



TESIS DOCTORAL

Estudio de la interacción entre péptidos β amiloides y proteínas de unión de calcio y sistemas redox relevantes en la señalización neuronal en cerebro y búsqueda de antagonistas.

Jairo Benito Salazar Casco

Programa de Doctorado en Biomarcadores de Salud y Estados Patológicos
(R012)

Conformidad de los directores de la tesis: Dr. D. Carlos Gutiérrez Merino, Dr. D. Alejandro Khalil Samhan Arias y Dra. D^a Ana María Mata Durán

Esta tesis cuenta con la autorización del director y codirectores de la misma y de la Comisión Académica del programa. Dichas autorizaciones constan en el Servicio de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Extremadura.

2022

Este trabajo es dedicado a Dios que me ha dado la oportunidad de cumplir mis objetivos y las tres mujeres más importantes de mi vida, mi Madre Vilma, mi Esposa Katherine Joya y mi amada princesa Katherine Salazar.

Índice

Agradecimientos	7
Resumen	9
Abstract	11
Abreviaturas.....	13
Lista de figuras	15
1. Introducción	17
2. Objetivos de este trabajo.....	53
3. Resultados	55
3.1. Diseño y evaluación experimental de un péptido antagonista de las interacciones entre el péptido A β (1-42) y las proteínas de unión de calcio CaM y calbindina-D28k.	55
3.2. Hexa-histidina, un péptido con aplicaciones versátiles en el desarrollo de estudios sobre mecanismos moleculares de acción de oligómeros de A β (1-42).	72
3.3. Estudios sobre la modulación de la interacción entre el péptido A β (1-42) y la CaM y evaluación experimental de la modulación de la nNOS por el péptido A β (1-42).	92
4. Discusión	101
5. Materiales y métodos	123
6. Conclusiones.....	143
7. Publicaciones.....	145
8. Referencias.....	147

Agradecimientos

Mi mayor gratitud al director de esta tesis, el Profesor Carlos Gutiérrez-Merino, que ha sido como un padre y porque cada momento que pase a su lado ha sido de gran aprendizaje, dedicación, entrega y paciencia.

También a los Profesores Alejandro Samhan-Arias, Ana María Mata Durán y Oscar Martínez Costa por el aprendizaje, apoyo y amistad brindados estos años.

Mi gratitud a Laura, Joana, María, Montaña y Rodrigo por la amistad y la ayuda brindada durante mi estancia en el laboratorio.

Un enorme agradecimiento a Raúl, Alonso, Rosa, Eunice, Andrés, Beatriz, Carlitos, Sergio, Alfonso, Ángel y Antonia que ha sido como una familia para mí.

Jairo Salazar ha sido el beneficiario de una Beca Predoctoral de la Fundación Carolina (Madrid, Spain) para realizar esta tesis doctoral. Los gastos de materiales y reactivos utilizados en esta tesis han sido financiados por los proyectos de investigación BFU2014-53641-P y BFU2017-85723-P del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades de España, cofinanciados por los Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER).



Unión Europea

Fondo Europeo
de Desarrollo Regional
"Una manera de hacer Europa"

Resumen

Los péptidos β -amiloide ($A\beta$) son biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer (EA) y han sido implicados en su etiopatogenia. El péptido $A\beta(1-42)$ es uno de los componentes predominantes de las placas amiloides y de los ovillos neurofibrilares detectados en la EA. La desregulación de la homeostasis intracelular del Ca^{2+} y de hierro en neuronas, y el estrés oxidativo en el cerebro tienen lugar en las etapas iniciales de la EA. Los *rafts* lipídicos de la membrana plasmática desempeñan un papel clave en la internalización del péptido $A\beta(1-42)$ en las neuronas. La calmodulina (CaM), una proteína de unión del calcio citosólico y de señalización del calcio en neuronas, es una de las proteínas intracelulares con mayor afinidad por $A\beta(1-42)$. En base a estos antecedentes, en esta tesis hemos estudiado las interacciones del $A\beta(1-42)$ con la CaM y la calbindina-D28k (que se expresa a niveles altos en las regiones cerebrales afectadas en la EA), y con enzimas redox asociadas a los “*rafts*” lipídicos utilizando un método fluorescente para medir la formación de complejos $A\beta(1-42):CaM$ y $A\beta(1-42):calbindina-D28k$. A partir de estudios de *docking* hemos diseñado un péptido que es un potente inhibidor de la formación de los complejos $A\beta(1-42):CaM$ y $A\beta(1-42):calbindina-D28k$. Además, hemos evaluado otros posibles antagonistas y moduladores de la formación de estos complejos: hexa-histidina, iones metálicos (Fe^{3+} , Cu^{2+} y Zn^{2+}), dos flavonoides (kaempferol y epigallocatequina) y dos antagonistas de la CaM (trifluoperazina y compuesto 48-80). Se analizan las implicaciones de los resultados para las disfunciones neuronales inducidas por el péptido $A\beta(1-42)$.

Palabras clave: Péptidos β -amiloide, $A\beta(1-42)$, calmodulina, calbindina-D28k, péptidos antagonistas, hexa-histidina, citocromo b_5 reductasa, óxido nítrico sintasa, Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , flavonoides, antagonistas de calmodulina.

Abstract

Amyloid- β peptides ($A\beta$) are recognized biomarkers of Alzheimer's disease (AD), and have been implied in AD etiopathogenesis. The peptide $A\beta(1-42)$ is one of the major components of amyloid plaques and of neurofibrillary tangles detected in AD. Dysregulation of intracellular Ca^{2+} and iron homeostasis in neurons, and brain oxidative stress take place in the initial stages of AD. Lipid rafts of the plasma membrane play a major role in the internalization of $A\beta(1-42)$ in neurons. The calmodulin (CaM), a multifunctional cytosolic calcium binding and signaling protein in neurons, is one of the intracellular proteins with higher affinity for $A\beta(1-42)$ soluble oligomers. On these grounds, in this Ph.D. thesis we have studied the interactions of $A\beta(1-42)$ soluble oligomers with CaM and calbindin-D28k (another calcium binding protein highly expressed in the brain regions more dysfunctional in AD), and with redox enzymes associated to lipid rafts, using a novel fluorescent method that measures the formation of $A\beta(1-42):CaM$ and $A\beta(1-42):calbindin-D28k$ complexes. Docking analysis of these complexes led us to design a peptide that behaves as a potent inhibitor of their formation, i.e. an antagonist peptide of $A\beta(1-42)$ complexation with these calcium binding proteins. In addition, we have experimentally evaluated the putative antagonist and/or modulatory effects of other compounds in the formation of these complexes, namely, hexa-histidine, metallic cations (Fe^{3+} , Cu^{2+} and Zn^{2+}), two flavonoids (kaempferol and epigallocatechin) and two CaM antagonists (trifluoperazine and compound 48-80). The implications of these results for neuronal dysfunctions that have been reported to be induced by $A\beta(1-42)$ are analyzed.

Keywords: Amyloid- β peptides, $A\beta(1-42)$, calmodulin, calbindin-D28k, antagonist peptides, hexa-histidine, cytochrome b_5 reductase, nitric oxide synthase, Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , flavonoids, calmodulin antagonists.

Abreviaturas

A β : péptido β -amiloide
APP: proteína precursora amiloide
BAPTA: ácido 1,2 bis(2-aminofenoxi) etano-N,N',N''-tetraacético
BSA: albúmina de suero bovino
BSA/ASA: relación entre el área de superficie no accesible/accesible
C48-80: compuesto 48-80
CaM: calmodulina
CaMBP: proteína de unión a la calmodulina
CaMK: proteína quinasa dependiente de calcio y calmodulina
Cb₅: citocromo *b*₅
Cb₅R: citocromo *b*₅ reductasa
CGN: neuronas granulares del cerebelo
DFA: desferoxamina
DMSO: dimetil sulfóxido
EA: enfermedad de Alzheimer (Abstract en inglés: AD, Alzheimer's disease)
EA-f: enfermedad de Alzheimer familiar
EDTA: ácido etilén diamino tetraacético
FRET: transferencia de energía de fluorescencia
Hepes: Ácido N- [2-hidroxietyl] piperazina-N-[ácido 2 -etanosulfónico]
HO-1: hemooxigenasa-1
IC₅₀: concentración que produce el 50% de efecto máximo
IP₃R: receptores de IP₃
IPTG: isopropil β D-tiogalactósido
kDa: kilodalton
LB: caldo de lisogenia
LTCC: canales de calcio operados por voltaje de tipo L
LTP: potenciación postsináptica de largo plazo
MAM: membranas asociadas a mitocondria
MCU: uniportador de calcio mitocondrial
NCP: neocuproína
NCX: intercambiador sodio-calcio
NMDAR: receptores de N-metil D-aspartato
nNOS: óxido nítrico sintasa neuronal
PBS: tampón fosfato salino
PBST: PBS suplementado con 0,2% Tritón X-100
PMCA: bomba de calcio de la membrana plasmática
PMSF: fluoruro de fenil metil sulfonilo
PSEN: presenilina
Q_{max}: extinción máxima de fluorescencia
RE: retículo endoplasmático
RMN: resonancia magnética nuclear
ROS y RNS: radicales libres del oxígeno y del nitrógeno, respectivamente
RYR: receptores de rianodina
SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil-sulfato de sodio.

S.E.: error estándar

SHE: electrodo estándar de hidrógeno

TFP: trifluoperazina

TPEN: N, N, N', N' -tetrakis(2-piridil metil) etilenediamina

Tris: tris (hidroximetil) aminometano

Triton X-100: 4-(1,1,3,3-tetrametil butil) fenil-polietilén glicol

Lista de figuras

Figura 1. Polimorfismo conformacional de los péptidos β -amiloides neurotóxicos. [Tomado de Cheng <i>et al.</i> , 2017].	20
Figura 2. Esquema de las mutaciones familiares de la enfermedad de Alzheimer (FAD), que facilitan la transferencia de calcio entre el retículo endoplasmático (RE) y la mitocondria.	28
Figura 3. Conformaciones adoptadas por la CaM: (a) apo-CaM (PDB ID: 1CFD) y (b) holo-CaM (Ca^{2+} -CaM, PDB ID: 1CLL).	32
Figura 4. Implicaciones funcionales de la asociación de los sistemas de transporte de calcio y generadores de ROS/RNS en la membrana plasmática neuronal.	44
Figura 5. Cinética de formación de complejo entre $\text{A}\beta(1-42)$ y CaM monitorizada por el incremento de la fluorescencia de $\text{A}\beta(1-42)$ HiLyte TM -Fluor555.	57
Figura 6. La estructura 1 del modelo in silico seleccionado del complejo $\text{A}\beta(1-42)$:CaM obtenido usando los archivos PDB ID: 1Z0Q para el péptido $\text{A}\beta(1-42)$ y 1CLL para la CaM saturada con Ca^{2+} .	59
Figura 7. La estructura 2 del modelo in silico seleccionado del complejo $\text{A}\beta(1-42)$:CaM obtenido usando los archivos PDB ID: 1IYT para el péptido $\text{A}\beta(1-42)$ y 1CLL para la CaM saturada con Ca^{2+} .	60
Figura 8. Resultado de las simulaciones de estructuras modelo más probables de los complejos entre el péptido VFAFAMAFML y el péptido $\text{A}\beta(1-42)$ y entre el péptido VFAFAMAFML y la CaM saturada con Ca^{2+} generados "in silico" utilizando el CABS-dock Web Server.	63
Figura 9. El péptido sintético VFAFAMAFML (aminoácido C-terminal aminado) antagoniza la formación del complejo $\text{A}\beta(1-42)$:CaM.	64
Figura 10. Cinética de formación del complejo entre el péptido $\text{A}\beta(1-42)$ y la calbindina-D28k monitorizado por el incremento de la fluorescencia de $\text{A}\beta(1-42)$ HiLyte TM -Fluor555.	67
Figura 11. El péptido sintético VFAFAMAFML (aminoácido C-terminal amidado) antagoniza la formación del complejo $\text{A}\beta(1-42)$:calbindina-D28k.	68
Figura 12. Estructuras de los modelos seleccionados para la formación del complejo $\text{A}\beta(1-42)$:calbindina-D28k obtenidas in silico utilizando los archivos PDB ID: 1IYT para el péptido $\text{A}\beta(1-42)$ y 6FIE para la calbindina-D28k.	71
Figura 13. El péptido Hexa-His antagoniza la formación del complejo $\text{A}\beta(1-42)$:CaM y $\text{A}\beta(1-42)$:calbindina-D28k.	72
Figura 14. Efecto de la poli-His6 en la cinética de formación del complejo $\text{A}\beta(1-42)$ HiLyte TM -Fluor555:His6.	73
Figura 15. Modelos de la formación del complejo $\text{A}\beta(1-42)$ HiLyte TM -Fluor555:His6 generado con MDockPeP Server a partir de la estructura del péptido $\text{A}\beta(1-42)$ (PDB ID: 1IYT) y la secuencia del péptido His6.	74
Figura 16. Colocalización y FRET entre Cb_5R y $\text{A}\beta(1-42)$ HiLyte TM -Fluor555.	76
Figura 17. La estructura 1 del modelo in silico seleccionado del complejo $\text{A}\beta(1-42)$: Cb_5R obtenido usando los archivos PDB ID: 1IYT para el péptido $\text{A}\beta(1-42)$ y 1UMK para la Cb_5R .	77
Figura 18. La estructura 2 del modelo in silico seleccionado del complejo $\text{A}\beta(1-42)$: Cb_5R obtenido usando los archivos PDB ID: 1IYT para el péptido $\text{A}\beta(1-42)$ y 1UMK para la Cb_5R .	79
Figura 19. La estructura 1 del modelo in silico seleccionado del complejo $\text{A}\beta(25-35)$: Cb_5R obtenido usando la secuencia de aminoácidos de para el péptido $\text{A}\beta(25-35)$ y 1UMK para la Cb_5R .	80

Figura 20. La estructura 2 del modelo in silico seleccionado del complejo A β (25-35):Cb ₅ R obtenido usando la secuencia de aminoácidos de para el péptido A β (25-35) y 1UMK para la Cb ₅ R.....	82
Figura 21. Simulaciones de acoplamiento restringidas para eritrocitos humanos Cb ₅ R y A β (1-40).	83
Figura 22. Efecto de cola de poli-His6 en la actividad NADH:Cb ₅ reductasa de la Cb ₅ R.....	85
Figura 19. Dependencia de la actividad ferricianuro reductasa de la Cb ₅ R con la concentración del péptido A β (1-42).....	87
Figura 24. Titulación con el péptido A β (1-42) de la fluorescencia del grupo FAD de la Cb ₅ R soluble humana recombinante con la cola de poli-His ₆	88
Figura 25. Dependencia del incremento de la intensidad de fluorescencia del FAD ($\Delta F/F_0$) con la concentración de los péptido A β (1-42) y A β (25-35) por unión específica a la Cb ₅ R soluble humana recombinante con cola de poli-His ₆	90
Figura 26. A) Espectro de emisión de la Cb ₅ R soluble humana recombinante con cola de poli-His ₆ con excitación a 460 nm (negro).	91
Figura 27. Efecto de metales la interacción de péptido A β (1-42) con la CaM.....	92
Figura 28. Efecto de la DFA y de Fe ³⁺ en la cinética de formación del complejo A β (1-42) HiLyte™-Fluor555:CaM.	93
Figura 29. Efecto de la DFA y de Fe ³⁺ en la cinética de formación del complejo A β (1-42) HiLyte™-Fluor555:calbindina-D28k.	95
Figura 30. Titulación de la fluorescencia de 10 nM Badan-CaM con la concentración de BAPTA.	96
Figura 31. Efecto de la TFP y del compuesto 48-80 (C48-80) en la cinética de formación del complejo A β (1-42) HiLyte™-Fluor555:CaM.	98
Figura 32. Efecto de los flavonoides kaempferol y epigallocatequina en la formación del complejo Badan-CaM:A β (1-42).	99
Figura 33. Efecto del péptido A β (1-42) en la actividad de la nNOS humana recombinante medida con los métodos de NADPH-oxidasa (negro) y de la hemoglobina (gris).	100
Figura 34. La viabilidad de las células HT-22 (línea celular inmortalizada derivada de neuronas de hipocampo de ratón) no se afecta significativamente por incubación con el péptido VF ₁ F ₂ F ₃ F ₄ F ₅ F ₆ F ₇ F ₈ F ₉ F ₁₀ a concentraciones (0,1-1 μ M) durante 24 horas.....	108
Figura 35. Resultado de la electroforesis (tricina-SDS PAGE) de las soluciones del péptido A β (1-42) utilizadas en esta tesis doctoral.	124
Figura 36. Mapa del vector pET-15b de GenScript [https://www.genscript.com/gsfiles/vector-map/bacteria/pET-15b.pdf?1617385216].....	125
Figura 37 La electroforesis SDS-PAGE incluida en esta figura demuestra el elevado grado de pureza de la calbindina-D28k humana recombinante purificada en esta tesis doctoral y la eliminación de la cola de poli-His ₆ por tratamiento con el kit Thrombin Clean Cleavage™.	127

1. Introducción

1.1. *El péptido β -amiloide: su papel como biomarcador de la enfermedad de Alzheimer (EA) y su implicación en la patogénesis de la EA.*

El péptido β -amiloide ($A\beta$) es un producto escindido de la región C-terminal de una proteína mucho más grande, la glicoproteína transmembrana tipo I expresada de forma ubicua, denominada proteína precursora amiloide (APP), cuya función aún se desconoce [Gaggelli *et al.*, 2006]. Normalmente es escindida por una enzima llamada “ α -secretasa” por una vía que no conduce a la producción de $A\beta$. Sin embargo, la escisión anormal por otras dos “secretasas” produce péptidos $A\beta$ neurotóxicos, en el extremo NH_2 -terminal por la β -secretasa (la cual ha sido identificada como BACE1) [Nunan y Small, 2000], y en el $COOH$ -terminal, por la γ -secretasa (un complejo de presenilinas, nicastrina, pen-2 y aph-1) [Nunan y Small, 2000]. El sitio de escisión de la γ -secretasa no está bien definido y por esta causa se forman péptidos $A\beta$ de longitudes variables, de 39 a 43 residuos de aminoácidos. Los más abundantes son $A\beta(1-40)$ y $A\beta(1-42)$ en una proporción de aproximadamente 10:1, siendo este último significativamente más neurotóxico y el componente principal de las placas seniles [Younkin, 1998]. Aunque $A\beta$ se produce predominantemente en las membranas plasmáticas y se extruye al espacio extracelular donde se deposita formando las placas seniles, que son características de la EA, aunque también se puede producir en las membranas dentro de las neuronas y extruirse al citosol [LaFerla *et al.*, 2007]. Existe un equilibrio dinámico entre $A\beta$ intracelular y extracelular, al menos en parte por transporte activo a través de la unión al receptor de acetilcolina nicotínico $\alpha 7$ ($\alpha 7nAChR$) [Nagele *et al.*, 2002] y al receptor de productos finales de glicación avanzada (RAGE) [Deane *et al.*, 2003].

La secuencia del péptido $A\beta(1-42)$ es:

1				5					10					15
Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	His	Gln
16				20					25					30
Lys	Leu	Val	Phe	Phe	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Ser	Asn	Lys	Gly	Ala
31				35					40		42			
Ile	Ile	Gly	Leu	Met	Val	Gly	Gly	Val	Val	Ile	Ala			

Los primeros 16 residuos aminoácidos del péptido $A\beta(1-42)$ son en gran parte hidrofílicos. Los residuos restantes comprenden un dominio en gran parte

hidrofóbico. Los residuos, His13 e His14, forman un sitio de unión para cobre (Cu(II)). Se ha reportado una afinidad atomolar (10^{-17}) por Cu(II) para A β (1-42), pero sustancialmente menor para A β (1-40) [Atwood *et al.*, 2000]. La alta afinidad por Cu(II) del sitio His13His14 ha sido respaldada por modelos computacionales [Raffa *et al.*, 2005]. Los estudios espectroscópicos del fragmento peptídico A β (1-28) sugieren la implicación adicional de la His6, y del aminoácido NH₂-terminal, pero no de la Tyr10, en la unión del Cu(II) [Syme *et al.*, 2004]. La unión del Cu(II) en A β (1-40), tanto en el monómero como en las fibrillas, es mononuclear con tres ligandos de nitrógeno y un ligando de oxígeno, es decir, coordinación N3O1 [Karr *et al.*, 2004].

Los péptidos A β (1-40) y A β (1-42) promueven directamente el estrés oxidativo mediado por los radicales libres [Butterfield, 1999]. Huang *et al.* (1999) han reportado que el complejo Cu(II)/A β tiene un potencial de reducción relativamente alto $E^0 = +0,71-0,77$ V frente al electrodo estándar de hidrógeno (SHE) y en presencia de metionina u otros agentes reductores, como el ácido ascórbico, produce peróxido de hidrógeno. Sin embargo, el único residuo de metionina de estos péptidos β -amiloide, la Met35, no es esencial para la neurotoxicidad [Ciccotosto *et al.*, 2004], pero si está presente, la toxicidad parece correlacionarse con la capacidad de este residuo de Met del péptido A β para ser oxidado por Cu(II) [Varadarajan *et al.*, 2001, Pogocki y Schoneich, 2002].

El dominio estructural central del péptido β -amiloide, A β (12-23), ha sido identificado como el sitio de autorreconocimiento [Tjernber *et al.*, 1996] para la formación de dímeros y oligómeros superiores (ver la **Figura 1**). Esta región también es el sitio de unión para el colesterol [Yao y Papadopoulos, 2002], la apolipoproteína E (ApoE) [Sadowski *et al.*, 2006], el receptor $\alpha 7nAChR$ [Wang *et al.*, 2000], y la alcohol deshidrogenasa de unión al péptido beta amiloide (ABAD) [Lustbader *et al.*, 2004]. A β también se une con alta afinidad a la enzima catalasa, pero a través del motivo A β (31-35) [Milton *et al.*, 1999]. Aparentemente, existe una inhibición mutua de la función en el complejo A β /catalasa, posiblemente por la interacción de la cadena lateral Met35 con el sitio activo que contiene el hierro de la catalasa. Se inhibe la producción de H₂O₂ por A β y también se inhibe el procesamiento de H₂O₂ por catalasa [Milton *et al.*, 1999].

El pliegue en horquilla de cada monómero A β en la fibrilla está estabilizado por un puente salino entre Asp23 y Lys28. La precipitación de A β es promovida por iones metálicos, principalmente Zn(II), pero también por Cu(II), Fe(III) [Lovell *et al.*,1999, Cuajungco *et al.*,2000] y Al(III) [House *et al.*,2004]. Bajo diferentes condiciones experimentales, el Cu(II)- A β depositado puede ser fibrilar [Karr *et al.*,2004], o amorfo, es decir, sin lámina beta [House *et al.*,2004]. Se ha sugerido que, en la EA, como en otras enfermedades amiloideas como el Parkinson, la enfermedad de Huntington y la demencia con cuerpos de Lewy, la deposición de las placas en realidad puede ser un mecanismo protector que inactiva la toxicidad extrema de las especies oligoméricas intermedias [Cuajungco *et al.*,2000; Cohen *et al.*,2006; Terry *et al.*,1991; Hartley *et al.*,1999]. Las placas de A β en la EA están enriquecidas en A β (1-42) y Cu(II), así como en Zn(II), Fe(III) [Lovell *et al.*,1998] y otros iones metálicos [Cornett *et al.*,1998; Exley, 2001], lo que sugiere que estos iones metálicos pueden estar formando complejos con A β en la forma oligomérica neurotóxica soluble.

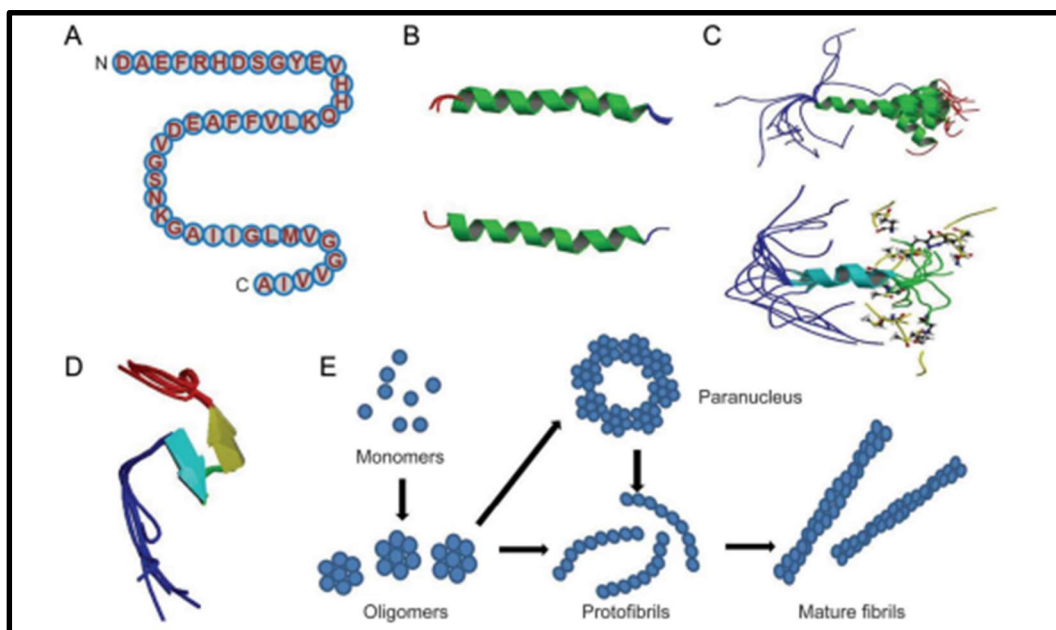


Figura 1. Polimorfismo conformacional de los péptidos β -amiloide neurotóxicos. [Tomado de Cheng *et al.*, 2017].

Estudios realizados con modelos celulares y animales de la EA [Younkin, 1998; Billings *et al.*, 2005; Oakley *et al.*, 2006; Knobloch *et al.*, 2007] y en muestras de cerebro de enfermos de Alzheimer [Zhang *et al.*, 2002; Walsh *et al.*, 2002] han conducido a concluir que las formas oligoméricas solubles (dímeros, trímeros u otros oligómeros de pequeño tamaño) son las especies más citotóxicas de A β y que las placas de A β pueden ser consideradas reservorios de estas especies neurotóxicas [Hu *et al.*, 2009]. Este punto ha sido ampliamente avalado por estudios realizados con modelos animales. Por ejemplo, un estudio realizado con ratas demostró que la inyección intracraneal de oligómeros solubles del péptido A β (1-42) produce más neurodegeneración, una mayor respuesta inflamatoria y una caída más rápida del aprendizaje y memorización que la inyección de A β (1-42) fibrilar [Friedrich *et al.*, 2010]. En otro estudio se ha demostrado que los oligómeros solubles del péptido A β (1-42) inyectados en el ventrículo lateral de ratas y macacos difunden en el cerebro y se acumulan en varias regiones asociadas con la memoria y funciones cognitivas, dónde inducen la fosforilación de la proteína tau, la activación de la microglía y la pérdida de sinapsis sin que sea detectable la presencia de agregados fibrilares de A β en estas regiones [Jin *et al.*, 2016]. Los resultados con cerebros de macacos tienen una especial relevancia para la evaluación crítica de los mecanismos moleculares implicados en la patogénesis de la EA, debido a su similitud con los cerebros de humanos. Adicionalmente, los oligómeros de A β inducen también otros mecanismos moleculares que están implicados en el desarrollo del proceso neurodegenerativo en el cerebro de enfermos de Alzheimer, como desregulación de la homeostasis del calcio, estrés del retículo endoplasmático, disfunción mitocondrial y activación de vías de muerte celular de tipo apoptótico [Bahr *et al.*, 1998; Tang, 2009].

