



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Regulación de la Apolipoproteína E sobre la vía PI3K/AKT en un contexto excitotóxico: efecto sobre el metabolismo y la autofagia neuronal

Diego Armando Ordóñez Pasaje

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Bogotá, Colombia
2014

Regulación de la Apolipoproteína E sobre la vía PI3K/AKT en un contexto excitotóxico: efecto sobre el metabolismo y la autofagia neuronal

Diego Armando Ordóñez Pasaje

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Neurociencias

Director:

Gonzalo Humberto Arboleda Bustos MD, MSc, PhD

Grupos de Investigación:

Muerte celular y

Neurociencias

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Bogotá, Colombia

2014

Dedicatoria

A mis padres

Que esta obra sea un gesterio de amor hacia ustedes.

Agradecimientos

- Al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, COLCIENCIAS.
- Al Departamento de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.
- A la facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.
- Al Dr. Gonzalo Arboleda Bustos por su colaboración en el desarrollo y dirección de mi trabajo de grado.
- Al estudiante de Doctorado Adrián Sandoval por sus enseñanzas técnicas de cultivo celular y diversas metodologías de biología molecular.
- A Luisa Barbosa por su colaboración en los ensayos de autofagia neuronal
- A mis compañeros de los grupos de Neurociencias y Muerte Celular por sus aportes a mi desarrollo como investigador
- Agradecimientos infinitos a mis padres Fanny Pasaje y Armando Ordóñez por apoyarme en este proceso.
- A Francy Bayona por brindarme su valiosa amistad y regalarme una hermosa historia de amor que mitigó circunstancias de estrés vividas en el desarrollo de la maestría

Resumen

La apolipoproteína E4 (ApoE4) es el principal riesgo genético para la enfermedad de Alzheimer (EA). Elevados niveles de glutamato han sido reportados en la EA, pero es aún desconocido el papel de las isoformas de ApoE en la muerte celular excitotóxica y las vías de señalización involucradas. Nosotros estudiamos el efecto de las isoformas de ApoE junto con el tratamiento de glutamato, el rol de las vías PTEN-Akt y la autofagia neuronal, empleando las células SHSY5Y. El metabolismo mitocondrial fue analizado con el ensayo de MTT, y la muerte celular con la liberación de LDH. La expresión de proteínas fue determinada mediante Western Blot. La autofagia fue analizada usando microscopia de fluorescencia para LC3. La ubicación de ApoE recombinante fue identificada usando microscopia confocal. Solamente ApoE4 incrementa significativamente la actividad de MTT, sin inducir un incremento en la liberación de LDH. El tratamiento con glutamato generó un incremento en la liberación de LDH asociado con una fosforilación marcada de PTEN (Ser380), una disminución de la fosforilación de Akt (Ser473). Las diferentes isoformas de ApoE protegen contra la toxicidad del glutamato, pero las isoformas ApoE3 y ApoE4 lo hacen de manera asociada con un incremento en el número de autofagosomas a diferencia de ApoE2. Las isoformas de ApoE están localizadas entre las redes mitocondriales. Estos resultados sugieren que ApoE4 incrementa el metabolismo celular, induciendo un estrés metabólico. Las isoformas ApoE3 y ApoE4 reducen la muerte celular inducida por glutamato en asociación de un incremento de la autofagia y de manera independiente de la activación de Akt; mientras que la protección de ApoE2 es independiente de estos cambios.

Palabras claves: Apolipoproteína E; glutamato; Akt; PTEN; metabolismo; autofagia

Abstract

The Apolipoprotein E4 (ApoE4) is the major genetic risk factor for Alzheimer's disease (AD). High glutamate levels have been reported in AD, but still unknown is the role of the ApoE isoforms in the excitotoxic cell death and the involved signalling pathways. We studied the effect of ApoE isoforms on glutamate treatment and the role of the PTEN-Akt pathways and neuronal autophagy, employing SHSY5Y cells. Mitochondrial metabolism

was analysed by MTT assay, and cell death by LDH release. Protein expression was determined by Western Blot. Autophagy was analysed using LC3 stain. Localization of recombinant ApoE was identified using confocal microscopy. Only ApoE4 increases significantly MTT activity, without inducing an increase in the release of LDH. Glutamate treatment induced an increase in the release of LDH associated with higher phosphorylation of PTEN (Ser380), a decrease of Akt phosphorylation (Ser473). The different isoforms of ApoE protect against glutamate toxicity, but ApoE3 and ApoE4 isoforms do so associated with an increase in the number of autophagosomes, in contrast to ApoE2. ApoE isoforms are localized between mitochondrial networks. These results suggest that ApoE4 increases cellular metabolism, inducing metabolic stress. ApoE3 and ApoE4 isoforms reduce cell death induced by glutamate in a form dependent on autophagy induction and independent of Akt activation; while the protection mediated by ApoE2 is independent of these changes.

Key words: Apolipoprotein E; glutamate; Akt; PTEN; metabolism; autophagy

Contenido

Resumen	VI
Lista de figuras	X
Lista de tablas	XI
Lista de abreviaturas	XII
Introducción	1
1. Marco conceptual	2
1.1 Apolipoproteína E	2
1.2 Receptores ApoE	3
1.2.1 Dominios extracelulares	3
1.2.2 Dominio intracelular	4
1.3 Señalización celular de ApoE	4
1.4 Apolipoproteína E y metabolismo mitocondrial	5
1.5 Vía PI3K/AKT	5
1.6 Proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs)	7
1.6.1 Señalización de Erk	8
1.7 Glutamato	8
1.7.1 Mecanismos de excitotoxicidad	9
1.7.1.1 Disfunción mitocondrial	10
1.7.1.2 Activación de la oxido nítrico sintasa	10
1.7.1.3 Activación de calpainas	11
1.8 Autofagia	11
1.8.1 Maquinaria de la macroautofagia	13
1.8.2 Regulación de la autofagia por especies reactivas de oxígeno	15
2. Objetivos	17
2.1 Objetivo general	17
2.2 Objetivos específicos	17

3. Materiales y métodos	18
4. Resultados	21
4.1 ApoE4 aumenta el metabolismo mitocondrial y el glutamato induce muerte neuronal	21
4.2 Isoformas de ApoE disminuyen la muerte neuronal mediada por glutamato	22
4.3 Las isoformas de ApoE regulan diferencialmente la vía de señalización PI3K/Akt	23
4.4 Neroprotección conferida por ApoE contra glutamato depende de la activación de la autofagia	24
4.5 Las isoformas de ApoE ingresan a la línea celular SHSY5Y	25
5. Discusión	28
6. Perspectivas	32
ANEXOS	34
ANEXO 1 Cultivo de Células SHSY5Y	34
ANEXO 2 Viabilidad Celular	38
ANEXO 3 Western Blot	41
ANEXO 4 Inmunofluorescencia	47
ANEXO 5 Tratamiento de cubre objetos	51
ANEXO 6 Conteo de vesículas autofágicas	52
Bibliografía	53

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. ApoE4 aumenta el metabolismo mitocondrial y el glutamato induce muerte neuronal	20
Figura 2. Isoformas de ApoE disminuyen la muerte neuronal mediada por glutamato	21
Figura 3. Las isoformas de ApoE regulan diferencialmente la vía de señalización PI3K/Akt	23
Figura 4. Neuroprotección conferida por ApoE contra glutamato depende de la activación de la autofagia	24
Figura 5. Las isoformas de ApoE ingresan a la línea celular SHSY5Y	25
Figura 6. Hipótesis sugerida del efecto de las isoformas de ApoE y glutamato en las neuronas SHSY5Y	30

Lista de tablas

Tabla No 1. Volumen requerido para el cultivo celular	Pág. 34
---	--------------------------

Lista de abreviaturas

°C:	Grados centígrados
AIF	Factor inductor de apoptosis
Akt/PKB	Proteína Cinasa B
Akt-p	Proteína Cinasa B fosforilada
Akt-T	Proteína Cinasa B total
AMBRA1	Regulador 1 de Beclin1
AMPK	Proteína Cinasa activada por AMP
ApoE	Apolipoproteína E
Apoer2	Receptor 2 de la apolipoproteína E
ATG	Proteínas relacionadas a la autofagia
ATP	Tri-fosfato de adenosina
BCA	Acido bicinconínico
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
CREB	Proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP
Dab-1	<i>Disable Homolog 1</i>
DFCP1	Proteína 1 que contiene doble domino FYVE
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FC	Factores de crecimiento

FIP200	Proteína de 200 kilo Dalton que interacciona con la familia cinasa FAK
Glut1	Transportador de glucosa 1
GSK3β	Cinasa glucógeno sintasa 3 β
H₂O	Agua
ddH₂O	Agua destilada y desionizada
H₂O₂	Peróxido de hidrogeno
IKKβ	Inhibidor del factor nuclear kappa
JNK	Cinasa del dominio terminal NH ₂ de c-Jun
L	Litro
LDH	Lactato deshidrogenasa
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LDLR	Receptor de lipoproteínas de baja densidad
LRP1	Proteína relacionada al receptor de lipoproteínas de baja densidad
LRP5	Proteína relacionada al receptor de lipoproteínas de baja densidad 5
LRP6	Proteína relacionada al receptor de lipoproteínas de baja densidad 6
LRP11	Proteína relacionada al receptor de lipoproteínas de Baja Densidad 11
LRP1B	Proteína relacionada al receptor de lipoproteínas de Baja Densidad 1B
MAPKs	Cinasas activadas por mitógenos
LAMP-2A	Proteína de membrana 2A asociada al lisosoma
LRP4	Proteína relacionada al receptor de lipoproteínas de baja densidad 4
mg	Miligramo
ml	Mililitro
mM	Milimolar

mTOR	Cinasa serina-treonina blanco de rapamicina
mTORC1	Complejo 1 de la proteína cinasa serina-treonina blanco de rapamicina
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 bromuro difeniltetrazolio
NGF	Factor de crecimiento del nervio
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMDAR	Receptor de NMDA
NO	Oxido nítrico
nNOS	Oxido nítrico sintasa neuronal
NPxY	Asparagina-Prolil-X-Tirosina
PBS	Tampón fosfato salino
PI	Fosfoinositol
PI3K	Fosfatidil Inositol 3 Cinasa
PLD	Poli-D-Lisina
PSD-95	Proteína de la densidad postsináptica 95
PTB	Dominio de unión a fosfotirosina
PTEN	Fostatasa y homóloga de tensina
PTPm	Poros de transición de permeabilidad mitocondrial
rhoGEF	Factor intercambiador de guaninas de la familia Rho
SFB	Suero fetal bovino
SNAP-29	Proteína 29 asociada al sinaptosoma
TBS	Tampón Tris salino
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
TOM20	Translocasa de la membrana externa mitocondrial de 20 kilo Dalton
TSC1/TSC2	Complejo proteico de esclerosis tuberosa
μg	Microgramo

ULK1	Cinasa 1 similar a unc-51
VAMP7	Proteína 7 de membrana asociada a vesícula
VDAC	Canal aniónico dependiente de voltaje
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
VLDLR	Receptor de Lipoproteínas de muy baja densidad
WB	Western Blot
WIPI-1 y 2	Proteína de interacción con fosfolípidos con dominio WD40
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial

Introducción

La incidencia y prevalencia de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson han aumentado en los últimos años (1), evento asociado al incremento de la población de adultos mayores. Esta serie de cambios demográficos predice que a corto plazo estas entidades patológicas serán un problema de salud pública y los gastos en tratamiento y rehabilitación serán importantes para el sistema de salud. El tratamiento de estas enfermedades en la actualidad es sintomático, pues se desconoce con claridad los procesos patológicos que conducen a la neurodegeneración. En los últimos años se han realizado muchos esfuerzos para determinar los factores tanto genéticos como ambientales que pueden llevar al desarrollo de las enfermedades en mención.

Es bien conocido que la presencia del alelo E4 del gen para la apolipoproteína E (ApoE) genera un riesgo muy elevado de padecer enfermedad de Alzheimer (EA) (2). Igualmente, condiciones excitotóxicas como isquemia y trauma cerebral, en las cuales hay una liberación aguda y sostenida de glutamato, se han asociado claramente con esta enfermedad (3-5). Cómo converge la señalización neuronal de ApoE4 y glutamato en la muerte neuronal, es un campo de investigación poco conocido en las neurociencias. Igualmente, no es claro cómo ApoE4 y glutamato modulan la vía PI3K/Akt, principal vía de señalización neuronal, que controla la supervivencia y el metabolismo celular. Investigar los mecanismos moleculares implicados en la historia natural de la neurodegeneración regulada por ApoE4 y glutamato, daría luces de posibles blancos moleculares a impactar farmacológicamente, ya sea en fases tempranas o tardías de estas enfermedades como Alzheimer.

El objetivo de este proyecto es esclarecer el papel de las isoformas ApoE y glutamato en la muerte y supervivencia celular, así como el rol en el metabolismo mitocondrial y en la autofagia neuronal. Para desarrollar este objetivo se utilizarán las diferentes variantes de la proteína ApoE en cultivo celular, realizando los ensayos en la línea celular neuronal SHSY5Y y se analizarán las consecuencias en condiciones estándar y en un contexto excitotóxico inducido por glutamato. También se determinará el efecto de estas proteínas en la vía de supervivencia celular PI3K/Akt, y la formación de vesículas autofágicas.

1. Marco conceptual

1.1 Apolipoproteína E

ApoE es una apolipoproteína que transporta colesterol en el cerebro y sus isoformas actúan diferencialmente en la señalización neuronal mediante los receptores de ApoE (6). En humanos existen tres alelos polimórficos para el gen ApoE: ApoE2, ApoE3 y ApoE4. La presencia del alelo ApoE4 es un factor de riesgo para enfermedades neurodegenerativas, principalmente para la EA de presentación esporádica. Por el contrario, el alelo ApoE2 es un factor protector contra esta enfermedad (6). Estas diferencias drásticas entre alelos se han relacionado con las propiedades estructurales de las correspondientes proteínas. Las 3 isoformas difieren en los aminoácidos de las posiciones 112 y 158. ApoE2 presenta cisteína en ambas posiciones, ApoE4 arginina, mientras que ApoE3 tiene cisteína y arginina respectivamente (7). Dicha configuración de las ApoE afecta su asociación a lípidos y la unión a receptores. Así mismo, estas características sustentan el efecto diferencial de las isoformas de ApoE en la vía de supervivencia y proliferación celular PI3K/Akt observado en la línea celular Neuro 2a, obtenida de un neuroblastoma de ratón (8).

En el cerebro, ApoE es sintetizada principalmente por astrocitos, y en menor medida por la microglia (9). En contextos neurotóxicos esta apolipoproteína también es sintetizada por oligodendrocitos y neuronas (10, 11). Posterior a su síntesis y liberación al medio extracelular, ApoE puede cumplir varias funciones: la principal es el transporte de esfingolípidos y colesterol, del astrocito como principal fuente de lípidos, a la neurona, para el crecimiento dendrítico; otra función menos frecuente pero de gran importancia para el número de espinas dendríticas, es el traslado de sulfatide sintetizado en el oligodendrocito a estas prolongaciones citoplasmáticas (6, 9). ApoE también es la encargada del aclaramiento de péptidos β amiloide para que sean degradados por la microglia. Se ha determinado que esta función es más eficiente con ApoE2 en comparación

con ApoE3 y ApoE4 (12), dando una posible explicación al riesgo para la EA. Cuando ApoE transporta los lípidos a la membrana de las neuronas también tiene un efecto en la señalización celular acoplándose a los receptores de la familia de lipoproteínas de baja densidad (13).

1.2 Receptores ApoE

ApoE interactúa con varios receptores de la familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad. Han sido reportados doce receptores, de los cuales siete pertenecen a mamíferos (LDLR, VLDLR, Apoer2, LRP4, LRP1, LRP1B, Megalina) y 5 a otras especies (Vitelogenina en pollo y en *Drosophila melanogaster*, LRP5, LRP6, LRP11) (9).

Esta familia de receptores tiene varios dominios intra y extracelulares conservados, que están unidos por un único dominio transmembranal y su estructura ha sido estudiada en el LDLR por resonancia nuclear magnética (14). Dentro de este grupo de dominios se encuentran:

1.2.1 Dominios extracelulares

- **Dominio de unión al ligando:** representa el 40 por ciento de la porción extracelular y se caracteriza por tener siete módulos de repeticiones ricas en cisteína (entre 40 y 45), unidos por enlaces disulfuro. Cada módulo es estabilizado por iones calcio (14, 15). Defectos en el acople a este ión son la principal causa de la hipercolesterolemia familiar (16).
- **Dominio homólogo al factor de crecimiento epidérmico (EGF) y dominio YWTD:** consiste en dos repeticiones EGF ricas en cisteína, seguido por un dominio YWTD y una tercera repetición EGF. Se ha sugerido que la función de estos dominios está relacionada con la internalización de vesículas LDL dependientes de pH (14).
- **Dominio glicosilado:** se cree que funciona como un tampón hidrofílico que mantiene unidas las partículas de lipoproteínas lejos de la bicapa lipídica de la membrana plasmática (14).

1.2.2 Dominio intracelular

Dominio intracelular: Representado por una cola citoplasmática, que contiene al menos un motivo NPxY. Este motivo es el responsable del inicio de la señalización intracelular y la endocitosis de vesículas de lipoproteínas (14).

1.3 Señalización celular de ApoE

Muchos estudios se han centrado en la señalización de relina como ligando para algunos de los receptores de la familia LDL, puntualmente para VLDLR y Apoer2, y se ha determinado que relina es vital para el neurodesarrollo y la plasticidad sináptica (13). El motivo NPxY, que inicia la señalización, previo a la unión de relina al receptor, también está presente en otros receptores, como el receptor del EGF y el receptor de insulina(13). Es así que inicialmente residuos de tirosina en el motivo NPxY son autofosforilados. Esta fosforilación permite el acople de proteínas adaptadoras con dominios de unión a fosfotirosina (PTB) y de andamiaje (13). Para estas últimas no es requisito la fosforilación para su unión al receptor. Dab-1, una proteína adaptadora con dominio PTB, interactúa con el motivo NPxY de los receptores de la familia LDL (13). Este evento molecular conduce al reclutamiento y fosforilación de cinasas de la familia Scr. Esta cascada de activación de cinasas inicia con la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) y la subsecuente activación de la proteína cinasa B (Akt), que resulta en la inhibición de la cinasa glucógeno sintasa β (GSK3 β) (17), una de las principales cinasas que fosforila Tau, proteína que estabiliza los microtúbulos y que se encuentra hiperfosforilada en la EA. Como se mencionó, una vía alterna es la interacción del receptor con proteínas adaptadoras de la familia JIP, las cuales reclutan proteínas activas por el estrés como JNK, proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y proteínas que intervienen en la reorganización del citoesqueleto, por ejemplo rhoGEF (18). Otra alternativa de señalización de estos receptores, es su función como correceptores, regulando positivamente la actividad del receptor NMDA, mediado por relina, mientras que ApoE3 y ApoE4, regulan diferencialmente su actividad. ApoE3 y ApoE4 se unen a Apoer2 y lo internalizan junto al receptor NMDA, pero el regreso de este receptor a la membrana plasmática es más lento cuando ApoE4 interviene en su internalización (19). Este fenómeno sugirió una reducción en el influjo de calcio a partir del receptor NMDA y por consiguiente una regulación negativa de la proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP (CREB) (19), un factor de transcripción que promueve la supervivencia neuronal. Esta serie de modelos planteados por el grupo del Doctor Herz, se ha enfocado en la señalización que ejerce relina en la plasticidad sináptica y en el desarrollo del sistema nervioso central, sin embargo, no es claro cómo las isoformas de la apolipoproteína E podrían modificar diferencialmente

estas cascadas de supervivencia neuronal en contextos neurotóxicos que simulen procesos moleculares de neurodegeneración, como la exposición a ceramida, glutamato o β amiloide a líneas celulares neuronales

1.4 Apolipoproteína E y metabolismo mitocondrial

La mitocondria es un organelo esencial para la supervivencia neuronal, puesto que es la encargada de sintetizar el mayor porcentaje de energía, representada en moléculas de ATP. Igualmente es la responsable de la mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), por acción los complejos de la cadena transportadora de electrones (20). Un desequilibrio metabólico mitocondrial, mantendría a la neurona en un riesgo inminente de muerte celular, ya sea por un aumento en el metabolismo, representado en una mayor producción de ERO o con una caída drástica de la síntesis de ATP. Cómo las isoformas de ApoE podrían aportar a la disminución o aumento de este riesgo, es un proceso que se encuentra en investigación. Estudios en cultivos neuronales de ratones transgénicos para ApoE4 y ApoE3, han demostrado que solo en ApoE4 hay una reducción en los niveles proteicos de todos los complejos de la cadena respiratoria y una disminución en la actividad enzimática del complejo IV (21). Algunos investigadores han planteado que el clivaje de ApoE4 encontrado en cerebros de pacientes con EA y en ratones transgénicos para ApoE4, podría generar fragmentos que promuevan la disfunción de la mitocondria (22, 23). Como sustento de esta hipótesis, un estudio demostró que la sobreexpresión del fragmento C-terminal truncado de ApoE4 (1-272), en cultivos neuronales, es responsable de la disminución de la actividad enzimática de los complejos III y IV de la cadena respiratoria mitocondrial (24). Adicionalmente se ha encontrado que en ratones transgénicos para ApoE4, después de un evento isquémico, fragmentos largos de esta isoforma se encuentran incrementados en la fracción mitocondrial (25). Si bien estos hallazgos han intentado explicar los efectos mitocondriales de las isoformas de ApoE a partir de la síntesis neuronal de estas proteínas, en condiciones basales y neurotóxicas, poco se ha estudiado sobre los efectos de estas apolipoproteínas en la mitocondria, cuando provienen del medio extracelular.

