p < 0,01$, es significativamente distinto de las células de EA no tratadas. Panel B: western blots representativos mostrando la especificidad de cada inhibidor sobre su proteína diana.

4.2.1-. Efecto de la retirada de suero en la activación de Erk1/2.

La figura 28 muestra que la retirada de suero produce un incremento notable en la fosforilación de Erk1/2 a lo largo del tiempo en linfoblastos de individuos controles y de EA. Esta activación sostenida contrasta con la estimulación transitoria de Erk1/2 inducida por la presencia de suero (figura 22B). No obstante, es un hecho conocido que la duración y la magnitud de la activación de Erk1/2 puede producir distintos efectos en el mismo tipo de células (Traverse y cols., 1992; Marshall, 1995; Pouysségur y cols., 2002). La figura 28 muestra que la estimulación de Erk1/2 producida tras la retirada de suero es significativamente menor en linfoblastos de pacientes de alzhéimer.

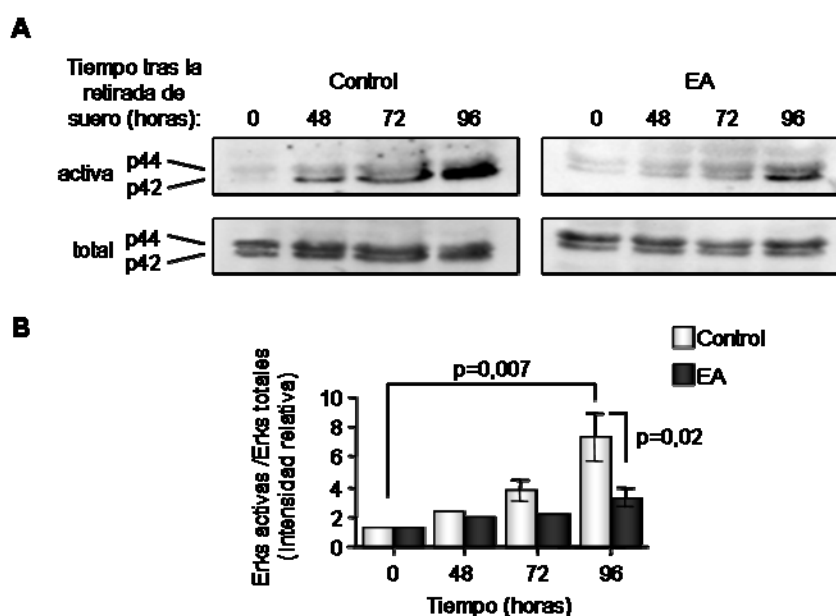


Figura 28. Activación de Erk1/2 a lo largo del tiempo tras la retirada de suero en linfoblastos de individuos controles y de pacientes con EA. Los linfoblastos de individuos controles y de pacientes con EA, se sembraron a una densidad inicial de 1×10^6 células \times ml^{-1} , en ausencia de suero y durante 96 horas. A los tiempos indicados en la figura se tomaron alícuotas de los cultivos para el análisis por western blotting de Erk1/2 activada y total. El panel A, muestra un experimento representativo de la activación de Erk1/2 en control y Alzheimer a lo largo del tiempo, mientras que, el panel B, muestra la media \pm el error estándar del análisis densitométrico de entre 3 y 5 experimentos. $p=0,007$: diferencias estadísticamente significativas entre 0 y 96 horas. $p=0,02$: diferencias estadísticamente significativas entre control y EA.

Esta menor respuesta de la vía de señalización a través de Erks en las células de pacientes, parece protegerlas de la apoptosis que induce la ausencia de factores tróficos. Cuando se trató a los linfoblastos controles con PD98059, para inhibir la fosforilación

de Erk1/2, se impidió la muerte celular (figura 29). Por otra parte, el tratamiento de las células con CMZ o con el inhibidor de CaMKII, KN62, produjo un incremento en la fosforilación de Erk1/2 de las células controles (figura 29). Bajo estas condiciones experimentales, las células procedentes de pacientes de alzhéimer sufren apoptosis en la misma medida que las de individuos controles (figura 29). Estas observaciones sugieren que la mayor actividad de la vía Ca^{2+}/CaM en linfoblastos de EA es responsable de la disminución de la fosforilación de Erk1/2 por la privación de suero, dando lugar a una activación sostenida de esta vía, de menor intensidad que en linfoblastos controles y que es compatible con la supervivencia celular en ausencia de suero, al menos, durante 72 horas.

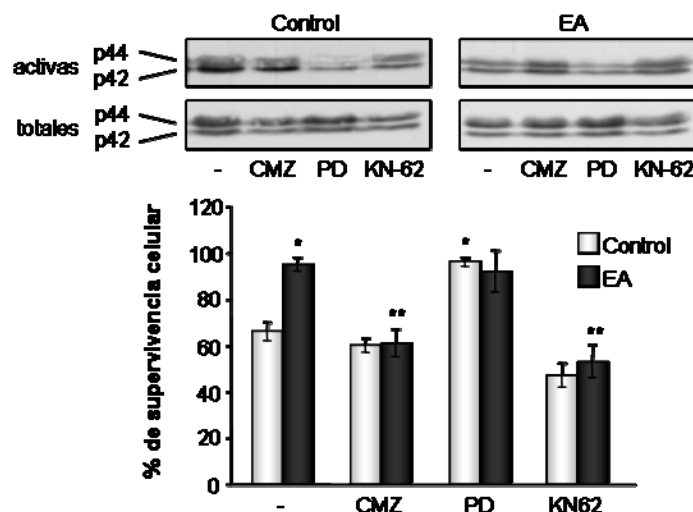


Figura 29. Efecto de PD98059, CMZ y KN-62 sobre la viabilidad celular y sobre el estado de activación de Erk1/2 en linfoblastos controles y de pacientes de EA. Los linfoblastos de individuos controles y de pacientes con EA se sembraron en medio RPMI sin suero durante 72 horas en ausencia o en presencia de CMZ 1 μ M, PD98059 20 μ M y KN-62 1 μ M. Pasado este tiempo, se analizó la viabilidad celular mediante recuento por exclusión de azul de Tripán (parte superior de la figura) y se recogieron las células para hacer extractos y su posterior análisis mediante western blotting. Se muestra un experimento representativo de inmunoblotting, donde aparecen los niveles de Erk1/2 fosforiladas y totales de un individuo control y un paciente con EA. En la parte inferior, se muestran los valores de supervivencia en las condiciones indicadas (media \pm error estándar). * $p < 0,001$: significativamente distintos de las células control sin drogas y ** $p < 0,05$: significativamente distinto de las células de EA no tratadas.

4.2.2.- Papel de la activación de Erk1/2 en la apoptosis inducida por la retirada de suero.

Para aportar más argumentos sobre la implicación de la vía de señalización de Erk1/2 en la supervivencia celular de los linfoblastos de EA, éstos se transfectaron transitoriamente por nucleofección con el vector pCDNA3 que contenía la forma

constitutivamente activada de MEK1, el activador de Erk1. Al mismo tiempo, se introdujo el vector vacío como control. A pesar de que la eficacia de la transfección no fue mucho mayor del 20%, el incremento de la expresión de MEK1, en las células transfectadas, fue suficiente para activar Erk1/2 y sensibilizar a las células procedentes de pacientes de EA a la muerte celular inducida por la retirada de suero (figura 30).

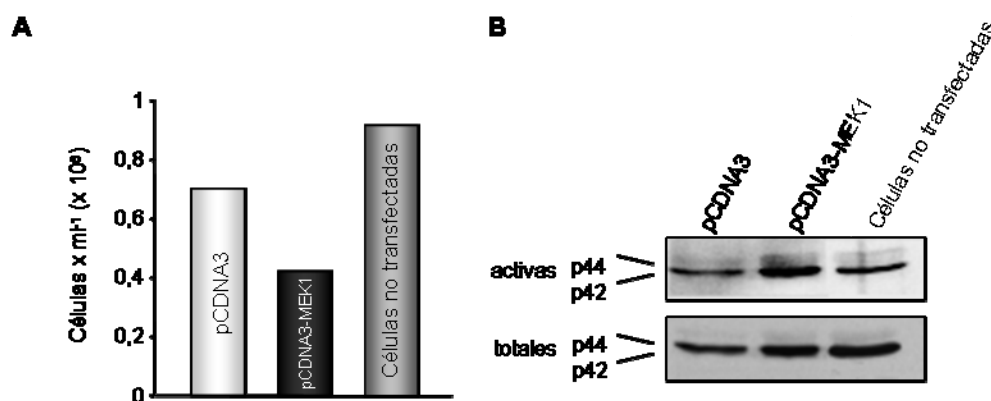


Figura 30. La construcción constitutivamente activa de Mek1, induce muerte celular a los linfoblastos procedentes de pacientes de Alzheimer, en ausencia de suero. Los linfoblastos de pacientes de Alzheimer fueron transfectados transitoriamente con el plásmido pCDNA3 vacío o con el plásmido que contiene la mutante constitutivamente activa de MEK1, tal y como se describe en el apartado “métodos”. 16 horas después de la nucleofección, las células se sembraron en medio RPMI sin suero a una densidad de 1×10^6 células \times ml⁻¹, durante 24 horas. Pasado este tiempo, se determinó la viabilidad celular por exclusión de azul Tripán mediante recuento de células en el microscopio invertido de contraste de fase. Los resultados son la media de 2 experimentos realizados en líneas celulares distintas. En el panel B se muestra el análisis por western blotting de la activación de Erk1/2 tras valorar los niveles de fosfo-Erk1/2 y Erk1/2 totales.

4.3.- Contenido celular de CaM en linfoblastos controles y de EA.

Los resultados descritos anteriormente sugieren que los linfoblastos de EA tienen un mayor contenido y/o actividad de CaM. Por esta razón, se determinaron por western blotting los niveles celulares de CaM en linfoblastos controles y de EA. Se pudieron observar niveles significativamente mayores de CaM en las células de pacientes que en las células de donantes controles (figura 31A). Este aumento en los niveles de la proteína, pudiera ser consecuencia, al menos en parte, de un aumento en la expresión génica de CaM. En efecto, el análisis por RT-PCR semicuantitativa de la expresión del gen CaM3 también mostró un aumento en la expresión de los linfoblastos de EA (figura 31B).

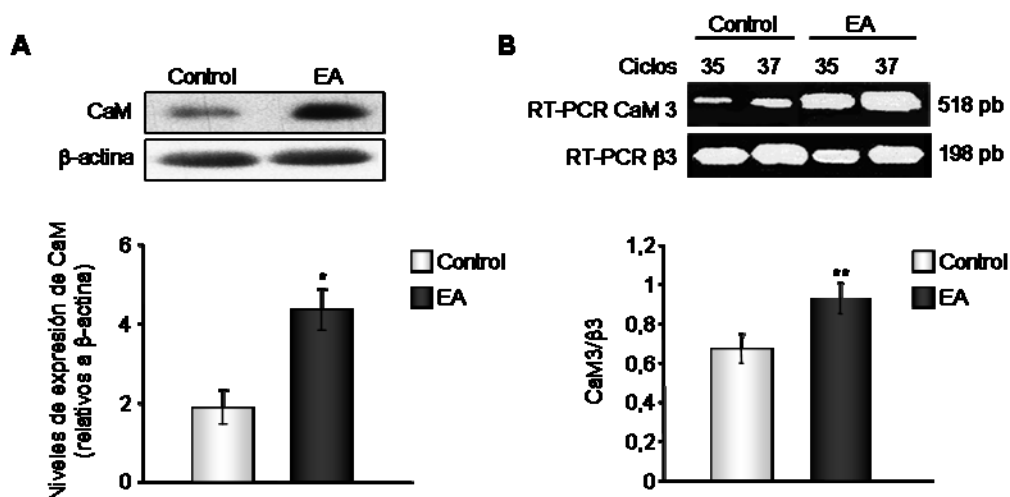


Figura 31. Contenido celular de CaM y niveles de expresión en linfoblastos controles y de EA. Los linfoblastos controles y de pacientes con EA se sembraron a una densidad inicial de 1×10^6 células \times ml^{-1} en medio RPMI con 10% de suero durante 72 horas. Pasado este tiempo, las células se recogieron para extractos para western blotting (panel A) o para la extracción del ARN total y posterior RT-PCR (panel B). A: en la parte superior se muestra un experimento representativo de los niveles de CaM en linfoblastos controles y de EA y, en la parte inferior, se muestran los valores medios \pm el error estándar del análisis densitométrico de 5 experimentos independientes. B: En la parte superior se muestra un experimento representativo de la electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de un individuo control y otro con EA a los ciclos indicados en la figura. Debajo, se muestran los valores medios \pm el error estándar del análisis densitométrico de 5 experimentos independientes. * $p < 0,01$ y ** $p < 0,05$: significativamente distinto de las células controles.

Aunque CaM es una proteína codificada por tres genes, localizados en los cromosomas 2 (2p21.1-p21.3), 14 (14q24-31) y 19 (19q13.2-13.3), respectivamente, (Berchtold y cols., 1993), solamente se ha analizado el gen de CaM3, que es el que está localizado en el cromosoma 19. En este cromosoma también se encuentra el gen de ApoE y se ha descrito que la EA de aparición tardía muestra ligamiento con el alelo $\epsilon 4$ de ApoE, en la región comprendida entre 19q13.1 y 19q13.3 (Pericak-Vance y cols., 1993).

5-. PROLIFERACIÓN Y SUPERVIVENCIA EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (CMSPS) Y EN LINFOCITOS

B.

Aunque los linfocitos inmortalizados con el virus de Epstein Barr se han utilizado con frecuencia como modelo experimental en estudios biológicos y médicos, debido a la facilidad de establecer líneas celulares que pueden proliferar indefinidamente, se consideró importante determinar que la respuesta al suero (la

adición o privación) no se ve alterada por el proceso de immortalización de linfocitos. Con este fin, se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CMSPs) de donantes controles y de pacientes con EA de aparición tardía y, en algunos casos, se purificaron magnéticamente linfocitos B, utilizando anti-CD19. Las CMSPs fueron estimuladas con el mitógeno específico de linfocitos B, mitógeno Pokeweed (PWM) de tipo lectina y procedente de plantas, durante tres días. La figura 32A, muestra una mayor incorporación de BrdU en el ADN de los linfocitos de pacientes con EA que la observada en individuos controles, sugiriendo un incremento en la tasa de proliferación de las células de enfermos de alzhéimer. Este efecto se asoció con una disminución en los niveles de p27 coincidiendo con lo observado en linfoblastos de EA (figura 11). También, se vio una disminución de los niveles de p27 en linfocitos B de pacientes con EA, tras la estimulación con PWM, como se muestra en la figura 32B.

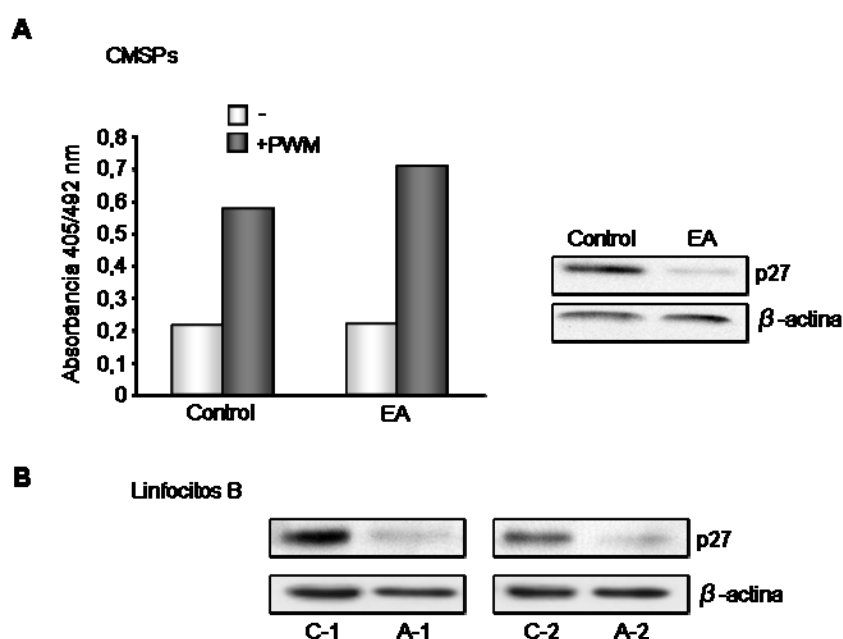


Figura 32. Proliferación de CMSPs y niveles de p27 en CMSPs y linfocitos B de individuos controles y de pacientes con EA estimulados con PWM. Panel A: las CMSPs de individuos controles y de pacientes con EA extraídas como se describe en “métodos” se mantuvieron en medio RPMI con 10% de suero durante 3 días. Al cabo de este tiempo las células se sembraron en medio nuevo a una concentración de 1×10^6 células \times ml^{-1} , en presencia y en ausencia del mitógeno Pokeweed (PWM) $5\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 24 horas. La respuesta proliferativa al PWM se determinó midiendo la incorporación de BrdU tras un pulso de 4 horas. Los resultados son la media de 2 experimentos llevados a cabo por triplicado. En la izquierda, se muestra un experimento representativo de inmunoblotting mostrando los niveles de p27 en las CMSPs de cada grupo. Panel B: linfocitos B de 2 individuos controles y 2 pacientes con EA se aislaron como se describe en “métodos”. Después se sembraron en medio RPMI con 10% de suero a la concentración de 1×10^6 células \times ml^{-1} , en presencia de PWM $5\mu\text{g}/\text{ml}$. Tras 24 horas de estimulación con el mitógeno, se recogieron extractos para western blotting. La figura muestra la medida de p27 en cada uno de los individuos.

Por otra parte, en las CMSPs procedentes de enfermos de alzhéimer, también se ha podido observar mayor activación de las vías de señalización PI3K/Akt y Erk1/2 que en las células controles. Los resultados aparecen recogidos en la figura 33.

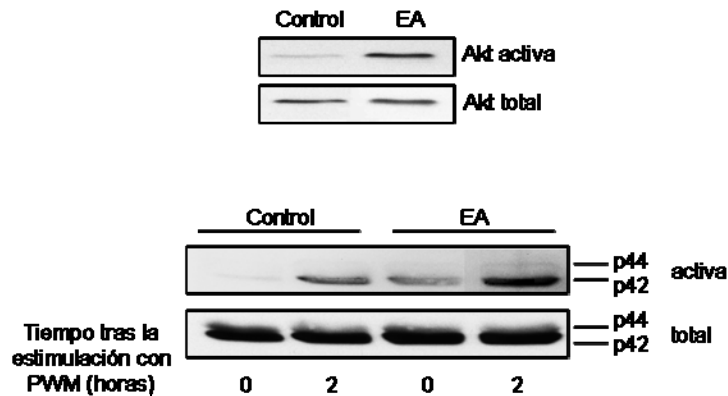


Figura 33. Activación de PI3K/Akt y Erk1/2 en CMSPs de individuos controles y de Pacientes con EA estimulados con PWM. Las CMSPs de individuos controles y de pacientes con EA se mantuvieron en medio RPMI con 10% de suero durante 3 días, al cabo de los cuales se sembraron a una densidad inicial de 1×10^6 células $\times \text{ml}^{-1}$, en presencia y en ausencia de PWM 5mg/ml. PI3K/Akt activa y total se determinaron en extractos celulares tomados a las 24 horas de la estimulación mientras que Erk1/2 activa y total fueron determinadas antes y después de 2 horas de la estimulación con PWM. Se muestran experimentos representativos.

Asimismo, y como se muestra en la figura 34, los linfocitos B de pacientes con EA, al igual que las líneas linfoblásticas de EA (figura 16), son más resistentes a la muerte celular inducida por la ausencia de suero que las células controles (figura 34). De igual forma, el tratamiento con el antagonista de CaM, CMZ, restaura la respuesta normal a la retirada del suero. La figura muestra también la dependencia de Ca^{2+} extracelular en la respuesta celular (figura 34, tabla XII).

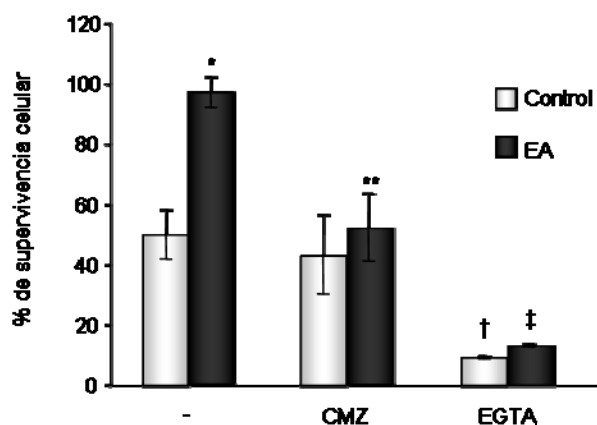


Figura 34. La retirada de suero induce muerte celular en linfocitos B de individuos controles y de pacientes con EA: efectos de CMZ y EGTA. Los linfocitos B de 5 individuos controles y 5 con EA se sembraron a una concentración inicial de 1×10^6 células \times ml^{-1} en medio RPMI sin suero en ausencia y en presencia de CMZ $1\mu\text{M}$ o EGTA $1\mu\text{M}$. Tras 72 horas se determinó la viabilidad celular por exclusión de Azul Tripán mediante recuento de células en el microscopio invertido de contraste de fase. En la figura se expresa la viabilidad como porcentaje del número inicial de células a día 0. El análisis estadístico se determinó por ANOVA seguido del test LSD de Fischer para múltiples comparaciones. * $p < 0,01$: significativamente distinto de las células controles. ** $p < 0,01$: significativamente distinto de las células de EA sin CMZ. † $p < 0,05$ y ‡ $p < 0,01$: significativamente distinto de sus controles respectivos incubados sin EGTA.

Estos resultados justifican el uso de linfocitos inmortalizados para el estudio de aspectos moleculares y celulares relevantes para la patología de la EA.

6. EFECTO DE SIMVASTATINA EN LA RESPUESTA CELULAR A LA PRESENCIA O AUSENCIA DE SUERO.

En este apartado se describen los resultados de un estudio en el que se ha considerado la posibilidad de que el efecto beneficioso de las estatinas en la EA estuviese relacionado con la capacidad de estas drogas de interferir con la maquinaria del ciclo celular y/o apoptosis.

Esta hipótesis de trabajo se basa en las observaciones que indican que además de inhibir la síntesis de colesterol (figura 35), estas drogas tienen efectos independientes del metabolismo lipídico. Estos efectos pleiotrópicos de las estatinas están relacionados con la prevención de la síntesis de intermediarios isoprenoides, como farnesil pirofosfato (FPP) y geranyl-geranyl pirofosfato (GGPP). Estos compuestos modifican una variedad de proteínas a nivel postransduccional, produciendo cambios importantes en su actividad o en su localización celular. Algunas de las proteínas afectadas son

quinasas, proteínas G heterotriméricas y algunas GTPasas de pequeño tamaño molecular, pertenecientes a las familias Ras y Rho (Danesh y cols., 2002, 2003; Danesh y Kanwar, 2004). Entre los efectos pleiotrópicos de las estatinas destacan sus propiedades anti-inflamatorias, así como antiproliferativas y proapoptóticas (revisado en Sassano y Plataniás, 2008). Estas características confieren a estas drogas un potencial beneficio para el tratamiento de la EA.

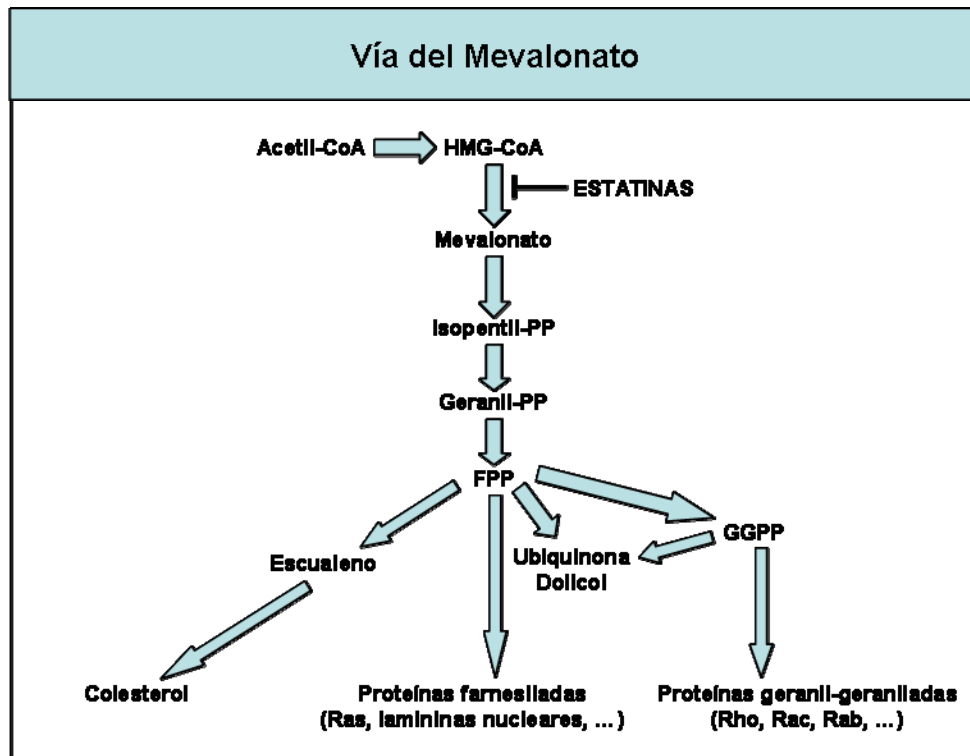


Figura 35. Ruta de síntesis del colesterol. Las estatinas actúan sobre la enzima HMG-CoA reductasa, que cataliza la conversión de HMG-CoA a Mevalonato.

Por esta razón, se ha estudiado el efecto de una de estas drogas, la simvastatina (SIM), de naturaleza lipofílica y cuya estructura química se muestra en la figura 36, en la actividad proliferativa en respuesta al suero y en la vulnerabilidad celular frente a la retirada del suero de linfoblastos controles y de EA.

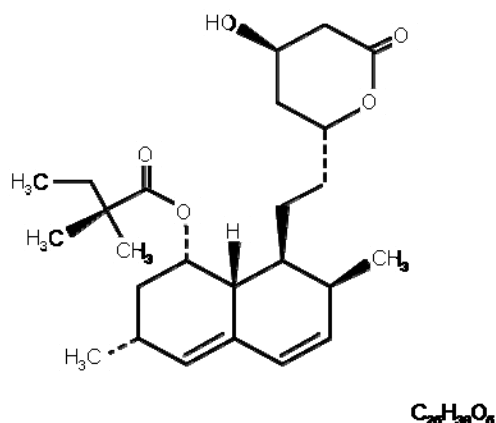


Figura 36. Fórmula y estructura química de la Simvastatina.

6.1. Efecto de simvastatina en la proliferación celular.

6.1.1. Dosis-respuesta.

La figura 37 muestra el análisis a lo largo del tiempo del efecto de dosis crecientes de simvastatina en la tasa de proliferación de linfoblastos controles y de pacientes de EA. Puede observarse que la tasa de proliferación de los linfoblastos de EA es significativamente mayor que la de las células control. Estos resultados están de acuerdo con observaciones previas de nuestro laboratorio (de las Cuevas y cols., 2003; Muñoz y cols., 2005, 2008a). El tratamiento con simvastatina produjo una disminución significativa del crecimiento celular en linfoblastos controles y de EA, de manera dependiente de la dosis (figura 37). Sin embargo, es notoria la distinta susceptibilidad de las células controles o de EA al tratamiento con simvastatina. Mientras que la acción inhibidora de simvastatina se aprecia a una concentración de $0,5\mu\text{M}$ en linfoblastos de EA (figura 37), se necesita una dosis diez veces superior para observar una disminución en el número de células controles tras la adición de suero (figura 37).

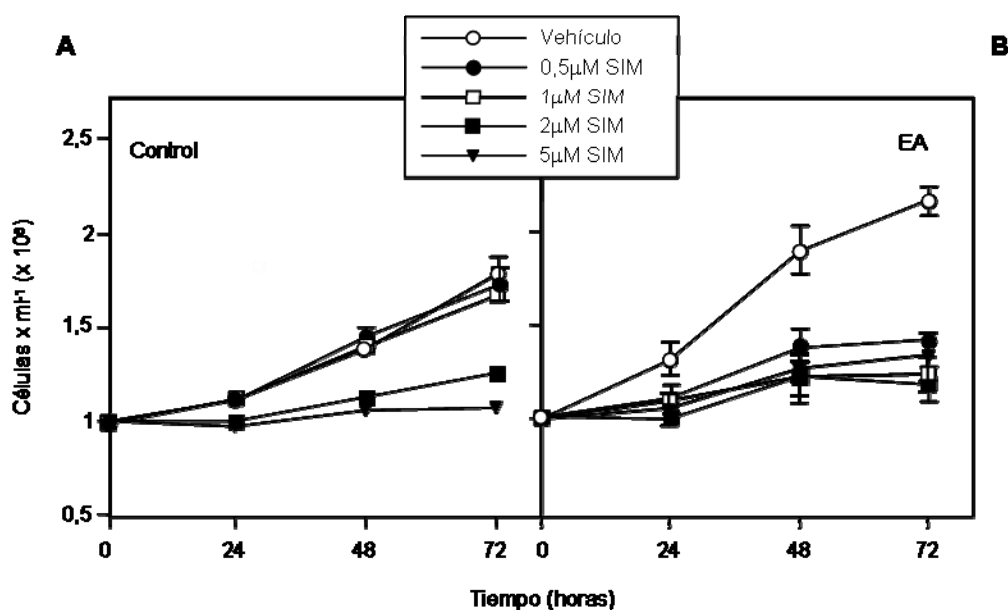


Figura 37. Efecto de concentraciones crecientes de SIM sobre la proliferación de linfoblastos controles y de pacientes con EA. Las células de individuos controles (A) y de pacientes con EA (B) se sembraron a una densidad inicial de 1×10^6 células \times ml^{-1} en medio RPMI con 10% de suero en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de SIM, 0,5, 1, 2,5 y 5 μM , durante 72 horas. Cada 24 horas se tomaron muestras de los cultivos para el recuento de células. La figura muestra los valores medios \pm el error estándar de 6 experimentos independientes, realizados con individuos diferentes.

Posteriormente, se analizó por citometría de flujo la posibilidad de que el tratamiento con simvastatina pudiera tener, en estas condiciones experimentales, efectos citotóxicos o apoptóticos mediante tinción con AnexinaV acoplada con fluoresceína e IP como marcadores de apoptosis y necrosis respectivamente.

La figura 38 muestra cómo solamente la concentración más alta (5 μM) de simvastatina produce un aumento en el porcentaje de células apoptóticas y necróticas (figura 38, paneles derechos). Por el contrario, cuando se utiliza una concentración de simvastatina de 1 μM , suficiente para bloquear el aumento en la actividad proliferativa en linfoblastos de EA, inducido por el suero, no se produce un aumento significativo de necrosis y apoptosis (figura 38, paneles izquierdo y central inferiores). Aproximadamente, el 80% de las células permanecen viables a las 72 horas de la estimulación por suero, tanto en presencia como en ausencia de simvastatina.

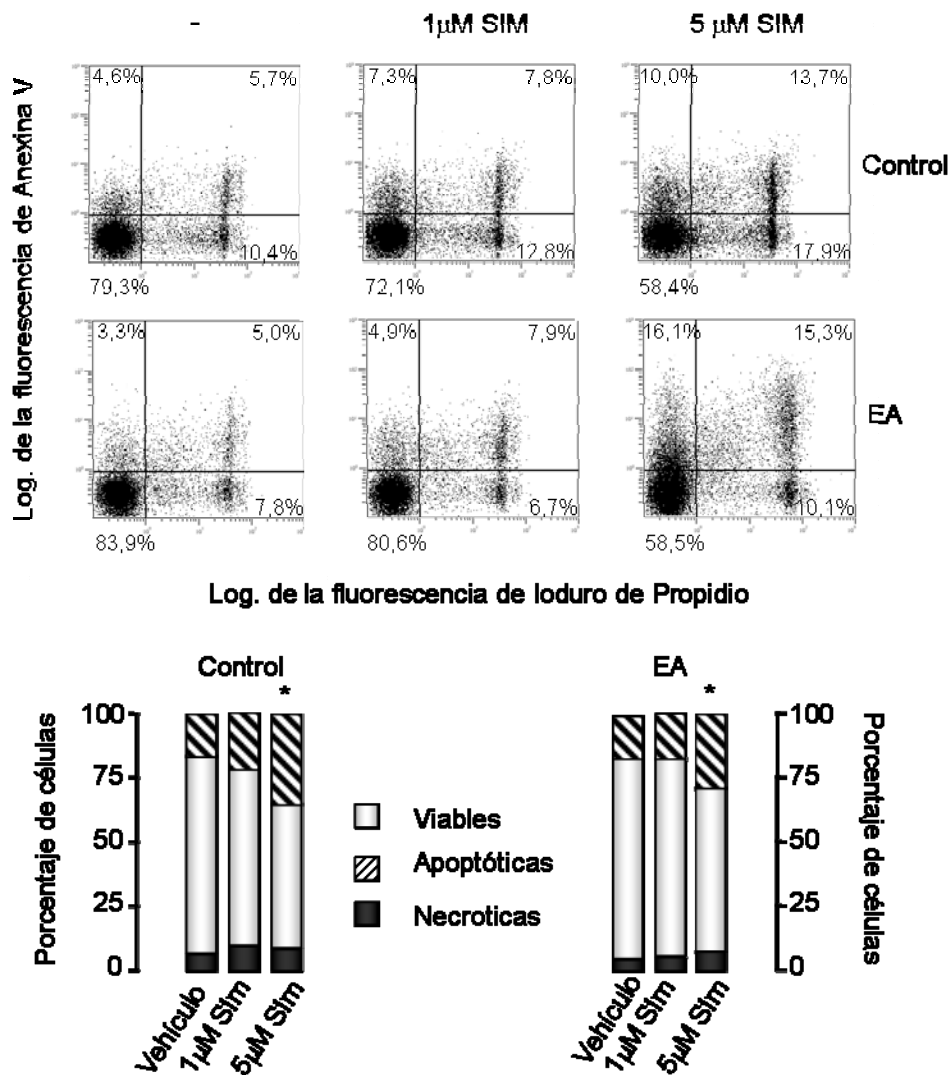


Figura 38. Análisis por citometría de flujo del porcentaje de células viables, apoptóticas y necróticas de linfoblastos controles y de EA tras el tratamiento con SIM. Los linfoblastos controles y de EA se sembraron a una concentración de 1×10^6 células \times ml^{-1} en medio RPMI con 10% de suero durante 2 días en ausencia o en presencia de SIM 1 ó 5 μM . Se analizó por citometría de flujo la exposición de fosfatidilserina al medio extracelular y la exclusión de IP tras el tratamiento con Anexina V-fluoresceína e IP. En la parte superior de la figura, se muestra un experimento representativo donde aparecen las células viables (abajo, izquierda) apoptóticas (arriba, izquierda) y necróticas (arriba, derecha). La parte inferior muestra los valores medios de 5 experimentos realizados con células procedentes de distintos individuos. * $p < 0,05$: proporción de células apoptóticas significativamente distinta comparada con la de los cultivos no tratados.

6.1.2. Efecto de simvastatina sobre la actividad proliferativa de linfoblastos controles y de EA.

Como aparece reflejado en la figura 39 con la dosis 1 μM de simvastatina se consigue el máximo efecto inhibitor de la proliferación de las células de EA, sin afectar a la de los linfoblastos de donantes controles por lo que se utilizó esta concentración

para los siguientes experimentos. En la figura 39, se aprecia también que el efecto antiproliferativo de la simvastatina es dependiente del tiempo de exposición de los cultivos a la droga.

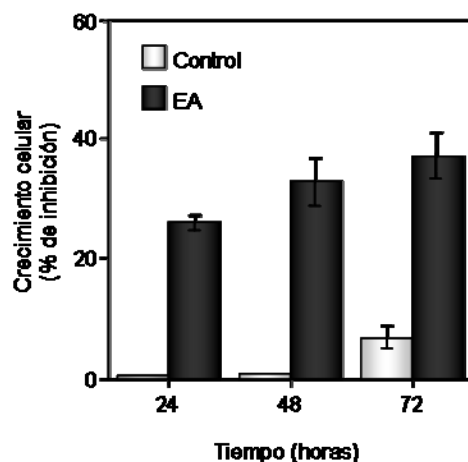


Figura 39. Efecto de SIM sobre la actividad proliferativa mediada por suero en linfoblastos controles y de EA. Las condiciones experimentales son idénticas a las de la figura 29. Cada 24 horas se tomaron alícuotas para el recuento de células. El porcentaje de inhibición del crecimiento celular se muestra tomando como referencia las células no tratadas (100%). Se muestran los valores medios \pm el error estándar de 6-8 experimentos independientes, llevados a cabo con células de individuos diferentes.

6.1.3. El efecto de simvastatina es independiente de los niveles de colesterol.

Con objeto de determinar el papel de los distintos derivados del mevalonato en la proliferación de linfoblastos de EA, se comprobó el efecto conjunto del mevalonato (MEV), GGPP, FPP o el escualeno (SQ) con simvastatina sobre estas células. En la figura 40 puede observarse que el MEV fue capaz de revertir la inhibición, inducida por simvastatina, de la respuesta proliferativa de linfoblastos de EA. Asimismo, el tratamiento con GGPP o FPP pero no con SQ, también previene el efecto de simvastatina. Estos resultados sugieren que esta acción de simvastatina no depende de la síntesis de colesterol.

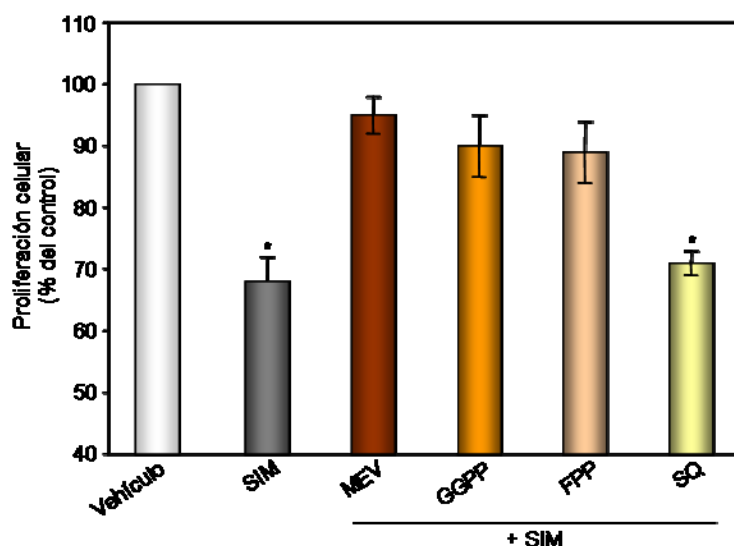


Figura 40. Efecto modulador de SIM sobre la proliferación celular inducida por suero en linfoblastos de EA. Los linfoblastos de individuos con EA se sembraron a una concentración inicial de 1×10^6 células $\times \text{ml}^{-1}$ en medio RPMI con 10% de suero durante 3 días en ausencia o en presencia de SIM $1 \mu\text{M}$ sólo o en combinación con MEV $200 \mu\text{M}$, GGPP $5 \mu\text{M}$, FPP $5 \mu\text{M}$ ó SQ $5 \mu\text{M}$. La proliferación celular se determinó por recuento de células que excluían el Azul Tripán. El porcentaje de proliferación celular se muestra tomando como referencia las células no tratadas (100%). En la figura se muestran valores medios \pm el error estándar de 4 experimentos realizados con individuos diferentes. * $p < 0,01$: significativamente distinto de las células no tratadas.

6.1.4. Efecto de simvastatina en la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular.

La figura 41 muestra el efecto de simvastatina sobre los niveles y estado de fosforilación de pRb en linfoblastos controles y de EA. Puede apreciarse que el tratamiento con simvastatina no afecta significativamente al estado de fosforilación de pRb en las células controles, pero previene parcialmente el aumento de fosforilación de la misma, inducido por el suero, en los linfoblastos de EA (figura 41A). En consonancia con estas observaciones, la figura 41B muestra un aumento en la actividad kinasa del complejo ciclinaE/CDK2 en los linfoblastos de pacientes de EA, que no se produce cuando se incuban las células en presencia de simvastatina.

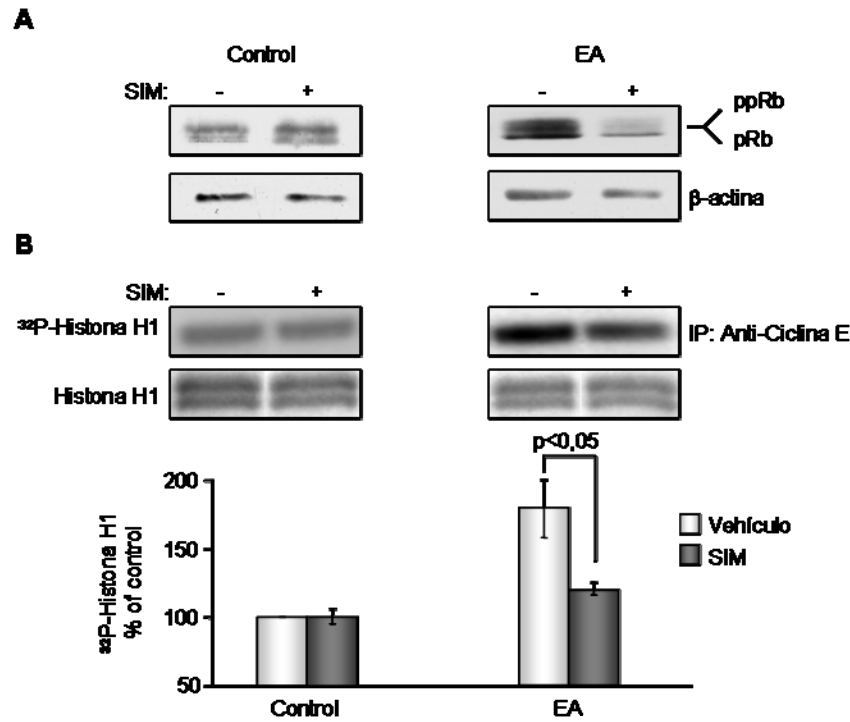


Figura 41. Efecto de SIM sobre el estado de fosforilación de pRb y la actividad quinasa del complejo ciclina E/CDK2 en linfoblastos controles y de EA. Los linfoblastos controles y de EA se sembraron a una densidad inicial de 1×10^6 células \times ml^{-1} en medio RPMI con 10% de suero durante 24 horas en ausencia o en presencia de SIM $1\mu\text{M}$. Panel A: Se recogieron células para realizar extractos para western blotting y determinar los niveles de pRb hipo- e hiperfosforilada (pRb y ppRb). Se muestran experimentos representativos. Panel B: Se recogieron células para extractos que se inmunoprecipitaron usando anticuerpo anti-ciclina E y después se midió la actividad quinasa con histona H1 como sustrato. La histona fosforilada se visualizó mediante autorradiografía y los niveles de H1 se determinaron tiñendo el gel con Coomassie. En la figura se presenta un experimento representativo y, debajo, el análisis densitométrico. Los datos mostrados son la media \pm el error estándar de 4 experimentos diferentes. $p < 0,05$: diferencias estadísticamente significativas.

El efecto de simvastatina inhibiendo la actividad de ciclina E/CDK2 no parece ser consecuencia de cambios en el contenido celular de ciclina E o de CDK2. Como se puede apreciar en la figura 42 el tratamiento con simvastatina no produjo cambios en la expresión de estas proteínas tanto en los linfoblastos controles como en los derivados de pacientes de EA.

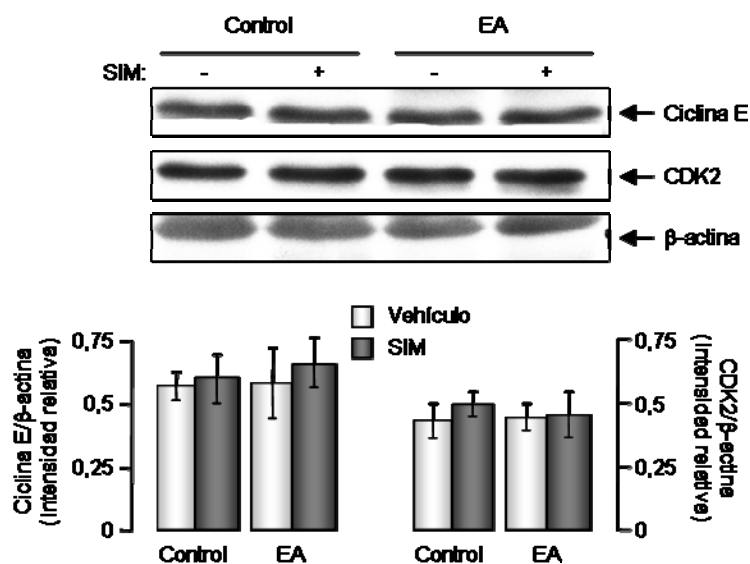


Figura 42. Efecto de SIM sobre los niveles de ciclina E y CDK2 en linfoblastos controles y de EA. Las células de individuos controles y de EA se sembraron a la concentración inicial de 1×10^6 células \times ml^{-1} en medio RPMI con 10% de suero durante 24 horas en ausencia o en presencia de SIM $1 \mu\text{M}$. En la parte superior de la figura se muestran experimentos representativos de las proteínas ciclina E y CDK2. En la parte inferior, se muestra el análisis densitométrico de las bandas. Los resultados son la media \pm el error estándar de 4 a 6 experimentos independientes.

Dado que la actividad de las CDKs depende también de la presencia de proteínas inhibitoras (CDKIs), se analizó si podría haber diferencias en los niveles de expresión de p21 y p27 tras el tratamiento con simvastatina, que pudieran explicar los cambios en la actividad del complejo ciclina E/CDK2 y fosforilación de pRb en los linfoblastos de EA.

La figura 43 muestra, como era de esperar, una disminución importante en los niveles de p21 y de p27 en los linfoblastos de pacientes con EA. El tratamiento con simvastatina no tuvo consecuencias en las células controles, Sin embargo, en presencia de simvastatina, los linfoblastos de EA recuperan los niveles normales de p21 y de p27 (figura 43).

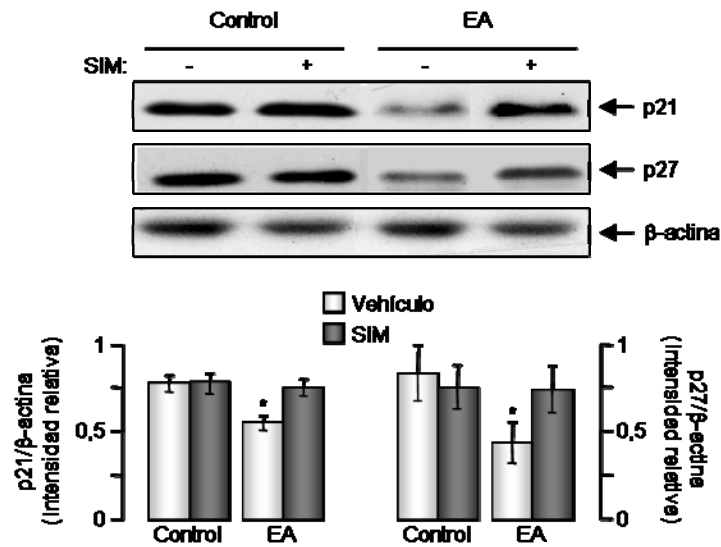


Figura 43. Efecto de SIM sobre los niveles de p21 y p27 en linfoblastos de individuos controles y pacientes con EA. Las células de individuos controles y de EA se sembraron a la concentración inicial de 1×10^6 células \times ml^{-1} en medio RPMI con 10% de suero durante 24 horas en ausencia o en presencia de SIM $1\mu\text{M}$. En la parte superior de la figura se muestran experimentos representativos de las proteínas p21 y p27. En la parte inferior, se muestra el análisis densitométrico de las bandas. Los resultados son la media \pm el error estándar de 6 experimentos independientes. * $p < 0,05$: respecto a las células no tratadas.

Un análisis densitométrico pormenorizado del efecto de simvastatina en el contenido celular de p21 y p27 en linfoblastos derivados de 8 pacientes distintos se recoge en la figura 44.

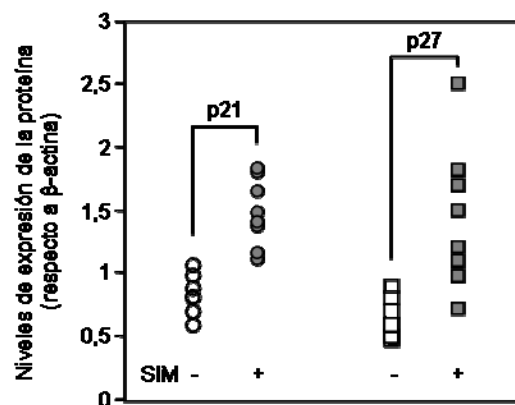


Figura 44. Análisis pormenorizado del efecto de SIM sobre el contenido celular de p21 y p27 en linfoblastos de pacientes con EA. Los linfoblastos de pacientes con EA se sembraron a la concentración inicial de 1×10^6 células \times ml^{-1} en medio RPMI con 10% de suero en ausencia o en presencia de SIM $1\mu\text{M}$. Tras 24 horas en cultivo se recogieron extractos para western blotting. En la figura se muestran los niveles de p21 y p27 de los linfoblastos no tratados (blanco) y tratados (gris) con SIM $1\mu\text{M}$ procedentes de 8 pacientes distintos.

6.1.5. Regulación de los niveles de p21 y de p27 por simvastatina en los linfoblastos de EA.

Para evaluar el efecto de simvastatina en el contenido celular de p21 y de p27, se analizó el efecto de la droga sobre la vida media de estas dos proteínas en los linfoblastos de EA. En la figura 45, puede observarse que el tratamiento con simvastatina redujo considerablemente la velocidad de degradación de p21. El contenido celular de β -actina, sin embargo, no se vio afectado por la droga, lo que hace improbable un efecto de la simvastatina sobre las proteasas celulares.

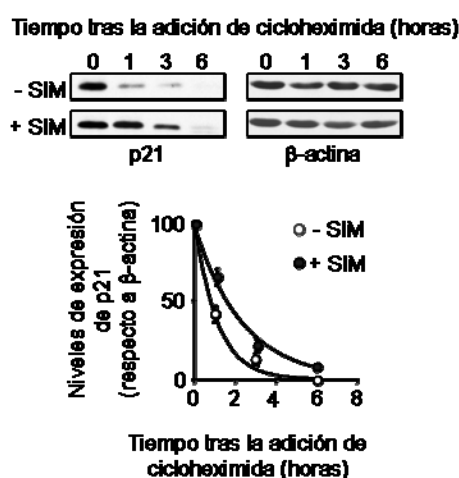


Figura 45. Efecto de SIM sobre la degradación de la proteína p21 en linfoblastos de pacientes con EA. Las células procedentes de pacientes con EA se incubaron en medio RPMI con 10% de suero a una concentración inicial de 1×10^6 células \times ml^{-1} en ausencia o en presencia de SIM $1\mu\text{M}$. Tras 24 horas, se añadió cicloheximida $20\mu\text{g/ml}$ y se recogieron células a los tiempos indicados. Los niveles de p21 se midieron por western blotting (experimento representativo en la parte superior de la figura). El descenso de la señal de p21 se representa en función del tiempo tras la adición de cicloheximida (parte inferior de la figura). Para calcular la vida media de la proteína, se utilizaron datos de 5 experimentos diferentes.

De igual forma (figura 46), la simvastatina aumentó la vida media de p27 en los linfoblastos de pacientes de EA, alcanzando los valores próximos a los de las células controles (aproximadamente 22 horas).

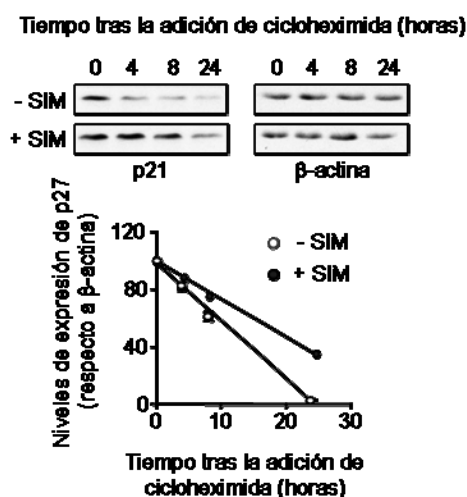


Figura 46. Efecto de SIM sobre la degradación de la proteína p27 en linfoblastos de pacientes con EA. Las células procedentes de pacientes con EA se incubaron en medio RPMI con 10% de suero a una concentración inicial de 1×10^6 células \times ml^{-1} en ausencia o en presencia de SIM $1 \mu\text{M}$. Tras 24 horas, se añadió cicloheximida $20 \mu\text{g/ml}$ y se recogieron células a los tiempos indicados. Los niveles de p27 se midieron por western blotting (experimento representativo en la parte superior de la figura). El descenso de la señal de p27 se representa en función del tiempo tras la adición de cicloheximida (parte inferior de la figura). El experimento se realizó 2 veces con diferentes líneas celulares obteniendo resultados similares en ambos casos.