La toxicidad de los péptidos A β se atribuyó inicialmente a su capacidad para generar especies reactivas de oxígeno e inducir estrés oxidativo e inflamación. Los efectos tóxicos son más agudos con las formas agregadas soluble de A β . Cuando forma un complejo con Cu(II), A β es un oxidante moderado y puede generar H₂O₂ en presencia de aire y un agente reductor como el ascorbato. Se ha demostrado experimentalmente que el complejo Cu(II)/ A β (1-40) tiene una coordinación N3O1 [Cuajungco *et al.*, 2000]. Se ha demostrado

mediante estudios *Ab initio* de complejos modelos [Raffa *et al.*, 2005] y mediante simulaciones de dinámica Molecular de Cu(II)/ A β (1-42) [Raffa y Rauk, 2007] que a pH fisiológico las estructuras más estables tienen coordinación N3O1 que involucra a las His13 e His14, una tercera His (His6 en una especie monomérica u otra His de una especie oligomérica), y el átomo de O de la His13. Los estudios *Ab initio* indican que dichas especies tendrían potenciales de reducción modestos, $E^0 > 0,0$ V frente al SHE [Raffa *et al.*, 2007]. Igualmente probable a pH = 7 o superior es la formación de un complejo N3O1 alternativo que implica, además de las His13 e His14, la intervención del átomo de N de la amida desprotonada y el carboxilato del Glu22. Sin embargo, dicho complejo tendría un potencial de reducción muy bajo, $E^0 \approx -0,4$ V frente al SHE [Raffa *et al.*, 2007]. El potencial de reducción determinado experimentalmente, $E^0 = +0,72-0,77$ V frente al SHE [Raffa *et al.*, 2005] indica que la diferencia de energía libre entre la especie Cu(II) y la especie Cu(I) reducida es de aproximadamente $70 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Esto es aproximadamente $50 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ más alto que el valor del par redox Cu(II)/Cu(I), $E^0 = 0,17$ V frente al SHE, y representa una desestabilización de la especie Cu(II)/A β de $50 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ relativa a especies Cu(II)/A β . En un complejo monomérico de Cu/ A β , es poco probable que se logre un potencial de reducción que sea sustancialmente diferente del Cu²⁺ acuoso, ya que la pequeñez del péptido impide restringir las especies de Cu(II) a una configuración de alta energía. Por lo tanto, la conclusión de este modelo de estudio redox [Raffa *et al.*, 2007] es que el alto valor medido experimentalmente es más probable que sea representativo de una especie oligomérica de A β que contiene cobre y, por lo tanto, respalda la noción de estrés oxidativo inducido por especies oligoméricas. Dado que la reducción de Cu(II) a Cu(I) es un proceso de un solo electrón, la generación de radicales libres que pueden iniciar la peroxidación lipídica debe preceder a la producción de H₂O₂. La peroxidación lipídica resultante produce 4-hidroxinonanal (HNE) y otros compuestos carbonílicos reactivos. El HNE por sí mismo es una señal de apoptosis [Peng *et al.*, 2007]. El HNE también produce reacciones de adición de Michael con los residuos de His de A β , y los aductos HNE/A β aceleran la oligomeración de las especies neurotóxicas de A β [Murray *et al.*, 2007]. La especie radical libre que inicia la peroxidación lipídica es incierta. Es poco probable que sea el anión superóxido, ya que O₂⁻ no puede penetrar en el interior de la membrana (pKa (HO₂⁻) = 4,8) excepto en condiciones de acidosis

severa. Por otro lado, un radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$ derivado de la reducción del H_2O_2) tendría un tiempo de vida demasiado corto para atravesar la capa formada por las cabezas polares de la bicapa lipídica de una membrana, debido a su alta reactividad. El H_2O_2 , el precursor del hidroxilo, puede difundir en el interior de la bicapa lipídica de la membrana pero requiere la presencia improbable de un metal reducido también dentro de la membrana para generar $\text{OH}\cdot$. Por estas razones [Brunelle y Rauk, 2002 y Brunelle *et al.*, 1999] propusieron que el residuo de Met35 sufre oxidación intramolecular por el Cu(II) unido al A β . Se ha mostrado computacionalmente que el catión radical de azufre resultante podría extraer un átomo de hidrógeno de un residuo de Gly cercano de una lámina β antiparalela, generando así un radical glicilo centrado en α -C estabilizado captodativamente. Tal radical, o su aducto de oxígeno (un radical peroxi, $\text{ROO}\cdot$), podría sobrevivir el tiempo suficiente y es suficientemente hidrofóbico para ser transportado al interior de la membrana. La entalpía de disociación del enlace α C-H de un residuo de Gly, aunque solo es de $350 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ [Rauk *et al.*, 1999], en comparación con el alquilo C-H ($\approx 400 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ y $\cdot\text{OH}$ en agua ($498 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), sigue siendo sustancialmente mayor que el grupo bis(vinílico) metileno ($-\text{CH} = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH} -$) de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), $270 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Por lo tanto, un radical glicilo o su derivado peroxi puede iniciar la peroxidación lipídica mediante la abstracción de un átomo de H del CH_2 central. Además, el A β se une al colesterol y un complejo oligomérico Cu(II)/A β puede oxidar el colesterol a 7 β -hidroxicolesterol, un derivado altamente neurotóxico por sus efectos proapoptóticos [Nelson *et al.*, 2005], y se produce H_2O_2 en cantidades estequiométricas en este proceso. Esta reacción tiene una especial relevancia porque los niveles de colesterol en las membranas se correlacionan con la unión de A β a las membranas y con la toxicidad de A β , y la afinidad de esta unión y la toxicidad aumentan con el estado de agregación de A β [Susasinghe *et al.*, 2003].

1.2. *Desregulación de la homeostasis intracelular del calcio en la EA y sistemas implicados en el control de la homeostasis del calcio y de la señalización del calcio neuronal modulados por A β .*

La conexión entre el calcio y la EA se observó hace varias décadas [Khachaturian, 1989], pero los datos recientes han aumentado el apoyo a esta hipótesis e implican fuertemente el papel de la alteración de la homeostasis intracelular de Ca²⁺ en la EA. En su versión más actualizada, esta hipótesis afirma que las interacciones de la señalización del calcio neuronal subyacen no sólo al depósito de placa amiloide, sino también a una serie de cambios moleculares dentro de la neurona que causan disfunción neuronal [Khachaturian, 2017]. En la hipótesis del calcio en el envejecimiento cerebral y la EA, Khachaturian [Khachaturian, 1994] propone que los cambios sostenidos en la homeostasis del calcio podrían ser una vía común para el envejecimiento y los cambios neuropatológicos asociados con la EA. La desregulación de la homeostasis intracelular de Ca²⁺ en la EA ha sido confirmada experimentalmente en numerosos trabajos experimentales. La primera evidencia experimental de la desregulación del calcio intracelular en la EA se reportó hace más de 25 años en células de fibroblastos aisladas de pacientes con EA [Peterson *et al.*, 1994]. Posteriormente, se ha reportado que las concentraciones de Ca²⁺ en reposo en las espinas y las dendritas de las neuronas piramidales del neocórtex cerebral son más altas de lo normal en las neuronas ubicadas cerca de los depósitos amiloides [Kuchibhotla *et al.*, 2008]. Consistente con este hecho, ha sido demostrado que la concentración del Ca²⁺ citosólico en las neuronas corticales de los animales 3xTg-AD no estimuladas es de 247 nmol/L, que es más del doble del encontrado en los controles no transgénicos (110 nmol/L) [López *et al.*, 2008]. Estos resultados han sido confirmados muchos otros estudios que indican que la señalización de Ca²⁺ está desregulada por la elevación sostenida de la concentración del Ca²⁺ citosólico en la EA, revisados en [Berridge, 2011].

Durante la neurotransmisión, un aumento del calcio intracelular tras la despolarización de la membrana transmite la señal de activación a las sinapsis. La señalización de calcio en las neuronas es, por lo tanto, crucial para la neurotransmisión y para mantener la plasticidad sináptica y generar la potenciación a largo plazo (LTP), que constituye la base del aprendizaje y la

memoria a través del fortalecimiento progresivo de la sinapsis [Morris, 2003 y Kawamoto *et al.*, 2012]. La señalización del calcio también regula el metabolismo neuronal y la producción de energía celular que es necesaria para mantener la transmisión sináptica [Brini, 2014]. Como era de esperar, las interrupciones en la señalización de calcio tienen consecuencias debilitantes en la función neuronal. Otros estudios en modelos de ratones con EA han respaldado la participación omnipresente de la desregulación de la concentración del calcio intracelular en la EA, vinculándola con la pérdida de memoria y con el aumento de la toxicidad de los péptidos A β [LaFerla, 2002, Smith *et al.*, 2005 y Green, *et al.*, 2009]. Otros estudios han demostrado que la elevación sostenida de la concentración del calcio citoplasmático aumenta la producción de A β al desencadenar la fosforilación de APP y tau, lo que indica que la desregulación del calcio intracelular exacerba la amiloidosis y la patología tau [Querfurth, y Selkoe, 1994; Pierrot *et al.*, 2006]. Emilsson *et al.*, (2006) demostraron que la expresión de ARNm de los genes implicados en la regulación del calcio está alterada en los cerebros con EA. Los resultados de este estudio sugieren además que la actividad de los canales de calcio del retículo endoplasmático (RE) está elevada en la EA [Emilsson *et al.*, 2006]. Notablemente, se han reportado muchas mutaciones en las presenilinas (PSEN) en la EA familiar (EA-f), mutaciones que están relacionadas con la desregulación de las vías de señalización del calcio intracelular [Supnet y Bezprozvanny, 2010]. Las PSEN1/2 son proteínas transmembrana presentes en la mayoría de las endomembranas pero predominante en las membranas del RE, donde se ha encontrado que interaccionan físicamente con los canales de calcio del RE, incluidos los dos principales canales de liberación de calcio del RE, los receptores de inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3R) y los receptores de rianodina (RyR) [Smith, 2005; Cheung, 2008; Cheung *et al.*, 2010]. Los ratones portadores de mutaciones encontradas en la EA-f muestran una actividad alterada tanto de IP3R como de RyR. Se ha documentado que las mutaciones de presenilina aumentan la expresión o la sensibilidad de RyR e IP3R, lo que lleva a una liberación exagerada de calcio mediada por RyR e IP3R en respuesta a varios agonistas [Smith 2005, Cheung *et al.*, 2010, Chan *et al.*, 2000, Lee *et al.*, 2006 y Stutzmann *et al.*, 2004]. La propia PSEN puede actuar como un canal pasivo de fuga de calcio del RE, lo que contribuye también a una liberación exagerada de calcio

del RE [Tu *et al.*, 2006]. Además, se ha demostrado que la liberación elevada de calcio del RE también precede a la patología de A β y estimula la formación de A β [Green *et al.*, 2008]. Esto es consistente con un estudio previo que mostró que la señalización alterada del calcio en fibroblastos derivados de familias asintomáticas de EA-f es un fuerte predictor del desarrollo futuro de la enfermedad [Etcheberrigaray *et al.*, 1998]. Además, otros estudios han demostrado que las mutaciones encontradas en la EA-f en los genes que codifican PSEN1 o PSEN2 dan como resultado niveles basales más altos de calcio en las neuronas corticales y del hipocampo, debido a la liberación excesiva de calcio del RE [Green *et al.*, 2008, Cheung *et al.*, 2010, Chan *et al.*, 2000 y Lee *et al.*, 2006]. Adicionalmente, se ha demostrado que los oligómeros del péptido A β (1-42) promueven la liberación de calcio del RE y, subsiguientemente, la muerte celular en neuronas corticales cultivadas [Resende *et al.*, 2008]. En conjunto, los datos acumulados hasta la fecha sugieren fuertemente que la liberación exagerada de calcio del RE y las alteraciones de la homeostasis del calcio tienen un papel importante en la patogénesis de la EA.

La disfunción mitocondrial es una característica común en todas las enfermedades neurodegenerativas, incluida la EA [Swerdlow *et al.*, 2014; Todorova y Blokland, 2017]. De hecho, se cree que la disfunción mitocondrial es uno de los principales impulsores avance de estas enfermedades [Cenini *et al.*, 2010]. Las neuronas dependen particularmente de las mitocondrias para la generación de energía para mantener la transmisión sináptica. El cerebro representa solo el 2% del peso corporal humana, pero utiliza aproximadamente el 20 % del suministro de oxígeno del cuerpo [Mink *et al.*, 1981]. La gran mayoría del ATP neuronal se produce a través de la respiración oxidativa mitocondrial [Ames, 2000], y las neuronas utilizan este ATP principalmente para generar los gradientes iónicos necesarios para la transmisión sináptica [Harris *et al.*, 2012]. Las mitocondrias localizadas en las sinapsis tienen, por tanto, un papel muy relevante para satisfacer la demanda de energía en estos sitios [Harris *et al.*, 2012].

El calcio intracelular tiene un gran impacto en la función mitocondrial. De hecho, el calcio juega un papel directo en la estimulación de las enzimas del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y la cadena de transporte de electrones que conducen a una mayor fosforilación oxidativa [Balaban, 2009, Denton, 2009,

Carafoli, 2010; Ivannikov y Macleod, 2013] (**Figura 2**). Las mitocondrias, a su vez, regulan la señalización del calcio intracelular secuestrando y amortiguando el calcio citosólico. Además, se ha demostrado que la exposición a A β aumenta los niveles de calcio mitocondrial en las neuronas corticales, lo que promueve la muerte celular, porque puede prevenirse bloqueando al uniportador de calcio mitocondrial (MCU) [Hedskog *et al.*, 2013]. El complejo MCU regula la captación de Ca $^{2+}$ por las mitocondrias, principalmente a través de las proteínas MICU1 y MICU2/3, que son sensores de la concentración del Ca $^{2+}$ a través de sus dominios de mano EF de unión a calcio conservados [Perocchi *et al.*, 2010]. La activación de MICU1 también está influenciada por el nivel de expresión de las proteínas de unión del Ca $^{2+}$, que también tienen dominios mano EF que compiten con MICU1 por la unión a calcio [Schwaller, 2010]. También se ha demostrado que un modelo de ratón con mutaciones EA-f en PSEN1 y APP tenían concentraciones elevadas de calcio mitocondrial, que se correlacionó con la inducción de la apoptosis en estos animales [Sanz-Blasco *et al.*, 2008]. La sobrecarga de calcio mitocondrial, cuando se combina con otros factores estresantes como el daño oxidativo, da como resultado la formación y apertura del poro de transmisión de permeabilidad mitocondrial (mPTP) [Kim *et al.*, 2015]. Otros estudios han mostrado que el péptido A β (1-42) puede inducir apoptosis neuronal al promover la sobrecarga de calcio mitocondrial y estimular la apertura del mPTP [Calvo-Rodriguez *et al.*, 2000]. La captación mitocondrial excesiva de Ca $^{2+}$ en tales contextos presentaría un problema particular para las mitocondrias envejecidas, que son particularmente vulnerables a los niveles altos de Ca $^{2+}$, ya que tienen una capacidad de amortiguación de calcio más bajas y son más susceptibles a la sobrecarga de calcio [Panel *et al.*, 2018].

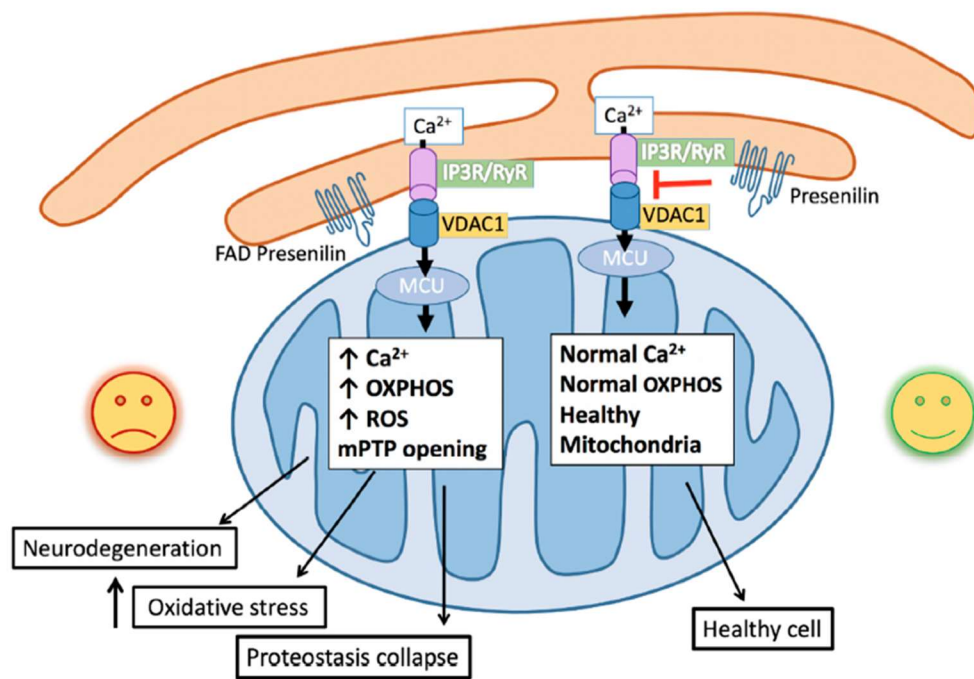


Figura 2. Esquema de las mutaciones familiares de la enfermedad de Alzheimer (FAD), que facilitan la transferencia de calcio entre el retículo endoplasmático (RE) y la mitocondria. El aumento de la liberación de calcio por la activación de los receptores del IP3 (IP3R) y de los receptores de rianodina (RyR) en las membranas asociadas a mitocondria (MAM) del RE se absorbe a través del canal iónico dependiente de voltaje (VDAC) localizado en la membrana mitocondrial externa y del uniportador de calcio mitocondrial selectivo de calcio (MCU) en la membrana interna mitocondrial. El aumento de la concentración del calcio mitocondrial estimula la fosforilación oxidativa, lo que conduce a una mayor generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), promoviendo el estrés oxidativo celular, la apertura del poro de alta permeabilidad mitocondrial (mPTP), el plegamiento incorrecto de proteínas y el colapso proteostático, y finalmente induciendo la apoptosis y neurodegeneración [Figura tomada de Ryan *et al.*, 2020].

Se ha demostrado en neuronas de pacientes con EA esporádica y familiar y en un modelo de ratón con EA que hay un aumento de los puntos de contacto entre el RE y las mitocondrias (MAM) y de la expresión de proteínas asociadas a las MAM, incluidos IP3R, RyR y VDAC [Hedskog *et al.*, 2009]. También se demostró que la exposición de las neuronas del hipocampo a A β aumenta el número de MAM y promueve la transferencia de calcio desde el RE a la mitocondria [Hedskog *et al.*, 2009]. De manera similar, las células que expresan el alelo 4 de la apolipoproteína E (APOE4) asociado a la EA esporádica [Roses y Allen, 1996], muestran una actividad de MAM regulada al alza y una comunicación entre el RE y la mitocondria más elevada [Tambini *et al.*, 2016], lo que sugiere que esta es una característica común en la EA. La PSEN1/2 también

se concentra en las MAM [Area-Gomez *et al.*, 2009] (**Figura 1**) y se ha demostrado que las mutaciones de la PSEN1 y de la PSEN2 observadas en la EA-f alteran el intercambio de lípidos y la transferencia de calcio entre el RE y las mitocondrias [Area-Gomez *et al.*, 2012; Zampese *et al.*, 2011].

Otros estudios han mostrado que la expresión de las proteínas de unión del calcio citosólico calmodulina, calbindinaD28k y parvalbúmina se reduce en pacientes con EA y en modelos de la EA [Riascos *et al.*, 2011; McLachlan *et al.*, 1987; Ahmadian *et al.*, 2015; Ali *et al.*, 2019]. El calcio citosólico en reposo ~~constante~~ oscila entre 70 y 150 nM en diferentes tipos de neuronas en cultivo, y alcanza un máximo por debajo de 1 μM tras la despolarización transitoria de la membrana plasmática por potenciales de acción o por estimulación de neurotransmisores excitadores [Berridge 1998; García y Strehler, 1999; LaFerla, 2002; Brini y Carafoli, 2009; Gutierrez-Merino *et al.*, 2014]. Además, existen grandes fluctuaciones dependientes del tiempo y del espacio en las concentraciones de Ca^{2+} dentro de diferentes regiones citosólicas, soma y extensiones axodendríticas tras la estimulación neuronal. La asociación de los canales de calcio operados por voltaje, los receptores de glutamato NMDA y AMPA y las bombas de calcio de la membrana plasmática, con los nanodominios de *rafts* lipídicos de la membrana plasmática conduce a la generación de picos transitorios de alta concentración del Ca^{2+} cerca de la membrana plasmática, tanto en el soma como en las sinapsis. [Gutierrez-Merino *et al.*, 2014; Marques-Da-Silva y Gutierrez-Merino, 2014. Dado que la constante de disociación del calcio de la CaM es relativamente alta, entre 0,2 y 0,5 μM [Corbacho *et al.*, 2017; Chin y Means, 2000], la potencia de la CaM como tampón de Ca^{2+} en diferentes compartimentos citosólicos de las neuronas no solo depende de la concentración local de la CaM, sino también de la concentración local de Ca^{2+} libre. Las fluctuaciones de la concentración de Ca^{2+} citosólico en las neuronas cambian fuertemente el equilibrio entre la conformación abierta saturada de calcio de Ca^{2+} -CaM (Ca^{2+}_4 -CaM) y la conformación cerrada de apo-CaM (menos Ca^{2+}) [Corbacho *et al.*, 2017]. Aunque la interacción del péptido $\text{A}\beta(1-42)$ con la CaM no altera significativamente la unión de Ca^{2+} a la CaM, la afinidad del péptido $\text{A}\beta(1-42)$ por la apoCaM es aproximadamente 20 veces menor [Corbacho *et al.*, 2017]. La conformación de la CaM cambia de una configuración cerrada a abierta tras la unión de calcio y permite que Ca^{2+} /CaM se una a proteínas diana

intracelulares con alta afinidad ($K_d = 10^{-7}$ a 10^{-11}) [Kaleka *et al.*, 2012]. La mayoría de las proteínas de unión de la CaM (CaMBP) se unen a Ca^{2+} -CaM, mientras que un pequeño número de proteínas, como la neuromodulina y la neurogranina, solo se unen a la apo-CaM [Kaleka *et al.*, 2012].

La CaM saturada de calcio se une con alta afinidad a los péptidos $A\beta(1-42)$ y $A\beta(25-35)$, como lo demuestra una constante de disociación del complejo $A\beta:Ca^{2+}_4$ -CaM cercana a 1 nM [Corbacho *et al.*, 2017]. Como resultado, la CaM podría tener una alta capacidad para amortiguar las concentraciones de $A\beta$ libres intracelulares. Recientemente hemos demostrado [Poejo *et al.*, 2021] que los cultivos primarios de neuronas granulares del cerebelo maduras expresan $5,5 \pm 0,5$ ng de CaM por μg de proteína total, es decir, aproximadamente 1 μg de CaM o 56 ± 6 picomoles de CaM en una placa sembrada con $2,5 \times 10^6$ neuronas. Además, encontramos que CaM se une ampliamente a los dímeros de $A\beta(1-42)$ en las neuronas granulares del cerebelo en cultivos *in vitro* después de solo 2 horas de incubación a $37^\circ C$ con concentraciones micromolares de dímeros $A\beta(1-42)$ añadidas al medio extracelular, lo que permitió calcular que la CaM presente en estas neuronas puede unir hasta cerca de 120 picomoles de $A\beta/2,5 \times 10^6$ neuronas [Poejo *et al.*, 2021]. Este último resultado permitió concluir que en las neuronas la CaM es un importante sistema de tamponamiento de las concentraciones intracelulares de los péptidos $A\beta$ neurotóxicos, debido a su elevada afinidad por estos péptidos. Otras proteínas conocidas por unir péptidos $A\beta$ con constantes de disociación cercanas a 1 nM, es decir, con afinidad similar a la de la CaM, son la proteína priónica celular [Laurén *et al.*, 2009] y la glucógeno sintasa quinasa 3α [Dunning *et al.*, 2015]. Sin embargo, el nivel de expresión de estas proteínas en las neuronas es varios órdenes de magnitud inferior al de la CaM.

Los péptidos $A\beta$ y la proteína tau son biomarcadores ampliamente establecidos de las características neuropatológicas de la EA, y tau, la proteína precursora de amiloide β y la enzima 1 de escisión de APP en el sitio β (BACE1) son CaMBP [Padilla *et al.*, 1990; O'Day *et al.*, 2015]. Además, la CaM se une y modula la actividad de varias proteínas quinasas involucradas en la hiperfosforilación de tau, como la CaMKII, la quinasa dependiente de ciclina 5 y la glucógeno sintasa quinasa 3α [Dunning, 2015; Yu *et al.*, 2008]. Tau pertenece a la familia de proteínas asociadas a microtúbulos que funcionan en el

ensamblaje y la estabilidad de los microtúbulos; la propia tubulina y la proteína 2 asociada a los microtúbulos también son CaMBP [Hammond *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2000].

1.3. *Las proteínas de unión de calcio en neuronas: CaM y calbindina-D28k. Estructura, funciones y regionalización de su expresión en el cerebro.*

La calmodulina es la principal proteína de señalización de Ca^{2+} , es ubicua en los organismos eucariotas, altamente conservada, y posee un amplio espectro de funciones fisiológicas esenciales. Una de las razones para la diversa gama de funciones de la CaM radica en su habilidad para interactuar con muchas proteínas y modular su actividad de diferentes maneras. Desde su descubrimiento como activador de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos (PDE) a principio de los años 70, y nombrada como calmodulina por Cheung [Cheung, 1980], se ha acumulado una gran cantidad de información acerca de su función en el control de procesos fisiológicos importantes, revisados en [Berchtold, y Villalobo, 2014]. El conocimiento generado acerca de la estructura y funcionalidad de la CaM y sus proteínas diana intracelulares, la dinámica de la unión de iones Ca^{2+} y los mecanismos de interacción con sus múltiples proteínas diana, sean estos dependientes o no de Ca^{2+} , es extenso. El calcio se une a la CaM, primero en los sitios del dominio COOH-terminal, que son los de mayor afinidad, y luego a los dos sitios del dominio NH₂-terminal. Sin embargo, en presencia de proteínas diana, la unión a calcio se vuelve cooperativa para los cuatro sitios, y la afinidad relativa a estos sitios varía. La concentración de calcio dentro de las células puede variar en un amplio intervalo (100-10000 nM) dependiendo del tipo celular y de su nivel de estimulación por diferentes señales extracelulares, por toxinas o en otras situaciones de estrés celular. Estas variaciones activan diferentes cascadas de señalización intracelular que se desencadenan en función de la sensibilidad de las distintas proteínas de unión de calcio a diferentes concentraciones del catión. La presencia de la apo-CaM es esencial para la supervivencia de las células, y ahora se sabe que algunas enzimas (óxido nítrico sintasa, PDE, glicógeno fosforilasa, miosina, miosina de vellosidades, y proteínas neuronales) tienen mayor afinidad para interactuar con esta forma de la CaM [Menyhard *et al.*, 2009].