1.5 Vía PI3K/AKT

La vía PI3K/Akt puede participar en la supervivencia celular y neuroprotección mediante el bloqueo de la apoptosis, al promover la proliferación celular, y regulando vías adicionales de señalización celular (26). En neuronas la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) y su mediador corriente abajo (Akt) median señales de supervivencia, diferenciación y proliferación neuronal (27, 28).

Estas vías activadas por diversos factores de crecimiento (FC), son un punto crucial en el cuál convergen diversas señales de supervivencia celular (29, 30). La unión de FC a los receptores tirosina cinasa causa autofosforilación de sus residuos tirosina, recluta proteínas adaptadoras como Shc, acoplándose corriente abajo y activando las vías PI3K/Akt y Raf/MEK/ERK (31-34).

PI3K consiste en una subunidad reguladora (85kDa) y una catalítica (100kDa) encargada de la fosforilación de lípidos de inositol para generar 3-fosfoinositoles (PI: PI(3)P, PI(3,4)P2 y PI(3,4,5)P3). Estos se unen a un dominio homólogo a plekstrina presente en una variedad de moléculas de señalización, alterando su actividad y localización subcelular (35). La función de supervivencia de PI3K en particular esta mediada por la activación de Akt (36-38). Se ha demostrado que la activación de Akt requiere su translocación a la membrana plasmática y la fosforilación en treonina 308 (Thr308) y serina 473 (Ser473) (39).

Los blancos corriente abajo de Akt son diversos, se asocian a respuestas metabólicas y de supervivencia celular (40, 41). En neuronas, Akt se ha demostrado que regula la supervivencia pero no el crecimiento y la diferenciación (30).

Los sustratos de Akt incluyen la inactivación por fosforilación de mediadores pro-apoptóticos (Bad, Bax, caspasa-9, factor de transcripción Forkhead, GSK-3, p53), y activación de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, IAP y mTOR) (36, 42-46).

Probablemente Akt media la supervivencia neuronal a diferentes niveles dependiendo del tipo celular, de la disponibilidad de blancos y del requerimiento de eventos transcripcionales o post-transcripcionales (47).

Adicional a su función en supresión de la muerte celular, los FC vía PI3K/Akt también regulan el metabolismo celular modulando la captación de glucosa (48-52). Poco se conoce acerca de la función de la vía PI3K/Akt en la regulación del metabolismo de la glucosa (glucólisis) y cómo esta contribuye a las decisiones de supervivencia/muerte celular (48, 53, 54).

A diferencia de las proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2, que mantienen la homeostasis mitocondrial en respuesta a remoción de FC al promover el

transporte continuo de metabolitos a través de la membrana mitocondrial externa aún en presencia de metabolismo celular disminuido (54-56), la supervivencia mediada por PI3K/Akt requiere de un suplemento continuo de sustratos metabólicos y por ende depende del metabolismo celular (50, 51).

En modelos de ausencia de FC y de glucosa, la disminución en la glucólisis se ha asociado de forma consistente con estadios iniciales de apoptosis (depleción de ATP, translocación mitocondrial de Bax, activación de JNK, disminución $\Delta\Psi_m$, y liberación de citocromo C al citoplasma). Estos cambios se generan debido a la ausencia de sustratos metabólicos derivados de la glucosa, ya que la sobreexpresión de Glut1 (transportador de glucosa) previene tales alteraciones (51, 57, 58). La sobreexpresión de Akt previene también las alteraciones asociadas a ausencia de FC y mantiene la supervivencia celular al estabilizar la bioenergética celular por medio del incremento en el transporte y metabolismo de glucosa (50). Se ha demostrado que Akt aumenta la actividad hexocinasa, de tal forma que la hexocinasa permanece asociada a la mitocondria y disminuye la muerte celular (59). Estos estudios sugieren que el acoplamiento entre la glucólisis y la función mitocondrial es un pre-requisito para que los FC y en particular Akt medien sus efectos en supervivencia. Además, la actividad hexocinasa es suficiente para que Akt inhiba la apoptosis (59). La forma como la vía PI3K/Akt regula la función hexocinasa, su asociación/desplazamiento de VDAC y la función mitocondrial, y cómo la actividad hexocinasa contribuye a la supervivencia celular mediada por los FC, requieren mayor análisis.

1.6 Proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs)

Las MAPKs son una familia de cinasas que transducen señales de la membrana celular al núcleo, en respuesta a una amplia variedad de estímulos, que regulan la expresión génica, el metabolismo, la proliferación, la motilidad, la supervivencia y la muerte celular. Estas cinasas se caracterizan por fosforilar sus sustratos en residuos serina y treonina, ya sea para activarlos o inhibirlos (60).

Las MAPKs constituyen tres familias: la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK); la cinasa del dominio terminal NH₂ de c-Jun (JNK); y la MAPK p38. Cada familia de cinasas tiene sus respectivas isoformas. La primera familia ha sido asociada principalmente a supervivencia neuronal, mientras que la segunda y la tercera a procesos de muerte neuronal. Se han clonado otras

familias de cinasas como ERK5, 7 y 8, pero su función y activación no ha sido bien caracterizada (60).

1.6.1 Señalización ERK

Esta familia de MAPKs tiene dos isoformas, Erk1 y Erk2, conocidas también como p44 y p42, por su peso molecular respectivo. En neuronas, estas cinasas son activadas por factores de crecimiento, como el factor de crecimiento del nervio (NGF), y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), los cuales promueven la supervivencia neuronal (61). Erk1/2 también pueden ser activadas en condiciones de estrés neuronal, como en procesos excitotóxicos e hipóxico isquémicos, como un mecanismo de defensa neuronal, pero si la intensidad de la señal es prolongada, Erk puede activar vías de muerte celular (62). Las cascadas de fosforilaciones para activar Erk1/2, que se originan ya sea por factores tróficos o excitotóxicos, convergen en la activación de proteínas cinasas de la familia Raf, que incluyen GTPasas, como Ras o Rap3. Estas GTPasas fosforilan a la cinasa de cinasa MAP1/2 (MKK1/2) y esta a su vez fosforila a Erk1/2 en residuos treonina-tirosina (61).

Erk1/2 tienen múltiples blancos que pueden mediar la supervivencia neuronal. Estos incluyen factores de transcripción que estimulan la producción de mediadores antiapoptóticos o blancos de Erk1/2 que inhiben la activación de proteínas proapoptóticas. Un ejemplo preciso de estas funciones duales pro supervivencia se ha evidenciado en neuronas sometidas a privación de nutrientes, en los cuales Erk1/2 media la activación de la cinasa p90Rsk2 y esta inhibe la proteína proapoptótica Bad, fosforiándola en el residuo serina 112 (63, 64). Esta cinasa también puede activar el factor de transcripción CREB, el cual promueve la síntesis de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (63). Otro rol transcripcional es la regulación negativa de los niveles de mRNA de Bim en neuronas privadas de NGF (65). De manera similar, en modelos de isquemia focal en murinos, se ha reportado aumento en los niveles de la fosforilación de CREB y Bcl-2, junto con la inhibición de proteínas proapoptóticas como Bax, Bad y BNIP3 (66, 67). Otras funciones neuroprotectoras de Erk1/2 son la inhibición de la caspasa 9 y la cinasa GSK3 β (68, 69).

1.7 Glutamato

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso central (70, 71). En contextos fisiológicos juega un rol central en el neurodesarrollo, la transmisión y plasticidad sináptica, igualmente interviene en procesos de memoria y aprendizaje (72-75). Estos procesos son mediados en gran medida por el receptor NMDA, el cual, por acción de influjo de calcio a la neurona, activa la vía de supervivencia celular PI3K/Akt y el factor de transcripción CREB, señales que promueven la integridad neuronal y el aumento de las espinas dendríticas (76-78). Pero en eventos citotóxicos agudos como la hipoxia-isquemia, o en enfermedades neurodegenerativas crónicas como EA y Parkinson, las concentraciones de glutamato se encuentran elevadas en el tejido cerebral, en respuesta a las diferentes noxas, y este fenómeno desencadena muerte neuronal, especialmente por el aumento de las concentraciones intracelulares de calcio (79-81).

1.7.1 Mecanismos de excitotoxicidad

La muerte celular necrótica y apoptótica han sido asociadas a la neurodegeneración por glutamato (82, 83). Esta heterogeneidad se ha explicado por las diferentes concentraciones de glutamato utilizadas en cultivo celular, observando necrosis a mayores concentraciones (84). En cultivos mixtos y en modelos animales de isquemia-hipoxia, con dosis únicas de glutamato también se han evidenciado diferentes tipos de muerte por la morfología celular, sugiriendo que estos procesos están ligados a las características de una neurona, específicamente, al tipo y variedad de receptores de glutamato (85). El principal receptor de glutamato implicado en la citotoxicidad es el receptor de NMDA e independientemente del tipo de muerte, los mecanismos generales están asociados con la disfunción mitocondrial que conducen a una falla energética neuronal, generación de radicales libres y finalmente la muerte celular (78, 86).

Un punto poco abordado en la investigación de los mecanismos de excitotoxicidad es el rol que podrían cumplir las isoformas de la apolipoproteína E. Se conoce que las isoformas de ApoE ejercen un efecto neuroprotector frente a la excitotoxicidad de NMDA, en cultivos neurogliales y ApoE2 tiende a presentar mayor neuroprotección (87-89). Sin embargo, se desconocen las vías de supervivencia neuronal que son reguladas por ApoE en un contexto excitotóxico.

Aunque son muchas las vías de muerte celular asociadas a glutamato y no hay una predominante, el influjo de calcio es un elemento clave y esencial para desencadenar los procesos de muerte celular (90, 91). El incremento intracelular

de calcio puede involucrar daño mitocondrial, activación de la óxido nítrico sintasa y proteasas sensibles a calcio.

1.7.1.1 Disfunción mitocondrial

La entrada de calcio a la mitocondria por el canal uniporte, ubicado en la membrana interna mitocondrial despolariza la membrana mitocondrial y desaparece la diferencia de potencial, necesaria para la producción de ATP (92), el cual es indispensable para mantener la homeostasis energética y la supervivencia neuronal. Esta caída del potencial de membrana mitocondrial conduce a la apertura del poro de permeabilidad mitocondrial con la posterior liberación de citocromo C al citosol, necesario para la conformación del apoptosoma y la subsecuente activación de caspasas, llevando a apoptosis (71). Adicionalmente esta depleción de ATP, amplifica este evento celular, puesto que limita la capacidad de la neurona para regular los niveles de calcio, por las diferentes bombas para este catión, que dependen de ATP (78).

El ingreso de calcio a este organelo también promueve la formación de ERO, que han sido implicadas en la disfunción del complejo I de la cadena transportadora de electrones en mitocondrias aisladas tratadas con calcio y sodio (93).

1.7.1.2 Activación de la óxido nítrico sintasa

Una de las características de la neurodegeneración excitotóxica es la producción de óxido nítrico (NO) y su importancia se destaca por trabajos en los cuales utilizan inhibidores de la óxido nítrico sintasa, previniendo la neurodegeneración mediada por glutamato (94). Adicionalmente, se ha determinado que la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) es la principal isoforma responsable de la excitotoxicidad mediada por NMDA (95). Otros experimentos han definido una asociación entre el receptor de NMDA y nNOS a través de la proteína de la densidad postsináptica de 95 KDa (PSD-95). PSD-95, mediante su dominio PDZ1, se une a la subunidad NR2B de NMDAR y con su dominio PDZ2 se une al dominio N-terminal de nNOS. En este modelo, el influjo de calcio a la neurona activa nNOS vía calmodulina (96). Una vez formado el NO, este interactúa con el radical superóxido para formar peroxinitrito, un potente oxidante, que causa oxidación de proteínas, peroxidación de lípidos y daño directo al ADN, llevando a muerte celular (97-99).

1.7.1.3 Activación de calpainas

Estas proteasas de cisteína sensibles a calcio han sido involucradas en la patogénesis excitotóxica en modelos que utilizan NMDA con inhibidores de calpainas, en los cuales se ha encontrado una modesta neuroprotección en cultivos hipocampales de rata (100), al igual que en la excitotoxicidad mediada por ácido kaínico en ratones transgénicos que sobreexpresan calpastatina humana, un específico inhibidor de calpainas (101). El mecanismo de muerte celular, se ha asociado a un efecto proapoptótico, por el clivaje que ejercen en las proteínas antiapoptóticas Bcl2 y en las proapoptóticas Bax y bid (71). Otro evento adicional, que destaca a las calpainas en la promoción de la apoptosis, es el clivaje y liberación del factor inductor de apoptosis (AIF) de la mitocondria, evidenciado en isquemia neuronal y cardiaca (102, 103), el cual es responsable de la condensación de la cromatina, fragmentación del ADN y muerte celular. Esta función proapoptótica ha sido soportada en estudios de privación de oxígeno y glucosa en cultivos neuronales, que muestran que la inhibición de calpainas previene la translocación de AIF de la mitocondria al citosol y la posterior muerte celular (104). Sin embargo, el rol de las calpainas en la muerte celular no es claro, puesto que a dosis subletales de NMDA intervienen en la reparación axonal (105).

1.8 Autofagia

La autofagia es un mecanismo celular de autodegradación de proteínas, complejos proteicos y organelos, a través de la formación de autofagosomas, en donde los compuestos celulares son degradados por hidrolasas (106).

Tres clases de autofagia han sido descritas, basándose en la interacción de las proteínas a degradar con el lumen del lisosoma (107):

1. Macroautofagia: referida en la literatura como autofagia, es un proceso que involucra la formación de vesículas de doble membrana, conocidas como autofagosomas. Los autofagosomas maduran y se fusionan con lisosomas para degradar su contenido mediante hidrolasas ácidas. Alrededor de 30 proteínas relacionadas a la autofagia (ATG), conservadas en levaduras y mamíferos participan en este proceso. Algunos genes de estas proteínas no son ortólogos, así que en mamíferos tienen otra denominación diferente a la de ATG.

2. Microautofagia: en este tipo de autofagia los lisosomas directamente envuelven componentes citosólicos.

3. Autofagia mediada por chaperonas: en este caso chaperonas marcan las proteínas a degradar que contienen el pentapéptido KFERQ. Después este complejo se une al receptor de la membrana lisosomal LAMP-2A y la proteína es translocada al lisosoma para ser degradada.

La autofagia ha sido involucrada con la regulación energética, la supervivencia y la muerte celular. Cada uno de los destinos celulares en mención han sido determinados en contextos celulares específicos. Es así, que el programa autofágico es activado por una variedad de factores, tales como limitación de amino ácidos, baja energía celular, cambios en el pH o temperatura, hipoxia, estrés oxidativo, remoción de factores de crecimiento, infección por patógenos, estrés del retículo endoplasmático y disfunción de otros organelos como la mitocondria (108)

A nivel fisiológico, aumento de la autofagia en músculo, hígado, páncreas, tejido adiposo y corteza cerebral ha sido observada en ratones sometidos a actividad física (109), como un mecanismo de obtención de energía a partir del catabolismo de proteínas y en músculo esquelético humano se ha demostrado que esta autofagia fisiológica es regulada por la disminución de la fosforilación de Akt y mTOR y la activación de la cinasa AMPK (110), la cual es activada ante una disminución de los niveles de ATP (111).

En condiciones de estrés celular, la autofagia en principio promueve la supervivencia celular, pero cuando dicho estrés no puede ser controlado la autofagia desencadena muerte celular. No es claro el papel de la autofagia en las enfermedades neurodegenerativas, pues unas investigaciones se inclinan por sus efectos pro supervivencia, mientras que otras sustentan procesos de muerte celular. Por ejemplo, en modelos de taupatías en murinos la activación de la autofagia incrementa la supervivencia neuronal y este evento es asociado con la reducción de los agregados de Tau (112, 113); en condiciones hipóxicas, células Neuro2a aumentan la expresión de LAMP-2A, una proteína indicadora de autofagia mediada por chaperona, y cuando esta proteína es interferida se reduce la supervivencia neuronal (114). Otro mecanismo de protección neuronal reportado es la mitofagia, en la cual, las mitocondrias disfuncionales son degradadas cuando Pink recluta a Parkin a la mitocondria (115). Por el contrario, células SHSY5Y incubadas con oligómeros de A β 42 aumentan la muerte celular, la cual es asociada con el incremento de vacuolas autofágicas (116) y en modelos de isquemia focal cerebral en murinos la inhibición de la autofagia contribuye a la neuroprotección (117, 118). Frente a estas discrepancias un grupo

de investigación ha propuesto que la supervivencia neuronal puede estar dada por el balance entre la formación de autofagosomas y la degradación autofágica (119).

1.8.1 Maquinaria de la macroautofagia

La autofagia ha sido dividida en diferentes etapas, las cuales se describen a continuación:

Iniciación

Una señal maestra que regula la inducción de la autofagia es el complejo 1 de la proteína cinasa serina-treonina blanco de rapamicina (mTORC1). La activación de mTORC1 promueve el crecimiento celular, incrementando la síntesis de proteínas. Mientras que la inactivación de mTORC1 es una señal de inducción de la autofagia (120, 121).

mTORC1 es regulado negativamente por la actividad GTPasa del complejo proteico TSC1-TSC2 (complejo esclerosis tuberosa), el cual es activado en la ausencia de FC, dado que al ser fosforilado por Akt y/o Erk1/2, su actividad GTPasa disminuye (122, 123). La disminución en la señalización de citoquinas también regula de manera positiva a TSC1-TSC2 puesto que se ha determinado que este complejo es inhibido mediante fosforilación de IKK β (inhibidor del factor nuclear kappa), una vez este ha sido activado por TNF α (factor de necrosis tumoral alfa) (124). Por otro lado, ya sea el estrés metabólico asociado a bajos niveles de energía (ATP) o el estrés genotóxico con la activación de P53, se han vinculado con la activación de la proteína cinasa AMPK (proteína cinasa activada por AMP), la cual activa TSC1-TSC2 (125). Además, AMPK puede tener un efecto directo en la inhibición de mTORC1, pues se ha reportado que AMPK fosforila raptor, un miembro de mTORC1, reduciendo su actividad de cinasa (126).