La figura 47 muestra que en presencia de cicloheximida los niveles de p21 y de p27 fueron prácticamente indetectables. Sin embargo, se pudo apreciar una ligera acumulación de p27 en presencia de simvastatina (figura 47). Estos resultados sugieren que se requiere la síntesis de proteínas *de novo* para que actúe la simvastatina. La figura muestra también que la simvastatina tiene efectos similares al inhibidor específico del proteasoma MG132, y que el tratamiento conjunto de simvastatina y MG132 no produce efectos aditivos. Por otra parte, el inhibidor de caspasas z-VAD-fmk no previno el efecto de simvastatina sobre la acumulación de p21 y de p27 en los linfoblastos de EA. En conjunto, estos datos sugieren que la simvastatina actúa inhibiendo la degradación de p21 y de p27 en el proteasoma.

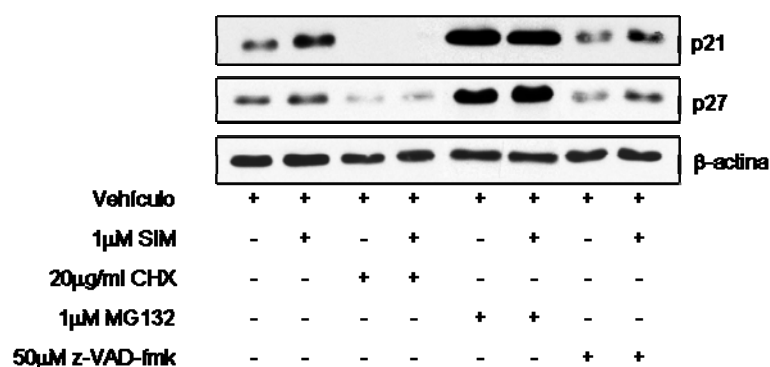


Figura 47. Efectos de cicloheximida, MG132 y z-VAD-fmk sobre la acumulación de p21 y p27 inducida por SIM en linfoblastos de pacientes con EA. La células de pacientes con EA se incubaron durante 24 horas en medio RPMI con 10% de suero a una concentración inicial de 1×10^6 células $\times \text{ml}^{-1}$ en ausencia o en presencia de SIM $1\mu\text{M}$ sólo o con cicloheximida $20\mu\text{g/ml}$, MG132 $1\mu\text{M}$ o z-VAD-fmk $50\mu\text{M}$. En la figura, se muestra un experimento representativo.

6.1.6. Efecto de simvastatina sobre la activación de PI3K/Akt.

Tanto el incremento de proliferación, inducido por el suero, como la disminución de los niveles de los CDKI en los linfoblastos de EA requiere la sobreactivación de PI3K/Akt (Muñoz y cols., 2008a, 2008b). Por esta razón, se valoró el efecto de simvastatina sobre la fosforilación de Akt en linfoblastos controles y de EA tras la estimulación con suero. En la figura 48, puede observarse que la administración de simvastatina no produjo cambios en la activación de Akt en las células control. Sin embargo, previno parcialmente la fosforilación de Akt en los linfoblastos de EA (figura 48).

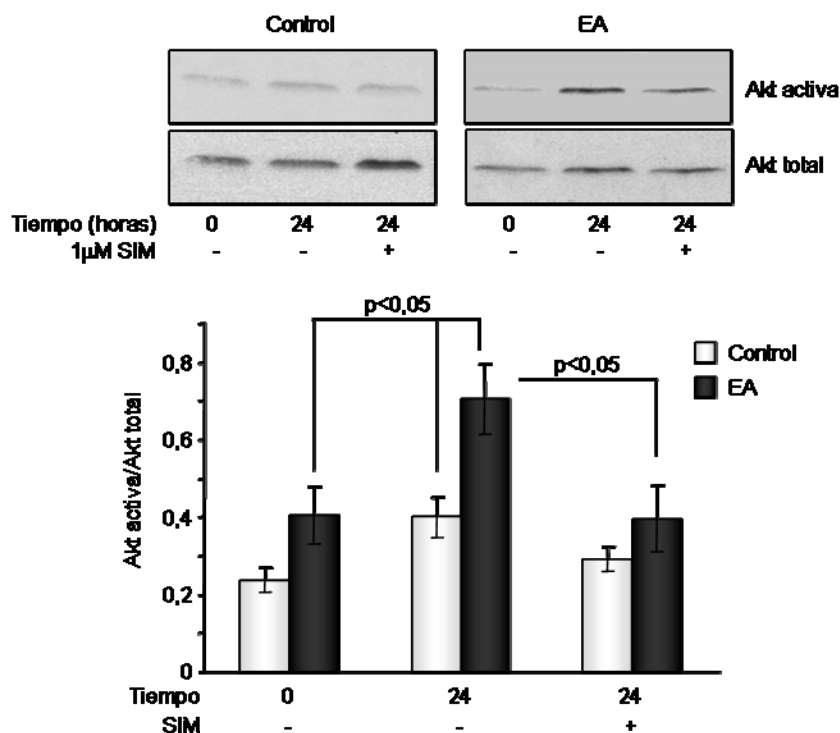


Figura 48. Efecto de SIM sobre la activación de PI3K/Akt en linfoblastos controles y de pacientes con EA. Los linfoblastos controles y de EA se sembraron a una concentración inicial de 1×10^6 células $\times \text{ml}^{-1}$ en medio RPMI con 10% de suero en ausencia o en presencia de SIM $1 \mu\text{M}$, se tomaron alícuotas de los cultivos a tiempo 0 y a 24 horas y se realizaron extractos para western blotting. En la parte superior de la figura se muestra un experimento representativo de la medida de PI3K/Akt activa y total a los tiempos indicados y en ausencia y presencia de SIM en las células controles y de EA. En la parte inferior se muestran los valores medios \pm el error estándar del análisis densitométrico de los resultados de 7 experimentos independientes.

6.2. Efecto de simvastatina sobre la vulnerabilidad celular a la retirada del suero.

En estos experimentos, se incubaron los linfoblastos de controles y de pacientes de EA en ausencia de suero durante 96 horas en ausencia y en presencia de simvastatina y se valoró la viabilidad celular por recuento directo del número de células que excluyen azul de Tripán. La figura 49 muestra, como era de esperar, una mayor resistencia de los linfoblastos de pacientes de EA a la retirada del suero. El tratamiento con simvastatina produjo un ligero aumento en la mortalidad de las células controles, y sensibilizó a los linfoblastos de pacientes con EA frente a la privación de suero, reduciendo la viabilidad hasta valores similares a los de las células controles (figura 49).

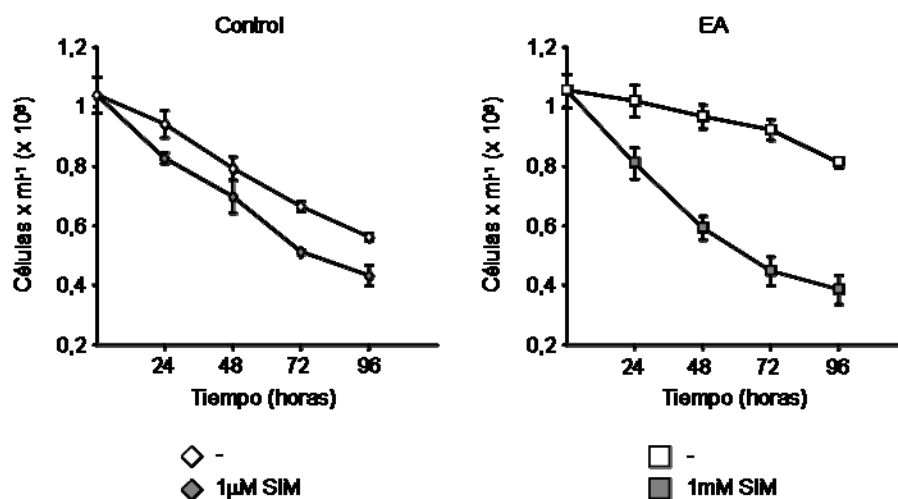


Figura 49. Efecto de SIM sobre la retirada de suero en linfoblastos controles y de EA. Los linfoblastos controles y de EA se sembraron a una concentración inicial de 1×10^6 células \times ml⁻¹ en medio RPMI sin suero durante 96 horas en ausencia o en presencia de SIM 1 μM y se tomaron alícuotas a los tiempos indicados para determinar la viabilidad celular. En la figura se muestran los valores medios \pm el error estándar de 3 a 5 experimentos independientes.

El efecto de simvastatina induciendo muerte celular en los cultivos de linfoblastos de EA es también dependiente del efecto de la droga inhibiendo la actividad del enzima HMG-CoA reductasa ya que, como puede apreciarse en la figura 50, el efecto de simvastatina desaparece cuando se incuban las células conjuntamente con MEV.

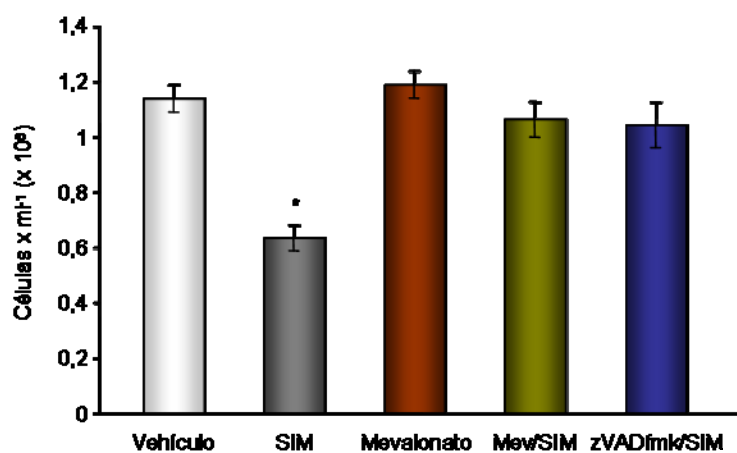


Figura 50. Efecto de SIM sobre la supervivencia celular inducida por la retirada del suero en linfoblastos de EA. Los linfoblastos de individuos con EA se sembraron a una concentración inicial de 1×10^6 células \times ml⁻¹ en medio RPMI sin suero durante 3 días en ausencia o en presencia de SIM 1 μM sólo o en combinación con mevalonato (MEV) 200 μM o z-VAD-fmk 50 μM. La supervivencia celular se determinó por recuento de células que excluían el Azul Tripán. En la figura se muestran valores medios \pm el error estándar de 7 experimentos realizados con individuos diferentes. * $p < 0,01$: significativamente distinto del resto de condiciones.

Por otra parte, el hecho de que el efecto de simvastatina desaparezca en presencia del inhibidor de caspasas z-VAD-fmk, sugiere que la muerte celular inducida por la simvastatina ocurre como consecuencia de la activación de la apoptosis. El porcentaje de células apoptóticas tras el tratamiento de linfoblastos de EA con simvastatina se determinó por citometría de flujo usando la tinción AnexinaV acoplada a fluoresceína. La figura 51 muestra que la simvastatina dobla el porcentaje de células AnexinaV⁺/IP⁻, sugiriendo que la droga induce una apoptosis temprana, mientras que solo se observaron cambios pequeños en el número de células AnexinaV⁺/IP⁺, indicativo de apoptosis tardía/necrosis tras los distintos tratamientos (figura 51).

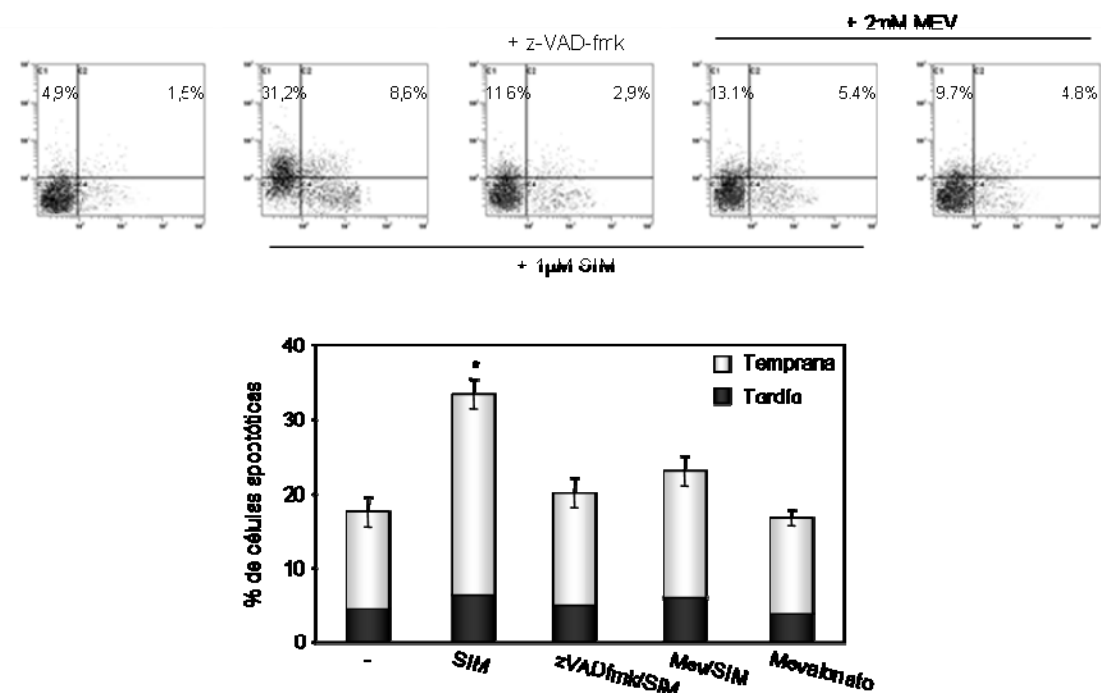


Figura 51. Análisis por citometría de flujo del porcentaje de células viables, apoptóticas y necróticas de linfoblastos de EA tras el tratamiento con SIM, MEV y z-VAD-fmk, en ausencia de suero. Los linfoblastos de EA se sembraron a una concentración de 1×10^6 células \times ml^{-1} en medio RPMI sin suero durante 3 días en ausencia o en presencia de SIM $1\mu\text{M}$, z-VAD-fmk $50\mu\text{M}$ y/o MEV $200\mu\text{M}$. Después, se recogieron y se trataron para análisis por citometría de flujo tal como se describe en “métodos”, tiñéndose con FITC-AnexinaV (eje de ordenadas) e IP (eje de abscisas). En la parte superior de la figura, se muestra un experimento representativo donde aparecen las células viables (abajo, izquierda) apoptóticas (arriba, izquierda) y necróticas (arriba, derecha). La parte inferior muestra los valores medios de 8 experimentos realizados con células procedentes de distintos individuos. * $p < 0,02$: significativamente distinto comparado con el resto de condiciones.

6.2.1. Efecto de simvastatina sobre la actividad de Erk1/2 tras la privación de suero.

Como se ha comentado anteriormente, los linfoblastos de pacientes de EA parecen superar la tendencia natural a la apoptosis inducida por la privación del suero regulando a la baja la activación de Erk1/2 (Bartolomé y cols., 2007). Además, el tratamiento con el inhibidor de Erk1/2, PD98059, no tuvo consecuencias sobre las células de EA y, sin embargo, previno parcialmente la activación de Erk1/2 en células controles e impidió la muerte celular inducida por la privación del suero (figuras 27 y 29). Por este motivo, se ha investigado si la administración de simvastatina es capaz de modular la actividad de esta cascada de señalización. La figura 52 muestra, como era de esperar, que la estimulación de Erk1/2 producida tras la retirada de suero es significativamente menor en linfoblastos de pacientes de alzhéimer. El tratamiento con simvastatina produjo un incremento en la fosforilación de Erk1/2 en las células de EA. En estas condiciones las células de EA sufren apoptosis de forma similar a las células controles a las 72 de la retirada del suero (figura 52).

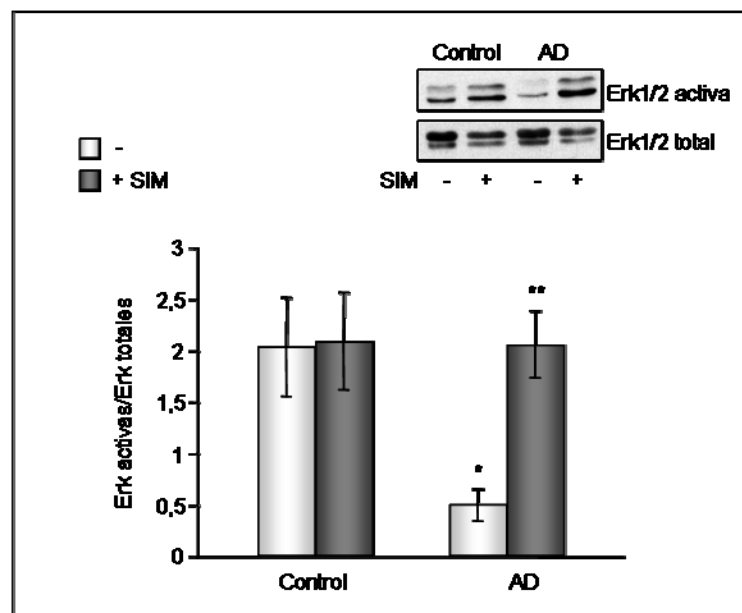


Figura 52. Efecto de SIM sobre la activación de Erk1/2 en ausencia de suero en linfoblastos controles y de pacientes con EA. Los linfoblastos controles y de EA se sembraron a una concentración inicial de 1×10^6 células \times ml^{-1} en medio RPMI sin suero en ausencia o en presencia de SIM $1\mu\text{M}$. Tras 72 horas, se recogieron las células y se realizaron extractos para western blotting. Arriba se muestra un experimento representativo. La figura muestra el análisis densitométrico de las bandas realizado en 3-5 experimentos independientes. * $p < 0,05$: diferencias significativas respecto a células controles. ** $p < 0,02$: significativamente distintos de las células de EA no tratadas.

7. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA RESPUESTA CELULAR DE LINFOBLASTOS DE PACIENTES DE EA Y DE ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA).

7.1. Selección de pacientes.

Para la realización de este estudio se utilizó una cohorte de 10 individuos diagnosticados de ELA y 20 pacientes con EA así como 20 individuos controles.

De los 20 pacientes con EA, 7 presentaban EA leve (puntuación MMSE entre 18-24), 5 EA moderada (MMSE entre 10-18) y 8, presentaban EA grave (MMSE <10).

Las características demográficas de los donantes de sangre periférica para este estudio están recogidas en la Tabla XIV.

TABLA XIV
Características demográficas

	Control n=20	EA n=20	ELA n=10
Edad (años)	71±2	75±2	63±3
Rango de edades	(43-82)	(59-89)	(46-79)
Género (Varón/Mujer)	8/12	9/11	5/5

Control: individuos sin signos de enfermedad neurológica; EA: pacientes con diagnóstico de probable EA; ELA: pacientes de esclerosis lateral amiotrófica; n: número de pacientes. Los valores son la media ± el error estándar.

Se generaron líneas linfoblastoides según se ha descrito en el apartado 1.1.

7.2. Actividad proliferativa de linfocitos inmortalizados de pacientes de EA y de ELA.

En la figura 53 se muestran los datos de la tasa de proliferación de linfoblastos de pacientes de EA y de ELA y de donantes controles a las 72 de la estimulación por suero. Como era de esperar, y de acuerdo con los trabajos previos de nuestro laboratorio (de las Cuevas y cols., 2003; Muñoz y cols., 2005, 2008a, 2008b; Sala y cols., 2008), los linfoblastos de EA mostraron una mayor actividad proliferativa que las células controles. Por contra, no se observaron diferencias significativas entre los linfoblastos controles y los derivados de pacientes con ELA.

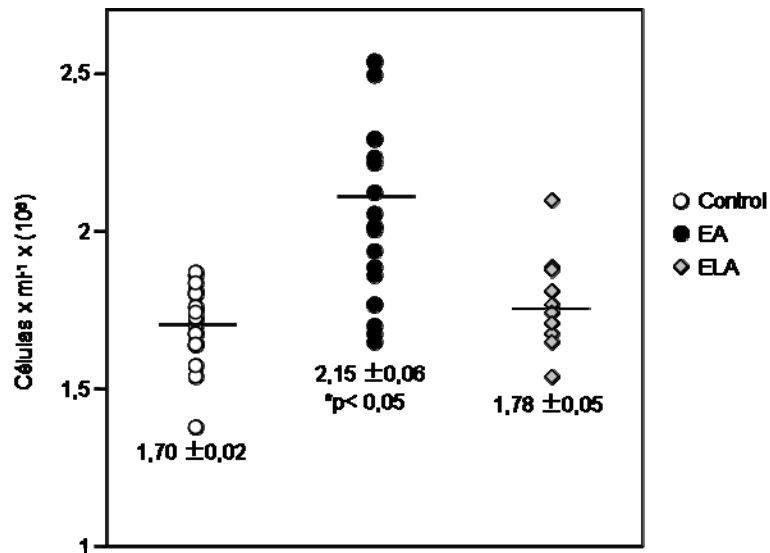


Figura 53. Diagrama comparativo de la actividad proliferativa de linfoblastos controles, de pacientes con EA y de pacientes con ELA. Las células inmortalizadas de individuos controles, con EA y con ELA, se sembraron a una concentración inicial de 1×10^6 células \times ml^{-1} en medio RPMI con 10% de suero, durante 72 horas. Cada 24 horas se tomaron alícuotas para recuento de células por exclusión de Azul Tripán. En la figura se muestran los valores de proliferación de cada individuo control, con EA y con ELA, a las 72 horas del inicio del experimento y se representa el valor medio \pm el error estándar. * $p < 0,05$: significativamente distinto de las células controles o de pacientes de ELA.

Dado que la edad media de los pacientes de ELA es menor que la de pacientes de EA, nos pareció oportuno comprobar si la actividad proliferativa de los linfoblastos procedentes de individuos controles se veía afectada por la edad. Sin embargo, como se muestra en la figura 54 no se observan diferencias significativas entre sujetos menores o mayores de 70 años.

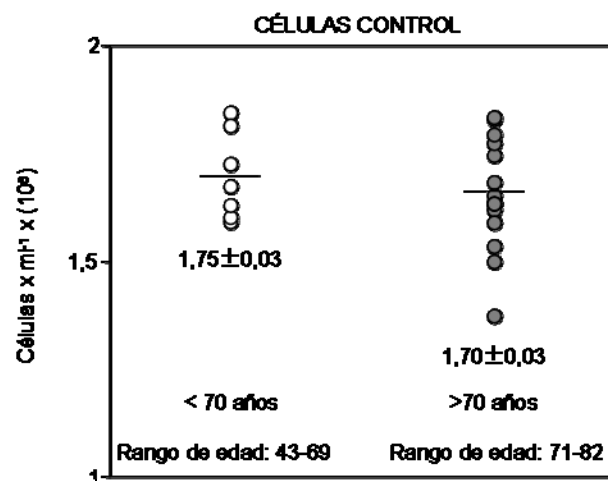


Figura 54. Diagrama comparativo de la actividad proliferativa de individuos controles de acuerdo con la edad. Los linfoblastos de individuos controles separados por edades (< de 70 años y > de 70 años), se sembraron a una densidad inicial de 1×10^6 células \times ml^{-1} en medio RPMI con 10% de suero, durante 72 horas. Pasado este tiempo, se tomaron alícuotas de los cultivos para recuento de la viabilidad

celular por exclusión de Azul Tripán. En la figura se muestran los valores de proliferación de cada individuo así como el valor medio de cada grupo \pm el error estándar.

Por otra parte, también se ha podido demostrar, que la tasa de proliferación de linfoblastos de EA no depende del grado de progresión de la enfermedad. La figura 55 muestra valores similares para las líneas linfoblásticas de pacientes con EA leve, moderada o grave (figura 55).

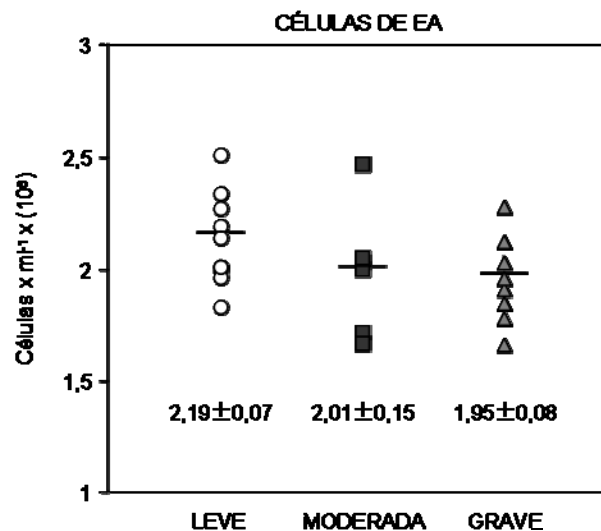


Figura 55. Actividad proliferativa de linfoblastos con EA respecto a la progresión de la enfermedad. Los linfoblastos de pacientes con EA, separados por grupos de acuerdo con el grado de enfermedad (leve, moderada, grave), se sembraron a una densidad inicial de 1×10^6 células x ml⁻¹ en medio RPMI con 10% de suero. Tras 72 horas, se tomaron alícuotas de los cultivos para recuento de la viabilidad celular por exclusión de Azul Tripán. En la figura se muestran los valores de proliferación de cada individuo así como el valor medio de cada grupo \pm el error estándar.

En consonancia con la ausencia de diferencias en la actividad proliferativa entre los linfoblastos de pacientes de ELA y de individuos controles, tampoco se pudieron observar cambios en los niveles de los inhibidores de CDKs, p21 y p27 (figura 56). La figura muestra asimismo, que en las mismas condiciones experimentales los linfoblastos de EA presentan un contenido significativamente menor de p21 y p27.

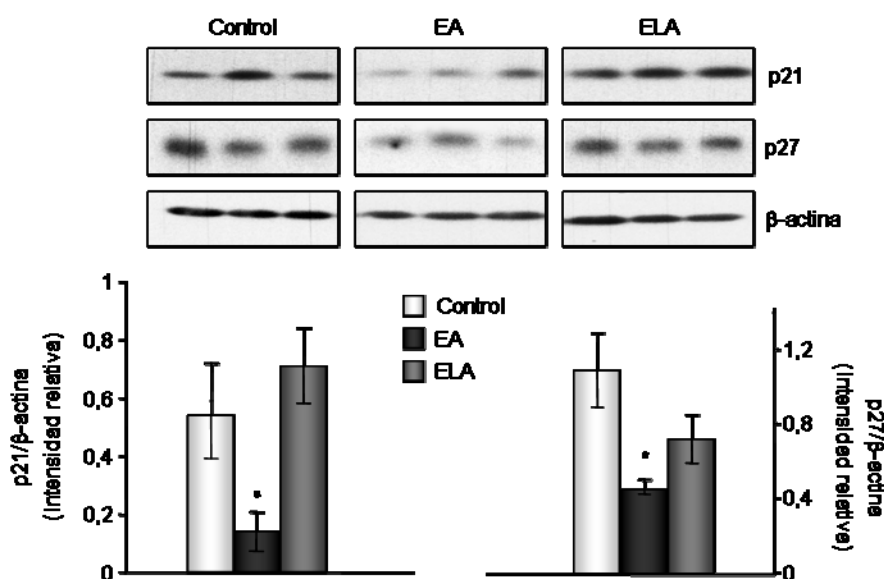


Figura 56. Niveles de expresión de los CDKIs p21 y p27 en linfoblastos de individuos controles, de pacientes con EA y de pacientes con ELA. Las células de individuos controles, con EA y con ELA, se sembraron a una concentración de 1×10^6 células \times ml^{-1} en medio RPMI con 10% de suero. Tras 24 horas en cultivo, se recogieron las células y se trataron para preparar extractos para western blotting. En la parte superior de la figura se muestran inmunoblots representativos de 3 líneas control, 3 de EA y 3 de ELA, mostrando los niveles de p21 y p27. Debajo se muestra el análisis densitométrico de cada una de las proteínas (valores medios \pm el error estándar). * $p < 0,05$: significativamente distinto de las células del grupo control.

7.3. Efecto de la privación de suero en linfoblastos de individuos controles y pacientes de EA y ELA.

La figura 57 muestra, de acuerdo con observaciones previas (Bartolomé y cols., 2007) que los linfoblastos derivados de pacientes de EA son más resistentes a la muerte celular que induce la retirada del suero, que las células controles. La respuesta celular a la retirada del suero de los linfoblastos de pacientes de ELA no difiere de la de los linfoblastos controles. Tanto en el grupo control como en el de pacientes de ELA, se observa que, aproximadamente, muere un 30% de las células tras 72 horas en ausencia de FBS, mientras que el porcentaje se reduce a menos del 10% en el grupo de pacientes de EA (figura 57).

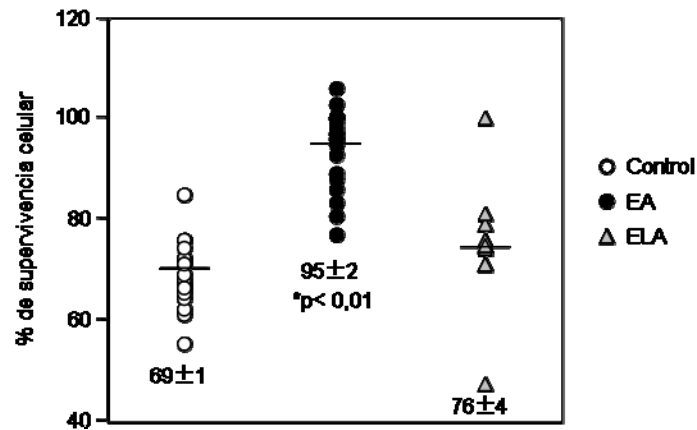


Figura 57. Diagrama comparativo de la supervivencia celular por la retirada de suero entre linfoblastos de individuos controles, de pacientes con EA y de pacientes con ELA. Las células inmortalizadas de individuos controles, con EA y con ELA, se sembraron a una concentración inicial de 1×10^6 células $\times \text{ml}^{-1}$ en medio RPMI sin suero, durante 72 horas. La viabilidad celular se determinó por recuento de células por exclusión de azul de Tripán y se expresa como porcentaje respecto al número de células al inicio del experimento (100%). En la figura se muestran los valores de supervivencia de cada individuo control, con EA y con ELA así como el valor medio de cada grupo \pm el error estándar. * $p < 0,01$: significativamente distinto de las células controles o de pacientes de ELA.

7.4. Actividad de PI3K/Akt y Erk1/2 en linfoblastos controles y de pacientes de EA o ELA.

Como ya se ha mencionado, la mayor actividad proliferativa de los linfoblastos de EA está asociada con una estimulación exacerbada de PI3K/Akt, mientras que la menor vulnerabilidad celular a la retirada del suero parece ser consecuencia de una regulación a la baja de la actividad de Erk1/2 (Muñoz y cols 2008a, b; Bartolomé y cols, 2007). De acuerdo con estas observaciones, se puede apreciar en la figura 58 que los linfoblastos de EA muestran un aumento en el estado de fosforilación de Akt significativamente mayor que el que se observa en las células controles o en los linfoblastos de pacientes de ELA.

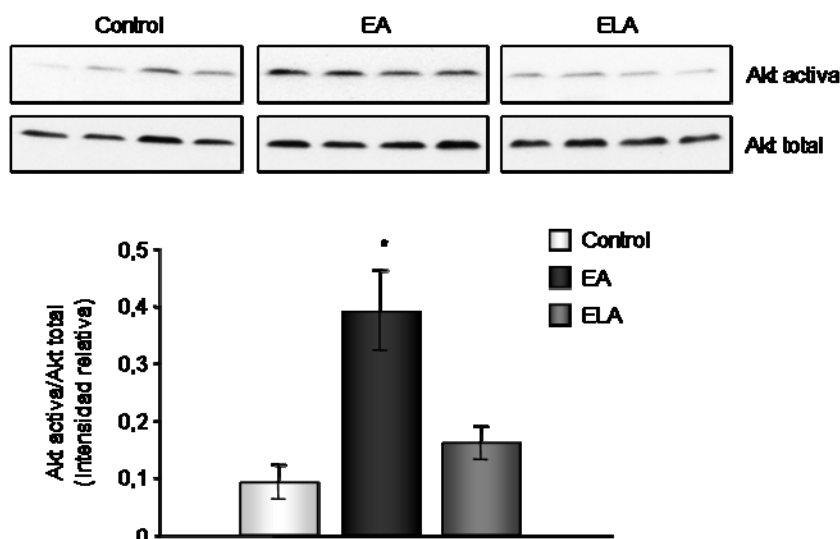


Figura 58. Activación de PI3K/Akt en linfoblastos de individuos controles, de pacientes con EA y de pacientes con ELA. Los linfoblastos de 4 individuos controles, de 4 con EA y de 4 con ELA, se sembraron a una concentración de 1×10^6 células \times ml^{-1} en medio RPMI con 10% de suero. Tras 24 horas en cultivo, se recogieron las células y se trataron para preparar extractos para western blotting. En la parte superior de la figura se muestran los inmunoblots de cada línea control, de EA y de ELA, mostrando los niveles de PI3K/Akt activa y total tras su incubación con los anticuerpos correspondientes. Debajo se muestra el análisis densitométrico de la proteína para cada grupo (valores medios \pm el error estándar). * $p < 0,05$: significativamente distinto de las células del grupo control.

En la figura 59 se ha comparado la actividad de Erk1/2 de linfoblastos controles y de pacientes de ELA y de EA, tras 72 horas en ausencia de suero. Como era de esperar, el estado de fosforilación de Erk1/2 en los linfoblastos de EA, es significativamente menor que en los controles. Sin embargo, tampoco se observaron cambios en la actividad de esta cascada de señalización en los linfoblastos de pacientes de ELA (figura 59). En estas condiciones, el porcentaje de muerte celular de los cultivos de pacientes con ELA es similar al de los controles (figura 57).

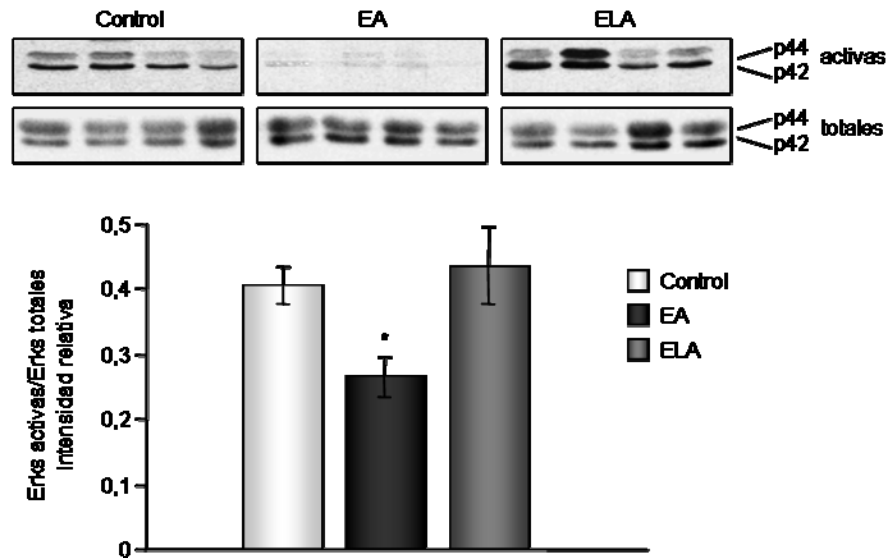


Figura 59. Activación de Erk1/2 en ausencia de suero en linfoblastos de individuos controles, de pacientes con EA y de pacientes con ELA. Los linfoblastos de individuos controles, de EA y de ELA, se sembraron a una concentración de 1×10^6 células \times ml^{-1} en medio RPMI sin suero. Tras 72 horas en cultivo, se recogieron las células y se prepararon extractos para western blotting. En la parte superior de la figura se muestran los inmunoblots de 4 líneas control, de 4 con EA y de 4 con ELA, mostrando los niveles de Erk1/2 activas y totales. Debajo se muestra el análisis densitométrico de las proteínas para cada grupo correspondientes a 8 experimentos independientes con distintos individuos (valores medios \pm el error estándar). * $p < 0,05$: significativamente distinto de las células del grupo de control.

En conjunto, estos resultados demuestran que no existen alteraciones en los mecanismos de control del ciclo celular y apoptosis en la ELA, al menos a nivel periférico. No se puede descartar, sin embargo que una posible perturbación de estos procesos en el SNC pudiera no tener consecuencias sistémicas en la ELA.

Discusión

1.- CARACTERIZACIÓN DE LAS LÍNEAS LINFOBLÁSTICAS DE EA.

En este trabajo hemos utilizado como modelo experimental linfocitos obtenidos a partir de sangre periférica de pacientes de EA y donantes controles, inmortalizados con el virus de Epstein Barr. Estas células son capaces de proliferar indefinidamente en cultivo. Las líneas linfoblásticas resultantes expresan marcadores de activación y moléculas de adhesión similares a las de células B activadas (Wang y cols., 1990), y por esta razón se han utilizado con frecuencia como modelo experimental en estudios biológicos y médicos (Gibson y Toral-Barza, 1992; Vanderhoeven y cols., 1999; Cechi y cols., 1999, 2002; Panetta y cols., 1999; Gomes y cols., 2003; Drexler y cols., 1999; Beesley y cols., 2006).

La EA y otras enfermedades neurodegenerativas afectan fundamentalmente al SN, pero sin embargo, presentan manifestaciones sistémicas. Estas últimas, aunque tienen menos relevancia clínica, permiten el estudio de aspectos fisiopatológicos relevantes en células y tejidos extraneurales, fácilmente accesibles. Existen numerosas evidencias en la literatura de la existencia de cambios moleculares, asociados al proceso neurodegenerativo, en células periféricas de pacientes (Etcheberrigaray y cols., 1994; Ibarreta y cols., 1998).

En trabajos previos de nuestro laboratorio y de otros, se han utilizado linfocitos y fibroblastos de pacientes para estudiar la relación existente entre ciclo celular y patogénesis de la EA (Nagy y cols., 2002; Tatebayashi y cols., 1995; Urcelay cols., 2001; de las Cuevas y cols., 2003, 2005; Muñoz y cols., 2005, 2008a, 2008b). Asimismo, también se ha estudiado la diferente vulnerabilidad celular a distintas situaciones de estrés de células de pacientes de EA y de individuos controles (de las Cuevas y cols., 2005; Bartolomé y cols., 2007). Los resultados de nuestro laboratorio desvelaron que los linfoblastos de EA presentan una respuesta anómala a la presencia o ausencia de suero. Las células de pacientes tienen una mayor capacidad proliferativa (de las Cuevas y cols., 2003, 2005; Muñoz y cols., 2005, 2008a) y son menos vulnerables a la apoptosis, inducida por la ausencia de suero. Estas características de los linfoblastos de EA han sido consideradas manifestaciones sistémicas de la enfermedad, pues reflejan

las alteraciones en el control del ciclo celular y apoptosis que se han detectado en cerebro.

El objetivo fundamental de este trabajo ha sido el estudio de algunos de los mecanismos de regulación de las cascadas de señalización celular implicadas en la mayor respuesta proliferativa y resistencia a la muerte celular de linfoblastos de pacientes de EA de aparición tardía.

Nuestros resultados han puesto de manifiesto complejas interacciones entre la ruta de señalización dependiente de Ca^{2+} /CaM y las cascadas de señalización PI3K/Akt y Erk1/2, regulando el destino celular dependiendo de la presencia o ausencia de factores tróficos.

Hemos podido observar diferencias significativas en la activación de PI3K/Akt, entre las células de EA y controles, que resultan en cambios importantes en el contenido celular de los inhibidores de CDK, p21 y p27 y, consecuentemente, en un aumento de la velocidad de proliferación. La mayor resistencia a la apoptosis, inducida por la retirada del suero, parece ser consecuencia de una menor activación de la vía Erk1/2. Ambos procesos parecen depender del contenido y/o actividad de CaM.

Aunque la utilización de líneas linfoblásticas de pacientes de EA resulta muy conveniente, pues evita la extracción repetida de muestras de sangre en una población tan vulnerable como la de ancianos con demencia, consideramos importante validar las observaciones realizadas en este modelo experimental, comprobando que se producen alteraciones similares en linfocitos no transformados. Nuestros resultados indican que en linfocitos de pacientes de EA también se produce una mayor respuesta proliferativa y resistencia a la apoptosis que en linfocitos controles. Asimismo, pudimos demostrar cambios en la activación de Erk1/2, PI3K/Akt y en el contenido celular de p27. Estas observaciones sugieren que el proceso de transformación celular no impide la respuesta celular normal a la presencia o ausencia del suero.

2.- MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN/MUERTE CELULAR DE LINFOBLASTOS CONTROLES Y DE EA.

2.1.- Alteración en la actividad proliferativa de linfoblastos de pacientes con EA.

Trabajos previos de nuestro laboratorio habían puesto de manifiesto alteraciones en la progresión a través del ciclo celular en linfoblastos de pacientes de EA, afectando fundamentalmente al tránsito G₁/S (de las Cuevas y cols., 2003). En efecto tanto la fosforilación de las proteínas de la familia retinoblastoma (pRb), como la actividad del factor de transcripción E2F son mayores en las células de pacientes (de las Cuevas y cols., 2005; Muñoz y cols., 2005). Cuando pRb se encuentra hipofosforilada forma complejos inhibitorios con factores de transcripción de la familia de E2F (Chellappan y cols., 1991). Tras la fosforilación de pRb, se libera E2F permitiendo, de este modo, la transcripción de genes cuyos productos son necesarios para la progresión del ciclo celular (Helin, 1998). Nuestros resultados permiten concluir que el aumento de fosforilación de pRb es consecuencia de una actividad incrementada del complejo ciclina E/CDK2 en los linfoblastos de EA. Este complejo puede ser regulado negativamente por la unión de proteínas reguladoras, llamadas inhibidoras de CDKs (CDKIs) (Sherr y Roberts, 1995). Se conocen dos familias de CDKIs, INK4 (p16, p15, p19 y p18) y CIP/KIP (p21, p27 y p57). Los inhibidores de la familia CIP/KIP están involucrados preferentemente en regular los complejos CDKs en la transición entre las fases G₁ y S del ciclo celular (Morgan, 1995; Sherr y Roberts, 1995). Nuestros resultados permiten concluir que el aumento en la actividad de ciclina E/CDK2 que se observa en las células de pacientes es consecuencia de una regulación a la baja en las proteínas p21 y p27. Estas proteínas juegan un papel relevante inhibiendo la proliferación celular durante el desarrollo, la diferenciación celular o la respuesta de la célula al estrés (Sherr y Roberts, 1999), aunque cada una de ellas puede ejercer funciones biológicas singulares. Las proteínas de la familia CIP/KIP comparten el extremo N-terminal, mediante el que se unen a los complejos CDKs, pero difieren en el resto de la secuencia, sugiriendo mecanismos distintos de regulación (Besson y cols., 2008). Así por ejemplo, los niveles de p21 parecen fluctuar más en respuesta a situaciones que causan daños en el material genético (Gartel y Tyner, 1999), mientras que los niveles de p27 parecen ser más sensibles a la acción de los mitógenos (Besson y

cols., 2006). La regulación del contenido celular de p21 y p27 ocurre a nivel de transcripción y traducción (Kwon y cols., 1997; Millard y cols., 1997), así como a través de cambios en la degradación de estas proteínas en el ubiquitín-proteasoma (Pagano y cols., 1995). De todos estos mecanismos, se considera que el que tiene más relevancia fisiológica es la degradación de p27 en el proteasoma (Shirane y cols., 1999). La regulación de los niveles de p21 es compleja, pues aunque mayoritariamente ocurre a nivel transcripcional, de manera dependiente de p53 (el-Deiry y cols., 1993), o independiente de esta proteína (Parker y cols., 1995), trabajos recientes han puesto de manifiesto que el contenido celular de p21 también es regulado controlando su degradación. Nuestros resultados demuestran que ambas proteínas tienen una vida media considerablemente menor en linfoblastos de pacientes de EA que la observada en células controles. Es interesante destacar que p21 tiene una vida media mucho más corta que la de p27 (3 horas vs. 22 horas) en linfocitos controles. Estos resultados están en consonancia con los valores descritos para la vida media de p21 en distintos tipos celulares (Dash y el-Deiry, 2005). En la literatura se ha descrito que la vida media de p27 oscila entre 2 y 44 horas, aproximadamente, dependiendo del tipo celular y las condiciones experimentales (Connor y cols., 2003; Vuocolo y cols., 2004).

Nuestros resultados sugieren que la degradación de p21 y p27 ocurre vía proteasoma, ya que estas proteínas se acumulan en presencia de un inhibidor específico del proteasoma como es el MG132 y no en presencia de un inhibidor general de caspasas. Se han descrito alteraciones en la actividad del proteasoma en cerebros de EA, aparentemente asociadas con la acumulación de proteínas con plegamiento defectuoso (Ding y Keller, 2003). Por otra parte, también se ha descrito que algunos de los componentes enzimáticos del proteasoma sufren una mayor oxidación e inactivación en cerebros de EA que en individuos controles (Castegna y cols., 2002a, 2002b). Sin embargo, resultados recientes de nuestro laboratorio (Muñoz y cols., 2008b) permiten descartar cambios en la actividad global del proteasoma en las células de pacientes de EA que pudieran dar cuenta de los niveles reducidos de p21 y p27 en linfoblastos de pacientes de EA.

2.2.- Respuesta celular a la retirada del suero en linfoblastos de individuos controles y pacientes con EA.

Nuestros resultados revelan que los linfoblastos de pacientes con EA presentan una mayor resistencia a la ausencia de suero que los linfoblastos de individuos controles. Estas observaciones están de acuerdo con trabajos previos de nuestro laboratorio (de las Cuevas y cols., 2005; Bartolomé y cols., 2007). Otros autores (Morocz y cols., 2002; Uberti y cols., 2002) habían demostrado previamente la existencia de un daño selectivo de los mecanismos implicados en la muerte celular, en células periféricas de pacientes de EA, aunque existen discrepancias acerca de la vulnerabilidad de las células de pacientes con EA a diferentes agentes causantes de estrés celular, que pueden deberse a que se han utilizado distintos tipos de células, fibroblastos, linfocitos B, linfocitos T ó linfocitos inmortalizados expuestos a diferentes condiciones experimentales.

La menor vulnerabilidad de los linfoblastos de EA a la muerte celular inducida por la retirada del suero, pudiera ser otra manifestación sistémica de la EA. Resultados recientes, realizados en ratones transgénicos portadores de la mutante humana del gen de PS1, causa de EAF, indican que linfocitos o neuronas de estos ratones muestran idéntica susceptibilidad a la muerte celular inducida por distintos agentes (Eckert y cols., 2001b). De nuevo, estos resultados resaltan la utilidad de modelos animales y células periféricas de pacientes para el estudio de la fisiopatología de la EA.

La muerte celular, inducida por la retirada del suero, ocurre por apoptosis, ya que es sensible al inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk, y cursa con alteraciones en el balance de proteínas pro- y anti-apoptóticas. Los linfoblastos de EA mostraron un aumento en el cociente Bcl-2/Bax, respecto al de linfoblastos controles, en respuesta a la privación del suero. Se considera que las proteínas de la familia Bcl-2 juegan un papel relevante, promoviendo la supervivencia de distintos tipos celulares, frente a una gran diversidad de estímulos, incluyendo radiación, ausencia de factores crecimiento y drogas quimioterapéuticas (Zhong y cols., 1993). La expresión ectópica de Bcl-2 protege a células neuronales de sufrir un proceso apoptótico, inducido por A β (Luetjens y cols., 2001). Asimismo, la actividad oncogénica de Bcl-2 en ciertos linfomas se ha atribuido a su función antiapoptótica (Vaux y cols., 1988).

2.3-. Papel de Ca^{2+} /CaM en el control de proliferación/muerte celular en la EA.

Tanto el control de la actividad proliferativa como la resistencia a la inducción de apoptosis por la retirada del suero, dependen de Ca^{2+} /CaM. Los dos procesos son sensibles a antagonistas de CaM. Los iones Ca^{2+} son esenciales en los procesos de aprendizaje y memoria (Mattson y Chan, 2003) y la perturbación de la homeostasis iónica se considera una de las causas de la neurodegeneración en la EA (LaFerla, 2002). Trabajos previos de nuestro laboratorio, habían mostrado que también se producen alteraciones en la homeostasis de Ca^{2+} (Ibarreta y cols., 1997) y de H^+ asociados a cambios en la actividad proliferativa en los linfoblastos de EA de aparición tardía (Urcelay y cols., 2001) y con alteraciones en la actividad transcripcional de E2F y NF- κ B (de las Cuevas y cols., 2005). Alteraciones similares en la homeostasis iónica se han descrito en linfocitos de pacientes con EAF (Brzyska y Elbaum, 2003) y en modelos murinos de EA (Eckert y cols, 2001b; López y cols., 2008).

Nuestros resultados muestran que las células de pacientes de EA presentan un mayor contenido en CaM, Esta proteína es el receptor intracelular más importante de Ca^{2+} . Se ha descrito que CaM juega un papel relevante para la supervivencia, tanto de células neuronales (Egea y cols., 2001; Cheng y cols., 2003), como de células de linfoma de pollo, (Schmalzigaug y cols., 2001) o de carcinoma de mama (Deb y cols., 2004). La importancia de la molécula de CaM para la supervivencia de las células de mamíferos queda reflejada en el hecho de que sea codificada por tres genes en cromosomas separados (Berchtold y cols., 1993) y que su secuencia se ha conservado en el proceso evolutivo, siendo idéntica en distintas especies (Toutenhoofd y Sthrehler, 2000). Por otra parte, en la literatura pueden encontrarse evidencias experimentales que indican la existencia de una relación lineal entre la concentración intracelular de CaM y la capacidad proliferativa (Rasmussen y Means, 1989). Cambios en el contenido total de CaM pueden hacer que las células, más o menos dependientes de la presencia de Ca^{2+} en el medio extracelular, puedan proliferar (Kahl y Means, 2003). En ausencia de suero, las células de pacientes de EA muestran una respuesta exacerbada en los flujos y/o en la fijación de Ca^{2+} (Ibarreta y cols., 1997). Nuestros resultados indican que se requiere la presencia de Ca^{2+} en el medio extracelular y, probablemente, un mayor contenido celular de CaM, para observar la resistencia de los linfoblastos de EA a la apoptosis

inducida por la retirada del suero. La adición de un quelante intracelular de Ca^{2+} como BAPTA-AM no tuvo consecuencias en la vulnerabilidad de las células controles y de EA, ante la retirada del suero, aunque no puede descartarse que la capacidad de tamponamiento del BAPTA-AM se vaya perdiendo a lo largo de la duración del experimento (Yao y Tsien, 1997).

Nuestros resultados muestran que dos antagonistas de CaM, no relacionados estructuralmente, como el W-7 o el CMZ, son capaces de anular el aumento de proliferación, inducido por el suero en los linfoblastos de EA. Estos resultados se acompañan de una inhibición de fosforilación de pRb y de un aumento en los niveles de p27, alcanzando valores similares a los de las células control. Estos resultados están de acuerdo con trabajos previos que sugerían que CaM regula el ciclo celular, actuando preferentemente en el tránsito G_1/S (Chafouleas y cols., 1982; Serratos y cols., 1988; Rasmussen y Means, 1987, 1989; de las Cuevas y cols., 2003), aunque CaM también está implicada en la regulación del tránsito G_2/M (Kahl y Means, 2003).

Los antagonistas de CaM no tuvieron efecto alguno sobre la capacidad proliferativa ni sobre la resistencia celular a la apoptosis de los linfoblastos controles, aunque su presencia sensibilizó a los linfoblastos de EA a la muerte celular inducida por la privación del suero. Estos resultados sugieren que debe haber un umbral de CaM, por encima del cual, las células adquieren una ventaja proliferativa. Estos resultados están de acuerdo con trabajos previos que indicaban un efecto selectivo de antagonistas de CaM induciendo apoptosis en células tumorales de un carcinoma de mama, sin afectar las células epiteliales normales de la glándula mamaria (Deb y cols., 2004).

La causa del mayor contenido de CaM en células de pacientes de EA se desconoce. CaM tiene una vida media larga (18-20 horas) (Ferrington y cols., 1997) y por tanto, es susceptible de sufrir, de forma espontánea, modificaciones químicas que pudieran dificultar su degradación (Sacksteder y cols., 2006). Es interesante resaltar que un aumento en los niveles de CaM es una característica de las células tumorales (Zendegui y cols., 1984; Ye y cols., 1997; Deb y cols., 2004). Los linfoblastos de EA, al igual que las células tumorales, tienen una mayor actividad proliferativa y resistencia a la apoptosis.

2.4-. Interacción de la vía $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ con las cascadas de señalización intracelular PI3K/Akt y MAPK.