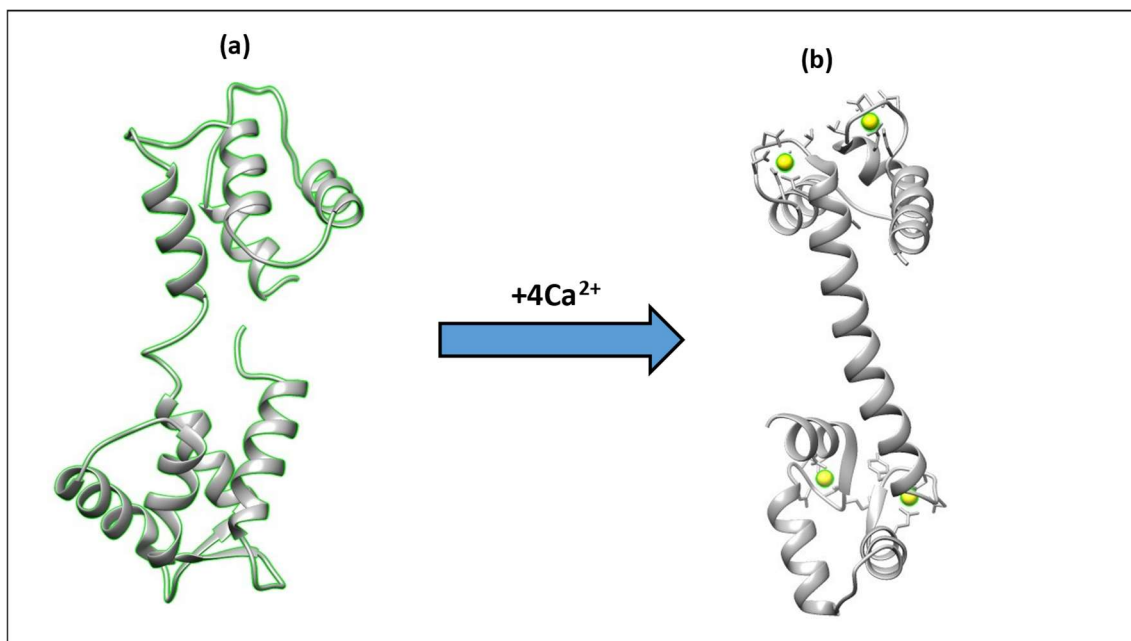


Figura 3. Conformaciones adoptadas por la CaM: (a) apo-CaM (PDB ID: 1CFD) y (b) holo-CaM (Ca^{2+} -CaM, PDB ID: 1CLL). Figuras tomadas de Protein Data Bank [<https://www.rcsb.org>].

La unión de hasta cuatro iones Ca^{2+} produce un fuerte cambio en la estructura global de la proteína, que cambia de forma elipsoide globular a forma de mancuerna, promoviendo también cambios característicos en los dominios terminales (**Figura 3**). Un hecho notable a resaltar es que la CaM une también a otros cationes metálicos con relativamente baja especificidad, como La^{3+} , Tb^{3+} , Pb^{2+} , Sm^{3+} , Sr^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} y Cu^{2+} [Mills y Johnson, 1985; Ouyang y Vogel, 1998]. Más aún, Andersson *et al.* (1982) demostraron utilizando resonancia magnética nuclear (RMN) de ^{43}Ca and ^{113}Cd que Cd^{2+} y Zn^{2+} compiten con Ca^{2+} por los cuatro sitios de unión en la CaM. Estos cambios causan que se expongan regiones hidrofóbicas entre ambos dominios; esta conformación altamente activa se denomina “forma abierta”. Las regiones hidrofóbicas de CaM están rodeados por aminoácidos cargados negativamente, por lo que los estados activados por Ca^{2+} atraerán preferentemente ligandos de naturaleza hidrofóbica y/o polarizados positivamente [Kovalevskaya *et al.*, 2013]. En base a estas propiedades estructurales de la forma abierta se han desarrollado compuestos catiónicos de naturaleza anfifílica que forman complejos con la CaM, estabilizados por interacciones iónicas e hidrofóbicas y que actúan como antagonistas de esta proteína [Weis *et al.*, 1980]. Estos compuestos se denominan genéricamente antagonistas de la CaM y se han

utilizado extensivamente como pruebas de tipo farmacológico para estudiar la participación de la Ca^{2+} -CaM en la regulación de eventos celulares dependientes del ión Ca^{2+} . Entre ellos se encuentran la trifluoperazina (TFP) y el compuesto 48-80 (C48-80) [Bar-Sagi y Prives, 1983; Gietzen, 1983]. La demostración posterior de que sus acciones biológicas implican también su interacción con otras proteínas, ver por ejemplo [Gietzen, 1983], ha limitado seriamente su uso en cultivos celulares para diseccionar mecanismos moleculares de la señalización intracelular por la vía de Ca^{2+} -CaM y sus posibles aplicaciones terapéuticas [Veigl *et al.*, 1989; Caldirola *et al.*, 1992]. Sin embargo, debe reseñarse que la TFP es un fármaco de uso clínico en la actualidad para tratar la esquizofrenia y la ansiedad, ver por ejemplo [<https://www.healthline.com/health/drugs/trifluoperazine-oral-tablet#take-as-directed>].

El uso de derivados fluorescentes de las proteínas es una estrategia ampliamente utilizada para monitorizar la interacción de estas con sus ligandos intracelulares, con otras proteínas y con estructuras subcelulares (como bicapas lipídicas o membranas biológicas). En el caso de la CaM, diferentes investigadores han sintetizado varios derivados fluorescentes que no alteran sus propiedades de unión al Ca^{2+} [Douglass *et al.*, 2002; Gangopadhyay *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2005; Gonzalez-Andrade *et al.*, 2009; Loving e Imperiali, 2009; Corbacho *et al.*, 2017]. Estos derivados han sido utilizados para medir las propiedades cinéticas de su interacción con antagonistas de la CaM [Douglass *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2005; Gonzalez-Andrade *et al.*, 2009] y con CaMBP y fragmentos peptídicos de estas [Gangopadhyay *et al.*, 2004; Loving e Imperiali, 2009; Corbacho *et al.*, 2017]. Las medidas de fluorescencia utilizando estos derivados fluorescentes permiten determinar características estructurales y constantes de formación de los complejos formados entre la CaM y CaMBP y con fragmentos peptídicos de las CaMBP [Gangopadhyay *et al.*, 2004]. En un estudio previo de nuestro equipo de investigación, mostramos que la medida del cambio de la intensidad de fluorescencia del derivado fluorescente Badan-CaM permiten monitorizar la interacción de la CaM con péptidos β -amiloides y determinar la constante de disociación de los complejos formados entre estas moléculas [Corbacho *et al.*, 2017]. Una ventaja adicional de la Badan-CaM es que la fluorescencia de Badan aumenta aproximadamente 40 veces cuando la

CaM se satura por Ca^{2+} [Gangopadhyay *et al.*, 2004; Corbacho *et al.*, 2017]. Este hecho hace que la Badan-CaM sea un derivado fluorescente muy apropiado también para determinar posibles cambios de la afinidad de la CaM por Ca^{2+} cuando forma complejos con otras moléculas (péptidos o proteínas) o iones.

La calmodulina (CaM) es una proteína amortiguadora del calcio que se expresa en las neuronas a concentraciones mucho más altas que en las células no excitables, alcanzando concentraciones micromolares en las neuronas [Xia y Storm, 2005]. La concentración de CaM expresada en el cerebro está entre 4 y 15 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido húmedo, con el mayor contenido en las regiones corticales, el estriado, el hipocampo, la amígdala y la sustancia negra [Biber *et al.*, 1984].

Por otro lado, la calbindina D28k es una importante proteína citoplasmática amortiguadora del calcio que se expresa en niveles particularmente altos en el sistema nervioso central (SNC) y el epitelio de absorción intestinal y renal [Schmidt, 2012]. La calbindina D28k se identificó por primera vez en el intestino, el colon, el riñón y el útero de *Gallus gallus domesticus* (pollo) [Wasserman *et al.*, 1969], donde participa en el movimiento transcelular de calcio a través del epitelio de absorción, principalmente en los túbulos contorneados distales del riñón [Lambers *et al.*, 2006]. La calbindina D28k también se expresa a niveles elevados en el SNC, donde aporta hasta un 1,5 % de la proteína soluble total [Chistakos *et al.*, 1989; Berggard, Szczepankiewicz *et al.*, 2002], y es particularmente abundante en las neuronas piramidales del hipocampo y en neuronas corticales del sistema nervioso central [Baimbridge *et al.*, 1992], que se encuentran en regiones del cerebro altamente sensibles a la neurodegeneración en la enfermedad de Alzheimer. En las células de riñón de pollo, la expresión de la calbindina D28k depende de la vitamina D, y esto es también cierto para otras células absorbentes [Clemens *et al.*, 1989], pero no en el SNC [Arnold y Heintz, 1997]. Está bien documentado en la literatura que la calbindina D28k tiene propiedades neuroprotectoras en el SNC [Yenari *et al.*, 2001; Yuan *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2011], y recientemente se ha demostrado que su depleción en un modelo de ratón de Alzheimer acelera la pérdida neuronal, la apoptosis y la disfunción mitocondrial [Kook *et al.*, 2014]. La actividad antiapoptótica de la calbindina D28k al unirse e inhibir a la caspasa-3 puede explicar, al menos en parte, su efecto neuroprotector [Bobay *et al.*, 2012;

Bellido *et al.*, 2000]. La calbindina D28k pertenece a una superfamilia de proteínas de unión del Ca^{2+} , que incluye a la calmodulina y a la troponina C. Todas estas proteínas tienen un alto contenido helicoidal y comparten estructuras de mano EF que constituyen los dominios de unión del calcio. La calbindina D28k tiene una estructura primaria de 261 aminoácidos (masa molecular de 30 kDa) y está codificada por el gen *CALB1*. La calbindina D28k tiene un alto porcentaje de estructura α -helicoidal y las hélices forman seis motivos de mano EF que se mantienen unidos en un solo pliegue globular a través de interacciones hidrofóbicas [Kojetin *et al.*, 2006]. Como en la mayoría de las proteínas de unión del Ca^{2+} , el ion calcio se une en la región del bucle entre las dos hélices de la mano EF; en la calbindina D28k, un ion de calcio está coordinado en cuatro de los seis motivos de mano EF. Las manos EF 1, 3, 4 y 5 unen calcio con gran afinidad [Akerfeldt *et al.*, 1996; Venters *et al.*, 2003]. Se ha demostrado que la calbindina D28k sufre cambios estructurales al unirse al calcio, lo que apoya su función como proteína transductora de la señal del calcio [Berggard *et al.*, 2002]. Sin embargo, tanto la apo como la proteína saturada por calcio presentan residuos hidrofóbicos expuestos en la superficie, lo que indica que la calbindina D28k puede formar complejos con dominios hidrofóbicos complementarios de otras proteínas en ambos estados [Berggard *et al.*, 2000]. Se ha demostrado que la calbindina D28k interacciona con una variedad de proteínas de interés terapéutico en procesos neurodegenerativos, como including membrane ATPases, IMPase, RanBPM, procaspase-3, caspase-3, and TRPV5 [Schmidt, 2012]. La calbindina D28k se une y aumenta la actividad catalítica de la inositol monofosfatasa (IMPasa), la supuesta diana terapéutica de la terapia con litio en el trastorno bipolar [Berggard, Szczepankiewicz *et al.*, 2002; Harwood, 2005]. Más recientemente, se ha demostrado que la inhibición de la IMPasa aumenta la autofagia y la eliminación de péptidos involucrados en la patogenia de las enfermedades de Huntington y Parkinson [Sakar *et al.*, 2005], lo que indica que la inhibición de la interacción calbindina-IMPasa puede ser de utilidad terapéutica benéfica en estas enfermedades. La interacción entre la calbindina D28k y la IMPasa se ha modelado *in silico* y la información obtenida se ha utilizado para desarrollar una serie de nuevos inhibidores peptídicos [Levi *et al.*, 2013].

1.4. *Los péptidos β -amiloide neurotóxicos modulan la actividad de CAMBP relevantes en el control de la homeostasis y la señalización del Ca^{2+} en neuronas.*

Las CaMBP desempeñan un papel importante en la función y excitabilidad neuronal, y muchas de ellas están asociadas a compartimentos subcelulares en las neuronas. En la **Tabla 1** se relacionan las CaMBP más relevantes en el control de la homeostasis y la señalización del Ca^{2+} en neuronas para las que se han reportado efectos moduladores de los péptidos β -amiloide neurotóxicos. A continuación, se revisan brevemente los estudios en los que se han reportado estos efectos y sus implicaciones para la supervivencia y funciones neuronales. La falta de antagonistas específicos para la formación de los complejos entre los péptidos $A\beta$ y la CaM en la modulación de las CaMBP por los péptidos $A\beta$, no ha permitido evaluar experimentalmente la implicación de estos complejos en las alteraciones de la homeostasis y señalización del Ca^{2+} intracelular en los estudios con cultivos celulares realizados hasta la fecha del inicio de esta tesis doctoral. Por esta razón, la búsqueda de antagonistas que puedan ser utilizados como herramientas metodológicas en estudios de cultivos celulares y eventualmente en el desarrollo de nuevas terapias para la EA ha sido uno de los objetivos de esta tesis doctoral.

Tabla 1. CaMBP de neuronas para las que se ha reportado modulación de su actividad por los péptidos β -amiloide neurotóxicos.

1. CaMBP implicadas en el control de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en neuronas.

- Ca^{2+} -ATPasas de la membrana plasmática (PMCA)
- Receptores de rianodina (RYR) del retículo endoplasmático

2. CaMBP implicadas en la señalización del Ca^{2+} en neuronas.

- Proteína quinasas dependientes de Ca^{2+} /CaM (CaMK)
 - Calcineurina
 - Receptores de N-metil-D-aspartato (NMDAR)
 - Canales de calcio operados por voltaje de tipo L (LTCC)
-

La CaM se une y modula la actividad de la PMCA, una proteína que tiene un papel importante reconocido en el control de la homeostasis del calcio citosólico en las neuronas, porque es el principal sistema de extrusión del Ca^{2+}

del citosol neuronal [Lopreiato *et al.*, 2014; Mata, 2018]. Mata y colaboradores [Berrocal *et al.*, 2009; Berrocal *et al.*, 2012] han demostrado que la PMCA es la única bomba de Ca^{2+} cuya actividad está alterada en muestras de cerebros de la EA comparados con muestras de cerebros control de la misma edad y que es la única bomba de Ca^{2+} del cerebro que se inhibe directamente por los péptidos $\text{A}\beta$ neurotóxicos. Los estudios mecanísticos desarrollados *in vitro* indican que los agregados de estos péptidos $\text{A}\beta$ son más potentes como inhibidores de la actividad de la PMCA que los monómeros [Berrocal *et al.*, 2012] y que el efecto inhibitor es debido a la interacción de los péptidos $\text{A}\beta$ con el dominio COOH-terminal de la PMCA [Mata, 2018]. Además, en estos estudios Mata y colaboradores han demostrado que el pretratamiento de la proteína purificada con Ca^{2+} -CaM protege contra la inhibición de la PMCA por los péptidos $\text{A}\beta$ [Berrocal *et al.*, 2012].

Los receptores RYR del retículo endoplasmático unen con alta afinidad a la CaM (K_d nanomolar) y la Ca^{2+} -CaM (la forma predominante de la CaM a concentraciones citosólicas elevadas del Ca^{2+}) inhibe la actividad de los receptores RYR [Meissner, 2002]. Sin embargo, los resultados experimentales obtenidos *in vitro* han demostrado que la aplicación de oligómeros de $\text{A}\beta$ solubles producen una fuerte estimulación de la actividad de los RYR, causado por un incremento de aproximadamente 10-veces del tiempo de apertura del canal [Shtifman *et al.*, 2010]. La estimulación de la liberación de Ca^{2+} del RE mediada por los RYR se ha confirmado en cultivos de neuronas de hipocampo tratadas con oligómeros de $\text{A}\beta(1-42)$ [Paula-Lima e Hidalgo, 2013]. Pero los autores de este estudio matizan que no pueden excluir la posibilidad de modulación indirecta de los RYR por el estrés oxidativo inducido en el cultivo de las neuronas de hipocampo tras 2-3 horas de incubación con el péptido $\text{A}\beta(1-42)$ a concentraciones ≥ 500 nM. La posibilidad de que la formación de complejos $\text{A}\beta(1-42)$:CaM esté implicada en esta modulación no ha sido considerada por los autores de este estudio.

Las CaMK son una familia de proteínas quinasas de serina/treonina (Ser/Thr) [Wayman *et al.*, 2008], que se expresan abundantemente en el cerebro. En algunas regiones, como el hipocampo, los niveles de CaMKII pueden llegar al 2 % del total de proteínas [Eroundu y Kennedy, 1985]. La CaMKII es la isoforma más estudiada de la familia CaMK en relación con la EA, debido a su

papel central en la plasticidad neuronal y las funciones cognitivas, como el aprendizaje [Bayer y Schulman, 2019]. El complejo Ca^{2+} -CaM se une a la región reguladora de la CaMKII y produce un cambio conformacional que activa la fosforilación de sus sustratos [Matsuo *et al.*, 2009] así como la autofosforilación [Zalcmán *et al.*, 2018]. La autofosforilación evita que la enzima vuelva a su forma inactiva y mantiene la actividad de CaMKII, incluso después de que disminuyan los niveles intracelulares de Ca^{2+} , lo que permite actividades autónomas de CaMKII e independientes de Ca^{2+} [Hudmon y Schulman, 2002]. Muchos estudios han demostrado que la actividad de α -CaMKII es esencial para la inducción de la potenciación a largo plazo (LTP) en cortes de hipocampo, aprendizaje espacial y memoria [Malinow *et al.*, 1989; Silva *et al.*, 1992; Bach *et al.*, 1995; Mayford *et al.*, 1996; Frankland *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2003; Elgersma *et al.*, 2004]. Se ha demostrado que el tratamiento de neuronas del hipocampo en cultivo con oligómeros de A β inhibe la activación de la α CaMKII [Min *et al.*, 2013; Ghosh y Giese, 2015] y que A β bloquea la activación de la CaMKII durante la inducción de la LTP [Zhao *et al.*, 2004]. La inhibición de la CaMKII por A β puede ser un mecanismo primario de defensa neuronal, porque la CaMKII es una proteína quinasa que fosforila a la proteína tau, y esta fosforilación se ha sugerido que potencia la fosforilación subsiguiente de tau por la isoforma 5 de la proteína quinasa dependiente de ciclina y por la glucógeno sintasa quinasa- β [Sengupta *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2007].

La calcineurina (o proteína fosfatasa 2B) es una proteína fosfatasa Ser/Thr dependiente de Ca^{2+} y calmodulina [Sharma y Parameswaran, 2018] que se activa con concentraciones nanomolares de Ca^{2+} [Klee *et al.*, 1998]. La calcineurina se expresa principalmente en la corteza cerebral, el hipocampo y el cuerpo estriado, así como en el cerebelo [Solà *et al.*, 1999]. En las neuronas, la calcineurina se encuentra en el pericario y el núcleo [Solà *et al.*, 1999] y en las terminales sinápticas [Kuno *et al.*, 1992]. Dependiendo de la fuerza, la duración y el sitio del estímulo de Ca^{2+} , la calcineurina puede aumentar o disminuir la eficacia sináptica y la excitabilidad celular a través de la modulación de los canales iónicos, los receptores de neurotransmisores, y las proteínas del citoesqueleto, las quinasas, otras fosfatasas y los factores de transcripción [Groth *et al.*, 2003]. La inhibición de la LTP inducida por tratamiento con A β en

el giro dentado del hipocampo se bloquea por inhibidores específicos de la calcineurina, indicando que la activación de la calcineurina contribuye significativamente a la inhibición de la LTP por A β [Chen *et al.*, 2002]. El tratamiento de cultivos primarios de neuronas CA3 del hipocampo con oligómeros de A β produce la relocalización intracelular de la α CaMKII desde las dendritas al soma [Gu *et al.*, 2009; Reese *et al.*, 2011]. Esta relocalización intracelular de la α CaMKII se ha observado también en un modelo de ratón transgénico de la EA esporádica, en el que los oligómeros de A β se inyectan en los ventrículos cerebrales, e inhibidores de la calcineurina la bloquean [Reese *et al.*, 2011].

Los NMDAR son fundamentales para la expresión de la LTP en el hipocampo y las regiones corticales [Berberich *et al.*, 2005; Fox *et al.*, 2006], y la sobreexpresión de la subunidad NR2B en el hipocampo aumenta la amplitud de LTP en la región CA1 y mejora el aprendizaje en ratones [Tang *et al.*, 1999]. El NMDAR puede ser modulado directa o indirectamente por la CaM o por la CaMKII, respectivamente [Lacobucci *et al.*, 2017]. En la modulación directa de CaM-NMDAR, después de la entrada de calcio, la CaM induce la inactivación del NMDAR a través de una reducción del tiempo de apertura del canal de Ca $^{2+}$ al unirse a dos regiones del dominio COOH-terminal de la subunidad NR1, un sitio de alta afinidad ($K_d \approx 4$ nM) y un sitio próximo al anterior de menor afinidad ($K_d \approx 87$ nM) [Ehlers *et al.*, 1996]. Esta inactivación dependiente del Ca $^{2+}$ evita la entrada excesiva de Ca $^{2+}$ a través del NMDAR que puede provocar neurodegeneración y excitotoxicidad [Wang *et al.*, 2008]. Además, la modulación indirecta del NMDAR por la CaMKII es crucial para la LTP y la depresión a largo plazo (LTD) en el cerebro [Barcomb *et al.*, 2016], ya que la interrupción de la NMDAR/CaMKII produce déficit en la LTP del hipocampo y en el aprendizaje espacial [Zhou *et al.*, 2007]. Los oligómeros de A β solubles se unen al NMDAR y potencian el influjo del Ca $^{2+}$ a través de este receptor, lo que induce la liberación posterior del Ca $^{2+}$ desde orgánulos subcelulares al citosol [Emptage *et al.*, 1999; De Felice *et al.*, 2007]. Además, se ha demostrado que los oligómeros de A β colocalizan con NMDAR en membranas postsinápticas de los árboles dendríticos de las neuronas [Lacor *et al.*, 2004; Green, 2009]. La activación directa del NMDAR por oligómeros solubles del péptido A β (1-42) se ha demostrado con

receptores de tipo NR1/NR2A y NR1/NR2B expresados heterológamente en ovocitos de *Xenopus laevis* [Texidó *et al.*, 2011]. Esta sobreestimulación de los NMDAR por A β induce eleva la concentración del Ca²⁺ citosólico a los niveles patológicos que producen la pérdida gradual de la función sináptica y finalmente la muerte neuronal por excitotoxicidad. Las neuronas del hipocampo son más sensibles a la excitotoxicidad inducida por el péptido A β que las neuronas corticales, y que las neuronas CA1 del hipocampo son más sensibles que las neuronas CA3 y que las neuronas del giro dentado del hipocampo [Ghosh y Giese, 2015]. Es interesante notar que esto se correlaciona con el orden jerárquico de pérdida funcional en estas regiones del cerebro observado en el avance de la EA [West *et al.*, 1994]. Estos resultados han servido como base racional para los ensayos clínicos de la memantina, un antagonista de los NMDAR, como agente neuroprotector en la EA [Wang y Reddy, 2017].

La entrada de calcio a través de los canales de calcio operados por voltaje es crucial para la liberación de neurotransmisores, las vías de señalización intracelular, la expresión génica y la plasticidad sináptica [Turner *et al.*, 2011]. Entre ellos, los de tipo L (LTCC) desempeñan un papel importante en la plasticidad neuronal, el aprendizaje y la memoria. Una alteración en la función y/o regulación de estos canales se ha asociado con enfermedades neuropsiquiátricas, migrañas, ataxia cerebelosa, autismo, esquizofrenia, trastorno bipolar y depresión [Berger y Bartsch, 2014; Nanou y Catterall, 2018]. Las isoformas de los LTCC, Cav1.2 y Cav1.3, se expresan más en el cerebro y han recibido una mayor atención con respecto a su papel en enfermedades neurológicas y psiquiátricas [Berger y Bartsch, 2014]. Además, la entrada de calcio a través de los LTCC está modulada por la CaM unida constitutivamente, lo que produce la inactivación dependiente de Ca²⁺ [Liang *et al.*, 2003] y previene el daño neuronal debido a la entrada excesiva de Ca²⁺ [Striessnig *et al.*, 2014]. Brevemente, el cambio conformacional de la CaM tras la unión del Ca²⁺ promueve la inactivación de los LTCC por interacción con sus sitios efectores adicionales del dominio COOH-terminal en Cav1.2 y, en el caso de Cav1.3, también del dominio NH₂-terminal [Striessnig *et al.*, 2014]. Una disminución de la actividad de los LTCC se ha reportado en el hipocampo de ratón transgénico APP/PS1, que es un modelo animal de la EA [Thibault *et al.*, 2012]. En un estudio

reciente de nuestro equipo de investigación [Poejo *et al.*, 2021] hemos reportado la inhibición de los LTCC de las neuronas granulares del cerebelo por concentraciones intracelulares submicromolares de dímeros del péptido A β (1-42). En este artículo concluimos que esta es una inhibición probablemente mediada por los complejos A β (1-42):CaM, pero indicamos explícitamente que serán necesarios estudios experimentales adicionales para demostrar esta hipótesis. Debido a la importante contribución del influjo de Ca²⁺ a través de los LTCC a la elevación sostenida de la concentración del Ca²⁺ citosólico en las neuronas [Willis *et al.*, 2010; Gutierrez-Merino *et al.*, 2014; Gutierrez-Merino *et al.*, 2016; Fortalezas *et al.*, 2018], la inhibición de los LTCC por los péptidos A β puede ser visualizado como un mecanismo molecular de neuroprotección para prevenir que se alcancen los niveles neurotóxicos del Ca²⁺ citosólico. Es interesante reseñar que ha sido reportado que la nimodipina, una dihidropiridina antagonista de los LTCC, tiene efectos beneficiosos en pacientes de la EA, ya que parece ralentizar el avance de las disfunciones neurológicas asociadas a la enfermedad [Birks *et al.*, 2002].

1.5. *Los sistemas redox asociados a los rafts lipídicos de la membrana neuronal: la nNOS y la citocromo b₅ reductasa (Cb5R).*

La relevancia del estrés oxidativo en la neurodegeneración cerebral observada en los enfermos de Alzheimer es ampliamente reconocida [Lee HJ., *et al.*, 2014]. En la primera parte de la Introducción de esta tesis doctoral se ha documentado la capacidad prooxidante de los péptidos β -amiloide y la disfunción mitocondrial en la EA, que también contribuye al estrés oxidativo celular. Pero ha sido también ampliamente documentado el hecho de que los péptidos β -amiloide interaccionan fuertemente con colesterol y gangliósidos, lípidos que están muy enriquecidos en los microdominios de la membrana plasmática denominados *rafts* lipídicos. Más aún, se ha demostrado que estos lípidos potencian la formación de oligómeros de A β y estructuras fibrilares, y que la formación de estas últimas es dependiente de colesterol [Choo-Smith y Surewicz, 1997; Choo-Smith *et al.*, 1997; Ariga *et al.*, 2001; Kakio *et al.*, 2001; Kakio *et al.*, 2002; Wood *et al.*, 2002; Matsuzaki *et al.*, 2010]. Varios estudios han

reportado que en cultivos de neuronas los *rafts* lipídicos tiene un papel importante en la captura e internalización de los péptidos A β añadidos al medio extracelular, revisados en [Lai y McLaurin, 2011]. Además, se ha demostrado que los oligómeros de A β aplicados exógenamente a las neuronas en cultivo se concentran en los *rafts* lipídicos [Williamson *et al.*, 2008; Poejo *et al.*, 2021a]. También se ha demostrado que los péptidos A β dimericos no fibrilares se acumulan en *rafts* lipídicos del ratón Tg2576, un modelo transgénico de la EA [Kawarabayashi *et al.*, 2004].