Una vez mTORC1 es inhibido, ATG13 disminuye su estado de fosforilación y mTORC1 se disocia del complejo proteína cinasa ATG1/ULK1, el cual está conformado por ATG101, ATG1/ULK1-2, ATG17/FIP200 y ATG13 (125). De esta manera ULK1 y ULK2 incrementan su actividad de cinasa (127). Adicionalmente, este complejo puede ser regulado directamente de manera positiva o negativa por AMPK y Akt respectivamente, ya sea fosforilando ULK1 en las serinas 317-555-777 mediante AMPK (128, 129) o fosforilando a la serina 774 por acción de Akt

(128). Posteriormente, el complejo se traslada al omegasoma, una protrusión del retículo endoplasmático (130, 131).

Nucleación

El complejo ATG1/ULK1 fosforila el complejo Vps34/PI3K clase 3 (conteniendo ATG6/Beclin 1, ATG14, Vsp34/PI3K clase 3, Vps15/p150 y AMBRA1), el cual activado sintetiza fosfatidil inositol trifosfato (PIP3) (127). De esta manera, proteínas como DFCP1 (proteína 1 que contiene doble dominio FYVE) y ATG18/WIPI-1 y 2 (proteína de interacción con fosfolípidos con dominio WD40), pueden acoplarse a los inositoles, contribuyendo a la fase de elongación con su función de andamiaje (108, 132). Particularmente DFCP1 ha sido utilizada como marcador del omegasoma (131, 133). Esta fase también ha sido denominada sitio de ensamblaje del fagóforo o estructura preautofagosómica (108, 125).

Elongación

En esta etapa dos procesos son requeridos para la expansión de la estructura en formación. Uno de ellos es la utilización de membranas fosfolípicas del retículo y/o de otras fuentes que recientemente han sido propuestas, como la mitocondria (134, 135), la membrana plasmática (136-138) y el aparato de Golgi (139). El transporte de dichas membranas al sitio de ensamblaje del fagóforo ha sido acuñado a ATG9 (140), la única proteína transmembrana de la familia ATG (141). Su función es dependiente de la actividad de los complejos ATG1/ULK1 y Vps34/PI3K clase 3 (127).

El otro proceso desarrollado en esta fase es la ejecución de dos sistemas de conjugación de proteínas. Una vía involucra la conjugación de ATG12 a ATG5, reacción que es llevada a cabo en orden secuencial por ATG7 y ATG10, las cuales funcionan de manera similar a las enzimas de ubiquitinización E1 y E2, respectivamente. Posteriormente, ATG12 y ATG5 se agregan con Atg16 para formar un complejo multimérico (108, 125). El segundo sistema de conjugación implica la transformación de la forma soluble de ATG8/LC3, denominada LC3-I en mamíferos, a la forma lipidada que se encuentra asociada a la vesícula autofágica, conocida como LC3-II en mamíferos. En este caso, LC3-I es inicialmente clivada en su dominio C-terminal por acción de ATG4 y seguidamente un grupo fosfatidiletanolamina es agregado, requiriendo la actividad enzimática de ATG7 y ATG3 con función similar a E2 (108, 125). Adicionalmente, la actividad de ATG3 es incrementada por su interacción con el complejo ATG12-ATG5 (142), también se ha asegurado que este complejo

funcionaría de manera similar a una E3 ligasa (127). En la autofagia de tipo selectiva p62 reconoce proteínas ubiquitinizadas e interactúa con LC3-II para capturar la proteína u organelo blanco en la vesícula en formación (127).

Maduración y degradación de los autofagosomas

Se ha propuesto que al finalizar el proceso de formación de la vesícula autofágica los complejos proteicos ATG son disociados (143). Solo la proteína LC3-II de la familia ATG permanece en el autofagosoma (143). Posteriormente la vesícula tiene dos destinos que han sido documentados: los autofagosomas pueden fusionarse con endosomas, dando origen a estructuras denominadas amfisosomas, los cuales se unen con los lisosomas para generar autofagolisosomas. La segunda posibilidad es la fusión directa del autofagosoma con el lisosoma (127). Los procesos moleculares de fusión con el lisosoma, aún no son bien establecidos. Sin embargo, algunos trabajos recientes postulan a la proteína Sintaxina 17, un componente de la familia SNARE, como la responsable de este proceso (144). Esta proteína se localiza en el retículo endoplasmático y el citosol cuando las células tienen medio de crecimiento a su disposición, mientras que en privación de FC, Sintaxina 17 se distribuye en la membrana externa de autofagosomas maduros para mediar la fusión a través de su interacción con ubisnap/SNAP-29 and VAMP7 (144, 145). Adicionalmente, la reducción de su expresión génica no altera la maquinaria de formación del autofagosoma, pero si bloquea la fusión con el lisosoma (144).

Una vez el autolisosoma degrada su contenido, mTORC1 es reactivado y la autofagia es bloqueada (146). No es claro cómo mTORC1 es activado nuevamente, pero es evidente que la degradación enzimática en el lisosoma es necesaria para desencadenar este evento molecular (146).

1.8.2 Regulación de la autofagia por especies reactivas de oxígeno

Dado el rol de ApoE en el metabolismo mitocondrial y la mitocondria como principal fuente endógena de ERO, es crucial resaltar este punto.

La continua actividad de la cadena transportadora de electrones conduce a la disipación de electrones de este sistema, principalmente en forma de superóxido y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (107). Estos radicales libres han sido reportados como reguladores positivos de la autofagia. Es así que bajo privación de

nutrientes celulares, se ha sugerido que la mitocondria es la responsable de generar H_2O_2 , el cual oxida ATG4, promoviendo la conversión de LC3-I hacia LC3-II (147). En privación de FC, el radical superóxido también se encuentra incrementado y al ser inhibido por la superóxido dismutasa mitocondrial, el proceso autofágico es reducido (148). Además, la serie de eventos oxidoreducción lleva a la formación de proteínas y organelos disfuncionales que se convierten en señales para la degradación de la maquinaria autofágica (107), eventos celulares que hacen complejo este sistema de regulación de la autofagia.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Analizar el efecto de las isoformas de ApoE en la autofagia neuronal y el metabolismo mitocondrial y su relación con las vías PI3K/Akt y MAP cinasas en un contexto excitotóxico.

2.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar el efecto de las isoformas de ApoE en un contexto excitotóxico en el metabolismo y la viabilidad celular en la línea celular neuronal SHSY5Y.
2. Determinar los niveles de expresión de Akt-p, PTEN-p y Erk1/2-p, mediados por las isoformas de ApoE en un contexto excitotóxico.
3. Identificar procesos de autofagia regulados por las isoformas de ApoE en un contexto excitotóxico.
4. Determinar si las isoformas de ApoE ingresan a la célula y si colocalizan con la mitocondria.

3. Materiales y métodos

Cultivo celular

La línea celular SHSY5Y es una línea neuronal que fue originada a partir de un neuroblastoma humano. En cultivo celular se mantiene en cajas de 75cm² con medio DMEM-F12 (Lonza, Walkersville, MD, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a 37°C con 95% de aire y 5% de CO₂. Para los ensayos las células SHSY5Y fueron diferenciadas durante 2 días con 2% de suero fetal bovino y 5µM de ácido retinoico (Sigma, Saint Louis, USA). Tratamientos con glutamato y las isoformas de la ApoE recombinante (Cell Science, Canton, MA, USA) fueron realizados a diferentes tiempos y concentraciones. (Ver ANEXO 1)

Ensayo MTT

La viabilidad celular fue evaluada mediante el ensayo MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 bromuro difeniltetrazolio). 25µl del sobrenadante fueron removidos de cada pozo y 20µl de la solución de MTT (5 mg MTT/ml en PBS) fueron agregados a cada pozo. El plato de cultivo celular fue protegido de la luz y después de dos horas de incubación a 37°C y 5% de CO₂, el sobrenadante fue removido y los cristales de formazan fueron disueltos por la adición de 100µl por pozo de buffer de lisis para MTT (dimetilformamida y SDS). El plato fue cubierto e incubado por una hora a 37°C y agitado por 20 minutos. La absorbancia fue cuantificada a una λ de 550nm. (Ver ANEXO 2)

Ensayo LDH

La muerte celular fue evaluada por la cantidad de lactato deshidrogenasa liberada al medio de cultivo celular, usando el kit citotox96 (Promega, Madison, USA). 50µl del sobrenadante fueron transferidos de cada pozo del ensayo y mezclados con 50µl del kit reconstituido. El plato fue protegido de la luz e incubado 37°C por 30 minutos. Después, 50µl de solución de parada fue agregada a cada pozo y la absorbancia fue determinada a una λ de 490nm. El control de muerte celular fue realizado, mediante lisis celular mecánica. (Ver ANEXO 2)

Ensayo JC-1

El potencial de membrana mitocondrial como un indicador del metabolismo de la mitocondria se evaluó usando JC-1 (5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetil bencimidazolilo carbocianina yoduro) (Invitrogen, USA). Cuando los tiempos de tratamiento de las células han finalizado se adiciona el JC1 (2,5 µg/ml) y se incuba por 15 minutos a 37°C y 5% de CO₂. Una vez cumplido el tiempo de incubación se retira el medio y se lava 3 veces por 5 minutos con PBS1X o medio DMEM-12. La fluorescencia de la placa es cuantificada mediante un fluorómetro con una excitación de 560 nm y una emisión de 595 nm para detectar los agregados de JC-1 (rojo) que indican las mitocondrias con un potencial de membrana estable, mientras que las células con mitocondrias despolarizadas o monómeros de JC-1 (verde) se detectan con un filtro de excitación de 485 nm y uno de emisión de 535 nm. Como control positivo para despolarizar las mitocondrias se usó el desacoplador CCCP 1 µM durante 1 minuto. El análisis correspondiente al potencial de membrana mitocondrial se realizó mediante la relación de la señal de los agregados sobre los monómeros de JC-1 (rojo /verde). (Ver ANEXO 2)

Western blot

Las células fueron sembradas en cajas de 6 pozos (3,5 x 10⁵ células/pozo) y diferenciadas como se mencionó antes. Después de los tratamientos las células fueron homogenizadas en buffer de lisis: RIPA mas inhibidores de proteasas y fosfatasas (Thermo Scientific, Rockford, USA). Los lisados fueron dispersados mediante ultrasonido, 3 veces por 5 segundos. 20µg de proteína fue sembrada por cada muestra, SDS-PAGE. Después de la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana PVDF (Hybond PVDF, Amersham-Pharmacia, Piscataway, USA) e incubadas en buffer de bloqueo (5% de leche descremada en TBS-Tween 20) por una hora a temperatura ambiente. Las membranas fueron incubadas toda la noche con los siguientes anticuerpos primarios: fosfo-Akt ser 473, Akt total, fosfo-PTEN ser 380, fosfo Erk1/2 y Erk total (1:1000) (Cell Signaling, Danvers, MA, USA). Un anticuerpo contra β-actina (1:5000 Promega, Madison, USA) fue usado como control de carga. Las membranas fueron lavadas 3 veces con TBS-Tween20 (5 minutos por lavado), seguido de la incubación con anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a la peroxidasa (1:2000 Cell Signaling, Danvers, MA, USA) durante una hora. Posteriormente 3 lavados con

TBS-Tween20 (5 minutos por lavado). Las reacciones fueron visualizadas usando un ensayo de quimioluminiscencia (ECL system, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), los productos de la quimioluminiscencia fueron detectados en placas sensibles a la luz (Amersham). Las placas fueron escaneadas y el análisis densitométrico de las bandas fue llevado a cabo con el software ImageJ (Instituto Nacional de Salud, Estados Unidos, versión 1.44). (Ver ANEXO 3)

Inmunofluorescencia

Las células fueron sembradas y diferenciadas en cajas de Petri usando cubre objetos, los cuales fueron previamente tratados con poly-D-lisina (3×10^5 células/pozo). Para evitar la desintegración de los autofagosomas, 4 horas antes de finalizar el tratamiento las células fueron incubadas con inhibidores de hidrolasas lisosomales (Pestatin y E64d $10\mu\text{g/ml}$); este procedimiento en mención solo se hizo cuando se estudió la autofagia con el marcaje de la proteína LC3. Después de los tratamientos las células fueron fijadas en paraformaldehído al 4% y permeabilizadas con digitonina. El bloqueo fue realizado con 1% de BSA en PBS. Después las células fueron incubadas con anti-LC3 (1: 50 Santa cruz, CA, USA), anti-MAP-II (1: 1000 Santa Cruz, CA, USA), anti-TOM20 (1: 50 Abcam, Boston, USA) y anti-ApoE (1: 100 Abcam, Boston, USA) durante toda la noche y después con anticuerpo secundario anti-goat Alexa fluor 568 (1:1000 Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), anti-chicken Alexa fluor 488 (1:1000 Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), anti-mouse Alexa fluor 568 (1:100 Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y anti-rabbit Alexa fluor 488 (1:1000 Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) respectivamente. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst. Los autofagosomas fueron visualizados por microscopía de fluorescencia y cuantificados con la herramienta de conteo de partículas del software ImageJ. (Ver ANEXO 4)

Análisis estadístico

El análisis de resultados se realizó mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de un post-test de Tukey-Kramer de comparación múltiple para averiguar si existen diferencias significativas entre los grupos de tratamientos. A partir de un p menor a 0,05 se consideró como diferencia significativa. Los datos fueron analizados con el software GraphPad Prism versión 5.0. Los valores de p obtenidos en el test de Tukey-Kramer o Bonferroni son expresados en las gráficas de la siguiente manera:

* si el p valor es inferior a 0,05

Regulación de la Apolipoproteína E sobre la vía PI3K/AKT en un contexto excitotóxico: efecto sobre el metabolismo y la autofagia neuronal

****** si el p valor es inferior a 0,01

******* si el p valor es inferior a 0,001

ns valor de p no significativo

Los datos del grupo control fueron normalizados al 100%, los cuales fueron comparados con los diferentes tratamientos y las gráficas representan la media de los datos. En el caso de los ensayos de LDH, los datos fueron normalizados con el control positivo de muerte

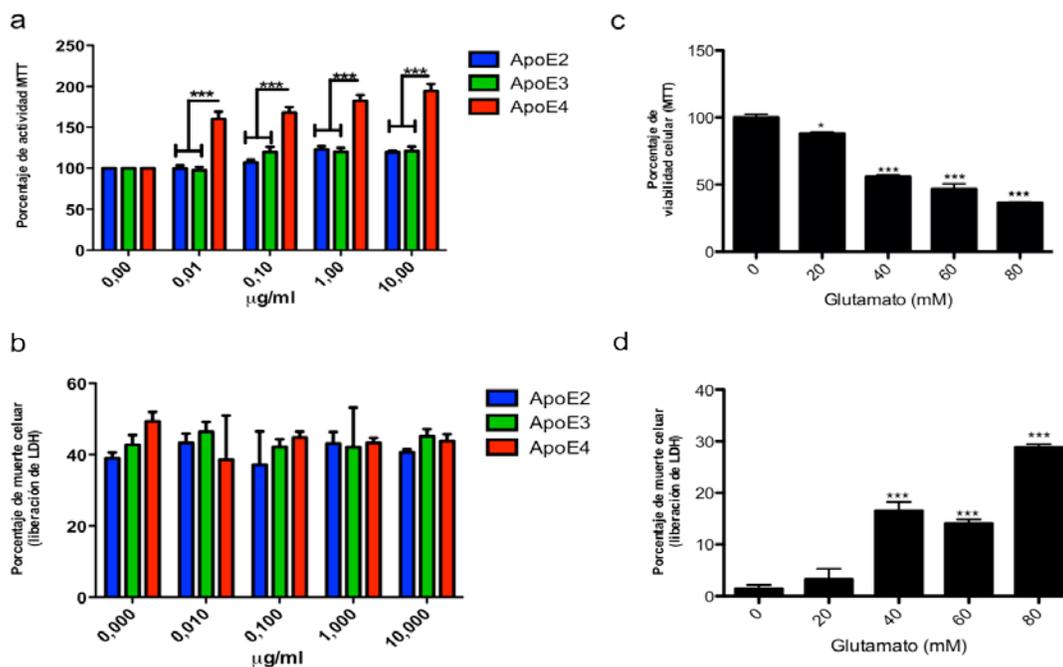
4. Resultados

4.1 ApoE4 aumenta el metabolismo mitocondrial y glutamato induce muerte neuronal

Para evaluar el metabolismo mitocondrial y la muerte neuronal, la línea celular SHSY5Y fue tratada inicialmente con diferentes concentraciones de las isoformas de ApoE y glutamato de forma independiente por 24 horas. Se encontró que ApoE4 induce mayor actividad MTT en comparación con ApoE2 y ApoE3 (Fig. 1a) y el efecto es más pronunciado a una concentración de 10µg/ml ($P < 0,001$) sin encontrar cambios en la liberación de LDH (Fig. 1b). La toxicidad del glutamato fue dosis dependiente y el mayor porcentaje de muerte celular fue generado a 80mM, encontrando significancia estadística a partir de 20mM (20mM- $P < 0,05$, 40mM- $P < 0,001$, 60mM- $P < 0,001$, 80mM- $P < 0,001$) en el ensayo de MTT, mientras que en el ensayo de LDH la significancia estadística es observada desde la concentración de 40mM (40mM- $P < 0,001$, 60mM- $P < 0,001$, 80mM- $P < 0,001$) (Fig. 1c y d). Los tratamientos posteriores fueron realizados con 10µg/ml para las isoformas de ApoE y 80mM para glutamato.

Figura 1. ApoE4 aumenta el metabolismo mitocondrial y el glutamato induce muerte neuronal. Células SHSY5Y fueron diferenciadas durante dos días e incubadas con diferentes concentraciones de ApoE2-3-4 y glutamato por 24 horas. La viabilidad y la muerte celular fueron determinadas por los ensayos de MTT y LDH respectivamente. ApoE4 incrementó de forma significativa el metabolismo mitocondrial a 10µg/ml con un valor de $P < 0,001$ (***) , determinado por MTT (a), sin observarse cambios en la liberación de LDH (b). El glutamato indujo muerte celular de manera dosis dependiente (c y d). Cada barra representa la media \pm SD de tres experimentos. $P < 0,05$ (*) fue considerado significativo.