La potencial participación de las distintas rutas de señalización y su interacción con $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ en la respuesta de las células controles y de EA en ausencia y en presencia de suero se estudió mediante el uso de inhibidores farmacológicos específicos. Nuestros resultados mostraron, que en presencia de suero, solamente el antagonista de CaM, CMZ, y el inhibidor de PI3K/Akt, Ly294002 fueron capaces de revertir la estimulación de proliferación de los linfoblastos de EA. La administración conjunta de ambos compuestos no tuvo efectos aditivos. Los inhibidores de MAP kinasas (Erk1/2 y p38), no tuvieron, por el contrario, efecto alguno sobre proliferación celular. Una diferencia importante entre el CMZ y el Ly294002 es que este último compuesto, también inhibe la proliferación de células controles. Este hecho sugiere que el antagonista de CaM pudiera prevenir la sobreactivación de la ruta PI3K/Akt en linfoblastos de EA. En ausencia de suero, sin embargo, la inhibición de la actividad de Erk1/2, pero no la de PI3K/Akt, protege a las células controles de la apoptosis que induce la privación del suero. El inhibidor de Erk1/2 no afecta a la tasa de supervivencia de los linfoblastos de EA, pero impide el efecto de los antagonistas de CaM, sensibilizando a los linfoblastos de EA a la ausencia de factores tróficos. Estas observaciones sugieren un papel central para $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ regulando la actividad de las vías de señalización PI3K/Akt y Erk1/2 en función de la disponibilidad de suero y controlando a través de ellas, el destino celular: supervivencia/muerte.

La interacción de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ con la cascada de señalización PI3K/Akt controla la progresión de las células de EA a través del ciclo de división celular, regulando a la baja los niveles celulares del CDKI, p27. En trabajos recientes de nuestro laboratorio, se ha podido demostrar la participación de esta vía estimulando la degradación de p27 en el proteasoma en linfoblastos de EA (Muñoz y cols., 2008a). La mayor actividad de PI3K/Akt en linfoblastos de EA da lugar a un aumento en la fosforilación de p27 en el residuo Thr187, tras lo cual, la proteína es reconocida por la proteína Skp2 del complejo SCF para ser ubiquitinada y, posteriormente, degradada por el proteasoma (Dick y cols., 1997). Tanto la adición de antagonistas de CaM como la inhibición de PI3K/Akt por Ly294002, restauran los niveles de fosforilación de p27 y el contenido celular de p27 a valores similares a los encontrados en linfoblastos de donantes controles (Muñoz y cols., 2008a). Por otra parte, también se pudo demostrar una alteración en la

localización subcelular de p27 en los linfoblastos de EA (Muñoz y cols., 2008b). Nuestros resultados también indican una mayor degradación de p21 en los linfoblastos de pacientes de EA, que resulta en una disminución en el contenido celular de p21 en las células de pacientes de EA tras la estimulación con suero. En este caso, no parece probable la implicación de PI3K/Akt, ya que no pudimos observar acumulación de p21 tras la inhibición de esta vía por Ly294002. Estos resultados están de acuerdo con trabajos previos realizados por Fukuchi y cols. y Rössig y cols., en una línea mieloide y en células de cordón umbilical, respectivamente, en los que observaron que la activación de PI3K/Akt aumenta la estabilización de p21 (Fukuchi y cols., 2000; Rössig y cols., 2002). Por otro lado, se ha descrito que la molécula de CaM puede regular la función inhibidora de CDK, mediante su unión a p21 en un sitio cercano a la señal de localización nuclear, facilitando su translocación al núcleo (Agell y cols., 2006), pero se desconoce si tiene algún efecto sobre el contenido celular total de p21. No puede descartarse que la fosforilación de p21 en ciertos residuos por kinasas dependientes de Ca^{2+} /CaM pudiera jugar algún papel en el control de la degradación de p21.

En la literatura se ha descrito un papel de la vía Ca^{2+} /CaM en la activación de PI3K/Akt en diversos tipos celulares (Pérez-García y cols., 2004; Cheng y cols., 2003). PI3K cataliza la reacción que genera fosfatidil inositol 3-4 bifosfato (PIP_2) e inositol 3,4,5 trifosfato (PIP_3). PIP_2 y PIP_3 se unen a los dominios plectrina de algunas proteínas como es el caso de Akt (Downes y cols., 2005; Wymann y Marone, 2005). La unión de los fosfolípidos a la molécula de Akt facilita su traslado a la membrana plasmática donde es fosforilada y activada por PDK1 y PDK2 en los residuos Thr 308 y Ser 473, respectivamente (Song y cols., 2005). En neuronas, se ha descrito que CaM es capaz de regular la activación de Akt por PI3K. Tanto la activación de Akt como la supervivencia neuronal depende de Ca^{2+} /CaM, ya que se observó que los antagonistas de CaM previenen la activación de Akt inhibiendo la generación de PIP_2 y PIP_3 (Egea y cols., 2001). CaM es capaz de asociarse al dominio SH2 de la subunidad reguladora de 85 KDa de PI3K (Joyal y cols., 1997; Pérez-García y cols., 2004). Además, la subunidad catalítica de PI3K, la proteína p110, también tiene en su secuencia un sitio de unión para CaM (Fischer y cols., 1998). Además de prevenir la activación de Akt, (Egea y cols., 2001; Shin y cols., 2002), los antagonistas de CaM son capaces de restaurar la actividad transcripcional de la familia de factores de transcripción FOX en células PTEN^{-/-} (Kau y cols., 2003). Por otra parte, la CaM podría activar directamente a Akt,

pues se ha descrito que estas dos proteínas son capaces de formar complejos *in vitro* (Deb y cols., 2004). Recientemente, se ha demostrado que esta unión facilita la translocación de Akt a la membrana plasmática (Coticchia y cols., 2008). Además, Akt es fosforilada directamente por CaMKK, de manera dependiente de Ca^{2+} (Yano y cols., 1998). Se desconoce cual de estos mecanismos predomina en linfocitos humanos, aunque recientemente hemos podido demostrar con experimentos de co-inmunoprecipitación la formación de complejos CaM-p85 de manera dependiente de Ca^{2+} (Muñoz y cols., 2008b).

La cascada de señalización Erk1/2 parece jugar un papel esencial regulando la supervivencia de linfocitos humanos de forma Ca^{2+} /CaM dependiente. Esta aseveración se basa en las siguientes observaciones: en primer, lugar la inhibición de la actividad de Erk1/2 protege a los linfoblastos derivados de donantes controles de la apoptosis inducida por la retirada del suero; en segundo lugar, previene el efecto de los antagonistas de CaM sensibilizando a los linfoblastos de EA a la privación del suero.

Es un hecho conocido que tanto la cinética como la duración de la activación de Erk1/2 determinan la naturaleza de la respuesta celular (Yano y cols., 1998; Egea y cols., 2001; Cheng y cols., 2003). Así, por ejemplo, nosotros encontramos un aumento transitorio de la fosforilación de Erk1/2 de mayor magnitud en los linfoblastos de EA en presencia de suero, mientras que la privación de suero, da lugar a una estimulación sostenida de Erk1/2, que se mantiene al menos durante los tres días de duración del experimento. En este caso, la activación está considerablemente disminuida en los linfoblastos de pacientes de EA. Estos resultados están de acuerdo con trabajos previos en los que se muestra que una activación persistente de Erk1/2, se asocia con arresto del ciclo celular e inducción de apoptosis en distintos tipos celulares (Kim y cols., 1998; Pérez-Sala y cols., 1995; Zhu y cols., 2002). Tanto la activación transitoria como sostenida de Erk1/2 en respuesta a la presencia o ausencia de suero, son sensibles a la presencia de antagonistas de CaM o a la del inhibidor de CaMKII, KN-62. En ausencia de suero, el aumento en el contenido y/o actividad de CaM produce una regulación a la baja de Erk1/2 en linfoblastos de EA. Los antagonistas de CaM restauran la actividad de la vía Erk1/2 hasta niveles similares a los de las células controles e inducen apoptosis en los linfoblastos de EA. Este efecto es impedido en presencia del inhibidor específico de Erk1/2, PD98059. Estas observaciones sugieren que las cascadas de señalización

$\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ y Erk1/2 interactúan y regulan de forma coordinada la respuesta celular en función de la disponibilidad de factores tróficos.

Interacciones entre estas dos rutas de señalización, Erk1/2 y $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ se han descrito previamente en numerosos tipos celulares. Por ejemplo, se ha descrito que la inhibición farmacológica de CaM disminuye la activación de MEK inducida por EGF (Derkinderen y cols, 1999), o que la CaMKII modula la estimulación de Erk1/2 por integrinas en células de tiroides TAD-2 (Illario y cols., 2003). También se ha descrito que $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ inhibe la fosforilación y activación de Erk1/2 en las células 3T3 (Knowles y cols., 1999). Se deduce de estas observaciones que la señalización a través de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ puede producir respuestas opuestas, dependiendo del estatus y tipo celular.

Se han propuesto diversos mecanismos por los cuales puede producirse la modulación de Erk1/2 por $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. En células de tiroides, CaMKII se asocia y fosforila a la proteína Raf-1, contribuyendo de ese modo a la activación de Erk1/2 (McShea y cols., 1999). Por otro lado, se ha descrito que CaM regula negativamente la señalización a través de Ras/Raf/MEK/Erk en fibroblastos (Wei y cols., 2002). También en neuronas, se ha propuesto un papel regulador de CaM de la actividad de KRas. Aparentemente, CaM se une al extremo carboxilo terminal que ancla KRas a la membrana plasmática, facilitando la redistribución de la actividad intracelular de la cascada KRas/MAPK (Fivaz y Meyer, 2005). *In vitro*, se ha podido demostrar una activación de synGAP por CaMKII (Pei y cols., 2002). SynGAP es una proteína GTPasa que es capaz de inhibir Erk1/2 en células neuronales (Zhao y cols., 2002). Elucidar si alguno de estos mecanismos está alterado en linfoblastos de pacientes de EA requiere una investigación futura.

2.5-. Alteraciones en las vías de señalización PI3K/Akt y Erk1/2 en el SN de pacientes de EA.

Los resultados obtenidos en células extraneurales de pacientes de EA no son directamente extrapolables a lo que sucede en el cerebro. Sin embargo, es interesante destacar que alteraciones similares a las descritas en linfoblastos se han detectado en cerebros de pacientes de EA. Así por ejemplo, se han relacionado alteraciones en la cascada de señalización PI3K/Akt con $\text{A}\beta$, los ovillos neurofibrilares y con la pérdida

neuronal en EA (Stein y cols., 2002). Se ha detectado un incremento de Akt fosforilada en Ser473 en neuronas de la corteza temporal de EA (Rickle y cols., 2004). La sobreactivación de Akt en cerebros de pacientes con EA está acompañada por un incremento en los niveles de fosforilación de sustratos de Akt como son GSK3 β , mTOR, tau y bajos niveles de p27 (Griffin y cols., 2005). Otros autores han observado un aumento en los niveles de fosfo-p27 (Thr187) en el citoplasma de neuronas vulnerables en la EA en asociación con ovillos neurofibrilares y neuritas distróficas (Ogawa y cols., 2003). Se ha considerado que la sobreactivación de la vía PI3K/Akt, normalmente asociada al control de la supervivencia celular en cerebros de pacientes con EA, pudiera ser una respuesta de las neuronas para compensar daños provocados por la enfermedad (Marino y cols., 2002). Sin embargo, el incremento de activación de esta vía en neuronas postmitóticas podría, eventualmente, inducir la muerte celular como consecuencia de sus efectos en proteínas reguladoras del ciclo celular.

Alteraciones en el control de la cascada de señalización Erk1/2 parecen jugar un papel importante en la patogénesis de la EA (Zhu y cols., 2002). Esta vía es clave en la regulación de la plasticidad sináptica en el hipocampo y en los procesos de aprendizaje y memoria (Derkinderen y cols., 1999). Se ha podido demostrar la activación de Erk1/2 en neuronas degenerativas (Mcshea y cols., 1999), así como la existencia de una aparente relación entre activación de Erk1/2 y la presencia de ovillos neurofibrilares en el cerebro humano (Knowles y cols., 1999). Por otra parte, *in vitro* se ha podido observar que A β es capaz de activar Erk1/2 e inducir la fosforilación de la proteína tau (Pei y cols., 2002; Zhao y cols., 2002).

En conjunto, nuestros resultados obtenidos en células periféricas de pacientes de EA, disfunción de las vías de señalización PI3K/Akt, y Erk1/2, niveles disminuidos de p21 y p27, similares a los descritos en neuronas vulnerables del cerebro de pacientes de EA, suponen un apoyo adicional a la hipótesis de que la EA es una enfermedad sistémica (Eckert y cols., 1994; Gibson y Huang, 2002; Nagy y cols., 2002). Por otra parte, se infiere que los linfocitos inmortalizados de pacientes de EA son un modelo experimental adecuado para el estudio de perturbaciones funcionales relevantes para la EA.

Aunque nuestros resultados no son directamente extrapolables a lo que ocurre en el cerebro de los afectados por alzhéimer, la modulación de las vías de señalización PI3K/Akt y Erk1/2 por Ca²⁺/CaM en respuesta a la presencia de factores

mitogénicos o de estrés, explica, en cierta forma, la relación que parece existir entre estrés celular y entrada aberrante en ciclo celular de neuronas susceptibles en el cerebro de pacientes de EA (Zhu y cols., 2001).

3-. EFECTOS DE SIMVASTATINA SOBRE LA RESPUESTA DE LINFOBLASTOS CONTROLES Y DE EA AL SUERO.

Teniendo en cuenta los estudios epidemiológicos que sugieren un efecto beneficioso del tratamiento con estatinas a pacientes de alzhéimer, en este trabajo hemos considerado la posibilidad de que las estatinas pudieran interferir con los mecanismos que controlan el ciclo celular, y pudieran, a través de esta forma, impedir la entrada y/o la progresión de neuronas vulnerables a través de un ciclo celular, que inevitablemente conduciría a la pérdida neuronal.

Sobre la idea de que las alteraciones descritas en los mecanismos de señalización celular que controlan la actividad proliferativa de linfoblastos de EA son manifestaciones sistémicas de la enfermedad, en este trabajo hemos realizado un estudio comparativo del efecto de la simvastatina en linfoblastos de pacientes de EA y donantes controles de edad aproximada sobre la actividad proliferativa y la vulnerabilidad celular a la retirada del suero.

La simvastatina inhibe la proliferación celular e induce apoptosis de manera dependiente de la dosis. Las células de EA son más sensibles a la simvastatina que las células controles. Con dosis bajas de simvastatina (1 μ M), se inhibe selectivamente la estimulación exacerbada que induce el suero en los linfoblastos de EA, sin que produzca efectos apreciables en los linfoblastos controles. Curiosamente, los efectos de las estatinas inhibiendo el crecimiento celular son, aparentemente, específicos de células tumorales. Así por ejemplo, concentraciones micromolares de estatinas fueron muy eficaces para inhibir la proliferación de un hepatocarcinoma humano sin afectar significativamente a los hepatocitos normales (Kubota y cols., 2004). De igual manera, las células de un mieloma, fueron más sensibles a la apoptosis inducida por las estatinas que las correspondientes células mieloides no tumorales (van de Donk., 2002). Estas observaciones nos llevan a pensar que la mayor sensibilidad de los linfoblastos de pacientes de EA a la simvastatina pudiera ser una manifestación adicional de carácter neoplásico de estas células, como ya se había sugerido previamente (de las Cuevas y cols., 2005).

La simvastatina inhibe la sobreestimulación de proliferación de linfoblastos de EA atenuando la actividad de proteínas reguladoras del tránsito entre G₁ y S del ciclo celular. Particularmente, disminuye la fosforilación de la proteína pRb, facilitando la activación del factor de transcripción E2F y la expresión de genes necesarios para la progresión del ciclo. Este efecto se debe a la inhibición de la actividad kinasa del complejo ciclina E/CDK2 como consecuencia del acúmulo de las proteínas inhibidoras p21 y p27. Estos resultados están de acuerdo con trabajos de otros autores indicando una asociación entre los efectos antiproliferativos de las estatinas y la acumulación de p21 y p27 en distintos tipos celulares (Efuet y Keyomarsi, 2006; Takeda y cols., 2007). Entre los mecanismos que se han propuesto para explicar el efecto de las estatinas aumentando el contenido celular de p21 y p27, hay que considerar en primer lugar la posibilidad de que la simvastatina inhiba la actividad global del proteasoma como se ha sugerido (Rao y cols., 1999). Las estatinas y los inhibidores clásicos del proteasoma tienen en su estructura química un anillo lactona que es responsable de la inhibición del proteasoma. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en nuestros experimentos se ha utilizado la forma activa de la droga (hidroxiácido) que carece del anillo lactona. Por otra parte, en trabajos previos de nuestro laboratorio, se pudo descartar que las diferencias en los niveles de p21 y p27 que se observan entre los linfoblastos controles y de EA pudieran atribuirse a alteraciones en la actividad global del proteasoma o al proceso de ubiquitinación de proteínas (Muñoz y cols., 2008a, 2008b). No obstante, nuestros resultados indican que la simvastatina inhibe la tasa de degradación de p21 y de p27 en linfoblastos de EA, contribuyendo de esta forma, al menos parcialmente, al acúmulo de estas proteínas. La simvastatina interfiere selectivamente con la degradación de estas proteínas en el proteasoma, ya que los efectos de la droga son similares a los de MG132 y la presencia de un inhibidor de caspasas no impide el efecto de simvastatina.

La degradación de p21 y p27 requiere la fosforilación previa de ciertos residuos (Nakayama y Nakayama, 2006). Al menos, en el caso de p27, este proceso depende de la actividad de PI3K/Akt (Muñoz y cols., 2008a). En consonancia con estas observaciones, hemos podido demostrar que la simvastatina revierte la sobreactivación de PI3K/Akt en los linfoblastos de EA. Nuestros resultados están de acuerdo con trabajos previos que muestran un efecto inhibitor de las estatinas en la actividad de PI3K/Akt tanto en células neuronales (Cerezo-Guisado y cols., 2005) como en células extraneurales (Nakagawa y cols., 1998; Weiss cols., 1999). Sin embargo, también se

han descrito efectos activadores de las estatinas sobre esta vía (Xu y cols., 2008; Sugawara y cols., 2008; Nakao y cols., 2007). Estas discrepancias pueden deberse a los diferentes tipos celulares y funciones biológicas en los que pueden actuar las estatinas.

Nuestros resultados no permiten descartar que la simvastatina pueda también modular la transcripción de p21 y p27. Además, tampoco se puede descartar que la simvastatina pudiese actuar modulando el balance redox de las células de EA, ya que es conocida la sensibilidad de estas proteínas al estado redox celular (Hwang y cols., 2004) y que las estatinas tienen importantes efectos antioxidantes (Franzoni y cols., 2003). Estas posibilidades están siendo consideradas en la actualidad en nuestro laboratorio.

La simvastatina no tiene apenas efectos sobre la supervivencia celular de linfoblastos controles tras la retirada del suero, pero sensibiliza a los linfoblastos de EA a la apoptosis que induce la ausencia de factores tróficos. La administración de simvastatina a linfoblastos de EA restaura la fosforilación de Erk1/2 hasta niveles similares a los de las células controles. Este efecto es impedido en presencia del inhibidor de esta cascada de señalización PD98059.

Los efectos de la simvastatina inhibiendo la proliferación celular e induciendo apoptosis en ausencia de suero en las células de EA están directamente relacionados con su capacidad de inhibir la actividad de HMG-CoA reductasa, ya que la actividad proliferativa se restauró, total o parcialmente, con la administración de MEV, de FPP ó GGPP, respectivamente. Asimismo, en presencia de MEV, la simvastatina induce apoptosis en los linfoblastos de EA en ausencia de suero. Estos resultados sugieren que la prenilación de ciertas proteínas pudiera estar implicada en la sobreestimulación de proliferación y mayor resistencia de los linfoblastos de EA en presencia o ausencia de suero. La prenilación es una modificación post-traducciona que afecta a una gran variedad de proteínas, incluyendo las subunidades de las proteínas G heterotriméricas, proteínas kinasas y las proteínas de la superfamilia Ras de GTPasas (Bishop y Hall, 2000; Repko y Maltese, 1989). Estas últimas, pueden modular tanto la actividad de PIK3/Akt (Anderson y Jackson, 2003) como de Erk1/2 (Denhardt, 1996; Repasky y cols., 2004). El hecho de que la simvastatina no tenga efectos apreciables sobre las células controles sugiere que debe haber otros factores además de la prenilación de alguna de estas proteínas. En este sentido, interesa destacar las numerosas evidencias en la literatura acerca de la interacción de Ca^{2+} /CaM y proteínas de la familia Ras (Moreto y cols., 2008; Ren y cols., 2008) controlando una gran variedad de procesos celulares. Cabe, por tanto, la posibilidad de que la modificación de alguna de estas proteínas, tras

el tratamiento con simvastatina, impida la regulación por $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ de las vías de señalización PI3K/Akt y Erk1/2 que controlan la respuesta proliferativa y la supervivencia/muerte celular de linfoblastos de EA, respectivamente.

Aunque nuestros resultados, obtenidos en células extraneurales no son directamente extrapolables al SNC, los efectos de la simvastatina, regulando el destino celular (supervivencia/muerte) dependiendo de la disponibilidad de factores tróficos, pudieran tener, tal vez, un efecto neuroprotector en el cerebro de los pacientes afectados. La concentración de simvastatina que se requiere para inhibir la actividad proliferativa e inducir apoptosis en linfoblastos de EA ($1\mu\text{M}$), está dentro de las que se han descrito que pueden alcanzarse en plasma en ensayos clínicos para el tratamiento de tumores sólidos (Thibault y cols., 1996). En este caso, tras la administración de la estatina a una dosis de 45 mg/Kg/día se han reportado concentraciones plasmáticas de hasta $3,9\mu\text{M}$. Por otra parte, también hay que considerar que las estatinas lipofílicas, como la simvastatina, pueden atravesar la barrera hematoencefálica con facilidad (Tsuji y cols., 1993).

4-. COMPARACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD PROLIFERATIVA Y VULNERABILIDAD CELULAR EN LINFOBLASTOS DE PACIENTES DE ELA Y DE EA.

En este trabajo hemos realizado un estudio comparativo de la actividad proliferativa y la vulnerabilidad celular a la retirada del suero en linfoblastos de pacientes de ELA y de EA.

En estas dos enfermedades neurodegenerativas se produce una pérdida neuronal que es causa de las manifestaciones irreversibles de la enfermedad. Mientras en la EA las neuronas afectadas se encuentran principalmente en la corteza y en el hipocampo, en la ELA son las motoneuronas superiores e inferiores las principalmente afectadas. Las dos enfermedades comparten características tales como la neuroinflamación, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial.

En los últimos años, ha aumentado la evidencia de que alteraciones en los mecanismos de regulación del ciclo celular pueden jugar un papel relevante en la apoptosis neuronal, no solo en la EA (Arendt y cols., 1996; Giovanni y cols., 1999; Copani y cols., 2001a, 2001b, 2002a, Yang y cols., 2001, Nagy y cols., 1998) sino

también en otras enfermedades neurodegenerativas como la ELA (Cleveland y Rothstein, 2001; Nguyen y cols., 2003; Ranganathan y Bowser, 2003).

Como ya hemos comentado, la re-entrada en ciclo celular por parte de neuronas diferenciadas da lugar a una “catástrofe mitótica” y a muerte celular (Heintz, 1993; Copani y cols., 2001a, 2001b; Herrup y cols., 2004).

Por otra parte, la ELA parece también manifestarse a nivel sistémico (Curti y cols., 1996; Cova y cols., 2006; Butarrelli y cols., 2006). Por estas razones nos pareció interesante estudiar posibles alteraciones en las vías de señalización celular que controlan los procesos de proliferación y apoptosis en linfoblastos de pacientes de ELA de forma comparable a nuestros resultados previos en líneas linfoblásticas de pacientes de EA.

Nuestros resultados indican que los linfoblastos de pacientes de ELA no presentan cambios en la actividad proliferativa en respuesta al suero, ni en la vulnerabilidad celular a la privación del suero cuando se comparan con las células de donantes controles de edad aproximada y difieren, por tanto, de la respuesta proliferativa exacerbada y mayor resistencia a la apoptosis característica de los linfoblastos de EA. En consecuencia, tampoco se observaron cambios entre los linfoblastos de pacientes de ELA y los controles en la actividad de PI3K/Akt y en los niveles celulares de los CDKIs p21 y p27. Estas observaciones en linfoblastos de ELA, difieren de trabajos de otros autores mostrando cambios en el contenido celular de estos CDKIs en motoneuronas afectadas por la ELA (Lim y Qi, 2003; Nguyen y cols., 2003; Appert-Collin y cols., 2006). Por el momento, no podemos determinar si la ausencia de alteraciones en la actividad proliferativa en células periféricas de pacientes refleja la ausencia de cambios en el control del ciclo celular en el SN de los individuos afectados, o por el contrario, la desregulación del ciclo celular que se cree ocurre en las motoneuronas en la ELA (revisado en Cleveland y Rothstein, 2001) no tiene manifestaciones paralelas a nivel sistémico. En este sentido, interesa destacar un trabajo reciente, en que no se encuentran evidencias de estrés oxidativo en fibroblastos de pacientes de ELA (Sala y cols., 2009), a pesar de que el estrés oxidativo es evidente en las motoneuronas afectadas por esta enfermedad (Barber y cols., 2006)

Asimismo, la actividad de Erk1/2 de los linfoblastos de ELA es similar a la de los linfoblastos controles y significativamente menor que la que muestran los linfoblastos de EA. En conjunto, estos resultados indican que las líneas linfoblásticas de pacientes

de ELA no constituyen un modelo adecuado para elucidar si existe una relación causa-efecto entre desregulación del ciclo celular y muerte neuronal en la ELA.

Por otro lado, la observación de que la actividad proliferativa y apoptótica y su regulación a nivel molecular estén selectivamente alteradas en linfoblastos de pacientes de EA, refuerza la idea de que la EA es una enfermedad sistémica desvelando como factor etiopatogénico una alteración de la respuesta celular a determinados estímulos.

Este estudio nos ha permitido también observar que las alteraciones en la respuesta celular al suero no dependen de la progresión de la EA y ya aparecen en los individuos con EA leve. Estos resultados están en consonancia con trabajos realizados en modelos murinos (Yang y cols., 2006; Yang y Herrup, 2007) que indican que las alteraciones en el control del ciclo celular aparecen muy pronto en el curso de la enfermedad, antes de la aparición de las placas de amiloide o de signos de neuroinflamación. Además, se han encontrado evidencias de expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular en necropsias de individuos diagnosticados de DCL (Yang y cols., 2003) y alteraciones en la proliferación de linfocitos con DCL (Nagy y cols., 2002). Estas observaciones sugieren que las alteraciones en el ciclo celular, que eventualmente causan pérdida neuronal, son un mecanismo importante en la EA, y por los cambios en alguna de las proteínas reguladoras, podrían ser considerados biomarcadores de la enfermedad.

Conclusiones

1. Los linfocitos inmortalizados de pacientes de EA muestran una respuesta anómala al suero: una mayor actividad proliferativa en presencia de suero y mayor resistencia a la muerte celular en ausencia de suero. Esta respuesta singular es consecuencia de cambios significativos, en función de la disponibilidad de factores tróficos, en la activación de las vías de señalización PI3K/Akt y Erk1/2 debido a un aumento en los niveles y/o actividad de CaM.
2. La perturbación de las interacciones moleculares entre Ca^{2+} /CaM y PI3K/Akt parece ser responsable de las alteraciones en los procesos de proliferación y regulación del contenido celular de p27 en linfoblastos de pacientes con EA.
3. La modulación de la actividad de Erk1/2 por CaM está implicada en la resistencia celular a la apoptosis en ausencia de suero. Esta conclusión se apoya en las siguientes evidencias experimentales:
 - La inhibición de la actividad Erk1/2 en células controles previene la muerte celular.
 - La expresión ectópica de una mutante constitutivamente activa de MEK en células de EA no impide la apoptosis inducida por la privación de suero.
 - Los linfoblastos controles muestran una activación persistente y de mayor intensidad que la de los linfoblastos de EA en respuesta a la privación del suero.
 - Los antagonistas de CaM sensibilizan a las células de EA a la retirada del suero y aumentan la actividad de Erk1/2.
4. El tratamiento de linfoblastos de EA con simvastatina, previene el aumento de proliferación y la activación de PI3K/Akt, así como la disminución de p21 y p27, inducidos por el suero.

5. Los efectos de simvastatina son independientes metabolismo de colesterol, ya que son revertidos tras la adición de mevalonato o isoprenoides, pero no por esqualeno.
6. Aunque nuestros resultados no se pueden extrapolar directamente al SNC, es posible que parte de los efectos beneficiosos de las estatinas para los pacientes de EA pudieran explicarse por la actividad antiproliferativa de simvastatina. La simvastatina podría impedir la progresión de las neuronas que hayan iniciado un ciclo aberrante de división celular.
7. Las alteraciones en las vías de señalización PI3K/Akt y Erk1/2, así como los cambios en los niveles de proteínas reguladoras del ciclo celular no se observan en otra enfermedad neurodegenerativa como la ELA. Estos resultados sugieren la posible utilidad de alguna de estas proteínas como biomarcadores de la EA.
8. Nuestros resultados, obtenidos en células periféricas de pacientes de EA, disfunción de las vías de señalización PI3K/Akt, Erk1/2 y cambios en la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular, son similares a los descritos en neuronas vulnerables del cerebro de pacientes de EA y, por tanto, pueden ser considerados como manifestaciones sistémicas de la enfermedad.
9. Por último, hay que destacar que la inmortalización de linfocitos para generar líneas linfoblastoides no modifica la respuesta celular normal a la presencia o ausencia de suero. Los linfocitos no transformados de pacientes de EA muestran también una mayor respuesta mitogénica y resistencia a la apoptosis, así como alteraciones en la activación de PI3K/Akt y Erk1/2. Estas observaciones apoyan la utilización de linfoblastos como modelo experimental adecuado para el estudio de perturbaciones funcionales relevantes para la patología de alzhéimer.

Bibliografía

- Adunsky A, Baram D, Hershkowitz M, Mekori YA (1991) Increased cytosolic free calcium in lymphocytes of Alzheimer patients. *J Neuroimmunol* 33:167-172.
- Agell N, Jaumot M, Rodriguez-Vilarrupla A, Brun S, Abella N, Canela N, Estanyol JM, Bachs O (2006) The diverging roles of calmodulin and PKC in the regulation of p21 intracellular localization. *Cell Cycle* 5:3-6.
- Aisen PS, Saumier D, Briand R, Laurin J, Gervais F, Tremblay P, Garceau D (2006) A Phase II study targeting amyloid-beta with 3APS in mild-to-moderate Alzheimer disease. *Neurology* 67:1757-1763.
- Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strohmeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T (2000) Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21:383-421.
- Alvarez A, Toro R, Caceres A, Maccioni RB (1999) Inhibition of tau phosphorylating protein kinase cdk5 prevents beta-amyloid-induced neuronal death. *FEBS Lett* 459:421-426.
- Alvarez XA, Franco A, Fernandez-Novoa L, Cacabelos R (1996) Blood levels of histamine, IL-1 beta, and TNF-alpha in patients with mild to moderate Alzheimer disease. *Mol Chem Neuropathol* 29:237-252.
- Alzheimer A (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Zeitschr Psychiatr* 64:146-148.
- Andersen JK (2004) Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med* 10 Suppl:S18-25.
- Anderson KE, Jackson SP (2003) Class I phosphoinositide 3-kinases. *Int J Biochem Cell Biol* 35:1028-1033.
- Anthony RS, McKelvie ND, Cunningham AJ, Craig JI, Rogers SY, Parker AC (1998) Flow cytometry using annexin V can detect early apoptosis in peripheral blood stem cell harvests from patients with leukaemia and lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 21:441-446.
- Appert-Collin A, Hugel B, Levy R, Niederhoffer N, Coupin G, Lombard Y, Andre P, Poindron P, Gies JP (2006) Cyclin dependent kinase inhibitors prevent apoptosis of postmitotic mouse motoneurons. *Life Sci* 79:484-490.
- Arendt T (2003) Synaptic plasticity and cell cycle activation in neurons are alternative effector pathways: the 'Dr. Jekyll and Mr. Hyde concept' of Alzheimer's disease or the yin and yang of neuroplasticity. *Prog Neurobiol* 71:83-248.
- Arendt T, Holzer M, Gartner U (1998) Neuronal expression of cyclin dependent kinase inhibitors of the INK4 family in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 105:949-960.
- Arendt T, Rodel L, Gartner U, Holzer M (1996) Expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 7:3047-3049.
- Armstrong RA (2006) Plaques and tangles and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol* 44:1-11.
- Arundine M, Tymianski M (2003) Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 34:325-337.

- Athyros VG, Kakafika AI, Papageorgiou AA, Paraskevas KI, Tziomalos K, Anagnostis P, Pagourelis E, Koumaras C, Karagiannis A, Mikhailidis DP (2008) Effects of statin treatment in men and women with stable coronary heart disease: a subgroup analysis of the GREACE Study. *Curr Med Res Opin* 24:1593-1599.
- Atwood CS, Obrenovich ME, Liu T, Chan H, Perry G, Smith MA, Martins RN (2003) Amyloid-beta: a chameleon walking in two worlds: a review of the trophic and toxic properties of amyloid-beta. *Brain Res Brain Res Rev* 43:1-16.
- Avila C, Parcet MA, Barros A, Forn C, Mallol R, Gonzalez Darder JM, Feliu Tatay R, Martinez Lozano MD, Campos Hernandez S (2004) [Memory evaluation using functional magnetic resonance: applications in preoperative patients and in Alzheimer s disease]. *Rev Neurol* 38:284-291.
- Ayala-Grosso C, Ng G, Roy S, Robertson GS (2002) Caspase-cleaved amyloid precursor protein in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 12:430-441.
- Bachurin S, Bukatina E, Lermontova N, Tkachenko S, Afanasiev A, Grigoriev V, Grigorieva I, Ivanov Y, Sablin S, Zefirov N (2001) Antihistamine agent Dimebon as a novel neuroprotector and a cognition enhancer. *Ann N Y Acad Sci* 939:425-435.
- Bacskai BJ, Klunk WE, Mathis CA, Hyman BT (2002) Imaging amyloid-beta deposits in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:1035-1041.
- Bailey P (2007) Biological markers in Alzheimer's disease. *Can J Neurol Sci* 34 Suppl 1:S72-76.
- Barber SC, Mead RJ, Shaw PJ (2006) Oxidative stress in ALS: a mechanism of neurodegeneration and a therapeutic target. *Biochim Biophys Acta* 1762:1051-1067.
- Barnham KJ, Masters CL, Bush AI (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov* 3:205-214.
- Bartolome F, de Las Cuevas N, Munoz U, Bermejo F, Martin-Requero A (2007) Impaired apoptosis in lymphoblasts from Alzheimer's disease patients: cross-talk of Ca²⁺/calmodulin and ERK1/2 signaling pathways. *Cell Mol Life Sci* 64:1437-1448.
- Bartolome F, Munoz U, Esteras N, Esteban J, Bermejo-Pareja F, Martin-Requero A (2009) Distinct regulation of cell cycle and survival in lymphocytes from patients with Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *Int J Clin Exp Pathol* 2:390-398.
- Baughn LB, Di Liberto M, Wu K, Toogood PL, Louie T, Gottschalk R, Niesvizky R, Cho H, Ely S, Moore MA, Chen-Kiang S (2006) A novel orally active small molecule potently induces G1 arrest in primary myeloma cells and prevents tumor growth by specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6. *Cancer Res* 66:7661-7667.
- Bayer TA, Wirths O, Majtenyi K, Hartmann T, Multhaup G, Beyreuther K, Czech C (2001) Key factors in Alzheimer's disease: beta-amyloid precursor protein processing, metabolism and intraneuronal transport. *Brain Pathol* 11:1-11.
- Beesley AH, Palmer ML, Ford J, Weller RE, Cummings AJ, Freitas JR, Firth MJ, Perera KU, de Klerk NH, Kees UR (2006) Authenticity and drug resistance in a panel of acute lymphoblastic leukaemia cell lines. *Br J Cancer* 95:1537-1544.
- Begni B, Brighina L, Sirtori E, Fumagalli L, Andreoni S, Beretta S, Oster T, Malaplate-Armand C, Isella V, Appollonio I, Ferrarese C (2004) Oxidative stress impairs glutamate uptake in fibroblasts from patients with Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 37:892-901.
- Behl C (2000) Apoptosis and Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 107:1325-1344.

- Bellucci C, Lilli C, Baroni T, Parnetti L, Sorbi S, Emiliani C, Lumare E, Calabresi P, Balloni S, Bodo M (2007) Differences in extracellular matrix production and basic fibroblast growth factor response in skin fibroblasts from sporadic and familial Alzheimer's disease. *Mol Med* 13:542-550.
- Bentahir M, Nyabi O, Verhamme J, Tolia A, Horre K, Wiltfang J, Esselmann H, De Strooper B (2006) Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms. *J Neurochem* 96:732-742.
- Berchtold MW, Egli R, Rhyner JA, Hameister H, Strehler EE (1993) Localization of the human bona fide calmodulin genes CALM1, CALM2, and CALM3 to chromosomes 14q24-q31, 2p21.1-p21.3, and 19q13.2-q13.3. *Genomics* 16:461-465.
- Bermejo P, Martin-Aragon S, Benedi J, Susin C, Felici E, Gil P, Ribera JM, Villar AM (2008) Differences of peripheral inflammatory markers between mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Immunol Lett* 117:198-202.
- Besson A, Dowdy SF, Roberts JM (2008) CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell* 14:159-169.
- Besson A, Gurian-West M, Chen X, Kelly-Spratt KS, Kemp CJ, Roberts JM (2006) A pathway in quiescent cells that controls p27Kip1 stability, subcellular localization, and tumor suppression. *Genes Dev* 20:47-64.
- Bhagavan S, Ibarreta D, Ma D, Kozikowski AP, Etcheberrigaray R (1998) Restoration of TEA-induced calcium responses in fibroblasts from Alzheimer's disease patients by a PKC activator. *Neurobiol Dis* 5:177-187.
- Bishop AL, Hall A (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 348 Pt 2:241-255.
- Blagosklonny MV, Wu GS, Omura S, El-Deiry WS (1996) Proteasome-Dependent Regulation of p21WAF1/CIP1 Expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 227:564-569.
- Blain JF, Poirier J (2004) Cholesterol homeostasis and the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother* 4:823-829.
- Blalock EM, Chen KC, Stromberg AJ, Norris CM, Kadish I, Kraner SD, Porter NM, Landfield PW (2005) Harnessing the power of gene microarrays for the study of brain aging and Alzheimer's disease: statistical reliability and functional correlation. *Ageing Res Rev* 4:481-512.
- Blasko I, Jellinger K, Kemmler G, Krampla W, Jungwirth S, Wichart I, Tragl KH, Fischer P (2008) Conversion from cognitive health to mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: prediction by plasma amyloid beta 42, medial temporal lobe atrophy and homocysteine. *Neurobiol Aging* 29:1-11.
- Blessed G, Tomlinson BE, Roth M (1968) The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects. *Br J Psychiatry* 114:797-811.
- Bodovitz S, Klein WL (1996) Cholesterol modulates alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 271:4436-4440.
- Boland B, Campbell V (2004) Abeta-mediated activation of the apoptotic cascade in cultured cortical neurones: a role for cathepsin-L. *Neurobiol Aging* 25:83-91.
- Bondy B, Klages U, Muller-Spahn F, Hock C (1994) Cytosolic free [Ca²⁺] in mononuclear blood cells from demented patients and healthy controls. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 243:224-228.

- Bondy B, Hofmann M, Muller-Spahn F, Witzko M, Hock C (1996) The PHA-induced calcium signal in lymphocytes is altered after blockade of K(+)-channels in Alzheimer's disease. *J Psychiatr Res* 30:217-227.
- Bongioanni P, Mondino C, Boccardi B, Borgna M, Castagna M (1996) Monoamine oxidase molecular activity in platelets of parkinsonian and demented patients. *Neurodegeneration* 5:351-357.
- Bonotis K, Krikki E, Holeva V, Aggouridaki C, Costa V, Baloyannis S (2008) Systemic immune aberrations in Alzheimer's disease patients. *J Neuroimmunol* 193:183-187.
- Borroni B, Colciaghi F, Caltagirone C, Rozzini L, Broglio L, Cattabeni F, Di Luca M, Padovani A (2003) Platelet amyloid precursor protein abnormalities in mild cognitive impairment predict conversion to dementia of Alzheimer type: a 2-year follow-up study. *Arch Neurol* 60:1740-1744.
- Borroni B, Volpi R, Martini G, Del Bono R, Archetti S, Colciaghi F, Akkawi NM, Di Luca M, Romanelli G, Caimi L, Padovani A (2002a) Peripheral blood abnormalities in Alzheimer disease: evidence for early endothelial dysfunction. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 16:150-155.
- Borroni B, Colciaghi F, Corsini P, Akkawi N, Rozzini L, Del Zotto E, Talarico G, Cattabeni F, Lenzi GL, Di Luca M, Padovani A (2002b) Early stages of probable Alzheimer disease are associated with changes in platelet amyloid precursor protein forms. *Neurol Sci* 23:207-210.
- Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82:239-259.
- Braak H, Braak E (1996) Evolution of the neuropathology of Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand Suppl* 165:3-12.
- Bradley WG, Polinsky RJ, Pendlebury WW, Jones SK, Nee LE, Bartlett JD, Hartshorn JN, Tandan R, Sweet L, Magin GK, et al. (1989) DNA repair deficiency for alkylation damage in cells from Alzheimer's disease patients. *Prog Clin Biol Res* 317:715-732.
- Brazil DP, Park J, Hemmings BA (2002) PKB binding proteins. Getting in on the Akt. *Cell* 111:293-303.
- Breitner JC (2003) NSAIDs and Alzheimer's disease: how far to generalise from trials? *Lancet Neurol* 2:527.
- Brookmeyer R, Gray S, Kawas C (1998) Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset. *Am J Public Health* 88:1337-1342.
- Brunk UT, Terman A (2002) The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur J Biochem* 269:1996-2002.
- Brzyska M, Elbaum D (2003) Dysregulation of calcium in Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 63:171-183.
- Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR (2000) Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 33:95-130.
- Busser J, Geldmacher DS, Herrup K (1998) Ectopic cell cycle proteins predict the sites of neuronal cell death in Alzheimer's disease brain. *J Neurosci* 18:2801-2807.

- Buttarelli FR, Circella A, Pellicano C, Pontieri FE (2006) Dopamine transporter immunoreactivity in peripheral blood mononuclear cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurol* 13:416-418.
- Cacquevel M, Lebourrier N, Cheenne S, Vivien D (2004) Cytokines in neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Curr Drug Targets* 5:529-534.
- Camins A, Pallas M, Silvestre JS (2008) Apoptotic mechanisms involved in neurodegenerative diseases: experimental and therapeutic approaches. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 30:43-65.
- Candore G, Balistreri CR, Grimaldi MP, Vasto S, Listi F, Chiappelli M, Licastro F, Lio D, Caruso C (2006) Age-related inflammatory diseases: role of genetics and gender in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1089:472-486.
- Candore G, Balistreri CR, Grimaldi MP, Listi F, Vasto S, Chiappelli M, Licastro F, Colonna-Romano G, Lio D, Caruso C (2007) Polymorphisms of pro-inflammatory genes and Alzheimer's disease risk: a pharmacogenomic approach. *Mech Ageing Dev* 128:67-75.
- Caragounis A, Du T, Filiz G, Laughton KM, Volitakis I, Sharples RA, Cherny RA, Masters CL, Drew SC, Hill AF, Li QX, Crouch PJ, Barnham KJ, White AR (2007) Differential modulation of Alzheimer's disease amyloid beta-peptide accumulation by diverse classes of metal ligands. *Biochem J* 407:435-450.
- Casoli T, Di Stefano G, Giorgetti B, Baliotti M, Recchioni R, Moroni F, Marcheselli F, Bernardini G, Fattoretti P, Bertoni-Freddari C (2008) Platelet as a physiological model to investigate apoptotic mechanisms in Alzheimer beta-amyloid peptide production. *Mech Ageing Dev* 129:154-162.
- Castegna A, Aksenov M, Thongboonkerd V, Klein JB, Pierce WM, Booze R, Markesbery WR, Butterfield DA (2002a) Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part II: dihydropyrimidinase-related protein 2, alpha-enolase and heat shock cognate 71. *J Neurochem* 82:1524-1532.
- Castegna A, Aksenov M, Aksenova M, Thongboonkerd V, Klein JB, Pierce WM, Booze R, Markesbery WR, Butterfield DA (2002b) Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part I: creatine kinase BB, glutamine synthase, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L-1. *Free Radic Biol Med* 33:562-571.
- Castellani R, Hirai K, Aliev G, Drew KL, Nunomura A, Takeda A, Cash AD, Obrenovich ME, Perry G, Smith MA (2002) Role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 70:357-360.
- Castellani RJ, Honda K, Zhu X, Cash AD, Nunomura A, Perry G, Smith MA (2004) Contribution of redox-active iron and copper to oxidative damage in Alzheimer disease. *Ageing Res Rev* 3:319-326.
- Castri P, Iacovelli L, De Blasi A, Giubilei F, Moretti A, Capone FT, Nicoletti F, Orzi F (2007) Reduced insulin-induced phosphatidylinositol-3-kinase activation in peripheral blood mononuclear leucocytes from patients with Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci* 26:2469-2472.
- Cataldo AM, Mathews PM, Boiteau AB, Hassinger LC, Peterhoff CM, Jiang Y, Mullaney K, Neve RL, Gruenberg J, Nixon RA (2008) Down syndrome fibroblast model of Alzheimer-related endosome pathology: accelerated endocytosis promotes late endocytic defects. *Am J Pathol* 173:370-384.
- Cattabeni F, Colciaghi F, Di Luca M (2004) Platelets provide human tissue to unravel pathogenic mechanisms of Alzheimer disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28:763-770.

- Caughey B, Lansbury PT (2003) Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci* 26:267-298.
- Cazzaniga E, Bulbarelli A, Lonati E, Re F, Galimberti G, Gatti E, Pitto M, Ferrarese C, Masserini M (2008) Enhanced folate binding of cultured fibroblasts from Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett* 436:317-320.
- Cecchi C, Latorraca S, Sorbi S, Iantomasi T, Favilli F, Vincenzini MT, Liguri G (1999) Glutathione level is altered in lymphoblasts from patients with familial Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 275:152-154.
- Cecchi C, Fiorillo C, Sorbi S, Latorraca S, Nacmias B, Bagnoli S, Nassi P, Liguri G (2002) Oxidative stress and reduced antioxidant defenses in peripheral cells from familial Alzheimer's patients. *Free Radic Biol Med* 33:1372-1379.
- Cenini G, Sultana R, Memo M, Butterfield DA (2008) Elevated levels of pro-apoptotic p53 and its oxidative modification by the lipid peroxidation product, HNE, in brain from subjects with amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* 12:987-994.
- Cerezo-Guisado MI, Garcia-Marin LJ, Lorenzo MJ, Bragado MJ (2005) Lovastatin inhibits the growth and survival pathway of phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B in immortalized rat brain neuroblasts. *J Neurochem* 94:1277-1287.
- Chaffer CL, Thomas DM, Thompson EW, Williams ED (2006) PPARgamma-independent induction of growth arrest and apoptosis in prostate and bladder carcinoma. *BMC Cancer* 6:53.
- Chafouleas JG, Bolton WE, Hidaka H, Boyd AE, 3rd, Means AR (1982) Calmodulin and the cell cycle: involvement in regulation of cell-cycle progression. *Cell* 28:41-50.
- Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins JR (1991) The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* 65:1053-1061.
- Chen KS, Masliah E, Grajeda H, Guido T, Huang J, Khan K, Motter R, Soriano F, Games D (1998) Neurodegenerative Alzheimer-like pathology in PDAPP 717V-->F transgenic mice. *Prog Brain Res* 117:327-334.
- Chen YX, Zhang XR, Xie WF, Li S (2004) Effects of taurine on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells in vitro. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 3:106-109.
- Cheng A, Wang S, Yang D, Xiao R, Mattson MP (2003) Calmodulin mediates brain-derived neurotrophic factor cell survival signaling upstream of Akt kinase in embryonic neocortical neurons. *J Biol Chem* 278:7591-7599.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- Chui HC, Tierney M, Zarow C, Lewis A, Sobel E, Perlmutter LS (1993) Neuropathologic diagnosis of Alzheimer disease: interrater reliability in the assessment of senile plaques and neurofibrillary tangles. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 7:48-54.
- Ciccocioppo F, Lanuti P, Marchisio M, Gambi F, Santavenere E, Pierdomenico L, Bascelli A, Velluto L, Gambi D, Miscia S (2008) Expression and phosphorylation of protein kinase C isoforms in Aβ(1-42) activated T lymphocytes from Alzheimer's disease. *Int J Immunopathol Pharmacol* 21:23-33.
- Cimino M, Balduini W, Carloni S, Gelosa P, Guerrini U, Tremoli E, Sironi L (2005) Neuroprotective effect of simvastatin in stroke: a comparison between adult and neonatal rat models of cerebral ischemia. *Neurotoxicology* 26:929-933.

- Clarke AR, Maandag ER, van Roon M, van der Lugt NM, van der Valk M, Hooper ML, Berns A, te Riele H (1992) Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development. *Nature* 359:328-330.
- Claycomb JM, Orr-Weaver TL (2005) Developmental gene amplification: insights into DNA replication and gene expression. *Trends Genet* 21:149-162.
- Cleveland DW, Rothstein JD (2001) From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci* 2:806-819.
- Cohen LH, van Leeuwen RE, van Thiel GC, van Pelt JF, Yap SH (2000) Equally potent inhibitors of cholesterol synthesis in human hepatocytes have distinguishable effects on different cytochrome P450 enzymes. *Biopharm Drug Dispos* 21:353-364.
- Colangelo V, Schurr J, Ball MJ, Pelaez RP, Bazan NG, Lukiw WJ (2002) Gene expression profiling of 12633 genes in Alzheimer hippocampal CA1: transcription and neurotrophic factor down-regulation and up-regulation of apoptotic and pro-inflammatory signaling. *J Neurosci Res* 70:462-473.
- Connor MK, Kotchetkov R, Cariou S, Resch A, Lupetti R, Beniston RG, Melchior F, Hengst L, Slingerland JM (2003) CRM1/Ran-mediated nuclear export of p27(Kip1) involves a nuclear export signal and links p27 export and proteolysis. *Mol Biol Cell* 14:201-213.
- Copani A, Sortino MA, Nicoletti F, Giuffrida SA (2002a) Alzheimer's disease research enters a "new cycle": how significant? *Neurochem Res* 27:173-176.
- Copani A, Condorelli F, Canonico PL, Nicoletti F, Sortino MA (2001a) Cell cycle progression towards Alzheimer's disease. *Funct Neurol* 16:11-15.
- Copani A, Uberti D, Sortino MA, Bruno V, Nicoletti F, Memo M (2001b) Activation of cell-cycle-associated proteins in neuronal death: a mandatory or dispensable path? *Trends Neurosci* 24:25-31.
- Copani A, Guccione S, Giurato L, Caraci F, Calafiore M, Sortino MA, Nicoletti F (2008) The cell cycle molecules behind neurodegeneration in Alzheimer's disease: perspectives for drug development. *Curr Med Chem* 15:2420-2432.
- Copani A, Sortino MA, Caricasole A, Chiechio S, Chisari M, Battaglia G, Giuffrida-Stella AM, Vancheri C, Nicoletti F (2002b) Erratic expression of DNA polymerases by beta-amyloid causes neuronal death. *Faseb J* 16:2006-2008.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261:921-923.
- Correas I, Diaz-Nido J, Avila J (1992) Microtubule-associated protein tau is phosphorylated by protein kinase C on its tubulin binding domain. *J Biol Chem* 267:15721-15728.
- Coticchia CM, Revankar CM, Deb TB, Dickson RB, Johnson MD (2008) Calmodulin modulates Akt activity in human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat*.
- Cotman CW, Poon WW, Rissman RA, Blurton-Jones M (2005) The role of caspase cleavage of tau in Alzheimer disease neuropathology. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:104-112.
- Cova E, Cereda C, Galli A, Curti D, Finotti C, Di Poto C, Corato M, Mazzini G, Ceroni M (2006) Modified expression of Bcl-2 and SOD1 proteins in lymphocytes from sporadic ALS patients. *Neurosci Lett* 399:186-190.
- Cribbs DH, Poon WW, Rissman RA, Blurton-Jones M (2004) Caspase-mediated degeneration in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 165:353-355.
- Cross TG, Scheel-Toellner D, Henriquez NV, Deacon E, Salmon M, Lord JM (2000) Serine/threonine protein kinases and apoptosis. *Exp Cell Res* 256:34-41.