Los nanodominios de *rafts* lipídicos son una estructura subcellular focalizada e integradora en el inicio de la señalización del calcio intracelular con la generación de óxido nítrico (ver la **Figura 4**). Utilizando microscopía de fluorescencia el equipo de investigación del director de esta tesis ha demostrado que la nNOS está asociada a los nanodominios enriquecidos en los sistemas de entrada del ión calcio más importantes en las neuronas granulares del cerebelo, receptores de NMDA y LTCC [Marques-da-Silva y Gutierrez-Merino, 2012]. La proximidad entre los sistemas de entrada de calcio y producción de este gas permite una estrategia celular eficiente para garantizar una respuesta celular rápida y modulada en neuronas para prevenir una hiperactividad metabólica neurotóxica en el cerebro, en dónde tienen que responder simultáneamente a muchas señales procedentes de las células vecinas (otras neuronas y glía) [Gutierrez-Merino *et al.*, 2014]. Más aún, teniendo en cuenta que la activación de la nNOS requiere concentraciones relativamente elevadas de calcio (0,2-0,4 μ M [Bredt y Snyder, 1994]), la localización de la nNOS en la proximidad de los receptores de NMDA y de los LTCC permite la rápida y fuerte activación de la producción del óxido nítrico en microdominios asociados a los *rafts* lipídicos sin una elevación sostenida de la concentración citosólica del ión calcio, que es fuertemente neurotóxica [Marques-da-Silva y Gutierrez-Merino, 2012].

Sin embargo, a los *rafts* lipídicos se encuentra asociada una enzima generadora del óxido nítrico (nNOS) [Sato *et al.*, 2004; Marques-da-Silva y Gutierrez-Merino, 2012] y una enzima potencialmente generadora del anión superóxido (Cb_5R) [Marques-da-Silva *et al.*, 2010; Samhan-Arias *et al.*, 2012; Gutierrez-Merino *et al.*, 2014]. Esto implica que en situaciones de estrés celular, la desregulación de estos nanodominios de la membrana plasmática neuronal

puede desempeñar un papel relevante en la generación focalizada del peroxinitrito (ver la **Figura 4**), que es un oxidante muy dañino para las neuronas y que se produce en procesos neurodegenerativos que cursan a través de estrés oxidativo [Gutierrez-Merino *et al.*, 2014]. Por otra parte, la generación de este oxidante es particularmente nociva para el control de la homeostasis del calcio citosólico en las neuronas, porque los principales sistemas de transporte del ión calcio de la membrana plasmática neuronal (NMDAR, LTCC, PMCA y NCX) son dianas moleculares del peroxinitrito y de otras ROS/RNS generadas a partir del mismo en procesos neurodegenerativos en el sistema nervioso central y periférico [Hidalgo y Donoso, 2008; Gutierrez-Merino, 2008]. Además se han reportado disfunciones del metabolismo lipídico en la enfermedad de Alzheimer [Rojo *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2014], y el sistema redox Cb_5/Cb_5R realiza funciones esenciales en este metabolismo, en concreto, en la introducción de insaturaciones en los ácidos grasos, en la biosíntesis del colesterol y de derivados de colesterol, como hidroxicolesteroles y hormonas esteroideas. Por tanto, la investigación de los posibles efectos de los péptidos $A\beta$ sobre la actividad de la nNOS y de la Cb_5R debe ser tomada en consideración para la racionalización de los mecanismos moleculares subyacentes a la generación del estrés oxidativo en la EA.

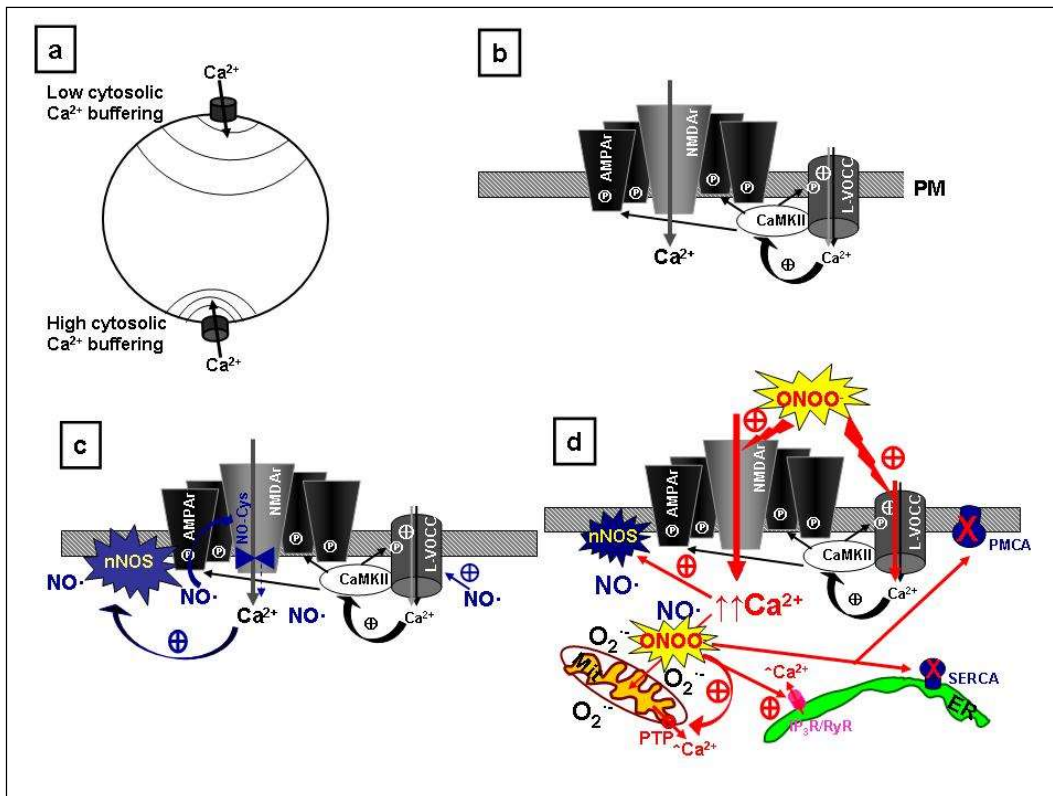


Figura 4. Implicaciones funcionales de la asociación de los sistemas de transporte de calcio y generadores de ROS/RNS en la membrana plasmática neuronal. (a) Generación de picos transitorios de concentraciones micromolares de calcio en elementos de volumen de tamaño de nm a submicrometros. El tamaño de estos elementos de volumen es fuertemente dependiente de la intensidad de la corriente de entrada de calcio a través de los sistemas de transporte de calcio asociados a los rafts lipídicos y de la capacidad de tamponamiento del calcio citosólico. (b) Más rápida y duradera potenciación de los NMDAR. La entrada de calcio a través de los L-VOCC (=LTCC) dispara la activación de la CaMKII vecinal en el raft lipídico, lo que produce: (1) la activación de los L-VOCC y potenciación de la entrada de calcio y (2) el reclutamiento de receptores de glutamato de tipo AMPA activados (AMPA). (c) Potenciación de la protección por $\cdot\text{NO}$ contra la excitotoxicidad de L-glutamato. La proximidad de la nNOS a los NMDAR y los L-VOCC permite alcanzar concentraciones de $\cdot\text{NO}$ más elevadas cerca de estos sistemas de transporte de calcio potenciando los efectos reguladores del $\cdot\text{NO}$ sobre estos sistemas de transporte. (d) Inducción de la desregulación de la concentración del calcio citosólico por el peroxinitrito. Una consecuencia dramática para las células de una sobreestimulación de la actividad de los sistemas de transporte de calcio asociados a los rafts lipídicos derivada de la co-localización de la nNOS. Otras abreviaturas utilizadas en esta figura: PM, membrana plasmática; Mit, mitocondria; ER, retículo endoplasmático; ONOO⁻, peroxinitrito; $\text{\textcircled{P}}$, fosforilación de la proteína; $\text{\textcircled{+}}$, estimulación; $\text{\textcircled{\times}}$ and X, inhibición o bloqueo. (Figura tomada de Gutierrez-Merino et al., 2014).

La nNOS es una enzima estimulada por la Ca^{2+} -CaM, que genera un segundo mensajero intracelular de gran relevancia para el aprendizaje y la memoria [Wang *et al.*, 2003; Conti *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2009]. La nNOS se

expresa a concentraciones particularmente elevadas en el hipocampo con una distribución intracelular generalizada (núcleo, citoplasma, membrana plasmática y espinas sinápticas) y media la plasticidad sináptica, incluida la LPT, y la supervivencia y señalización neuronal [Zhou *et al.*, 2004]. La inhibición de la CaMKII (producida por los péptidos A β como se ha comentado previamente) disminuye el nivel de fosforilación de la Ser847 de la nNOS, lo que resulta en disminución de la activación de la nNOS por la Ca²⁺-CaM [Hayashi *et al.*, 1999; El-Mili *et al.*, 2008]. Este es un efecto neuroprotector, porque sirve para atenuar la sobreproducción de óxido nítrico causada por la elevación sostenida de la concentración del Ca²⁺ citosólico en las neuronas que producen los péptidos A β (documentada previamente en un apartado previo de la Introducción de esta tesis doctoral). Además, se ha reportado que la nNOS se inhibe *in vitro* por varios péptidos A β con constantes de inhibición entre 0,81 y 14 μ M [Padayachee *et al.*, 2011]. Sin embargo, estas concentraciones de péptidos A β no es probable que se lleguen a alcanzar en las neuronas hasta estados muy avanzados de la degeneración cerebral en la EA.

La citocromo *b*₅ reductasa (Cb₅R) es una enzima perteneciente a la familia de las oxidorreductasas que está presente a concentraciones relativamente altas en tejido hepático. Esta proteína cataliza la reducción del ferricitocromo b₅ a ferrocitocromo usando NADH como sustrato. La estructura tridimensional de la proteína revela dos regiones distintas altamente conservadas denominadas dominios FAD y NADH [Samhan-Arias y Gutierrez-Merino, 2014b; Gutierrez-Merino *et al.*, 2022]. El dominio FAD tiene una gran hendidura en la que se encuentra el grupo prostético FAD, y el dominio NADH proporciona una posición adecuada el asentamiento de NADH, como sustrato de la enzima.

Existen dos isoformas de la Cb₅R. La isoforma dominante es una variante unida a la membrana que consta de un dominio de anclaje a la membrana de aproximadamente 3kDa un dominio catalítico hidrofílico soluble de aproximadamente 31 kDa, donde localiza el dominio catalítico [Samhan-Arias y Gutierrez-Merino, 2014b]. La isoforma soluble está formada únicamente por el dominio catalítico de 31kDa. Estudios previos han demostrado que las variantes solubles y de membrana de Cb₅R están codificadas por el mismo gen y son productos de corte y empalme alternativo [Pietrini *et al.*, 1988]. La isoforma de

membrana se ha localizado en la membrana plasmática y en el retículo endoplasmático, las mitocondrias, el aparato de Golgi, los peroxisomas, el núcleo, el retículo sarcoplasmático y las sinapsis neuronales, y se ha demostrado que es un componente crítico del sistema microsomal de transporte de electrones [Samhan-Arias y Gutierrez-Merino, 2014b]. Cabe destacar que un mapeo detallado de su ubicación mostró una distribución muy heterogénea en diferentes áreas cerebrales, con un significativo enriquecimiento en las neuronas piramidales del hipocampo, en las células de Purkinje y en la capa granular del cerebelo y en núcleos de neuronas piramidales del tronco del encéfalo [Sanchez-López *et al.*, 2016]. Esta proteína, junto el citocromo b_5 (Cb_5), participa en una variedad de funciones metabólicas, como elongación y desaturación de ácidos grasos, anabolismo del colesterol, reducción de metahemoglobina y señalización redox de neuronas [Mizaei, 2010; Samhan-Arias y Gutierrez-Merino, 2014b] incluido el metabolismo y la desintoxicación de xenobióticos [Rhoas *et al.*, 2011; Abouraya *et al.*, 2011], la bioactivación de fármacos cancerígenos [Sangeetha *et al.*, 2012]. Por el contrario, la isoforma soluble de la Cb_5R existe principalmente en los eritrocitos circulantes de mamíferos y es importante para la reducción de la metahemoglobina a hemoglobina, regulando así de manera efectiva la concentración de metahemoglobina en estas células. La deficiencia funcional en las isoformas de Cb_5R inducen el desarrollo de la metahemoglobinemia congénita recesiva, la primera enfermedad que se asoció directamente con una deficiencia enzimática. Los pacientes que sufren esta dolencia son especialmente susceptibles a la metahemoglobinemia tóxica resultante por ejemplo. como consecuencia de la ingestión de fármacos oxidantes [Percy *et al.*, 2005]. En la literatura, se informa que la actividad específica (k_{cat}) de la enzima nativa funcional purificada oscila entre un mínimo de 368 s^{-1} (humana), y un máximo de 1060 s^{-1} (variante bovina) [Roma *et al.*, 2006].

La actividad de la Cb_5R ha asociado la producción de ROS en las neuronas granulares del cerebelo vinculada a apoptosis con un aumento de los niveles de proteína, un incremento de esta enzima en los dominios de tipo *raft* lipídico de la membrana plasmática y una estimulación de su actividad enzimática [Samhan-Arias *et al.*, 2018; Samhan-Arias y Gutierrez-Merino, 2014b; Samhan-Arias *et al.*, 2012; Samhan-Arias *et al.*, 2009]. La caracterización

bioquímica de la producción de ROS por la Cb₅R ha demostrado que esta enzima es capaz de producir anión superóxido en ausencia de aceptores de electrones presentes de manera natural en las células, y esta producción se estimula en presencia de algunos pares redox, como el citocromo c [Samhan-Arias y Gutierrez-Merino, 2014a; Samhan-Arias y Gutierrez-Merino, 2014b; Samhan-Arias *et al.*, 2018]. Esta producción de anión superóxido por parte de Cb₅R es particularmente relevante en la apoptosis neuronal, ya que se ha demostrado que se estimula fuertemente por el citocromo c, que se libera de las mitocondrias al citosol durante las etapas iniciales de la apoptosis [Samhan-Arias *et al.*, 2018]. Estudios previos del equipo de investigación del director de esta tesis han demostrado que la desregulación de la Cb₅R genera un incremento de la producción de anión superóxido que estimula la entrada celular en la fase irreversible de la apoptosis neuronal caracterizada por la activación de las caspasas [Samhan-Arias *et al.*, 2009; Samhan-Arias *et al.*, 2012; Samhan-Arias y Gutierrez-Merino, 2014b.

1.6. *Mecanismos moleculares de la neurotoxicidad por la sobrecarga celular y tisular de hierro y su implicación en enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento.*

La homeostasis defectuosa de los iones de hierro y cobre que participan en ciclos redox en las células probablemente contribuya a la neuropatología de la enfermedad de Alzheimer. Las placas amiloides insolubles y los ovillos neurofibrilares característicos de la enfermedad de Alzheimer contienen altas concentraciones de zinc, cobre y hierro. La acumulación focal de zinc, cobre y hierro podría privar a otros tejidos de esos metales esenciales, lo que lleva a una función neuronal aberrante [Roberts *et al.*, 2012]. La homeostasis anormal de los iones metálicos de zinc, cobre y hierro se ha implicado en el proceso de plegamiento incorrecto asociado con la producción de péptidos A β neurotóxicos a partir de la proteína precursora amiloide (APP) y de tau hiperfosforilada (que se encuentra en las placas y ovillos) y contribuye al estrés oxidativo neuronal [Sayre *et al.*, 2000]. La acumulación de tau en los ovillos neurofibrilares se asocia con la inducción de la hemo oxigenasa-1 (HO-1), un potente antioxidante, que tiene un papel importante en el metabolismo del hemo liberado de las mitocondrias dañadas. Aunque la bilirrubina que se genera en este proceso es

antioxidante [Perry, 2002], también se libera hierro ferroso, que produce radicales hidroxilos a través de la reacción de Fenton.

La mayor parte de la APP se escinde mediante la vía no amiloidogénica: α -secretasa y γ -secretasa, para liberar el fragmento NH₂-terminal p3, dejando el dominio intracelular de la APP en la membrana. Alternativamente, la APP puede ser escindida primero por la β -secretasa y luego por la γ -secretasa para producir A β (la vía neurodegenerativa amiloidogénica) [Altamura y Muckenthaler, 2009]. Se ha sugerido que el hierro podría potenciar el procesamiento de la APP a través de la interacción de las proteínas reguladoras del hierro con un elemento regulador de hierro (IRE) putativo en la región 5' no traducida de su ARNm, ubicada inmediatamente upstream de un dominio de caja aguda sensible a la interleuquina-1 [Rogers *et al.*, 2002]. Además, el exceso de hierro inhibe la expresión de la furina (una proteína que balancea y modula las actividades de la α -secretasa y la β -secretasa [Silvestri y Camaschella, 2008; Guillemot *et al.*, 2013]), lo que favorece la activación de la β -secretasa. Por lo tanto, la traducción de APP podría estar elevada en condiciones de exceso de hierro, aumentando la cantidad de la APP disponible para entrar en la vía amiloidogénica, que se ve favorecida por la disminución de la actividad de la furina [Altamura y Muckenthaler, 2009].

El aumento de las concentraciones de hierro se ha correlacionado con la agregación de A β en áreas inicialmente afectadas por la enfermedad de Alzheimer y ofrece una oportunidad para el diagnóstico basado en la resonancia magnética nuclear (RMN). Las resonancias magnéticas de cerebros humanos *post-mortem* y un modelo de ratón de Alzheimer muestran disminuciones en la resonancia magnética T2* del hipocampo, que es sensible a las propiedades magnéticas del hierro [Schenck, 2003; Haacke *et al.*, 2005] o su variación espacial, atribuida en parte al hierro en las placas A β [Jack *et al.*, 2005; Nabuurs *et al.*, 2011; Antharam, 2012]. Aunque la resolución de la RMN no es suficiente para detectar placas individuales, las anomalías T2* que resultan de los agregados de placa pueden ser detectadas. En base a ello, se ha propuesto que los cambios en la resonancia magnética ponderada en T2* del hipocampo podrían ser un complemento valioso para analizar los cambios morfológicos en

el desarrollo de un biomarcador para las primeras etapas de la enfermedad de Alzheimer [Holland *et al.*, 2009].

Los aumentos de hierro en el cerebro de los animales producen defectos cognitivos pronunciados [Schröder *et al.*, 2013]. Los depósitos de hierro en ratones transgénicos con mutaciones en presinilina/APP, modelos animales de la EA [Holcomb *et al.*, 1998] colocalizan con placas A β [Smith *et al.*, 1998; Falangola *et al.*, 2005] y los aumentos de hierro cerebral total coinciden con la formación temprana de placas [Leskovjan *et al.*, 2011]. La sobreexpresión de la HO-1 en ratones conduce a la sobrecarga de hierro y la agregación de tau en el cerebro, que son característicos en la EA [Hui *et al.*, 2011]. La HO-1 está sobreexpresada en el hipocampo y la corteza temporal de los enfermos de Alzheimer con deterioro cognitivo leve, lo que apoya la implicación de esta enzima de degradación del grupo hemo en la patogenia de la enfermedad de Alzheimer [Schipper *et al.*, 1995; Schipper *et al.*, 2006].

El incremento de la concentración de hierro total en el cerebro con el envejecimiento puede ser causado por varios factores, que incluyen la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, inflamación, redistribución de hierro dentro del cerebro y cambios en la homeostasis de hierro [Conde y Streit, 2006; Farrall y Wardlaw, 2009]. Se ha documentado que el proceso de envejecimiento puede comprometer el sistema homeostático de hierro [Killilea *et al.*, 2004], desplazando el metabolismo hacia un exceso de hierro que no es eficientemente quelado por proteínas de almacenamiento u otras moléculas.

Se ha demostrado *in vitro* que la agregación de proteínas implicadas en trastornos neurodegenerativos, como la α -sinucleína [Li *et al.*, 2010] y la proteína tau hiperfosforilada [Yamamoto *et al.*, 2002], se desencadena por concentraciones elevadas de hierro. Los cuerpos de inclusión que contienen proteínas dañadas o agregadas podrían causar estrés en el retículo endoplasmático, que es una característica común de varias enfermedades neurodegenerativas [Liu y Connor, 2012]. La neurodegeneración que resulta de la toxicidad del hierro puede provocar apoptosis [Ott *et al.*, 2007] y ferroptosis, una forma de muerte celular no apoptótica dependiente del hierro [Dixon *et al.*,

2012]. La acumulación del hierro en la glia induce un estado de inflamación a través de una mayor liberación de citoquinas pro-inflamatorias [Williams *et al.*, 2012] y da como resultado un ciclo de retroalimentación positiva de neuroinflamación y neurodegeneración [Xu *et al.*, 2012]. La concentración total de hierro aumenta con la edad en la sustancia negra, el putamen, el globo pálido, el núcleo caudado y la corteza cerebral [Zecca L. *et al.* 2004; Hallgren B, Sourander P. 1958; Ramos P *et al.* 2014; Hebbrecht G, Maenhaut W, De Reuck J. 1999]. La distribución regional del hierro total en el cerebro de un adulto sano es heterogénea. Las concentraciones más altas de hierro se han detectado en los ganglios basales (putamen, globo pálido y núcleo caudado), mientras que las concentraciones más bajas se detectaron en la sustancia gris cortical, la sustancia blanca, el mesencéfalo, el cerebelo, la protuberancia, el *locus coeruleus* y la médula [Zecca *et al.*, 2004; Ramos *et al.*, 2014; Zecca *et al.*, 1996; Zecca *et al.*, 2001; House *et al.*, 2012]. La heterogeneidad regional del hierro cerebral y su cambio con la edad han sido confirmados *in vivo* mediante RMN [Bartzokis *et al.*, 2007; Aquino *et al.*, 2009; Bartzokis *et al.*, 2011; Bilgic *et al.*, 2012]. Otros cambios que ocurren con la edad incluyen la redistribución de hierro entre sus diferentes formas moleculares (ferritina, neuromelanina, transferrina, haemosiderona y otras) y la redistribución entre las neuronas y células gliales [Connor *et al.*, 1990].

En la microglía y los astrocitos de la corteza, el cerebelo, el hipocampo, los ganglios basales y la amígdala, los depósitos de hierro se detectan histoquímicamente y las concentraciones de ferritina generalmente aumentan con la edad. El hierro fagocitado por las subpoblaciones de células de microglía positivas para ferritina probablemente se convierte en una fuente de especies tóxicas que causan la degeneración celular [Lopes *et al.*, 2008]. Aunque se considera que la HO-1 es citoprotectora, la regulación positiva de esta enzima en la glia podría contribuir a la neurodegeneración, porque, a medida que el cerebro envejece, es probable que la acción prolongada de la HO-1 en los astrocitos participe en el secuestro de hierro, estrés oxidativo intracelular e insuficiencia mitocondrial [Schipper *et al.*, 2009].

El exceso de hierro puede inducir estrés oxidativo al generar especies reactivas del oxígeno (ROS) por la reacción de Fenton, en particular el radical hidroxilo [Crichton *et al.*, 2006; Crichton *et al.*, 2014]. Las ROS pueden dañar el ADN nuclear y el ADNmt [Melis *et al.*, 2013], afectar la expresión del ADN por mecanismos epigenéticos [Kwok, 2010], y oxidar proteínas. La peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de los lípidos de la membrana por ROS genera aldehídos altamente reactivos, como el 4-hidroxinonenal, que modifica irreversiblemente las proteínas por carbonilación [Dalle-Donne *et al.*, 2003; Perluigi *et al.*, 2012]. Además, las ROS pueden inducir la liberación de hierro de los grupos hierro-azufre de las proteínas mitocondriales de la cadena respiratoria y otras proteínas de unión a hierro, lo que conduce a una mayor producción de ROS a través de la reacción de Fenton. La alteración de la homeostasis del hierro puede interferir con las funciones mitocondriales y, como resultado, acelerar la progresión de mecanismos degenerativos asociados a la oxidación de biomoléculas con funciones biológicas relevantes para la fisiología celular [Mastroberardino *et al.*, 2009; Horowitz *et al.*, 2010].

En este contexto, el uso de compuestos antioxidantes para paliar el avance de los procesos neurodegenerativos de las enfermedades cuya tasa de incidencia aumenta significativamente con el envejecimiento de la población humana es una posibilidad que ha tomado fuerza durante los últimos años. Entre estos antioxidantes tienen un valor terapéutico especial los compuestos naturales presentes en los productos alimentarios, porque permiten realizar intervenciones de tipo nutricional de bajo coste y accesibles a prácticamente toda la población. Dentro de este tipo de compuestos se encuentran los flavonoides antioxidantes, presentes en muchos alimentos de origen vegetal (frutas y verduras). Además, los flavonoides forman complejos con cationes de hierro y de otros metales de transición. La capacidad de atrapar cationes de hierro y su carácter hidrofóbico (que les permite incorporarse rápidamente y difundir a través de las membranas biológicas) hace que los flavonoides sean particularmente potentes para antagonizar las reacciones de Fenton en las células e inhibir la peroxidación lipídica inducida por Fe^{2+} [Chen *et al.*, 2000; Mira *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2002]. Los flavonoides que tienen un mayor número de grupos hidroxilo, como la miricetina, la quercetina, el kaempferol y la luteolina, son los más

potentes como inhibidores de la peroxidación lipídica inducida por Fe^{2+} [Silva *et al.*, 2002]. Además, los flavonoides tienen efectos antiinflamatorios [Maleki *et al.*, 2009] y se están utilizando como agentes antiinflamatorios en los tratamientos terapéuticos de un número cada vez mayor de patologías humanas, ver, por ejemplo, [Ren *et al.*, 2019]. Se han reportado muchos efectos beneficiosos de la administración de estos flavonoides para paliar el avance de los deterioros neurológicos y la neurodegeneración asociados a la EA y a otras enfermedades neurodegenerativas cuya incidencia aumenta mucho con la edad, revisados en [Gutierrez-Merino *et al.*, 2011].

2. Objetivos de este trabajo

Durante los últimos años se han acumulado muchas evidencias experimentales que apoyan la hipótesis de un papel relevante de los oligómeros intracelulares de los péptidos β -amiloide neurotóxicos en la etiopatogenia de la EA. De entre estos péptidos, el $A\beta(1-42)$ ha sido foco de atención, dado que es uno de los componentes predominantes de las placas amiloides y de los ovillos neurofibrilares detectados en muestras de cerebro de enfermos de Alzheimer. Estudios realizados usando diferentes modelos animales y celulares de la patología de Alzheimer han demostrado que la desregulación de la homeostasis intracelular del Ca^{2+} en neuronas y el estrés oxidativo celular en el cerebro son dos eventos detectados en las etapas iniciales de los procesos de muerte neuronal inducidos por los péptidos β -amiloide neurotóxicos en general y por el péptido $A\beta(1-42)$ en particular. Poco antes del inicio de esta tesis doctoral nuestro equipo de investigación identificó a la CaM como una de las proteínas intracelulares con mayor afinidad por el péptido $A\beta(1-42)$ y otros péptidos β -amiloide neurotóxicos libres en disolución. Como se ha documentado en la sección de la Introducción de esta tesis doctoral, la CaM es una proteína de unión de Ca^{2+} con múltiples funciones de regulación de la actividad neuronal y que se encuentra en las neuronas a concentraciones notablemente más elevadas que en otros tipos celulares de mamíferos. Una proteína estructuralmente relacionada con la CaM es la calbindina-D28k, que presenta niveles de expresión elevados en neuronas localizadas en las regiones del cerebro más afectadas en la EA. Por otra parte, ha sido ampliamente documentada una alta propensión del péptido $A\beta(1-42)$ a unirse a los *rafts* lipídicos de la membrana plasmática, desempeñando un papel clave en la internalización de este péptido en las neuronas. Estudios previos han demostrado que asociados a los *rafts* lipídicos de las neuronas se encuentran dos sistemas redox cuya desregulación funcional ha sido implicada en la muerte celular asociada a los procesos neurodegenerativos, la *Cb5R* y la nNOS. La *Cb5R* es una enzima que desempeña un papel clave en el metabolismo lipídico y se han documentado alteraciones significativas del metabolismo lipídico cerebral en los enfermos de Alzheimer. Por otra parte, la sobreestimulación de la nNOS se ha demostrado que tiene un

papel relevante en el daño por estrés oxidativo inducido en el cerebro por muchos procesos neurodegenerativos. Además, el péptido A β (1-42) une con alta afinidad cationes metálicos como Fe^{2+/3+} y Cu^{1+/2+}, potenciando reacciones de tipo Fenton, y la desregulación de la homeostasis intracelular del hierro en las neuronas se ha propuesto como una de las posibles causas del inicio del proceso neurodegenerativo en el cerebro de los enfermos de Alzheimer.