Regulación de la Apolipoproteína E sobre la vía PI3K/AKT en un contexto excitotóxico: efecto sobre el metabolismo y la autofagia neuronal

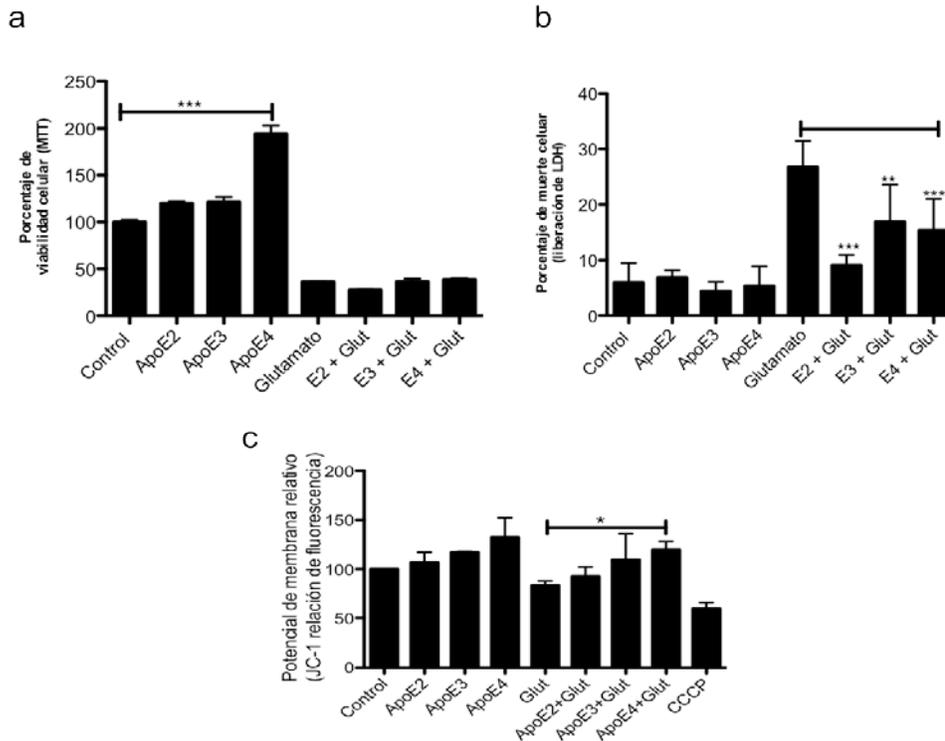


4.2 Isoformas de ApoE disminuyen la muerte neuronal mediada por glutamato

Para determinar el papel de las isoformas de ApoE en la muerte celular inducida por glutamato, las células SHSY5Y fueron incubadas por una hora con las isoformas de ApoE y luego tratadas por 24 horas con glutamato. Las isoformas de ApoE disminuyeron significativamente la liberación de LDH mediada por glutamato ($P < 0,01$). Este efecto tiende a ser mayor con ApoE2 (Fig. 2b). No se encontraron cambios en el metabolismo mitocondrial evaluado por MTT, entre el tratamiento con glutamato y glutamato más las isoformas de ApoE (Fig. 2a). Sin embargo, el ensayo de JC-1 revela que el glutamato disminuye el potencial de membrana mitocondrial y ApoE4 restaura este efecto de manera significativa ($P < 0,05$) (Fig 2c). Estos resultados sugieren que la neuroprotección conferida por las isoformas de ApoE es hecha regulando diferencialmente el metabolismo mitocondrial.

Figura 2. Isoformas de ApoE disminuyen la muerte neuronal mediada por glutamato. Células SHSY5Y fueron diferenciadas durante dos días e incubadas con 10µg/ml de ApoE2-3-4 y tratadas con glutamato 80mM por 24 horas. La viabilidad y la muerte celular fueron determinada

por los ensayos de MTT y LDH respectivamente. El potencial de membrana mitocondrial fue evaluado con JC-1. Las isoformas de ApoE disminuyeron de manera significativa la muerte celular generada por glutamato (b), sin generar cambios en la actividad MTT (a), pero incrementado el potencial de membrana mitocondrial (c). Cada barra representa la media \pm SD de tres experimentos. $P < 0,05$ (*) fue considerado significativo.



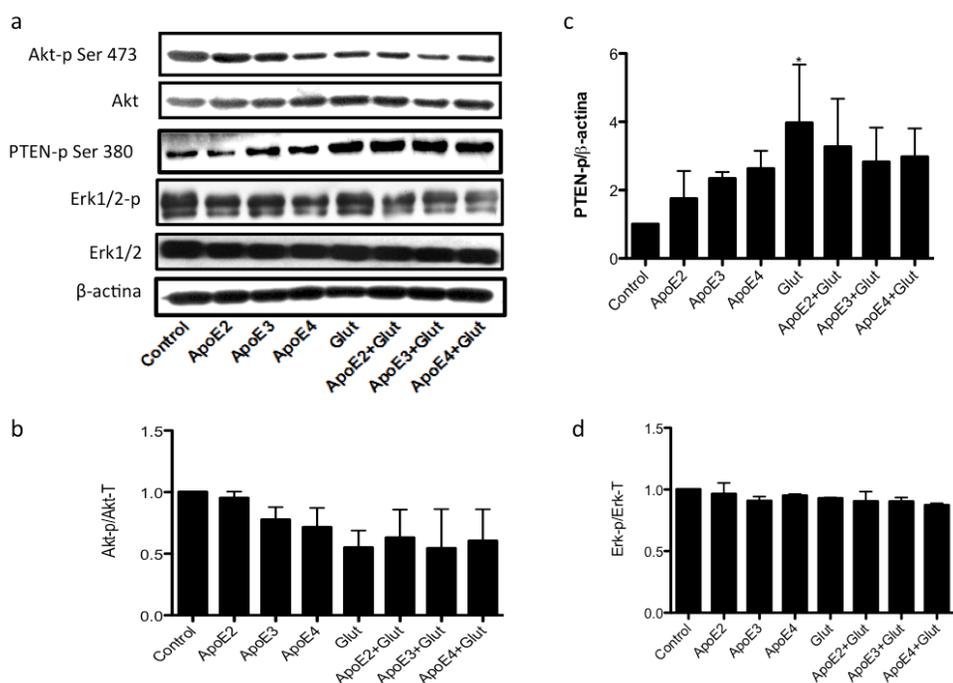
4.3 Las isoformas de ApoE regulan diferencialmente la vía de señalización PI3K/Akt

La vía de señalización PI3K/Akt y MAPK es indispensable para la supervivencia neuronal. Se ha reportado que ApoE regula las vías de señalización PI3K/Akt y MAPK (8), pero se desconoce el impacto de estas en la excitotoxicidad por glutamato. Western blot específicos para Akt-p (Ser 473), PTEN-p (Ser 380) y Erk 1/2-p fueron realizados en presencia o ausencia de glutamato por 24 horas, con previo tratamiento de las isoformas de ApoE. Las isoformas de ApoE3 y ApoE4 disminuyeron los niveles de expresión de Akt-p, en 22 y 28% respectivamente, sin mostrar significancia estadística (Fig 3 a y b). ApoE incrementó el nivel fosforilación de PTEN, particularmente ApoE3 y ApoE4, pero no se encontraron diferencias estadísticas (Figura 3 a y c). El tratamiento con glutamato redujo en 45% la fosforilación de Akt (Fig 3 a y b), y las diferentes isoformas de ApoE no revirtieron los niveles de Akt-p. Glutamato generó un claro incremento en la

Regulación de la Apolipoproteína E sobre la vía PI3K/AKT en un contexto excitotóxico: efecto sobre el metabolismo y la autofagia neuronal

fosforilación de PTEN ($P < 0,01$), y el pre tratamiento con las isoformas de ApoE solo parcialmente redujo los niveles de PTEN fosforilado (Figura 3 a y c). La fosforilación de Erk 1/2 no mostró cambios (Figura 3 a y d). Estos resultados indican que la neuroprotección conferida por las isoformas de ApoE, no dependen claramente de la fosforilación de Akt y el aumento de la actividad metabólica mitocondrial observado con ApoE4, se asocia con una disminución de Akt-p y un incremento de PTEN.

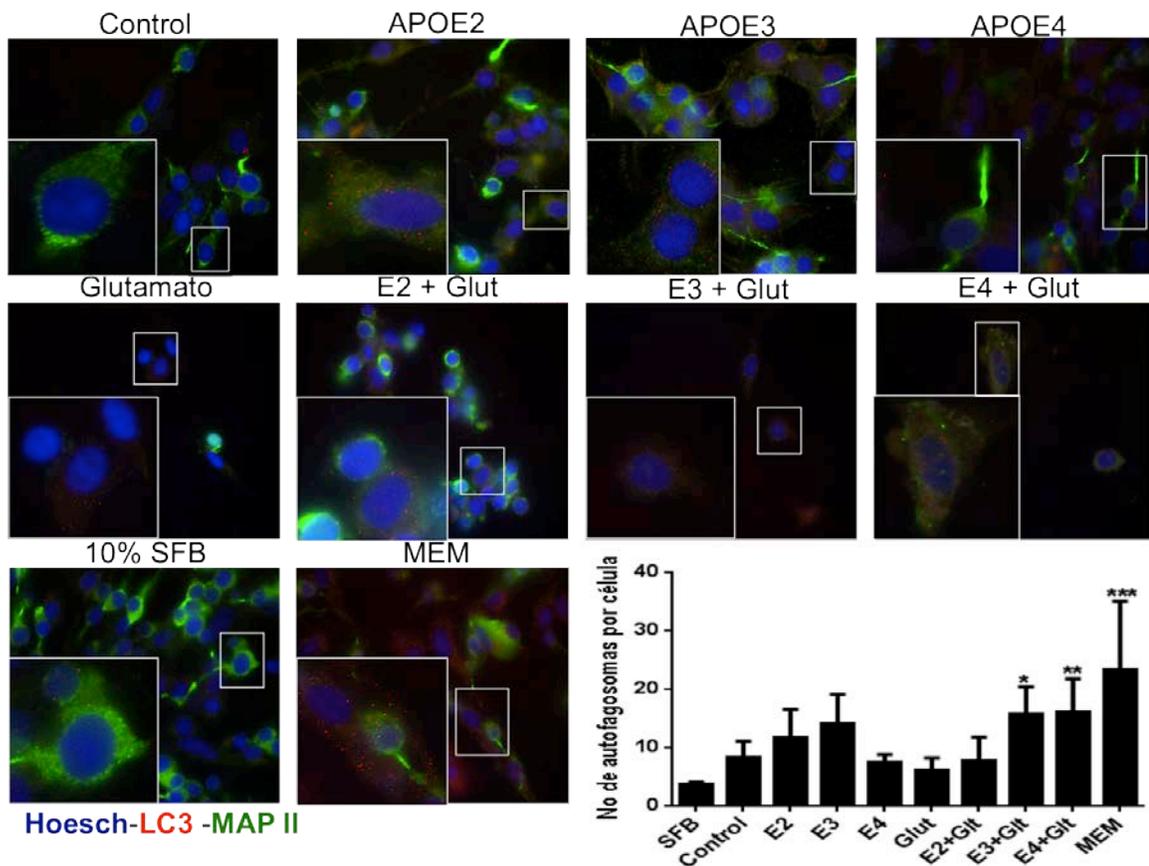
Figura 3. Las isoformas de ApoE regulan diferencialmente la vía de señalización PI3K/Akt. Células SHSY5Y fueron diferenciadas durante dos días e incubadas con 10ug/ml de ApoE2-3-4 y tratadas con glutamato 80mM por 24 horas. La expresión de Akt-p, PTEN-p y Erk1/2-p fue determinada por western blot y análisis densitométrico realizado con el software ImageJ. Las isoformas ApoE disminuyen la expresión de Akt-p (ser 473) (a y b) y aumentan la expresión de p-PTEN (Ser 380) (a y c), siendo más evidente con ApoE4. Glutamato reduce la expresión de Akt-p (a y b) y aumenta la expresión de p-PTEN (a y c). No se encontraron cambios con p-Erk. Cada barra representa la media \pm SD de tres experimentos.



4.4 Neuroprotección conferida por ApoE contra glutamato depende de la activación de la autofagia.

El incremento de la actividad metabólica mitocondrial sugerida por ApoE4, se ha asociado a un incremento en las ERO y se ha sugerido que las células pueden controlar este estrés oxidativo mediante la activación de la autofagia (107). Para evaluar el impacto de las isoformas de ApoE sobre la autofagia, se analizó el número de autofagosomas mediante inmunofluorescencia del marcaje de LC3. A las 24 horas se observa una tendencia de aumento en el número de autofagosomas en la presencia de las isoformas de ApoE. El glutamato no causó un incremento en el número de autofagosomas, aunque si lo hizo en la presencia de las isoformas ApoE3 y ApoE4 de manera significativa $P < 0,05$ y $P < 0,01$ (Figura 4). Estos hallazgos sugieren que la muerte neuronal inducida por el glutamato después de 24 horas es independiente de la autofagia, mientras la neuroprotección contra el glutamato, conferida por las isoformas de ApoE, en particular ApoE3 y ApoE4, es dependiente de la activación de la autofagia.

Figura 4. Neuroprotección conferida por ApoE contra glutamato depende de la activación de la autofagia. Células SHSY5Y fueron diferenciadas durante dos días e incubadas con 10ug/ml de ApoE2-3-4 y tratadas con glutamato 80mM por 24 horas. Autofagosomas fueron visualizados con microscopía de fluorescencia, marcando la proteína LC3 y el análisis cuantitativo fue realizado con el software ImageJ. 10% de suero fetal bovino fue utilizado como control negativo de autofagia y medio DMEM como control positivo. Autofagia asociada a disminución en la muerte celular es observada en los tratamientos de ApoE3 o ApoE4 más glutamato a las 24 horas.



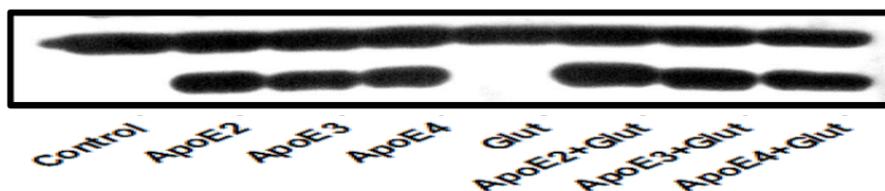
4.5 Las isoformas de ApoE ingresan a la línea celular SHSY5Y

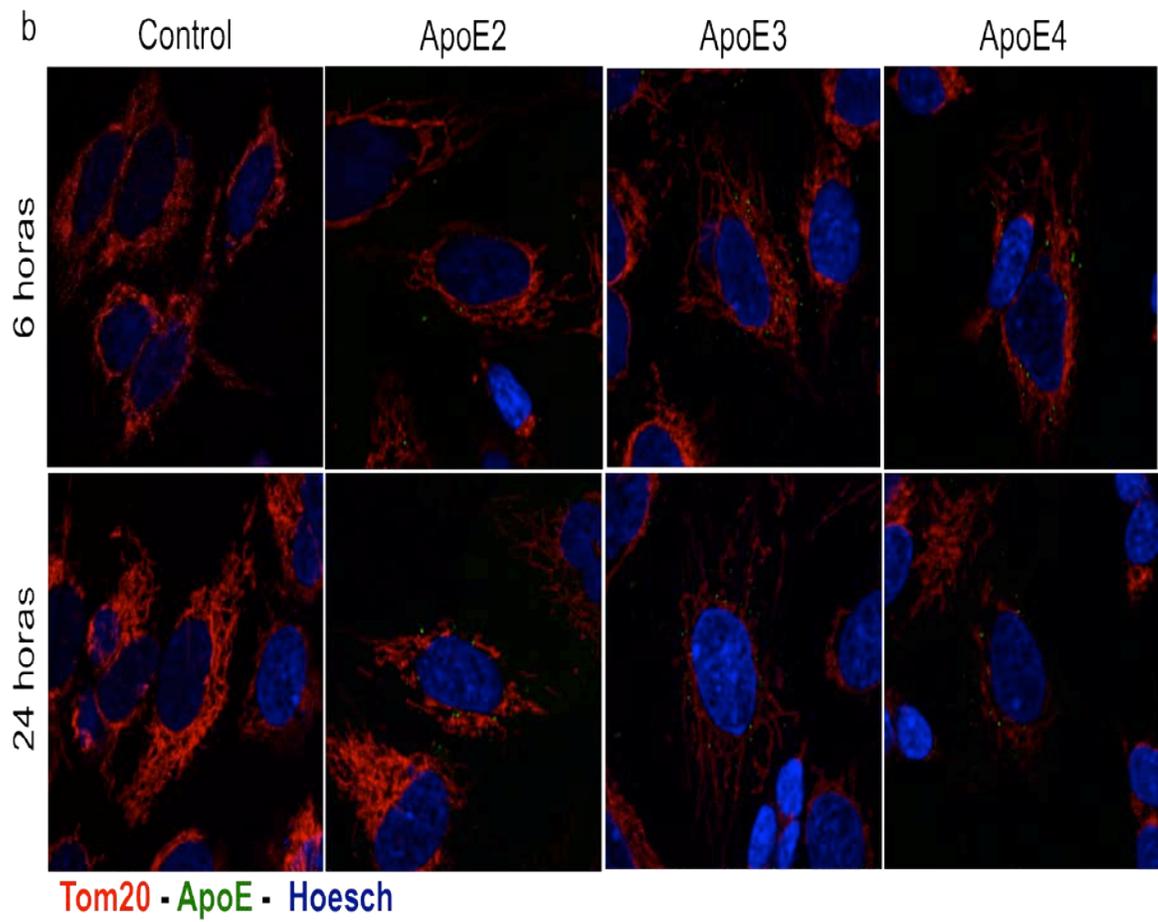
Varios estudios han demostrado el impacto de ApoE, particularmente ApoE4 en la mitocondria cuando su origen es intracelular en condiciones de estrés celular. Aunque en este trabajo es más probable que ApoE ejerza sus efectos uniéndose a sus receptores, no se descarta que esta apolipoproteína ingrese al espacio intracelular y actúe directamente en la mitocondria. Por esta razón, se procedió a determinar en este modelo si las isoformas de ApoE ingresan en la línea celular SHSY5Y y si estas se localizan en la mitocondria. Para dilucidar este objetivo, las células fueron tratadas con ApoE en presencia y ausencia de glutamato por 24 horas y western blot para ApoE fue realizado, el cual reveló que las células SHSY5Y no sintetizan ApoE en condiciones basales, ni bajo el estrés del glutamato y las diferentes isoformas de ApoE recombinante están presentes, sin variar su expresión entre ellas (Fig. 5a). Para confirmar el ingreso de ApoE a la neurona, microscopía confocal para ApoE fue realizada a las 6 y 24 horas, adicionalmente se utilizó el marcador mitocondrial TOM20. Este ensayo reveló que las isoformas de ApoE se ubican en el espacio intracelular a partir de las 6 horas, ubicándose entre las redes mitocondriales, pero sin colocalizar con el marcador mitocondrial TOM20 (Fig. 5b).

Figura 5. Las isoformas de ApoE ingresan a la línea celular SHSY5Y. Células SHSY5Y fueron diferenciadas durante dos días e incubadas con 10µg/ml de ApoE2-3-4 y tratadas con glutamato 80mM por 24 horas. Expresión de ApoE fue determinada por western blot (a) y visualizada en el espacio intracelular mediante microscopía confocal (b). La línea celular SHSY5Y no expresa ApoE y la proteína recombinante es identificada en el espacio intracelular.

a

β-actina
ApoE





5. Discusión

En este trabajo se ha demostrado que la isoforma 4 de ApoE incrementa la actividad mitocondrial, específicamente la actividad enzimática del complejo II de la cadena respiratoria, evidenciado en el ensayo de MTT y de forma global este efecto fue observado con la tinción de JC-1, sin inducir muerte celular, y esto es asociado con una tendencia a la defosforilación de Akt, mientras que los niveles de PTEN fosforilado incrementan, junto con la autofagia. ApoE2 y ApoE3 inducen cambios similares, pero en menor grado. Adicionalmente, las proteínas recombinantes de ApoE se ubican entre las mitocondrias.

Aunque la principal función de ApoE en el cerebro es el transporte de colesterol y esfingolípidos, esta también juega un importante rol en la señalización neuronal después de unirse a la familia de receptores de LDL (9, 149). El link molecular entre las isoformas de ApoE y PTEN es desconocido. Sin embargo, es conocido que PTEN puede ser reclutado a la proteína de andamiaje PSD-95 por la activación del receptor de NMDA (150), el cual es diferencialmente regulado por las isoformas de ApoE cuando ellas se unen a ApoER2 (19). De esta manera, las isoformas de ApoE podrían estar operando en plataformas de señalización que reclutan y activan proteínas tales como PTEN, el cual inhibe la vía PI3K-Akt y por tanto activa la maquinaria autofágica como se ha observado en el presente estudio.

ApoE2 y ApoE3 han sido descritas como promotoras de la plasticidad sináptica y la integridad neuronal (19), así como en la prevención de la pérdida sináptica causada por oligómeros A β (151). ApoE4 ha sido ligada a vías moleculares las cuales sensibilizan a procesos neurodegenerativos, así como también la pérdida de la integridad neurovascular, asociada con la activación de NF- κ B (152), reducción de la expresión de la enzima degradante de la insulina a través de la estimulación del receptor de NMDA y la PKA (153). Estos eventos pueden ser asociados con estrés oxidativo, como han sido recientemente descritos en neuronas expuestas a un fragmento largo de ApoE4 (154) o cuando el fragmento es producido intracelularmente (22, 23, 155).