- Crouch PJ, Harding SM, White AR, Camakaris J, Bush AI, Masters CL (2008) Mechanisms of A beta mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 40:181-198.
- Cryns V, Yuan J (1998) Proteases to die for. *Genes Dev* 12:1551-1570.
- Curti D, Malaspina A, Facchetti G, Camana C, Mazzini L, Tosca P, Zerbi F, Ceroni M (1996) Amyotrophic lateral sclerosis: oxidative energy metabolism and calcium homeostasis in peripheral blood lymphocytes. *Neurology* 47:1060-1064.
- Danesh FR, Kanwar YS (2004) Modulatory effects of HMG-CoA reductase inhibitors in diabetic microangiopathy. *Faseb J* 18:805-815.
- Danesh FR, Anel RL, Zeng L, Lomasney J, Sahai A, Kanwar YS (2003) Immunomodulatory effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 51:139-148.
- Danesh FR, Sadeghi MM, Amro N, Philips C, Zeng L, Lin S, Sahai A, Kanwar YS (2002) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors prevent high glucose-induced proliferation of mesangial cells via modulation of Rho GTPase/ p21 signaling pathway: Implications for diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8301-8305.
- Dash BC, El-Deiry WS (2005) Phosphorylation of p21 in G2/M promotes cyclin B-Cdc2 kinase activity. *Mol Cell Biol* 25:3364-3387.
- Davidson MH (2001) Statin trials in progress: unanswered questions. *Curr Atheroscler Rep* 3:9-13.
- Davies P, Maloney AJ (1976) Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 2:1403.
- Dbaibo GS, Pushkareva MY, Jayadev S, Schwarz JK, Horowitz JM, Obeid LM, Hannun YA (1995) Retinoblastoma gene product as a downstream target for a ceramide-dependent pathway of growth arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1347-1351.
- de las Cuevas N, Munoz U, Hermida OG, Martin-Requero A (2005) Altered transcriptional regulators in response to serum in immortalized lymphocytes from Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging* 26:615-624.
- de las Cuevas N, Urcelay E, Hermida OG, Saiz-Diaz RA, Bermejo F, Ayuso MS, Martin-Requero A (2003) Ca²⁺/calmodulin-dependent modulation of cell cycle elements pRb and p27kip1 involved in the enhanced proliferation of lymphoblasts from patients with Alzheimer dementia. *Neurobiol Dis* 13:254-263.
- de Lustig ES, Kohan S, Famulari AL, Dominguez RO, Serra JA (1994) Peripheral markers and diagnostic criteria in Alzheimer's disease: critical evaluations. *Rev Neurosci* 5:213-225.
- Deane R, Zlokovic BV (2007) Role of the blood-brain barrier in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 4:191-197.
- Deane R, Wu Z, Zlokovic BV (2004) RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates alzheimer amyloid beta-peptide clearance through transport across the blood-brain barrier. *Stroke* 35:2628-2631.
- Deane R, Du Yan S, Subramanian RK, LaRue B, Jovanovic S, Hogg E, Welch D, Manness L, Lin C, Yu J, Zhu H, Ghiso J, Frangione B, Stern A, Schmidt AM, Armstrong DL, Arnold B, Liliensiek B, Nawroth P, Hofman F, Kindy M, Stern D, Zlokovic B (2003) RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med* 9:907-913.
- Deb TB, Coticchia CM, Dickson RB (2004) Calmodulin-mediated activation of Akt regulates survival of c-Myc-overexpressing mouse mammary carcinoma cells. *J Biol Chem* 279:38903-38911.

- Dedeoglu A, Cormier K, Payton S, Tseitlin KA, Kremesky JN, Lai L, Li X, Moir RD, Tanzi RE, Bush AI, Kowall NW, Rogers JT, Huang X (2004) Preliminary studies of a novel bifunctional metal chelator targeting Alzheimer's amyloidogenesis. *Exp Gerontol* 39:1641-1649.
- DeKosky ST (2002) [Neurobiology and molecular biology of Alzheimer's disease]. *Rev Neurol* 35:752-760.
- Del Bo R, Angeretti N, Lucca E, De Simoni MG, Forloni G (1995) Reciprocal control of inflammatory cytokines, IL-1 and IL-6, and beta-amyloid production in cultures. *Neurosci Lett* 188:70-74.
- Delacourte A (2005) Tauopathies: recent insights into old diseases. *Folia Neuropathol* 43:244-257.
- Demidenko ZN, Blagosklonny MV (2004) Flavopiridol induces p53 via initial inhibition of Mdm2 and p21 and, independently of p53, sensitizes apoptosis-reluctant cells to tumor necrosis factor. *Cancer Res* 64:3653-3660.
- Denhardt DT (1996) Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling. *Biochem J* 318 (Pt 3):729-747.
- Derkinderen P, Enslin H, Girault JA (1999) The ERK/MAP-kinases cascade in the nervous system. *Neuroreport* 10:R24-34.
- Dhitavat S, Ortiz D, Shea TB, Rivera ER (2002) Acetyl-L-carnitine protects against amyloid-beta neurotoxicity: roles of oxidative buffering and ATP levels. *Neurochem Res* 27:501-505.
- Di Giovanni S, Movsesyan V, Ahmed F, Cernak I, Schinelli S, Stoica B, Faden AI (2005) Cell cycle inhibition provides neuroprotection and reduces glial proliferation and scar formation after traumatic brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:8333-8338.
- Dick LR, Cruikshank AA, Destree AT, Grenier L, McCormack TA, Melandri FD, Nunes SL, Palombella VJ, Parent LA, Plamondon L, Stein RL (1997) Mechanistic studies on the inactivation of the proteasome by lactacystin in cultured cells. *J Biol Chem* 272:182-188.
- Dietschy JM, Turley SD (2001) Cholesterol metabolism in the brain. *Curr Opin Lipidol* 12:105-112.
- Ding Q, Keller JN (2003) Does proteasome inhibition play a role in mediating neuropathology and neuron death in Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis* 5:241-245.
- Dodel RC, Du Y, Depboylu C, Hampel H, Frolich L, Haag A, Hemmeter U, Paulsen S, Teipel SJ, Brettschneider S, Spottke A, Nolker C, Moller HJ, Wei X, Farlow M, Sommer N, Oertel WH (2004) Intravenous immunoglobulins containing antibodies against beta-amyloid for the treatment of Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75:1472-1474.
- Donahue JE, Flaherty SL, Johanson CE, Duncan JA, 3rd, Silverberg GD, Miller MC, Tavares R, Yang W, Wu Q, Sabo E, Hovanesian V, Stopa EG (2006) RAGE, LRP-1, and amyloid-beta protein in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 112:405-415.
- Downes CP, Gray A, Lucocq JM (2005) Probing phosphoinositide functions in signaling and membrane trafficking. *Trends Cell Biol* 15:259-268.
- Drachman DA (2006) Aging of the brain, entropy, and Alzheimer disease. *Neurology* 67:1340-1352.
- Drewes G, Lichtenberg-Kraag B, Doring F, Mandelkow EM, Biernat J, Goris J, Doree M, Mandelkow E (1992) Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. *Embo J* 11:2131-2138.

- Drexler HG, MacLeod RA, Uphoff CC (1999) Leukemia cell lines: in vitro models for the study of Philadelphia chromosome-positive leukemia. *Leuk Res* 23:207-215.
- Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR (1995) A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7686-7689.
- Eckert A, Hartmann H, Forstl H, Muller WE (1994) Alterations of intracellular calcium regulation during aging and Alzheimer's disease in nonneuronal cells. *Life Sci* 55:2019-2029.
- Eckert A, Forstl H, Zerfass R, Hartmann H, Muller WE (1996) Lymphocytes and neutrophils as peripheral models to study the effect of beta-amyloid on cellular calcium signalling in Alzheimer's disease. *Life Sci* 59:499-510.
- Eckert A, Steiner B, Marques C, Leutz S, Romig H, Haass C, Muller WE (2001a) Elevated vulnerability to oxidative stress-induced cell death and activation of caspase-3 by the Swedish amyloid precursor protein mutation. *J Neurosci Res* 64:183-192.
- Eckert A, Schindowski K, Leutner S, Luckhaus C, Touchet N, Czech C, Muller WE (2001b) Alzheimer's disease-like alterations in peripheral cells from presenilin-1 transgenic mice. *Neurobiol Dis* 8:331-342.
- Eckert A, Keil U, Marques CA, Bonert A, Frey C, Schussel K, Muller WE (2003) Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol* 66:1627-1634.
- Eckman EA, Adams SK, Troendle FJ, Stodola BA, Kahn MA, Fauq AH, Xiao HD, Bernstein KE, Eckman CB (2006) Regulation of steady-state beta-amyloid levels in the brain by neprilysin and endothelin-converting enzyme but not angiotensin-converting enzyme. *J Biol Chem* 281:30471-30478.
- Efuet ET, Keyomarsi K (2006) Farnesyl and geranylgeranyl transferase inhibitors induce G1 arrest by targeting the proteasome. *Cancer Res* 66:1040-1051.
- Egea J, Espinet C, Soler RM, Dolcet X, Yuste VJ, Encinas M, Iglesias M, Rocamora N, Comella JX (2001) Neuronal survival induced by neurotrophins requires calmodulin. *J Cell Biol* 154:585-597.
- Eikelenboom P, Stam FC (1982) Immunoglobulins and complement factors in senile plaques. An immunoperoxidase study. *Acta Neuropathol* 57:239-242.
- el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75:817-825.
- Ellison D, Love S (2004) Dementias. *Neuropathology: A reference text of CNS Pathology* Edinburgh, UK: Mosby:551-584.
- Emre M, Cummings JL, Lane RM (2007) Rivastigmine in dementia associated with Parkinson's disease and Alzheimer's disease: similarities and differences. *J Alzheimers Dis* 11:509-519.
- Etcheberrigaray R, Ibarreta D (2001) [Ionic channels and second messenger alterations in Alzheimer's disease. Relevance of studies in nonneuronal cells]. *Rev Neurol* 33:740-749.
- Etcheberrigaray R, Ito E, Kim CS, Alkon DL (1994) Soluble beta-amyloid induction of Alzheimer's phenotype for human fibroblast K⁺ channels. *Science* 264:276-279.
- Etcheberrigaray R, Ito E, Oka K, Tofel-Grehl B, Gibson GE, Alkon DL (1993) Potassium channel dysfunction in fibroblasts identifies patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8209-8213.

- Etminan M, Gill S, Samii A (2003) Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on risk of Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Bmj* 327:128.
- Evans DB, Rank KB, Bhattacharya K, Thomsen DR, Gurney ME, Sharma SK (2000) Tau phosphorylation at serine 396 and serine 404 by human recombinant tau protein kinase II inhibits tau's ability to promote microtubule assembly. *J Biol Chem* 275:24977-24983.
- Fassbender K, Masters C, Beyreuther K (2000) Alzheimer's disease: an inflammatory disease? *Neurobiol Aging* 21:433-436; discussion 451-433.
- Fassbender K, Simons M, Bergmann C, Stroick M, Lutjohann D, Keller P, Runz H, Kuhl S, Bertsch T, von Bergmann K, Hennerici M, Beyreuther K, Hartmann T (2001) Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5856-5861.
- Feddersen RM, Ehlenfeldt R, Yunis WS, Clark HB, Orr HT (1992) Disrupted cerebellar cortical development and progressive degeneration of Purkinje cells in SV40 T antigen transgenic mice. *Neuron* 9:955-966.
- Feng Z, Zhang JT (2004a) Protective effect of melatonin on beta-amyloid-induced apoptosis in rat astrogloma C6 cells and its mechanism. *Free Radic Biol Med* 37:1790-1801.
- Feng Z, Zhang JT (2004b) Melatonin reduces amyloid beta-induced apoptosis in pheochromocytoma (PC12) cells. *J Pineal Res* 37:257-266.
- Ferrer I, Pozas E, Ballabriga J, Planas AM (1997) Strong c-Jun/AP-1 immunoreactivity is restricted to apoptotic cells following intracerebral ibotenic acid injection in developing rats. *Neurosci Res* 28:21-31.
- Ferrington DA, Chen X, Krainev AG, Michaelis EK, Bigelow DJ (1997) Protein half-lives of calmodulin and the plasma membrane Ca-ATPase in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 237:163-165.
- Finch CE (2005) Developmental origins of aging in brain and blood vessels: an overview. *Neurobiol Aging* 26:281-291.
- Finch CE, Morgan TE (2007) Systemic inflammation, infection, ApoE alleles, and Alzheimer disease: a position paper. *Curr Alzheimer Res* 4:185-189.
- Fischer R, Julsgart J, Berchtold MW (1998) High affinity calmodulin target sequence in the signalling molecule PI 3-kinase. *FEBS Lett* 425:175-177.
- Fisher A, Pittel Z, Haring R, Bar-Ner N, Kliger-Spatz M, Natan N, Egozi I, Sonogo H, Marcovitch I, Brandeis R (2003) M1 muscarinic agonists can modulate some of the hallmarks in Alzheimer's disease: implications in future therapy. *J Mol Neurosci* 20:349-356.
- Fivaz M, Meyer T (2005) Reversible intracellular translocation of KRas but not HRas in hippocampal neurons regulated by Ca²⁺/calmodulin. *J Cell Biol* 170:429-441.
- Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK (1999) The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66:137-147.
- Frantz B, Klatt T, Pang M, Parsons J, Rolando A, Williams H, Tocci MJ, O'Keefe SJ, O'Neill EA (1998) The activation state of p38 mitogen-activated protein kinase determines the efficiency of ATP competition for pyridinylimidazole inhibitor binding. *Biochemistry* 37:13846-13853.
- Franzoni F, Quinones-Galvan A, Regoli F, Ferrannini E, Galetta F (2003) A comparative study of the in vitro antioxidant activity of statins. *Int J Cardiol* 90:317-321.
- Fry DW, Harvey PJ, Keller PR, Elliott WL, Meade M, Trachet E, Albassam M, Zheng X, Leopold WR, Pryer NK, Toogood PL (2004) Specific inhibition of cyclin-dependent kinase

4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Mol Cancer Ther* 3:1427-1438.

- Fukuchi K, Watanabe H, Tomoyasu S, Ichimura S, Tatsumi K, Gomi K (2000) Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors, Wortmannin or LY294002, inhibited accumulation of p21 protein after gamma-irradiation by stabilization of the protein. *Biochim Biophys Acta* 1496:207-220.
- Furuya K, Ginis I, Takeda H, Chen Y, Hallenbeck JM (2001) Cell permeable exogenous ceramide reduces infarct size in spontaneously hypertensive rats supporting in vitro studies that have implicated ceramide in induction of tolerance to ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:226-232.
- Galvan V, Gorostiza OF, Banwait S, Ataie M, Logvinova AV, Sitaraman S, Carlson E, Sagi SA, Chevallier N, Jin K, Greenberg DA, Bredesen DE (2006) Reversal of Alzheimer's-like pathology and behavior in human APP transgenic mice by mutation of Asp664. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:7130-7135.
- Gambi F, Reale M, Iarlori C, Salone A, Toma L, Paladini C, De Luca G, Feliciani C, Salvatore M, Salerno RM, Theoharides TC, Conti P, Exton M, Gambi D (2004) Alzheimer patients treated with an AchE inhibitor show higher IL-4 and lower IL-1 beta levels and expression in peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Psychopharmacol* 24:314-321.
- Gamblin TC, Chen F, Zambrano A, Abraha A, Lagalwar S, Guillozet AL, Lu M, Fu Y, Garcia-Sierra F, LaPointe N, Miller R, Berry RW, Binder LI, Cryns VL (2003) Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10032-10037.
- Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, et al. (1995) Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* 373:523-527.
- Gao N, Flynn DC, Zhang Z, Zhong XS, Walker V, Liu KJ, Shi X, Jiang BH (2004) G1 cell cycle progression and the expression of G1 cyclins are regulated by PI3K/AKT/mTOR/p70S6K1 signaling in human ovarian cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:C281-291.
- Garcia-Calvo M, Peterson EP, Leiting B, Ruel R, Nicholson DW, Thornberry NA (1998) Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J Biol Chem* 273:32608-32613.
- Gartel AL, Tyner AL (1999) Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp Cell Res* 246:280-289.
- Gasparini L, Racchi M, Binetti G, Trabucchi M, Solerte SB, Alkon D, Etcheberrigaray R, Gibson G, Blass J, Paoletti R, Govoni S (1998) Peripheral markers in testing pathophysiological hypotheses and diagnosing Alzheimer's disease. *Faseb J* 12:17-34.
- Gastard MC, Troncoso JC, Koliatsos VE (2003) Caspase activation in the limbic cortex of subjects with early Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 54:393-398.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119:493-501.
- Gibson G, Martins R, Blass J, Gandy S (1996) Altered oxidation and signal transduction systems in fibroblasts from Alzheimer patients. *Life Sci* 59:477-489.
- Gibson GE, Toral-Barza L (1992) Cytosolic free calcium in lymphoblasts from young, aged and Alzheimer subjects. *Mech Ageing Dev* 63:1-9.
- Gibson GE, Huang HM (2002) Oxidative processes in the brain and non-neuronal tissues as biomarkers of Alzheimer's disease. *Front Biosci* 7:d1007-1015.

- Gibson GE, Zhang H, Sheu KR, Park LC (2000) Differential alterations in antioxidant capacity in cells from Alzheimer patients. *Biochim Biophys Acta* 1502:319-329.
- Gilman S, Koller M, Black RS, Jenkins L, Griffith SG, Fox NC, Eisner L, Kirby L, Rovira MB, Forette F, Orgogozo JM (2005) Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology* 64:1553-1562.
- Giovanni A, Wirtz-Brugger F, Keramaris E, Slack R, Park DS (1999) Involvement of cell cycle elements, cyclin-dependent kinases, pRb, and E2F x DP, in B-amyloid-induced neuronal death. *J Biol Chem* 274:19011-19016.
- Giovanni A, Keramaris E, Morris EJ, Hou ST, O'Hare M, Dyson N, Robertson GS, Slack RS, Park DS (2000) E2F1 mediates death of B-amyloid-treated cortical neurons in a manner independent of p53 and dependent on Bax and caspase 3. *J Biol Chem* 275:11553-11560.
- Glabe CC (2005) Amyloid accumulation and pathogenesis of Alzheimer's disease: significance of monomeric, oligomeric and fibrillar Abeta. *Subcell Biochem* 38:167-177.
- Glenner GG, Wong CW (1984a) Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun* 122:1131-1135.
- Glenner GG, Wong CW (1984b) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120:885-890.
- Goedert M, Spillantini MG (2006) A century of Alzheimer's disease. *Science* 314:777-781.
- Goedert M, Spillantini MG, Crowther RA (1991) Tau proteins and neurofibrillary degeneration. *Brain Pathol* 1:279-286.
- Goedert M, Klug A, Crowther RA (2006) Tau protein, the paired helical filament and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 9:195-207.
- Goedert M, Spillantini MG, Cairns NJ, Crowther RA (1992) Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* 8:159-168.
- Goedert M, Hasegawa M, Jakes R, Lawler S, Cuenda A, Cohen P (1997) Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases. *FEBS Lett* 409:57-62.
- Gomes CA, da Cruz TG, Andrade JL, Milhazes N, Borges F, Marques MP (2003) Anticancer activity of phenolic acids of natural or synthetic origin: a structure-activity study. *J Med Chem* 46:5395-5401.
- Goya L, Maiyar AC, Ge Y, Firestone GL (1993) Glucocorticoids induce a G1/G0 cell cycle arrest of Con8 rat mammary tumor cells that is synchronously reversed by steroid withdrawal or addition of transforming growth factor-alpha. *Mol Endocrinol* 7:1121-1132.
- Graff-Radford NR, Crook JE, Lucas J, Boeve BF, Knopman DS, Ivnik RJ, Smith GE, Younkin LH, Petersen RC, Younkin SG (2007) Association of low plasma Abeta42/Abeta40 ratios with increased imminent risk for mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Arch Neurol* 64:354-362.
- Grana X, Reddy EP (1995) Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene* 11:211-219.
- Greene LA, Biswas SC, Liu DX (2004) Cell cycle molecules and vertebrate neuron death: E2F at the hub. *Cell Death Differ* 11:49-60.
- Griffin RJ, Moloney A, Kelliher M, Johnston JA, Ravid R, Dockery P, O'Connor R, O'Neill C (2005) Activation of Akt/PKB, increased phosphorylation of Akt substrates and loss and

altered distribution of Akt and PTEN are features of Alzheimer's disease pathology. *J Neurochem* 93:105-117.

- Griffin WS, Mrazek RE (2002) Interleukin-1 in the genesis and progression of and risk for development of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *J Leukoc Biol* 72:233-238.
- Griffin WS, Sheng JG, Royston MC, Gentleman SM, McKenzie JE, Graham DI, Roberts GW, Mrazek RE (1998) Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a 'cytokine cycle' in disease progression. *Brain Pathol* 8:65-72.
- Grossberg GT, Edwards KR, Zhao Q (2006) Rationale for combination therapy with galantamine and memantine in Alzheimer's disease. *J Clin Pharmacol* 46:17S-26S.
- Grynspan F, Griffin WR, Cataldo A, Katayama S, Nixon RA (1997) Active site-directed antibodies identify calpain II as an early-appearing and pervasive component of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Brain Res* 763:145-158.
- Guo H, Albrecht S, Bourdeau M, Petzke T, Bergeron C, LeBlanc AC (2004) Active caspase-6 and caspase-6-cleaved tau in neuropil threads, neuritic plaques, and neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 165:523-531.
- Guo Q, Fu W, Holsberg FW, Steiner SM, Mattson MP (1999) Superoxide mediates the cell-death-enhancing action of presenilin-1 mutations. *J Neurosci Res* 56:457-470.
- Guo Q, Sopher BL, Furukawa K, Pham DG, Robinson N, Martin GM, Mattson MP (1997) Alzheimer's presenilin mutation sensitizes neural cells to apoptosis induced by trophic factor withdrawal and amyloid beta-peptide: involvement of calcium and oxyradicals. *J Neurosci* 17:4212-4222.
- Gysin S, Lee SH, Dean NM, McMahon M (2005) Pharmacologic inhibition of RAF-->MEK-->ERK signaling elicits pancreatic cancer cell cycle arrest through induced expression of p27Kip1. *Cancer Res* 65:4870-4880.
- Haass C (1999) Apoptosis. Dead end for neurodegeneration? *Nature* 399:204-205, 207.
- Halliday G, Robinson SR, Shepherd C, Kril J (2000) Alzheimer's disease and inflammation: a review of cellular and therapeutic mechanisms. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27:1-8.
- Hanger DP, Hughes K, Woodgett JR, Brion JP, Anderton BH (1992) Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci Lett* 147:58-62.
- Hara T, Omura-Minamisawa M, Chao C, Nakagami Y, Ito M, Inoue T (2005) Bcl-2 inhibitors potentiate the cytotoxic effects of radiation in Bcl-2 overexpressing radioresistant tumor cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 61:517-528.
- Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441:885-889.
- Harada J, Sugimoto M (1999) Activation of caspase-3 in beta-amyloid-induced apoptosis of cultured rat cortical neurons. *Brain Res* 842:311-323.
- Hardy J, Allsop D (1991) Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 12:383-388.
- Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353-356.
- Hardy JA, Higgins GA (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256:184-185.

- Hartmann H, Eckert A, Forstl H, Muller WE (1994) Similar age-related changes of free intracellular calcium in lymphocytes and central neurons: effects of Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 243:218-223.
- Harvey BK, Shen H, Chen GJ, Yoshida Y, Wang Y (2004) Midkine and retinoic acid reduce cerebral infarction induced by middle cerebral artery ligation in rats. *Neurosci Lett* 369:138-141.
- Heaney AP (2003) Novel pituitary ligands: peroxisome proliferator activating receptor-gamma. *Pituitary* 6:153-159.
- Heintz N (1993) Cell death and the cell cycle: a relationship between transformation and neurodegeneration? *Trends Biochem Sci* 18:157-159.
- Helin K (1998) Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. *Curr Opin Genet Dev* 8:28-35.
- Hemming ML, Selkoe DJ (2005) Amyloid beta-protein is degraded by cellular angiotensin-converting enzyme (ACE) and elevated by an ACE inhibitor. *J Biol Chem* 280:37644-37650.
- Hemming ML, Selkoe DJ, Farris W (2007) Effects of prolonged angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment on amyloid beta-protein metabolism in mouse models of Alzheimer disease. *Neurobiol Dis* 26:273-281.
- Herrup K, Busser JC (1995) The induction of multiple cell cycle events precedes target-related neuronal death. *Development* 121:2385-2395.
- Herrup K, Neve R, Ackerman SL, Copani A (2004) Divide and die: cell cycle events as triggers of nerve cell death. *J Neurosci* 24:9232-9239.
- Himmler A (1989) Structure of the bovine tau gene: alternatively spliced transcripts generate a protein family. *Mol Cell Biol* 9:1389-1396.
- Hirashima N, Etcheberrigaray R, Bergamaschi S, Racchi M, Battaini F, Binetti G, Govoni S, Alkon DL (1996) Calcium responses in human fibroblasts: a diagnostic molecular profile for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 17:549-555.
- Hirokawa N, Shiomura Y, Okabe S (1988) Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J Cell Biol* 107:1449-1459.
- Hock BJ, Jr., Lamb BT (2001) Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Trends Genet* 17:S7-12.
- Hoglinger GU, Breunig JJ, Depboylu C, Rouaux C, Michel PP, Alvarez-Fischer D, Boutillier AL, Degregori J, Oertel WH, Rakic P, Hirsch EC, Hunot S (2007) The pRb/E2F cell-cycle pathway mediates cell death in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:3585-3590.
- Holcomb L, Gordon MN, McGowan E, Yu X, Benkovic S, Jantzen P, Wright K, Saad I, Mueller R, Morgan D, Sanders S, Zehr C, O'Campo K, Hardy J, Prada CM, Eckman C, Younkin S, Hsiao K, Duff K (1998) Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat Med* 4:97-100.
- Holmes C, Boche D, Wilkinson D, Yadegarfar G, Hopkins V, Bayer A, Jones RW, Bullock R, Love S, Neal JW, Zotova E, Nicoll JA (2008) Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet* 372:216-223.
- Hoozemans JJ, O'Banion MK (2005) The role of COX-1 and COX-2 in Alzheimer's disease pathology and the therapeutic potentials of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 4:307-315.

- Hoozemans JJ, Bruckner MK, Rozemuller AJ, Veerhuis R, Eikelenboom P, Arendt T (2002) Cyclin D1 and cyclin E are co-localized with cyclo-oxygenase 2 (COX-2) in pyramidal neurons in Alzheimer disease temporal cortex. *J Neuropathol Exp Neurol* 61:678-688.
- Hou ST, Cowan E, Walker T, Ohan N, Dove M, Rasquinha I, MacManus JP (2001) The transcription factor E2F1 promotes dopamine-evoked neuronal apoptosis by a mechanism independent of transcriptional activation. *J Neurochem* 78:287-297.
- Hou ST, Callaghan D, Fournier MC, Hill I, Kang L, Massie B, Morley P, Murray C, Rasquinha I, Slack R, MacManus JP (2000) The transcription factor E2F1 modulates apoptosis of neurons. *J Neurochem* 75:91-100.
- Hsiao K, Chapman P, Nilsson S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G (1996) Correlative memory deficits, Aβ elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274:99-102.
- Hwang CY, Ryu YS, Chung MS, Kim KD, Park SS, Chae SK, Chae HZ, Kwon KS (2004) Thioredoxin modulates activator protein 1 (AP-1) activity and p27Kip1 degradation through direct interaction with Jab1. *Oncogene* 23:8868-8875.
- Hye A, Lynham S, Thambisetty M, Causevic M, Campbell J, Byers HL, Hooper C, Rijdsdijk F, Tabrizi SJ, Banner S, Shaw CE, Foy C, Poppe M, Archer N, Hamilton G, Powell J, Brown RG, Sham P, Ward M, Lovestone S (2006) Proteome-based plasma biomarkers for Alzheimer's disease. *Brain* 129:3042-3050.
- Hynd MR, Scott HL, Dodd PR (2004) Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 45:583-595.
- Iarlori C, Gambi D, Gambi F, Lucci I, Feliciani C, Salvatore M, Reale M (2005) Expression and production of two selected beta-chemokines in peripheral blood mononuclear cells from patients with Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* 40:605-611.
- Ibarreta D, Parrilla R, Ayuso MS (1997) Altered Ca²⁺ homeostasis in lymphoblasts from patients with late-onset Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 11:220-227.
- Ibarreta D, Urcelay E, Parrilla R, Ayuso MS (1998) Distinct pH homeostatic features in lymphoblasts from Alzheimer's disease patients. *Ann Neurol* 44:216-222.
- Illario M, Cavallo AL, Bayer KU, Di Matola T, Fenzi G, Rossi G, Vitale M (2003) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II binds to Raf-1 and modulates integrin-stimulated ERK activation. *J Biol Chem* 278:45101-45108.
- Imahara SD, O'Keefe GE (2004) Genetic determinants of the inflammatory response. *Curr Opin Crit Care* 10:318-324.
- Imahori K, Uchida T (1997) Physiology and pathology of tau protein kinases in relation to Alzheimer's disease. *J Biochem* 121:179-188.
- Imbimbo BP, Lombard J, Pomara N (2005) Pathophysiology of Alzheimer's disease. *Neuroimaging Clin N Am* 15:727-753, ix.
- in t' Veld BA, Ruitenbergh A, Hofman A, Launer LJ, van Duijn CM, Stijnen T, Breteler MM, Stricker BH (2001) Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 345:1515-1521.
- Inestrosa NC, Alarcon R, Arriagada J, Donoso A, Alvarez J, Campos EO (1994) Blood markers in Alzheimer disease: subnormal acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in lymphocytes and erythrocytes. *J Neurol Sci* 122:1-5.
- Ishiguro K, Omori A, Takamatsu M, Sato K, Arioka M, Uchida T, Imahori K (1992) Phosphorylation sites on tau by tau protein kinase I, a bovine derived kinase generating an epitope of paired helical filaments. *Neurosci Lett* 148:202-206.

- Ishizawa T, Sahara N, Ishiguro K, Kersh J, McGowan E, Lewis J, Hutton M, Dickson DW, Yen SH (2003) Co-localization of glycogen synthase kinase-3 with neurofibrillary tangles and granulovacuolar degeneration in transgenic mice. *Am J Pathol* 163:1057-1067.
- Ito E, Oka K, Etcheberrigaray R, Nelson TJ, McPhie DL, Tofel-Grehl B, Gibson GE, Alkon DL (1994) Internal Ca²⁺ mobilization is altered in fibroblasts from patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:534-538.
- Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y (1994) Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron* 13:45-53.
- Jacks T, Fazeli A, Schmitt EM, Bronson RT, Goodell MA, Weinberg RA (1992) Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature* 359:295-300.
- Janus C, Pearson J, McLaurin J, Mathews PM, Jiang Y, Schmidt SD, Chishti MA, Horne P, Heslin D, French J, Mount HT, Nixon RA, Mercken M, Bergeron C, Fraser PE, St George-Hyslop P, Westaway D (2000) A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature* 408:979-982.
- Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT, Jr. (1993) The C-terminus of the beta protein is critical in amyloidogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 695:144-148.
- Jellinger KA (2006) Challenges in neuronal apoptosis. *Curr Alzheimer Res* 3:377-391.
- Jellinger KA, Stadelmann C (2001) Problems of cell death in neurodegeneration and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 3:31-40.
- Jellinger KA, Janetzky B, Attems J, Kienzl E (2008) Biomarkers for early diagnosis of Alzheimer disease: 'ALZheimer ASSociated gene'--a new blood biomarker? *J Cell Mol Med* 12:1094-1117.
- Jick H, Zornberg GL, Jick SS, Seshadri S, Drachman DA (2000) Statins and the risk of dementia. *Lancet* 356:1627-1631.
- Johnson CS, Muindi JR, Hershberger PA, Trump DL (2006) The antitumor efficacy of calcitriol: preclinical studies. *Anticancer Res* 26:2543-2549.
- Johnson GL, Lapadat R (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298:1911-1912.
- Jong YJ, Dalemar LR, Seehra K, Baenziger NL (2002) Bradykinin receptor modulation in cellular models of aging and Alzheimer's disease. *Int Immunopharmacol* 2:1833-1840.
- Jordan J, Galindo MF, Miller RJ (1997) Role of calpain- and interleukin-1 beta converting enzyme-like proteases in the beta-amyloid-induced death of rat hippocampal neurons in culture. *J Neurochem* 68:1612-1621.
- Jordan-Sciutto KL, Malaiyandi LM, Bowser R (2002) Altered distribution of cell cycle transcriptional regulators during Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 61:358-367.
- Jordan-Sciutto KL, Dorsey R, Chalovich EM, Hammond RR, Achim CL (2003) Expression patterns of retinoblastoma protein in Parkinson disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:68-74.
- Joyal JL, Burks DJ, Pons S, Matter WF, Vlahos CJ, White MF, Sacks DB (1997) Calmodulin activates phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 272:28183-28186.
- Kahl CR, Means AR (2003) Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways. *Endocr Rev* 24:719-736.
- Kaku M, Tsutsui K, Motokawa M, Kawata T, Fujita T, Kohno S, Tohma Y, Ohtani J, Tenjoh K, Tanne K (2003) Amyloid beta protein deposition and neuron loss in osteopetrotic (op/op) mice. *Brain Res Brain Res Protoc* 12:104-108.

- Kalback W, Esh C, Castano EM, Rahman A, Kokjohn T, Luehrs DC, Sue L, Cisneros R, Gerber F, Richardson C, Bohrmann B, Walker DG, Beach TG, Roher AE (2004) Atherosclerosis, vascular amyloidosis and brain hypoperfusion in the pathogenesis of sporadic Alzheimer's disease. *Neurol Res* 26:525-539.
- Kalmijn S, van Boxtel MP, Ocke M, Verschuren WM, Kromhout D, Launer LJ (2004) Dietary intake of fatty acids and fish in relation to cognitive performance at middle age. *Neurology* 62:275-280.
- Kassner SS, Bonaterra GA, Kaiser E, Hildebrandt W, Metz J, Schroder J, Kinscherf R (2008) Novel systemic markers for patients with Alzheimer disease? - a pilot study. *Curr Alzheimer Res* 5:358-366.
- Kasten MM, Giordano A (1998) pRb and the cdks in apoptosis and the cell cycle. *Cell Death Differ* 5:132-140.
- Kau TR, Schroeder F, Ramaswamy S, Wojciechowski CL, Zhao JJ, Roberts TM, Clardy J, Sellers WR, Silver PA (2003) A chemical genetic screen identifies inhibitors of regulated nuclear export of a Forkhead transcription factor in PTEN-deficient tumor cells. *Cancer Cell* 4:463-476.
- Kehoe PG, Wilcock GK (2007) Is inhibition of the renin-angiotensin system a new treatment option for Alzheimer's disease? *Lancet Neurol* 6:373-378.
- Kerr JFR (2002) History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 181-182:471-474.
- Khan TK, Alkon DL (2006) An internally controlled peripheral biomarker for Alzheimer's disease: Erk1 and Erk2 responses to the inflammatory signal bradykinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13203-13207.
- Khan TK, Alkon DL (2008) Early diagnostic accuracy and pathophysiologic relevance of an autopsy-confirmed Alzheimer's disease peripheral biomarker. *Neurobiol Aging*.
- Kidd M (1963) Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* 197:192-193.
- Kidd M (1964) Alzheimer's Disease--an Electron Microscopical Study. *Brain* 87:307-320.
- Kienzl E, Jellinger K, Janetzky B, Steindl H, Bergmann J (2002) A broader horizon of Alzheimer pathogenesis: ALZAS--an early serum biomarker? *J Neural Transm Suppl*:87-95.
- Kim CS, Han YF, Etcheberrigaray R, Nelson TJ, Olds JL, Yoshioka T, Alkon DL (1995) Alzheimer and beta-amyloid-treated fibroblasts demonstrate a decrease in a memory-associated GTP-binding protein, Cp20. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3060-3064.
- Kim JH, Liao D, Lau LF, Haganir RL (1998) SynGAP: a synaptic RasGAP that associates with the PSD-95/SAP90 protein family. *Neuron* 20:683-691.
- Klein JA, Longo-Guess CM, Rossmann MP, Seburn KL, Hurd RE, Frankel WN, Bronson RT, Ackerman SL (2002) The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature* 419:367-374.
- Klein WL, Krafft GA, Finch CE (2001) Targeting small A β oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci* 24:219-224.
- Knockaert M, Greengard P, Meijer L (2002) Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends Pharmacol Sci* 23:417-425.
- Knowles RB, Chin J, Ruff CT, Hyman BT (1999) Demonstration by fluorescence resonance energy transfer of a close association between activated MAP kinase and neurofibrillary tangles: implications for MAP kinase activation in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:1090-1098.

- Koistinen P (1987) Human peripheral blood and bone marrow cell separation using density gradient centrifugation on Lymphoprep and Percoll in haematological diseases. *Scand J Clin Lab Invest* 47:709-714.
- Kojro E, Gimpl G, Lammich S, Marz W, Fahrenholz F (2001) Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5815-5820.
- Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441:880-884.
- Kong QL, Zhang JM, Zhang ZX, Ge PJ, Xu YJ, Mi RS, Zhao YH, Sui YP, He W (2002) [Serum levels of macrophage colony stimulating factor in the patients with Alzheimer's disease]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 24:298-301.
- Koutsilieri E, Riederer P (2007) Excitotoxicity and new antigitamatergic strategies in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 13 Suppl 3:S329-331.
- Krawczun MS, Jenkins EC, Lele KP, Sersen EA, Wisniewski HM (1990) Study of spindle microtubule reassembly in cells from Alzheimer and Down syndrome patients following exposure to colcemid. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 4:203-216.
- Krishan A (1975) Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J Cell Biol* 66:188-193.
- Kruman, II, Wersto RP, Cardozo-Pelaez F, Smilenov L, Chan SL, Chrest FJ, Emokpae R, Jr., Gorospe M, Mattson MP (2004) Cell cycle activation linked to neuronal cell death initiated by DNA damage. *Neuron* 41:549-561.
- Kubota T, Fujisaki K, Itoh Y, Yano T, Sendo T, Oishi R (2004) Apoptotic injury in cultured human hepatocytes induced by HMG-CoA reductase inhibitors. *Biochem Pharmacol* 67:2175-2186.
- Kuller LH (2007) Statins and dementia. *Curr Atheroscler Rep* 9:154-161.
- Kusdra L, Rempel H, Yaffe K, Pulliam L (2000) Elevation of CD69+ monocyte/macrophages in patients with Alzheimer's disease. *Immunobiology* 202:26-33.
- Kvetnoi IM, Kvetnaia TV, Riadnova I, Fursov BB, Ernandes-Jago H, Blesa JR (2003) [Expression of beta-amyloid and tau-protein in mastocytes in Alzheimer disease]. *Arkh Patol* 65:36-39.
- Kwon TK, Buchholz MA, Ponsalle P, Chrest FJ, Nordin AA (1997) The regulation of p27Kip1 expression following the polyclonal activation of murine G0 T cells. *J Immunol* 158:5642-5648.
- Laezza C, Notarnicola M, Caruso MG, Messa C, Macchia M, Bertini S, Minutolo F, Portella G, Fiorentino L, Stingo S, Bifulco M (2006) N6-isopentenyladenosine arrests tumor cell proliferation by inhibiting farnesyl diphosphate synthase and protein prenylation. *Faseb J* 20:412-418.
- LaFerla FM (2002) Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 3:862-872.
- LaFerla FM, Oddo S (2005) Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction. *Trends Mol Med* 11:170-176.
- Lamb BT (1995) Making models for Alzheimer's disease. *Nat Genet* 9:4-6.

- Lamkin TJ, Chin V, Yen A (2006) All-trans retinoic acid induces p62DOK1 and p56DOK2 expression which enhances induced differentiation and G0 arrest of HL-60 leukemia cells. *Am J Hematol* 81:603-615.
- Lancelot E, Beal MF (1998) Glutamate toxicity in chronic neurodegenerative disease. *Prog Brain Res* 116:331-347.
- Lanni C, Uberti D, Racchi M, Govoni S, Memo M (2007) Unfolded p53: a potential biomarker for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 12:93-99.
- Lanni C, Racchi M, Uberti D, Mazzini G, Stanga S, Sinforiani E, Memo M, Govoni S (2008a) Pharmacogenetics and pharmagenomics, trends in normal and pathological aging studies: focus on p53. *Curr Pharm Des* 14:2665-2671.
- Lanni C, Racchi M, Mazzini G, Ranzenigo A, Polotti R, Sinforiani E, Olivari L, Barcikowska M, Styczynska M, Kuznicki J, Szybinska A, Govoni S, Memo M, Uberti D (2008b) Conformationally altered p53: a novel Alzheimer's disease marker? *Mol Psychiatry* 13:641-647.
- Lassmann H, Bancher C, Breitschopf H, Wegiel J, Bobinski M, Jellinger K, Wisniewski HM (1995) Cell death in Alzheimer's disease evaluated by DNA fragmentation in situ. *Acta Neuropathol* 89:35-41.
- Le Quan Sang KH, Mignot E, Gilbert JC, Huguet R, Aquino JP, Regnier O, Devynck MA (1993) Platelet cytosolic free-calcium concentration is increased in aging and Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 33:391-393.
- Lee EY, Chang CY, Hu N, Wang YC, Lai CC, Herrup K, Lee WH, Bradley A (1992) Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature* 359:288-294.
- Lee HG, Casadesus G, Nunomura A, Zhu X, Castellani RJ, Richardson SL, Perry G, Felsher DW, Petersen RB, Smith MA (2009) The neuronal expression of MYC causes a neurodegenerative phenotype in a novel transgenic mouse. *Am J Pathol* 174:891-897.
- Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ (2001) Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci* 24:1121-1159.
- Lemere CA, Blusztajn JK, Yamaguchi H, Wisniewski T, Saido TC, Selkoe DJ (1996) Sequence of deposition of heterogeneous amyloid beta-peptides and APO E in Down syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation. *Neurobiol Dis* 3:16-32.
- Lesne S, Kotilinek L, Ashe KH (2008) Plaque-bearing mice with reduced levels of oligomeric amyloid-beta assemblies have intact memory function. *Neuroscience* 151:745-749.
- Lesne S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH (2006) A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 440:352-357.
- Leuner K, Pantel J, Frey C, Schindowski K, Schulz K, Wegat T, Maurer K, Eckert A, Muller WE (2007) Enhanced apoptosis, oxidative stress and mitochondrial dysfunction in lymphocytes as potential biomarkers for Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl*:207-215.
- Leutner S, Schindowski K, Frolich L, Maurer K, Kratzsch T, Eckert A, Muller WE (2005) Enhanced ROS-generation in lymphocytes from Alzheimer's patients. *Pharmacopsychiatry* 38:312-315.
- Levkau B, Koyama H, Raines EW, Clurman BE, Herren B, Orth K, Roberts JM, Ross R (1998) Cleavage of p21Cip1/Waf1 and p27Kip1 mediates apoptosis in endothelial cells through activation of Cdk2: role of a caspase cascade. *Mol Cell* 1:553-563.

- Li QX, Fuller SJ, Beyreuther K, Masters CL (1999) The amyloid precursor protein of Alzheimer disease in human brain and blood. *J Leukoc Biol* 66:567-574.
- Liang J, Slingerland JM (2003) Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle* 2:339-345.
- Lim AC, Qi RZ (2003) Cyclin-dependent kinases in neural development and degeneration. *J Alzheimers Dis* 5:329-335.
- Lindberg C, Hjorth E, Post C, Winblad B, Schultzberg M (2005) Cytokine production by a human microglial cell line: effects of beta-amyloid and alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Neurotox Res* 8:267-276.
- Lockshin RA, Zakeri Z (2004) Apoptosis, autophagy, and more. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36:2405-2419.
- Lopez JR, Lyckman A, Oddo S, Laferla FM, Querfurth HW, Shtifman A (2008) Increased intraneuronal resting [Ca²⁺] in adult Alzheimer's disease mice. *J Neurochem* 105:262-271.
- Losem-Heinrichs E, Gorg B, Schleicher A, Redecker C, Witte OW, Zilles K, Bidmon HJ (2004) A combined treatment with 1alpha,25-dihydroxy-vitamin D3 and 17beta-estradiol reduces the expression of heat shock protein-32 (HSP-32) following cerebral cortical ischemia. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90:371-374.
- Lovasic L, Bauschke H, Janus C (2005) Working memory impairment in a transgenic amyloid precursor protein TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease. *Genes Brain Behav* 4:197-208.
- Lowe J, Blanchard A, Morrell K, Lennox G, Reynolds L, Billett M, Landon M, Mayer RJ (1988) Ubiquitin is a common factor in intermediate filament inclusion bodies of diverse type in man, including those of Parkinson's disease, Pick's disease, and Alzheimer's disease, as well as Rosenthal fibres in cerebellar astrocytomas, cytoplasmic bodies in muscle, and mallory bodies in alcoholic liver disease. *J Pathol* 155:9-15.
- Lucas JJ, Hernandez F, Gomez-Ramos P, Moran MA, Hen R, Avila J (2001) Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *Embo J* 20:27-39.
- Luetjens CM, Lankiewicz S, Bui NT, Krohn AJ, Poppe M, Prehn JH (2001) Up-regulation of Bcl-xL in response to subtoxic beta-amyloid: role in neuronal resistance against apoptotic and oxidative injury. *Neuroscience* 102:139-150.
- Luo RX, Postigo AA, Dean DC (1998) Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell* 92:463-473.
- Luo Y, Yin W, Signore AP, Zhang F, Hong Z, Wang S, Graham SH, Chen J (2006) Neuroprotection against focal ischemic brain injury by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone. *J Neurochem* 97:435-448.
- Lusis AJ, Heinzmann C, Sparkes RS, Scott J, Knott TJ, Geller R, Sparkes MC, Mohandas T (1986) Regional mapping of human chromosome 19: organization of genes for plasma lipid transport (APOC1, -C2, and -E and LDLR) and the genes C3, PEPD, and GPI. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:3929-3933.
- Luth HJ, Holzer M, Gertz HJ, Arendt T (2000) Aberrant expression of nNOS in pyramidal neurons in Alzheimer's disease is highly co-localized with p21ras and p16INK4a. *Brain Res* 852:45-55.
- Maes OC, Xu S, Yu B, Chertkow HM, Wang E, Schipper HM (2007) Transcriptional profiling of Alzheimer blood mononuclear cells by microarray. *Neurobiol Aging* 28:1795-1809.

- Maglott A, Bartik P, Cosgun S, Klotz P, Ronde P, Fuhrmann G, Takeda K, Martin S, Dontenwill M (2006) The small alpha5beta1 integrin antagonist, SJ749, reduces proliferation and clonogenicity of human astrocytoma cells. *Cancer Res* 66:6002-6007.
- Mahieux F, Couderc R, Fenelon G, Maachi M (2006) [Relationships between weight loss and circulating cytokines in patients with Alzheimer's disease]. *Psychol Neuropsychiatr Vieil* 4:281-286.
- Mandelkow EM, Thies E, Trinczek B, Biernat J, Mandelkow E (2004) MARK/PAR1 kinase is a regulator of microtubule-dependent transport in axons. *J Cell Biol* 167:99-110.
- Mandelkow EM, Drewes G, Biernat J, Gustke N, Van Lint J, Vandenheede JR, Mandelkow E (1992) Glycogen synthase kinase-3 and the Alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau. *FEBS Lett* 314:315-321.
- Marcourakis T, Bahia VS, Kawamoto EM, Munhoz CD, Gorjao R, Artes R, Kok F, Caramelli P, Nitrini R, Curi R, Scavone C (2008) Apolipoprotein E genotype is related to nitric oxide production in platelets. *Cell Biochem Funct* 26:852-858.
- Marino S, Krimpenfort P, Leung C, van der Korput HA, Trapman J, Camenisch I, Berns A, Brandner S (2002) PTEN is essential for cell migration but not for fate determination and tumorigenesis in the cerebellum. *Development* 129:3513-3522.
- Marshall CJ (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80:179-185.
- Masliah E, Mallory M, Alford M, Hansen LA, Saitoh T (1993) Immunoreactivity of the nuclear antigen p105 is associated with plaques and tangles in Alzheimer's disease. *Lab Invest* 69:562-569.
- Matsuoka Y, Picciano M, La Francois J, Duff K (2001) Fibrillar beta-amyloid evokes oxidative damage in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 104:609-613.
- Mattila KM, Frey H (1995) Two-dimensional analysis of qualitative and quantitative changes in blood cell proteins in Alzheimer's disease: search for extraneuronal markers. *Appl Theor Electrophor* 4:189-196.
- Mattson MP (1997) Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev* 77:1081-1132.
- Mattson MP, Chan SL (2003) Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell Calcium* 34:385-397.
- Mattson MP, Chan SL, Camandola S (2001) Presenilin mutations and calcium signaling defects in the nervous and immune systems. *Bioessays* 23:733-744.
- Maxfield FR, Tabas I (2005) Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature* 438:612-621.
- Mayer ML (2005) Glutamate receptor ion channels. *Curr Opin Neurobiol* 15:282-288.
- Mazighi M, Lavalley PC, Labreuche J, Amarenco P (2007) Statin therapy and stroke prevention: what was known, what is new and what is next? *Curr Opin Lipidol* 18:622-625.
- Mazzola JL, Sirover MA (2003) Subcellular alteration of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in Alzheimer's disease fibroblasts. *J Neurosci Res* 71:279-285.
- McGeer PL, Schulzer M, McGeer EG (1996) Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies. *Neurology* 47:425-432.

- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34:939-944.
- McShane RH (2004) Memantine plus donepezil improves physical and mental health in people with Alzheimer's disease. *Evid Based Ment Health* 7:76.
- McShea A, Zelasko DA, Gerst JL, Smith MA (1999) Signal transduction abnormalities in Alzheimer's disease: evidence of a pathogenic stimuli. *Brain Res* 815:237-242.
- McShea A, Harris PL, Webster KR, Wahl AF, Smith MA (1997) Abnormal expression of the cell cycle regulators P16 and CDK4 in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 150:1933-1939.
- Mecocci P, Polidori MC, Ingegni T, Cherubini A, Chionne F, Cecchetti R, Senin U (1998) Oxidative damage to DNA in lymphocytes from AD patients. *Neurology* 51:1014-1017.
- Mecocci P, Polidori MC, Cherubini A, Ingegni T, Mattioli P, Catani M, Rinaldi P, Cecchetti R, Stahl W, Senin U, Beal MF (2002) Lymphocyte oxidative DNA damage and plasma antioxidants in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 59:794-798.
- Menendez-Gonzalez M, Castro-Santos P, Suarez A, Calatayud MT, Perez-Pinera P, Martinez M, Ribacoba R, Gutierrez C (2008a) Value of measuring plasmatic levels of neurosin in the diagnosis of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 14:59-67.
- Menendez-Gonzalez M, Castro-Santos P, Calatayud MT, Perez-Pinera P, Ribacoba R, Martinez-Rivera M, Gutierrez C, Lopez-Muniz A, Suarez A (2008b) Plasmatic level of neurosin predicts outcome of mild cognitive impairment. *Int Arch Med* 1:11.
- Merrill GF (1998) Cell synchronization. *Methods Cell Biol* 57:229-249.
- Mhyre TR, Loy R, Tariot PN, Profenno LA, Maguire-Zeiss KA, Zhang D, Coleman PD, Federoff HJ (2008) Proteomic analysis of peripheral leukocytes in Alzheimer's disease patients treated with divalproex sodium. *Neurobiol Aging* 29:1631-1643.
- Millard SS, Yan JS, Nguyen H, Pagano M, Kiyokawa H, Koff A (1997) Enhanced ribosomal association of p27(Kip1) mRNA is a mechanism contributing to accumulation during growth arrest. *J Biol Chem* 272:7093-7098.
- Minghetti L (2004) Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:901-910.
- Miscia S, Ciccocioppo F, Lanuti P, Velluto L, Bascelli A, Pierdomenico L, Genovesi D, Di Siena A, Santavenere E, Gambi F, Ausili-Cefaro G, Grimley PM, Marchisio M, Gambi D (2009) Aβ(1-42) stimulated T cells express P-PKC-δ and P-PKC-ζ in Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* 30:394-406.
- Misonou H, Morishima-Kawashima M, Ihara Y (2000) Oxidative stress induces intracellular accumulation of amyloid beta-protein (Aβ) in human neuroblastoma cells. *Biochemistry* 39:6951-6959.
- Monsonego A, Weiner HL (2003) Immunotherapeutic approaches to Alzheimer's disease. *Science* 302:834-838.
- Moreira PI, Smith MA, Zhu X, Santos MS, Oliveira CR, Perry G (2004) Therapeutic potential of oxidant mechanisms in Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother* 4:995-1004.
- Moreira PI, Harris PL, Zhu X, Santos MS, Oliveira CR, Smith MA, Perry G (2007) Lipic acid and N-acetyl cysteine decrease mitochondrial-related oxidative stress in Alzheimer disease patient fibroblasts. *J Alzheimers Dis* 12:195-206.
- Moreto J, Llado A, Vidal-Quadras M, Calvo M, Pol A, Enrich C, Tebar F (2008) Calmodulin modulates H-Ras mediated Raf-1 activation. *Cell Signal* 20:1092-1103.

- Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, Duff K, Jantzen P, DiCarlo G, Wilcock D, Connor K, Hatcher J, Hope C, Gordon M, Arendash GW (2000) A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 408:982-985.
- Morgan DO (1995) Principles of CDK regulation. *Nature* 374:131-134.
- Mori H (2000) Untangling Alzheimer's disease from fibrous lesions of neurofibrillary tangles and senile plaques. *Neuropathology* 20 Suppl:S55-60.
- Morocz M, Kalman J, Juhasz A, Sinko I, McGlynn AP, Downes CS, Janka Z, Rasko I (2002) Elevated levels of oxidative DNA damage in lymphocytes from patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 23:47-53.
- Mott RT, Hulette CM (2005) Neuropathology of Alzheimer's disease. *Neuroimaging Clin N Am* 15:755-765, ix.
- Mrak RE, Griffin WS (2005) Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiol Aging* 26:349-354.
- Mrak RE, Sheng JG, Griffin WS (1995) Glial cytokines in Alzheimer's disease: review and pathogenic implications. *Hum Pathol* 26:816-823.
- Mulnard RA, Cotman CW, Kawas C, van Dyck CH, Sano M, Doody R, Koss E, Pfeiffer E, Jin S, Gamst A, Grundman M, Thomas R, Thal LJ (2000) Estrogen replacement therapy for treatment of mild to moderate Alzheimer disease: a randomized controlled trial. Alzheimer's Disease Cooperative Study. *Jama* 283:1007-1015.
- Munoz U, Bartolome F, Bermejo F, Martin-Requero A (2008a) Enhanced proteasome-dependent degradation of the CDK inhibitor p27(kip1) in immortalized lymphocytes from Alzheimer's dementia patients. *Neurobiol Aging* 29:1474-1484.
- Munoz U, Bartolome F, Esteras N, Bermejo-Pareja F, Martin-Requero A (2008b) On the mechanism of inhibition of p27 degradation by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 in lymphoblasts of Alzheimer's disease patients. *Cell Mol Life Sci* 65:3507-3519.
- Munoz U, de Las Cuevas N, Bartolome F, Hermida OG, Bermejo F, Martin-Requero A (2005) The cyclopentenone 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2 inhibits G1/S transition and retinoblastoma protein phosphorylation in immortalized lymphocytes from Alzheimer's disease patients. *Exp Neurol* 195:508-517.
- Murakami M, Goto T, Saito Y, Goto S, Kochi M, Ushio Y (2001) The inhibitory effect of simvastatin on growth in malignant gliomas--with special reference to its local application with fibrin glue spray in vivo. *Int J Oncol* 19:525-531.
- Murayama S, Bouldin TW, Suzuki K (1992) Immunocytochemical and ultrastructural studies of eosinophilic granular bodies in astrocytic tumors. *Acta Neuropathol* 83:408-414.
- Naderi J, Lopez C, Pandey S (2006) Chronically increased oxidative stress in fibroblasts from Alzheimer's disease patients causes early senescence and renders resistance to apoptosis by oxidative stress. *Mech Ageing Dev* 127:25-35.
- Nagy Z (2005) The last neuronal division: a unifying hypothesis for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* 9:531-541.
- Nagy Z (2007) The dysregulation of the cell cycle and the diagnosis of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1772:402-408.
- Nagy Z, Esiri MM, Cato AM, Smith AD (1997) Cell cycle markers in the hippocampus in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 94:6-15.
- Nagy Z, Combrinck M, Budge M, McShane R (2002) Cell cycle kinesis in lymphocytes in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 317:81-84.

- Nagy ZS, Esiri MM, Smith AD (1998) The cell division cycle and the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 87:731 – 739.
- Nakagawa H, Mutoh T, Kumano T, Kuriyama M (1998) HMG-CoA reductase inhibitor-induced L6 myoblast cell death: involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *FEBS Lett* 438:289-292.
- Nakamura S, Kawamoto Y, Nakano S, Akiguchi I, Kimura J (1997) p35nc5a and cyclin-dependent kinase 5 colocalize in Lewy bodies of brains with Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 94:153-157.
- Nakao T, Shiota M, Tatemoto Y, Izumi Y, Iwao H (2007) Pravastatin induces rat aortic endothelial cell proliferation and migration via activation of PI3K/Akt/mTOR/p70 S6 kinase signaling. *J Pharmacol Sci* 105:334-341.
- Nakashima H, Ishihara T, Yokota O, Terada S, Trojanowski JQ, Lee VM, Kuroda S (2004) Effects of alpha-tocopherol on an animal model of tauopathies. *Free Radic Biol Med* 37:176-186.
- Nakayama K-I, Hatakeyama S, Nakayama K (2001) Regulation of the Cell Cycle at the G1-S Transition by Proteolysis of Cyclin E and p27Kip1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 282:853-860.
- Nakayama KI, Nakayama K (2006) Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* 6:369-381.
- Nassief A, Marsh JD (2008) Statin therapy for stroke prevention. *Stroke* 39:1042-1048.
- Nguyen MD, Boudreau M, Kriz J, Couillard-Despres S, Kaplan DR, Julien JP (2003) Cell cycle regulators in the neuronal death pathway of amyotrophic lateral sclerosis caused by mutant superoxide dismutase 1. *J Neurosci* 23:2131-2140.
- Nicoll JA, Wilkinson D, Holmes C, Steart P, Markham H, Weller RO (2003) Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat Med* 9:448-452.
- Nijhuis EW, Oostervink F, Hinloopen B, Rozing J, Nagelkerken L (1996) Differences in dexamethasone-sensitivity between lymphocytes from patients with Alzheimer's disease and patients with multi-infarct dementia. *Brain Behav Immun* 10:115-125.
- Nixon RA (2000) A "protease activation cascade" in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 924:117-131.
- Nixon RA, Cataldo AM (2006) Lysosomal system pathways: genes to neurodegeneration in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 9:277-289.
- Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, Yu WH, Peterhoff C, Cataldo A, Cuervo AM (2005) Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:113-122.
- Nordberg A (2008) Amyloid plaque imaging in vivo: current achievement and future prospects. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35 Suppl 1:S46-50.
- Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, Jones PK, Ghanbari H, Wataya T, Shimohama S, Chiba S, Atwood CS, Petersen RB, Smith MA (2001) Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:759-767.
- O'Hare MJ, Hou ST, Morris EJ, Cregan SP, Xu Q, Slack RS, Park DS (2000) Induction and modulation of cerebellar granule neuron death by E2F-1. *J Biol Chem* 275:25358-25364.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39:409-421.

- Ogawa O, Lee HG, Zhu X, Raina A, Harris PL, Castellani RJ, Perry G, Smith MA (2003) Increased p27, an essential component of cell cycle control, in Alzheimer's disease. *Aging Cell* 2:105-110.
- Oh SY, Park KS, Kim JA, Choi KY (2002) Differential modulation of zinc-stimulated p21(Cip/WAF1) and cyclin D1 induction by inhibition of PI3 kinase in HT-29 colorectal cancer cells. *Exp Mol Med* 34:27-31.
- Ohno M (2006) Genetic and pharmacological basis for therapeutic inhibition of beta- and gamma-secretases in mouse models of Alzheimer's memory deficits. *Rev Neurosci* 17:429-454.
- Paccalin M, Pain-Barc S, Pluchon C, Paul C, Besson MN, Carret-Rebillat AS, Rioux-Bilan A, Gil R, Hugon J (2006) Activated mTOR and PKR kinases in lymphocytes correlate with memory and cognitive decline in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 22:320-326.
- Padmanabhan J, Park DS, Greene LA, Shelanski ML (1999) Role of cell cycle regulatory proteins in cerebellar granule neuron apoptosis. *J Neurosci* 19:8747-8756.
- Padovani A, Borroni B, Colciaghi F, Pastorino L, Archetti S, Cottini E, Caimi L, Cattabeni F, Di Luca M (2001a) Platelet amyloid precursor protein forms in AD: a peripheral diagnostic tool and a pharmacological target. *Mech Ageing Dev* 122:1997-2004.
- Padovani A, Pastorino L, Borroni B, Colciaghi F, Rozzini L, Monastero R, Perez J, Pettenati C, Mussi M, Parrinello G, Cottini E, Lenzi GL, Trabucchi M, Cattabeni F, Di Luca M (2001b) Amyloid precursor protein in platelets: a peripheral marker for the diagnosis of sporadic AD. *Neurology* 57:2243-2248.
- Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, Yew PR, Draetta GF, Rolfe M (1995) Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 269:682-685.
- Palmer CL, Cotton L, Henley JM (2005) The molecular pharmacology and cell biology of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors. *Pharmacol Rev* 57:253-277.
- Palotas A, Kalman J, Laskay G, Juhasz A, Janka Z, Penke B (2001) Comparative studies on [Ca²⁺]_i-level of fibroblasts from Alzheimer patients and control individuals. *Neurochem Res* 26:817-820.
- Palotas A, Kalman J, Laskay G, Juhasz A, Janka Z, Penke B (2002a) [Change of fibroblast calcium levels caused by beta-amyloid peptide in Alzheimer disease]. *Ideggyogy Sz* 55:164-167.
- Palotas A, Kalman J, Palotas M, Juhasz A, Janka Z, Penke B (2002b) Fibroblasts and lymphocytes from Alzheimer patients are resistant to beta-amyloid-induced increase in the intracellular calcium concentration. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 26:971-974.
- Palotas A, Puskas LG, Kitajka K, Palotas M, Molnar J, Pakaski M, Janka Z, Penke B, Kalman J (2004a) Altered response to mirtazapine on gene expression profile of lymphocytes from Alzheimer's patients. *Eur J Pharmacol* 497:247-254.
- Palotas A, Penke B, Palotas M, Kenderessy AS, Kemeny L, Kis E, Vincze G, Janka Z, Kalman J (2004b) Haloperidol attenuates beta-amyloid-induced calcium imbalance in human fibroblasts. *Skin Pharmacol Physiol* 17:195-199.
- Panetta JC, Evans WE, Cheok MH (2006) Mechanistic mathematical modelling of mercaptopurine effects on cell cycle of human acute lymphoblastic leukaemia cells. *Br J Cancer* 94:93-100.

- Papassotiropoulos A, Wollmer MA, Tsolaki M, Brunner F, Molyva D, Lutjohann D, Nitsch RM, Hock C (2005) A cluster of cholesterol-related genes confers susceptibility for Alzheimer's disease. *J Clin Psychiatry* 66:940-947.
- Park DS, Farinelli SE, Greene LA (1996) Inhibitors of cyclin-dependent kinases promote survival of post-mitotic neuronally differentiated PC12 cells and sympathetic neurons. *J Biol Chem* 271:8161-8169.
- Park DS, Levine B, Ferrari G, Greene LA (1997) Cyclin dependent kinase inhibitors and dominant negative cyclin dependent kinase 4 and 6 promote survival of NGF-deprived sympathetic neurons. *J Neurosci* 17:8975-8983.
- Park DS, Obeidat A, Giovanni A, Greene LA (2000) Cell cycle regulators in neuronal death evoked by excitotoxic stress: implications for neurodegeneration and its treatment. *Neurobiol Aging* 21:771-781.
- Park KH, Hallows JL, Chakrabarty P, Davies P, Vincent I (2007) Conditional neuronal simian virus 40 T antigen expression induces Alzheimer-like tau and amyloid pathology in mice. *J Neurosci* 27:2969-2978.
- Parker SB, Eichele G, Zhang P, Rawls A, Sands AT, Bradley A, Olson EN, Harper JW, Elledge SJ (1995) p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells. *Science* 267:1024-1027.
- Pastorino L, Lu KP (2006) Pathogenic mechanisms in Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol* 545:29-38.
- Patrignani P, Tacconelli S, Sciulli MG, Capone ML (2005) New insights into COX-2 biology and inhibition. *Brain Res Brain Res Rev* 48:352-359.
- Paudel HK, Lew J, Ali Z, Wang JH (1993) Brain proline-directed protein kinase phosphorylates tau on sites that are abnormally phosphorylated in tau associated with Alzheimer's paired helical filaments. *J Biol Chem* 268:23512-23518.
- Pearce JM (2000) Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 68:348.
- Pei JJ, Braak H, An WL, Winblad B, Cowburn RF, Iqbal K, Grundke-Iqbal I (2002) Up-regulation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and MEK1/2 is associated with the progression of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 109:45-55.
- Pepper C, Thomas A, Fegan C, Hoy T, Bentley P (2003) Flavopiridol induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells through a p38 and ERK MAP kinase-dependent mechanism. *Leuk Lymphoma* 44:337-342.
- Pereira MP, Hurtado O, Cardenas A, Bosca L, Castillo J, Davalos A, Vivancos J, Serena J, Lorenzo P, Lizasoain I, Moro MA (2006) Rosiglitazone and 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 cause potent neuroprotection after experimental stroke through noncompletely overlapping mechanisms. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:218-229.
- Perez-Garcia MJ, Cena V, de Pablo Y, Llovera M, Comella JX, Soler RM (2004) Glial cell line-derived neurotrophic factor increases intracellular calcium concentration. Role of calcium/calmodulin in the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem* 279:6132-6142.
- Perez-Sala D, Collado-Escobar D, Mollinedo F (1995) Intracellular alkalinization suppresses lovastatin-induced apoptosis in HL-60 cells through the inactivation of a pH-dependent endonuclease. *J Biol Chem* 270:6235-6242.
- Pericak-Vance MA, St George-Hyslop PH, Gaskell PC, Jr., Growdon J, Crain BJ, Hulette C, Gusella JF, Yamaoka L, Tanzi RE, Roses AD, et al. (1993) Linkage analysis in familial

- Alzheimer disease: description of the Duke and Boston data sets. *Genet Epidemiol* 10:361-364.
- Perry G, Cash AD, Smith MA (2002) Alzheimer Disease and Oxidative Stress. *J Biomed Biotechnol* 2:120-123.
 - Peterson C, Ratan RR, Shelanski ML, Goldman JE (1988) Altered response of fibroblasts from aged and Alzheimer donors to drugs that elevate cytosolic free calcium. *Neurobiol Aging* 9:261-266.
 - Pfeifer M, Boncristiano S, Bondolfi L, Stalder A, Deller T, Staufenbiel M, Mathews PM, Jucker M (2002) Cerebral hemorrhage after passive anti-A β immunotherapy. *Science* 298:1379.
 - Pimplikar SW (2009) Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 41:1261-1268.
 - Pirttila T, Mattinen S, Frey H (1992) The decrease of CD8-positive lymphocytes in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 107:160-165.
 - Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, Koff A (1994) p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 8:9-22.
 - Pouyssegur J, Volmat V, Lenormand P (2002) Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochem Pharmacol* 64:755-763.
 - Price DL, Tanzi RE, Borchelt DR, Sisodia SS (1998) Alzheimer's disease: genetic studies and transgenic models. *Annu Rev Genet* 32:461-493.
 - Price JL, Morris JC (1999) Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 45:358-368.
 - Price JL, Davis PB, Morris JC, White DL (1991) The distribution of tangles, plaques and related immunohistochemical markers in healthy aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 12:295-312.
 - Racchi M, Uberti D, Govoni S, Memo M, Lanni C, Vasto S, Candore G, Caruso C, Romeo L, Scapagnini G (2008) Alzheimer's disease: new diagnostic and therapeutic tools. *Immun Ageing* 5:7.
 - Radde R, Duma C, Goedert M, Jucker M (2008) The value of incomplete mouse models of Alzheimer's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35 Suppl 1:S70-74.
 - Raina AK, Zhu X, Smith MA (2004) Alzheimer's disease and the cell cycle. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 64:107-112.
 - Raina AK, Zhu X, Shimohama S, Perry G, Smith MA (2003) Tipping the apoptotic balance in Alzheimer's disease: the abortosis concept. *Cell Biochem Biophys* 39:249-255.
 - Raina AK, Hochman A, Zhu X, Rottkamp CA, Nunomura A, Siedlak SL, Bux H, Castellani RJ, Perry G, Smith MA (2001) Abortive apoptosis in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 101:305-310.
 - Rakonczay Z, Horvath Z, Juhasz A, Kalman J (2005) Peripheral cholinergic disturbances in Alzheimer's disease. *Chem Biol Interact* 157-158:233-238.
 - Rakover I, Arbel M, Solomon B (2007) Immunotherapy against APP beta-secretase cleavage site improves cognitive function and reduces neuroinflammation in Tg2576 mice without a significant effect on brain A β levels. *Neurodegener Dis* 4:392-402.
 - Ranganathan S, Bowser R (2003) Alterations in G(1) to S phase cell-cycle regulators during amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol* 162:823-835.

- Ranganathan S, Scudiere S, Bowser R (2001) Hyperphosphorylation of the retinoblastoma gene product and altered subcellular distribution of E2F-1 during Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *J Alzheimers Dis* 3:377-385.
- Rao S, Porter DC, Chen X, Herliczek T, Lowe M, Keyomarsi K (1999) Lovastatin-mediated G1 arrest is through inhibition of the proteasome, independent of hydroxymethyl glutaryl-CoA reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7797-7802.
- Rasmussen CD, Means AR (1987) Calmodulin is involved in regulation of cell proliferation. *Embo J* 6:3961-3968.
- Rasmussen CD, Means AR (1989) Calmodulin is required for cell-cycle progression during G1 and mitosis. *Embo J* 8:73-82.
- Ray S, Britschgi M, Herbert C, Takeda-Uchimura Y, Boxer A, Blennow K, Friedman LF, Galasko DR, Jutel M, Karydas A, Kaye JA, Leszek J, Miller BL, Minthon L, Quinn JF, Rabinovici GD, Robinson WH, Sabbagh MN, So YT, Sparks DL, Tabaton M, Tinklenberg J, Yesavage JA, Tibshirani R, Wyss-Coray T (2007) Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. *Nat Med* 13:1359-1362.
- Reale M, Iarlori C, Feliciani C, Gambi D (2008) Peripheral chemokine receptors, their ligands, cytokines and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 14:147-159.
- Reale M, Iarlori C, Gambi F, Lucci I, Salvatore M, Gambi D (2005) Acetylcholinesterase inhibitors effects on oncostatin-M, interleukin-1 beta and interleukin-6 release from lymphocytes of Alzheimer's disease patients. *Exp Gerontol* 40:165-171.
- Reale M, Iarlori C, Gambi F, Feliciani C, Salone A, Toma L, DeLuca G, Salvatore M, Conti P, Gambi D (2004) Treatment with an acetylcholinesterase inhibitor in Alzheimer patients modulates the expression and production of the pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines. *J Neuroimmunol* 148:162-171.
- Refolo LM, Malester B, LaFrancois J, Bryant-Thomas T, Wang R, Tint GS, Sambamurti K, Duff K, Pappolla MA (2000) Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis* 7:321-331.
- Reisberg B, Ferris SH, de Leon MJ, Crook T (1982) The Global Deterioration Scale for assessment of primary degenerative dementia. *Am J Psychiatry* 139:1136-1139.
- Ren JG, Li Z, Sacks DB (2008) IQGAP1 integrates Ca²⁺/calmodulin and B-Raf signaling. *J Biol Chem* 283:22972-22982.
- Repasky GA, Chenette EJ, Der CJ (2004) Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis? *Trends Cell Biol* 14:639-647.
- Repko EM, Maltese WA (1989) Post-translational isoprenylation of cellular proteins is altered in response to mevalonate availability. *J Biol Chem* 264:9945-9952.
- Richartz-Salzbunger E, Batra A, Stransky E, Laske C, Kohler N, Bartels M, Buchkremer G, Schott K (2007) Altered lymphocyte distribution in Alzheimer's disease. *J Psychiatr Res* 41:174-178.
- Rickle A, Bogdanovic N, Volkman I, Winblad B, Ravid R, Cowburn RF (2004) Akt activity in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Neuroreport* 15:955-959.
- Ringheim GE, Szczepanik AM, Petko W, Burgher KL, Zhu SZ, Chao CC (1998) Enhancement of beta-amyloid precursor protein transcription and expression by the soluble interleukin-6 receptor/interleukin-6 complex. *Brain Res Mol Brain Res* 55:35-44.
- Risner ME, Saunders AM, Altman JF, Ormandy GC, Craft S, Foley IM, Zvartau-Hind ME, Hosford DA, Roses AD (2006) Efficacy of rosiglitazone in a genetically defined population with mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Pharmacogenomics J* 6:246-254.

- Robison SH, Munzer JS, Tandan R, Bradley WG (1987) Alzheimer's disease cells exhibit defective repair of alkylating agent-induced DNA damage. *Ann Neurol* 21:250-258.
- Rocchi A, Pellegrini S, Siciliano G, Murri L (2003) Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review. *Brain Res Bull* 61:1-24.
- Rockwood K, Kirkland S, Hogan DB, MacKnight C, Merry H, Verreault R, Wolfson C, McDowell I (2002) Use of lipid-lowering agents, indication bias, and the risk of dementia in community-dwelling elderly people. *Arch Neurol* 59:223-227.
- Rogers JT, Lahiri DK (2004) Metal and inflammatory targets for Alzheimer's disease. *Curr Drug Targets* 5:535-551.
- Rogers JT, Leiter LM, McPhee J, Cahill CM, Zhan SS, Potter H, Nilsson LN (1999) Translation of the Alzheimer amyloid precursor protein mRNA is up-regulated by interleukin-1 through 5'-untranslated region sequences. *J Biol Chem* 274:6421-6431.
- Rohn TT, Rissman RA, Davis MC, Kim YE, Cotman CW, Head E (2002) Caspase-9 activation and caspase cleavage of tau in the Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Dis* 11:341-354.
- Rossig L, Badorff C, Holzmann Y, Zeiher AM, Dimmeler S (2002) Glycogen synthase kinase-3 couples AKT-dependent signaling to the regulation of p21Cip1 degradation. *J Biol Chem* 277:9684-9689.
- Sacksteder CA, Whittier JE, Xiong Y, Li J, Galeva NA, Jacoby ME, Purvine SO, Williams TD, Rechsteiner MC, Bigelow DJ, Squier TC (2006) Tertiary structural rearrangements upon oxidation of Methionine145 in calmodulin promotes targeted proteasomal degradation. *Biophys J* 91:1480-1493.
- Saito K, Elce JS, Hamos JE, Nixon RA (1993) Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: a potential molecular basis for neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2628-2632.
- Saito T, Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Takano J, Huang SM, Suemoto T, Higuchi M, Saido TC (2005) Somatostatin regulates brain amyloid beta peptide Abeta42 through modulation of proteolytic degradation. *Nat Med* 11:434-439.
- Sala G, Trombin F, Mattavelli L, Beretta S, Tremolizzo L, Andreoni S, Calabrese E, Sanvito L, Ferrarese C (2009) Lack of evidence for oxidative stress in sporadic amyotrophic lateral sclerosis fibroblasts. *Neurodegener Dis* 6:9-15.
- Sala SG, Munoz U, Bartolome F, Bermejo F, Martin-Requero A (2008) HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin inhibits cell cycle progression at the G1/S checkpoint in immortalized lymphocytes from Alzheimer's disease patients independently of cholesterol-lowering effects. *J Pharmacol Exp Ther* 324:352-359.
- Salvesen GS, Dixit VM (1997) Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91:443-446.
- Sangfelt O, Erickson S, Castro J, Heiden T, Gustafsson A, Einhorn S, Grandér D (1999) Molecular mechanisms underlying interferon-alpha-induced G0/G1 arrest: CKI-mediated regulation of G1 Cdk-complexes and activation of pocket proteins. *Oncogene* 18:2798-2810.
- Sapronov NS, Bul'on VV, Krylova IB, Gavrovskaya LK, Selina EN, Evdokimova NR (2006) Cerebroprotective effect of a new taurine derivative during cerebral ischemia. *Bull Exp Biol Med* 141:44-47.
- Sassano A, Plataniias LC (2008) Statins in tumor suppression. *Cancer Lett* 260:11-19.
- Sastre M, Dewachter I, Rossner S, Bogdanovic N, Rosen E, Borghgraef P, Evert BO, Dumitrescu-Ozimek L, Thal DR, Landreth G, Walter J, Klockgether T, van Leuven F,

- Heneka MT (2006) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs repress beta-secretase gene promoter activity by the activation of PPARgamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:443-448.
- Sayre LM, Smith MA, Perry G (2001) Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Curr Med Chem* 8:721-738.
 - Schellenberg GD (1995) Progress in Alzheimer's disease genetics. *Curr Opin Neurol* 8:262-267.
 - Schenk D (2002) Amyloid-beta immunotherapy for Alzheimer's disease: the end of the beginning. *Nat Rev Neurosci* 3:824-828.
 - Schipper HM, Chertkow H, Mehindate K, Frankel D, Melmed C, Bergman H (2000) Evaluation of heme oxygenase-1 as a systemic biological marker of sporadic AD. *Neurology* 54:1297-1304.
 - Schmalzigaug R, Ye Q, Berchtold MW (2001) Calmodulin protects cells from death under normal growth conditions and mitogenic starvation but plays a mediating role in cell death upon B-cell receptor stimulation. *Immunology* 103:332-342.
 - Schmidt R, Schmidt H, Curb JD, Masaki K, White LR, Launer LJ (2002) Early inflammation and dementia: a 25-year follow-up of the Honolulu-Asia Aging Study. *Ann Neurol* 52:168-174.
 - Scott CW, Vulliet PR, Caputo CB (1993) Phosphorylation of tau by proline-directed protein kinase (p34cdc2/p58cyclin A) decreases tau-induced microtubule assembly and antibody SMI33 reactivity. *Brain Res* 611:237-242.
 - Seigneurin JM, Guilbert B, Bourgeat MJ, Avrameas S (1988) Polyspecific natural antibodies and autoantibodies secreted by human lymphocytes immortalized with Epstein-Barr virus. *Blood* 71:581-585.
 - Selkoe DJ (1991) The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6:487-498.
 - Selkoe DJ (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81:741-766.
 - Serra JA, Famulari AL, Kohan S, Marschoff ER, Dominguez RO, de Lustig ES (1994) Copper-zinc superoxide dismutase activity in red blood cells in probable Alzheimer's patients and their first-degree relatives. *J Neurol Sci* 122:179-188.
 - Serratos J, Pujol MJ, Bachs O, Carafoli E (1988) Rearrangement of nuclear calmodulin during proliferative liver cell activation. *Biochem Biophys Res Commun* 150:1162-1169.
 - Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ (2008) Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 14:837-842.
 - Sharma G, Singh RP, Agarwal R (2003) Growth inhibitory and apoptotic effects of inositol hexaphosphate in transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP-C1) cells. *Int J Oncol* 23:1413-1418.
 - Shastry BS, Giblin FJ (1999) Genes and susceptible loci of Alzheimer's disease. *Brain Res Bull* 48:121-127.
 - Shelton SB, Krishnamurthy P, Johnson GV (2004) Effects of cyclin-dependent kinase-5 activity on apoptosis and tau phosphorylation in immortalized mouse brain cortical cells. *J Neurosci Res* 76:110-120.
 - Sheng JG, Zhou XQ, Mrak RE, Griffin WS (1998) Progressive neuronal injury associated with amyloid plaque formation in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:714-717.

- Sheng JG, Bora SH, Xu G, Borchelt DR, Price DL, Koliatsos VE (2003) Lipopolysaccharide-induced-neuroinflammation increases intracellular accumulation of amyloid precursor protein and amyloid beta peptide in APP^{swe} transgenic mice. *Neurobiol Dis* 14:133-145.
- Sherr CJ, Roberts JM (1995) Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9:1149-1163.
- Sherr CJ, Roberts JM (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13:1501-1512.
- Shimohama S (2000) Apoptosis in Alzheimer's disease--an update. *Apoptosis* 5:9-16.
- Shin I, Yakes FM, Rojo F, Shin NY, Bakin AV, Baselga J, Arteaga CL (2002) PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med* 8:1145-1152.
- Shirane M, Harumiya Y, Ishida N, Hirai A, Miyamoto C, Hatakeyama S, Nakayama K, Kitagawa M (1999) Down-regulation of p27(Kip1) by two mechanisms, ubiquitin-mediated degradation and proteolytic processing. *J Biol Chem* 274:13886-13893.
- Simons M, Keller P, Dichgans J, Schulz JB (2001) Cholesterol and Alzheimer's disease: is there a link? *Neurology* 57:1089-1093.
- Simons M, Keller P, De Strooper B, Beyreuther K, Dotti CG, Simons K (1998) Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6460-6464.
- Skoog I, Gustafson D (2002) Hypertension and related factors in the etiology of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 977:29-36.
- Smale G, Nichols NR, Brady DR, Finch CE, Horton WE, Jr. (1995) Evidence for apoptotic cell death in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 133:225-230.
- Smith MZ, Nagy Z, Esiri MM (1999) Cell cycle-related protein expression in vascular dementia and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 271:45-48.
- Song G, Ouyang G, Bao S (2005) The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 9:59-71.
- Sparks DL (1996) Intraneuronal beta-amyloid immunoreactivity in the CNS. *Neurobiol Aging* 17:291-299.
- Sparks DL, Scheff SW, Hunsaker JC, 3rd, Liu H, Landers T, Gross DR (1994) Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol. *Exp Neurol* 126:88-94.
- Speciale L, Calabrese E, Saresella M, Tinelli C, Mariani C, Sanvito L, Longhi R, Ferrante P (2007) Lymphocyte subset patterns and cytokine production in Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging* 28:1163-1169.
- Spremo-Potparevic B, Zivkovic L, Djelic N, Bajic V (2004) Analysis of premature centromere division (PCD) of the X chromosome in Alzheimer patients through the cell cycle. *Exp Gerontol* 39:849-854.
- Spremo-Potparevic B, Zivkovic L, Djelic N, Plecas-Solarovic B, Smith MA, Bajic V (2008) Premature centromere division of the X chromosome in neurons in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 106:2218-2223.
- Stadelmann C, Deckwerth TL, Srinivasan A, Bancher C, Bruck W, Jellinger K, Lassmann H (1999) Activation of caspase-3 in single neurons and autophagic granules of granulovacuolar degeneration in Alzheimer's disease. Evidence for apoptotic cell death. *Am J Pathol* 155:1459-1466.

- Stalder M, Phinney A, Probst A, Sommer B, Staufenbiel M, Jucker M (1999) Association of microglia with amyloid plaques in brains of APP23 transgenic mice. *Am J Pathol* 154:1673-1684.
- Stavrovskaya IG, Kristal BS (2005) The powerhouse takes control of the cell: is the mitochondrial permeability transition a viable therapeutic target against neuronal dysfunction and death? *Free Radic Biol Med* 38:687-697.
- Stefanis L (2005) Caspase-dependent and -independent neuronal death: two distinct pathways to neuronal injury. *Neuroscientist* 11:50-62.
- Stefanis L, Park DS, Friedman WJ, Greene LA (1999) Caspase-dependent and -independent death of camptothecin-treated embryonic cortical neurons. *J Neurosci* 19:6235-6247.
- Stein TD, Johnson JA (2002) Lack of neurodegeneration in transgenic mice overexpressing mutant amyloid precursor protein is associated with increased levels of transthyretin and the activation of cell survival pathways. *J Neurosci* 22:7380-7388.
- Stern Y (2006) Cognitive reserve and Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 20:S69-74.
- Stieler JT, Lederer C, Bruckner MK, Wolf H, Holzer M, Gertz HJ, Arendt T (2001) Impairment of mitogenic activation of peripheral blood lymphocytes in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 12:3969-3972.
- Strum JC, Shehee R, Virley D, Richardson J, Mattie M, Selley P, Ghosh S, Nock C, Saunders A, Roses A (2007) Rosiglitazone induces mitochondrial biogenesis in mouse brain. *J Alzheimers Dis* 11:45-51.
- Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Burki K, Frey P, Paganetti PA, Waridel C, Calhoun ME, Jucker M, Probst A, Staufenbiel M, Sommer B (1997) Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13287-13292.
- Su JH, Anderson AJ, Cummings BJ, Cotman CW (1994) Immunohistochemical evidence for apoptosis in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 5:2529-2533.
- Sugawara T, Ayer R, Jadhav V, Chen W, Tsubokawa T, Zhang JH (2008) Simvastatin attenuation of cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in rats via increased phosphorylation of Akt and endothelial nitric oxide synthase. *J Neurosci Res* 86:3635-3643.
- Sun YX, Wright HT, Janciauskiene S (2002) Alpha1-antichymotrypsin/Alzheimer's peptide A β (1-42) complex perturbs lipid metabolism and activates transcription factors PPAR γ and NF κ B in human neuroblastoma (Kelly) cells. *J Neurosci Res* 67:511-522.
- Sviridov D, Nestel P, Watts G (2007) Statins and metabolism of high density lipoprotein. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 5:215-221.
- Tacconi S, Perri R, Balestrieri E, Grelli S, Bernardini S, Annichiarico R, Mastino A, Caltagirone C, Macchi B (2004) Increased caspase activation in peripheral blood mononuclear cells of patients with Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 190:254-262.
- Takahashi H, Mercken M, Honda T, Saito Y, Murayama M, Song S, Takashima A (1999) Impaired proteolytic processing of presenilin-1 in chromosome 14-linked familial Alzheimer's disease patient lymphocytes. *Neurosci Lett* 260:121-124.
- Takeda I, Maruya S, Shirasaki T, Mizukami H, Takahata T, Myers JN, Kakehata S, Yagihashi S, Shinkawa H (2007) Simvastatin inactivates beta1-integrin and extracellular signal-related kinase signaling and inhibits cell proliferation in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Cancer Sci* 98:890-899.

- Tan J, Town T, Suo Z, Wu Y, Song S, Kundtz A, Kroeger J, Humphrey J, Crawford F, Mullan M (1999) Induction of CD40 on human endothelial cells by Alzheimer's beta-amyloid peptides. *Brain Res Bull* 50:143-148.
- Tang BN, Minoshima S, George J, Robert A, Swine C, Laloux P, Borghet TV (2004) Diagnosis of suspected Alzheimer's disease is improved by automated analysis of regional cerebral blood flow. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 31:1487-1494.
- Tanzi RE (1999) A genetic dichotomy model for the inheritance of Alzheimer's disease and common age-related disorders. *J Clin Invest* 104:1175-1179.
- Tariot PN, Farlow MR, Grossberg GT, Graham SM, McDonald S, Gergel I (2004) Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving donepezil: a randomized controlled trial. *Jama* 291:317-324.
- Tatebayashi Y, Takeda M, Kashiwagi Y, Okochi M, Kurumadani T, Sekiyama A, Kanayama G, Hariguchi S, Nishimura T (1995) Cell-cycle-dependent abnormal calcium response in fibroblasts from patients with familial Alzheimer's disease. *Dementia* 6:9-16.
- Terry RD (1963) The Fine Structure of Neurofibrillary Tangles in Alzheimer's Disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 22:629-642.
- Terry RD (1978) Senile dementia. *Fed Proc* 37:2837-2840.
- Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R (1991) Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 30:572-580.
- Thibault A, Samid D, Tompkins AC, Figg WD, Cooper MR, Hohl RJ, Trepel J, Liang B, Patronas N, Venzon DJ, Reed E, Myers CE (1996) Phase I study of lovastatin, an inhibitor of the mevalonate pathway, in patients with cancer. *Clin Cancer Res* 2:483-491.
- Thornberry NA, Lazebnik Y (1998) Caspases: enemies within. *Science* 281:1312-1316.
- Tobinick E, Gross H, Weinberger A, Cohen H (2006) TNF-alpha modulation for treatment of Alzheimer's disease: a 6-month pilot study. *MedGenMed* 8:25.
- Tolkovsky AM, Xue L, Fletcher GC, Borutaite V (2002) Mitochondrial disappearance from cells: a clue to the role of autophagy in programmed cell death and disease? *Biochimie* 84:233-240.
- Tomokane N, Iwaki T, Tateishi J, Iwaki A, Goldman JE (1991) Rosenthal fibers share epitopes with alpha B-crystallin, glial fibrillary acidic protein, and ubiquitin, but not with vimentin. *Immunoelectron microscopy with colloidal gold. Am J Pathol* 138:875-885.
- Tonkonogy J, Moak GS (1988) Alois Alzheimer on presenile dementia. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 1:199-206.
- Toutenhoofd SL, Strehler EE (2000) The calmodulin multigene family as a unique case of genetic redundancy: multiple levels of regulation to provide spatial and temporal control of calmodulin pools? *Cell Calcium* 28:83-96.
- Town T, Nikolic V, Tan J (2005) The microglial "activation" continuum: from innate to adaptive responses. *J Neuroinflammation* 2:24.
- Townsend KP, Pratico D (2005) Novel therapeutic opportunities for Alzheimer's disease: focus on nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Faseb J* 19:1592-1601.
- Townsend KP, Town T, Mori T, Lue LF, Shytle D, Sanberg PR, Morgan D, Fernandez F, Flavell RA, Tan J (2005) CD40 signaling regulates innate and adaptive activation of microglia in response to amyloid beta-peptide. *Eur J Immunol* 35:901-910.

- Traverse S, Gomez N, Paterson H, Marshall C, Cohen P (1992) Sustained activation of the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade may be required for differentiation of PC12 cells. Comparison of the effects of nerve growth factor and epidermal growth factor. *Biochem J* 288 (Pt 2):351-355.
- Trinh NH, Hoblyn J, Mohanty S, Yaffe K (2003) Efficacy of cholinesterase inhibitors in the treatment of neuropsychiatric symptoms and functional impairment in Alzheimer disease: a meta-analysis. *Jama* 289:210-216.
- Troncoso JC, Sukhov RR, Kawas CH, Koliatsos VE (1996) In situ labeling of dying cortical neurons in normal aging and in Alzheimer's disease: correlations with senile plaques and disease progression. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:1134-1142.
- Trump DL, Hershberger PA, Bernardi RJ, Ahmed S, Muindi J, Fakih M, Yu WD, Johnson CS (2004) Anti-tumor activity of calcitriol: pre-clinical and clinical studies. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90:519-526.
- Tsuji A, Saheki A, Tamai I, Terasaki T (1993) Transport mechanism of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors at the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* 267:1085-1090.
- Tuppo EE, Arias HR (2005) The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 37:289-305.
- Uberti D, Lanni C, Racchi M, Govoni S, Memo M (2008) Conformationally altered p53: a putative peripheral marker for Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis* 5:209-211.
- Uberti D, Lanni C, Carsana T, Francisconi S, Missale C, Racchi M, Govoni S, Memo M (2006) Identification of a mutant-like conformation of p53 in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging* 27:1193-1201.
- Uberti D, Carsana T, Bernardi E, Rodella L, Grigolato P, Lanni C, Racchi M, Govoni S, Memo M (2002) Selective impairment of p53-mediated cell death in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients. *J Cell Sci* 115:3131-3138.
- Urcelay E, Ibarreta D, Parrilla R, Ayuso MS, Martin-Requero A (2001) Enhanced proliferation of lymphoblasts from patients with Alzheimer dementia associated with calmodulin-dependent activation of the na⁺/H⁺ exchanger. *Neurobiol Dis* 8:289-298.
- van de Donk NW, Kamphuis MM, Lokhorst HM, Bloem AC (2002) The cholesterol lowering drug lovastatin induces cell death in myeloma plasma cells. *Leukemia* 16:1362-1371.
- Van Den Bosch L, Van Damme P, Bogaert E, Robberecht W (2006) The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1762:1068-1082.
- van Leeuwen FW, de Kleijn DP, van den Hurk HH, Neubauer A, Sonnemans MA, Sluijs JA, Koycu S, Ramdjielal RD, Salehi A, Martens GJ, Grosveld FG, Peter J, Burbach H, Hol EM (1998) Frameshift mutants of beta amyloid precursor protein and ubiquitin-B in Alzheimer's and Down patients. *Science* 279:242-247.
- van Loo G, Saelens X, van Gorp M, MacFarlane M, Martin SJ, Vandenabeele P (2002) The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ* 9:1031-1042.
- Vanderhoeven I, Cras P, Martin JJ, Van Broeckhoven C, De Jonghe C (1999) Proteolytic processing of presenilin-1 in human lymphoblasts is not affected by the presence of the I143T and G384A mutations. *Neurosci Lett* 274:183-186.

- Vasto S, Mocchegiani E, Candore G, Listi F, Colonna-Romano G, Lio D, Malavolta M, Giacconi R, Cipriano C, Caruso C (2006) Inflammation, genes and zinc in ageing and age-related diseases. *Biogerontology* 7:315-327.
- Vasto S, Candore G, Balistreri CR, Caruso M, Colonna-Romano G, Grimaldi MP, Listi F, Nuzzo D, Lio D, Caruso C (2007) Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. *Mech Ageing Dev* 128:83-91.
- Vasto S, Candore G, Listi F, Balistreri CR, Colonna-Romano G, Malavolta M, Lio D, Nuzzo D, Mocchegiani E, Di Bona D, Caruso C (2008) Inflammation, genes and zinc in Alzheimer's disease. *Brain Res Rev* 58:96-105.
- Vaux DL, Cory S, Adams JM (1988) Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335:440-442.
- Verdaguer E, Garcia-Jorda E, Canudas AM, Dominguez E, Jimenez A, Pubill D, Escubedo E, Pallas JC, Camins A (2002) Kainic acid-induced apoptosis in cerebellar granule neurons: an attempt at cell cycle re-entry. *Neuroreport* 13:413-416.
- Vignini A, Nanetti L, Moroni C, Tanase L, Bartolini M, Luzzi S, Provinciali L, Mazzanti L (2007) Modifications of platelet from Alzheimer disease patients: a possible relation between membrane properties and NO metabolites. *Neurobiol Aging* 28:987-994.
- Villemagne VL, Fodero-Tavoletti MT, Pike KE, Cappai R, Masters CL, Rowe CC (2008) The ART of loss: Abeta imaging in the evaluation of Alzheimer's disease and other dementias. *Mol Neurobiol* 38:1-15.
- Vincent I, Rosado M, Davies P (1996) Mitotic mechanisms in Alzheimer's disease? *J Cell Biol* 132:413-425.
- Vincent I, Jicha G, Rosado M, Dickson DW (1997) Aberrant expression of mitotic cdc2/cyclin B1 kinase in degenerating neurons of Alzheimer's disease brain. *J Neurosci* 17:3588-3598.
- Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 269:5241-5248.
- Vogt A, Sun J, Qian Y, Hamilton AD, Sefti SM (1997) The geranylgeranyltransferase-I inhibitor GGTI-298 arrests human tumor cells in G0/G1 and induces p21(WAF1/CIP1/SDI1) in a p53-independent manner. *J Biol Chem* 272:27224-27229.
- Vuocolo S, Soprano DR, Soprano KJ (2004) p27/Kip1 mediates retinoic acid-induced suppression of ovarian carcinoma cell growth. *J Cell Physiol* 199:237-243.
- Wainwright LJ, Lasorella A, Iavarone A (2001) Distinct mechanisms of cell cycle arrest control the decision between differentiation and senescence in human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9396-9400.
- Wakabayashi T, De Strooper B (2008) Presenilins: members of the gamma-secretase quartets, but part-time soloists too. *Physiology (Bethesda)* 23:194-204.
- Walsh DM, Selkoe DJ (2004) Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* 44:181-193.
- Walsh DM, Selkoe DJ (2007) A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem* 101:1172-1184.
- Wang CX, Shuaib A (2005) NMDA/NR2B selective antagonists in the treatment of ischemic brain injury. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 4:143-151.
- Wang F, Gregory C, Sample C, Rowe M, Liebowitz D, Murray R, Rickinson A, Kieff E (1990) Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) and nuclear proteins 2 and 3C

are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes: EBNA-2 and LMP1 cooperatively induce CD23. *J Virol* 64:2309-2318.

- Wang X, Su B, Fujioka H, Zhu X (2008) Dynamin-like protein 1 reduction underlies mitochondrial morphology and distribution abnormalities in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients. *Am J Pathol* 173:470-482.
- Watson GS, Cholerton BA, Reger MA, Baker LD, Plymate SR, Asthana S, Fishel MA, Kulstad JJ, Green PS, Cook DG, Kahn SE, Keeling ML, Craft S (2005) Preserved cognition in patients with early Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment during treatment with rosiglitazone: a preliminary study. *Am J Geriatr Psychiatry* 13:950-958.
- Webster SD, Tenner AJ, Poulos TL, Cribbs DH (1999) The mouse C1q A-chain sequence alters beta-amyloid-induced complement activation. *Neurobiol Aging* 20:297-304.
- Wei W, Wang X, Kusiak JW (2002) Signaling events in amyloid beta-peptide-induced neuronal death and insulin-like growth factor I protection. *J Biol Chem* 277:17649-17656.
- Weiss RH, Ramirez A, Joo A (1999) Short-term pravastatin mediates growth inhibition and apoptosis, independently of Ras, via the signaling proteins p27Kip1 and P13 kinase. *J Am Soc Nephrol* 10:1880-1890.
- Wenk GL, Parsons CG, Danysz W (2006) Potential role of N-methyl-D-aspartate receptors as executors of neurodegeneration resulting from diverse insults: focus on memantine. *Behav Pharmacol* 17:411-424.
- Westerman MA, Cooper-Blacketer D, Mariash A, Kotilinek L, Kawarabayashi T, Younkin LH, Carlson GA, Younkin SG, Ashe KH (2002) The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 22:1858-1867.
- White P, Hiley CR, Goodhardt MJ, Carrasco LH, Keet JP, Williams IE, Bowen DM (1977) Neocortical cholinergic neurons in elderly people. *Lancet* 1:668-671.
- Wilcock DM, Jantzen PT, Li Q, Morgan D, Gordon MN (2007) Amyloid-beta vaccination, but not nitro-nonsteroidal anti-inflammatory drug treatment, increases vascular amyloid and microhemorrhage while both reduce parenchymal amyloid. *Neuroscience* 144:950-960.
- Wilcock DM, Munireddy SK, Rosenthal A, Ugen KE, Gordon MN, Morgan D (2004) Microglial activation facilitates Abeta plaque removal following intracranial anti-Abeta antibody administration. *Neurobiol Dis* 15:11-20.
- Wild R, Pettit T, Burns A (2003) Cholinesterase inhibitors for dementia with Lewy bodies. *Cochrane Database Syst Rev*:CD003672.
- Wilson JT (2003) Head injury and Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74:841.
- Wippold FJ, 2nd, Perry A, Lennerz J (2006) Neuropathology for the neuroradiologist: Rosenthal fibers. *AJNR Am J Neuroradiol* 27:958-961.
- Wippold FJ, 2nd, Cairns N, Vo K, Holtzman DM, Morris JC (2008) Neuropathology for the neuroradiologist: plaques and tangles. *AJNR Am J Neuroradiol* 29:18-22.
- Wolozin B (2004) Cholesterol, statins and dementia. *Curr Opin Lipidol* 15:667-672.
- Wolozin B, Brown J, 3rd, Theisler C, Silberman S (2004) The cellular biochemistry of cholesterol and statins: insights into the pathophysiology and therapy of Alzheimer's disease. *CNS Drug Rev* 10:127-146.
- Wolozin B, Kellman W, Ruosseau P, Celesia GG, Siegel G (2000) Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol* 57:1439-1443.

- Woods J, Snape M, Smith MA (2007) The cell cycle hypothesis of Alzheimer's disease: suggestions for drug development. *Biochim Biophys Acta* 1772:503-508.
- Wu F, Buckley S, Bui KC, Yee A, Wu HY, Liu J, Warburton D (1996) Cell cycle arrest in G0/G1 phase by contact inhibition and TGF-beta 1 in mink Mv1Lu lung epithelial cells. *Am J Physiol* 270:L879-888.
- Wu Q, Chen Z, Su W (2001) Growth inhibition of gastric cancer cells by all-trans retinoic acid through arresting cell cycle progression. *Chin Med J (Engl)* 114:958-961.
- Wymann MP, Marone R (2005) Phosphoinositide 3-kinase in disease: timing, location, and scaffolding. *Curr Opin Cell Biol* 17:141-149.
- Xie L, Helmerhorst E, Taddei K, Plewright B, Van Bronswijk W, Martins R (2002) Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor. *J Neurosci* 22:RC221.
- Xu RX, Chen X, Hu SS, Chen JH, Liu XW, Liu XB, Shi LH, Cong XF (2008) [Lovastatin protects mesenchymal stem cells against hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis through activation of PI3K/Akt and ERK1/2 signaling pathways]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* 36:685-690.
- Yamaguchi H, Hirai S, Morimatsu M, Shoji M, Harigaya Y (1988) Diffuse type of senile plaques in the brains of Alzheimer-type dementia. *Acta Neuropathol* 77:113-119.
- Yamamoto M, Kiyota T, Horiba M, Buescher JL, Walsh SM, Gendelman HE, Ikezu T (2007) Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha regulate amyloid-beta plaque deposition and beta-secretase expression in Swedish mutant APP transgenic mice. *Am J Pathol* 170:680-692.
- Yang JT, Lee TH, Weng HH, Chang CN, Chen WC, Cheng WC, Wu JH (2005) Dexamethasone enhances NT-3 expression in rat hippocampus after traumatic brain injury. *Exp Neurol* 192:437-443.
- Yang Y, Herrup K (2007) Cell division in the CNS: protective response or lethal event in post-mitotic neurons? *Biochim Biophys Acta* 1772:457-466.
- Yang Y, Geldmacher DS, Herrup K (2001) DNA replication precedes neuronal cell death in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21:2661-2668.
- Yang Y, Mufson EJ, Herrup K (2003) Neuronal cell death is preceded by cell cycle events at all stages of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 23:2557-2563.
- Yang Y, Varvel NH, Lamb BT, Herrup K (2006) Ectopic cell cycle events link human Alzheimer's disease and amyloid precursor protein transgenic mouse models. *J Neurosci* 26:775-784.
- Yankner BA, Lu T (2009) Amyloid beta-protein toxicity and the pathogenesis of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 284:4755-4759.
- Yano S, Tokumitsu H, Soderling TR (1998) Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. *Nature* 396:584-587.
- Yao Y, Tsien RY (1997) Calcium current activated by depletion of calcium stores in *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol* 109:703-715.
- Ye Q, Wei Y, Fischer R, Borner C, Berchtold MW (1997) Expression of calmodulin and calmodulin binding proteins in rat fibroblasts stably transfected with protein kinase C and oncogenes. *Biochim Biophys Acta* 1359:89-96.
- Younkin SG (1995) Evidence that A beta 42 is the real culprit in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 37:287-288.

- Yu HL, Chertkow HM, Bergman H, Schipper HM (2003) Aberrant profiles of native and oxidized glycoproteins in Alzheimer plasma. *Proteomics* 3:2240-2248.
- Yu WH, Cuervo AM, Kumar A, Peterhoff CM, Schmidt SD, Lee JH, Mohan PS, Mercken M, Farmery MR, Tjernberg LO, Jiang Y, Duff K, Uchiyama Y, Naslund J, Mathews PM, Cataldo AM, Nixon RA (2005a) Macroautophagy--a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 171:87-98.
- Zainaghi IA, Forlenza OV, Gattaz WF (2007) Abnormal APP processing in platelets of patients with Alzheimer's disease: correlations with membrane fluidity and cognitive decline. *Psychopharmacology (Berl)* 192:547-553.
- Zana M, Szecsenyi A, Czibula A, Bjelik A, Juhasz A, Rimanoczy A, Szabo K, Vetro A, Szucs P, Varkonyi A, Pakaski M, Boda K, Rasko I, Janka Z, Kalman J (2006) Age-dependent oxidative stress-induced DNA damage in Down's lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 345:726-733.
- Zendejui JG, Zielinski RE, Watterson DM, Van Eldik LJ (1984) Biosynthesis of calmodulin in normal and virus-transformed chicken embryo fibroblasts. *Mol Cell Biol* 4:883-889.
- Zhao WQ, Feng C, Alkon DL (2003) Impairment of phosphatase 2A contributes to the prolonged MAP kinase phosphorylation in Alzheimer's disease fibroblasts. *Neurobiol Dis* 14:458-469.
- Zhao WQ, Ravindranath L, Mohamed AS, Zohar O, Chen GH, Lyketsos CG, Etcheberrigaray R, Alkon DL (2002) MAP kinase signaling cascade dysfunction specific to Alzheimer's disease in fibroblasts. *Neurobiol Dis* 11:166-183.
- Zhong LT, Kane DJ, Bredesen DE (1993) BCL-2 blocks glutamate toxicity in neural cell lines. *Brain Res Mol Brain Res* 19:353-355.
- Zhu X, Smith MA, Perry G, Aliev G (2004a) Mitochondrial failures in Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 19:345-352.
- Zhu X, Raina AK, Perry G, Smith MA (2004b) Alzheimer's disease: the two-hit hypothesis. *Lancet Neurol* 3:219-226.
- Zhu X, Lee HG, Perry G, Smith MA (2007) Alzheimer disease, the two-hit hypothesis: an update. *Biochim Biophys Acta* 1772:494-502.
- Zhu X, Lee HG, Raina AK, Perry G, Smith MA (2002) The role of mitogen-activated protein kinase pathways in Alzheimer's disease. *Neurosignals* 11:270-281.
- Zhu X, Raina AK, Lee HG, Casadesus G, Smith MA, Perry G (2004c) Oxidative stress signalling in Alzheimer's disease. *Brain Res* 1000:32-39.
- Zhu X, Castellani RJ, Takeda A, Nunomura A, Atwood CS, Perry G, Smith MA (2001) Differential activation of neuronal ERK, JNK/SAPK and p38 in Alzheimer disease: the 'two hit' hypothesis. *Mech Ageing Dev* 123:39-46.
- Zhu X, Lee HG, Casadesus G, Avila J, Drew K, Perry G, Smith MA (2005) Oxidative imbalance in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 31:205-217.
- Zhu X, Webber KM, Casadesus G, Raina AK, Lee HG, Marlatt M, Hartzler A, Atwood CS, Perry G, Smith MA (2004d) Mitotic and gender parallels in Alzheimer disease: therapeutic opportunities. *Curr Drug Targets* 5:559-563.
- Ziegler U, Groscurth P (2004) Morphological features of cell death. *News Physiol Sci* 19:124-128.
- Zipp F, Waiczies S, Aktas O, Neuhaus O, Hemmer B, Schraven B, Nitsch R, Hartung HP (2007) Impact of HMG-CoA reductase inhibition on brain pathology. *Trends Pharmacol Sci* 28:342-349.