En base a estos antecedentes, el objetivo global de esta tesis doctoral es el estudio de las interacciones del péptido A β (1-42) con las proteínas de unión de calcio, CaM y calbindina-D28k, y con los sistemas redox asociados a los “rafts” lipídicos, Cb₅R y nNOS, y sus implicaciones funcionales.

Para alcanzar este objetivo global se han planteado los siguientes objetivos parciales:

- Desarrollo de un método de medida de la cinética de formación de complejos entre concentraciones nanomolares del péptido A β (1-42) y de proteínas.
- Diseño y evaluación experimental de péptidos antagonistas de las interacciones entre el péptido A β (1-42) y las proteínas de unión de calcio CaM y calbindina-D28k.
- Estudio de la posible modulación por el péptido A β (1-42) y otros péptidos β -amiloide neurotóxicos de las actividades de la Cb₅R y de la nNOS.
- Estudios sobre la modulación de la interacción entre el péptido A β (1-42) y la CaM por Fe³⁺ (y otros iones metálicos) y por otros compuestos seleccionados por su potencial uso terapéutico.

3. Resultados

3.1. Diseño y evaluación experimental de un péptido antagonista de las interacciones entre el péptido A β (1-42) y las proteínas de unión de calcio CaM y calbindina-D28k.

1.1. Interacción entre A β (1-42)HiLyteTM Fluor555 y calmodulina (CaM).

En un trabajo previo de nuestro equipo de investigación [Corbacho *et al.*, 2017] encontramos que la intensidad de fluorescencia del derivado fluorescente HiLyteTM -Fluor555 aumentaba de manera dependiente de la concentración de CaM, con un valor de $IC_{50} \approx 1$ nM. Los resultados de la **figura 5A** muestran que la adición de 5 nM de CaM a una disolución 10 nM A β (1-42) HiLyteTM -Fluor555 provoca una lenta cinética de aumento de la intensidad de fluorescencia de la sonda HiLyteTM -Fluor555, que alcanza un valor máximo de un $17 \pm 2\%$, muy próximo al incremento de un 20-25% reportado en [Corbacho *et al.*, 2017]. Este experimento permite concluir que es posible medir la cinética de formación del complejo entre ambas moléculas midiendo la cinética de cambio de intensidad de fluorescencia de la sonda A β (1-42) HiLyteTM -Fluor555, que es causado por las alteraciones en el microambiente del fluoróforo inducidos por la proximidad con la CaM, lo cual sugiere la formación de un complejo. Es significativo que la formación de este complejo no produce desplazamiento del pico de emisión del espectro de A β (1-42) HiLyteTM -Fluor555. El aumento de la fluorescencia en función del tiempo, después de la adición de CaM, sigue una cinética de primer orden (**figura 5B**), con una constante de velocidad (k_{on}) de $4,0 \pm 0,3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, es decir, con un valor de tiempo de semirreacción ($t_{1/2}$) de 173 ± 10 s.

A continuación, estudiamos este proceso cinético con 10 nM A β (1-42) HiLyteTM -Fluor555 a diferentes concentraciones de CaM, variando la relación molar A β (1-42):CaM (**figura 5C**). Estos resultados revelan que el cambio máximo de fluorescencia incrementa a concentraciones de CaM entre 2,5 nM y

5 nM, sin diferencias significativas entre 5 y 10 nM. Es de reseñar que a 5 nM de CaM la relación molar para la formación del complejo es de 2:1. En trabajos previos de nuestro laboratorio se concluyó que la CaM se une a dímeros de A β (1-42) [Corbacho *et al.*, 2017]. Por lo tanto, los resultados que se muestran en la **figura 5C** respaldan aún más esta hipótesis, porque A β (1-42) se encuentra en gran medida en estado dimérico en nuestras condiciones experimentales, como se indica en la sección de Materiales y Métodos. Sin embargo, con una relación molar A β (1-42):CaM 1:1, p.e., 10 nM de CaM y 10 nM A β (1-42), la constante de velocidad del proceso cinético incrementa cerca de 4 veces, por encima de $(18\pm 4) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (tiempo de semirreacción $t_{1/2} = 38\pm 7 \text{ s}$), sugiriendo que una segunda molécula de CaM puede también unirse al complejo A β (1-42)₂:CaM conduciendo a la formación de complejos A β (1-42)₂:CaM₂.

Los estudios cinéticos anteriores nos permitieron obtener la velocidad de formación del complejo A β (1-42) HiLyte™ -Fluor555:CaM, además indican una alta afinidad de la CaM por A β (1-42), ya que se deduce una extensiva formación de estos complejos en el intervalo de concentraciones nanomolares estudiado. Con la finalidad de evaluar la constante de disociación del complejo A β (1-42) HiLyte™ -Fluor555:CaM, hemos medido la cinética de reversión del incremento de la fluorescencia agregando 100 nM de A β (1-42) no marcado una vez que ha finalizado la cinética de formación del complejo A β (1-42) HiLyte™ -Fluor555:CaM (**figura 5D**). La disminución de la fluorescencia revela la cinética de intercambio de A β (1-42)HiLyte™-Fluoro555 por A β (1-42) no marcado. Se puede ver que este es un proceso cinético mucho más lento, ya que es necesario un tiempo de $900\pm 50 \text{ s}$ para obtener una disminución del 50% del incremento de la fluorescencia asociado a la formación del complejo A β (1-42) HiLyte™ -Fluor555:CaM. A partir de estos resultados hemos calculado una constante de velocidad del intercambio de A β (1-42) HiLyte™-Fluoro555 por A β (1-42) no marcado de $(7,7\pm 0,9) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Por lo tanto, nuestros resultados llevaron a un valor de aproximadamente 5 para la relación entre la constante de velocidad promedio de los pasos limitantes de la velocidad de formación y disociación del complejo (k_{on}/k_{off}). Se puede concluir que a concentraciones nanomolares de

A β (1-42) y CaM, el equilibrio está fuertemente desplazado hacia la formación del complejo A β (1-42):CaM.

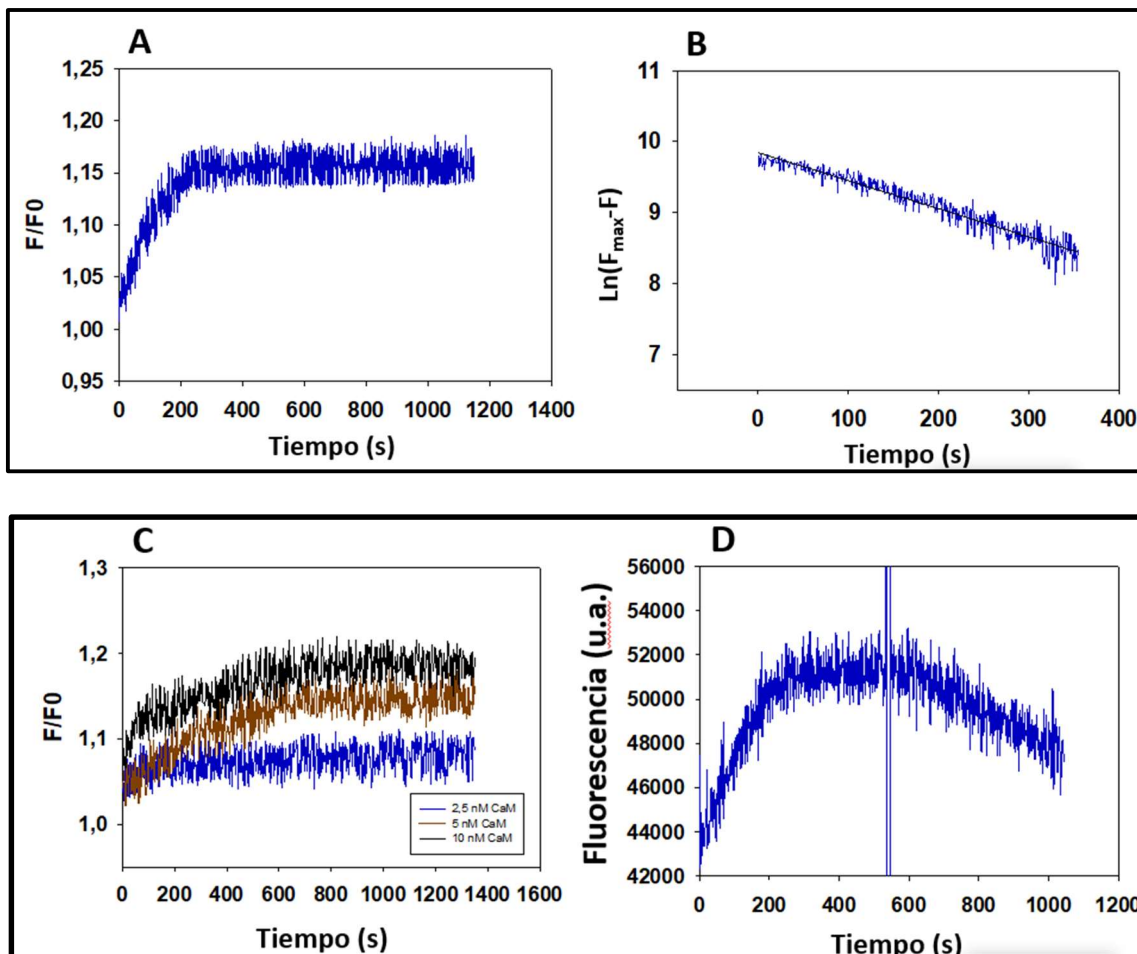


Figura 5. Cinética de formación de complejo entre A β (1-42) y CaM monitorizada por el incremento de la fluorescencia de A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555. (A) Registro cinético representativo del incremento de la intensidad de fluorescencia de 10 nM A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555 inducido por la adición de 5 nM CaM. (B) El incremento de la fluorescencia de A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555 se ajusta a un proceso cinético de primer orden. F_{\max} es la intensidad de fluorescencia máxima al finalizar el proceso cinético. La línea continua negra es el ajuste lineal por mínimos cuadrados de los datos del panel A a la ecuación: $y = 9,845 - 0,00396x$ ($R^2=0,922$). (C) Dependencia de la cinética de incremento de la intensidad de fluorescencia de A β (1-42) HiLyteTM-Fluoro555 10 nM con la concentración de la CaM: 2,5 nM (azul), 5 nM (marrón) y 10 nM (negro). (D) Reversión del aumento de la intensidad de fluorescencia de A β (1-42) HiLyteTM-Fluoro555 provocado por la adición de 5 nM CaM, tras la adición de 100 nM de A β (1-42) en el punto indicado por una flecha. Las medidas de fluorescencia se han realizado como se indica en la sección de los Materiales y Métodos de esta tesis, y a.u. significa unidades de fluorescencia dadas por las lecturas del fluorímetro.

1.2. Docking entre A β (1-42) y CaM y criterio para seleccionar los modelos estructurales *in silico* más probables del complejo A β (1-42):CaM.

El *docking* entre A β (1-42) y CaM se realizó siguiendo la metodología indicada en la sección Materiales y Métodos. Primero, obtuvimos los archivos de las 10 estructuras más probables después de la minimización de energía libre de Gibbs (ΔG) proporcionada por el servidor ClusPro para los archivos de A β (1-42) con PDB ID: 1IYT y 1Z0Q. Teniendo en cuenta los resultados experimentales obtenidos en nuestro trabajo anterior sobre la formación del complejo A β (1-42):CaM [Corbacho *et al.*, 2017], consideramos como simulaciones aceptables para el complejo A β (1-42):CaM solo las que presentan fuertes interacciones hidrofóbicas en el segmento de la secuencia de la CaM, comprendido entre los residuos 25-35 del péptido. Además, nuestro trabajo anterior mostró que la formación del complejo no altera la unión a Ca²⁺ a la CaM [Corbacho *et al.*, 2017], excluyendo que el péptido A β (1-42) se una al dominio de unión a Ca²⁺ de CaM. La aplicación de estos criterios redujo el número de modelos estructurales más probables para la formación del complejo entre A β (1-42) y CaM a 4. Entonces, seleccionamos dos modelos favorecidos hidrofóbicamente, altamente calificados, uno para cada archivo PDB ID de A β (1-42), aplicando el criterio de valores de ΔG más bajo entre los modelos que mostraron un solapamiento extensivo con el dominio de interacción de CaM con el péptido A β (25-35) que se muestran en la figura 4 de la ref. [Corbacho *et al.*, 2017]. Las interfaz de interacción para cada uno de los dos modelos seleccionados fueron analizadas usando PDBePISA (Protein interfaces, Surfaces, and Assemblies). Hemos designado a estos modelos seleccionados como las estructuras 1 y 2 y se muestran en las **figuras 6 y 7**, respectivamente. Los valores de ΔG obtenidos para las estructuras 1 y 2 fueron -17 y -15 kcal/mol, los cuales son consistentes con la baja constante de disociación de los complejos A β (1-42):CaM reportados en nuestros trabajos experimentales previos [Corbacho *et al.*, 2017]. El análisis *in silico* de la interfaz de interacción se presenta resumida en la **tabla 2**, la cual muestra los residuos de aminoácidos de A β (1-42) y de la CaM más probablemente involucrados en la interacciones establecidas para ambos modelos del complejo A β (1-42):CaM. Para ser conservadores, hemos incluido en estas listas solo los residuos de aminoácidos de (1-42) y CaM con BSA/ASA $\geq 0,5$, es decir, muy por encima del valor del umbral recomendado de 0,15.

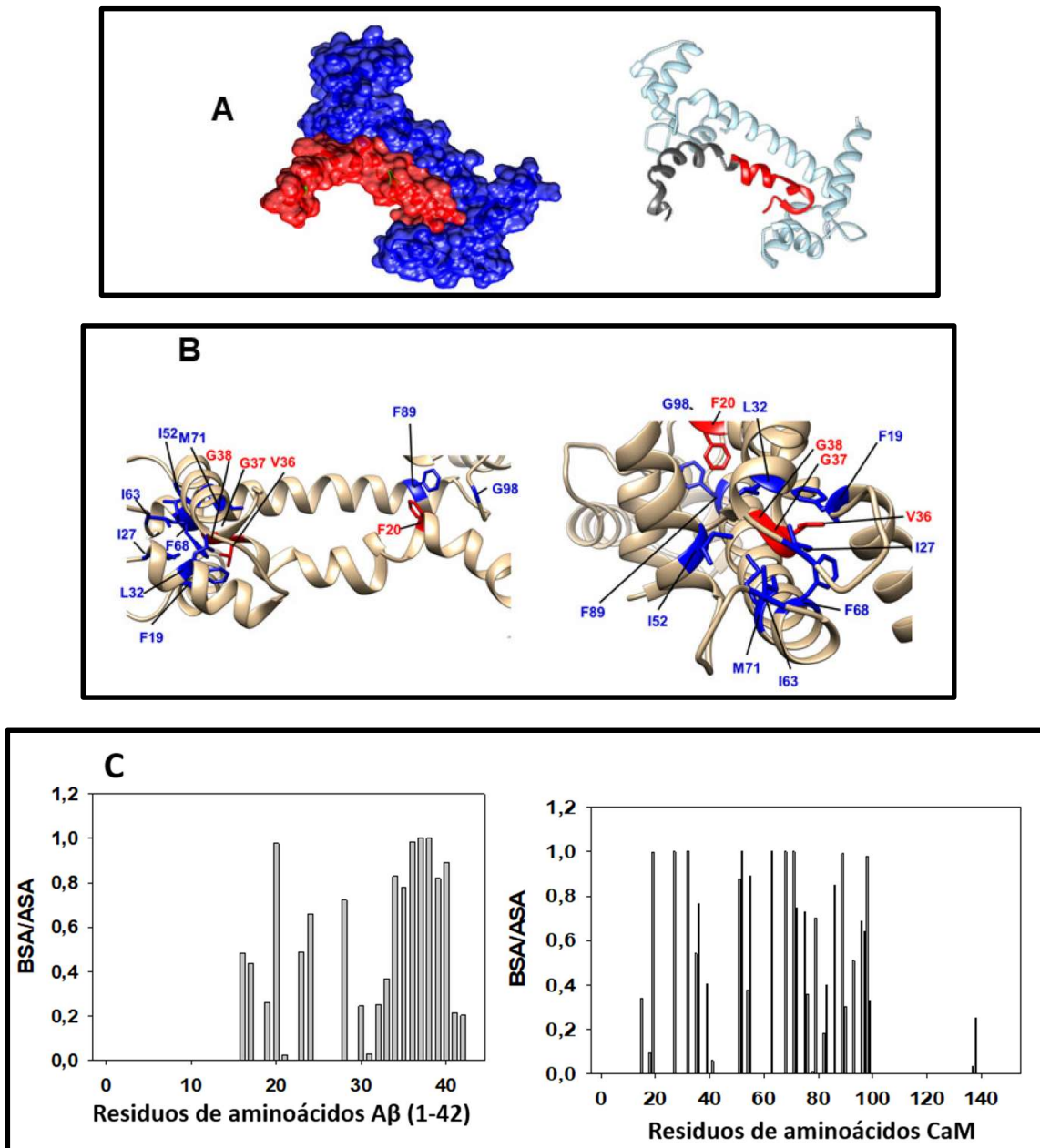


Figura 6. La estructura 1 del modelo in silico seleccionado del complejo A β (1-42):CaM obtenido usando los archivos PDB ID: 1Z0Q para el péptido A β (1-42) y 1CLL para la CaM saturada con Ca²⁺. El acoplamiento se realizó como se indica en la sección de Materiales y Métodos. (A) Imágenes del espacio ocupado (alta densidad electrónica) y del esqueleto peptídico de los péptidos y proteínas en el complejo. El péptido A β (1-42) en rojo y la CaM de azul (en la imagen de esqueleto peptídico de azul claro), los residuos 24-42 de los aminoácidos del péptido A β (1-42) en rojo y el resto de A β (1-42) de gris oscuro. (B) Los detalles estructurales de la interfaz A β (1-42):CaM de la estructura del modelo 1 in silico. Los residuos de aminoácidos de la CaM (coloreados en azul) son los que interactúan más fuertemente con los residuos 24-42 de los aminoácidos del péptido A β (1-42) (coloreados en rojo). (C) Gráficos de los valores BSA/ASA obtenidos para los residuos de aminoácidos del péptido A β (1-42) y de la CaM en la estructura 2 del modelo in silico del complejo A β (1-42):CaM.

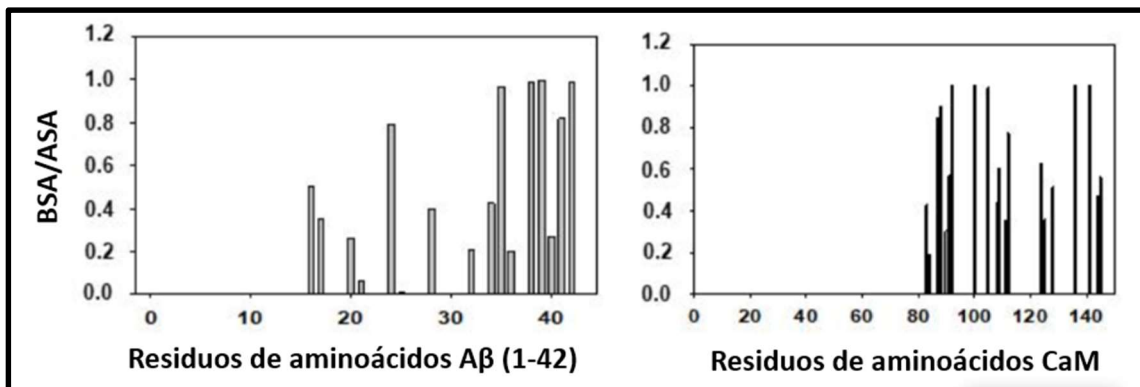
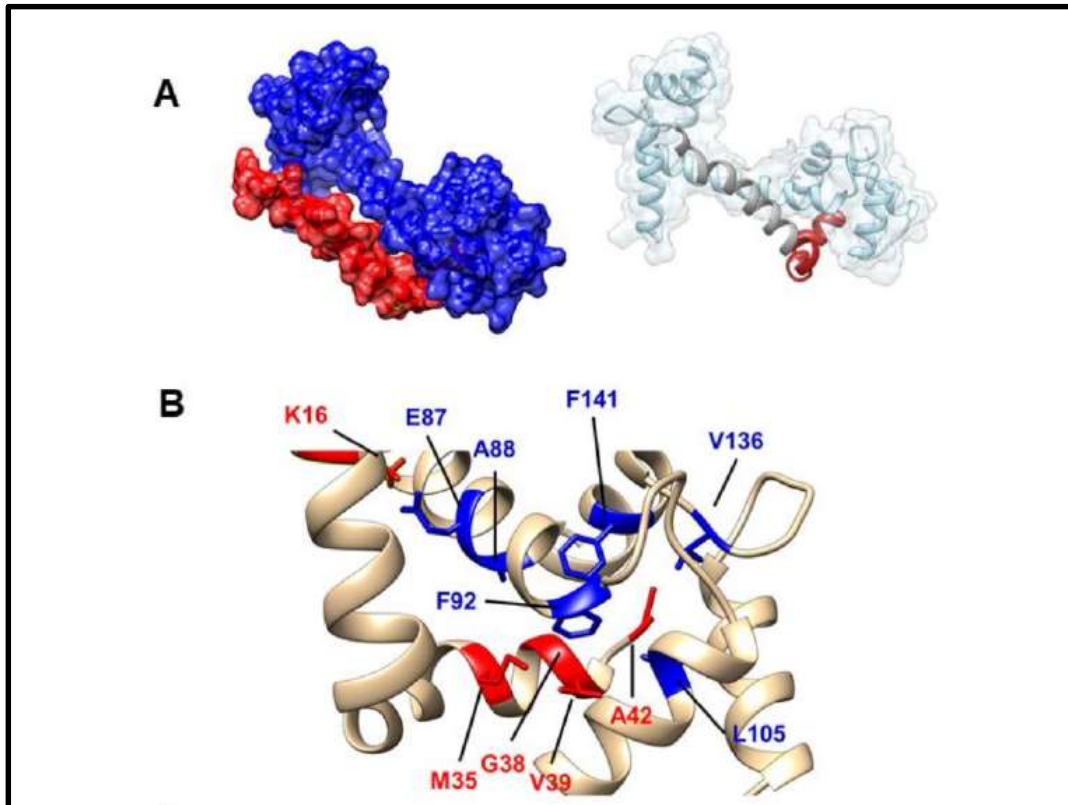


Figura 7. La estructura 2 del modelo in silico seleccionado del complejo A β (1-42):CaM obtenido usando los archivos PDB ID: 1IYT para el péptido A β (1-42) y 1CLL para la CaM saturada con Ca²⁺. El acoplamiento se realizó como se indica en la sección de Materiales y Métodos. (A) Imágenes del espacio ocupado (alta densidad electrónica) y del esqueleto peptídico de los péptidos y proteínas en el complejo. El péptido A β (1-42) en rojo y la CaM de azul (en la imagen de esqueleto peptídico de azul claro), los residuos 24-42 de los aminoácidos del péptido A β (1-42) en rojo y el resto de A β (1-42) de gris oscuro. (B) Los detalles estructurales de la interfaz A β (1-42):CaM de la estructura del modelo 2 in silico. Los residuos de aminoácidos de la CaM (coloreados en azul) son los que interactúan más fuertemente con los residuos 24-42 de los aminoácidos del péptido A β (1-42) (coloreados en rojo). (C) Gráficos de los valores BSA/ASA obtenidos para los residuos de aminoácidos del péptido A β (1-42) y de la CaM en la estructura 2 del modelo in silico del complejo A β (1-42):CaM.

Tabla 2. Lista de los residuos de aminoácidos del péptido A β (1-42) y de la CaM que interaccionan más fuertemente en la interfaz péptido/proteína de las estructuras 1 y 2, obtenidas mediante simulaciones de docking para el complejo 1:1 A β (1-42):CaM. Los residuos de aminoácidos, tanto del péptido A β (1-42) como de la CaM, se enumeran de mayor a menor según el valor del parámetro BSA/ASA (valores entre paréntesis), obtenidos del análisis de interfaz con el software PDBePISA. Solo se han incluido los aminoácidos con valores de BSA/ASA $\geq 0,5$.

	Residuos de aminoácidos A β (1-42)	Residuo de aminoácidos de CaM
Estructura modelo 1	Gly37 (1,0), Gly38 (1,0), Val36 (0,98), Phe20 (0,97), Val40 (0,89), Leu34 (0,83), Val39 (0,82), Met35 (0,77), Lys28 (0,72), Val24 (0,66)	Ile27 (1,0), Leu32(1,0), Ile52 (1,0), Ile63 (1,0), Phe68 (1,0), Met71 (1,0), Phe19 (0,99), Phe89 (0,99), Gly98 (0,98), Val55 (0,98), Met51 (0,88), Arg86 (0,85), Met36 (0,76), Met72 (0,74), Lys75 (0,73), Thr79 (0,70), Gly96 (0,68), Asn97 (0,64)
Estructura modelo 2	VAL39 (0,99), Ala42 (0,99), Gly38 (0,98), Met35 (0,96), Ile41 (0,82), Val24 (0,79), Lys16 (0,5)	Val136 (1,0), Phe141 (1,0), Phe92 (0,99), Leu105 (0,99), Ala88 (0,90), Glu87 (0,85), Leu112 (0,77), Met124 (0,63), Met109 (0,61), Val91 (0,57), Met145 (0,56), Ala128 (0,52)

1.3. Diseño de un péptido antagonista para la formación del complejo A β (1-42):CaM y su evaluación experimental.

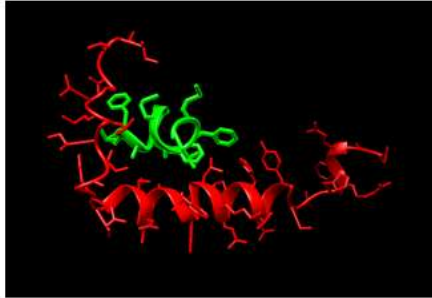
Con el objetivo de diseñar un péptido antagonista de la formación del complejo entre A β (1-42) y CaM, primero identificamos los residuos de aminoácidos de la CaM, que directamente interaccionan con cada uno de los residuos de aminoácidos del dominio 24-42 del péptido de A β (1-42), en las simulaciones de acoplamiento molecular previamente seleccionadas (estructuras 1 y 2, véase el detalle de las estructuras 1 y 2 mostradas en la **figuras 6B** y **7B**). Los datos mostrados en la **tabla 2** visualizan los residuos de aminoácidos más relevantes del complejo A β (1-42):CaM encontrados en el análisis de la interfaz usando modelos estructurales simulados del complejo *in silico*. Elegimos la estructura 1 de A β (1-42) y CaM como la estructura guía para el diseño del péptido, porque la predicción muestra más residuos de aminoácidos en el dominio 24-42 de A β (1-42) que interaccionan fuertemente con la CaM, como lo señalan los valores promedio más altos de la relación entre el área de

superficie no accesible/accesible (BSA/ASA) obtenidos en el análisis de las interfases con el servidor PDBePISA (**Tabla 2**), y que dan un valor de ΔG más favorable. A continuación, calculamos la distancia de separación en la estructura tridimensional de CaM entre los residuos de aminoácidos de CaM que participan en estos pares. Posteriormente, utilizando el tamaño de volumen de los residuos de aminoácidos estándar, introducimos residuos de aminoácidos no polares para producir una separación entre los aminoácidos que imite su separación en la estructura tridimensional de CaM. Este protocolo operativo nos condujo al siguiente péptido de diez aminoácidos (del N-terminal al C-terminal): VF AFAMA FML (aminoácido C-terminal) como candidato posible a ser antagonista peptídico para la formación del complejo $A\beta(1-42):CaM$.