El incremento de la actividad metabólica generada por ApoE4, que ha sido descrita en este trabajo, es probablemente asociada con un incremento en la producción de ERO, las cuales inducen la autofagia como un mecanismo celular para controlar el incremento del estrés oxidativo, como ha sido sugerido previamente (107). Además, es posible que los efectos de las apolipoproteínas en la función mitocondrial puedan ser atribuidos a un efecto directo de ApoE en el metabolismo mitocondrial (155), en conjunto con su interacción con sus receptores. Como se demuestra en este trabajo, las apolipoproteínas son internalizadas y se distribuyen en las redes mitocondriales sin presentar procesos de clivaje que han sido observados en investigaciones que estudian las apolipoproteínas de origen intracelular (22-25). Entonces las diferentes isoformas al ser internalizadas, posiblemente junto con su receptor, podrían funcionar como signalosomas e interactuar con proteínas de la membrana externa mitocondrial. En este caso, ApoE4 de forma diferencial sería la responsable de modular positivamente el metabolismo de la glucosa a través de la hexocinasa, generando más sustratos para la cadena respiratoria y por tanto mayor producción de ERO.

La exposición a glutamato indujo una disminución en el metabolismo de MTT y un incremento en la liberación de LDH, asociado con un incremento en la fosforilación de PTEN y una disminución en la fosforilación de Akt. Las isoformas de ApoE previenen la liberación de LDH, pero no la disminución en la actividad MTT y también disminuyen levemente la fosforilación de PTEN e incrementan los niveles de la autofagia. Sin embargo, no fueron observados cambios en la fosforilación de Akt.

Neuroprotección conferida por las isoformas de ApoE contra la excitotoxicidad del glutamato ha sido reportada en previos estudios (87, 88). En el presente estudio las diferentes isoformas de ApoE confieren neuroprotección contra la toxicidad del glutamato y tiende a ser más significativo con ApoE2 y ApoE4, eventos que son regulados diferencialmente por la función mitocondrial y la fosforilación de Akt. Esto sugiere que el incremento del metabolismo mitocondrial regulado por ApoE4 y la neuroprotección conferida por las isoformas de ApoE no parecen depender de la activación de la vía de supervivencia PI3K/Akt.

La autofagia es un proceso involucrado tanto en la supervivencia como en la muerte celular (156), la cual es regulada negativamente por la fosforilación de Akt (157). Los ensayos presentados han demostrado que en un contexto neurotóxico inducido por glutamato, la autofagia inducida por ApoE es un factor determinante en la supervivencia neuronal seguida la exposición de glutamato, particularmente con ApoE3 y ApoE4 después de 24 horas de tratamiento. Interesantemente, la neuroprotección mediada por ApoE2 es independiente de la autofagia. En este contexto el glutamato induce daño mitocondrial, así que ApoE3 y ApoE4

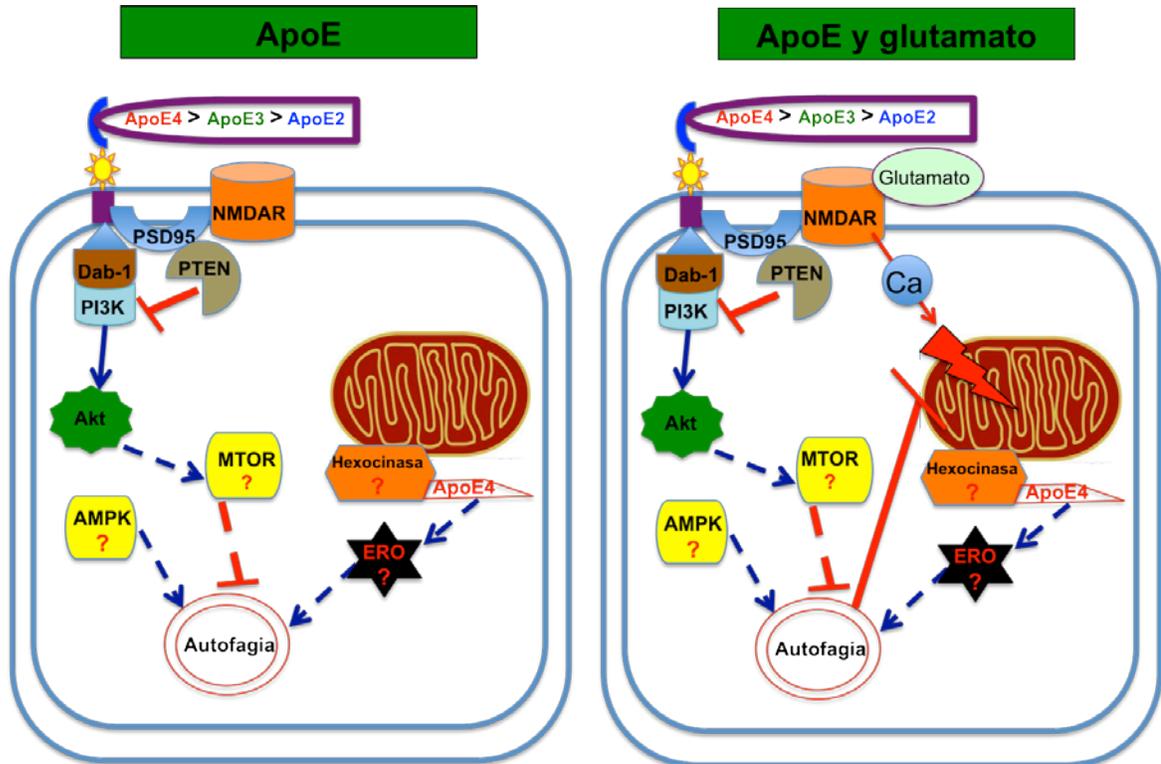
posiblemente protegen la neurona mediante la degradación de mitocondrias disfuncionales activando la autofagia. Otra alternativa sería la regulación del receptor de NMDA como ha sido postulado previamente (19). Aunque se observó una disminución en la fosforilación de PTEN, esta no es suficiente para incrementar la fosforilación de Akt e inactivar la actividad autofágica.

Es claro que las isoformas de ApoE protegen contra el efecto neurotóxico del glutamato, pero los mecanismos neuroprotectores utilizados, los cuales se basan en la disminución de la fosforilación de Akt y el incremento de la autofagia, podrían convertirse en factores de riesgo para muerte neuronal. Estudios previos han mostrado incremento de la autofagia en cerebros de pacientes con EA y en modelos murinos para esta enfermedad (158, 159), no obstante el mecanismo molecular de la autofagia es desconocido en la EA. De manera interesante, en este modelo neuronal, ApoE4 como factor de riesgo para la entidad patológica en mención, induce la autofagia, la cual es aparentemente mediada por el incremento en la fosforilación de PTEN, conduciendo a la inactivación de la vía PI3K/Akt, de igual forma el proceso de la autofagia podría ser llevado a cabo mediante la generación de ERO de origen mitocondrial.

En conclusión, los resultados demuestran que las isoformas de ApoE confieren neuroprotección contra la exposición del glutamato, regulando diferencialmente Akt y PTEN, llevando a la activación de la autofagia. Sin embargo, la activación crónica de la autofagia podría transformarse en un factor de riesgo para neurodegeneración. (Ver figura 6)

Desde el punto de vista técnico, es importante resaltar que el modelo celular utilizado demuestra que las neuronas SHSY5Y no expresan ApoE a nivel proteico, tanto en condiciones basales como excitotóxicas a diferencia de otros trabajos que demuestran síntesis de *novο* de ApoE. De esta manera, este trabajo utiliza una línea celular que elimina el sesgo del posible efecto de ApoE intracelular. Es así que la línea celular en mención se convierte en un excelente modelo para el estudio de la señalización de ApoE.

Figura 6. Hipótesis sugerida del efecto de las isoformas de ApoE y glutamato en las neuronas SHSY5Y. Las isoformas de ApoE incrementan diferencialmente la fosforilación de PTEN (ApoE4 > ApoE3 > ApoE2). Como consecuencia, hay una reducción en la fosforilación de Akt. Adicionalmente, ApoE se ubica entre las redes mitocondriales y particularmente ApoE4 incrementa el metabolismo mitocondrial, generando ERO. Este evento, junto con la defosforilación de Akt conduce a la activación de la autofagia. Cuando el glutamato actúa en el receptor de NMDA, moléculas de calcio ejercen disfunción mitocondrial, provocando muerte celular, pero el metabolismo y la autofagia metabólica de ApoE3 y ApoE4 regulan negativamente este proceso.



6. Perspectivas

El presente trabajo ha indagado el efecto de la ApoE sobre el metabolismo neuronal, enfocándose en la función mitocondrial y la autofagia, tanto en condiciones basales como excitotóxicas. Aunque se han encontrado algunos hallazgos importantes que esclarecen la actividad diferencial de las isoformas de ApoE, aparecen muchos interrogantes por dilucidar.

Si bien el metabolismo mitocondrial estudiado con el MTT y JC-1 revelan la alta o la baja actividad de la cadena respiratoria mitocondrial, no es claro si estos eventos comprometen la producción de ERO. Es así que serán necesarios ensayos que evalúen este aspecto y como el tratamiento con antioxidantes podría o no revertir los efectos celulares corriente abajo de la actividad mitocondrial.

Como se ha discutido en la sección teórica, las cinasas AMPK y mTOR son reguladoras de la autofagia. Por lo tanto, ensayos de Western blot de estas proteínas serían útiles en la disección de la señalización de ApoE.

Muchos trabajos se han enfocado en los efectos de ApoE de origen intracelular y otros con la señalización cuando esta interactúa con sus receptores (21-25). La internalización de ApoE y su distribución entre las redes mitocondriales mostrada en este trabajo hace más complejo el análisis de su accionar. Posteriores estudios encaminados a revelar la interacción de ApoE con proteínas en esta región subcelular abrirán un nuevo campo de investigación.

Dadas las controversias que ha tenido la autofagia en la regulación de la muerte y supervivencia celular, algunos grupos de investigación han propuesto analizar el balance de la degradación de los autofagosomas (158-161). Los análisis presentados de fluorescencia de LC3 evidencian la importancia de ApoE en la regulación de la autofagia. Sin embargo, el marcaje de LC3 no esclarece si los autofagosomas son degradados cuando estos se fusionan con los lisosomas. Actualmente, nuestro grupo de investigación ha iniciado estudios de degradación

de vesículas autofágicas en la línea celular CAD. Subsecuentes ensayos serán realizados en la línea celular SHSY5Y.

ANEXOS

ANEXO 1: Cultivo de células SHSY5Y

El cultivo con líneas celulares requiere especial atención en los posibles eventos de contaminación (bacterias, hongos y levaduras). Las actividades de cultivo celular se realizan siempre en cabina de flujo laminar vertical tipo IIA, y previo a cada sesión de trabajo, la superficies debe ser desinfectada con alcohol etílico al 70% y expuesta a luz ultravioleta por 15-30 minutos antes de iniciar el trabajo, de tal manera que el aire haya circulado y se filtre.

Es importante anotar que dentro del cuarto de cultivo se debe usar la vestimenta adecuada, y las prácticas de lavado de manos son indispensables. La desinfección de las manos con alcohol etílico al 70% se debe hacer antes de introducir en la cabina de flujo laminar, o en el caso de haber hecho contacto con un elemento no estéril. Todo material fungible estéril se debe mantener en su empaque original, y una vez abierto, este se debe sellar mediante cinta adhesiva. Los empaques solo se deben abrir y cerrar al interior de la cabina. Existen algunas sustancias usadas en cultivo (medio de cultivo, suero fetal bovino) que deben permanecer refrigeradas. Es esencial verificar a que temperatura debe conservarse cada uno de los reactivos.

Todo material plástico o de vidrio que entre en contacto con medio de cultivo, debe ser esterilizado.

Soluciones para cultivo celular

Medio de cultivo

La línea celular SHSY5Y es cultivada en el medio D-MEM F12 (GIBCO Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12). Existen varias formas comerciales de este medio de cultivo, en esta ocasión se adquirió el medio líquido, es cual fue suplementado con 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de

estreptomycin. A partir de este medio base se prepara el medio de crecimiento, agregando 10% v/v de suero fetal bovino, o medio de diferenciación, adicionando 2% v/v de suero fetal bovino y ácido retinoico a una concentración final de 5 μ M.

Tampón fosfato salino (PBS)

Esta solución se usa para el lavado de las monocapas celulares, la preparación de tripsina-EDTA y la solución de MTT. Cloruro de sodio (NaCl): 0,8 gr%/100ml; cloruro de potasio (KCl): 0,02 gr%/100ml; fosfato diácido de potasio (KH₂PO₄): 0,024 gr%/100ml; fosfato monobásico de sodio (NaH₂PO₄): 0,144 gr%/100ml. Se ajusta el pH a 7,4 y se esteriliza con calor húmedo en autoclave.

Solución de tripsina 0,25%

La tripsina en solución es usada para la cosecha de las células, ya sea para hacer sembrado de experimento, para la criopreservación, o para realizar un pasaje de células a una caja nueva.

Esta solución contiene 0,25% de tripsina y 0,1% EDTA disueltos en PBS. Se debe ajustar el pH a 7,4 y posteriormente se esteriliza por ultrafiltración. Esta solución debe ser conservada a -20°C.

Cubierta con Poli-D-Lisina (PLD)

Este procedimiento se hace bajo condiciones de esterilidad y en cabina de flujo laminar:

Se prepara la solución stock de PLD 0,1mg/ml, usando ddH₂O y se hacen alícuotas de 5 ml en tubos cónicos de 50 ml estériles y se almacenan a -20°C. Posteriormente a una de las alícuotas de 5ml de PLD stock se adiciona 45 ml de ddH₂O para obtener una concentración de 0,01mg/ml. Esta solución de trabajo es aplicada sobre los pozos o cajas, permitiendo un cubrimiento uniforme de la superficie y se debe dejar actuar por al menos 1 hora. Luego se retira el exceso y se realizan tres lavados con ddH₂O durante 5 minutos. La esterilidad es asegurada mediante irradiación directa con luz UV durante al menos 20 minutos sobre los pozos.

Criopreservación de células SHSY5Y

En cabina, una vez retirado el medio de cultivo de las células, estas son desprendidas mediante tripsina en solución, se envasan en un tubo cónico de 15 ml. En este punto se puede tomar 10 μ l de la solución para proceder al conteo celular y después se procede a centrifugar por 5 min a 1.200 rpm. Nuevamente en cabina, se descarta el medio, después, el *pellet* de células es disgregado en

SFB a una concentración final de 90% y en seguida se agrega DMSO a una concentración final de 10%. Finalmente, tan rápido como sea posible la suspensión es alicuotada en viales de criopreservación. Estos son colocados en una cámara de criopreservación con base en isopropanol y se llevan directamente a -70°C . Pasados tres días, los viales son transferidos a nitrógeno líquido. Una segunda alternativa es trasladar los viales inmediatamente a nitrógeno líquido. La cantidad de células recomendada a congelar es de 1×10^6 células por ml de medio de congelación.

Descongelación

En cabina, se prepara un tubo cónico de 15 ml con 5ml de medio de crecimiento a 37°C . Una vez el criovial es descongelado parcialmente a temperatura ambiente, es colocado en el tubo para ser centrifugado por 5 min a 1.200 rpm. Se retira el sobrenadante y el *pellet* celular es resuspendido en medio de crecimiento. Luego, la solución celular es trasladada a cajas de 25 cm^2 . Al día siguiente el medio se reemplaza por medio fresco.

Desprendimiento celular

Para desprender las células adheridas a la superficie de la caja de cultivo se usa la solución de tripsina al 0,25%. Cuando las cajas alcanzan un 70 a 90% de confluencia celular, se debe hacer uso de las células, ya sea para subcultivos, desarrollar un experimento o para congelarlas.

En cabina, se retira el medio de cultivo y se agrega 1 ml de la solución de tripsina para cajas de 25 cm^2 y 2 ml para cajas de 75 cm^2 . Luego las células son incubadas a 37°C por un tiempo no mayor de 5 minutos. Para acelerar el desprendimiento celular, la caja de cultivo puede ser golpeada manualmente en su base. Una vez desprendidas las células, la tripsina es inhibida, agregando medio de crecimiento. Se trasfiere la suspensión celular a un tubo cónico de 15 ml y se centrifuga a 1.200 rpm por 5 minutos.

Sembrado de células para experimentos en placas de 6 y 96 pozos

Los ensayos de MTT son llevados a cabo en placas de 96 pozos. Mientras que los tratamientos que son destinados a microscopía de fluorescencia y western blot son realizados en placas de 6 pozos.

La cantidad de células que se siembran por cada pozo debe ser la suficiente para alcanzar una confluencia del 70%. En este procedimiento, las células, después de ser desprendidas, son resuspendidas en medio de diferenciación.

La siguiente tabla muestra la cantidad de células SHSY5Y y el volumen de medio de diferenciación requerido por cada pozo:

Tabla No 1. Volumen requerido para el cultivo celular

	Volumen por pozo	Células por pozo
Caja de 96 Pozos	200 μ l	18.000
Caja de 6 pozos (WB)	2 ml	350.000
Caja de 6 pozos (fluorescencia)	2 ml	300.000

Conteo celular

El azul de tripán es una coloración que permite determinar la integridad de las membranas celulares. Las células con membrana íntegra no son permeables al colorante, por tanto ellas son translúcidas. Mientras que aquellas que tienen perforada la membrana, toman una coloración azul. Un hemocitómetro es usado para estimar la cantidad de células por unidad de volumen de medio.

Para esta tinción celular se requiere las células en suspensión. Es así que previamente se hace un desprendimiento celular. Una vez obtenida la suspensión celular, se mezclan 10 μ l de esta con 10 μ l de azul de tripán. 10 μ l de la mezcla son colocados en cada uno de los lados del hemocitómetro y se procede a contar bajo el microscopio.

Cuando el promedio de los cuadrantes ha sido obtenido se procede a realizar el cálculo. Dado que cada cuadrante de la cámara equivale a 1/10.000 ml, se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Células por ml} = \text{Promedio de las células} \times 20.000$$

ANEXO 2: Viabilidad celular

Ensayo MTT

El ensayo de MTT permite evaluar la viabilidad celular o la actividad mitocondrial mediante la transformación de un sustrato colorimétrico. Esta transformación es realizada por deshidrogenasas mitocondriales, en especial la succinato deshidrogenasa (Complejo II de la cadena respiratoria). La viabilidad celular o la actividad mitocondrial se puede medir aprovechando que la succinato deshidrogenasa genera la ruptura del anillo de tetrazolio del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5 difenil tetrazolio, (reactivo MTT), generando una sal de formazán, la cual absorbe la luz a una longitud de onda diferente con respecto al sustrato original. Esta sal es soluble en solventes orgánicos. La cantidad de absorbancia obtenida será directamente proporcional a la viabilidad celular o a la actividad mitocondrial. Dependiendo del solvente orgánico que se use, la longitud de onda de máxima absorbancia cambia. Para los ensayos de este trabajo se empleó el Buffer de lisis MTT (Ver anexo) y la longitud de onda requerida para medir la absorción fue 590 nm.

Para este ensayo se utilizaron placas de 96 pozos y un lector de placas para medir la absorbancia.

Cuando los tratamientos en las células han finalizado, se adiciona la solución de MTT (Ver Anexo). El volumen agregado es el 10% del volumen de medio inicial en el pozo, en este caso 20 μ l. Después, la placa es incubada a 37°C con 5% de CO₂ durante 1 a 2 horas para permitir que las células metabolicen el MTT hacia formazán. Posteriormente, el medio de cultivo es retirado cuidadosamente para evitar el desprendimiento de las células y 100 μ l de Buffer de Lisis son agregados a cada pozo, preferiblemente a temperatura mayor de 37°C para facilitar la solubilización del formazán. Una vez solubilizados los cristales, la absorción es cuantificada en un lector de placas a 590 nm.