- Zivkovic L, Spremo-Potparevic B, Djelic N, Bajic V (2006) Analysis of premature centromere division (PCD) of the chromosome 18 in peripheral blood lymphocytes in Alzheimer disease patients. *Mech Ageing Dev* 127:892-896.

Anexos

Research Article

Impaired apoptosis in lymphoblasts from Alzheimer's disease patients: Cross-talk of Ca²⁺/calmodulin and ERK1/2 signaling pathways

F. Bartolomé^{a, +}, N. de las Cuevas^{a, +}, Ú. Muñoz^a, F. Bermejo^b and Á. Martín-Requero^{a, *}

^a Department of Cellular and Molecular Pathophysiology, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Ramiro de Maéztu 9, 28040 Madrid (Spain), Fax: +34 91 536 0432, e-mail: amrequero@cib.csic.es

^b Hospital Doce de Octubre, Avda de Córdoba s/n, 28041 Madrid (Spain)

Received 14 February 2007; received after revision 16 April 2007; accepted 23 April 2007

Abstract. We have analyzed the intracellular signals that allow lymphoblasts from Alzheimer's disease (AD) patients to escape from serum deprivation-induced apoptosis. The following observations suggested that modulation of ERK1/2 activity by Ca²⁺/calmodulin (CaM) is involved in preventing apoptosis: (i) ERK1/2 activity seems to support lethality in control cells, as PD98059, the inhibitor of the activating MEK prevented cell death; (ii) control cells show a persistent and higher stimulation of ERK1/2 than that of AD cells in the absence of serum; (iii) CaM

antagonists have no effects on control cells, but sensitize AD cells to death induced by serum withdrawal and increased ERK1/2 phosphorylation, and (iv) no apoptotic effects of CaM antagonists were observed in AD cells treated with PD98059. These results suggest the existence of an activation threshold of the ERK1/2 pathway setting by Ca²⁺/CaM-dependent mechanisms, which appears to be the critical factor controlling cell survival or death decision under trophic factor withdrawal.

Keywords. Alzheimer's disease, lymphocytes, cell survival, Ca²⁺/calmodulin, ERKs.

Introduction

Evidence has been accumulating that some neurons degenerate via apoptotic pathways in Alzheimer's disease (AD). Apoptosis and cell cycle deregulation have been linked with the recurrence of certain types of neuronal cell death. The interpretation of these findings is that a differentiated cell like the neuron is committed to the permanent cessation of cell division, so if for any reason it is forced to enter the cell cycle it

dies. Strong support for the role of cell cycle events in neuronal loss in AD comes from the observation that AD neurons contain multiple markers spanning different phases of cell cycle [1–4]. Furthermore, it has been demonstrated [5] that a significant fraction of the hippocampal pyramidal and basal forebrain neurons have fully or partially replicated four independent loci of three different chromosomes. These anomalies were not found in unaffected regions of AD brains or in the hippocampus of non-demented age-matched controls. Moreover, cell cycle regulatory deficit is not restricted to neurons in AD patients [6–8].

⁺ Present address: Servicio de Inmunología, Hospital Gregorio Marañón, Madrid (Spain).

* Corresponding author.

Although AD is considered a neurological disease, changes in tissues other than brain in AD patients have been reported, suggesting that it is also systemic, and therefore peripheral tissues such as skin fibroblasts and lymphocytes have been used as a tool to investigate systemic derangement in various neuropsychiatric disorders [9]. Epstein-Barr virus (EBV) infection *in vitro* causes transformation of B cells and generates B lymphoblastoid cell lines (LCLs) [10]. These LCLs retain the phenotype and functions of mature B cells [11]. LCLs have been widely used as models in various biological and medical studies [12]. Previous work from this laboratory, using EBV-immortalized lymphocytes from late-onset AD patients, demonstrated a Ca^{2+} /calmodulin (CaM)-dependent stimulation of cell proliferation and survival of AD lymphoblasts compared with age-matched non-demented donors [13–15]. The enhanced proliferative activity of the AD cell lines was associated with a high degree of phosphorylation of pRb family proteins and increased activity of the E2F transcription factor, while the Ca^{2+} /CaM-induced increased survival of AD cells was accompanied by diminished NF- κ B-DNA binding activity [15].

This work was undertaken to further study the molecular mechanisms involved in the distinct Ca^{2+} /CaM-mediated regulation of cell survival in AD lymphoblasts. Considering the fact that some neuronal populations can survive the accumulating oxidative challenges and degenerative process during the development of AD, an understanding of the molecular mechanisms that can decrease the vulnerability of neurons and thus increase their resistance to stress conditions are of great interest. The results presented here show that lymphoblasts from AD patients are more resistant than those of non-demented subjects to apoptosis induced by serum starvation. The protective mechanism involves an impairment in the Ca^{2+} /CaM-dependent modulation of ERK1/2 signaling pathway and is accompanied by changes in Bcl-2/Bax ratio and caspase activity.

Materials and methods

Materials. All components for cell culture were obtained from Invitrogen (Barcelona, Spain). Serum replacement was obtained from Sigma-Aldrich (Alcobendas, Spain). The kinase inhibitors PD98059, SB202190, LY294002, and the caspase inhibitor benzoyloxy-carbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone (z-VAD-fmk) were obtained from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Radioactive compounds were purchased from Amersham (Uppsala, Sweden). Polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes for Western blots were purchased from Bio-Rad (Richmond, CA). Rabbit polyclonal antibodies against human phospho-Akt (Ser473), phospho-ERK1/2(Thr202/Tyr204), total ERK1/2, p38 MAPK, phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182), and goat polyclonal anti-body anti-total Akt were obtained from Cell Signaling (Beverly,

MA). Mouse anti-human Bcl-2 (100) mAb (SC-509) and rabbit anti-human Bax (N-20) pAb (SC-493) were from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA). The enhanced chemiluminescence (ECL) system was from Amersham. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), calmidazolium (CMZ), and the CAMKII inhibitor KN-62 were obtained from Sigma-Aldrich. All other reagents were of molecular biology grade.

Collection of peripheral blood and isolation of mononuclear cells. Peripheral blood (15 ml) was collected by venipuncture from seven AD patients and seven age-matched non-demented individuals. The AD cases were all considered to have sporadic late-onset AD (onset of symptoms >65 years; family history negative for neuropsychiatric disorders). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated on Lymphoprep™ density-gradient centrifugation according to the instructions of the manufacturer (Axi-Shield Po CAS, Oslo Norway). Cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), counted, and resuspended at the desired concentration. PBMCs were stimulated with a B cell mitogen (pokeweed mitogen, PWM). B cells were prepared by magnetic sorting using a B cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) according to the manufacturer's instructions. Briefly, PBMCs were harvested from the interface and were washed twice in PBS and incubated with anti-CD19 for 15 min at 4°C. Unlabeled cells were then isolated by elution from magnetic columns. B cells ($\sim 2 \times 10^5$ cells) were incubated in 0.2 ml RPMI for 3 days in the absence of serum and mitogens.

In all cases, peripheral blood samples were taken after written informed consent of the patients or their relatives.

Cell lines. Twenty patients diagnosed in the department of Neurology of the University Hospital Doce de Octubre (Madrid, Spain) as probable AD cases according to NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Diseases and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association) criteria were used in this study. The average age of onset of the disease was 74 ± 2 years. The frequency of the ApoE 4 allele was found to be 3% in the control group and 39% in the AD group in agreement with values previously reported for the normal and AD population in Spain [16], and were consistent with the late-onset form of AD. A group of 20 non-demented age-matched individuals was used as control.

Establishment of LCLs was performed in our laboratory as previously described [17], by infecting peripheral blood lymphocytes with the EBV [18]. Cells were grown in suspension in T flasks in an upright position, in approximately 10 ml RPMI 1640 (Gibco, BRL) medium that contained 2 mM L-glutamine, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ penicillin/streptomycin and, unless otherwise stated, 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) and maintained in a humidified 5% CO_2 incubator at 37°C. Fluid was routinely changed every 2 days by removing the medium above the settled cells and replacing it with an equal volume of fresh medium.

Determination of cell proliferation. Cell proliferation was assessed by the 5'-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation method using an enzyme-linked immunosorbent assay kit procured from Roche (Madrid, Spain). Cells (5000 cells/well) were seeded in 96-well microtiter plates. Four hours prior to the end of the interval of measurement, BrdU (10 μM) was added. The cells were fixed with precooled 70% ethanol for 30 min at -20°C and incubated with nucleases following manufacturer's recommendations. Cells were then treated for 30 min at 37°C with peroxidase-conjugated anti-BrdU antibody. Excess antibody was removed by washing the cells three times, followed by the addition of substrate solution. Absorbance was measured at 405 nm with a reference wavelength of 492 nm using a microplate reader.

MTT colorimetric survival assay. Active mitochondria of living cells can cleave MTT to produce formazan, the amount of which is directly proportional to the living cell number. Cell survival was assessed essentially as described [19]. Cells were incubated with 1 mg/ml MTT in a reaction volume of 200 μl . After the incubation DMSO was added to dissolve formazan crystals. Dye absorbance in viable cells was measured at 570 nm with 630 nm as a reference wavelength. Cell survival was estimated as the percentage of the

value of untreated controls. In some experiments cell survival was determined by direct cell counting in a Neubauer chamber. Potential toxicity of the reagents used was routinely checked by trypan blue exclusion under inverted phase-contrast microscopy.

Cell cycle analysis. Exponentially growing cultures of cell lines were seeded at an initial concentration of 1×10^6 cells/ml. Cell cycle analysis was performed using a standard method [20]. Cells were fixed in 75 % ethanol for 1 h at room temperature. Subsequent centrifugation of the samples was followed by incubation of cells in PBS containing 1 μ g/ml RNase at room temperature for 20 min and staining with propidium iodide (PI; 25 μ g/ml). Cells were analyzed in an EPICS-XL cytofluorimeter (Coulter Cientifica, Móstoles, Spain). Estimates of cell-cycle phase distributions were obtained by computer analysis of DNA content distributions. An apoptosis detection kit that measured phosphatidylserine (PS) was purchased from PharMingen (San Diego, CA). The assay was conducted following manufacturer's directions. Cells were analyzed for PS exposure/PI exclusion by staining with FITC-Annexin V and PI. **Detection of DNA double-strand breaks using TUNEL apoptosis assay.** For detection of DNA strand breaks, the TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) method was applied [21]. The terminal deoxynucleotidyl transferase method, using fluorescein-dUTP, was used to detect 3'-hydroxy ends in genomic DNA produced during apoptotic cell death. Cells were allowed to settle on polyornithine-coated slides. After serum starvation, cells were fixed with paraformaldehyde (4 % in PBS) and labeled according to manufacturer's instructions. Cells were analyzed using a Nikon microscope and a digital camera.

Preparation of whole cell extracts. To prepare whole cells extracts, cells were harvested and washed in PBS and then lysed in ice-cold lysis buffer (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 1 % Nonidet P-40), containing 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM PMSE, 1 mM sodium pyrophosphate and protease inhibitor Complete Mini Mixture (Roche, Mannheim, Germany). The protein content of the extracts was determined by the Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA).

Immunoblotting analysis. For Western blot analysis, 50–100 μ g of whole cell extracts were fractionated on a SDS-polyacrylamide gel, and transferred to PVDF membrane (Immobilon-P). The amount of protein and the integrity of transfer were verified by staining with Ponceau-S solution (Sigma). The membranes were then blocked with non-fat milk and incubated, overnight at 4°C, with primary antibodies from Santa Cruz at the following dilutions: anti-Bcl-2, 1:2000; anti-Bax, 1:2000; anti-phosphorylated ERK1/2, 1:500; anti-total ERK1/2, 1:2000; anti-phosphorylated, Akt 1:1000; anti-total Akt, 1:1000; anti-phosphorylated p38, 1:1000; and anti-p38, 1:500. Signals from the primary antibodies were amplified using species-specific antisera conjugated with horseradish peroxidase (Sigma) and detected with a chemiluminescent substrate detection system ELC (Amersham). The relative protein levels were determined by scanning the bands with a GS-800 imaging densitometer provided with the Quantity One 4.3.1. software from Bio-Rad.

DNA constructs and transfections. The pcDNA3 vector containing the constitutively active form of MEK1 was a gift from Dr. Carme Caelles (Biomedical Research Institute IRB-PCB, Barcelona, Spain). The pcDNA3 and pcDNA3-MEK1 were introduced into purified EBV-immortalized lymphocytes with the Nucleofector system (Amaxa Biosystems GmbH, Cologne, Germany). Typically, 2×10^6 cells were resuspended in 100 μ l Cell Line Nucleofector Solution V and mixed with 5 μ g plasmid DNA. To evaluate transfection efficiency, the same number of cells were transfected with the GFP-expressing construct pmaxGFP (Amaxa Biosystems). Nucleofections were performed using the Amaxa Nucleofector II device and the P-16 program. Cell viability and transfection efficiency were evaluated on 5×10^5 GFP-nucleofected cells after 16 h by PI staining and flow cytometry analysis. The transfection efficiency was approximately 20 %. Serum deprivation was started 16 h postnucleofection. After 24 h, the cells were collected and processed for immunoblotting and cell viability assays.

Statistical analysis. Unless otherwise stated, all data represent means \pm SE. Statistical analysis was performed on the Data Desk

package (version 4.0) for Macintosh. Statistical significance was estimated by the Student's *t*-test or, when appropriated, by analysis of variance (ANOVA) followed by the Fischer's LSD test for multiple comparisons. Differences were considered significant at a level of $p < 0.05$.

Results

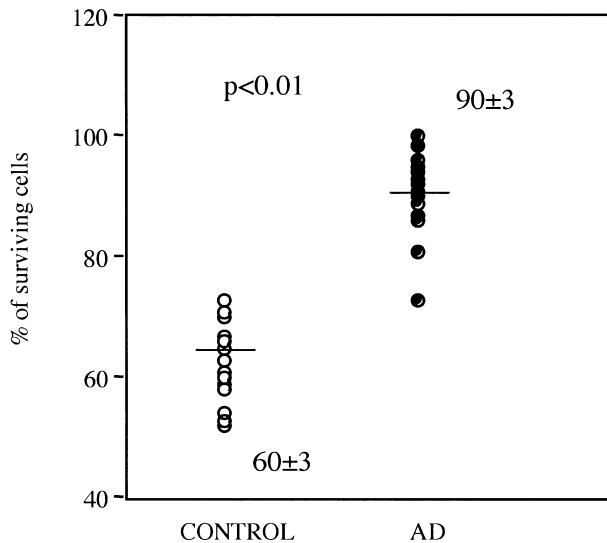
Cellular response to serum withdrawal in control and AD lymphoblasts. Data in Figure 1 summarize the cellular response to serum deprivation of cell lines, used in this study, derived from AD patients and age-matched control individuals. In agreement with previous observations [15], AD lymphoblasts were shown to be more resistant to serum withdrawal-induced cell death. In control cultures, more than 30 % of cells died after a 4-day period of serum starvation, whereas less than 10 % of AD cells died during the same period of time. To rule out the possibility that differences in the proliferative activity of control and AD lymphoblasts could mask the apparent increased survival of AD cells, we determined the rate of DNA synthesis by assessing the incorporation of BrdU in control and AD cells. As expected, Figure 2 shows that incorporation of BrdU by AD cells was significantly higher than by control cells in the presence of 10 % FBS. However, when cells were incubated in the absence of trophic support, no differences in DNA synthesis and hence proliferation between control and AD cells could be detected (Fig. 2). Taken together, our results suggest that increased cell survival after serum withdrawal is a distinct feature of lymphoblasts from AD patients. Data in Table 1 show how the treatment with the CaM antagonist, calmidazolium (CMZ), sensitize AD cells to death triggered by the absence of trophic support, without changing the percentage of surviving control cells (Table 1). Similar results were obtained with KN-62, indicating the involvement of CaMKII in the CaM-mediated regulation of cell survival. Table 1 also shows that cell survival in AD cultures was significantly decreased by the presence of the extracellular Ca^{2+} chelator EGTA, but was not affected by the intracellular Ca^{2+} chelator BAPTA-AM.

Cell death induced by serum deprivation in fresh isolated human B cells. Although EBV-transformed LCLs have been widely used as models in various biological and medical studies [12] as they can be easily established and continue proliferating for many generations, we considered it important to study the cellular response to serum deprivation of non-transformed B lymphocytes of control and late-onset AD patients. To address this issue, PBMCs were obtained, and B cells were purified by magnetic sorting. As shown in Figure 2, B cells from AD patients were

Table 1. Influence of perturbations of Ca²⁺/calmodulin signaling pathway on the cell death induced by serum withdrawal.

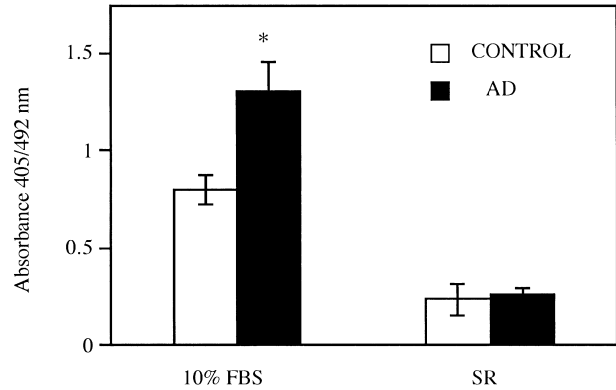
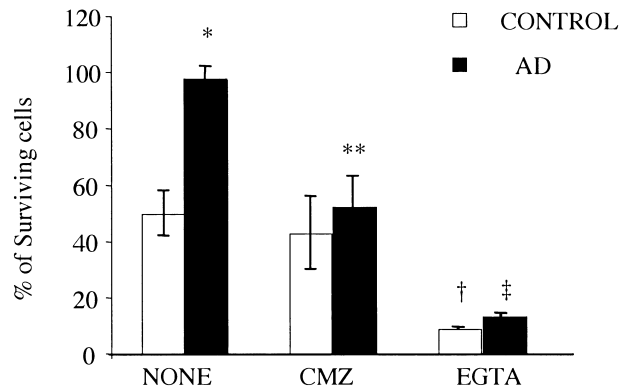
Additions	Control % of surviving cells	AD % of surviving cells
None	66±4	95±3 ^a
1 μM CMZ	60±3	61±6 ^b
1 μM KN-62	47±5	53±7 ^b
1 mM EGTA	48±6	64±5 ^b
2.5 μM BAPTA-AM	52±7	83±5 ^a

Lymphoblasts from control and Alzheimer's disease (AD) patients were incubated in serum-free RPMI medium for 3 days in the absence or in the presence of the CaM antagonist Calmidazolium (CMZ), the CaMKII inhibitor KN-62 or calcium chelators. The cells were then counted for their survival rate by trypan blue dye exclusion method. Results are expressed as % of the number of cells at day 0, and are the mean ± SE of six independent experiments. Statistical difference: ^a $p < 0.05$ from lymphoblasts from control individuals, ^b $p < 0.05$ from untreated AD lymphoblasts.

**Figure 1.** Scatter plot comparing cell survival following serum deprivation between lymphoblasts derived from control or Alzheimer's disease (AD) patients. Immortalized lymphocytes from control (open symbols) and AD individuals (filled symbols) were seeded at an initial density of 1×10^6 /ml and incubated in serum-free RPMI medium for 96 h. Cell viability was determined by trypan blue exclusion under inverted phase-contrast microscopy, and expressed as percentage of the initial number of cells at day 0. Statistical significance was determined by the Student's *t*-test.

more resistant to serum deprivation than those from control individuals. As previously shown for EBV-lymphoblasts from AD patients, treatment of B cells with CMZ also results in increased sensitivity to death induced by the absence of trophic support (Fig. 3).

Serum withdrawal induces apoptosis. Because cell death can occur via apoptosis or necrosis, it was important to determine which mechanism was involved in serum-starved cells. Apoptosis is character-

**Figure 2.** Proliferative response of control and AD lymphoblasts. Lymphoblasts from control and AD individuals (5000 cells/well) were seeded in 96-well plates in the presence of 10% FBS or serum replacement (SR). After 72 h, cells were pulsed with 10 μM BrdU for 4 h. DNA synthesis was assessed by BrdU incorporation method according to the manufacturer's instructions. Proliferation was expressed as absorbance of stimulated minus that of non-stimulated cultures. Each bar represents the mean ± SE of three independent experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$ significantly different from control cells.**Figure 3.** Serum deprivation-induced cell loss of human B cells from control and AD patients: Effects of calmidazolium (CMZ) and EGTA. B cells were isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of five late-onset AD patients and five age-matched control subjects. Lymphocytes were seeded at an initial density of 1×10^6 /ml and incubated in serum-free RPMI medium for 72 h in the absence or in the presence of 1 μM CMZ or 1 mM EGTA. Cell viability was determined by trypan blue exclusion under inverted phase-contrast microscopy, and expressed as percentage of the initial number of cells at day 0. Statistical significance was determined by ANOVA followed by the Fischer's LSD test for multiple comparisons. * $p < 0.01$ significantly different from control cells, ** $p < 0.01$ significantly different from AD cells without CMZ, † $p < 0.05$ and ‡ $p < 0.01$ significantly different from their respective control cells incubated without EGTA.

ized by a number of morphological and biochemical events that distinguish it from necrosis. Serum withdrawal-induced cell death was therefore assessed by different procedures. These included (1) flow cytometric analysis of cellular DNA content, (2) detection of DNA breaks by TUNEL, and (3) flow cytometric analysis of phosphatidylserine exposure using Annex-

in V-FITC and PI. Figure 4a shows a representative experiment of cell cycle status after serum deprivation in control and AD lymphoblasts, demonstrating a higher accumulation of hypodiploid nuclei in control cultures than in AD cells. DNA fragmentation was further confirmed by TUNEL staining of control and AD lymphoblasts 4 days after withdrawal of trophic support. Figure 4b shows representative photomicrographs illustrating a higher number of TUNEL-positive cells in control cultures than in lymphoblasts from AD patients. Figure 5 confirmed the externalization of PS in control cells, a characteristic feature of cells entering apoptosis, although there were also 20% necrotic cells. Treatment of cells with CMZ had no effect on lymphoblasts from control subjects (Fig. 5 upper right panel), but induced a 10-fold increase in the appearance of Annexin V⁺/PI⁻ cells in cultures from AD patients (Fig. 5 lower right panel).

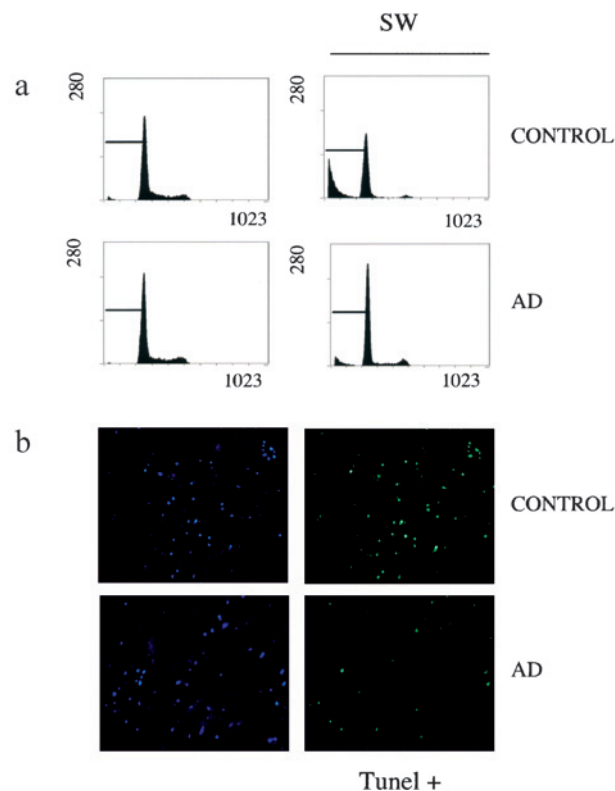


Figure 4. Effects of serum withdrawal on distribution of cells in cell cycle and DNA fragmentation of control and AD lymphoblasts. (a) Cells were seeded at an initial density of 1×10^6 /ml and incubated in RPMI medium. After 96 h of serum deprivation, cells were harvested, fixed and analyzed by flow cytometry as described under Materials and methods. Labels show areas of the curve corresponding to sub G_0/G_1 . (b) Control and AD cells were incubated in serum-free medium in polyornithine-coated chambers for 96 h. Cells were visualized by the TUNEL method. Cells positive for DNA strand breaks (TUNEL-positive nuclei) show green fluorescence on fluorescein staining. Representative experiments are shown. 4',6'-Diamino-2-penylindole (DAPI) signal was used to identify nuclei.

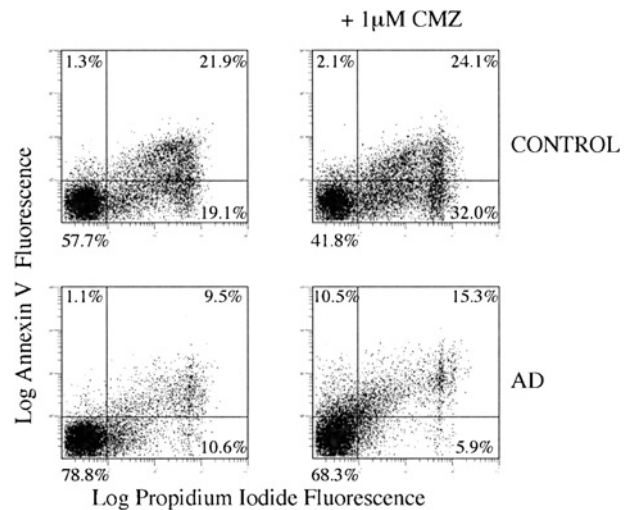


Figure 5. Flow cytometric analysis of apoptotic and necrotic cells from control and AD subjects resulting from serum deprivation in the absence or in the presence of CMZ. Representative results of flow cytometric measurements of the fraction of viable (bottom left), apoptotic (top left) and necrotic (top right) lymphoblasts from AD patients incubated for 72 h in serum-free RPMI medium, in absence (left panels) or in the presence of $1 \mu\text{M}$ CMZ (right panels). Cells were analyzed for phosphatidylserine exposure/propidium iodide (PI) exclusion by staining with FITC-Annexin V (y-axis) and PI (x-axis).

To address whether or not the activity of caspases is also essential for the observed increase in apoptosis after serum withdrawal, control and AD cells were treated with a general caspase inhibitor z-VAD-fmk. Figure 6a shows that this compound prevented apoptosis in control cells without affecting survival of lymphoblasts from AD patients. Bcl-2 and related proteins are important regulators of mitochondrial-mediated apoptosis [22]. To provide a mechanistic view of how serum withdrawal induced apoptosis, the protein expression levels of anti- or pro-apoptotic proteins, Bcl-2 and Bax, respectively, were determined by Western blotting. Figures 6b and c show a significant increase in AD lymphoblasts of Bcl-2/Bax ratio as compared with control cultures.

Involvement of PI3-K/Akt and MAPK activation on cell survival of control and AD lymphoblasts. In most cell types, the processes of survival and proliferation are dependent on the PI3-K/Akt and MAPKs (*i.e.*, ERK1/2 and p38), the downstream mediators in the signaling cascade activated via trophic ligand receptor interactions [23–25]. The potential participation of these signaling pathways was analyzed using pharmacological inhibitors. Cells were treated with LY294002, inhibitor of PI3-K/Akt [26]. Likewise, the involvement of MAPK pathways in the serum withdrawal-induced apoptosis was addressed using SB202190, a p38 MAP kinase inhibitor [27] and

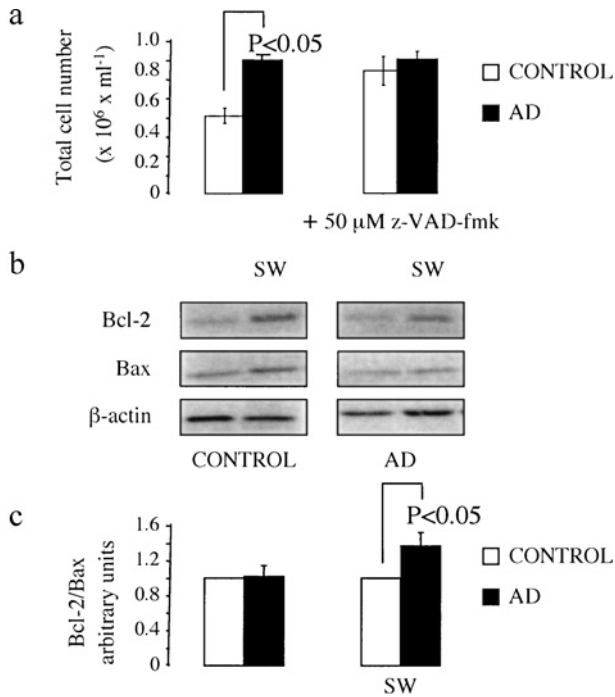


Figure 6. Serum withdrawal induced apoptosis. (a) Protective efficacy of the caspase inhibitor z-VAD-fmk on serum withdrawal-induced apoptosis. Lymphoblasts from non-AD and AD patients were incubated onto 96-well dishes, at an initial density of $1 \times 10^6/\text{ml}$, in serum-free RPMI medium (SW) for 72 h in the absence or in the presence of 50 μM of the broad-spectrum caspase inhibitor z-VAD-fmk. Cell viability was assessed by trypan blue exclusion. Six independent experiments, carried out with different cell lines, were carried out in duplicate. Values shown are the mean \pm SE and expressed as percentage of the value of untreated controls. (b) Expression levels of Bcl-2 and Bax proteins from control and AD lymphoblasts. After 72 h of serum deprivation, cell extracts were prepared for Western blot analysis. To ensure equal loading of proteins, the membranes were reprobbed with anti- β -actin. Representative immunoblots are shown. (c) Densitometric analysis of the ratio Bcl-2/Bax. Values shown represent the mean \pm SE for eight independent experiments with cells derived from different individuals.

PD98059, an inhibitor of MEK 1/2, the upstream activator of ERK1/2 [28]. The effectiveness of PD98059 and LY294002 was confirmed by reduced phosphorylation of ERK1/2 or Akt, respectively (Fig. 7a). However, under our experimental conditions, phosphorylated p38 was below detection levels in our immunoblot assays even in the absence of SB202190. As shown in Figure 7b, treatment of control cells with SB202190 or LY294002, had no effect on cell survival after serum deprivation. The lack of effect of the PI3-K inhibitor in AD lymphoblasts contrasts with the inhibitory action of this drug on the enhanced proliferative response of AD cell lines to serum [29]. Treatment of AD cells with LY294002 prevented the down-regulation of the levels of the CDK inhibitor p27^{kip1} induced by serum [29]. However, treatment of control cells with PD98059

prevented cell death induced by serum starvation (Fig. 7b). This inhibitor had no effect in AD cells, but prevented the effects of CMZ inducing apoptosis in these cell lines (Fig. 7b). These findings indicate that ERK1/2 pathway supports lethality in control cells, and that this mechanism is altered in a $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -dependent manner in AD cells.

Role of serum on ERKs activation. In an initial series of experiments, we examined the effect of serum on the activation of the ERK1/2 pathway in control and

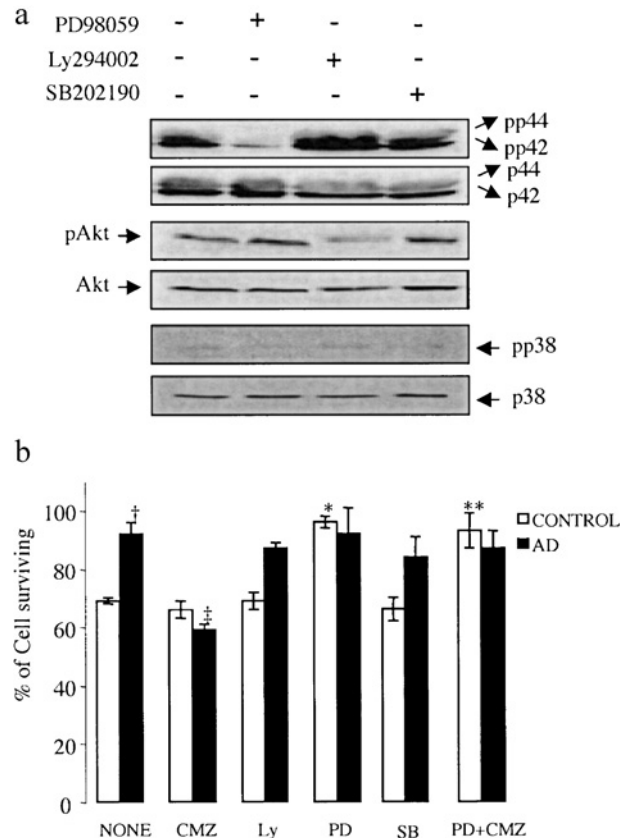


Figure 7. Effects of kinase inhibitors on serum withdrawal-induced loss of cell viability. (a) Lymphoblasts from control individuals were incubated at an initial density of $1 \times 10^6/\text{ml}$ in serum-free RPMI medium, for 72 h in the absence or in the presence of 20 μM PD98059, 10 μM LY294002, 10 μM SB202190, or 1 μM CMZ. The relative levels of activation of p42/p44 ERKs, p38 and Akt were assessed by Western blot analysis using phospho-specific antibodies. Representative immunoblots are shown. (b) Lymphoblasts from control and AD patients were incubated on 96-well plates in the absence and in the presence of different kinases inhibitors as above. Cell viability was assessed by measuring the MTT reduction and by counting cells excluding trypan blue. Independent experiments, with different cell lines, were carried out in duplicate. Values shown are the mean \pm SE for three to nine experiments, and expressed as percentage of the value of untreated controls. Statistical significance was determined by ANOVA followed by the Fischer's LSD test for multiple comparisons. * $p < 0.001$ and ** $p < 0.05$ significantly different from control cells in the absence of inhibitors; † $p < 0.001$ significantly different from control cells; ‡ $p < 0.01$ significantly different from untreated AD cells.

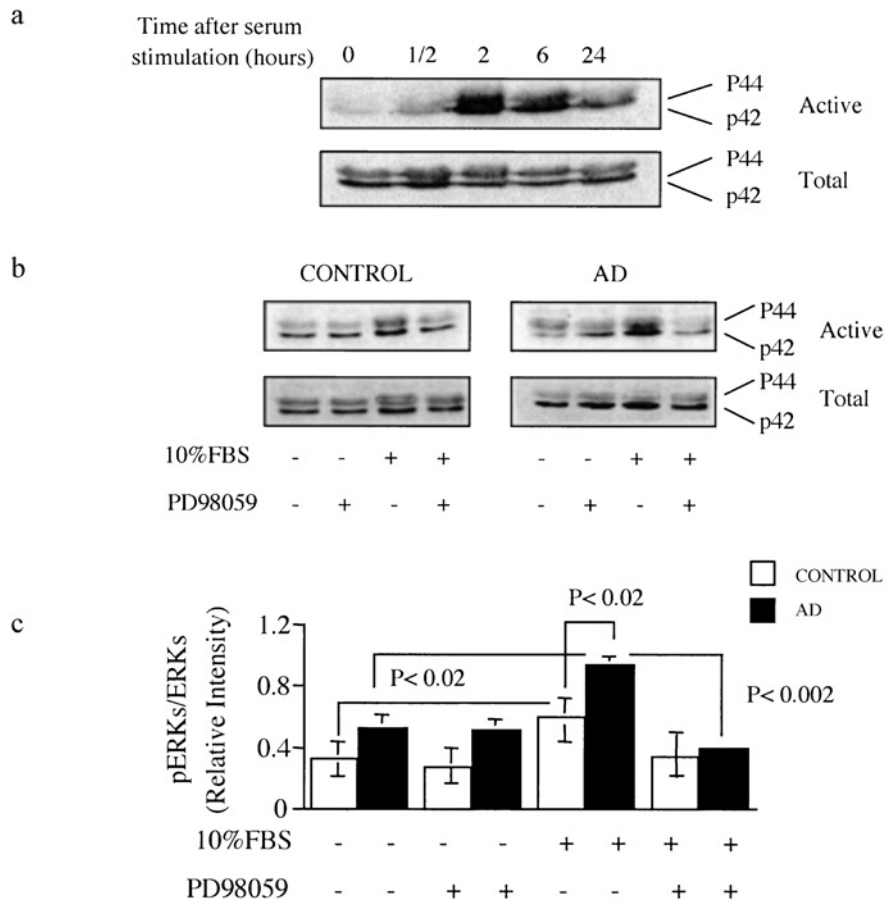


Figure 8. ERK1/2 pathway is transiently activated by serum in control and AD lymphoblasts. (a) Lymphoblasts from AD patients were seeded at an initial density of 1×10^6 /ml in serum-free medium for 24 h. Then 10% FBS was added and cells were harvested at the time periods indicated. The relative levels of activation of p42/p44 ERKs were assessed by Western blot analysis using phospho-specific antibodies. The same membranes were then stripped and reprobbed with antibodies against total ERKs. A representative immunoblot is shown. (b) Lymphoblasts from control and AD patients were seeded as above in the absence or in the presence of $10 \mu\text{M}$ PD98059, and then stimulated by 10% FBS for 1 h. (c) The immunoreactive bands were quantified by densitometric analysis. Results shown below are the mean \pm SE of three to five determinations made in experiments using cells from different individuals. Statistical significance was determined by ANOVA followed by the Fischer's LSD test for multiple comparisons.

AD lymphoblasts. This was accomplished by Western blot analysis using phosphorylation-specific antibodies to detect levels of active (*i.e.*, phosphorylated ERK) *versus* phosphorylation-independent antibodies to quantitate the total for each of the kinases. Addition of 10% FBS to cell cultures resulted in a clear activation of ERK1/2 (Fig. 8a). The FBS-induced ERK1/2 phosphorylation is transient, the effect being maximum 2 h after serum addition and declined afterwards. The increase in the phosphorylated form of ERKs did not result from increased expression of ERKs as total ERKs levels were not altered (Fig. 8a). The addition of serum activated the ERK1/2 pathway in both control and AD, although the response was enhanced in lymphoblasts from AD patients (Fig. 8b, c). As expected, treatment of cells with PD98059 blocked the serum-induced ERK phosphorylation (Fig. 8b, c). These results correlate

with the enhanced proliferation of AD cells following serum stimulation [15]. Similar response was obtained when untransformed lymphocytes from control and AD patients were stimulated with the plant lectin PWM, which preferentially activates B cells [30]. Figure 9 shows that 24 h after PWM stimulation, incorporation of BrdU by AD cells was higher than by control cells. The increased proliferation of AD lymphocytes was associated with enhanced phosphorylation of ERK1/2 (Fig. 9).

It is known from previous studies [31, 32] that ERK phosphorylation may produce different outcomes in the same cell type as proliferation or apoptosis, depending on the duration of ERK activation. For this reason, we studied the kinetics for ERK1/2 activation upon serum withdrawal. Figure 10a shows that deprivation of trophic support induced a sustained increase in the ERK1/2 phosphorylation that

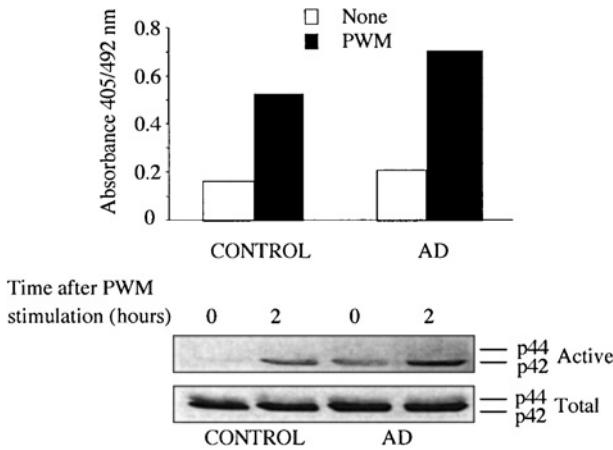


Figure 9. PWM-induced cell proliferation and ERK1/2 activation in PBMCs from control and AD individuals. PBMCs were isolated from two control individuals and two AD patients and kept in culture for 3 days. They were then resuspended in fresh medium at a density of $1 \times 10^6/\text{ml}$ and cultured in the absence or in the presence of $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ B cell mitogen, pokeweed mitogen (PWM) for 24 h. The proliferative response to PWM was determined by BrdU incorporation in the last 4 h. Results are the mean of two experiments performed in triplicate. Protein extracts for Western blot analysis were prepared 2 h after PWM stimulation. A representative immunoblot is shown.

lasted for at least 96 h in both control and AD cells, although a considerable reduced ERK1/2 activation was observed in lymphoblasts from AD patients (Fig. 10a, b). The lower response of ERK pathway to serum withdrawal in AD cells seems to protect them from the apoptosis induced by serum withdrawal. When control cells were treated with PD98059 to inhibit ERK1/2 phosphorylation, they became resistant against apoptosis (Fig. 7b). On the other hand, treatment of cells with either CMZ or the CaMKII inhibitor KN-62 produced an increase in ERK1/2 phosphorylation in AD cells without affecting significantly the phosphorylation status of ERK1/2 in control cells (Fig. 10c). Under these experimental conditions, AD cells underwent apoptosis as did control cells (Fig. 7b). Thus, these observations suggest that the enhanced signaling through the $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ pathway in AD cells decreased the activation of ERK1/2 by serum deprivation, resulting in a sustained, but lower than in control cells, activation of ERK pathway compatible with cell survival. To further investigate this possibility, we transiently transfected AD cells with constitutively active MEK1, the upstream activator of ERK. pcDNA3 and pcDNA3-MEK1 vectors were introduced in AD lymphoblasts by nucleofection. Although the transfection efficiency was no higher than 20%, the increased expression of MEK1 was sufficient to activate ERK1/2 and sensitize AD cells to death in response to serum withdrawal (Fig. 11).

Discussion

The results presented here indicate that lymphocytes from AD patients are less vulnerable to cell death induced by serum deprivation than those derived from age-matched control individuals (Figs 1 and 3, Table 1). A selective impairment of mechanisms involved in cell death in peripheral cells from AD patients has been previously reported [33, 34], although there are contradictory results as to whether cells from AD patients are more resistant [35] or more vulnerable to different cell stressors [36, 37].

Cell death induced by serum deprivation showed characteristics of apoptosis (Figs 4–6). The lower sensitivity of AD cells to trophic factor withdrawal was due to changes in the balance of pro- and anti-apoptotic proteins (Fig. 6).

AD cells treated with CaM antagonists undergo significant apoptosis in the absence of serum in the culture medium as they do in control cells (Fig. 5), suggesting a role of the $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ signaling pathway in protecting AD cells from apoptosis. A role for CaM mediating cell survival has been previously reported in a number of cell types including neurons [38–40]. CaM antagonists, however, had no effect in control cells, suggesting a threshold for CaM activation as the survival signal. Our results are in consonance with previous reports indicating that CaM antagonists specifically resulted in apoptosis in tumorigenic mammary carcinoma cells, but did not affect normal mammary gland-derived epithelial cells [41]. $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ regulation of cell survival appears to be mediated by CaMKII, as its specific inhibitor KN-62 mimics the effects of CaM antagonists. Therefore, it seems unlikely that CaM-dependent activities other than CaM kinases (*i.e.*, calcineurin) are recruited by serum withdrawal to accomplish its trophic effects in AD cells. In agreement with this observation, it was reported that inhibition of this kinase rendered resistant glioma cells sensitive to FAS-mediated apoptosis [42]. The protective effect of CaM against serum withdrawal-induced apoptosis requires extracellular Ca^{2+} , indicating that Ca^{2+} influx is critical for survival under serum deprivation. In contrast, the presence of the intracellular Ca^{2+} chelator, BAPTA, did not influence the survival of either control or AD cells; however, it has to be taken into account that the buffering capacity of BAPTA may be overwhelmed with time [43].

On the other hand, inhibition of ERKs protected control cells from serum withdrawal-induced apoptosis and blocked the apoptotic effects of CaM antagonists in AD cells (Fig. 7). Therefore, it seems that CaM has a critical role as mediator of cell survival by regulating the activity of the ERK pathway.

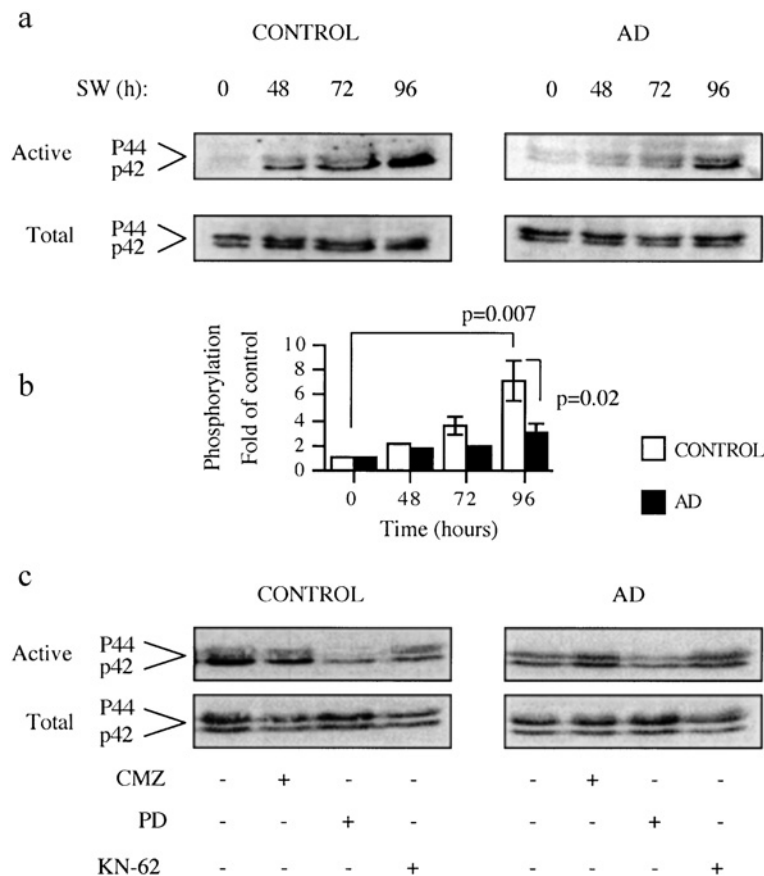


Figure 10. Persistent activation of ERKs by serum deprivation in control and AD lymphoblasts. Effects of PD98059, CMZ, and KN-62 on ERKs phosphorylation. (a) Lymphoblasts from control and AD lymphoblasts were serum deprived (SW) for 96 h. At the times indicated, aliquots were taken to prepare cell extracts. The relative levels of activation of p42/p44 ERKs were assessed by Western blot analysis using phospho-specific antibodies. The same membranes were then stripped and reprobbed with antibodies against total ERKs. (b) The immunoreactive bands were quantified by densitometric analysis. Results shown below are the mean \pm SE of three to five determinations made in different experiments. (c) Cells were incubated in the absence of serum for 72 h in the presence of 20 μ M PD98059, 1 μ M CMZ or 1 μ M KN-62. Representative experiments are shown.

Previous reports indicated that the kinetics and duration of ERK activation are important factors in determining the cellular response [30–32]. In fact, we observed an enhanced and transient activation of ERK in AD lymphoblasts in the presence of serum (Fig. 8), whereas serum deprivation induced a sustained phosphorylation (although lower than in control cells) of ERKs (Fig. 10). Whether there is serum or not, AD cells proliferate at higher rates or show a decreased degree of cell death [15]. Our results are in consonance with previous work in which a persistent activation of ERK was associated with cell cycle arrest and apoptosis in different cell types [44–46]. Both the transient and the sustained activation of ERK1/2 in the presence or in the absence of serum are sensitive to CaM antagonists or CaMKII inhibitors. Under trophic factor deprivation, CaM appears to down-regulate the sustained ERK activation. Several lines of evidence support this idea: (i) ERK1/2 phosphorylation is markedly decreased in AD cells, in which enhanced CaM signaling has been previously reported [13, 14]; (ii) CaM antagonists restored ERK activity of AD lymphoblasts to levels similar to those of control cells; and (iii) CaM antagonists failed to sensitize AD cells to apoptosis induced by serum withdrawal in the presence of PD98059. Thus, this study reveals that the

Ca²⁺/CaM and ERK pathways interact and, together, regulate the cellular response to the trophic support availability.

Interactions between these two pathways have been previously described in multiple cell systems. For example, it was reported that pharmacological inhibition of CaM decreased EGF-induced MAPK activity [47], or that CaMKII modulates integrin-stimulated ERK activation in thyroid TAD-2 cells [48]. It has also been described that Ca²⁺/CaM may down-regulate ERK phosphorylation in 3T3 Swiss cells [49]. Therefore, it is clear from these observations and the results of this study that Ca²⁺/CaM signal may produce opposite effects depending on the cell type or the cell status context.

Several mechanisms for Ca²⁺/CaM modulation of ERK activity have been reported. For example, it was shown in thyroid cancer cells that CaMKII associate and phosphorylate Raf-1, contributing to ERK activation [48]. On the other hand it was reported that CaM negatively regulate the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in fibroblasts [50]. *In vitro*, CaMKII can activate synGAP [51], a Ras inhibitory GTPase expressed in neurons [52], which may inhibit ERK activation. Whether there are similar mechanisms operative in human lymphocytes and

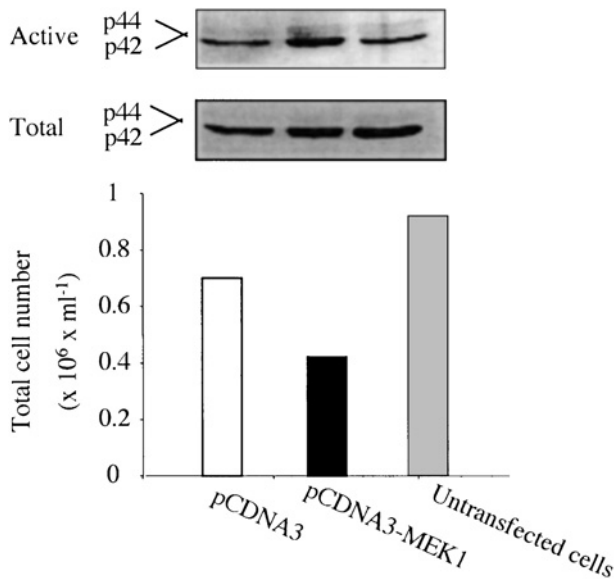


Figure 11. Serum deprivation-induced death of AD lymphoblasts following transfection with constitutively active MEK1 construct. AD lymphoblasts were transiently transfected with pcDNA3 or pcDNA-MEK1 constructs as described in the Methods. At 16 h after nucleofection, cells were seeded at a density of $1 \times 10^6/\text{ml}$, deprived of serum and incubated for 24 h. Cell viability was then determined by trypan blue exclusion under inverted phase-contrast microscopy. The relative levels of activation of p42/p44 ERKs were assessed by Western blot analysis. The experiment was performed twice with different cell lines with similar results, and one of the experiments is shown.

impaired in AD patients will need further investigation.

Alternatively, the $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ signaling pathway may also regulate cell death/survival by increasing the activity of the Na^+/H^+ exchanger as previously reported [13]. An increase in intracellular pH is known to be protective against apoptosis [53].

Previous reports indicated that ERK1/2 pathway is actively involved in the pathogenesis of AD [54]. This signaling pathway is known to play a critical role in hippocampal synaptic plasticity and the processes of learning and memory [55]. Thus, the abnormal activated pathway in the hippocampus in AD may specifically impair hippocampal functions and contribute to the memory deficits of AD patients. ERK1/2 activation has been shown in degenerative neurons [56], and an association between phosphorylated ERK1/2 and neurofibrillary tangles has been demonstrated in human brain [57]. *In vitro*, ERK1/2 can be activated by β -amyloid and phosphorylate tau protein [58, 59].

Interestingly, deregulation of ERK1/2 activation has been also detected in fibroblasts from AD patients [60, 61]. Thus, together, these observations and our results showing a reduced activation of ERK pathway by serum deprivation in AD lymphoblast add further

support to the idea that AD has systemic expression at cellular and molecular levels.

In summary, this study reveals a functional relationship between $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ and ERKs in serum-induced signaling in immortalized lymphocytes, controlling cell fate (death or survival) depending on growth factor availability. The enhanced signaling through $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ in AD cells seems to protect them from apoptosis by down-regulating the persistent activation of ERK1/2 induced by serum deprivation.

This mechanism might represent an adaptative response for AD cells that are exposed to chronic stress. It has been considered that susceptible neurons in AD survive for long time in a compromised way by delaying the apoptotic process, a mechanism termed abortosis or abortive apoptosis [62, 63].

Although AD-associated changes detected in peripheral cells might not reflect exactly those in the AD brain, a $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -dependent modulation of ERK1/2 pathway in response to both mitogenic stimuli or cellular stressors, could provide an explanation for the relationship between cellular stress and unscheduled cell cycle entry observed in susceptible neurons in AD [64]. In fact these two events seem to be necessary and invariant features of AD as proposed by the “two-hit” hypothesis [64, 65].