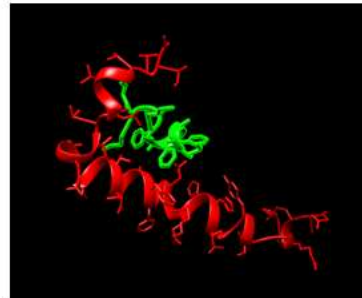
Con el objetivo de reforzar esta hipótesis, hemos realizado simulaciones de *docking* del péptido VF AFAMA FML con $A\beta(1-42)$ y con la conformación de la CaM saturada por Ca^{2+} , utilizando una aproximación metodológica alternativa (CABS-dock Web Server) que no implica ninguna suposición apriorística de la estructura tridimensional del péptido VF AFAMA FML, como se indica en la sección de los Materiales y Métodos de esta tesis. Las dos estructuras modelo más probables para la formación de complejos entre el péptido VF AFAMA FML y el péptido $A\beta(1-42)$ y entre el péptido VF AFAMA FML y la CaM, generadas con esta aproximación se presentan en la **figura 8**. Además, dentro de las 10 estructuras más probables generadas para estos complejos, mediante este análisis "*in silico*" se obtuvieron otras estructuras modelo muy próximas a los modelos 1 y 2 seleccionados y mostrados en la **figura 8**. La inspección visual directa de las estructuras modelo mostradas en esta figura permiten constatar que el péptido VF AFAMA FML está muy probablemente interaccionando con los dominios de interfaz del péptido $A\beta(1-42)$ y de la CaM, los más fuertemente implicados en la formación del complejo $A\beta(1-42):CaM$ obtenidos previamente con la aproximación ClusPro/PDBePISA. Este resultado reafirma la hipótesis de que el péptido VF AFAMA FML sea un antagonista de la formación del complejo entre el $A\beta(1-42)$ y la CaM.

Estructura modelo del complejo péptido VF AFAMAFML: A β (1-42)

Modelo 1

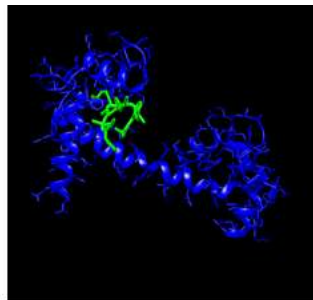


Modelo 2



Estructura modelo del complejo péptido VF AFAMAFML:CaM

Modelo 1



Modelo 2

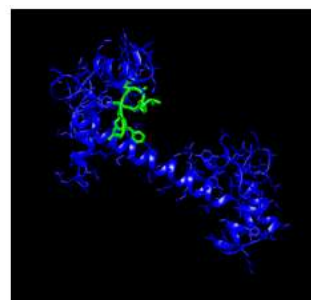


Figura 8. Resultado de las simulaciones de estructuras modelo más probables de los complejos entre el péptido VF AFAMAFML y el péptido A β (1-42) y entre el péptido VF AFAMAFML y la CaM saturada con Ca²⁺ generados “in silico” utilizando el CABS-dock Web Server. Las dos estructuras modelo con mayor tamaño de agrupaciones (las dos más probables) se muestran para cada complejo. En las imágenes se muestran las cadenas polipeptídicas y para los péptidos también el esqueleto de las cadenas laterales de los aminoácidos. El péptido VF AFAMAFML se ha coloreado en verde, A β (1-42) en rojo y la CaM en azul.

La capacidad del péptido sintético VF AFAMAFML (aminoácido C-terminal amidado) para antagonizar la formación del complejo A β (1-42):CaM se ha evaluado experimentalmente usando A β (1-42) HiLyteTM-Fluoro555. Los resultados obtenidos se presentan en la **figura 9** y muestran que solo son necesarias concentraciones submicromolares de este péptido para inhibir la cinética de incremento de la fluorescencia, que controla la interacción entre 10

nM de A β (1-42) HiLyte™-Fluoro555 y 5 nM CaM. De hecho, 1 μ M del péptido VF AFAMAFML (aminoácido C-terminal aminado) bloquea completamente la cinética del aumento de la fluorescencia. Se puede calcular un valor IC₅₀ de 75 \pm 10 nM para este péptido a partir de estos resultados, como se indica en la leyenda de la **figura 9A**.

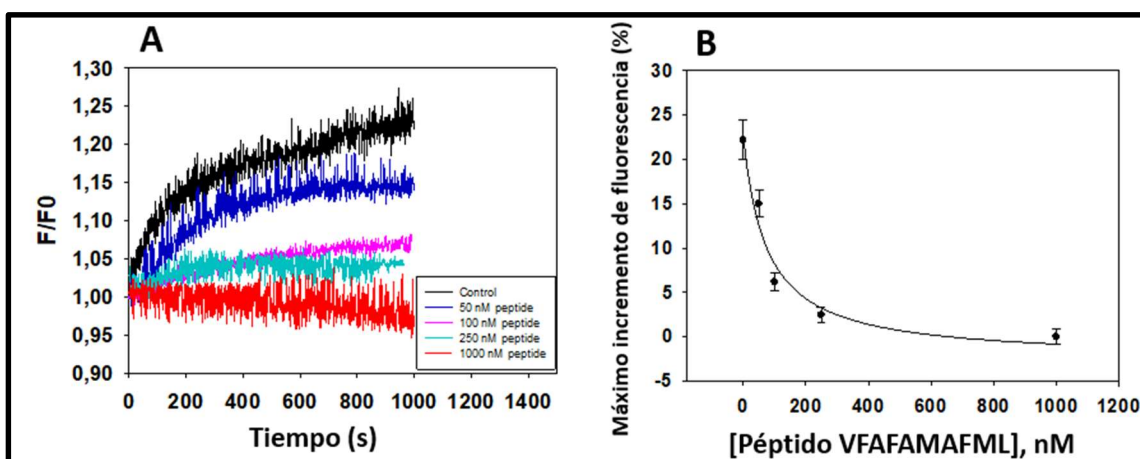


Figura 9. El péptido sintético VF AFAMAFML (aminoácido C-terminal aminado) antagoniza la formación del complejo A β (1-42):CaM. (A) Efecto del incremento de la concentración de este péptido sintético en la cinética de incremento de la intensidad de fluorescencia de 10 nM A β (1-42) HiLyte™-Fluoro555 después de la adición 5 nM de CaM. La titulación con el péptido sintético y las medidas experimentales se realizaron como se indica en los Materiales y Métodos. La cinética de fluorescencia fue registrada en presencia de las siguientes concentraciones del péptido VF AFAMAFML (aminoácido C-terminal aminado): 0 (negro), 50 nM (azul oscuro), 100 nM (rosa), 250 nM (azul verdoso) y 1000 nM (rojo). (B) Gráfico de la dependencia del máximo incremento de fluorescencia registrado 1000 s después de la adición de la CaM con la concentración del péptido VF AFAMAFML (aminoácido C-terminal aminado). Los datos mostrados son el promedio (círculos llenos de negro) \pm S.E. (barras de error) de los resultados obtenidos en triplicados de medidas experimentales. La línea continua es un ajuste por regresión no lineal de los datos a la ecuación hiperbólica para el efecto inhibitor de fármacos con unión a un sitio: $Y = Y_0 - Q_{max} * x / (IC_{50} + x)$, donde Y_0 es el máximo incremento de fluorescencia en ausencia del péptido, Q_{max} es el máximo de extinción del incremento de fluorescencia a saturación del péptido y IC_{50} es la concentración del péptido que reduce a la mitad el máximo de incremento de fluorescencia. El ajuste de datos dio los siguientes resultados: $R^2=0,966$, $Y_0=22\%$, $Q_{max}=22\%$ y $IC_{50}=75 \pm 10$ nM.

1.4. Interacción entre A β (1-42) HiLite™-Fluor555 y calbindina D28k

La cinética de aumento de la intensidad fluorescencia del cromóforo HiLyte™-Fluor555, después de añadir 5 nM de calbindina D28k a una solución de 10 nM A β (1-42) HiLyte™-Fluor555, se muestra en la **figura 10A**. Nuestros resultados muestran que el cambio en la intensidad es incluso más alto que el encontrado con la CaM (ver la **figura 5A**). Así, los resultados de la cinética de fluorescencia que monitoriza la interacción entre calbindina D28k indican que el microentorno del fluoróforo está significativamente más alterado en la formación del complejo A β (1-42) HiLyte™-Fluor555 con calbindina-D28k, que en el de formación del complejo con CaM. Además, cabe destacar que esta formación de complejos no produce un desplazamiento significativo de la longitud de onda de la banda de emisión del espectro de A β (1-42) HiLyte™-Fluor555. La cinética de aumento de la intensidad de fluorescencia observada después de la adición de calbindina D28k a una solución de 10 nM A β (1-42) HiLyte™-Fluor555 tiene una fase de retraso inicial de aproximadamente 1 min, que no se observó en la cinética después de la adición de CaM. Este resultado sugiere que un cambio conformacional inicial en A β (1-42):calbindina-D28k produce una interacción más estrecha entre ambas moléculas. De acuerdo con esto, el tiempo necesario para alcanzar el 50 % del incremento máximo de la fluorescencia de A β (1-42) HiLyte™-Fluor555 es más alto que el encontrado con CaM, a saber, 250 ± 10 s para calbindina-D28k frente a 173 ± 10 s para CaM (**figuras 5A y 10A**).

La **figura 10B** muestra la dependencia de este proceso cinético tras la adición de diferentes concentraciones de calbindina-D28k. Estos resultados revelaron que el máximo cambio de incremento de fluorescencia se produce cuando la concentración de la calbindina-D28k aumenta desde 2.5 hasta 10 nM. A concentraciones de 10 nM de calbindina-D28k, la relación molar A β (1-42):calbindina-D28k es de 1:1. Dado que A β (1-42) se encuentra en gran medida en estado dimérico en nuestras condiciones experimentales, como se indica en la sección de Materiales y Métodos, estos resultados respaldan la hipótesis de que se están formando complejos de estequiometría (A β (1-42))₂:(calbindina-D28k)₂.

Las cinéticas previamente mostradas indicaron una alta afinidad de calbindina-D28k por A β (1-42), resultando en una intensa formación de complejos entre estas dos moléculas a concentraciones nanomolares de ambas. Esto se confirmó mediante la reversión del incremento de la fluorescencia provocado por 5 nM calbindina-D28k tras la adición de 100 nM de A β (1-42) no marcado, después de completar la cinética de formación del complejo A β (1-42) HiLyte™-Fluor555:calbindina-D28k (**figura 10C**). La disminución de la intensidad de fluorescencia monitoriza la cinética de intercambio de A β (1-42) HiLyte™-Fluor555 por A β (1-42) no marcado y, a partir de estos resultados, se puede calcular la velocidad de disociación del complejo A β (1-42) HiLyte™-Fluor555:calbindina-D28k. Este es un proceso cinético más lento que el proceso cinético de unión de A β (1-42) HiLyte™-Fluor555 a la calbindina-D28k, con un tiempo de retraso corto de 1-2 min, lo que indica que se necesita una relajación conformacional del complejo antes de la liberación de A β (1-42) HiLyte™-Fluor555. El ajuste de los resultados a un proceso cinético de primer orden permite calcular una constante de velocidad de disminución de fluorescencia de $(8,3 \pm 0,4) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (**Figura 10D**). Sorprendentemente, esta constante de velocidad es aproximadamente 10 veces mayor que la constante de velocidad obtenida para el proceso cinético de reversión del complejo entre A β (1-42) HiLyte™-Fluor555 y la CaM. Además, la relación calculada entre los tiempos de semirreacción ($t_{1/2}$) de formación y disociación del complejo es ≈ 3 para los complejos A β (1-42):calbindina-D28k, mientras que el valor obtenido para A β (1-42):CaM es 0,2. Por lo tanto, nuestros resultados nos permiten concluir que CaM muestra una afinidad aproximadamente 10 veces mayor por A β (1-42) que la calbindina D28k.

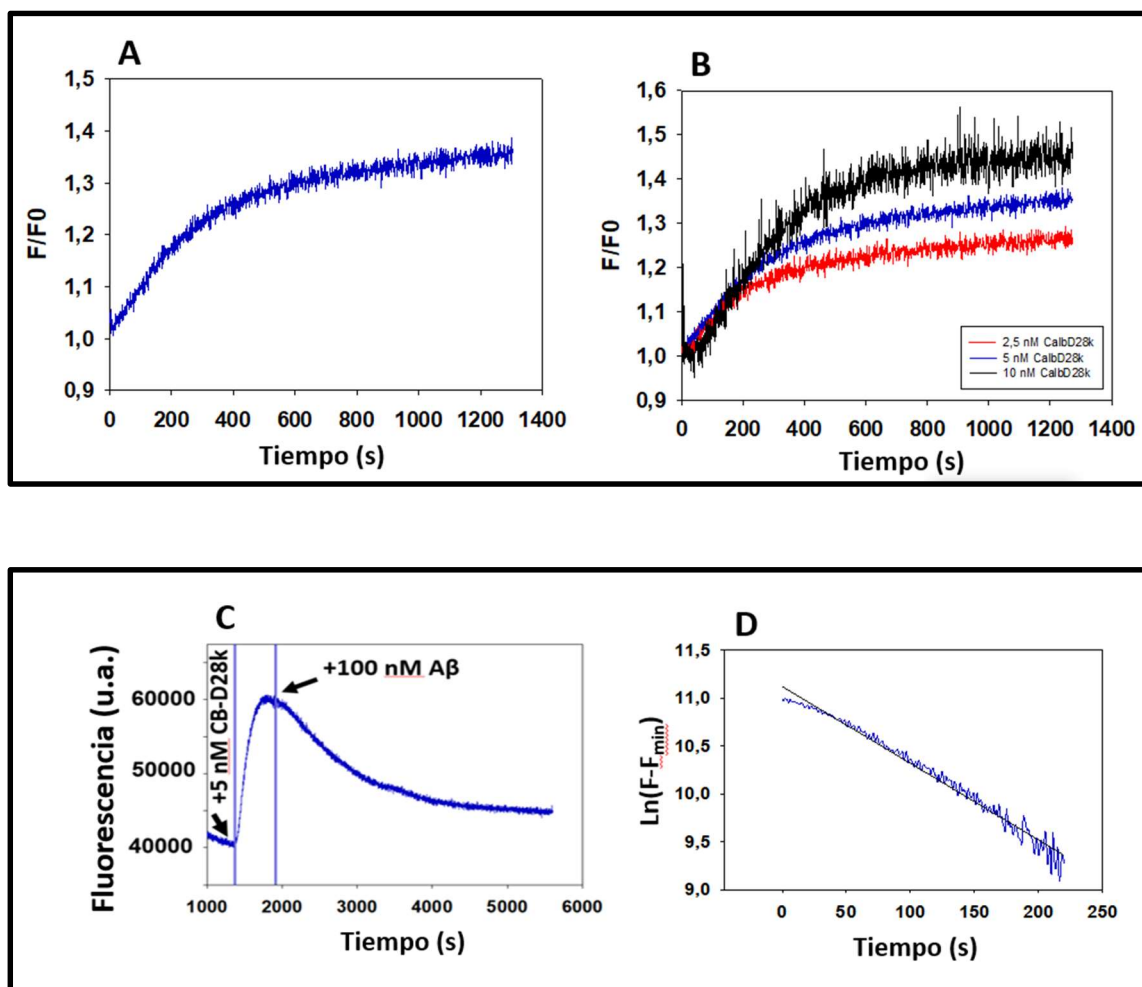


Figura 10. Cinética de formación del complejo entre el péptido A β (1-42) y la calbindina-D28k monitorizado por el incremento de la fluorescencia de A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555. (A) Registro representativo del incremento de la intensidad de fluorescencia de 10 nM de A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555 después de añadir 5 nM de calbindina-D28k. (B) Dependencia de la cinética de incremento de la intensidad de fluorescencia de 10 nM A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555 con la concentración de calbindina-D28k: 2,5 nM (rojo), 5 nM (azul) y 10 nM (negro). (C) El incremento de fluorescencia de A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555 después de la adición de 5 nM de calbindina-D28k (primera flecha) se revierte por la adición de 100 nM de A β (1-42) en el punto indicado por la segunda flecha. (D) La cinética de disminución de la fluorescencia de A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555 después de la adición de 100 nM A β (1-42) sigue un proceso cinético de primer orden con una fase de retraso inicial de alrededor de 60 s. F_{\min} es la intensidad de fluorescencia mínima al finalizar el proceso cinético. La línea negra continua es el ajuste lineal por mínimos cuadrados de los datos del panel C a la ecuación $y = 11,12 - 0,007998x$ ($R^2 = 0,982$). Las medidas de fluorescencia se han realizado como se indica en la sección de los Materiales y Métodos de esta tesis, y a.u. significa unidades de fluorescencia dadas por las lecturas del fluorímetro.

Se ha evaluado experimentalmente la capacidad que tiene el péptido sintético VFAFAMAFML (aminoácido C-terminal amidado) para antagonizar la formación del complejo A β (1-42):calbindina-D28k usando A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555 (**Figura 11**). Los resultados muestran que solo se necesitan concentraciones submicromolares de este péptido para inhibir la cinética de incremento de la fluorescencia que monitoriza la interacción entre 10 nM A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555 y 5 nM de CaM. De hecho, 250 nM de VFAFAMAFML (aminoácido C-terminal amidado) bloquea casi por completo la cinética de incremento de fluorescencia. Se puede calcular un valor IC₅₀ de 27 \pm 3 nM a partir de estos resultados, como se indica en la leyenda de la **figura 11B**.

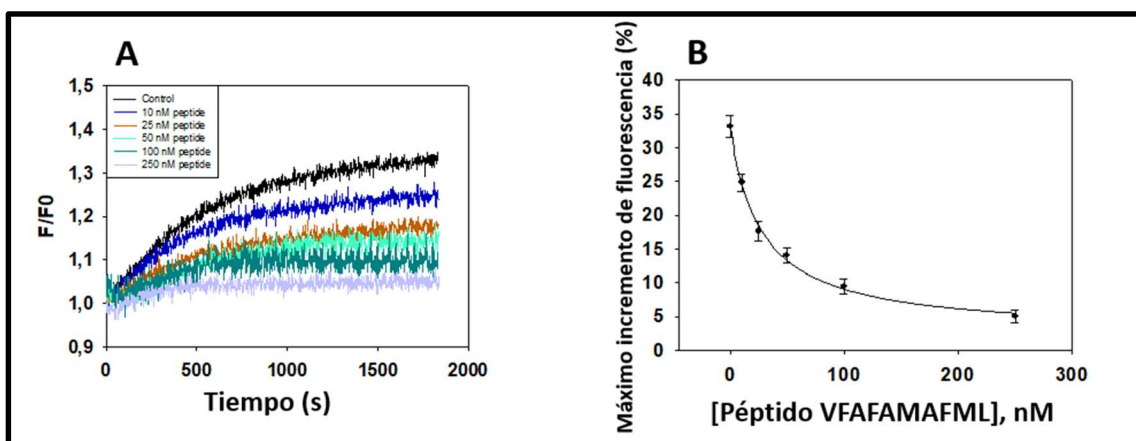


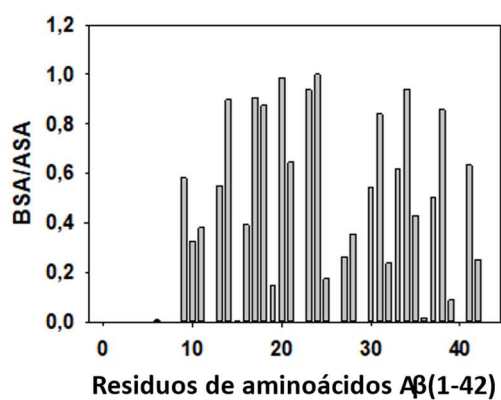
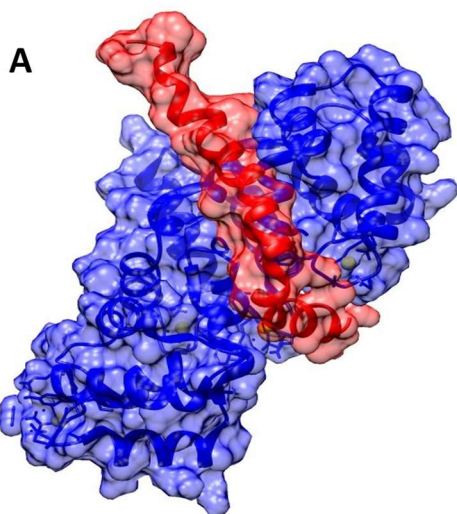
Figura 11. El péptido sintético VFAFAMAFML (aminoácido C-terminal amidado) antagoniza la formación del complejo A β (1-42):calbindina-D28k. (A) Efecto de concentraciones crecientes de este péptido sintético sobre la cinética del incremento de la intensidad de fluorescencia 10 nM A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555 después de la adición de 5 nM de calbindina-D28k. La titulación con el péptido sintético y las medidas de fluorescencia se han realizado como se indica en la sección de los Materiales y Métodos de esta tesis. La cinética de la fluorescencia se registró en presencia de las siguientes concentraciones del péptido VFAFAMAFML (aminoácido C-terminal amidado): 0 (negro), 10 nM (azul oscuro), 25 nM (marrón), 50 nM (azul verdoso), 100 nM (verde) y 250 nM (gris). (B) Gráfico de la dependencia del máximo incremento de fluorescencia registradas 1700 s después de la adición de calbindina-D28k en función de las concentraciones del péptido VFAFAMAFML (aminoácido C-terminal amidado). Los datos que se muestran son el promedio (círculos negros) \pm S.E. (barras de error) de los resultados obtenido en medidas experimentales realizadas por triplicado. La línea continua es el ajuste por regresión no lineal de los datos a la ecuación hiperbólica para el efecto inhibitor de fármacos con unión a un sitio inhibitor: $y = y_0 - [Q_{max} * (\frac{x}{IC_{50} + x})]$, donde y_0 es el aumento máximo de fluorescencia en ausencia del péptido, Q_{max} es la extinción máxima del aumento de fluorescencia a la saturación del péptido y IC_{50} es la concentración del péptido que reduce a la mitad el aumento máximo de fluorescencia. El ajuste de datos dio los siguientes resultados: $R^2 = 0,99694$, $y_0 = 33 \%$, $Q_{max} = 33 \%$ y $IC_{50} = 27 \pm 3$ nM.

2.5 El análisis de docking entre A β (1-42) y calbindina-D28k apoya la formación de complejos A β (1-42):calbindina-D28k.

Como se ha indicado en el apartado anterior, el péptido hidrofóbico VFAFAMAFML (aminoácido C-terminal amidado) se comporta como un antagonista contra la formación del complejo A β (1-42):CaM y también contra la formación de complejos A β (1-42):calbindina-D28k. Esta observación experimental nos llevó a elegir, dentro de los modelos favorecidos hidrofóticamente mejor clasificados (proporcionada por el servidor ClusPro), solo las simulaciones del complejo A β (1-42):calbindina-D28k que muestran una gran cantidad de interacciones con residuos de aminoácidos del péptido A β (1-42) seleccionados para el diseño de este antagonista peptídico. El estudio de docking entre A β (1-42) y calbindina-D28k se ha realizado como se indica en la sección Materiales y Métodos. Como resultado, encontramos que el acoplamiento con la estructura A β (1-42) PDB ID: 1IYT dio más simulaciones energéticamente favorables para el complejo A β (1-42):calbindina-D28k en relación a PDB ID: 1Z0Q, que cumplían el requisito impuesto de amplias interacciones entre los residuos de aminoácidos 24 a 42 de A β (1-42) y Calbindina-D28k. Esto sugiere que el microambiente del bolsillo de unión de A β (1-42) en la calbindina-D28 es más hidrofóbico que en la CaM, lo que también concuerda con el mayor incremento de la fluorescencia de A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555 asociado a su unión a la calbindina-D28k. Por este motivo, obtuvimos los archivos PDB de las 10 estructuras más probables después de la minimización de energía libre (ΔG) proporcionadas por el servidor ClusPro para A β (1-42) PDB ID: 1IYT, todas con valores negativos de ΔG superiores a 10 kcal/mol. Por lo tanto, las simulaciones de acoplamiento predicen una unión de alta afinidad entre A β (1-42) y calbindina-D28k, lo que concuerda bien con los resultados obtenidos en los experimentos cinéticos de fluorescencia. Tres de las estructuras más probables para el complejo A β (1-42):calbindina-D28k mostraron amplias interacciones entre la calbindina-D28k y los residuos de aminoácidos 24-42 de A β (1-42). Estas son las estructuras modelo de los complejos A β (1-42):Calbindina-D28k que se muestran en la **figura 12**, para los cuales la simulación de acoplamiento da valores de ΔG de -17 (modelo 1), -12 (modelo 2) y -11,6 (modelo 3) kcal/mol. Luego, seleccionamos estas estructuras con los

valores de ΔG más bajos para el análisis de interfaz con PDBePISA, que identificó los residuos de aminoácidos de A β (1-42) y calbindina-D28k enumerados en la **tabla 3** como aquellos cuyo microambiente está más fuertemente alterado por las interacciones establecidas en el dominio interfaz entre el péptido y la proteína del complejo A β (1-42):calbindina-D28k en los tres modelos seleccionados.

Estructura del modelo 1



Estructura del modelo 2

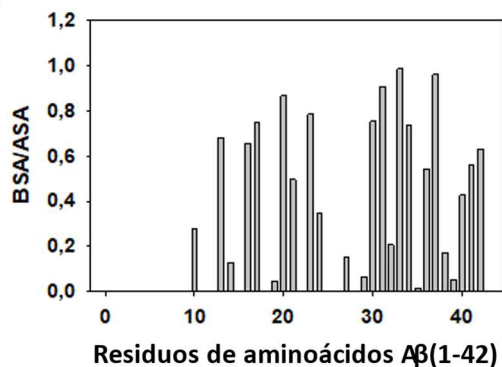
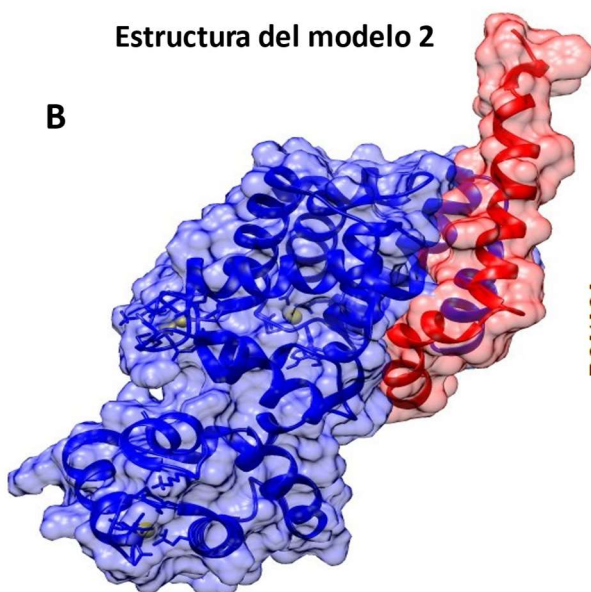


Figura 12. Estructuras de los modelos seleccionados para la formación del complejo A β (1-42):calbindina-D28k obtenidas in silico utilizando los archivos PDB ID: 1IYT para el péptido A β (1-42) y 6FIE para la calbindina-D28k. (A) Estructura del modelo 1. (B) Estructura del modelo 2. (C) Estructura del modelo 3. Para cada estructura modelo del complejo A β (1-42):calbindina-D28k, se muestran imágenes del espacio ocupado (alta densidad electrónica) y del esqueleto peptídico de los péptidos y proteínas en el complejo. El péptido A β (1-42) está coloreado en rojo y la calbindina-D28k está en color azul. Además, se han incluido los gráficos de los valores de BSA/ASA obtenidos para los residuos de aminoácidos del péptido A β (1-42) en las estructuras de los modelos 1, 2 y 3 generados in silico del complejo A β (1-42):calbindina-D28k a la derecha de cada imagen tridimensional del complejo. El análisis de docking se realizó como se indica en detalle en la sección de los Materiales y Métodos de esta tesis doctoral.