Para calcular la viabilidad o la actividad mitocondrial de cada uno de los tratamientos se debe comparar el promedio de estas mediciones con el promedio de la absorbancia de los controles, cuya absorbancia es normalizada a 100%.

Solución MTT

La sal de tetrazolio se debe disolver en PBS estéril para alcanzar una concentración de 5mg/ml. Antes de usar, la solución se debe esterilizar mediante ultrafiltración en cabina. Esta solución se debe conservar a 4°C si es empleada en el transcurso de una semana. Para periodos prolongados de almacenamiento la solución es conservada a -20°C. También debe ser protegida de la luz, ya que esta facilita su oxidación espontánea.

Buffer de lisis MTT

200 ml de dimetilformamida con 150 ml de ddH₂O son mezclados. El pH es ajustado a 4,7 con ácido acético glacial. Después, 40 g de SDS son agregados y se lleva a un volumen final de 400 ml con ddH₂O. La solución es almacenada a 4°C y para su uso, se descongela en baño serológico.

Ensayo LDH

La enzima lactato deshidrogenasa se localiza en el citoplasma celular y no es liberada al exterior, salvo en casos de ruptura de membrana y muerte celular. La cantidad relativa de esta enzima libre en el medio es cuantificada usando kits comerciales con base en un pseudosustrato y en un reactivo cromógeno. En este caso se utilizó CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega® Cat. No. G1781). Este procedimiento permite evaluar la integridad de las células en cultivo, que se relaciona inversamente con la muerte celular. Dicho kit se usó según lo especificado en las instrucciones emitidas por el fabricante, las cuales se resumen a continuación.

1. Trasferir 50 ul de medio de cada uno de los tratamientos, controles del experimento y controles positivos (incluidos en el kit o se realiza muerte celular mecánica) para LDH a una caja nueva de 96 pozos.
2. Reconstruir la mezcla de sustrato (Substrate mix) con el buffer (Assay buffer), 12 ml de buffer por frasco de mezcla de sustrato. Después de reconstituido el sustrato se almacena a -20°C protegido de la luz.
3. Adicionar 50 ul del sustrato reconstituido a cada pozo (tratamientos y controles), proteger la caja de la luz e incubar a temperatura ambiente por exactamente 30 min.
4. Transcurridos los 30 min, adicionar 50 ul a cada pozo de la solución de parada (Stop solution).
5. Leer la placa a 490 nm. El análisis de los datos se hace normalizando al 100 % el control de muerte celular (control positivo para LDH).

Ensayo JC-1

El potencial de membrana mitocondrial como un indicador del metabolismo de la mitocondria se evaluó usando JC-1 (5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetil bencimidazolilo carbocianina yoduro) (Invitrogen, USA). Este catión es permeable a las células y dada su carga positiva, este se agregará en la matriz mitocondrial cuando el potencial de membrana mitocondrial se encuentre elevado (-180mV). Dichos agregados generan un espectro de luz roja. Mientras que cuando el potencial de membrana mitocondrial disminuye, JC-1 se distribuirá en el citosol en forma de monómeros, en cuya configuración emitirá una coloración verde en el espectro de luz.

Para este ensayo las células se siembran en platos de 96 pozos en medio de diferenciación por 2 días. Cuando los tiempos de tratamiento de las células han finalizado se adiciona el JC1 (2,5 µg/ml) y se incuba por 15 minutos a 37°C y 5% de CO₂. JC-1 debe prepararse en medio DMEM F12 y mezclarse con ayuda del vortex. Una vez cumplido el tiempo de incubación se retira el medio y se lava 3 veces por 5 minutos con PBS1X o medio DMEN-12 que debe estar a una temperatura de 37°C, además durante estos lavados las células deben mantenerse en la incubadora con las condiciones que se mencionó previamente. Finalmente la fluorescencia de la placa es cuantificada mediante un fluorómetro con una excitación de 560 nm y una emisión de 595 nm para detectar los agregados de JC-1 (rojo) que indican las mitocondrias con un potencial de membrana estable, mientras que las células con mitocondrias despolarizadas o monómeros de JC-1 (verde) se detectan con un filtro de excitación de 485 nm y uno de emisión de 535 nm. Como control positivo para despolarizar las mitocondrias se usó el desacoplador CCCP 1 µM durante 1 minuto. El análisis correspondiente al potencial de membrana mitocondrial se realizó mediante la relación de la señal de los agregados sobre los monómeros de JC-1 (rojo /verde).

ANEXO 3: Western Blot

El Western Blot es una técnica usada para determinar la cantidad de una proteína específica. Su principio se basa en la reacción específica entre antígeno-anticuerpo, la cual es aprovechada para visualizar proteínas en una membrana de nitrocelulosa, utilizando anticuerpos conjugados con peroxidasa de rábano y una solución quimioluminiscente. La luz producida se usa para exponer una película fotosensible. Tras el revelado de dicha película, queda impresa en ella la banda correspondiente a la proteína detectada por el anticuerpo específico. Ésta técnica es semicuantitativa, permitiendo calcular la cantidad relativa de proteína en comparación con un control experimental. La densidad óptica de la banda resultante en la placa fotosensible es determinada usando el software ImageJ (versión 1.44 fue empleada en este trabajo).

Soluciones usadas en Western Blot

Buffer de lisis celular

En este estudio se utilizó el buffer de lisis RIPA (Pierce® Cat. No. 89900), el cual contiene 25mM Tris-HCl, pH 7.6, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% Deoxicolato de sodio y 0,1% SDS.

Coctel de inhibición enzimático

Es usado para impedir la digestión enzimática de las proteínas celulares y las modificaciones covalentes una vez ocurrida la lisis. Por tanto, se requiere usar inhibidores de proteasas y fosfatasa para mantener las proteínas intactas para su estudio. En este caso se adquirieron dos reactivos comerciales: PhosphoStop (Roche® Cat. No. 04906845001) y cOmplete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche® Cat. No. 04693159001) que inhiben las fosfatasa y proteasas respectivamente.

- Phosphostop: se disuelve una tableta en 1 ml de ddH₂O mediante vortex. Esta solución tendrá una concentración de 10X y se conserva a -20°C.
- cOmplete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail: se disuelve una tableta en 1,5 ml de ddH₂O mediante vortex. Esta solución tendrá una concentración de 7X y se conserva a -20°C

Los inhibidores de fosfatasa y proteasas son llevados a una concentración de 1X con Buffer RIPA al momento de realizar la lisis celular.

Buffer de carga

Regulación de la Apolipoproteína E sobre la vía PI3K/AKT en un contexto excitotóxico: efecto sobre el metabolismo y la autofagia neuronal

El buffer de carga se utiliza con dos objetivos, el primero es desnaturalizar las proteínas para facilitar su migración a través de los geles de poliacrilamida y el segundo es otorgar una clave visual de la migración electroforética usando colorante como el azul de Bromofenol, el cual migra en el mismo sentido de las proteínas. En este trabajo se usó el Laemmli Sample Buffer (BioRad ® Cat. No. 161-0737), el cual requiere 50 ul de 2-Mercaptoetanol por cada 950 ul de Buffer.

Las proteínas, previa cuantificación (Ver anexo) y normalización, se mezclan con el Buffer Laemmli completo en tubos de 2,2 ml hasta completar 20 ul. La mezcla se calienta a 95°C por 5 min y posteriormente se enfría en hielo antes de ser sembrada en gel de poliacrilamida.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las proteínas desnaturalizadas son separadas de acuerdo a su peso molecular. Para esto se recurre a la electroforesis en geles de poliacrilamida, donde las proteínas son sometidas a una corriente eléctrica constante que permite separar las proteínas por peso en una matriz de poliacrilamida.

Gel de separación

Para preparar 2 geles se adiciona en el siguiente orden los volúmenes especificados a continuación:

Gel de separación	10%	12%	15%
Mezcal 30% acrilamida: bisacrilamida	3,3 ml	4ml	4,95 ml
1,5 M TRIS-HCL/0,4 % SDS pH 8,8 (*)	2,5 ml	2,5 ml	2,5ml
Solución SDS al 10% p/v (***)	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
ddH ₂ O	4 ml	3,3 ml	2,35 ml
Solución de APS (Persulfato de amonio) al 10% p/v (***)	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	8 ul	8 ul	8 ul

El APS y el TEMED son los últimos componentes en ser agregados, puesto que son los responsables de la reacción de polimerización. Se mezcla con suavidad, se sirven 3 ml entre los vidrios de soporte e inmediatamente se adiciona 200 ul de isopropanol para evitar la oxigenación de la acrilamida.

(*) Para 250 ml de la solución 1,5M TRIS-HCL/0,4 % SDS pH 8,8: se pesa 45,42 g de TRIS base, 1 g de SDS y se disuelven en 200 ml de ddH₂O, se ajusta a pH 8,8 con HCL concentrado y se completa con ddH₂O hasta 250 ml. Se conserva a 4°C hasta el momento de su uso.

(**) Para 50 ml de SDS al 10% p/v se pesan 5 g de SDS y se diluyen en ddH₂O hasta completar 50 ml de disolución.

(***) Para 500 ul de solución de APS al 10% p/v se pesan 50 mg de APS y se adicionan 500 ul de ddH₂O. Se conserva protegido de la luz a -20°C hasta el momento de su uso.

Gel de concentración

Para preparar 2 geles se adicionan en el siguiente orden los volúmenes especificados a continuación:

Gel de concentración	Volumen
Mezcal 30% acrilamida: bisacrilamida	830 ul
0,5 M TRIS-HCL/0,4% SDS pH 6,8 (*)	630 ul
Solución SDS al 10% p/v	50 ul
ddH ₂ O	3,4 ml
Solución de APS (persulfato de amonio) al 10% % p/v	50 ul
TEMED	10 ul

(*) Para 100 ml de la solución 0,5 M TRIS-HCL/0,4% SDS pH 6,8: Se pesan 6,05 g de TRIS base, 0,4 g de SDS, se disuelven en 70 ml de ddH₂O, se ajusta a pH 6,8 con HCL concentrado y se completa con ddH₂O hasta 100 ml y se mantiene a 4°C hasta el momento de su uso.

Buffer de corrido 10X

Para preparar 1 L se pesan y disuelven en 800 ml de ddH₂O siguientes compuestos:

TRIS base	22,7 g (188 mM)
Glicina	141,13 g (188 mM)
SDS	10 g (0,1% p/v)

Después se lleva a 1000 ml como volumen final con ddH₂O en un balón aforado y se conserva refrigerado a 4°C.

Buffer de corrido 1X

Al momento de su uso, la solución 10X se diluye hasta llegar a una concentración de 1X. La cámara Mini Protean II requiere aproximadamente 500 ml de buffer de corrido 1X. Entonces, 50 ml del buffer de corrido 10X se completan con ddH₂O hasta 500ml.

Buffer de transferencia 10X

Para preparar 1 L se pesan y disuelven en 800 ml de ddH₂O los siguientes compuestos:

Regulación de la Apolipoproteína E sobre la vía PI3K/AKT en un contexto excitotóxico: efecto sobre el metabolismo y la autofagia neuronal

Tris Base	30,4 g (250 mM)
Glicina	140,4 g (1,87 M)

Luego se lleva a volumen final de 1000 ml con ddH₂O en un balón aforado y se conserva refrigerado a 4°C.

Buffer de transferencia 1X

Para preparar 1 L se requiere una probeta de 1000 ml, en la cual se agregan 80 ml de buffer de transferencia 10X, 720 ml de ddH₂O y 200 ml de metanol.

Buffer de lavado: TRIS Buffer Salino (TBS) 10X

Para preparar 1 L de este buffer se pesan y disuelven en 800 ml de ddH₂O los siguientes compuestos:

TRIS base	24,228 g (200 mM)
NaCl	80,066 g (1,37 M)

Posteriormente se lleva a volumen final de 1000 ml en un balón aforado, se ajusta el pH a 7,6 con HCL concentrado y se conserva refrigerado a 4°C.

Buffer de lavado: TRIS Buffer Salino-Tween (TBS-T) 1X

Para preparar 1 L se toman 100 ml de TBS 10X, se adiciona 1 ml de Tween-20 (para una concentración final de 0,1% v/v) y se completa a un volumen de 1000 ml con ddH₂O en un balón aforado o en una probeta.

Buffer de bloqueo

Al momento del uso se preparan 250 ml de esta solución, para lo cual se pesan 12,5 g de leche descremada (para una concentración final de 5% p/v) y se disuelven en 200 ml de TBS-T 1X, se agita hasta que los compuestos estén mezclados y se completa con TBS-T 1X hasta 250 ml.

Anticuerpo primario

Los anticuerpos primarios son los encargados de reconocer la proteína en estudio. En este trabajo se usaron anticuerpos comerciales. Las membranas de PVDF cargadas con las proteínas totales fueron expuestas a los anticuerpos diluidos en buffer de bloqueo durante toda la noche a 4°C o durante 2 horas durante temperatura ambiente. A continuación se resumen las diluciones realizadas con cada anticuerpo en un total de 3 ml de buffer de bloqueo.

Anticuerpo	Dilución
Anti-Akt total (monoclonal, conejo)	1:1000
Anti-Akt-p Ser472 (monoclonal, conejo)	1:1000
Anti-PTEN-p Ser380 (monoclonal conejo)	1:1000
Anti-Erk total (monoclonal conejo)	1:1000
Anti-Erk-p (monoclonal conejo)	1:1000
Anti- β -actina (monoclonal, conjugado con HRP)	1:5000

Anticuerpo secundario

El anticuerpo secundario reconoce la fracción Fc de los anticuerpos primarios que ya se encuentran unidos al epítotope en estudio. Este anticuerpo también es diluido en buffer de bloqueo y generalmente se incubaba a temperatura ambiente durante 1 hora, aunque la incubación durante toda la noche a 4°C también genera buenos resultados.

Anticuerpo	Dilución
Anti-rabbit IgG HRP-linked	1:2000

Extracción de proteína

En este proceso se emplean tres compuestos mencionados previamente: Buffer RIPA, inhibidores de proteasas e inhibidores de fosfatasa (coctel de inhibición enzimática).

Para obtener una cantidad considerable de proteína las células son sembradas en placas de 6 pozos. Cuando los tratamientos han finalizado se retira el medio de cultivo y se agregan 80 μ l del coctel de inhibición enzimática por cada pozo. Se utiliza una base de hielo para la placa y se procede a lisar las células frotando con una punta de 1 ml o con la ayuda de un "cell scraper". Posteriormente, la solución producto del lisado es transferida a un tubo de centrifuga de 1,5 ml. Luego, las muestras son sometidas a ultrasonido usando un procesador ultrasónico. Cada pulso de ultrasonido se realiza 3 veces durante 5 segundos con la muestra sobre hielo.

Las muestras son conservadas a -20°C, si se usan durante una semana. Para tiempos más prolongados se almacenan a -70°C.

Determinación de la concentración de proteína

Para asegurar la normalización de los valores en el western blot se requiere la cuantificación de la proteína total de cada muestra de los lisados celulares. En este estudio se realizó por el método del ácido bicinonínico (BCA), método sensible y con pocas interferencias. El BCA es un compuesto capaz de formar un

Regulación de la Apolipoproteína E sobre la vía PI3K/AKT en un contexto excitotóxico: efecto sobre el metabolismo y la autofagia neuronal

complejo de color púrpura que resulta de la quelación de dos moléculas de BCA con un ion cuproso. Los iones cuprosos provienen de la reducción de iones cúpricos por las proteínas en un medio con pH alcalino. La intensidad del color púrpura es proporcional a la cantidad de proteína total en la muestra, de tal manera que se puede cuantificar en un espectrofotómetro y compararse con muestras patrón para posteriormente extrapolar los valores de absorbancia mediante una regresión lineal. Para este ensayo se empleó la relación reactivo: muestra (20:1). El kit BCA de PIERCE (Cat. No 23227) contiene dos soluciones: A (BCA) y B (cobre) que deben ser mezcladas en una relación 50(A):1(B). Se realizó una curva de calibración con albúmina sérica bovina (BSA). Dado que la albúmina se encontraba una concentración de 1ug/ul, se tomaron 5 pesos diferentes de albúmina (5-10-15-25ul). Las diferentes cantidades de albúmina y 5 ul de cada muestra son depositadas en pozos de una placa de 96 pozos. Los datos de la curva se realizaron por triplicado, mientras que la muestra por duplicado. Una vez realizada la mezcla del reactivo de BCA 100 ul son agregados a cada muestra y a las cantidades de albúmina. Luego, la placa protegida de la luz es incubada a 37°C durante una hora. Después se realiza la medición de la absorbancia a 562 nm. Los valores de las muestras son calculados a partir de la regresión lineal obtenida de los datos de absorbancia de la albúmina

ANEXO 4: Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia es una técnica usada para determinar la presencia o ausencia de epítopes, principalmente proteicos, mediante la unión específica de anticuerpos a un blanco problema. En la gran mayoría de los casos se realiza inmunofluorescencia haciendo uso de dos anticuerpos: un anticuerpo primario cuya fracción Fab reconoce al epítope en cuestión y la fracción Fc sirve de epítope para un anticuerpo secundario en cuya fracción Fc se encuentra unida de manera covalente una molécula fluorescente.

Esta técnica permite evaluar con alta precisión el lugar específico de expresión de una proteína, e incluso, haciendo uso de anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos distintos, es posible identificar varios epítopes de manera simultánea.

Para visualizar las imágenes de fluorescencia se empleó un microscopio confocal Nikon C1 Plus ECLIPSE Ti.

Para fluorescencia se sembraron 250000 células por pozo en una placa de seis pozos o en cajas de Petri que contienen una laminilla o cubre objeto, el cual es tratado con poly-D-lisina para mejorar la adherencia de las células SHSY5Y (ver protocolo). Las células son sembradas en medio de diferenciación y se incuban a 37°C con 5% de CO₂ durante dos días.

Dos protocolos de fluorescencia fueron utilizados. Uno de ellos es específico para la proteína LC3, siguiendo las recomendaciones de Tanida y colaboradores (162) y el otro sigue el protocolo general de la inmunofluorescencia.

Inmunofluorescencia para LC3

Para el estudio de la proteína LC3, la cual permite identificar los autofagolisosomas, las células fueron incubadas con 2 inhibidores de hidrolasas lisosomales (Pestatin A y E64d 10µg/ml) 4 horas antes de finalizar los tratamientos. El objetivo de los inhibidores es evitar la degradación de LC3 por las hidrolasas lisosomales y por tanto mejorar la visualización de las vesículas en mención.

Cuando el tratamiento es finalizado, el medio de cultivo es retirado por aspiración y las células son lavadas con TBS 1X. Luego el TBS es retirado e inmediatamente las células son fijadas con paraformaldehído al 4% (ver protocolo) durante 5

Regulación de la Apolipoproteína E sobre la vía PI3K/AKT en un contexto excitotóxico: efecto sobre el metabolismo y la autofagia neuronal

minutos a 37°C. Después el paraformaldehído es retirado y se lava con TBS 1X tres veces durante 5 minutos cada vez y el TBS es retirado.

Una vez fijadas las células, estas deben ser permeabilizadas si el epítipo a estudiar se encuentra intracelularmente, como fue en este trabajo. Dado que los autofagosomas y autofagolisosomas son sensibles a algunos detergentes, para la permeabilización se utiliza una solución de 50 ug/ml de digitonina en PBS 1X durante 5 minutos a 37°C. Después el exceso de la permeabilización de digitonina es detenida con NH₄CL en PBS (50mM) por 5 minutos a 37°C. Luego, se lava con TBS 1X dos veces durante 3 minutos cada vez y el TBS es retirado.