Acknowledgements. We thank Dr. González-Manchón and A. Jaio for help with the transfection experiments. This work has been supported by grants from the Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS PI040312). F.B. holds a contract of the CSIC (I3P program). N.C. and U.M. are fellows from the Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social and Ministerio de Educación y Ciencia, respectively.

- 1 McShea, A., Harris, P. L. R., Webster, K. R., Wahl, A. F. and Smith, M. A. (1997) Abnormal expression of the cell cycle regulators P16 and CDK4 in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 150, 933 – 939.
- 2 Nagy, Z. S., Esiri, M. M. and Smith, A. D. (1998) The cell division cycle and the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 87, 731 – 739.
- 3 Busser, J., Geldmacher, D. S. and Herrup, K. (1998) Ectopic cell cycle proteins predict the sites of neuronal cell death in Alzheimer's disease brain. *J. Neurosci.* 18, 2801 – 2807.
- 4 Copani, A., Uberti, D., Sortino, M. A., Bruno, V., Nicoletti, F. and Memo, M. (2001) Activation of cell-cycle-associated proteins in neuronal death: a mandatory or dispensable path? *Trends Neurosci.* 24, 25 – 31.
- 5 Yang, Y., Geldmacher, D. S. and Herrup, K. (2001) DNA replication precedes neuronal cell death in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 21, 2661 – 2668.
- 6 Tatebayashi, Y., Takeda, M., Kashiwagi, Y., Okaochi, M., Kurumadani, T., Sekiyama, A., Kanayama, Q., Hariguchi, S. and Nishimura, T. (1995) Cell-cycle-dependent abnormal calcium response in fibroblasts from patients with familial Alzheimer's disease. *Dementia* 6, 9 – 16.
- 7 Stieler, J. T., Lederer, C., Bruckner, M. K., Wolf, H., Holzer, M., Gertz, H. J. and Arendt, T. (2001) Impairment of mitogenic activation of peripheral blood lymphocytes in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 12, 3969 – 3972.

- 8 Nagy, Z. S., Combrinck, M., Budge, M. and McShane, R. (2002) Cell cycle kinesin in lymphocytes in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 317, 81 – 84.
- 9 Dolman, C. L. (1984) Diagnosis of neurometabolic disorders by examination of skin biopsies and lymphocytes. *Semin. Diagn. Pathol.* 1, 82 – 97.
- 10 Neitzel, H. (1986) A routine method for the establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines. *Hum. Genet.* 73, 320 – 326.
- 11 Beatty, P. R., Krams, S. M. and Martinez, O. M. (1997) Involvement of IL-10 in the autonomous growth of EBV-transformed B cell lines. *J. Immunol.* 158, 4045 – 4051.
- 12 Minami, R., Watanabe, Y., Kudoh, T., Suzuki, M., Oynagi, K., Orii, T. and Nakao, T. (1978) Lysosomal acid hydrolases in established lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus, from patients with genetic lysosomal storage diseases. *Hum. Genet.* 44, 79 – 87.
- 13 Urcelay, E., Ibarreta, D., Parrilla, P., Ayuso, M. S. and Martín-Requero, A. (2001) Enhanced proliferation of lymphoblasts from patients with Alzheimer dementia associated with calmodulin-dependent activation of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Neurobiol. Dis.* 8, 289 – 298.
- 14 Cuevas, N., Urcelay, E., Hermida, O. G., Saíz-Díaz R. A., Bermejo, F., Ayuso, M. S. and Martín-Requero, A. (2003) Ca²⁺/calmodulin-dependent modulation of cell cycle elements pRb and p27^{kip1} involved in the enhanced proliferation of lymphoblasts from patients with Alzheimer dementia. *Neurobiol. Dis.* 13, 254 – 263.
- 15 Cuevas, N., Muñoz, U., Hermida, O. G. and Martín-Requero, A. (2005) Altered transcriptional regulators in response to serum in immortalized lymphocytes from Alzheimer's disease patients. *Neurobiol. Aging* 26, 615 – 624.
- 16 Ibarreta, D., Gómez-Isla T., Portera-Sánchez, A., Parrilla, R., and Ayuso, M. S. (1995) Apolipoprotein E genotype in Spanish patients of Alzheimer's or Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 14, 146 – 149.
- 17 Ibarreta, D., Urcelay, E., Parrilla, R. and Ayuso, M. S. (1998) Distinct pH homeostatic features in lymphoblasts from Alzheimer's disease patients. *Ann. Neurol.* 44, 216 – 222.
- 18 Koistinen, P. (1987) Human peripheral blood and bone marrow cell separation using density gradient centrifugation on Lymphoprep and Percoll in haematological diseases. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 47, 709 – 714.
- 19 Mitsiades, N., Mitsiades, C. S., Poulaki, V., Chauhan, D., Richardson, P. G., Hideshima, T., Munshi, N., Treon, S. P. and Anderson, K. C. (2002) Biologic sequelae of nuclear factor-kappaB blockade in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood* 99, 4079 – 4086.
- 10 Krishan, A. (1975) Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J. Cell Biol.* 66, 188 – 193.
- 21 Gavrieli, Y., Sherman, Y. and Ben-Sasson, S. A. (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119, 493 – 501.
- 22 Zhong, L. T., Kane, D. J. and Bredesen, D. E. (1993) BCL-2 blocks glutamate toxicity in neural cell lines. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 19, 353 – 355.
- 23 Cross, T. G., Scheel-Toellner, D., Henriquez, N. V., Deacon, E., Salmon, M. and Lord, J. M. (2000) Serine/threonine protein kinases and apoptosis. *Exp. Cell Res.* 256, 34 – 41.
- 24 Braszil, D. P., Park, J. and Hemmings, B. A. (2002) PKB binding proteins. Getting in on the Akt. *Cell* 111, 293 – 303.
- 25 Johnson, G. L. and Lapadat, R. (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911 – 1912.
- 26 Vlahos, C. J., Matter, W. F., Hui, K. Y. and Brown, R. F. (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.* 269 5241 – 5248.
- 27 Frantz, B., Klatt, T., Pang, M., Parsons, J., Rolando, A., Williams, H., Tocci, M. J., O'Keefe, S. J. and O'Neill, E. A. (1998) The activation state of p38 mitogen-activated protein kinase determines the efficiency of ATP competition for pyridinylimidazole inhibitor binding. *Biochemistry* 37, 13846 – 13853.
- 28 Dudley, D. T., Pang, L., Decker, S. J., Bridges, A. J. and Saltiel, A. R. (1995) A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7686 – 7689.
- 29 Muñoz, U., Bartolomé, F., Bermejo, F. and Martín-Requero, A. (2007) Enhanced proteasome-dependent degradation of the CDK inhibitor p27kip1 in immortalized lymphocytes from Alzheimer's dementia patients. *Neurobiol. Aging.* Doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.03.013.
- 30 Famularo, G., Giacomelli, R., Alesse, E., Cifone, M. G., Morrone, S., Boirivant, M., Danese, C., Perego, M. A., Santoni, A. and Tonietti, G. (1989) Polyclonal B lymphocyte activation in progressive systemic sclerosis. *J. Clin. Lab. Immunol.* 29, 59 – 63.
- 31 Marshall, C. J. (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: Transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80, 179 – 185.
- 32 Pouysségur, J., Volmat, V. and Leonormand, P. (2002) Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signaling. *Biochem. Pharmacol.* 64, 755 – 763.
- 33 Mórocz, M., Kálmán, J., Juhász, A., Sinkó, I., McGlynn, A. P., Downes, C., Janka, Z. and Raskó, I. (2002) Elevated levels of oxidative DNA damage in lymphocytes from patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 23, 47 – 53.
- 34 Uberti, D., Carsana, T., Bernardi, E., Rodella, L., Grigolato, P., Lanni, C., Racchi, M., Govoni, S. and Memo M. (2002) Selective impairment of p53-mediated cell death in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients. *J. Cell Sci.* 115, 3131 – 3138.
- 35 Naderi, J., Lopez, C. and Pandey, S. (2006) Chronically increased oxidative stress in fibroblasts from Alzheimer's disease patients causes early senescence and renders resistance to apoptosis by oxidative stress. *Mech. Ageing Dev.* 127, 25 – 35.
- 36 Schindowski, K., Krazsch, T., Peters, J., Steiner, B., Leutner, S., Touchet, N., Maurer, K., Czech, C., Pradier, L., Frolich, L., Muller, W. E. and Eckert, A. (2003) Impact of aging: sporadic, and genetic risk factors on vulnerability to apoptosis in Alzheimer's disease. *Neuromol. Med.* 4, 161 – 178.
- 37 Mohammad Abdul, H., Sultana, R., Keller, J. N., St Clair, D. K., Markesbery, W. R. and Butterfield, D. A. (2006) Mutations in amyloid protein and presenilin-1-genes increase the basal oxidative stress mediated by amyloid beta-peptide (1 – 42). HO and kainic acid: implications for Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 96, 1322 – 1335.
- 38 Yano, S., Tokumitsu, H. and Soderling, T. R. (1998) Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. *Nature* 396, 584 – 587.
- 39 Egea, J., Espinet, C., Soler, R. M., Dolcet, X., Yuste V. J., Encinas, M., Iglesias, M., Rocamora, N. and Comella, J. X. (2001) Neuronal survival induced by neurotrophins requires calmodulin. *J. Cell Biol.* 154, 585 – 597.
- 40 Cheng, A., Wang, S., Yang, D., Xiao, R. and Mattson, M. P. (2003) Calmodulin mediates brain-derived neurotrophic factor cell survival signaling upstream of Akt kinase in embryonic neocortical neurons. *J. Biol. Chem.* 278, 7591 – 7599.
- 41 Deb, T. B., Coticchia, C. M. and Dickson, R. B. (2004) Calmodulin-mediated activation of Akt regulates survival of c-Myc-overexpressing mouse mammary carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 279, 38903 – 38911.
- 42 Yang, B. F., Xiao, C., Roa, H. W., Krammer, P. H. and Hao, C. (2003) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II regulation of c-FLIP expression and phosphorylation in modulation of Fas-mediated signaling in malignant glioma cells. *J. Biol. Chem.* 278, 7043 – 7050.
- 43 Yao, Y. and Tsien, R. Y. (1997) Calcium current activated by depletion of calcium stores in *Xenopus* oocytes. *J. Gen. Physiol.* 109, 703 – 715.

- 44 Wang, X., Martindale, J. L., and Holbrook, N. J. (2000) Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275, 39435 – 39443.
- 45 Tang, D., Wu, D., Hirao, A., Lahthi, J. M., Liu, L., Mazza, B., Kidd, V. J., Mak, T. W. and Ingram, A. J. (2002) ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. *J. Biol. Chem.* 277, 12710 – 12717.
- 46 Choi, B. K., Choi C. H., Oh, H. L., and Kim, Y. K. (2004) Role of ERK activation in cisplatin-induced apoptosis in A172 human glioma cells. *Neurotoxicology* 25, 915 – 924.
- 47 Tebar, F., Llado, A. and Enrich, C. (2002) Role of calmodulin in the modulation of the MAPK signalling pathway and the transactivation of epidermal growth factor receptor mediated by PKC. *FEBS Lett.* 517, 206 – 210.
- 48 Illario, M., Cavallo, A. L., Bayer, K. U., Di Matola, T., Fenzi, G., Rossi, G. and Vitale, M. (2003) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II binds to Raf-1 and modulates integrin-stimulated ERK activation. *J. Biol. Chem.* 278, 45101 – 45198.
- 49 Bosch, M., Gil, J., Bachs, O. and Agell, N. (1998) Calmodulin inhibitor W13 induces sustained activation of ERK2 and expression of p21(cip1). *J. Biol. Chem.* 273, 22145 – 22150.
- 50 Villalonga, P., Lopez-Alcalá, C., Boch, M., Chiloeches, A., Rocamora, N., Gil, J., Marais, R., Marshall, C. J., Bachs, O. and Agell, N. (2001) Calmodulin binds to K-Ras, but not to H- or N-Ras, and modulates its downstream signaling. *Mol. Cell Biol.* 21, 7345 – 7354.
- 51 Oh, J. S., Manzerra, P. and Kennedy, M. B. (2004) Regulation of the neuron-specific Ras GTPase-activating protein, synGAP, by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Biol. Chem.* 279, 17980 – 17988.
- 52 Kim, J. H., Liao, D., Lau, L. F. and Huganir, R. L. (1998) SynGAP: a synaptic RasGAP that associates with the PSD-95/SAP90 protein family. *Neuron* 20, 683 – 691.
- 53 Perez-Sala, D., Collado-Escobar, D. and Mollinedo F. (1995) Intracellular alkalinization suppresses lovastatin-induced apoptosis in HL-60 cells through the inactivation of a pH-dependent endonuclease. *J. Biol. Chem.* 270, 6235 – 6242.
- 54 Zhu, X., Lee, H. G., Raina, A. K., Perry, G. and Smith, M. A. (2002) The role of mitogen-activated protein kinase pathways in Alzheimer's disease. *Neurosignals* 11, 270 – 281.
- 55 Derkinderen, P., Enslin, H. and Girault, J. A. (1999) The ERK/MAP-kinases cascade in the nervous system. *Neuroreport* 10 R24-R34.
- 56 McShea, A., Zelasko, D. A., Gerst, J. L. and Smith, M. A. (1999) Signal transduction abnormalities in Alzheimer's disease: evidence of a pathogenic stimuli. *Brain Res.* 815, 27 – 242.
- 57 Knowles, R. B., Chin, J., Ruff, C. T. and Hyman, B. T. (1999) Demonstration by fluorescence resonance energy transfer of a close association between activated MAP kinase and neurofibrillary tangles: implications for MAP kinase activation in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58, 1090–1098.
- 58 Wei, W., Wang, X. and Kusiak, J. W. (2002) Signaling events in amyloid beta-peptide-induced neuronal death and insulin-like growth factor I protection. *J. Biol. Chem.* 277, 17849 – 17656.
- 59 Pei, J. J., Braak, H., An, W-L., Winblad, B., Cowburn, R. F., Iqbal K. and Grundke-Iqbal, I. (2002) Up-regulation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and MEK1/2 is associated with the progression of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 109, 45 – 55.
- 60 Zhao, W. Q., Ravindranath, L., Mohamed, A. S., Zohar, O., Chen, G. H., Lyketsos, C. G., Etcheberrigaray, R. and Alkon, D. L. (2002) MAP kinase signaling cascade dysfunction specific to Alzheimer's disease in fibroblasts. *Neurobiol. Dis.* 11, 166 – 183.
- 61 Khan, T. K. and Alkon, D. L. (2006) An internally controlled peripheral biomarker for Alzheimer's disease: Erk1 and Erk2 responses to the inflammatory signal bradykinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 13203 – 13207.
- 62 Raina, A. K., Zhu, X., Shimohama, S., Perry, G. and Smith, M. A. (2003) Tipping the apoptotic balance in Alzheimer's disease: The abortosis concept. *Cell Biochem. Biophys.* 39, 249 – 255.
- 63 Jellinger, K. A. (2006) Challenges in neuronal apoptosis. *Curr. Alzheimer Res.* 3, 377 – 391.
- 64 Zhu, X., Castellani, R. J., Takeda, A., Nunomura, A., Atwood, C. S., Perry, G. and Smith, M. A. (2001) Differential activation of neuronal ERK, JNK/SAPK and p38 in Alzheimer disease: the 'two hit' hypothesis. *Mech. Ageing Dev.* 123 39 – 46.
- 65 Zhu, X., Raina, A. K., Perry, G. and Smith, M. A. (2004) Alzheimer's disease. The two-hit hypothesis. *Lancet Neurol.* 3, 219 – 226.

To access this journal online:
<http://www.birkhauser.ch/CMLS>

HMG-CoA Reductase Inhibitor Simvastatin Inhibits Cell Cycle Progression at the G₁/S Checkpoint in Immortalized Lymphocytes from Alzheimer's Disease Patients Independently of Cholesterol-Lowering Effects

Simone G. Sala, Úrsula Muñoz, Fernando Bartolomé, Félix Bermejo, and Ángeles Martín-Requero

Department of Cellular and Molecular Pathophysiology, Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain (S.G.S., U.M., F.B., A.M.R.); and Hospital Doce de Octubre, Madrid, Spain (F.B.)

Received July 19, 2007; accepted October 9, 2007

ABSTRACT

Recent work has suggested that statins may exert beneficial effects on patients suffering from Alzheimer's disease (AD). The pharmacological effects of statins extend beyond their cholesterol-lowering properties. Based on the antineoplastic and apoptotic effects of statins in several cell types, we hypothesized that statins may be able to protect neurons by controlling the regulation of cell cycle. A growing body of evidence indicates that neurodegeneration involves the activation of cell cycle machinery in postmitotic neurons. We and others have presented direct evidence to support the hypothesis that the failure of cell cycle control is not restricted to neurons in AD patients, but that it occurs in peripheral cells as well. For these

reasons, we found it worthy to study the role of simvastatin on cell proliferation in immortalized lymphocytes from AD patients. We report here that simvastatin (SIM) inhibits the serum-mediated enhancement of cell proliferation in AD by blocking the events critical for G₁/S transition. SIM induces a partial blockade of retinoblastoma protein phosphorylation and inhibition of cyclin E/cyclin-dependent kinase (CDK)2 activity associated with increased levels of the CDK inhibitors p21^{Cip1} and p27^{Kip1}. These effects of SIM on AD lymphoblasts are dependent on inhibition of the proteasome-mediated degradation of p21 and p27 proteins. The antiproliferative effect of this natural statin may provide a therapeutic approach for AD disease.

Statin therapy is a widely used treatment for hypercholesterolemia, reduces the risk of stroke, and improves cardiovascular functions (Farnier and Davignon, 1998). The statin family of drugs is competitive inhibitors of HMG-CoA reductase, the rate-limiting enzyme in the synthesis of cholesterol (Corsini et al., 1995), which converts HMG-CoA to mevalonate (MEV).

In the last decade, epidemiological, clinical, and experimental evidence has accumulated that links cholesterol to the development of AD, and recent studies showed that statin therapy might be of benefit in treating AD (Wolozin,

2004), although the efficacy of statins at slowing the cognitive decline and the progression of AD remains controversial. The link between cholesterol and AD is not surprising because the brain is the most cholesterol-rich organ, and disturbances in cholesterol homeostasis have been found associated with all major neuropathological features of AD (Shobab et al., 2005). Data from the Canadian Study of Health and Aging revealed a 74% reduced risk of developing AD in statin users compared with the total population (Rockwood et al., 2002). In other studies, a reduction in the risk of AD was observed in patients treated with statins compared with those receiving other medications typically used in cardiovascular disease (Wolozin et al., 2000), suggesting that statins in particular, rather than low cholesterol levels or lipid-lowering agents in general, are responsible for the reduction in the risk of AD.

A number of nonlipid-dependent or pleiotropic effects of statins have been reported (Takemoto and Liao, 2001). By

This work was supported by Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias Grant FIS PI040312 and Ministry of Education and Science Grant SAF2007-62405). F.B. holds a contract of the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (I3P Program). U.M. is a fellow from the Spanish Ministry of Education and Science.

S.G.S., Ú.M., and F.B. contributed equally to this work.
Article, publication date, and citation information can be found at <http://jpet.aspetjournals.org>.
doi:10.1124/jpet.107.128959.

ABBREVIATIONS: AD, Alzheimer's disease; MEV, mevalonate; FPP, farnesyl pyrophosphate; GGPP, geranylgeranyl pyrophosphate; EBV, Epstein-Barr virus; Z-VAD-FMK, benzyloxy-carbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone; pRb, retinoblastoma protein; CDK, cyclin-dependent kinase; SQ, squalene; FBS, fetal bovine serum; PI, propidium iodide; SIM, simvastatin; MG132, *N*-benzyloxycarbonyl (Z)-Leu-Leu-leucinal.

preventing the synthesis of isoprenoid intermediates such as farnesyl pyrophosphate (FPP) and geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) in the mevalonate pathway, statins may alter the subcellular localization and function of multiple proteins, including protein kinases, the subunit of trimeric G proteins, and Ras and Ras-related GTPases (Danesh et al., 2002). Pleiotropic effects of statins include anti-inflammatory properties as well as antiproliferative and proapoptotic effects (Koyuturk et al., 2004), all of these potentially relevant in treating AD. Growing evidence suggests that neuronal cell cycle regulatory failure, leading to apoptosis, may be a significant component of the AD pathogenesis (Herrup et al., 2004; Nagy, 2005). Neuronal changes supporting alteration on cell cycle control in the etiology of AD include the ectopic expression of cell cycle markers, or cytoskeletal alterations (Busser et al., 1998; Copani et al., 2001; Nagy, 2005). Moreover, it was reported that a significant number of hippocampal pyramidal and basal forebrain neurons in AD brain have undergone full or partial DNA replication (Yang et al., 2001). These events occur early in the progression of AD (Yang et al., 2003; Yang and Herrup, 2007), suggesting that cell cycle-induced death is a central mechanistic feature of the disease. There is an expanding body of evidence supporting the ability of some statins to exert direct antiproliferative and proapoptotic effects on various types of human cells (Katz, 2005). On these grounds, we have considered the possibility that the beneficial effects of statin therapy in AD could be related to their ability to interfere with cell cycle machinery. To this aim, we have investigated the effects of simvastatin, a lipophilic statin, on the distinct features of control of cell proliferation in lymphoblasts derived from late-onset AD patients. Previous work from this and other laboratories has demonstrated that cell cycle regulatory deficit is not restricted to neurons in AD; it is also observed in peripheral cells such as lymphocytes or fibroblasts (Tatebayashi et al., 1995; Nagy et al., 2002; de las Cuevas et al., 2003), thus providing a useful tool to study the involvement of cell cycle-related events in the pathogenesis of AD. A number of studies have found AD-specific changes in molecules and signaling pathways in peripheral lymphocytes that mirror changes in the brain (Eckert et al., 1998; Nagy et al., 2002; Muñoz et al., 2007). Moreover, these cells have also been used to study molecular changes in response to therapy in AD (Casademont et al., 2003; Reale et al., 2005). Conversely, Epstein-Barr virus (EBV) infection in vitro causes transformation of B cells and generates B-lymphoblastoid cell lines that resemble activated B cells (Neitzel, 1986). In fact, we have previously demonstrated identical cellular response to serum addition or withdrawal in peripheral lymphocytes or EBV-transformed lymphocytes from control and AD patients (Bartolomé et al., 2007; Muñoz et al., 2007). Taken together, these reports support a rationale for the use of peripheral cells, and in particular EBV lymphoblasts from AD patients as a model to further understand disease biology, progression, and therapeutic actions.

We report here that simvastatin selectively blocked the serum-enhanced proliferation of lymphoblasts from AD patients by regulating critical events of the G₁/S transition, suggesting potential additional molecular targets for the clinical efficacy of this drug in treating AD.

Materials and Methods

Materials

All components for cell culture were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA). Radioactive compounds were purchased from GE Healthcare (Uppsala, Sweden). Simvastatin and the caspase inhibitor benzyloxy-carbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone (Z-VAD-FMK) were purchased from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Polyvinylidene difluoride membranes for Western blots were purchased from Bio-Rad (Hercules, CA). Mouse monoclonal antibody anti-human

p27 was obtained from BD Biosciences Transduction Laboratories (Erembodegem, Belgium). Rabbit anti-human p27 (sc-528), anti-retinoblastoma protein (pRb) (sc-500), anti-p21 (sc-397), anti-cyclin E (sc-198), and anti-cyclin-dependent kinase (CDK)2 (sc-748) were obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). The enhanced chemiluminescence system and radioactive compounds were from GE Healthcare. Mevalonate, geranylgeranyl pyrophosphate, farnesyl pyrophosphate, squalene (SQ), histone H1, and anti- β -actin antibody were obtained from Sigma-Aldrich (Alcobendas, Spain). All other reagents were of molecular grade.

Source of Cell Lines

EBV-immortalized lymphocytes from 20 late-onset AD patients (mean age \pm S.D., 75.6 \pm 7) and 20 nondemented age-matched individuals were selected from the cell lines present in our cell repository. The diagnosis of probable Alzheimer was made in the Department of Neurology of the University Hospital Doce de Octubre (Madrid, Spain) according to National Institute of Neurological and Communicative Diseases and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association criteria. The frequency of the apolipoprotein E4 allele was found to be 3% in the control group and 39% in the AD group in agreement, with values previously reported for the normal and AD population of Spain (Ibarreta et al., 1995) and consistent with the late-onset form of AD.

All study protocols were approved by the Spanish Council of Higher Research Institutional Review Board, and they are in accordance with National and European Union Guidelines. In all cases, peripheral blood samples were taken after written informed consent of the patients or their relatives.

Culture of Human Lymphoblasts

Cells were grown in suspension in T flasks in an upright position, in approximately 10 ml of RPMI 1640 medium (Invitrogen) medium that contained 2 mM L-glutamine, 100 mg/ml penicillin/streptomycin, and, unless otherwise stated, 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS). Flasks were maintained in a humidified 5% CO₂ incubator at 37°C. Fluid was routinely changed every 2 days by removing the medium above the settled cells and replacing it with an equal volume of fresh medium.

Determination of Cell Proliferation

Proliferation was determined by cell counting in a Neubauer chamber. EBV-immortalized lymphoblasts from control and AD individuals were seeded at an initial cell concentration of 1×10^6 cells/ml. Cells were serum-starved for 24 h. The next day, cells were stimulated by adding 10% FBS. Cells were enumerated every day thereafter. Potential toxicity of the reagents used was routinely checked by trypan blue exclusion under inverted phase-contrast microscopy.

Flow Cytometric Analysis

Exponentially growing cultures of cell lines were seeded at an initial concentration of 1×10^6 cells/ml. Forty-eight hours later, cells were analyzed in an EPICS-XL cytofluorimeter (Coulter Científica, Móstoles, Spain). An apoptosis detection kit that measured phosphatidylserine and propidium iodide (PI) was purchased from BD Bio-

sciences PharMingen (San Diego, CA). The assay was conducted following manufacturer directions. Cells were analyzed for phosphatidylserine exposure/PI exclusion by staining with fluorescein isothiocyanate-annexin V and PI.

Immunological Analysis

Cell Extracts. To prepare whole cell extracts, cells were harvested, washed in phosphate-buffered saline, and then lysed in ice-cold lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, and 1% Nonidet P-40), containing 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM sodium pyrophosphate, and protease inhibitor Complete Mini Mixture (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The protein content of the extracts was determined by the Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad).

Western Blot Analysis. Whole cell extracts (50–100 μg) were fractionated on an SDS-polyacrylamide gel and then transferred to polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon-P; Millipore Corporation, Billerica, MA). The amount of protein and the integrity of transfer were verified by staining with Ponceau-S solution (Sigma-Aldrich). The filters were then blocked with nonfat milk or bovine serum albumin, and they were incubated overnight at 4°C, with primary antibodies from Santa Cruz at the following dilutions: 1:500, anti-pRb; 1:500, anti-p27; 1:500, anti-p21; 1:500, anti-cyclin E; and 1:2000, anti- β -actin. Signals from the primary antibodies were amplified using species-specific antisera conjugated with horseradish peroxidase (Sigma-Aldrich) and detected with a chemiluminescence substrate detection system (ECL; GE Healthcare). Blots were stripped and reprobed with anti- β -actin as a protein loading control. The relative protein levels were determined by scanning the bands with a GS-800 imaging densitometer provided with the QuantityOne 4.3.1 software (Bio-Rad), normalized by that of β -actin. The specificity of anti-p21 and anti-p27 antibodies was checked by using the corresponding blocking peptide obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (sc-397-p and sc-528-p, respectively), following manufacturer's directions.

Immunoprecipitation and Cyclin E/CDK2 Kinase Assay

Lymphoblasts from control and AD individuals were seeded at an initial cell density of 1×10^6 cells/ml and incubated for 24 h. Protein extracts (500 μg) were incubated with an antibody against cyclin E for 2 h at 4°C, followed by an incubation with 20 μl of protein G-Sepharose for 2 h. Samples were washed in kinase buffer (50 mM KCl, 8 mM MgCl_2 , 1 mM dithiothreitol, 3 mM ATP, and 50 mM HEPES, pH 7.4). The immune complexes were resuspended in 40 μl of kinase buffer containing 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ histone H1. $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (10 μCi) was added, and after shaking for 1 h at 37°C, the reaction was stopped by addition of 10 μl of 6 \times SDS sample buffer. After boiling, the samples were resolved in a 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and the phosphorylated histone H1 was visualized by autoradiography. The amounts of histone H1 were detected by gel staining with Coomassie.

Statistical Analysis

Unless otherwise stated, all data represent means \pm S.E. Statistical analysis was performed on the Data Desk package, version 4.0, for Macintosh. Statistical significance was estimated by the Student's *t* test, or, when appropriated, by analysis of variance followed by the Scheffé post hoc analysis. Differences were considered significant at a level of $p < 0.05$.

Results

Simvastatin Causes Both Cell Growth Inhibition and Apoptotic Cell Death. Figure 1 shows a time course analysis of the effect of increasing doses of simvastatin on rates of proliferation, upon serum stimulation, of lymphoblasts from control and AD patients. In agreement with previous reports

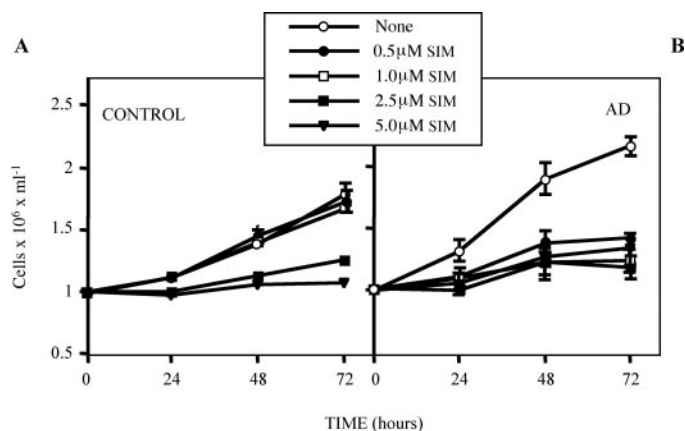


Fig. 1. Effect of increasing concentrations of SIM on proliferation of lymphoblasts from normal (A) and AD individuals (B) were seeded at an initial density of $1 \times 10^6 \times \text{ml}^{-1}$ in RPMI 1640 medium containing 10% FBS, in the presence of increasing concentrations of SIM, and they were cultured for 3 days. Every day thereafter, samples were taken for cell counting. Values shown are the means \pm S.E. for six to eight independent experiments carried out with different individuals.

from this laboratory (de las Cuevas et al., 2003; Muñoz et al., 2005, 2007), the proliferative activity of AD lymphoblasts was significantly higher than that of control cells. Treatment of cells with simvastatin resulted in a significant inhibition of cell growth of both control and AD lymphoblasts in a dose-dependent manner. However, the sensitivity toward SIM inhibitory action was higher in cells derived from AD subjects. In these cell lines, the inhibitory action was observed at the lowest concentration tested (0.5 μM) (Fig. 1B), whereas a 5-fold increase in the concentration of simvastatin is needed to decrease the total cell number in control cultures (Fig. 1A).

We next assessed the percentage of cells showing characteristics of apoptosis/necrosis following treatment with SIM. To this end, we performed a comparative analysis of annexin V exposure/PI exclusion by flow cytometry. Only high concentrations of SIM, 5 μM , induced a significant increase in the percentage of apoptotic and necrotic cells, both in control and AD lymphoblasts (Fig. 2, right). In contrast, 1 μM SIM did not have significant apoptotic or necrotic effects on AD cells. Figure 2 (middle and left) shows that approximately 80% of cells remained viable after 72 h of serum stimulation in the absence and in the presence of 1 μM SIM. These results suggest that the blockade of the serum-induced increase in the cell number of AD lymphoblasts, by low doses of SIM, is due to inhibition of cell proliferation rather than the consequence of cytotoxic or apoptotic effects.

Simvastatin Inhibits the Serum-Mediated Enhanced Proliferation of AD Lymphoblasts. To further study the antiproliferative action of SIM, 1 μM concentration was chosen in subsequent experiments to obtain maximal differences in the effect of SIM in AD cells without affecting proliferation of control cells (Fig. 3). As shown in Fig. 3, the inhibitory effect of simvastatin was time-dependent.

For determining the role of various isoprenoids derived from MEV in regulating the inhibitory effect of simvastatin on proliferation of AD lymphoblasts, cells were cotreated with 1 μM SIM and MEV or various isoprenoid intermediaries GGPP, FPP, and SQ. Figure 4 shows that MEV reversed the inhibitory effect of SIM on cell proliferation. The cotreatment of AD cells with GGPP and FPP, but not SQ, prevented

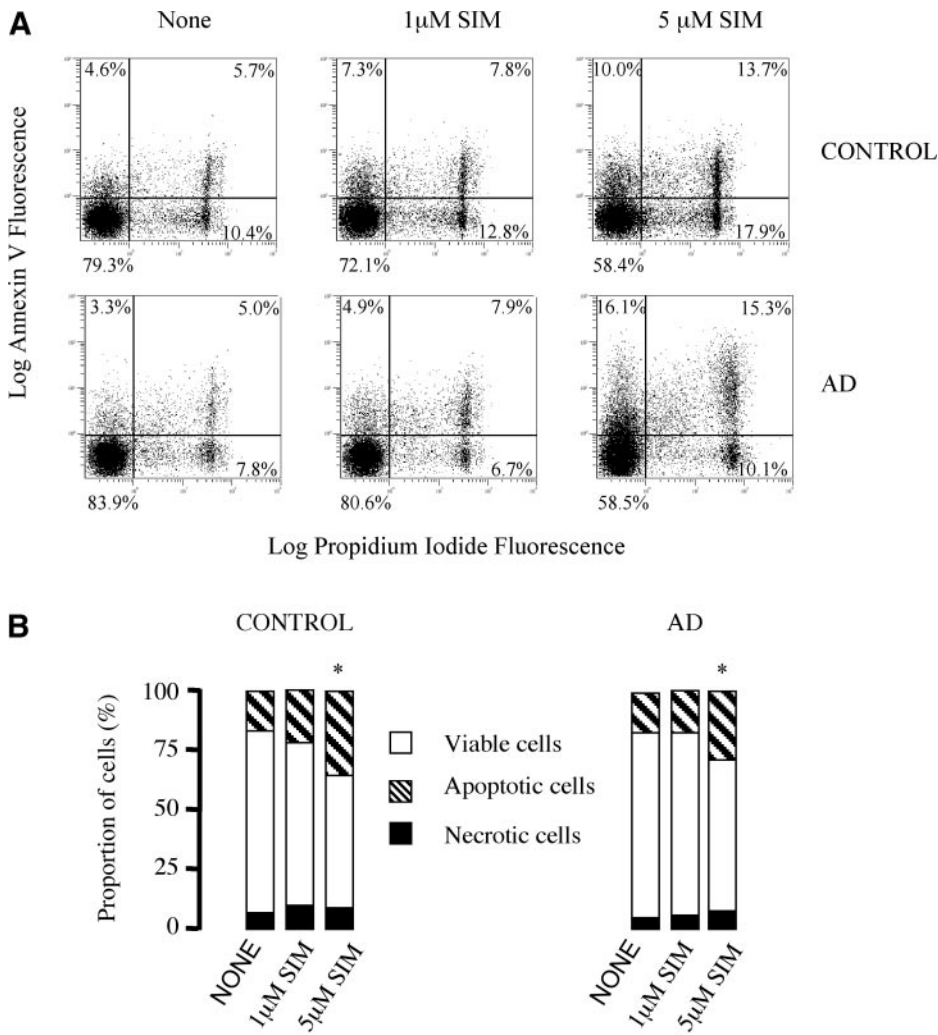


Fig. 2. Flow cytometric analysis of the fraction of viable, apoptotic, and necrotic cells after treatment of AD lymphoblasts with SIM. A, lymphoblasts from AD subjects were seeded at an initial density of $1 \times 10^6 \times \text{ml}^{-1}$, and they were cultured for 2 days in the absence (Me_2SO) or in the presence of 1 or 5 μM SIM. Then, they were stained with fluorescein isothiocyanate-annexin V and propidium iodide. A representative experiment is shown. B, means of five experiments carried out with cells derived from different individuals are shown. *, $p < 0.05$, significant difference in the proportion of apoptotic cells compared with untreated cultures.

the action of SIM, suggesting that the modulatory effect of SIM is dependent on GGPP and FPP and independent of cholesterol synthesis.

Effects of Simvastatin on the Expression of Key Cell Cycle Regulatory Proteins. Previous work from this laboratory demonstrated that the serum-mediated enhancement of AD cell proliferation is the consequence of altered G_1/S transition (de las Cuevas et al., 2003; Muñoz et al., 2005). It was shown that serum induced an increase in the expression levels and phosphorylation status of the pRb family proteins in AD lymphoblasts. For this reason, we investigated the effect of SIM on the activity of the cyclic E-dependent kinase and on the phosphorylation of pRb in control and AD lymphoblasts. Data in Fig. 5 confirm and extend our previous finding (de las Cuevas et al., 2003), showing that both levels and phosphorylation of pRb were increased in AD lymphoblasts (Fig. 5). The SIM treatment did not alter significantly the phosphorylation status of pRb in control cells, but it partially prevented the serum-induced enhanced phosphorylation of pRb in lymphoblasts from AD patients (Fig. 5). SIM inhibited the serum-mediated enhanced cyclin E/CDK2-associated kinase activity in AD cells (Fig. 5).

The SIM-induced inhibition of cell proliferation and cyclin E/CDK2 kinase in AD cells was not due to changes in the expression levels of CDK2 and cyclin E (Fig. 6A), but it was

associated with an accumulation of the CDK inhibitors $p27^{\text{Kip1}}$ and $p21^{\text{Cip1}}$ (hereafter p27 and p21, respectively). SIM addition increased the content of these two proteins in AD lymphoblasts, without changing the expression levels of p27 and p21 in control cells (Fig. 6B).

Effect of SIM on Degradation of p21 and p27 Proteins. As in other cell types, p21 is a short-lived protein in human lymphoblasts (Fig. 7). Inhibition of protein synthesis with cycloheximide leads to a rapid decrease in p21 levels, with less than 50% remaining after 2 h. It is shown that p21 disappears faster in AD cells than in control lymphoblasts, showing a shorter half-life of p21 (0.9 ± 0.04 versus 1.7 ± 0.12 h in control cells). Treatment of cells with SIM had no effect on control cells, but it significantly reduced the rate of decay of p21 levels on AD cells (Fig. 7). The cellular content of β -actin was not affected by SIM treatment in control and in AD cells (Fig. 7), thus making unlikely the possibility of a direct interference with the activity of cellular proteases. In agreement with a recent report from this laboratory (Muñoz et al., 2007), p27 degradation was enhanced in AD lymphoblasts (Fig. 7). This protein has a longer half-life than p21 in AD cells (approximately 12 h). As shown in Fig. 7, treatment of AD cells with SIM increased the half-life of p27 protein to values found for control cells (approximately 22 h).

Figure 8 shows that the effects of SIM on p21 and p27

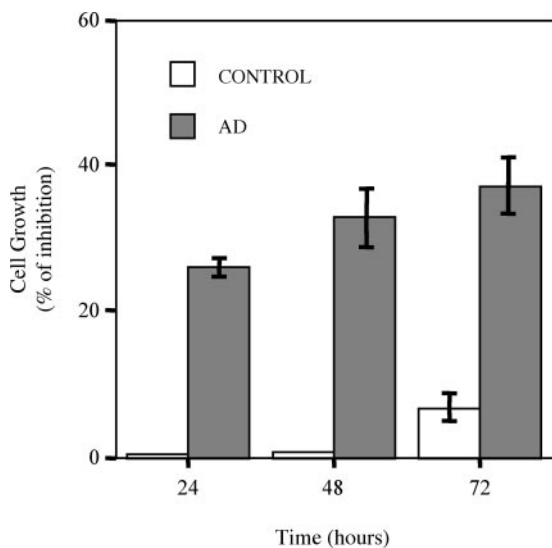


Fig. 3. Effect of SIM on the serum-mediated proliferative activity of control and AD lymphoblasts. Lymphoblasts from control and AD subjects were seeded at an initial density of $1 \times 10^6 \times \text{ml}^{-1}$, and they were cultured for 3 days in the absence (Me_2SO) or in the presence of $1 \mu\text{M}$ SIM. Every day thereafter cells were enumerated. The percentage of cell growth is shown after setting the growth of untreated cells as 100%. Values shown are the means \pm S.E. for six to eight experiments carried out with cells derived from different individuals. The mean values of cell proliferation ranged from 1.7 to 1.92 and from 1.6 to 1.99 cells $\times 10^6 \times \text{ml}^{-1}$ in control cells in the absence or in the presence of $1 \mu\text{M}$ SIM, respectively. For AD cells, the corresponding values ranged from 2.02 to 2.43 and from 1.1 to 1.8 cells $\times 10^6 \times \text{ml}^{-1}$ in the absence or in the presence of $1 \mu\text{M}$ SIM.

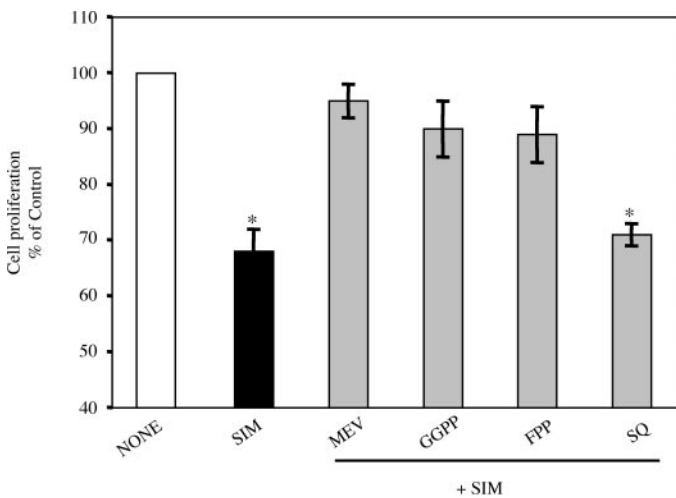


Fig. 4. Modulatory effect of SIM on serum-induced cell proliferation in AD lymphoblasts. Lymphoblasts from AD subjects were seeded at an initial density of $1 \times 10^6 \times \text{ml}^{-1}$, and they were cultured for 3 days in the absence (Me_2SO), or in the presence of $1 \mu\text{M}$ SIM alone or in combination with $200 \mu\text{M}$ MEV, $5 \mu\text{M}$ GGPP, $5 \mu\text{M}$ FPP, or $5 \mu\text{M}$ SQ. Cell proliferation was determined by enumeration of cells excluding trypan blue. The percentage of cell proliferation is shown after setting the proliferation of untreated cells as 100%. Values shown are the means \pm S.E. for four experiments carried out with cells derived from different individuals. *, $p < 0.01$, significantly different from untreated cells.

levels were completely prevented by cotreatment with cycloheximide, indicating de novo protein synthesis is required for its effects. SIM and the proteasome inhibitor MG132 had similar effect on p21 and p27 accumulation, and no additive effects were observed when added together (Fig. 8). In addition, the caspase inhibitor Z-VAD-FMK did not prevent the

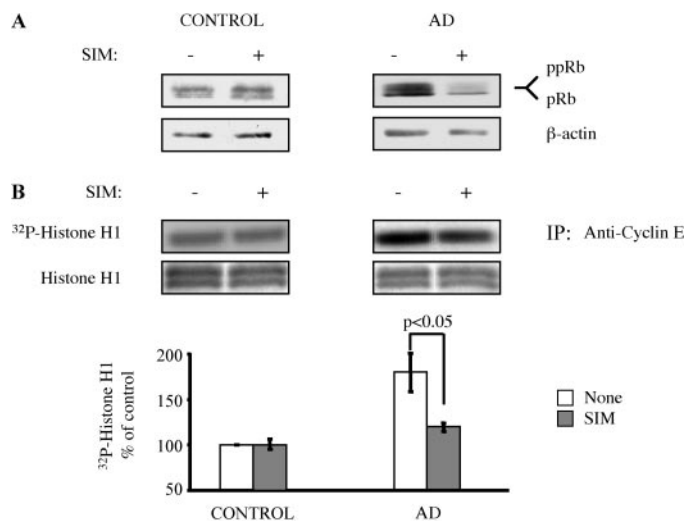


Fig. 5. Effects of SIM on phosphorylation status of pRb and cyclin E/CDK2 kinase activity in control and AD lymphoblasts. A, lymphoblasts from AD subjects were seeded at an initial density of $1 \times 10^6 \times \text{ml}^{-1}$ and incubated for 24 h in the absence (Me_2SO) or in the presence of $1 \mu\text{M}$ SIM. Hypo- and hyperphosphorylated pRb (ppRb) levels were determined by Western blot. Representative Western blots are presented. B, control and AD lymphoblasts were incubated in RPMI 1640 medium containing 10% FBS for 24 h. Cell extracts were immunoprecipitated using anti-cyclin E antibody, and they were assayed for kinase activity using histone H1 as substrate. Phosphorylated histone H1 was visualized using autoradiography. Levels of H1 were determined by gel staining with Coomassie. A representative experiment is shown, whereas below the densitometric analysis is presented. Data shown represent the means \pm S.E. for four different experiments.

effect of SIM on p21 and p27 accumulation in AD cells. Taken together, these results suggest that SIM inhibits the proteasome-mediated degradation of p21 and p27 proteins.

Discussion

Recent evidence suggests that statin use is associated with decreased risk for AD, although the mechanisms underlying the apparent risk reduction are poorly understood. In the present work, we have considered the possibility that the benefit of statins treatment for AD patients is related to the ability of these drugs to inhibit cell proliferation. This issue has been addressed by carrying out a comparative study of the influence of statin treatment on the proliferative activity of EBV-immortalized lymphocytes from late-onset AD patients and age-matched nondemented individuals. Previous work from this laboratory indicates that differences in the proliferative activity and cell cycle regulatory proteins are also found between untransformed lymphocytes from control and AD subjects (Bartolomé et al., 2007; Muñoz et al., 2007).

Incubation of lymphoblasts from AD patients and control subjects, with increasing concentrations of SIM inhibited cell growth and induced apoptosis in a dose-response-dependent manner. AD cells were more sensitive to SIM than control cells. At low doses ($\leq 1 \mu\text{M}$), SIM selectively blunted the serum-mediated enhancement of proliferation of AD lymphoblasts, without altering the normal basal rates of proliferation. It is known that statin induced cell growth inhibition is tumor cell-specific. Micromolar concentrations of statins were very effective in inhibiting cell proliferation of human hepatocarcinoma cells, but they had little effect on normal hepatocytes (Kubota et al., 2004). Moreover, primary myeloid

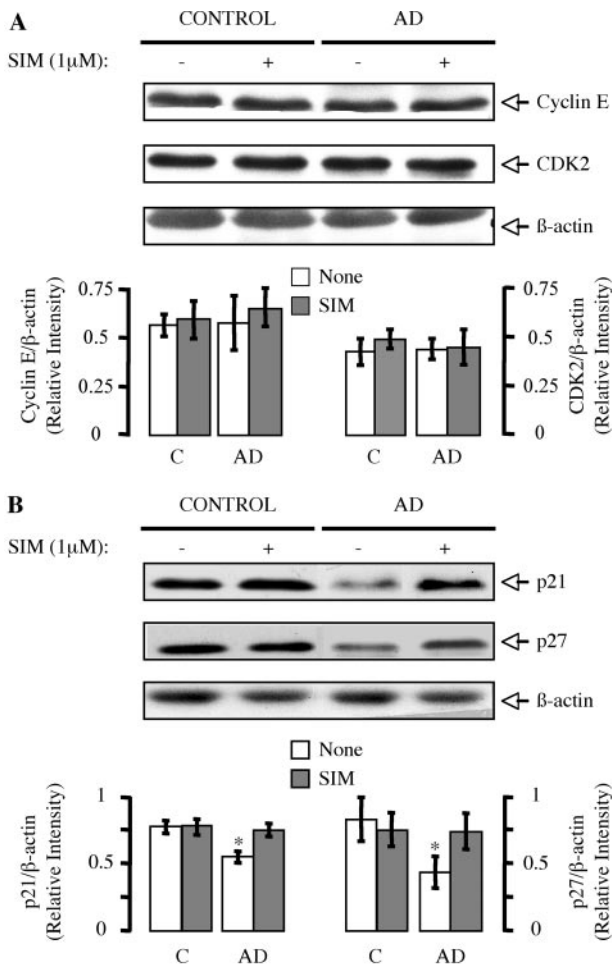


Fig. 6. Effects of SIM on CDK2, cyclin E, and p21 and p27 protein levels in control and AD lymphoblasts. A, lymphoblasts from AD subjects were seeded at an initial density of $1 \times 10^6 \times \text{ml}^{-1}$, and they were cultured for 24 h in the absence (Me_2SO) or in the presence of 1 μM SIM. Representative Western blots of cyclin E and CDK2 proteins in control and AD lymphoblasts are shown. Band intensities were determined and normalized by that of β -actin. Results are means \pm S.E. for four to six independent experiments. B, representative Western blots of p21 and p27 proteins. The densitometric data represent the means \pm S.E. for six different experiments. *, $p < 0.05$.

B leukemic and myeloma cells undergo apoptosis with statins, whereas their normal counterparts are resistant to statin effects (van de Donk et al., 2002). Thus, the higher sensitivity of AD cells to SIM may represent other neoplastic-like feature of these cell lines, as suggested previously (de las Cuevas et al., 2005).

The antiproliferative effect of SIM in AD cells is directly related to HMG-CoA reductase inhibition because cell proliferation was completely or partially rescued by MEV or FPP and GGPP, respectively, but not by SQ, an intermediate of cholesterol synthesis. These results suggest that prenylation of small G proteins could be involved in the serum-enhanced proliferation of AD cells.

SIM inhibits the serum-mediated increased proliferation of AD cells by attenuating the activity of several key cell cycle regulators that control G_1/S progression. It particularly prevented the enhanced phosphorylation of pRb in response to serum in AD cells. Mitogenic stimuli induce hyperphosphorylation of pRb and related "pocket" proteins from mid- G_1 to mitosis. pRb hyperphosphorylation releases E2F tran-

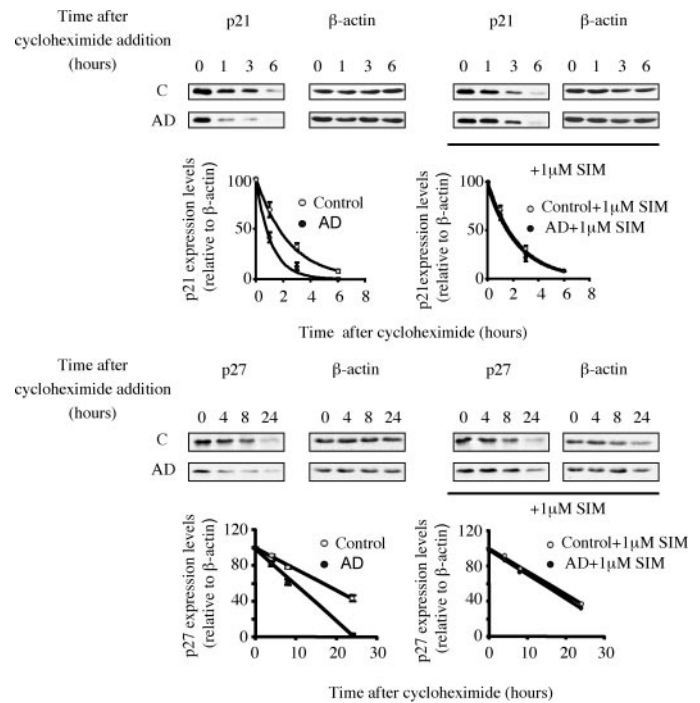


Fig. 7. Effect of SIM on degradation of p21 and p27 proteins in control and AD lymphoblasts. A, cells were incubated for 24 h in RPMI 1640 medium containing 10% FBS in the absence (Me_2SO) or in the presence of 1 μM SIM, and then 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cycloheximide was added. Cells were harvested 1, 3, and 6 h thereafter, and p21 was detected by immunoblotting. The decay of the p21 signal is graphed as a function of time post-cycloheximide addition. Data from five different experiments were used to calculate the half-life of the protein. B, experimental conditions are identical to that described above, except that for p27 detection, aliquots of cells were taken at 4, 8, and 24 h after cycloheximide addition. The experiment was performed twice with different cell lines with similar results, and one of the experiments is shown.

scription factors, thus contributing to the expression of several growth and cell cycle regulatory genes with functional E2F binding sites in their promoters (Stevaux and Dyson, 2002). In agreement with previous reports (de las Cuevas et al., 2003; Muñoz et al., 2005, 2007) lymphoblasts from AD patients showed a higher degree of phosphorylation of pRb. The addition of SIM had no effect on the phosphorylation status of pRb in control cells, but it significantly reduced the levels of the hyperphosphorylated form of pRb in AD lymphoblasts. This effect was due to inhibition of the kinase activity of cyclin E/CDK2 complex, and it was found to be associated with increased levels of the CDK inhibitors p21 and p27.