Tabla 3. Lista de residuos de aminoácidos del péptido A β (1-42) y de la calbindina-D28k que interaccionan más fuertemente en las regiones de interfaz de las estructuras modelo seleccionadas 1, 2 y 3 obtenidas mediante simulaciones de docking para el complejo A β (1-42):calbindina-D28k 1:1. Los residuos de aminoácidos, tanto del péptido A β (1-42) como de la calbindina-D28k, se enumeran de mayor a menor valor del parámetro BSA/ASA (valores entre paréntesis) obtenidos del análisis de interfaz con el servidor PDBePISA. Solo se han incluido los residuos de aminoácidos con valores $\geq 0,5$ de BSA/ASA para el péptido A β (1-42) y $\geq 0,6$ para la calbindina-D28k.

aminoácidos	Residuos de aminoácidos	Residuo de
	A β (1-42)	calbindina-D28k
Estructura modelo 1	Val24 (1), Phe20 (0,98), Leu34 (0,94), Asp23 (0,93), Leu17 (0,91), His14 (0,90), Val18 (0,88), Gly38 (0,86), Ile31 (0,84), Ala21 (0,65), Ile41 (0,63), Gly33 (0,62), Ala30 (0,55), Gly37 (0,52)	Val173 (0,96), Ile73 (0,94), Val181 (0,88), Leu179 (0,86), Lys72 (0,85), Glu177 (0,85), His80 (0,84), Ser28 (0,83), Glu57 (0,82), Phe61 (0,81), Pro172 (0,68), Tyr30 (0,67), Ser156 (0,61)
Estructura modelo 2	Gly33 (0,98), Gly37 (0,96), Ile31 (0,91), Phe20 (0,86), Asp23 (0,79), Leu17 (0,75), Leu34 (0,74), His13 (0,68), Lys16 (0,66), Ala42 (0,63), Ile41 (0,55), Val36 (0,54)	His80 (0,95), Arg47 (0,95), Pro172 (0,92), Leu89 (0,82), Glu57 (0,78), Arg93 (0,77), Leu82 (0,76), Lys98 (0,74), Ser55 (0,74), Glu77 (0,73), Pro83 (0,72), Leu52 (0,71), Val81 (0,63)
Estructura modelo 3	Gly37 (0,99), Ala21 (0,95), Ile31 (0,92), Leu17 (0,80), Ile41 (0,78), Leu34 (0,76), Gly38 (0,71), His14 (0,69), Val40 (0,63), Phe20 (0,62), Ala30 (0,53), Ala42 (0,52)	Gly188 (0,99), Ser28 (0,95), Asn157 (0,87), Ala258 (0,84), Glu166 (0,83), Phe177 (0,80), Asn192 (0,72), Cys257 (0,70), Ser156 (0,67), Phe191 (0,67), Thr250 (0,63), Gln182 (0,63)

3.2. Hexa-histidina, un péptido con aplicaciones versátiles en el desarrollo de estudios sobre mecanismos moleculares de acción de oligómeros de A β (1-42).

2.1. La hexa-histidina antagoniza la interacción de A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555 con la calmodulina y con la calbindina D28k.

En el desarrollo de los estudios de esta tesis doctoral se ha identificado a la hexa-histidina (His₆) como un segundo péptido con la capacidad de antagonizar la interacción entre A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555 y las proteínas de unión de calcio calmodulina y calbindina D28k. Los resultados mostrados en la **Figura 13 (paneles A y B)** así lo demuestran. El protocolo experimental utilizado para obtener estos resultados ha sido el mismo utilizado con el péptido VFAFAMAFML en el capítulo anterior de los resultados de esta tesis doctoral, para poner de manifiesto el antagonismo de la interacción entre A β (1-42) y estas proteínas de unión de calcio. En este caso, los resultados permiten obtener una IC₅₀ de aproximadamente 1 μ M His₆ para la interacción entre A β (1-42) y calmodulina y de \approx 0,1 μ M His₆ para la interacción entre A β (1-42) y calbindina D28k. Estos valores de IC₅₀ son más elevados que los obtenidos para el péptido VFAFAMAFML, aunque debe notarse que en el caso de la calbindina D28k el valor obtenido para la IC₅₀ de His₆ es solo aproximadamente 4 veces mayor que la IC₅₀ de VFAFAMAFML.

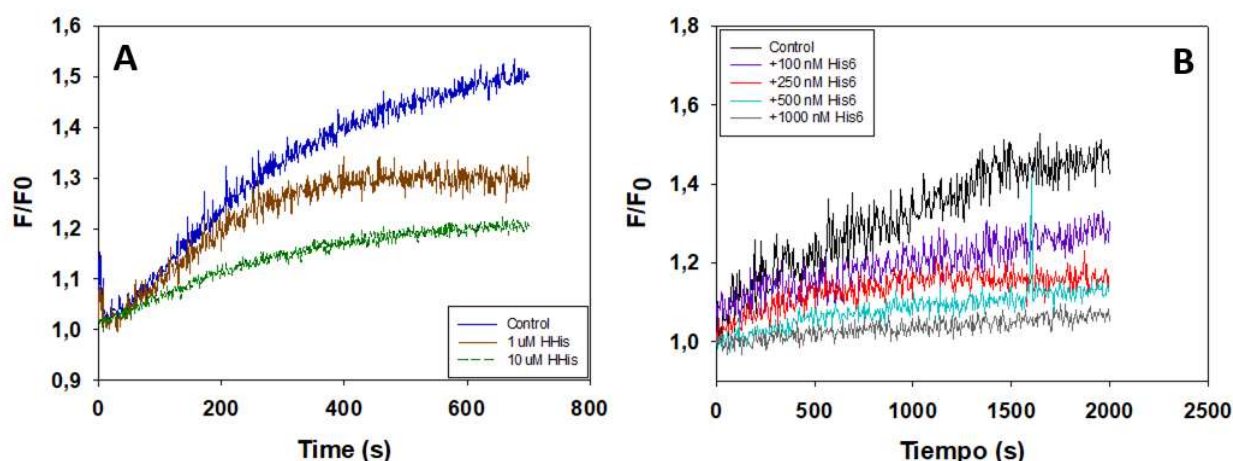


Figura 13. El péptido Hexa-His antagoniza la formación del complejo A β (1-42):CaM y A β (1-42):calbindina-D28k. (A) Efecto de concentraciones crecientes del péptido Hexa-His sobre la cinética del incremento de la intensidad de fluorescencia 10 nM A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555 después de la adición de 5 nM de CaM. (B) Efecto de concentraciones crecientes del péptido Hexa-His sobre la cinética del incremento de la intensidad de fluorescencia 10 nM A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555 después de la adición de 5 nM de calbindina D28k.

La adición de concentraciones submicromolares de His₆ a una solución de 10 nM A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555 produce un incremento de aproximadamente un 10% en la intensidad de fluorescencia de este derivado de A β (1-42), **Figura 14**. El incremento máximo de la fluorescencia de A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555 no varía significativamente entre 0,1 y 0,25 μ M de His₆ (concentraciones en exceso sobre la de A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555), lo que implica que a estas concentraciones de His₆ la formación de complejos entre este péptido y A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555 está saturada. El análisis de los resultados muestra que el incremento de fluorescencia presenta una fase de retardo inicial de 1-2 minutos con un valor de $t_{1/2}$ entre 8 y 9 minutos a ambas concentraciones de His₆. Estos resultados permiten excluir que la reacción bimolecular entre His₆ y A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555 sea el paso limitante de este proceso cinético y apoyan que el incremento de fluorescencia es consecuencia de un proceso cinético de primer orden (cambio conformacional) en la estructura de A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555 inducido por la formación del complejo entre ambas moléculas.

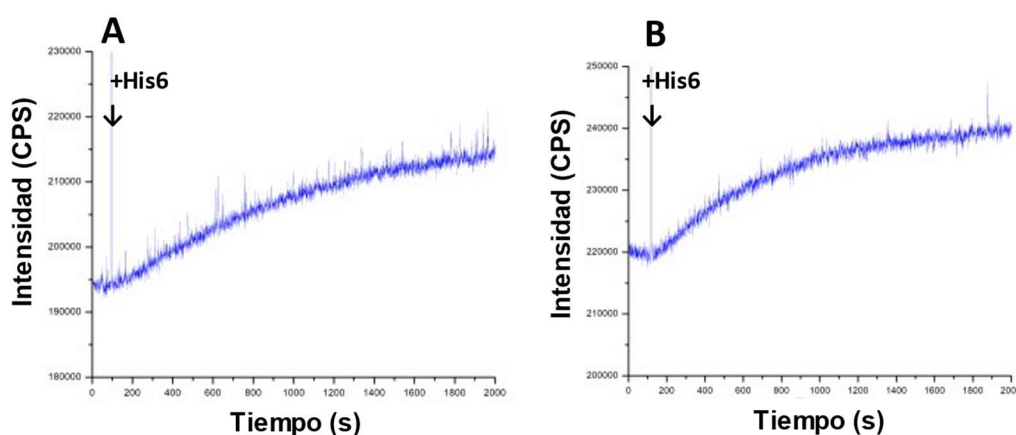


Figura 14. Efecto de la poli-His₆ en la cinética de formación del complejo A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555:His₆. La formación del complejo se midió con concentraciones 10 nM A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555 y 0,1 y 0,25 μ M de His₆ (paneles A y B, respectivamente). La flecha señala el tiempo al que se añadió la His₆ en la cubeta de medida de la fluorescencia. Las condiciones experimentales se describen detalladamente en los Materiales y Métodos de esta tesis doctoral. Se muestran los trazos cinéticos promedio de los resultados obtenidos en triplicados experimentales.

2.2. Docking entre la hexa-histidina y A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555.

El análisis de *docking* entre la Hexa-histidina (His₆) y el péptido A β (1-42) realizado con el software MDockPeP Server genera tres posibles tipos de

modelos estructurales más probables entre los 10 modelos del complejo entre estas dos moléculas generados por el servidor. Estos modelos estructurales se presentan en la **Figura 15**. El modelo 1 es el que el servidor genera como el más probable, que es representativo de 4 de los 10 modelos estructurales más probables que muestran la interacción de la His₆ con el dominio próximo al aminoácido NH₂-terminal del péptido Aβ(1-42), implicando a la α-hélice corta y la parte de la α-hélice larga próxima al codo estructural de esta molécula. El modelo 2 es el que el servidor genera como el segundo más probable y es representativo de otros 4 de los 10 modelos estructurales más probables que muestran la interacción de la His₆ con el dominio próximo al aminoácido COOH-terminal del péptido Aβ(1-42). El modelo 3 es el que el servidor genera como el tercero más probable y es representativo de 2 de los 10 modelos estructurales más probables que muestran la interacción de la His₆ con el dominio medio de la α-hélice larga del péptido Aβ(1-42).

Modelos generados por docking entre hexa-His y Aβ(1-42)

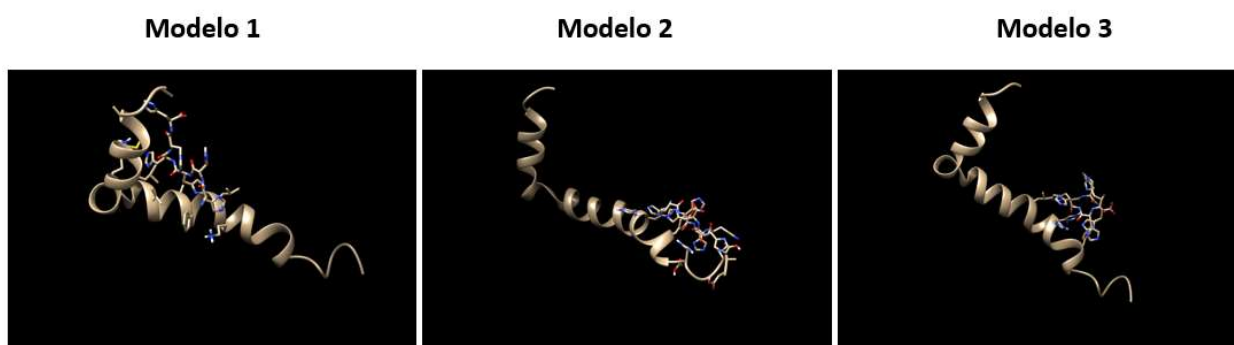


Figura 15. Modelos de la formación del complejo Aβ(1-42) HiLyte™-Fluor555:His6 generado con MDockPeP Server a partir de la estructura del péptido Aβ(1-42) (PDB ID: 1IYT) y la secuencia del péptido His6.

Por tanto, el análisis *“in silico”* efectuado permite concluir que hay una notable plasticidad conformacional en la formación de los complejos entre la His₆ y el péptido Aβ(1-42). Un corolario de esta conclusión es que el modelo estructural predominante de estos complejos debe ser fuertemente dependiente del microentorno en el que estos se encuentren (más o menos hidrofóbico).

2.3. Colocalización del A β (1-42) con la Cb₅R en neuronas granulares del cerebelo de rata.

El retículo endoplasmático es un orgánulo intracelular que une extensivamente concentraciones entre 60 y 200 nM del péptido A β (1-42) internalizado en neuronas granulares del cerebelo (CGN) [Poejo *et al.*, 2021a] y en la línea neuronal HT-22 [Poejo, 2022]. Como se ha indicado en la sección de Introducción de esta Tesis doctoral, estudios realizados por otros investigadores han demostrado que la desregulación de las funciones del retículo endoplasmático media la citotoxicidad de los diferentes péptidos β -amiloides neurotóxicos, A β (1-42) entre ellos. Además, en la enfermedad de Alzheimer se han documentado alteraciones significativas del metabolismo de los lípidos, incluyendo al colesterol [Rojo *et al.*, 2006]. El sistema citocromo *b*₅/citocromo *b*₅ reductasa (Cb₅/Cb₅R) desempeña un importante papel en el metabolismo de los lípidos (véase la sección de Introducción de esta tesis) y por estas razones hemos evaluado experimentalmente la posibilidad de que este sistema redox pueda encontrarse asociado a nanodominios de las membranas celulares que unen concentraciones del A β (1-42) en la escala de nanomolar a submicromolar.

Utilizando la técnica de microscopía de fluorescencia hemos estudiado la colocalización de A β (1-42) HiLyte™-Fluor555 con Cb₅R en neuronas granulares del cerebelo en cultivo. El anticuerpo anti-Cb₅R de conejo se ha visualizado con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo fluorescente marcado con Alexa488 y se han adquirido imágenes de fluorescencia de neuronas en ausencia y en presencia de 100 nM A β (1-42) HiLyte™-Fluor555 (**Figura 16**). Los resultados muestran una extensa colocalización de Cb₅R con A β (1-42) en estas neuronas, color naranja-amarillo en las imágenes de superposición (“merge”) mostradas en la figura. El análisis de la relación de intensidades de fluorescencia roja/fluorescencia verde de las imágenes (**Figura 16, panel FRET**) demuestra que esta relación se incrementa más de cuatro veces en presencia de 100 nM A β (1-42) HiLyte™-Fluor555 con respecto al valor de esta relación en neuronas granulares del cerebelo teñidas solo con anti-Cb₅R +secundario fluorescente Alexa488. La intensidad promedio de fluorescencia (roja y verde) por pixel en los somas neuronales se ha medido utilizando la

herramienta de selección de región de interés del software HCLImage de Hamamatsu.

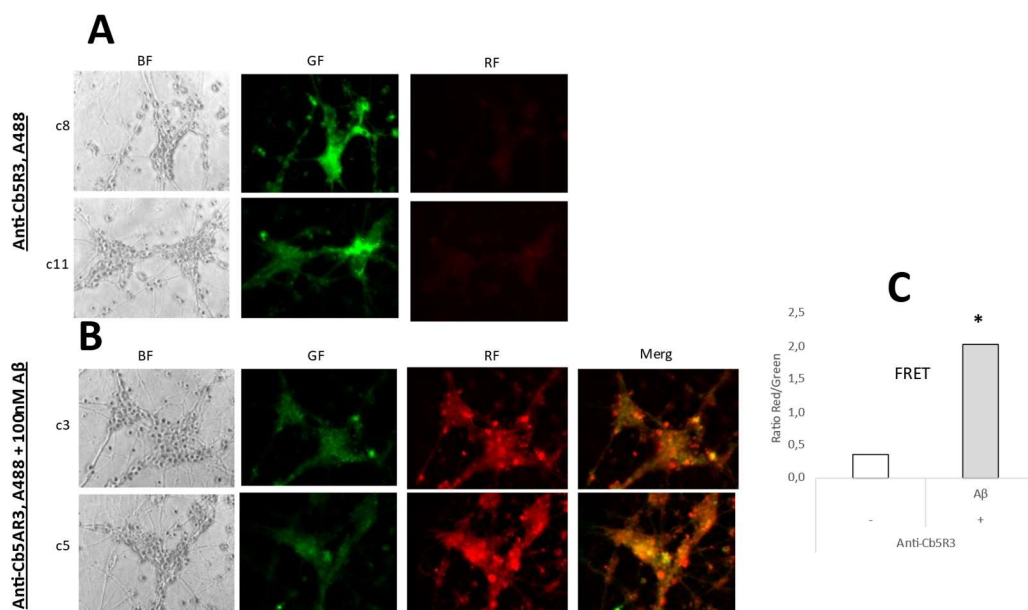


Figura 16. Colocalización y FRET entre Cb_5R y $A\beta(1-42)$ HiLyte™-Fluor555. Panel A: imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de CGN teñidas con el anticuerpo primario anti- Cb_5R3 más el secundario anti-IgG marcado con Alexa488 (Anti- Cb_5R^*A488). Panel B: imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de CGN doblemente teñidas con el anticuerpo primario anti- Cb_5R3 más el secundario anti-IgG marcado con Alexa488 (Anti- Cb_5R^*A488) y con 100 nM $A\beta(1-42)$ HiLyte™-Fluor555 (Anti- Cb_5R^*A488 +100 nM $A\beta$). Para cada campo seleccionado, indicado a la izquierda de las imágenes con c(número), se presentan las imágenes de: contraste de fases (BF), de fluorescencia verde (GF) y de fluorescencia roja (RF). La barra de escala insertada en las imágenes son de 20 μ m. Las imágenes GF y RF se obtuvieron con un tiempo de exposición de 0,4 s. Las áreas de color amarillo y naranja de las imágenes de superposición de las imágenes GF y RF (merge) muestran la colocalización extensiva de Cb_5R y $A\beta(1-42)$. Panel C: Valor del cociente entre las intensidades de la fluorescencia roja y verde por pixel (relación RF/GF), obtenido como se explica detalladamente en la sección de los Materiales y Métodos de esta tesis doctoral. Los resultados mostrados son los valores promedio \pm el error estándar de resultados obtenidos en experimentos realizados por triplicado ($n > 100$ CGN somas en cada caso). (*) $p < 0.05$, diferencia estadísticamente significativa entre los valores de la relación RF/GF de CGN doblemente teñidas (Anti- Cb_5R^*A488 +100 nM $A\beta$) y los valores de la relación RF/GF de las CGN teñidas solo con (Anti- Cb_5R^*A488).

Imágenes de las neuronas granulares del cerebelo teñidas solo con 100 nM $A\beta(1-42)$ HiLyte™-Fluor555 se han adquirido para restar el componente de excitación directa de la fluorescencia roja con el filtro de excitación de 470 nm. En este caso se demostró que es solo una pequeña contribución de intensidad de fluorescencia (<10% de la señal total registrada con doble tinción

fluorescente). Como se ha documentado con otros pares FRET en publicaciones previas de nuestro laboratorio [Marques-da-Silva *et al.*, 2010; Marques-da-Silva and Gutierrez-Merino, 2012,2014; Fortalezas *et al.*, 2019], esto implica que hay una transferencia de energía de fluorescencia (FRET) significativa entre la sonda Alexa488 unida al secundario fluorescente contra anti- *Cb*₅R (donador) y A β (1-42) HiLyte™-Fluor555 (aceptor). Teniendo en cuenta el tamaño del complejo entre el anticuerpo primario anti-*Cb*₅R y el anticuerpo secundario fluorescente conjugado con Alexa488 este resultado implica que *Cb*₅R y A β (1-42) colocalizan a una distancia ≤ 40 nm en las neuronas granulares del cerebelo.

2.4. Docking entre péptidos A β neurotóxicos y la *Cb*₅R.

La colocalización de dos proteínas en nanodominios estructurales de una dimensión de 40 nm en las células no implica necesariamente la formación de complejos por interacción directa entre dos proteínas de dimensiones de solo pocos nm. Por tanto, hemos realizado estudios adicionales para evaluar críticamente la posibilidad de formación de complejos entre la *Cb*₅R y péptidos A β neurotóxicos.

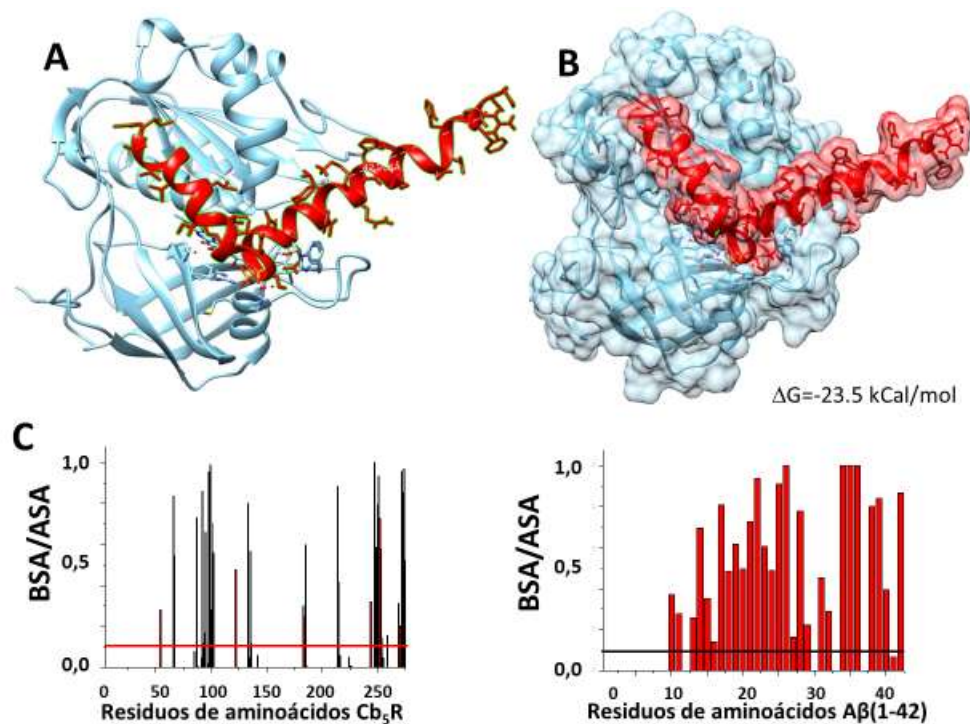


Figura 17. La estructura 1 del modelo in silico seleccionado del complejo A β (1-42):*Cb*₅R obtenido usando los archivos PDB ID: 1IYT para el péptido A β (1-42) y 1UMK para la *Cb*₅R. El acoplamiento se realizó como se indica en la sección de Materiales y Métodos.

(A) Imágenes del esqueleto peptídico de los péptidos y proteínas en el complejo. El péptido A β (1-42) en rojo y Cb₅R en gris (en la imagen de esqueleto peptídico de rojo), los residuos 24-42 de los aminoácidos del péptido A β (1-42) en el modelo participan en la interacción con la Cb₅R. (B) Imágenes del espacio ocupado (alta densidad electrónica) y del esqueleto peptídico de los péptidos y proteínas en el complejo. El péptido A β (1-42) en rojo y Cb₅R en gris. (C) Gráficos de los valores BSA/ASA obtenidos para los residuos de aminoácidos del péptido A β (1-42) y de la Cb₅R en la estructura 2 del modelo in silico del complejo A β (1-42):Cb₅R.

En primer lugar, hemos hecho un análisis de *docking* entre la isoforma de la Cb₅R de eritrocitos (PDB ID: 1UMK) y A β (1-42) (PDB ID: 1IYT y 1Z0Q) utilizando ClusPro Web Server, véase la sección de los Materiales y Métodos para más detalles de esta aproximación metodológica. Los resultados de este análisis generaron dos agrupaciones de conformaciones de baja energía altamente probables con la conformación 1IYT del A β (1-42), modelo 1 (**Figura 17**) y modelo 2 (**Figura 18**). Ambos modelos implican la interacción del A β (1-42) con el dominio catalítico que contiene el grupo prostético de la Cb₅R, el FAD, y aminoácidos próximos del dominio de unión del Cb₅ a la Cb₅R, que se han reportado en una publicación reciente de nuestro equipo de investigación [Samhan-Arias *et al.* (2018a)]. Imponiendo la condición de que se vea afectado el dominio de unión del FAD y aminoácidos proximales del dominio de unión del Cb₅ a la Cb₅R en los complejos entre la Cb₅R y el A β (1-42), el análisis de *docking* con la conformación 1Z0Q del A β (1-42) generó modelos de complejos con valores de energía de estabilización notablemente inferiores (≤ 12 kcal/mol) y han sido descartados en este estudio. La energía de estabilización obtenida para los dos modelos del complejo entre la conformación 1IYT del A β (1-42) y la Cb₅R es muy elevada, -23,5 y -21,2 kcal/mol para los modelos 1 y 2, respectivamente. Los aminoácidos más fuertemente implicados en el dominio de interacción entre la Cb₅R y el A β (1-42) han sido obtenidos a partir del análisis de enmascaramiento de residuos, índice BSA/ASA (*Buried Surface Area/Accessible Surface Area*), como se ha explicado previamente en esta tesis. Los aminoácidos con valor de BSA/ASA > 0,75 se indican a continuación:

Modelo 1: *Aminoácidos de la Cb₅R*: A66, H92, G98, G99, I133, D214, P250, P251, C272, F273 y V274. *Aminoácidos del péptido A β (1-42)*: L17, E22, G25, K28, L34, M35, V36, G38, V39, y A42.

Modelo 2: Aminoácidos de la *Cb5R*: P135, I142, P252, I254, E270, C272, F273 y V274. Aminoácidos del péptido $A\beta(1-42)$: S8, G9, V12, H13, L17, y V24.