Los epítipes inespecíficos deben ser bloqueados, y para esto se utiliza la solución de bloqueo, la cual contiene 2% de BSA p/v, 5% de suero fetal bovino v/v, 20 mM Tris-HCL pH 7,5 y 150 mM NaCl. Se incuba durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se retira la solución de bloqueo y se procede a lavar con TBS 1X tres veces durante 3 minutos cada vez y el TBS es retirado.

El paso siguiente es incubar la laminilla con el o los anticuerpos primarios. Estos son diluidos en la solución de bloqueo. Se requieren 50 µl de anticuerpo diluido por cada tratamiento, los cuales se depositan en los cubre objetos y encima de estos, se colocan láminas de acetato plástico, cuyo objeto es distribuir homogéneamente el anticuerpo. La incubación se realiza toda la noche en un ambiente húmedo para evitar la evaporación de la solución.

Pasada la incubación con el anticuerpo primario, se retiran las láminas de acetato y se procede a hacer 3 lavados con TBS 1x de 10 minutos cada uno, en agitación.

Para la incubación con el anticuerpo secundario, el cual está conjugado con una molécula fluorescente, se depositan 70 µl del anticuerpo diluido en cada cubre objeto. Posteriormente se procede a incubar durante una hora en un ambiente húmedo. Finalizada la incubación se realizan 5 lavados con TBS 1X de 10 minutos cada uno. En caso de realizar tinción del núcleo, se incuba con DAPI o Hoechst. En este trabajo se utilizó el segundo reactivo a una concentración de 1ug/ml en PBS 1X durante un minuto y se procede a hacer los lavados con PBS 1X de 5 minutos cada uno.

Se preparan los portaobjetos con 12 µl de medio de montaje Vectashield® (Vector Labs) cada uno y se colocan los cubre objetos sobre la gota de medio de montaje con la cara cultivada hacia abajo. Se sellan los bordes con esmalte transparente y se deja secar en oscuridad.

Inmunofluorescencia general

Cuando el tratamiento es finalizado, el medio de cultivo es retirado por aspiración y las células son lavadas con PBS 1X. Luego el PBS es retirado e inmediatamente las células son fijadas con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos. Después, el paraformaldehído es retirado y se lava con PBS 1X tres veces durante 5 minutos cada vez y el PBS es retirado.

Para la permeabilización se utiliza una solución de 0,1% v/v de Tritón X100 en PBS 1X durante 4 minutos. Después se lava con PBS 1X tres veces durante 5 minutos cada vez y el PBS es retirado.

El bloqueo se realiza con de BSA 1% p/v, 0,05% v/v de Tritón X100 en PBS 1X. Se incuba durante 30 minutos. Posteriormente se retira la solución de bloqueo y se procede a incubar el anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo durante toda la noche. Después, se lava con el buffer de bloqueo 3 veces por 10 minutos cada vez. Luego, se incuba el anticuerpo secundario y se lava con el buffer de bloqueo 6 veces durante 10 minutos cada vez. Por último se realiza la tinción del núcleo y el montaje de los cubre objetos como se mencionó antes.

A continuación se mencionan los anticuerpos utilizados y sus diluciones

Anticuerpo primario	Dilución
Anti-LC3 (policlonal, cabra)	1:50
Anti-MAP-II (policlonal, pollo)	1:1000
Anti-TOM20 (monoclonal, ratón)	1:50
Anti-ApoE (monoclonal, conejo)	1:100

Anticuerpo secundario	Dilución
Anti-goat Alexa Fluor 568	1:1000
Anti-chicken Alexa Fuor 488	1:1000
Anti-mouse Alexa Fluor 568	1:100
Anti-rabbit Alexa Fluor 488	1:1000

Soluciones usadas en inmunofluorescencia

Paraformaldehído (PFA) 4%

El paraformaldehído genera irritación en la vía aérea y al contacto con la piel, también se le han atribuido propiedades carcinogénicas. Es así que su preparación se realiza con las precauciones necesarias.

Regulación de la Apolipoproteína E sobre la vía PI3K/AKT en un contexto excitotóxico: efecto sobre el metabolismo y la autofagia neuronal

Usando guantes y tapabocas se pesan 4 g de paraformaldehído y se disuelven en 50 ml de PBS 1X. Dentro de una cabina de extracción de gases se coloca una plancha caliente con agitación magnética. El paraformaldehído no es fácilmente soluble a pH ácido o a temperatura ambiente, por lo cual la solución se debe calentar sin permitir la ebullición de la misma. Poco a poco se agrega una solución de NaOH 10N para aumentar el pH y permitir la solubilización del paraformaldehído. Una vez disuelto por completo, se debe permitir el enfriamiento de la solución, llevar a pH 7,4 y completar a 100 ml con PBS 1X.

Otra alternativa es calentar a 70°C 50 ml de PBS 1X en horno microondas y adicionar 4 g de paraformaldehído. Disuelto el paraformaldehído se completa a 100 ml con PBS 1X.

La solución es almacenada -20°C hasta por un mes y a 4°C hasta por 1 semana.

Phosphate-buffered saline (PBS)

Para un litro de PBS 1X se pesan 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na₂HPO₄ y 0,24 g de KH₂PO₄. Se mezclan los reactivos en 800 ml de ddH₂O y se completa hasta 1000 ml.

ANEXO 5: Tratamiento de cubre objetos

La línea celular SHSY5Y posee pobre adherencia a las superficies de vidrio. Así que para hacer el análisis de fluorescencia es necesario que los cubre objetos tengan una cubierta que permita la adherencia celular. Para dicho objetivo, los cubre objetos se tratan de la siguiente manera:

En primera instancia, las laminillas son incubadas con ácido clorhídrico 10N en una caja de Petri de vidrio durante una hora, con el fin de eliminar cualquier componente que interfiera con el tratamiento de adherencia.

Una vez retirado el ácido, los cubre objetos son lavados con ddH₂O 3 veces por 10 minutos. Posteriormente se procede a trasladar las laminillas a placas de 6 pozos. Después, se cubre las laminillas con 800 ul de Poli-D-Lisina a una concentración de 0,01 mg/ml por una hora. Luego, Poli-D-Lisina es retirada y los cubre son expuestos a rayos UV durante 30 minutos.

ANEXO 6: Conteo de vesículas autofágicas

Los autofagosomas fueron visualizados marcando la proteína LC3 con la técnica de fluorescencia y las imágenes fueron tomadas con microscopía de fluorescencia. Posteriormente, las partículas observadas se cuantificaron utilizando el software ImageJ en su versión 1.44. A continuación se describen los pasos que se hicieron en este proceso con el software ImageJ:

Primero se determina el tamaño de las partículas, para lo cual se hace uso del zoom para identificar una partícula de menor y otra de máximo tamaño. Se calcula el área de estas partículas en pixeles cuadrados. De esta manera se tiene un rango de tamaño de partículas a cuantificar.

Después, haciendo uso de la herramienta buscar bordes (“find edges”) ubicada en la pestaña de proceso (“process”) los bordes de las partículas son definidos, adicionalmente se eliminan partículas gigantes de suciedad. Para continuar con el proceso se requiere cambiar a 8 bits la imagen. Esta opción se encuentra en tipo (“type”) de la pestaña imagen (“image”).

Posteriormente, en la opción ajustar (Adjust) de la herramienta imagen (“Image”), se configura el umbral de intensidad de fluorescencia, nominado como umbral (“Threshold”) en el software. Este debe abarcar el área de la curva de intensidad de fluorescencia.

Ajustado el umbral, se procede a contar las partículas haciendo uso de la herramienta análisis de partículas (“Analyse Particles”) de la pestaña análisis (“Analyse”). Finalmente, en el cuadro de dialogo se digita el rango del tamaño de las partículas y el software contabiliza las partículas de la imagen en estudio.

Bibliografía

1. Barnes DE, Yaffe K. The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *Lancet neurology*. 2011;10(9):819-28. Epub 2011/07/22.
2. Arboleda GH, Yunis JJ, Pardo R, Gomez CM, Hedmont D, Arango G, et al. Apolipoprotein E genotyping in a sample of Colombian patients with Alzheimer's disease. *Neuroscience letters*. 2001;305(2):135-8. Epub 2001/05/30.
3. Fleminger S, Oliver DL, Lovestone S, Rabe-Hesketh S, Giora A. Head injury as a risk factor for Alzheimer's disease: the evidence 10 years on; a partial replication. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2003;74(7):857-62. Epub 2003/06/18.
4. Heyman A, Wilkinson WE, Stafford JA, Helms MJ, Sigmon AH, Weinberg T. Alzheimer's disease: a study of epidemiological aspects. *Annals of neurology*. 1984;15(4):335-41. Epub 1984/04/01.
5. Percy M, Somerville MJ, Hicks M, Garcia A, Colelli T, Wright E, et al. Risk factors for development of dementia in a unique six-year cohort study. I. An exploratory, pilot study of involvement of the E4 allele of apolipoprotein E, mutations of the hemochromatosis-HFE gene, type 2 diabetes, and stroke. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2014;38(4):907-22. Epub 2013/10/02.
6. Bu G. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nature reviews Neuroscience*. 2009;10(5):333-44. Epub 2009/04/03.
7. Zhong N, Weisgraber KH. Understanding the association of apolipoprotein E4 with Alzheimer disease: clues from its structure. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(10):6027-31. Epub 2008/10/25.
8. Laffont I, Takahashi M, Shibukawa Y, Honke K, Shuvaev VV, Siest G, et al. Apolipoprotein E activates Akt pathway in neuro-2a in an isoform-specific manner. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002;292(1):83-7. Epub 2002/03/14.
9. Holtzman DM, Herz J, Bu G. Apolipoprotein e and apolipoprotein e receptors: normal biology and roles in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2012;2(3):a006312. Epub 2012/03/07.
10. Stoll G, Meuller HW, Trapp BD, Griffin JW. Oligodendrocytes but not astrocytes express apolipoprotein E after injury of rat optic nerve. *Glia*. 1989;2(3):170-6. Epub 1989/01/01.
11. Xu Q, Bernardo A, Walker D, Kanegawa T, Mahley RW, Huang Y. Profile and regulation of apolipoprotein E (ApoE) expression in the CNS in mice with targeting of green fluorescent protein gene to the ApoE locus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006;26(19):4985-94. Epub 2006/05/12.
12. Castellano JM, Kim J, Stewart FR, Jiang H, DeMattos RB, Patterson BW, et al. Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid-beta peptide clearance. *Science translational medicine*. 2011;3(89):89ra57. Epub 2011/07/01.
13. Herz J, Beffert U. Apolipoprotein E receptors: linking brain development and Alzheimer's disease. *Nature reviews Neuroscience*. 2000;1(1):51-8. Epub 2001/03/17.
14. Herz J. Deconstructing the LDL receptor--a rhapsody in pieces. *Nature structural biology*. 2001;8(6):476-8. Epub 2001/05/25.

15. Daly NL, Djordjevic JT, Kroon PA, Smith R. Three-dimensional structure of the second cysteine-rich repeat from the human low-density lipoprotein receptor. *Biochemistry*. 1995;34(44):14474-81. Epub 1995/11/07.
16. Blacklow SC, Kim PS. Protein folding and calcium binding defects arising from familial hypercholesterolemia mutations of the LDL receptor. *Nature structural biology*. 1996;3(9):758-62. Epub 1996/09/01.
17. Beffert U, Morfini G, Bock HH, Reyna H, Brady ST, Herz J. Reelin-mediated signaling locally regulates protein kinase B/Akt and glycogen synthase kinase 3beta. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(51):49958-64. Epub 2002/10/12.
18. Gotthardt M, Trommsdorff M, Nevitt MF, Shelton J, Richardson JA, Stockinger W, et al. Interactions of the low density lipoprotein receptor gene family with cytosolic adaptor and scaffold proteins suggest diverse biological functions in cellular communication and signal transduction. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(33):25616-24. Epub 2000/05/29.
19. Chen Y, Durakoglugil MS, Xian X, Herz J. ApoE4 reduces glutamate receptor function and synaptic plasticity by selectively impairing ApoE receptor recycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(26):12011-6. Epub 2010/06/16.
20. Correia SC, Santos RX, Perry G, Zhu X, Moreira PI, Smith MA. Mitochondrial importance in Alzheimer's, Huntington's and Parkinson's diseases. *Advances in experimental medicine and biology*. 2012;724:205-21. Epub 2012/03/14.
21. Chen HK, Ji ZS, Dodson SE, Miranda RD, Rosenblum CI, Reynolds IJ, et al. Apolipoprotein E4 domain interaction mediates detrimental effects on mitochondria and is a potential therapeutic target for Alzheimer disease. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(7):5215-21. Epub 2010/12/02.
22. Brecht WJ, Harris FM, Chang S, Tesseur I, Yu GQ, Xu Q, et al. Neuron-specific apolipoprotein e4 proteolysis is associated with increased tau phosphorylation in brains of transgenic mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24(10):2527-34. Epub 2004/03/12.
23. Harris FM, Brecht WJ, Xu Q, Tesseur I, Kekonius L, Wyss-Coray T, et al. Carboxyl-terminal-truncated apolipoprotein E4 causes Alzheimer's disease-like neurodegeneration and behavioral deficits in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(19):10966-71. Epub 2003/08/27.
24. Nakamura T, Watanabe A, Fujino T, Hosono T, Michikawa M. Apolipoprotein E4 (1-272) fragment is associated with mitochondrial proteins and affects mitochondrial function in neuronal cells. *Molecular neurodegeneration*. 2009;4:35. Epub 2009/08/22.
25. James R, Searcy JL, Le Bihan T, Martin SF, Gliddon CM, Povey J, et al. Proteomic analysis of mitochondria in APOE transgenic mice and in response to an ischemic challenge. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2012;32(1):164-76. Epub 2011/09/01.
26. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes & development*. 1999;13(22):2905-27. Epub 1999/12/02.
27. Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annual review of neuroscience*. 2001;24:677-736. Epub 2001/08/25.
28. Zhou H, Summers SA, Birnbaum MJ, Pittman RN. Inhibition of Akt kinase by cell-permeable ceramide and its implications for ceramide-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(26):16568-75. Epub 1998/06/20.

-
29. Kandel ES, Hay N. The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Experimental cell research*. 1999;253(1):210-29. Epub 1999/12/02.
 30. Kaplan DR, Cooper E. PI-3 kinase and IP3: partners in NT3-induced synaptic transmission. *Nature neuroscience*. 2001;4(1):5-7. Epub 2001/01/03.
 31. Bibel M, Barde YA. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes & development*. 2000;14(23):2919-37. Epub 2000/12/15.
 32. Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nature reviews Neuroscience*. 2003;4(4):299-309. Epub 2003/04/03.
 33. Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annual review of biochemistry*. 2003;72:609-42. Epub 2003/04/05.
 34. Kaplan DR, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Current opinion in neurobiology*. 2000;10(3):381-91. Epub 2000/06/14.
 35. Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera M, Bilanges B. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2010;11(5):329-41. Epub 2010/04/10.
 36. Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, et al. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science*. 1997;275(5300):661-5. Epub 1997/01/31.
 37. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*. 1997;88(4):435-7. Epub 1997/02/21.
 38. Kennedy SG, Wagner AJ, Conzen SD, Jordan J, Bellacosa A, Tsichlis PN, et al. The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes & development*. 1997;11(6):701-13. Epub 1997/03/15.
 39. Su CH, Wang CY, Lan KH, Li CP, Chao Y, Lin HC, et al. Akt phosphorylation at Thr308 and Ser473 is required for CHIP-mediated ubiquitination of the kinase. *Cellular signalling*. 2011;23(11):1824-30. Epub 2011/07/20.
 40. Marte BM, Downward J. PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends in biochemical sciences*. 1997;22(9):355-8. Epub 1997/09/25.
 41. Tanti JF, Grillo S, Gremeaux T, Coffe PJ, Van Obberghen E, Le Marchand-Brustel Y. Potential role of protein kinase B in glucose transporter 4 translocation in adipocytes. *Endocrinology*. 1997;138(5):2005-10. Epub 1997/05/01.
 42. Brunet A, Datta SR, Greenberg ME. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Current opinion in neurobiology*. 2001;11(3):297-305. Epub 2001/06/12.
 43. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 1997;91(2):231-41. Epub 1997/11/05.
 44. Gao N, Zhang Z, Jiang BH, Shi X. Role of PI3K/AKT/mTOR signaling in the cell cycle progression of human prostate cancer. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;310(4):1124-32. Epub 2003/10/16.
 45. Kennedy SG, Kandel ES, Cross TK, Hay N. Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria. *Molecular and cellular biology*. 1999;19(8):5800-10. Epub 1999/07/20.

46. Zheng WH, Kar S, Quirion R. Insulin-like growth factor-1-induced phosphorylation of transcription factor FKHRL1 is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt kinase and role of this pathway in insulin-like growth factor-1-induced survival of cultured hippocampal neurons. *Molecular pharmacology*. 2002;62(2):225-33. Epub 2002/07/20.
47. Rokudai S, Fujita N, Hashimoto Y, Tsuruo T. Cleavage and inactivation of antiapoptotic Akt/PKB by caspases during apoptosis. *Journal of cellular physiology*. 2000;182(2):290-6. Epub 2000/01/07.
48. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 1995;378(6559):785-9. Epub 1995/12/21.
49. Hajduch E, Alessi DR, Hemmings BA, Hundal HS. Constitutive activation of protein kinase B alpha by membrane targeting promotes glucose and system A amino acid transport, protein synthesis, and inactivation of glycogen synthase kinase 3 in L6 muscle cells. *Diabetes*. 1998;47(7):1006-13. Epub 1998/07/02.
50. Plas DR, Talapatra S, Edinger AL, Rathmell JC, Thompson CB. Akt and Bcl-xL promote growth factor-independent survival through distinct effects on mitochondrial physiology. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(15):12041-8. Epub 2001/03/30.
51. Vander Heiden MG, Plas DR, Rathmell JC, Fox CJ, Harris MH, Thompson CB. Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism. *Molecular and cellular biology*. 2001;21(17):5899-912. Epub 2001/08/04.
52. Zheng WH, Kar S, Dore S, Quirion R. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1): a neuroprotective trophic factor acting via the Akt kinase pathway. *Journal of neural transmission Supplementum*. 2000(60):261-72. Epub 2001/02/24.
53. Coffey PJ, Jin J, Woodgett JR. Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *The Biochemical journal*. 1998;335 (Pt 1):1-13. Epub 1998/09/22.
54. Hajduch E, Litherland GJ, Hundal HS. Protein kinase B (PKB/Akt)--a key regulator of glucose transport? *FEBS letters*. 2001;492(3):199-203. Epub 2001/03/21.
55. Vander Heiden MG, Chandel NS, Li XX, Schumacker PT, Colombini M, Thompson CB. Outer mitochondrial membrane permeability can regulate coupled respiration and cell survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(9):4666-71. Epub 2000/04/26.
56. Vander Heiden MG, Chandel NS, Schumacker PT, Thompson CB. Bcl-xL prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange. *Molecular cell*. 1999;3(2):159-67. Epub 1999/03/17.
57. Moley KH, Mueckler MM. Glucose transport and apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2000;5(2):99-105. Epub 2001/03/10.
58. Rathmell JC, Vander Heiden MG, Harris MH, Frauwirth KA, Thompson CB. In the absence of extrinsic signals, nutrient utilization by lymphocytes is insufficient to maintain either cell size or viability. *Molecular cell*. 2000;6(3):683-92. Epub 2000/10/13.
59. Gottlob K, Majewski N, Kennedy S, Kandel E, Robey RB, Hay N. Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes & development*. 2001;15(11):1406-18. Epub 2001/06/08.
60. Wada T, Penninger JM. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene*. 2004;23(16):2838-49. Epub 2004/04/13.
61. Hetman M, Gozdz A. Role of extracellular signal regulated kinases 1 and 2 in neuronal survival. *European journal of biochemistry / FEBS*. 2004;271(11):2050-5. Epub 2004/05/22.