Accumulating evidence has suggested the involvement of p21 and p27 in statins-induced antiproliferative effects in a number of cell types (Efuet and Keyomarsi, 2006; Takeda et al., 2007). However, the molecular mechanisms implicated in up-regulation of these proteins by statins treatment are not fully elucidated.

p21 and p27 abundance are regulated at the levels of transcription and protein turnover. The ubiquitin-proteasome pathway is thought to be the prevalent mechanism of p27 regulation in many cellular systems (Pagano et al., 1995). The regulation of p21 levels is very complex. Although transcriptional regulation, by p53-dependent (el-Deiry et al., 1993) and p53-independent mechanisms (Parker et al., 1995), is well established, recent studies suggest that p21 can also be regulated by posttranslational mechanisms (Na-

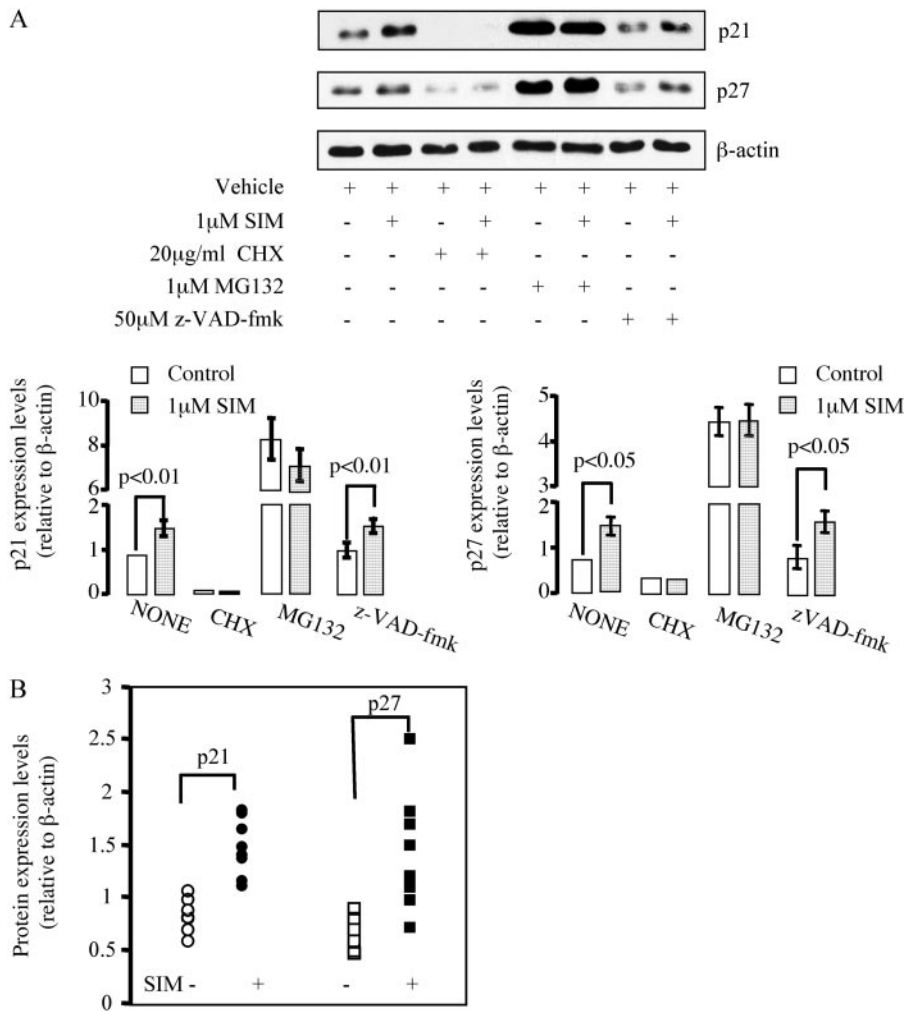


Fig. 8. Effects of cycloheximide, MG132, and Z-VAD-FMK on SIM-induced p21 and p27 accumulation in AD lymphoblasts. A, cells from AD patients were incubated for 24 h in RPMI 1640 medium containing 10% FBS, in the absence (Me_2SO) or in the presence of 1 μM SIM alone or with 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cycloheximide, 1 μM MG132, or 50 μM Z-VAD-FMK. Representative Western blots of p21 and p27 are presented. Densitometric analysis of these proteins is shown below. Results are means \pm S.E. for six to eight independent experiments. B, scatter plots comparing p21 and p27 levels between untreated (open symbols) or treated with 1 μM SIM (filled symbols) lymphoblasts derived from eight different patients.

kayama and Nakayama, 2006). Our results suggest that SIM induced the accumulation of p21 and p27 proteins in AD lymphoblasts, at least partially, by inhibiting the rate of degradation of these two proteins. First, the half-lives of p21 and p27 were increased up to the values found in control cells, following treatment of AD lymphoblasts with SIM, and second, the effects of SIM were dependent on de novo protein synthesis. The ubiquitin-proteasome pathway seems to be implicated in the impaired degradation of p21 and p27 proteins induced by SIM. This asseveration is supported by the observations that SIM mimicked the effect of the proteasome inhibitor MG132 on the cellular content of p21 and p27 proteins and that the effect of SIM was not influenced by cotreatment with the caspase inhibitor Z-VAD-FMK. Whether SIM is able to modify the activity of the proteasome machinery or the ubiquitination of p21 and p27 proteins cannot be ascertained from the present work. We had recently reported that global proteasome activity and the accumulation of ubiquitin-tagged proteins are not impaired in lymphoblasts from AD patients (Muñoz et al., 2007) and thus cannot be the explanation for the down-regulation of p21 and p27 in AD cells. It was also shown that enhanced degradation of p27 protein in AD lymphocytes was dependent on signaling through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway (Muñoz et al., 2007). Whether this pathway is also implicated in the control of the cellular content of p21 protein and the

possible modulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-mediated signaling pathway by statins is currently under investigation in our laboratory. The possibility should also be considered that differences in the cellular content of the CDK inhibitors between control and AD cells may be due to changes in the redox balance in AD cells, taking into account the sensitivity of p27 and p21 protein levels to redox status (Hwang et al., 2004).

In summary, the present work indicates that SIM could effectively suppress the serum-mediated enhanced proliferation of AD cells, and this effect was associated with substantial elevation of CDK inhibitors p21 and p27, leading to inactivation of the kinase activity of the cyclin E/CDK2 complex during G_1/S progression. Considering that changes in the abundance of CDK inhibitors had also been detected in AD brain (Griffin et al., 2005) and that cell cycle regulatory failure has been linked to the disease pathogenesis, our results could provide new insight into one of the multiple potential mechanisms through which statins may exert neuroprotective actions in AD brain. This effect of SIM, up-regulating specifically p21 and p27 levels may lead to vulnerable neurons that had entered the cell cycle to arrest at G_1/S restriction point.

Regarding the pathophysiological relevance of our findings, it is worth mentioning that recent evidence in AD patients and in animal models (Yang et al., 2003; Yang and

Herrup, 2007) supports the hypothesis that cell cycle dysfunction is an early event in AD pathogenesis. Cell cycle proteins have been found in brains of individuals with mild cognitive impairment (Yang et al., 2003), and cell cycle disturbances have also been reported in lymphocytes from mild cognitive impairment patients (Nagy et al., 2002). These observations suggest that cell cycle-induced death is a central mechanistic feature of the disease, and therefore alterations in cell cycle regulatory proteins may serve as disease markers. On these grounds, the demonstration of shared alterations in p21 and p27 protein levels in peripheral lymphocytes and AD brain, suggest that these cells, easily obtainable, may be potential useful surrogate for early diagnosis and therapeutic monitoring of AD.

References

- Bartolomé F, Cuevas N, Muñoz U, Bermejo F, and Martín-Requero A (2007) Impaired apoptosis in lymphoblasts from Alzheimer's disease patients: cross-talk of Ca^{2+} /calmodulin and ERK1/2 signaling pathways. *Cell Mol Life Sci* **64**:1437–1448.
- Busser J, Geldmacher DS, and Herrup K (1998) Ectopic cell cycle proteins predict the sites of neuronal cell death in Alzheimer's disease brain. *J Neurosci* **18**:2801–2807.
- Casademont J, Miro O, Rodriguez-Santiago B, Viedma P, Blesa R, and Cardellach F (2003) Cholinesterase inhibitor rivastigmine enhance the mitochondrial electron transport chain in lymphocytes of patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* **206**:23–26.
- Copani A, Uberti D, Sortino MA, Bruno V, Nicoletti F, and Memo M (2001) Activation of cell-cycle-associated proteins in neuronal death: a mandatory or dispensable path? *Trends Neurosci* **24**:25–31.
- Corsini A, Maggi FM, and Catapano AL (1995) Pharmacology of competitive inhibitors of HMG-CoA reductase. *Pharmacol Res* **31**:9–27.
- Danesh FR, Sadeghi MM, Amro N, Phillips C, Zeng L, Lin S, Sahai A, and Kanwar YS (2002) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors prevent high glucose-induced proliferation of mesangial cells via modulation of Rho GTPase/p21 signaling pathway: implications for diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:8301–8305.
- de las Cuevas N, Muñoz U, Hermida OG, and Martín-Requero A (2005) Altered transcriptional regulators in response to serum in immortalized lymphocytes from Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging* **26**:615–624.
- de las Cuevas N, Urceley E, Hermida OG, Saiz-Díaz RA, Bermejo F, Ayuso MS, and Martín-Requero A (2003) Ca^{2+} /calmodulin-dependent modulation of cell cycle elements pRb and p27^{Kip1} involved in the enhanced proliferation of lymphoblasts from patients with Alzheimer dementia. *Neurobiol Dis* **13**:254–263.
- Eckert A, Cotman CW, Zerfass R, Hennerici M, and Muller WE (1998) Lymphocytes as cell model to study apoptosis in Alzheimer's disease: vulnerability to programmed cell death appears to be altered. *J Neural Transm Suppl* **54**:259–267.
- Efuet ET and Keyomarsi K (2006) Farnesyl and geranylgeranyl transferase inhibitors induce G1 arrest by targeting the proteasome. *Cancer Res* **66**:1040–1051.
- el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, and Vogelstein B (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**:817–825.
- Farnier M and Davignon J (1998) Current and future treatment of hyperlipidemia: the role of statins. *Am J Cardiol* **82**:3J–10J.
- Griffin RJ, Moloney A, Kelliher M, Johnston JA, Ravid R, Dockery P, O'Connor R, and O'Neill C (2005) Activation of Akt/PKB, increased phosphorylation of Akt substrates and loss and altered distribution of Akt and PTEN are features of Alzheimer's disease pathology. *J Neurochem* **93**:105–117.
- Herrup K, Neve R, Ackerman SL, and Copani A (2004) Divide and die: cell cycle events as triggers of nerve cell death. *J Neurosci* **24**:9232–9239.
- Hwang CY, Ryu YS, Chung MS, Kim KD, Park SS, Chae SK, Chae HZ, and Kwon KS (2004) Thioredoxin modulates activator protein 1 (AP-1) activity and p27Kip1 degradation through direct interaction with Jab1. *Oncogene* **23**:8868–8875.
- Ibarreta D, Gómez-Isla T, Portera-Sánchez A, Parrilla R, and Ayuso MS (1995) Apolipoprotein E genotype in Spanish patients of Alzheimer's or Parkinson's disease. *J Neurol Sci* **14**:146–149.
- Katz MS (2005) Therapy insight: potential of statins for cancer chemoprevention and therapy. *Nat Clin Pract Oncol* **2**:82–89.
- Koyuturk M, Ersoz M, and Altioik N (2004) Simvastatin induces proliferation inhibition and apoptosis in C6 glioma cells via c-jun N-terminal kinase. *Neurosci Lett* **370**:212–217.
- Kubota T, Fujisaki K, Itoh Y, Yano T, Sendo T, and Oishi R (2004) Apoptotic injury in cultured human hepatocytes induced by HMG-CoA reductase inhibitors. *Biochem Pharmacol* **67**:2175–2186.
- Muñoz U, Bartolomé F, Bermejo F, and Martín-Requero A (2007) Enhanced proteasome-dependent degradation of the CDK inhibitor p27(kip1) in immortalized lymphocytes from Alzheimer's dementia patients. *Neurobiol Aging*, in press.
- Muñoz U, de las Cuevas N, Bartolomé F, Hermida OG, Bermejo F, and Martín-Requero A (2005) The cyclopentenone 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 inhibits G1/S transition and retinoblastoma protein phosphorylation in immortalized lymphocytes from Alzheimer's disease patients. *Exp Neurol* **195**:508–517.
- Nagy Z (2005) The last neuronal division: a unifying hypothesis for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* **9**:531–541.
- Nagy Z, Combrinck M, Budge M, and McShane R (2002) Cell cycle kinesin in lymphocytes in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **317**:81–84.
- Nakayama KI and Nakayama K (2006) Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* **6**:369–381.
- Neitzel H (1986) A routine method for the establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines. *Hum Genet* **73**:320–326.
- Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, Yew PR, Draetta GF, and Rolfe M (1995) Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* **269**:682–685.
- Parker SB, Eichele G, Zhang Rawls A, Sands T, Bradley A, Olson EN, Harper JW, and Elledge SJ (1995) p53-independent expression of p21/CIP1 in muscle and other terminally differentiated cells. *Science* **267**:1024–1027.
- Reale M, Iarlori C, Gambi F, Lucci I, Salvatore M, and Gambi D (2005) Acetylcholinesterase inhibitors effects on oncostatin-M, interleukin-1beta and interleukin-6 release from lymphocytes of Alzheimer's disease patients. *Exp Gerontol* **40**:165–171.
- Rockwood K, Kirkland S, Hogan DB, MacKnight C, Merry H, Verreault R, Wolfson C, and McDowell I (2002) Use of lipid-lowering agents, indication bias, and the risk of dementia in community-dwelling elderly people. *Arch Neurol* **59**:223–227.
- Shobab LA, Hsiung GY, and Feldman HH (2005) Cholesterol in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* **4**:841–852.
- Stevaux O and Dyson NJ (2002) A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Curr Opin Cell Biol* **14**:684–691.
- Takeda I, Maruya S, Shirasaki T, Mizukami H, Takahata T, Myers JN, Kakehata S, Yagihashi S, and Shinkawa H (2007) Simvastatin inactivates β 1-integrin and extracellular signal-related kinase signaling and inhibits cell proliferation in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Cancer Sci* **98**:890–899.
- Takemoto M and Liao JK (2001) Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**:1712–1719.
- Tatebayashi Y, Takeda M, Kashiwagi Y, Okochi M, Kurumadani T, Sekiyama A, Kanayama G, Hariguchi S, and Nishimura T (1995) Cell-cycle-dependent abnormal calcium response in fibroblasts from patients with familial Alzheimer's disease. *Dementia* **6**:9–16.
- van de Donk NW, Kamphuis MM, Lokhorst HM, and Bloem AC (2002) The cholesterol lowering drug lovastatin induces cell death in myeloma plasma cells. *Leukemia* **16**:1362–1371.
- Wolozin B (2004) Cholesterol, statins and dementia. *Curr Opin Lipidol* **15**:667–672.
- Wolozin B, Kellman W, Russeau P, Ceslia GG, and Siegel G (2000) Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol* **57**:1439–1443.
- Yang Y, Geldmacher DS, and Herrup K (2001) DNA replication precedes neuronal cell death in Alzheimer's disease. *J Neurosci* **21**:2661–2668.
- Yang Y and Herrup K (2007) Cell division in the CNS: protective response or lethal event in post-mitotic neurons? *Biochim Biophys Acta* **1772**:457–466.
- Yang Y, Mufson EJ, and Herrup K (2003) Neuronal cell death is preceded by cell cycle events at all stages of Alzheimer's disease. *J Neurosci* **23**:2557–2563.

Address correspondence to: Dr. Ángeles Martín-Requero, Centro de Investigaciones Biológicas, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain. E-mail: amrequero@cib.csic.es

Original Article

Distinct Regulation of Cell Cycle and Survival in Lymphocytes from Patients with Alzheimer's Disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis

Fernando Bartolomé¹, Úrsula Muñoz¹, Noemí Esteras, MPharm¹, Jesús Esteban², Félix Bermejo-Pareja^{2,3} and Ángeles Martín-Requero^{1,4}

¹Department of Cellular and Molecular Pathophysiology, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), ²Hospital Doce de Octubre, ³Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), ⁴Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Ramiro de Maéztu 9, 28040 Madrid, Spain

Received 14 November 2008; Accepted 25 November 2008; Available online 01 December 2008

Abstract: Alterations in cell cycle progression seem to be associated with neuronal death in Alzheimer's disease (AD) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). We previously reported disturbances in the control of cell survival/death fate in immortalized lymphocytes from AD patients. These cell cycle dysfunction and impaired apoptosis were considered systemic manifestations of AD disease. The purpose of this study was to evaluate whether these abnormalities are characteristic of AD, or they may be seen in other neurodegenerative disorders such ALS. Our results indicate that alterations in signaling molecules, Akt and ERK1/2, and in the cyclin-dependent kinase complex inhibitors (CDKis) p21^{Cip1} and p27^{Kip1} are detectable in lymphoblasts from AD patients, but not in ALS patients, suggesting that these variables may be considered for the development of biomarkers of AD. However, lymphocytes from ALS patients do not represent a useful model to study cell cycle-related events associated with neurodegeneration of motoneurons.

Keywords: Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis, lymphocytes, cell proliferation, apoptosis, p21, p27, PI3K/Akt, ERK1/2

Introduction

Neuronal death is involved in the onset of irreversible manifestations of Alzheimer's disease (AD) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). In AD brain, neuronal loss occurs in the memory system of the association cortex, whereas in ALS the upper and lower motor neurons are affected. Although AD and ALS differ in important ways, they also have common pathogenic features, including neuroinflammation, and oxidative and mitochondrial dysfunction leading to apoptosis.

There is increasing evidence suggesting that regulatory proteins of cell cycle progression are also involved in the pathogenesis of neurodegenerative disorders and in the apoptotic death of injured neurons. Cell cycle disturbances have been observed in a number

of neurological diseases including AD [1, 2] and ALS [3, 4]. In these studies, it has been suggested that cell cycle signaling might affect neuronal death pathway. The cell cycle is associated with the phase specific expression or modification of defined sets of regulatory genes that control proliferation, differentiation or entry into a quiescent state [5]. However, re-entry of quiescent, terminally differentiated neurons into the cell cycle may result in a mitotic catastrophe and cell death [6-9].

Previous work demonstrated that cell cycle regulatory deficit is not only restricted to neurons of AD. It has also been observed in lymphocytes or fibroblasts of AD [10-13], thus providing a useful tool to further study the involvement of cell cycle-related events in the pathogenesis of AD and for the search of treatment strategies. Moreover, lymphocytes from ALS subjects have been shown to exhibit

traits of the disease [14]; however, as far as we know the possible dysfunction of cell survival/death mechanisms has not been studied in peripheral cells from ALS subjects.

Lymphoblasts from AD patients exhibit an enhanced stimulation of proliferation and survival compared with that from control individuals [13, 15-17]. The enhanced proliferative activity of the AD cell lines was associated with a high degree of phosphorylation of Akt and downregulation of the inhibitors of the G1-S checkpoint of the cell cycle, p21 and p27, while the increased survival of serum-deprived AD cells was accompanied by diminished ERK1/2 activation. To investigate whether these abnormalities are characteristic of AD or they are common to neurodegenerative disorders, we generated lymphoblastoid cell lines from ALS patients and compared the cellular response to serum to that of AD lymphoblasts.

Our results indicate that alterations in signaling molecules, Akt and ERK1/2, and in the CDKi p21 and p27 are detectable in immortalized lymphocytes of patients with AD, but not patients with ALS, suggesting that these variables may be considered for the development of biomarkers of AD. However, lymphocytes from ALS patients do not represent a useful model to study cell cycle-related events associated with neurodegeneration of motoneurons.

Materials and Methods

Materials

Polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes for western blots were purchased from Bio-Rad (Richmond, CA). Rabbit polyclonal antibodies (pAbs) against human phospho-Akt (Ser473), phospho-ERK1/2, total ERK1/2 were obtained from Cell Signaling (Beverly, MA), and pAbs such as rabbit anti-human p27 (sc-528) and p21 (sc-397), and goat anti-human total Akt (sc-1618) were from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA). The enhanced chemiluminescence (ECL) system was from Amersham (Uppsala, Sweden). Tissue culture media and reagents were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA).

Cell Lines

20 patients diagnosed in the Department of

Neurology of the University Hospital Doce de Octubre (Madrid, Spain) of probable Alzheimer according to NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Diseases and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association) criteria [18]. Of the 20 patients, 7 had mild AD (DSM-III-R, Mini Mental State Examination (MMSE) score between 18-24), 5 had moderate AD (MMSE:10-18), and 8 had severe AD (MMSE:<10). 10 patients suffering from ALS (diagnosed based on the revised El Escorial criteria were used in this study [19]. A group of 20 healthy individuals was used as control. A summary of demographic and clinical characteristics of all subjects enrolled in this study is reported in **Table 1**.

Table 1 Summary of study population

	AD	ALS	HC
Age	75±2	63±3	71±2
Age range	59-89	46-79	43-82
Gender			
Male	9	5	8
Female	11	5	12
Total	20	10	20

HC, healthy control individuals, no sign of neurological disease; AD, patients with a diagnosis of probable AD; ALS, patients with a diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Values are expressed as mean±SE.

All study protocols were approved by the Spanish Council of Higher Research Institutional Review Board and are in accordance with National and European Union Guidelines. In all cases, peripheral blood samples were taken after written informed consent of the patients or their relatives.

Establishment of lymphoblastic cell lines was performed in our laboratory as previously described [20] by infecting peripheral blood lymphocytes with the Epstein Barr virus (EBV) [21]. Cells were grown in suspension in T flasks in an upright position, in approximately 10 ml of RPMI-1640 (Invitrogen) medium that contained 2 mM L-glutamine, 100 g/ml streptomycin and, unless otherwise stated, 10 % (v/v) fetal bovine serum (FBS) and maintained in a humidified 5% CO₂ incubator at 37°C. Fluid was routinely changed every two days by removing the medium above the settled cells and replacing it with an equal volume of fresh medium.

Determination of Cell Proliferation

Proliferation was determined by cell counting in a Neubauer chamber. EBV immortalized lymphocytes from control and AD individuals were seeded at an initial cell concentration of 1×10^6 cells/ml. Cells were enumerated everyday thereafter. Potential toxicity of the reagents used was routinely checked by trypan blue exclusion under inverted phase-contrast microscopy.

Preparation of Cell Extracts

To prepare whole cell extracts, cells were harvested and washed in PBS and then lysed in ice-cold lysis buffer (20mM Hepes pH 7.9, 25% glycerol, 0.4M NaCl, 50mM NaF, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM DTT), containing 1mM sodium orthovanadate, 1mM PMSF, 1mM sodium pyrophosphate and protease inhibitor complete mini mixture (Roche, Mannheim).

Western Blot Analysis

50-100 mg of whole cell extracts were fractionated on a SDS polyacrylamide gel, and transferred to PVDF membrane (Immobilon-P). The amount of protein and the integrity of transfer were verified by staining with Ponceau-S solution (Sigma). The filters were then blocked with non-fat milk and incubated at 4°C overnight, with primary antibodies from Santa Cruz at the following dilutions: 1:500 anti-p27, 1:500 anti-p21, 1:1000 anti-phospho Akt, 1:1000 anti-Akt, 1:500 anti-phospho ERK1/2, 1:2000 anti-ERK1/2, and 1:2000 anti-actin. Signals from the primary antibodies were amplified using species-specific antisera conjugated with horseradish peroxidase (Sigma) and detected with a chemiluminescent substrate detection system ECL (Amersham). The relative protein levels were determined by scanning the bands with a GS-800 imaging densitometer provided with the Quantity One 4.3.1. software from BioRad.

Statistical Analysis

Unless otherwise stated, all data represents mean \pm SE. Statistical analysis was performed on the Data Desk package (version 4.0) for Macintosh. Statistical significance was estimated by analysis of variance (ANOVA) followed by the Scheffe test for multiple comparisons. Differences were considered significant at a level of $p < 0.05$.

Results

Proliferation of Immortalized Lymphocytes from Control and AD or ALS Patients

Data in **Figure 1** confirms and extends our previous finding [13, 15, 17, 22] by showing that the serum-induced proliferation of lymphoblasts from AD patients is enhanced compared with that of cells from healthy controls. In contrast, no significant differences were observed between control and ALS lymphoblasts (**Figure 1**).

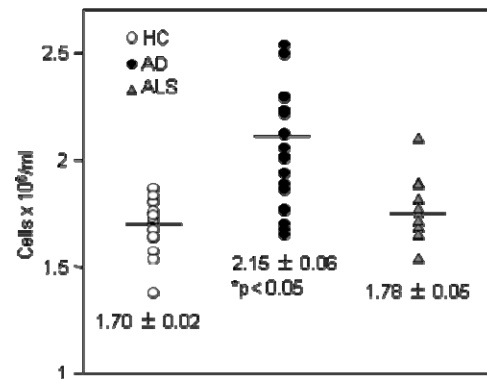


Figure 1 Scatter plot comparing proliferative activity between control and AD or ALS lymphoblasts. Immortalized lymphoblasts from control, AD, and ALS individuals were seeded at an initial density of 1×10^6 /ml and cultured for 3 days in RPMI medium containing 10% FBS. Everyday thereafter, samples were taken for cell counting. Values shown are from day 3 of culture, and are the mean \pm SE. Statistical significance was determined by ANOVA.

Since the mean age of ALS patients was lower than that of control or AD subjects, we investigated whether the proliferative activity of control cells was affected by aging. As shown in **Figure 2A**, there were no differences in proliferation of cells derived from subjects younger or older than 70 years old. Moreover, cell proliferation of lymphoblasts from AD patients was not affected by the degree of disease progression, as cell lines from mild, moderate or severe AD patients show similar rates of cell growth (**Figure 2B**).

Cellular Response to Serum Withdrawal in Control and AD or ALS Lymphoblasts

Data in **Figure 3** summarizes the cellular response to serum deprivation of all cell lines used in this study, derived from AD and ALS patients and control individuals. In agreement with previous observations [16], it is shown

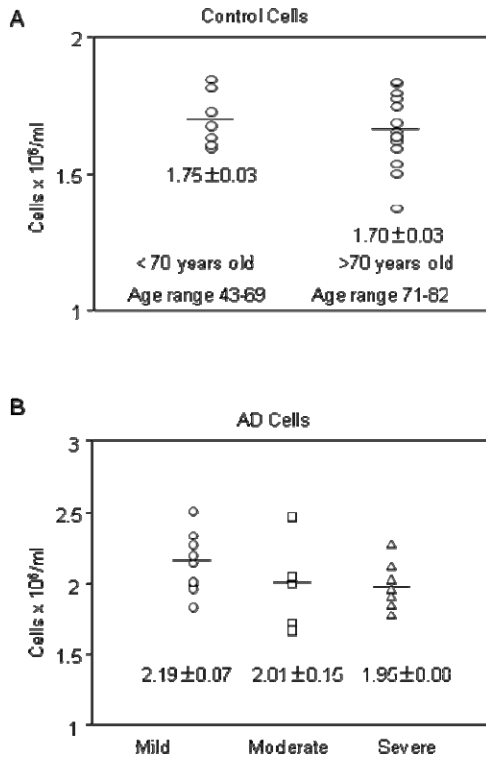


Figure 2 Aging does not affect the proliferative activity of control cells. Neither AD progression influences cell proliferation. **A.** Scatter plot comparing the influence of aging on the proliferation of lymphoblasts from control individuals. Immortalized lymphocytes from control individuals were seeded at an initial density of 1×10^6 /ml and cultured for 3 days in RPMI medium containing 10% FBS. **B.** lymphoblasts from mild, moderate or severe AD were cultured as above. Values shown are the mean \pm SE.

that AD lymphoblasts were more resistant to serum withdrawal-induced cell death than control cells. The cellular response of ALS lymphoblasts did not differ from that of control cells. In control, as well as in ALS cultures, more than 30% of cells died after 3-day period of serum starvation, whereas less than 10% of AD cells died during the same period of time.

Effect of PI3K/Akt and MAPK Activation on the Survival of Control and AD Lymphoblasts

We have recently reported that alterations of PI3K/Akt and ERK1/2 signaling pathways underlined the abnormal cellular response of AD lymphoblasts to the presence or the absence of trophic support [15, 16]. Enhanced proliferation of AD lymphoblasts was associated with increased activation of

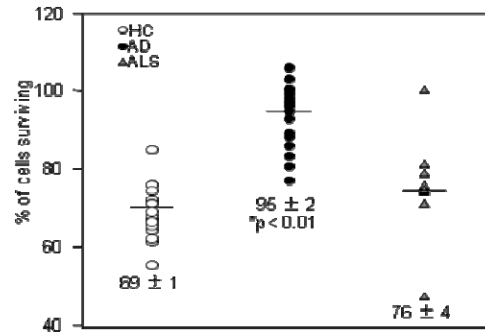


Figure 3 Scatter plot comparing cell survival following serum deprivation between lymphoblasts derived from control, AD or ALS patients. Immortalized lymphocytes from control, AD, and ALS individuals were seeded at an initial density of 1×10^6 /ml and incubated in serum-free RPMI medium for 72 hours. Cell viability was determined by Trypan blue exclusion under inverted phase-contrast microscopy, and expressed as percentage of the initial number of cells at day 0. Values shown are the mean \pm SE. Statistical significance was determined by ANOVA.

PI3K/Akt as monitored by the stimulation of phosphorylation of Akt [15]. Data in **Figure 4** shows, in consonance with the lack of stimulation of proliferation of ALS lymphoblasts, no changes in the cellular content of phosphorylated Akt, compared with levels of control cells. As expected, AD cells show increased phosphorylation of Akt relative to the levels of phospho Akt observed in control or ALS cells (**Figure 4**). PI3K/Akt signaling appears to regulate the G1-S checkpoint of cell cycle by downregulating the levels of two CDK inhibitors p27 and p21 [15, 17]. It was suggested that PI3K/Akt modulates the rate of protein degradation by the proteasome, after phosphorylation of specific residues of these proteins. Therefore, the levels of these proteins were determined in control, AD or ALS lymphoblasts. Only cells from AD patients exhibit significant lower content of p21 and p27 (**Figure 5**).

The ERK1/2 pathway seems to support lethality in immortalized lymphoblasts, as the specific inhibitor PD98059 prevented the serum withdrawal-induced cell death by apoptosis [16]. Moreover, it was shown that deprivation of trophic support induced a sustained increase in the ERK1/2 phosphorylation of significantly lower intensity in AD lymphoblasts [16]. In this work, we have compared the activation of this pathway in

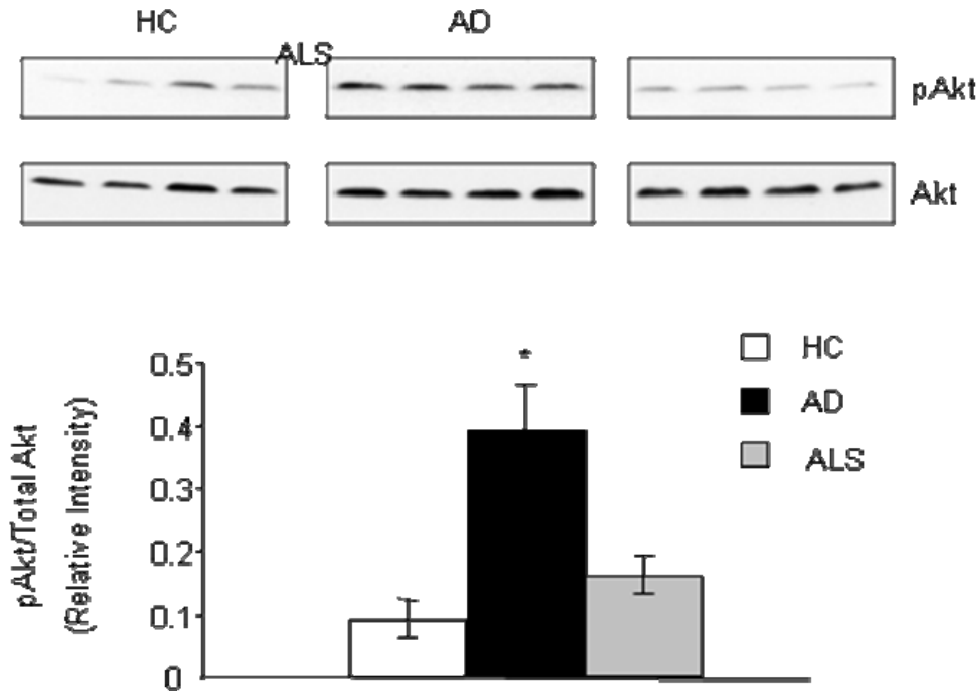


Figure 4 PI3K/Akt activation in control, AD and ALS lymphoblasts. Control, AD, and ALS lymphoblasts from 4 different individuals, were incubated in RPMI containing 10% FBS. Whole cell extracts were prepared 24 h thereafter, and were immunoblotted with antibodies anti-phospho-Akt (Ser473) and total Akt. The densitometric data represent the mean \pm SE. * $p < 0.05$, significantly different from control cells.

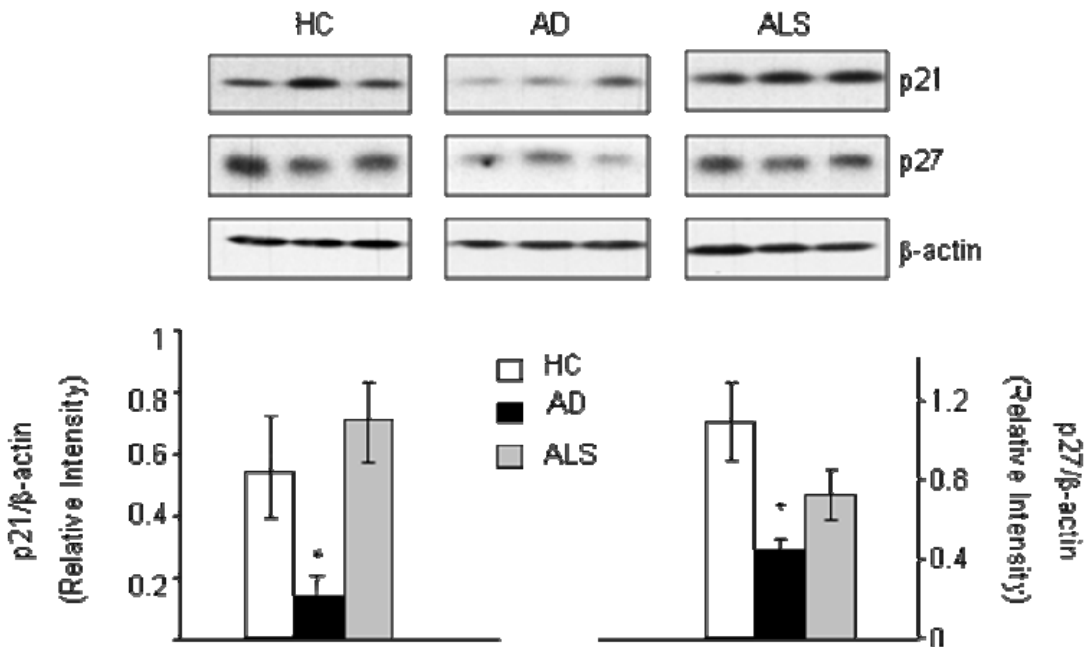


Figure 5 p21 and p27 protein levels in control, AD and ALS lymphoblasts. Lymphoblasts from control, AD or ALS subjects were seeded at an initial density of $1 \times 10^6 \times \text{ml}^{-1}$ and cultured for 24 h in RPMI medium containing 10% FBS. Thereafter aliquots were taken to prepare cell extracts. Western blots of p21 and p27 proteins in 3 different cell lines from control, AD, and ALS individuals are shown. Densitometric analysis of these proteins are shown below. Results are means \pm SE. * $p < 0.05$ significantly different from control cells.

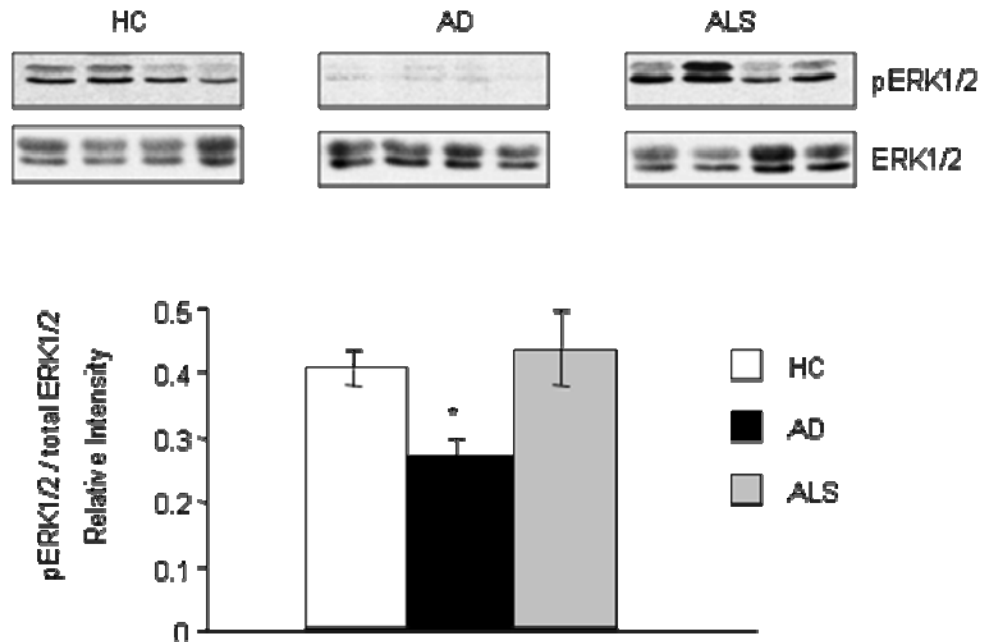


Figure 6 Activity of ERKs in serum deprived control, AD and ALS lymphoblasts. Lymphoblasts from control, AD, and ALS lymphoblasts were serum deprived for 72 h. Thereafter aliquots were taken to prepare cell extracts. The relative levels of activation of p42/p44 ERKs were assessed by western blot analysis using phospho-specific antibodies. The same membranes were then stripped and reprobed with antibodies against total ERKs. Representative Western blots in 4 different cell lines from control, AD and ALS patients are shown. The immunoreactive bands were quantified by densitometric analysis. Results shown below are the mean \pm SE of 8 different experiments. * $p < 0.05$ significantly different from control cells.

control, AD and ALS cells 72 hours after serum deprivation. The activity of the ERK1/2 pathway was assessed by western blotting, using phospho-specific antibodies. **Figure 6** shows the state of activation of the ERK1/2 pathway in control and AD or ALS lymphoblasts. As expected, after 72 hours of serum deprivation, the phosphorylation status of ERK1/2 in AD cells is significantly reduced compared with that of control or ALS lymphoblasts. Under these experimental conditions, ALS cells undergo apoptosis as control cells do (**Figure 3**). Thus, these observations suggest that the sustained, but reduced signaling through the ERK1/2 pathway in AD lymphoblasts protects them from the serum withdrawal-induced cell death.

Discussion

Recent work has highlighted the important role of neuronal vulnerability in the instigation and progression of neurodegenerative diseases including AD and ALS [23]. Moreover, a number of published studies indicated that cell cycle status significantly influence neuron

vulnerability and neurodegenerative pathways [8, 24-26]. The ability to control cell cycle has been considered a critical factor in preventing neurons entering a vulnerable state with high risk for instigation of neurodegenerative mechanisms [27].

Reports from our and other laboratories had presented evidences indicating that, while the predominant clinical expression arises from the SNC, AD and ALS have systemic expression at the cellular and molecular levels [12, 15, 28-31]. Although these alterations appear to have no clinical consequences outside the central nervous system, their parallel expression in peripheral cells and in the brain, provide a plausible pathophysiological model to explain partly the clinical manifestations. Of particular relevance to this work is the fact that dysfunction of cell cycle is a more general phenomenon affecting cells other than neurons in AD patients [10, 11, 13, 15, 22].

In the present study, we addressed the question whether easily peripheral cells from patients affected with ALS show altered cell

survival/death mechanisms comparable to the previously reported for lymphoblastoid cells lines from AD patients [13-16, 32]. We found that AD cells distinctively proliferate at higher rates and showed a decreased vulnerability to serum deprivation-induced cell death than EBV-immortalized lymphocytes from age-matched control individuals. In addition, we demonstrated that the cellular response to serum addition or deprivation was not affected by the viral transformation [15, 16], indicating that lymphoblastoid cell lines are a useful tool to study the involvement of cell cycle-related events in the neurodegenerative diseases.

Despite the fact that recent literature has shown data regarding systemic manifestation in ALS [30, 33], we did not observed changes in the proliferative capacity of lymphoblasts from ALS patients compared with that of cells from healthy individuals. In contrast, lymphoblasts from AD patients show an enhanced proliferative activity after serum stimulation, in agreement with previous reports from this laboratory [13, 15, 22]. It was reported that overactivation of PI3K/Akt signaling pathway in AD cells, was likely responsible for the enhanced proliferative activity by down-regulating cellular levels of the CDKis, p21 and p27 [15]. In contrast, no significant change in Akt activity was observed in ALS lymphoblasts. Accordingly, p21 and p27 levels were found to decrease only in cells from AD patients. This finding is not in agreement with earlier reports showing deregulation of CDKis associated with neurodegeneration in ALS [4, 34, 35]. A possible explanation for this divergence may be the use of peripheral cells versus motoneurons. At present, we cannot ascertain whether the lack of changes in cell cycle regulators in peripheral cells from ALS patients reflects the absence of cell cycle related events associated with neurodegeneration in ALS, or, on the contrary, cell cycle disturbances thought to occur in motoneurons [3], do not have systemic manifestations. In this regard, it is worth to mention a recent report showing no evidence for oxidative stress in fibroblast from ALS patients [36], despite the fact of impaired stress response in affected motoneurons [37].

Other distinct feature of AD cells is to be less vulnerable than control lymphoblasts to cell death induced by serum deprivation [16, 32]. A sustained, but lower, activation of ERK1/2 in AD cells, as compared with the control group

seems to protect AD lymphoblasts from death. We report here that lymphoblasts from ALS patients behave as control cells in response to serum withdrawal by showing similar phosphorylation of ERK1/2 and equal susceptibility to the induced cell death.

Collectively, our results show no major alterations in the proliferative capacity or vulnerability to serum deprivation-induced cell death in ALS lymphoblasts compared with cells from control individuals. These observations suggest that these cells do not represent a useful model to study cell cycle-related events associated with motoneurons degeneration.

On the other hand, our findings that cell cycle progression, cell survival and their molecular regulators are distinctly altered in lymphoblasts from AD patients add further support in favor of considering AD as a systemic disease, underlying as possible etiopathogenic mechanism altered responsiveness to cell activation agents. Considering that changes in the abundance of CDK inhibitors had also been detected in AD brain [38], and that perturbation in the activity of PI3K/Akt and ERK1/2 signaling pathways had been detected in AD brains [39-41], our results highlight the usefulness of peripheral cells from AD patients as potential surrogate for diagnosis and therapeutic monitoring of AD.

The cell cycle disturbances and alteration of the apoptotic response found in AD lymphoblasts did not correlate with progression of the disease. They seem to be early manifestations of the disease. This observation is in consonance with recent evidence in AD patients and in animal models [42, 43] indicating that cell cycle dysfunction is an early event in AD pathogenesis. Cell cycle proteins have been found in brains of individuals with mild cognitive impairment (MCI) [42], and cell cycle disturbances have also been reported in lymphocytes from MCI patients [11]. These observations suggest that cell cycle-induced death is a central mechanistic feature of AD, and therefore alterations in cell cycle/apoptosis regulatory proteins may serve as markers of AD disease.

Acknowledgements

This work has been supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation

(SAF2007-62405) and Fundación Rodríguez Pascual. NE holds a fellowship of the JAE predoctoral program of the CSIC.

Please address all correspondences to Dr. Ángeles Martín-Requero, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain. Tel: 34-91-837-3112; Fax: 34-91-536-0432; Email: amrequero@cib.csic.es

References

- [1] Nagy Z, Esiri MM and Smith AD. The cell division cycle and the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 1998;87:731-739.
- [2] Arendt T. Synaptic plasticity and cell cycle activation in neurons are alternative effector pathways: the 'Dr. Jekyll and Mr. Hyde concept' of Alzheimer's disease or the yin and yang of neuroplasticity. *Prog Neurobiol* 2003;71:83-248.
- [3] Cleveland DW and Rothstein JD. From charcot to lou gehrig: deciphering selective motor neuron death in als. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:806-819.
- [4] Nguyen MD, Boudreau M, Kriz J, Couillard-Despres S, Kaplan DR and Julien J-P. Cell cycle regulators in the neuronal death pathway of amyotrophic lateral sclerosis caused by mutant superoxide dismutase 1. *J Neurosci* 2003;23:2131-2140.
- [5] Ross ME. Cell division and the nervous system: regulating the cycle from neural differentiation to death. *Trends Neurosci* 1996;19:62-68.
- [6] Heintz N. Cell death and the cell cycle: a relationship between transformation and neurodegeneration? *Trends Biochem Sci* 1993;18:157-159.
- [7] Copani A, Copani A, Angela Sortino M, Nicoletti F, Bruno V, Nicoletti F, Ubertia D and Memo M. Activation of cell-cycle-associated proteins in neuronal death: a mandatory or dispensable path? *Trends Neurosci* 2001;24:25-31.
- [8] Herrup K, Neve R, Ackerman SL and Copani A. Divide and die: cell cycle events as triggers of nerve cell death. *J Neurosci* 2004;24:9232-9239.
- [9] Zhu X, Raina AK, Perry G and Smith MA. Alzheimer's disease: the two-hit hypothesis. *Lancet Neurol* 2004;3:219-226.
- [10] Tatebayashi Y, Takeda M, Kashiwagi Y, Okochi M, Kurumadani T, Sekiyama A, Kanayama G, Hariguchi S and Nishimura T. Cell-cycle-dependent abnormal calcium response in fibroblasts from patients with familial Alzheimer's disease. *Dementia* 1995;6:9-16.
- [11] Nagy Z, Combrinck M, Budge M and McShane R. Cell cycle kinesis in lymphocytes in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2002;317:81-84.
- [12] Urcelay E, Ibarreta D, Parrilla R, Ayuso MS and Martín-Requero A. Enhanced proliferation of lymphoblasts from patients with Alzheimer dementia associated with calmodulin-dependent activation of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Neurobiol Dis* 2001;8:289-298.
- [13] de las Cuevas N, Urcelay E, Hermida OG, Saiz-Diaz RA, Bermejo F, Ayuso MS and Martín-Requero A. Ca²⁺/calmodulin-dependent modulation of cell cycle elements pRb and p27kip1 involved in the enhanced proliferation of lymphoblasts from patients with Alzheimer dementia. *Neurobiol Dis* 2003;13:254-263.
- [14] Curti D, Malaspina A, Facchetti G, Camana C, Mazzini L, Tosca P, Zerbi F and Ceroni M. Amyotrophic lateral sclerosis: oxidative energy metabolism and calcium homeostasis in peripheral blood lymphocytes. *Neurology* 1996;47:1060-1064.
- [15] Muñoz U, Bartolome F, Bermejo F and Martín-Requero A. Enhanced proteasome-dependent degradation of the CDK inhibitor p27kip1 in immortalized lymphocytes from Alzheimer's dementia patients. *Neurobiol Aging* 2008;29:1474-1484.
- [16] Bartolome F, de Las Cuevas N, Muñoz U, Bermejo F and Martín-Requero A. Impaired apoptosis in lymphoblasts from Alzheimer's disease patients: cross-talk of Ca²⁺/calmodulin and ERK1/2 signaling pathways. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:1437-1448.
- [17] Sala SG, Muñoz U, Bartolome F, Bermejo F and Martín-Requero A. HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin inhibits cell cycle progression at the G1/S checkpoint in immortalized lymphocytes from Alzheimer's disease patients independently of cholesterol-lowering effects. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;324:352-359.
- [18] McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D and Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 1984;34:939-944.
- [19] Brooks BR, Miller RG, Swash M and Munsat TL. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2000;1:293-299.
- [20] Ibarreta D, Urcelay E, Parrilla R and Ayuso MS. Distinct pH homeostatic features in lymphoblasts from Alzheimer's disease patients. *Ann Neurol* 1998;44:216-222.
- [21] Koistinen P. Human peripheral blood and bone marrow cell separation using density gradient centrifugation on Lymphoprep and Percoll in haematological diseases. *Scand J Clin Lab Invest* 1987;47:709-714.
- [22] Muñoz U, de las Cuevas N, Bartolome F, Hermida OG, Bermejo F and Martín-Requero A. The cyclopentenone 15-deoxy-[Delta]12,14-prostaglandin J2 inhibits G1/S transition and

- retinoblastoma protein phosphorylation in immortalized lymphocytes from Alzheimer's disease patients. *Exp Neurol* 2005;195:508-517.
- [23] Wishart TM, Parson SH and Gillingwater TH. Synaptic vulnerability in neurodegenerative disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006;65:733-739.
- [24] Vincent I, Rosado M and Davies P. Mitotic mechanisms in Alzheimer's disease? *J Cell Biol* 1996;132:413-425.
- [25] Ranganathan S and Bowser R. Alterations in G(1) to S phase cell-cycle regulators during amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol* 2003;162:823-835.
- [26] Herrup K and Yang Y. Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology? *Nat Rev Neurosci* 2007;8:368-378.
- [27] Klein JA and Ackerman SL. Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *J Clin Invest* 2003;111:785-793.
- [28] Huang HM, Martins R, Gandy S, Etcheberrigaray R, Ito E, Alkon DL, Blass J and Gibson G. Use of cultured fibroblasts in elucidating the pathophysiology and diagnosis of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1994;747:225-244.
- [29] Mecocci P, Polidori MC, Ingegneri T, Cherubini A, Chionne F, Cecchetti R and Senin U. Oxidative damage to DNA in lymphocytes from AD patients. *Neurology* 1998;51:1014-1017.
- [30] Cova E, Cereda C, Galli A, Curti D, Finotti C, Di Poto C, Corato M, Mazzini G and Ceroni M. Modified expression of Bcl-2 and SOD1 proteins in lymphocytes from sporadic ALS patients. *Neurosci Lett* 2006;399:186-190.
- [31] Buttarelli FR, Circella A, Pellicano C and Pontieri FE. Dopamine transporter immunoreactivity in peripheral blood mononuclear cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurol* 2006;13:416-418.
- [32] de las Cuevas N, Munoz U, Hermida OG and Martin-Requero A. Altered transcriptional regulators in response to serum in immortalized lymphocytes from Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging* 2005;26:615-624.
- [33] Cereda C, Cova E, Di Poto C, Galli A, Mazzini G, Corato M and Ceroni M. Effect of nitric oxide on lymphocytes from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients: toxic or protective role? *Neurol Sci* 2006;27:312-316.
- [34] Lim AC and Qi RZ. Cyclin-dependent kinases in neural development and degeneration. *J Alzheimers Dis* 2003;5:329-335.
- [35] Appert-Collin A, Hugel B, Levy R, Niederhoffer N, Coupin G, Lombard Y, André P, Poindron P and Gies JP. Cyclin dependent kinase inhibitors prevent apoptosis of postmitotic mouse motoneurons. *Life Sci* 2006;79:484-490.
- [36] Sala G, Trombin F, Mattavelli L, Beretta S, Tremolizzo L, Andreoni S, Calabrese E, Sanvito L and Ferrarese C. Lack of evidence for oxidative stress in sporadic amyotrophic lateral sclerosis fibroblasts. *Neurodegener Dis* 2008 (Epub ahead of print).
- [37] Barber SC, Mead RJ and Shaw PJ. Oxidative stress in ALS: A mechanism of neurodegeneration and a therapeutic target. *Biochim Biophys Acta* 2006;1762:1051-1067.
- [38] Griffin RJ, Moloney A, Kelliher M, Johnston JA, Ravid R, Dockery P, O'Connor R and O'Neill C. Activation of Akt/PKB, increased phosphorylation of Akt substrates and loss and altered distribution of Akt and PTEN are features of Alzheimer's disease pathology. *J Neurochem* 2005;93:105-117.
- [39] Rickle A, Bogdanovic N, Volkman I, Winblad B, Ravid R and Cowburn RF. Akt activity in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Neuroreport* 2004;15:955-959.
- [40] Derkinderen P, Enslin H and Girault JA. The ERK/MAP-kinases cascade in the nervous system. *Neuroreport* 1999;10:R24-34.
- [41] Zhu X, Lee HG, Raina AK, Perry G and Smith MA. The role of mitogen-activated protein kinase pathways in Alzheimer's disease. *Neurosignals* 2002;11:270-281.
- [42] Yang Y, Mufson EJ and Herrup K. Neuronal cell death is preceded by cell cycle events at all stages of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2003;23:2557-2563.
- [43] Yang Y and Herrup K. Cell division in the CNS: Protective response or lethal event in post-mitotic neurons? *Biochim Biophys Acta* 2007;1772:457-466.