-
62. Subramaniam S, Unsicker K. ERK and cell death: ERK1/2 in neuronal death. *The FEBS journal*. 2010;277(1):22-9. Epub 2009/10/22.
 63. Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science*. 1999;286(5443):1358-62. Epub 1999/11/13.
 64. Tan Y, Ruan H, Demeter MR, Comb MJ. p90(RSK) blocks bad-mediated cell death via a protein kinase C-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(49):34859-67. Epub 1999/11/27.
 65. Hughes R, Gilley J, Kristiansen M, Ham J. The MEK-ERK pathway negatively regulates bim expression through the 3' UTR in sympathetic neurons. *BMC neuroscience*. 2011;12:69. Epub 2011/07/19.
 66. Huang CY, Liou YF, Chung SY, Lin WY, Jong GP, Kuo CH, et al. Role of ERK signaling in the neuroprotective efficacy of magnesium sulfate treatment during focal cerebral ischemia in the gerbil cortex. *The Chinese journal of physiology*. 2010;53(5):299-309. Epub 2011/07/29.
 67. Tian HP, Huang BS, Zhao J, Hu XH, Guo J, Li LX. Non-receptor tyrosine kinase Src is required for ischemia-stimulated neuronal cell proliferation via Raf/ERK/CREB activation in the dentate gyrus. *BMC neuroscience*. 2009;10:139. Epub 2009/12/01.
 68. Allan LA, Morrice N, Brady S, Magee G, Pathak S, Clarke PR. Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK. *Nature cell biology*. 2003;5(7):647-54. Epub 2003/06/07.
 69. Hetman M, Hsuan SL, Habas A, Higgins MJ, Xia Z. ERK1/2 antagonizes glycogen synthase kinase-3beta-induced apoptosis in cortical neurons. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(51):49577-84. Epub 2002/10/24.
 70. Danbolt NC. Glutamate uptake. *Progress in neurobiology*. 2001;65(1):1-105. Epub 2001/05/23.
 71. Wang Y, Qin ZH. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2010;15(11):1382-402. Epub 2010/03/10.
 72. Luk KC, Sadikot AF. Glutamate and regulation of proliferation in the developing mammalian telencephalon. *Developmental neuroscience*. 2004;26(2-4):218-28. Epub 2005/02/16.
 73. Mukherjee S, Manahan-Vaughan D. Role of metabotropic glutamate receptors in persistent forms of hippocampal plasticity and learning. *Neuropharmacology*. 2012. Epub 2012/06/30.
 74. She K, Ferreira JS, Carvalho AL, Craig AM. Glutamate binding to the GluN2B subunit controls surface trafficking of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(33):27432-45. Epub 2012/06/29.
 75. Suzuki M, Nelson AD, Eickstaedt JB, Wallace K, Wright LS, Svendsen CN. Glutamate enhances proliferation and neurogenesis in human neural progenitor cell cultures derived from the fetal cortex. *The European journal of neuroscience*. 2006;24(3):645-53. Epub 2006/07/20.
 76. Liu T, Kong D, Shah BP, Ye C, Koda S, Saunders A, et al. Fasting activation of AgRP neurons requires NMDA receptors and involves spinogenesis and increased excitatory tone. *Neuron*. 2012;73(3):511-22. Epub 2012/02/14.
 77. Martel MA, Wyllie DJ, Hardingham GE. In developing hippocampal neurons, NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) can mediate signaling to

- neuronal survival and synaptic potentiation, as well as neuronal death. *Neuroscience*. 2009;158(1):334-43. Epub 2008/04/02.
78. Papadia S, Hardingham GE. The dichotomy of NMDA receptor signaling. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. 2007;13(6):572-9. Epub 2007/11/15.
79. Blandini F. An update on the potential role of excitotoxicity in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Functional neurology*. 2010;25(2):65-71. Epub 2010/10/07.
80. Fujimoto S, Katsuki H, Kume T, Kaneko S, Akaike A. Mechanisms of oxygen glucose deprivation-induced glutamate release from cerebrocortical slice cultures. *Neuroscience research*. 2004;50(2):179-87. Epub 2004/09/24.
81. Gazulla J, Cavero-Nagore M. [Glutamate and Alzheimer's disease]. *Revista de neurologia*. 2006;42(7):427-32. Epub 2006/04/08. Glutamato y enfermedad de Alzheimer.
82. Ankarcrona M, Dybukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, et al. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron*. 1995;15(4):961-73. Epub 1995/10/01.
83. Nicotera P, Ankarcrona M, Bonfoco E, Orrenius S, Lipton SA. Neuronal necrosis and apoptosis: two distinct events induced by exposure to glutamate or oxidative stress. *Advances in neurology*. 1997;72:95-101. Epub 1997/01/01.
84. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(16):7162-6. Epub 1995/08/01.
85. Portera-Cailliau C, Price DL, Martin LJ. Non-NMDA and NMDA receptor-mediated excitotoxic neuronal deaths in adult brain are morphologically distinct: further evidence for an apoptosis-necrosis continuum. *The Journal of comparative neurology*. 1997;378(1):88-104. Epub 1997/02/03.
86. Stanika RI, Winters CA, Pivovarova NB, Andrews SB. Differential NMDA receptor-dependent calcium loading and mitochondrial dysfunction in CA1 vs. CA3 hippocampal neurons. *Neurobiology of disease*. 2010;37(2):403-11. Epub 2009/11/03.
87. Aono M, Bennett ER, Kim KS, Lynch JR, Myers J, Pearlstein RD, et al. Protective effect of apolipoprotein E-mimetic peptides on N-methyl-D-aspartate excitotoxicity in primary rat neuronal-glia cell cultures. *Neuroscience*. 2003;116(2):437-45. Epub 2003/02/01.
88. Aono M, Lee Y, Grant ER, Zivin RA, Pearlstein RD, Warner DS, et al. Apolipoprotein E protects against NMDA excitotoxicity. *Neurobiology of disease*. 2002;11(1):214-20. Epub 2002/12/04.
89. Lee Y, Aono M, Laskowitz D, Warner DS, Pearlstein RD. Apolipoprotein E protects against oxidative stress in mixed neuronal-glia cell cultures by reducing glutamate toxicity. *Neurochemistry international*. 2004;44(2):107-18. Epub 2003/09/16.
90. Choi DW. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neuroscience letters*. 1985;58(3):293-7. Epub 1985/08/05.
91. Lau A, Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2010;460(2):525-42. Epub 2010/03/17.
92. Pivovarova NB, Andrews SB. Calcium-dependent mitochondrial function and dysfunction in neurons. *The FEBS journal*. 2010;277(18):3622-36. Epub 2010/07/28.
93. Dykens JA. Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated CA2+ and Na+: implications for neurodegeneration. *Journal of neurochemistry*. 1994;63(2):584-91. Epub 1994/08/01.

94. Dawson VL, Dawson TM, London ED, Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(14):6368-71. Epub 1991/07/15.
95. Dawson VL, Kizushi VM, Huang PL, Snyder SH, Dawson TM. Resistance to neurotoxicity in cortical cultures from neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1996;16(8):2479-87. Epub 1996/04/15.
96. Sattler R, Xiong Z, Lu WY, Hafner M, MacDonald JF, Tymianski M. Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science*. 1999;284(5421):1845-8. Epub 1999/06/12.
97. Alvarez B, Radi R. Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino acids*. 2003;25(3-4):295-311. Epub 2003/12/09.
98. Calcerrada P, Peluffo G, Radi R. Nitric oxide-derived oxidants with a focus on peroxynitrite: molecular targets, cellular responses and therapeutic implications. *Current pharmaceutical design*. 2011;17(35):3905-32. Epub 2011/09/22.
99. Habib S, Ali A. Biochemistry of nitric oxide. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*. 2011;26(1):3-17. Epub 2012/01/03.
100. Brorson JR, Marcuccilli CJ, Miller RJ. Delayed antagonism of calpain reduces excitotoxicity in cultured neurons. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1995;26(7):1259-66; discussion 67. Epub 1995/07/01.
101. Higuchi M, Tomioka M, Takano J, Shirotani K, Iwata N, Masumoto H, et al. Distinct mechanistic roles of calpain and caspase activation in neurodegeneration as revealed in mice overexpressing their specific inhibitors. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(15):15229-37. Epub 2005/02/09.
102. Chen Q, Paillard M, Gomez L, Ross T, Hu Y, Xu A, et al. Activation of mitochondrial mu-calpain increases AIF cleavage in cardiac mitochondria during ischemia-reperfusion. *Biochemical and biophysical research communications*. 2011;415(4):533-8. Epub 2011/11/08.
103. Polster BM, Basanez G, Etxebarria A, Hardwick JM, Nicholls DG. Calpain I induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(8):6447-54. Epub 2004/12/14.
104. Cao G, Xing J, Xiao X, Liou AK, Gao Y, Yin XM, et al. Critical role of calpain I in mitochondrial release of apoptosis-inducing factor in ischemic neuronal injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007;27(35):9278-93. Epub 2007/08/31.
105. Faddis BT, Hasbani MJ, Goldberg MP. Calpain activation contributes to dendritic remodeling after brief excitotoxic injury in vitro. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1997;17(3):951-9. Epub 1997/02/01.
106. Son JH, Shim JH, Kim KH, Ha JY, Han JY. Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases. *Experimental & molecular medicine*. 2012;44(2):89-98. Epub 2012/01/20.
107. Lee J, Giordano S, Zhang J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *The Biochemical journal*. 2012;441(2):523-40. Epub 2011/12/23.
108. Burman C, Ktistakis NT. Autophagosome formation in mammalian cells. *Seminars in immunopathology*. 2010;32(4):397-413. Epub 2010/08/27.
109. He C, Sumpter R, Jr., Levine B. Exercise induces autophagy in peripheral tissues and in the brain. *Autophagy*. 2012;8(10):1548-51. Epub 2012/08/16.

110. Jamart C, Francaux M, Millet GY, Deldicque L, Frere D, Feasson L. Modulation of autophagy and ubiquitin-proteasome pathways during ultra-endurance running. *J Appl Physiol.* 2012;112(9):1529-37. Epub 2012/02/22.
111. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2012;13(4):251-62. Epub 2012/03/23.
112. Schaeffer V, Goedert M. Stimulation of autophagy is neuroprotective in a mouse model of human tauopathy. *Autophagy.* 2012;8(11). Epub 2012/08/10.
113. Schaeffer V, Lavenir I, Ozcelik S, Tolnay M, Winkler DT, Goedert M. Stimulation of autophagy reduces neurodegeneration in a mouse model of human tauopathy. *Brain : a journal of neurology.* 2012;135(Pt 7):2169-77. Epub 2012/06/13.
114. Dohi E, Tanaka S, Seki T, Miyagi T, Hide I, Takahashi T, et al. Hypoxic stress activates chaperone-mediated autophagy and modulates neuronal cell survival. *Neurochemistry international.* 2012;60(4):431-42. Epub 2012/02/07.
115. Cai Q, Zakaria HM, Simone A, Sheng ZH. Spatial parkin translocation and degradation of damaged mitochondria via mitophagy in live cortical neurons. *Current biology : CB.* 2012;22(6):545-52. Epub 2012/02/22.
116. Saura V, Stewart-Parker M, Williams TL, Ratnayaka A, Atherton J, Gorringer K, et al. Visualization of co-localization in Abeta42-administered neuroblastoma cells reveals lysosome damage and autophagosome accumulation related to cell death. *The Biochemical journal.* 2012;441(2):579-90. Epub 2011/10/01.
117. Gao L, Jiang T, Guo J, Liu Y, Cui G, Gu L, et al. Inhibition of Autophagy Contributes to Ischemic Postconditioning-Induced Neuroprotection against Focal Cerebral Ischemia in Rats. *PloS one.* 2012;7(9):e46092. Epub 2012/10/03.
118. Qin AP, Liu CF, Qin YY, Hong LZ, Xu M, Yang L, et al. Autophagy was activated in injured astrocytes and mildly decreased cell survival following glucose and oxygen deprivation and focal cerebral ischemia. *Autophagy.* 2010;6(6):738-53. Epub 2010/06/25.
119. Lee JA. Neuronal autophagy: a housekeeper or a fighter in neuronal cell survival? *Experimental neurobiology.* 2012;21(1):1-8. Epub 2012/03/23.
120. Wullschlegel S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell.* 2006;124(3):471-84. Epub 2006/02/14.
121. Yang X, Yang C, Farberman A, Rideout TC, de Lange CF, France J, et al. The mammalian target of rapamycin-signaling pathway in regulating metabolism and growth. *Journal of animal science.* 2008;86(14 Suppl):E36-50. Epub 2007/11/14.
122. Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature cell biology.* 2002;4(9):648-57. Epub 2002/08/13.
123. Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell.* 2005;121(2):179-93. Epub 2005/04/27.
124. Lee DF, Kuo HP, Chen CT, Hsu JM, Chou CK, Wei Y, et al. IKK beta suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway. *Cell.* 2007;130(3):440-55. Epub 2007/08/19.
125. Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Current opinion in cell biology.* 2010;22(2):124-31. Epub 2009/12/26.
126. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular cell.* 2008;30(2):214-26. Epub 2008/04/29.

-
127. Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2013. Epub 2013/11/10.
 128. Bach M, Larance M, James DE, Ramm G. The serine/threonine kinase ULK1 is a target of multiple phosphorylation events. *The Biochemical journal*. 2011;440(2):283-91. Epub 2011/08/09.
 129. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature cell biology*. 2011;13(2):132-41. Epub 2011/01/25.
 130. Graef M, Friedman JR, Graham C, Babu M, Nunnari J. ER exit sites are physical and functional core autophagosome biogenesis components. *Molecular biology of the cell*. 2013;24(18):2918-31. Epub 2013/08/02.
 131. Karanasios E, Stapleton E, Manifava M, Kaizuka T, Mizushima N, Walker SA, et al. Dynamic association of the ULK1 complex with omegasomes during autophagy induction. *Journal of cell science*. 2013. Epub 2013/09/10.
 132. Proikas-Cezanne T, Pfisterer SG. Assessing mammalian autophagy by WIPI-1/Atg18 puncta formation. *Methods in enzymology*. 2009;452:247-60. Epub 2009/02/10.
 133. Karanasios E, Stapleton E, Walker SA, Manifava M, Ktistakis NT. Live cell imaging of early autophagy events: omegasomes and beyond. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2013(77). Epub 2013/08/10.
 134. Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, Mitra K, Sougrat R, Kim PK, et al. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell*. 2010;141(4):656-67. Epub 2010/05/19.
 135. Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, et al. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*. 2013;495(7441):389-93. Epub 2013/03/05.
 136. Puri C, Renna M, Bento CF, Moreau K, Rubinsztein DC. Diverse autophagosome membrane sources coalesce in recycling endosomes. *Cell*. 2013;154(6):1285-99. Epub 2013/09/17.
 137. Ravikumar B, Moreau K, Jahreiss L, Puri C, Rubinsztein DC. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nature cell biology*. 2010;12(8):747-57. Epub 2010/07/20.
 138. Ravikumar B, Moreau K, Rubinsztein DC. Plasma membrane helps autophagosomes grow. *Autophagy*. 2010;6(8):1184-6. Epub 2010/09/24.
 139. Ohashi Y, Munro S. Membrane delivery to the yeast autophagosome from the Golgi-endosomal system. *Molecular biology of the cell*. 2010;21(22):3998-4008. Epub 2010/09/24.
 140. He C, Baba M, Klionsky DJ. Double duty of Atg9 self-association in autophagosome biogenesis. *Autophagy*. 2009;5(3):385-7. Epub 2009/02/03.
 141. Chan SN, Tang BL. Location and membrane sources for autophagosome formation - from ER-mitochondria contact sites to Golgi-endosome-derived carriers. *Molecular membrane biology*. 2013. Epub 2013/11/02.
 142. Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2009;10(7):458-67. Epub 2009/06/06.
 143. Koyama-Honda I, Itakura E, Fujiwara TK, Mizushima N. Temporal analysis of recruitment of mammalian ATG proteins to the autophagosome formation site. *Autophagy*. 2013;9(10). Epub 2013/07/26.

144. Kramer H. Route to destruction: autophagosomes SNARE lysosomes. *The Journal of cell biology*. 2013;201(4):495-7. Epub 2013/05/15.
145. Takats S, Nagy P, Varga A, Piracs K, Karpati M, Varga K, et al. Autophagosomal Syntaxin17-dependent lysosomal degradation maintains neuronal function in *Drosophila*. *The Journal of cell biology*. 2013;201(4):531-9. Epub 2013/05/15.
146. Chen Y, Yu L. Autophagic lysosome reformation. *Experimental cell research*. 2013;319(2):142-6. Epub 2012/09/25.
147. Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *The EMBO journal*. 2007;26(7):1749-60. Epub 2007/03/10.
148. Chen Y, Azad MB, Gibson SB. Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell death and differentiation*. 2009;16(7):1040-52. Epub 2009/05/02.
149. Ruiz J, Kouivaskaia D, Migliorini M, Robinson S, Saenko EL, Gorlatova N, et al. The apoE isoform binding properties of the VLDL receptor reveal marked differences from LRP and the LDL receptor. *Journal of lipid research*. 2005;46(8):1721-31. Epub 2005/05/03.
150. Jurado S, Benoist M, Lario A, Knafo S, Petrok CN, Esteban JA. PTEN is recruited to the postsynaptic terminal for NMDA receptor-dependent long-term depression. *The EMBO journal*. 2010;29(16):2827-40. Epub 2010/07/16.
151. Sen A, Alkon DL, Nelson TJ. Apolipoprotein E3 (ApoE3) but not ApoE4 protects against synaptic loss through increased expression of protein kinase C epsilon. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(19):15947-58. Epub 2012/03/20.
152. Bell RD, Winkler EA, Singh I, Sagare AP, Deane R, Wu Z, et al. Apolipoprotein E controls cerebrovascular integrity via cyclophilin A. *Nature*. 2012;485(7399):512-6. Epub 2012/05/25.
153. Du J, Chang J, Guo S, Zhang Q, Wang Z. ApoE 4 reduces the expression of Abeta degrading enzyme IDE by activating the NMDA receptor in hippocampal neurons. *Neuroscience letters*. 2009;464(2):140-5. Epub 2009/07/21.
154. Dafnis I, Stratikos E, Tzinia A, Tsilibary EC, Zannis VI, Chroni A. An apolipoprotein E4 fragment can promote intracellular accumulation of amyloid peptide beta 42. *Journal of neurochemistry*. 2010;115(4):873-84. Epub 2010/04/24.
155. Narita M, Holtzman DM, Fagan AM, LaDu MJ, Yu L, Han X, et al. Cellular catabolism of lipid poor apolipoprotein E via cell surface LDL receptor-related protein. *Journal of biochemistry*. 2002;132(5):743-9. Epub 2002/11/06.
156. Puyal J, Ginet V, Grishchuk Y, Truttmann AC, Clarke PG. Neuronal autophagy as a mediator of life and death: contrasting roles in chronic neurodegenerative and acute neural disorders. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. 2012;18(3):224-36. Epub 2011/04/29.
157. Rubinsztein DC, Gestwicki JE, Murphy LO, Klionsky DJ. Potential therapeutic applications of autophagy. *Nature reviews Drug discovery*. 2007;6(4):304-12. Epub 2007/03/31.
158. Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, Yu WH, Peterhoff C, Cataldo A, et al. Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2005;64(2):113-22. Epub 2005/03/09.
159. Yu WH, Cuervo AM, Kumar A, Peterhoff CM, Schmidt SD, Lee JH, et al. Macroautophagy--a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *The Journal of cell biology*. 2005;171(1):87-98. Epub 2005/10/06.

-
160. Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, Aliev G, Askew DS, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*. 2008;4(2):151-75. Epub 2008/01/12.
161. Nixon RA. Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *Journal of cell science*. 2007;120(Pt 23):4081-91. Epub 2007/11/23.
162. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol*. 2008;445:77-88. Epub 2008/04/22.