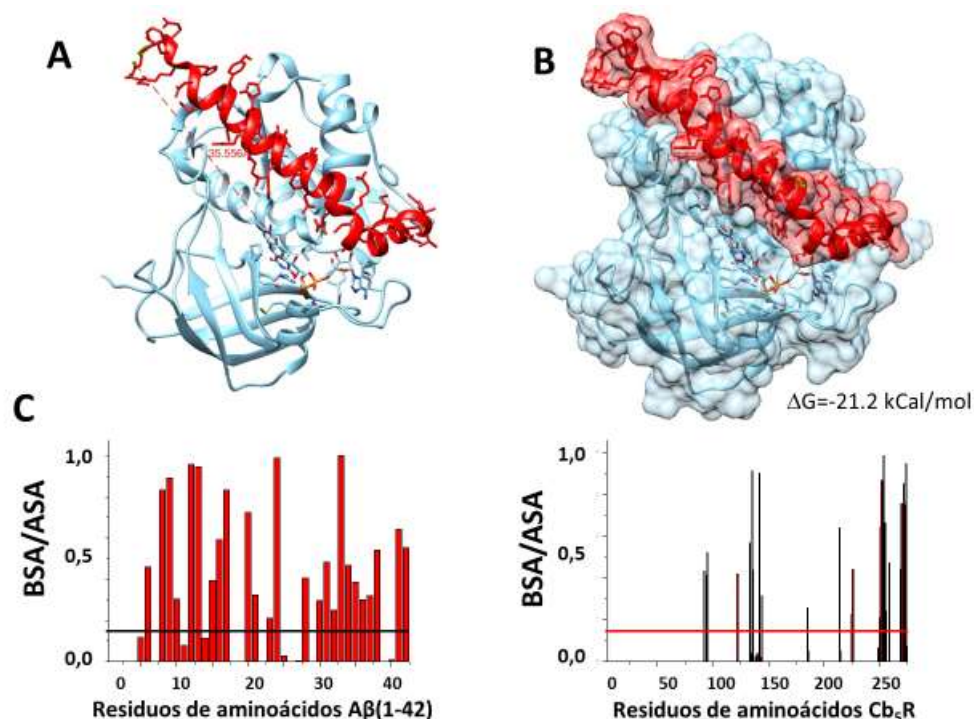


Figura 18. La estructura 2 del modelo in silico seleccionado del complejo $A\beta(1-42):Cb_5R$ obtenido usando los archivos PDB ID: 1IYT para el péptido $A\beta(1-42)$ y 1UMK para la *Cb5R*. El acoplamiento se realizó como se indica en la sección de Materiales y Métodos. (A) Imágenes del esqueleto peptídico de los péptidos y proteínas en el complejo. El péptido $A\beta(1-42)$ en rojo y *Cb5R* en gris (en la imagen de esqueleto peptídico de rojo), los residuos 24-42 de los aminoácidos del péptido $A\beta(1-42)$ en el modelo participan en la interacción con la *Cb5R*. (B) Imágenes del espacio ocupado (alta densidad electrónica) y del esqueleto peptídico de los péptidos y proteínas en el complejo. El péptido $A\beta(1-42)$ en rojo y *Cb5R* en gris. (C) Gráficos de los valores BSA/ASA obtenidos para los residuos de aminoácidos del péptido $A\beta(1-42)$ y de la *Cb5R* en la estructura 2 del modelo in silico del complejo $A\beta(1-42):Cb_5R$.

Este análisis pone de manifiesto que el dominio formado por los aminoácidos 25 a 35 del $A\beta(1-42)$ tienen una importante contribución a la formación del complejo con la *Cb5R* en ambos modelos (modelos 1 y 2). Puesto que el péptido $A\beta(25-35)$ ha sido reportado como el péptido β -amiloide de menor tamaño derivado del $A\beta(1-42)$ que mantiene la capacidad neurotóxica [Millucci

et al., 2010], hemos realizado también estudios de docking entre la Cb_5R y el péptido $A\beta(25-35)$ para evaluar la propensión de este péptido más corto a formar complejos con la Cb_5R . Imponiendo la condición de que el dominio de unión del FAD y aminoácidos proximales del dominio de unión del Cb_5 a la Cb_5R forme parte del dominio de interacción entre la Cb_5R y el péptido $A\beta(25-35)$, el análisis de CABS-dock Web Server genera los dos modelos más probables del complejo entre estas dos moléculas que se muestran en las **Figuras 19** y **20**. Sin embargo, debe notarse que el valor de la energía de estabilización de estos complejos (-9,7 kcal/mol) es notablemente inferior a los valores obtenidos para los modelos 1 y 2 del complejo entre la conformación 1IYT del $A\beta(1-42)$ y la Cb_5R (-23,5 y -21,2 kcal/mol).

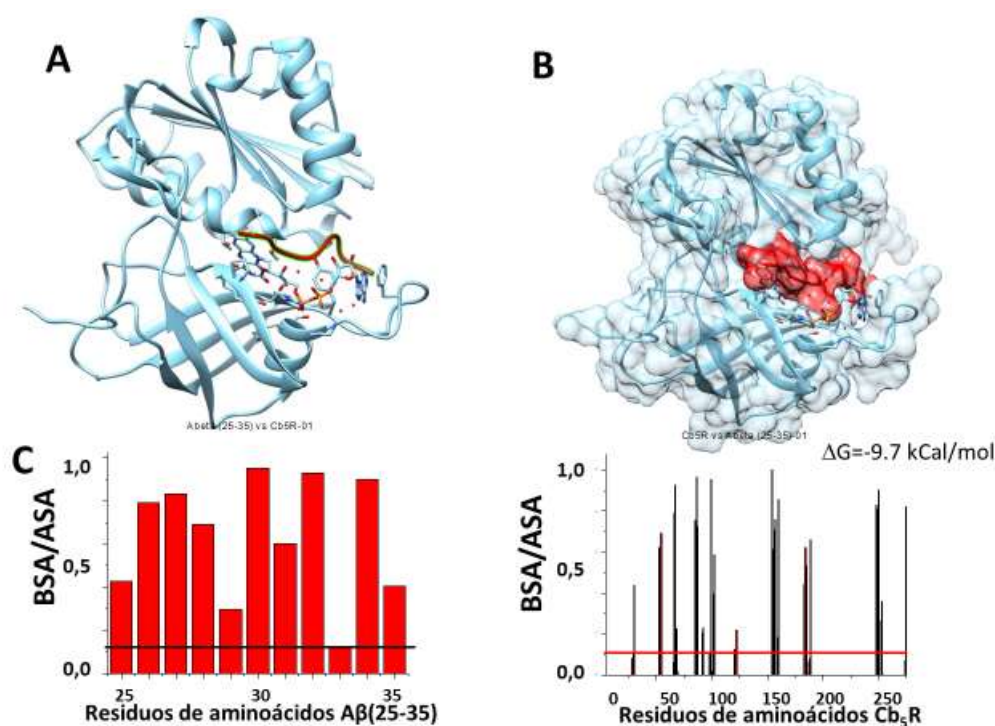


Figura 19. La estructura 1 del modelo in silico seleccionado del complejo $A\beta(25-35):Cb_5R$ obtenido usando la secuencia de aminoácidos de para el péptido $A\beta(25-35)$ y 1UMK para la Cb_5R . El acoplamiento se realizó como se indica en la sección de Materiales y Métodos. (A) Imágenes del esqueleto peptídico de los péptidos y proteínas en el complejo. El péptido $A\beta(25-35)$ en rojo y Cb_5R en gris (en la imagen de esqueleto peptídico de rojo). (B) Imágenes del espacio ocupado (alta densidad electrónica) y del esqueleto peptídico de los péptidos y proteínas en el complejo. El péptido $A\beta(25-35)$ en rojo y Cb_5R en gris. (C) Gráficos de los valores BSA/ASA obtenidos para los residuos de aminoácidos del péptido $A\beta(25-35)$ y de la Cb_5R en la estructura 1 del modelo in silico del complejo $A\beta(25-35):Cb_5R$.

Otro péptido β -amiloide detectado en el cerebro de pacientes de Alzheimer es el $A\beta(1-40)$. En la **Figura 21A** se muestra el modelo para la formación de complejo entre la Cb_5R (PDB ID: 1UMK) y la estructura parcialmente plegada del péptido $A\beta(1-40)$ (PDB ID: 2LFM) generado por el análisis de *docking* realizado con el ClusPro Web Server. Este modelo está basado en los 10 modelos más probables y ponderados por tamaño de agrupaciones. Cumple el requisito de que el dominio de unión del FAD y aminoácidos proximales del dominio de unión del Cb_5 a la Cb_5R forme parte del dominio de interacción entre estas dos moléculas. Debe notarse, sin embargo, que la energía libre de estabilización de este complejo ($E = -13,9$ kcal/mol) es significativamente menor que la obtenida con el péptido $A\beta(1-42)$. Por tanto, el análisis de *docking* sugiere que la Cb_5R tiene mucho menos afinidad por el péptido $A\beta(1-40)$ que por el péptido $A\beta(1-42)$. La superficie de interacción definida para relaciones BSA/ASA $> 0,15$ (**Figura 21 B, C y D**) está compuesta por los siguientes aminoácidos:

Aminoácidos de la Cb_5R : H77, Y79, V89, V90, R91, P92, Y93, T94, I109, K110, Y112, F120, G123, G124, K125, M126, S127, S145, G146, L147, I158, R159, P160, D161, K162, G179, G180, T181, G182, T184, P185, Q210, M272, C273, G274, P275, P276, I279, L284, T294, E295, C297, F298, V299, F300.

Aminoácidos del péptido $A\beta(1-40)$: D7, S8, G9, Y10, E11, V12, H13, H14, Q15, K16, L17, V18, F19, M35, V36, G38, V39, V40.

Una secuencia similar de aminoácidos se obtiene para el modelo de complejo más probable cuando se selecciona la opción de solo interacción electrostática ($E = -16,1$ kcal/mol) y la misma secuencia cuando se selecciona la opción de solo interacción hidrofóbica ($E = -13,6$ kcal/mol). Por tanto, esas simulaciones sugieren que estas son las dos fuerzas predominantes en la interacción entre la Cb_5R y el péptido $A\beta(1-40)$. El modelo de complejo obtenido con todos los tipos de interacciones balanceados predice enlaces por puentes de H entre los siguientes pares de residuos del complejo $Cb_5R:A\beta(1-40)$: K125:D7, R91:S8, R91:G9, K110:E11, Y112:E11, T181:E11, P275:E11, K162:L17, K110:Y10 y P160:V39. Asimismo, predice la formación de tres puentes salinos en el complejo $Cb_5R:A\beta(1-40)$: K125:D7, R91:D7 y K110:E11.

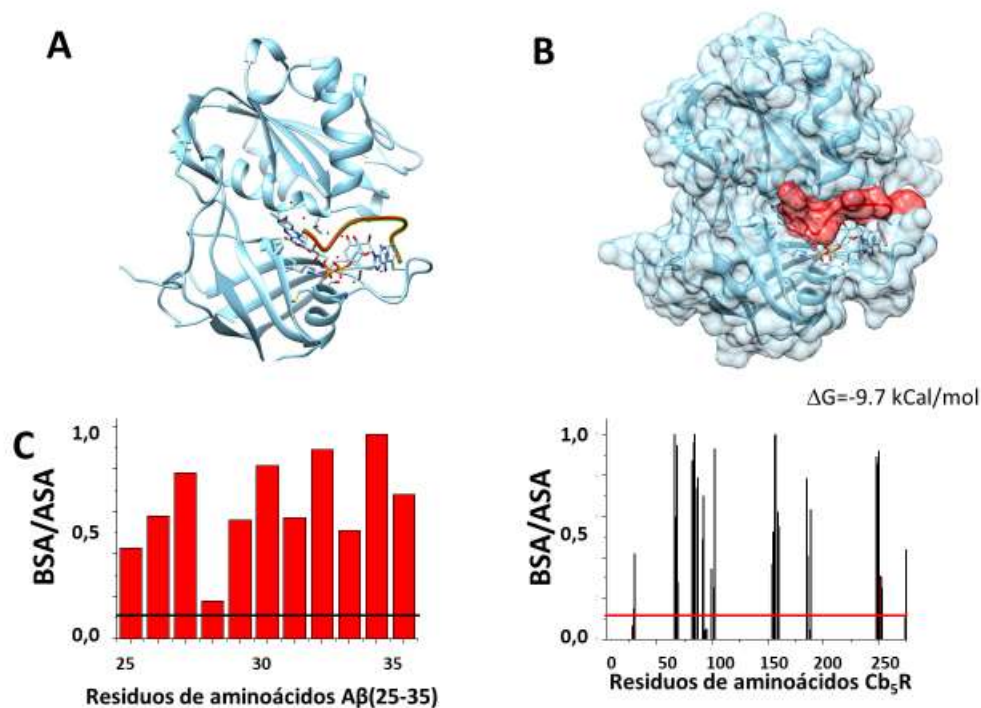


Figura 20. La estructura 2 del modelo in silico seleccionado del complejo A β (25-35):Cb₅R obtenido usando la secuencia de aminoácidos de para el péptido A β (25-35) y 1UMK para la Cb₅R. El acoplamiento se realizó como se indica en la sección de Materiales y Métodos. (A) Imágenes del esqueleto peptídico de los péptidos y proteínas en el complejo. El péptido A β (25-35) en rojo y Cb₅R en gris (en la imagen de esqueleto peptídico de rojo). (B) Imágenes del espacio ocupado (alta densidad electrónica) y del esqueleto peptídico de los péptidos y proteínas en el complejo. El péptido A β (25-35) en rojo y Cb₅R en gris. (C) Gráficos de los valores BSA/ASA obtenidos para los residuos de aminoácidos del péptido A β (25-35) y de la Cb₅R en la estructura 2 del modelo in silico del complejo A β (25-35):Cb₅R.

Dado que los resultados de simulaciones “*in silico*” deben ser contrastados experimentalmente, procedimos a medir experimentalmente el efecto de los péptidos A β (1-42) y A β (25-35) sobre la actividad de la Cb₅R.

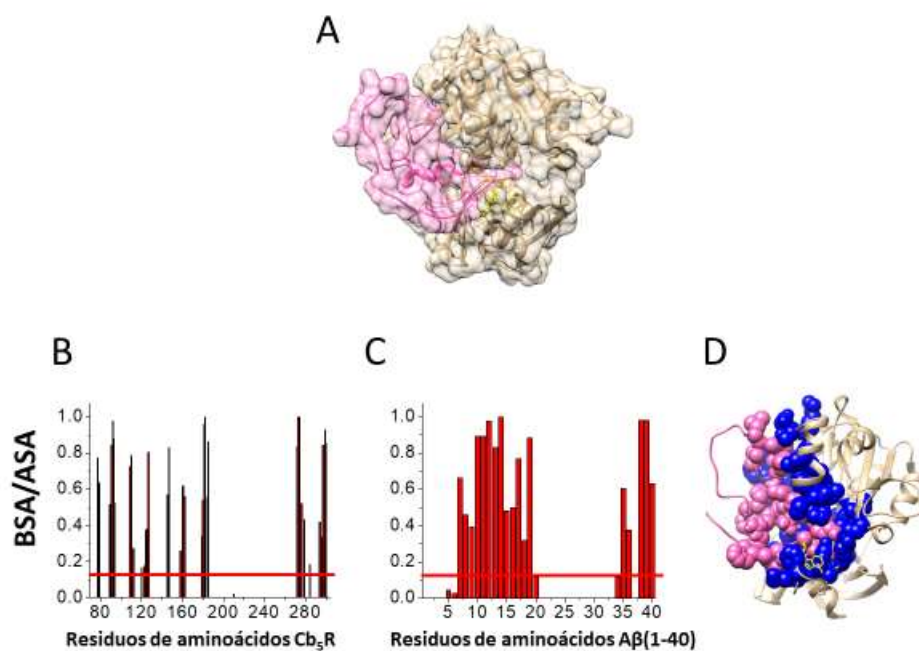


Figura 21. Simulaciones de acoplamiento restringidas para eritrocitos humanos Cb_5R y $A\beta(1-40)$. La solución mejor clasificada se seleccionó como se indica en la sección Materiales y Métodos. En el panel A se muestra un modelo 3D predicho para la formación del complejo entre Cb_5R (marrón) y $A\beta$ (rosa). La relación entre la superficie oculta y la superficie accesible se calculó y representó para el caso de Cb_5R (panel B) y $A\beta$ (panel C) donde el nivel del fondo (correspondiente a un valor de relación de 0,15) se indica mediante una línea roja. Los residuos resaltados involucrados en la formación de puentes de hidrógeno y salinos entre Cb_5R y $A\beta$ están etiquetados como esferas azules y esferas rosas, respectivamente (panel D). El grupo FAD de Cb_5R se coloreó en amarillo en todos los paneles.

2.5. Concentraciones submicromolares de péptidos β -amiloides inhiben la reducción del citocromo b_5 por la Cb_5R recombinante con una cola de poli- His_6 , pero no a la Cb_5R recombinante sin la cola de poli- His_6 .

Hemos producido y purificado la Cb_5R humana recombinante con una cola de poli- His_6 añadida al aminoácido NH_2 -terminal como se ha descrito en la sección de los Materiales y Métodos de esta tesis doctoral. La reducción del Cb_5 dependiente de NADH catalizada por la Cb_5R se ha medido siguiendo el protocolo descrito también en los Materiales y Métodos de esta tesis y, a partir de las medidas de velocidad inicial, se ha calculado la actividad de la Cb_5R .

La actividad específica promedio determinada para las muestras de Cb_5R humana recombinante utilizadas en esta tesis ha sido de $7,9 \pm 0,7$ μ moles de Cb_5 reducido/min/mg de Cb_5R a 25 °C y se ha determinado a partir de trazos cinéticos

de velocidad inicial como el mostrado en la **Figura 22A**. Hemos titulado esta actividad con concentraciones crecientes del péptido A β (1-42) en varias series experimentales, de manera que en una cada una de las cubetas de ensayo solo se han medido control (sin adición del péptido β -amiloide) y, como máximo, dos adiciones de A β (1-42). Este protocolo se ha diseñado para tener un control interno de la actividad de la Cb₅R en ausencia de péptido A β (1-42), para todas las medidas experimentales realizadas con diferentes cubetas de ensayo, eliminando la posible variabilidad de la actividad de la Cb₅R asociada a la posible pérdida de actividad durante el periodo de tiempo necesario para completar la gráfica de titulación con el péptido β -amiloide, usualmente 2-3 días. Además, en la cubeta de ensayo se han ajustado las concentraciones de Cb₅R y de Cb₅ de manera que fuera posible la obtención de datos fiables de velocidad inicial de reducción del Cb₅ en periodos de tiempo de 5-10 minutos, tras la adición del NADH y sólo con una pequeña disminución de la concentración de Cb₅ oxidado en la cubeta de ensayo. Como se ilustra en la **Figura 22A** la inhibición de la velocidad de reducción del Cb₅ por los péptidos A β (1-42) y A β (25-35) se observa en una escala de varios minutos tras la adición del péptido, lo que implica una rápida unión de estos péptidos al sitio de inhibición. De hecho, las medidas de la actividad de reducción del Cb₅ por 50 y 100 nM del péptido β -amiloide, sin incubación previa o con preincubación hasta 30 minutos de la Cb₅R con el péptido, dieron resultados de inhibición que no fueron significativamente diferentes (menos del 10% de diferencia entre ellos). Por otra parte, la posibilidad de que la inhibición observada pudiera ser atribuible a la interacción entre el Cb₅ y el péptido β -amiloide es muy poco probable, porque hasta 2 μ M de los péptidos A β (1-42) y A β (25-35) no producen alteración detectable del espectro de absorción del Cb₅, lo que excluye una significativa perturbación del microentorno del grupo hemo de esta molécula por estos péptidos.

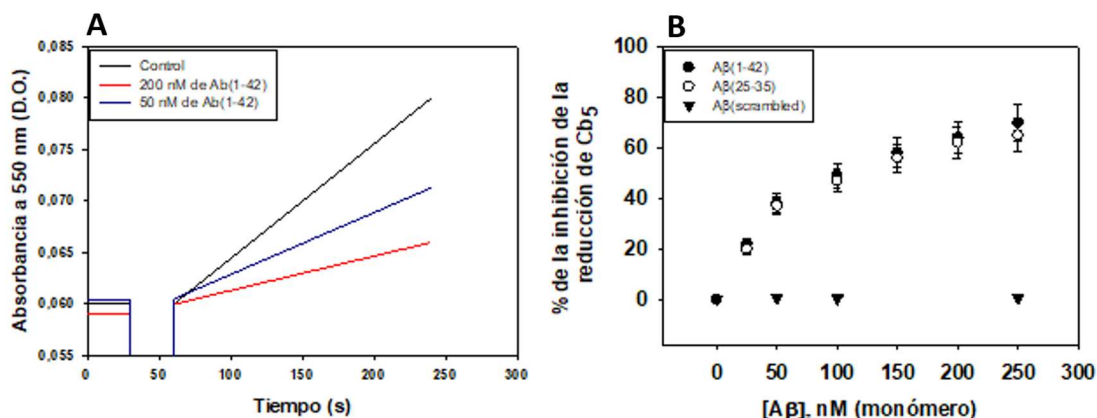


Figura 22. Efecto de cola de poli-His6 en la actividad NADH: Cb_5 reductasa de la Cb_5R . (A) Cinética de la reducción del Cb_5 dependiente de NADH por la Cb_5R con cola de poli-His6 en ausencia y en presencia de las concentraciones indicadas de los péptidos $A\beta(1-42)$ y $A\beta(25-35)$. (B) Dependencia con la concentración de $A\beta(1-42)$, $A\beta(25-35)$ y $A\beta(\text{scrambled})$ de la inhibición de la reducción de Cb_5 dependiente de NADH por la Cb_5R con cola de poli-His6. Las medidas de la actividad de reducción del Cb_5 dependiente de NADH se han realizado como se indica en la sección de los Materiales y Métodos de esta tesis doctoral. Los resultados mostrados son el promedio \pm el error estándar de los resultados obtenidos en triplicados experimentales.

Los resultados obtenidos mostraron inhibición por los péptidos $A\beta(1-42)$ y $A\beta(25-35)$ de la actividad NADH: Cb_5 reductasa de la Cb_5R , siendo este resultado diferente en el caso del obtenido con el "scrambled" péptido de $A\beta$ que no inhibe la actividad de la Cb_5R de reducción del Cb_5 dependiente de NADH (**Figura 22B**). Los resultados se ajustan bien a la ecuación de inhibición por unión a un sitio inhibitor con una K_i de 50-60 nM (monómeros) y una inhibición máxima de 75-80%. Puesto que el péptido $A\beta(1-42)$ se encuentra en forma dimérica como se ha indicado antes es esta tesis doctoral, esto implica que para este péptido la K_i real es de 25-30 nM (dímeros). Esta K_i es 5-10 veces mayor que la concentración de la Cb_5R en la cubeta de ensayo, por lo que puede despreciarse la corrección de la concentración libre del péptido $A\beta(1-42)$ por la unión del péptido a la enzima.

A continuación, hemos estudiado la dependencia de la actividad de reducción del Cb_5 dependiente de NADH por la Cb_5R humana recombinante, sin la cola de poli-His6, con la concentración de los péptidos $A\beta(1-42)$ y $A\beta(25-35)$. La eliminación de la cola de poli-His6 se ha realizado como se ha descrito en la sección de los Materiales y Métodos de esta tesis. Los resultados obtenidos

demonstraron que hasta una concentración de 2 μM estos péptidos no tienen ningún efecto sobre la actividad de la Cb_5R humana recombinante sin la cola de poli-His₆, ni de tipo inhibidor ni activador, ya que registramos variaciones aleatorias de la actividad dentro de un intervalo de $\pm 5\%$ a las diferentes concentraciones testeadas (0,1, 0,25, 0,5, 1 y 2 μM), es decir, dentro del intervalo de error estándar de estas medidas (**Figura 23A**: gráfica de barras con oscilaciones de $\pm 5\%$). Para reafirmar más este resultado, hemos medido el efecto de estos péptidos β -amiloides sobre la actividad de la reducción de Cb_5 dependiente de NADH de la Cb_5R de membranas preparadas de sinaptosomas de cerebro de cerdo y de cerebro de rata, siguiendo protocolos validados en publicaciones previas de nuestro grupo de investigación [Samhan-Arias *et al.*, 2008, 2009, 2014, 2018]. Los resultados obtenidos nos permitieron concluir que, hasta una concentración de 2 μM , los péptidos $A\beta(1-42)$ y $A\beta(25-35)$ no tienen ningún efecto estadísticamente significativo sobre la actividad de reducción de Cb_5 dependiente de NADH de la isoforma de membrana de la Cb_5R (**Figura 23A**). Una importante conclusión derivada de estos resultados es que la cola de poli-His₆ sensibiliza fuertemente la inhibición de la Cb_5R por péptidos β -amiloides. Puesto que esta cola de poli-His₆ se encuentra unida covalentemente al grupo amino terminal de la Cb_5R , que está relativamente distante del centro catalítico de esta enzima, hipotetizamos que la inhibición se produce por bloqueo del correcto posicionamiento del Cb_5 con respecto al centro catalítico. Esta hipótesis es también compatible con los resultados de docking que muestran una ubicación de los péptidos β -amiloides colateral al sitio de unión del grupo prostético FAD, pero no directamente ni a FAD, ni al centro catalítico de esta enzima. Para confirmar esta hipótesis medimos el efecto del péptido $A\beta(1-42)$ sobre la actividad ferricianuro reductasa de la Cb_5R humana recombinante con la cola de poli-His₆, una actividad que utiliza como sustrato una molécula pequeña que debería tener cuya accesibilidad al centro catalítico no debería verse significativamente afectada. Los resultados obtenidos demuestran que hasta una concentración de 2 μM el péptido $A\beta(1-42)$ no tiene ningún efecto sobre la actividad ferricianuro reductasa de la Cb_5R humana recombinante con la cola de poli-His₆ (**Figura 23B**).

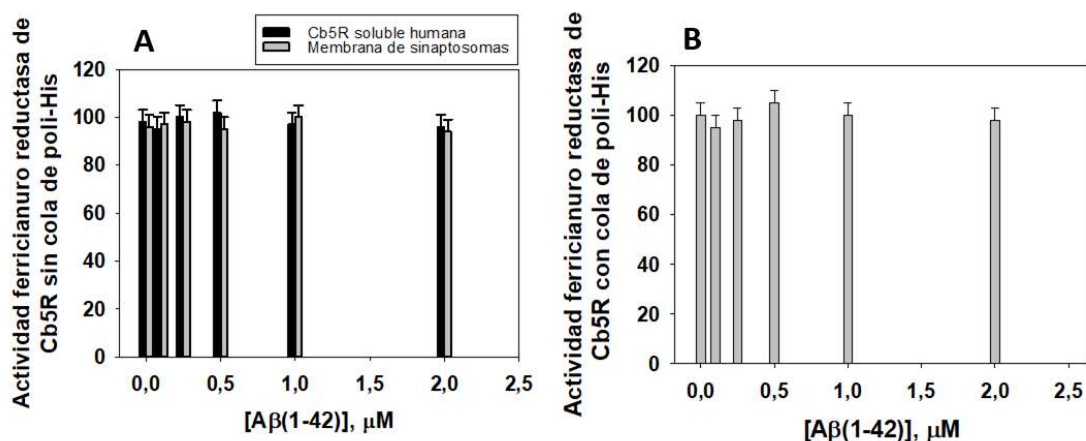


Figura 19. Dependencia de la actividad ferricianuro reductasa de la Cb_5R con la concentración del péptido $A\beta(1-42)$. (A) Cb_5R soluble humana recombinante sin cola de poli- His_6 y membranas de sinaptosomas. (B) Cb_5R soluble humana recombinante con cola de poli- His_6 . Los resultados se han normalizado con respecto al valor medido en ausencia del péptido $A\beta(1-42)$, que se ha tomado como valor 100%. Los resultados mostrados son el promedio \pm el error estándar de los resultados obtenidos en triplicados experimentales.

2.6. La interacción entre el péptidos $A\beta(1-42)$ y la Cb_5R humana recombinante con una cola de poli- His_6 puede ser cuantificada utilizando la fluorescencia de FAD, el grupo prostético de la Cb_5R .

En trabajos publicados previos de nuestro equipo de investigación hemos demostrado que la fluorescencia de FAD puede ser utilizada para monitorizar cambios conformacionales en la Cb_5R humana recombinante [Samhan-Arias *et al.*, 2018b,2019]. La titulación con el péptido $A\beta(1-42)$ de la Cb_5R humana recombinante con la cola de poli- His_6 muestra que este péptido produce un incremento de la fluorescencia de FAD, que es rápido y dependiente de la concentración del péptido (**Figura 24A**). La fluorescencia del FAD de la Cb_5R presenta una lenta cinética de incremento de la intensidad de fluorescencia en la cubeta de ensayo durante el tiempo de duración de estos experimentos (1-2 horas). Esta lenta cinética de incremento de fluorescencia se correlaciona con una pequeña pérdida de actividad de la Cb_5R (menor del 10%), lo que indica que está monitorizando el desplegamiento de la estructura de la Cb_5R asociado a la generación de un pequeño porcentaje de desnaturalización de esta enzima, un proceso muy lento a la temperatura de las medidas de fluorescencia [Samhan-

Arias *et al.*, 2018a]. Por esta razón, realizamos experimentos control añadiendo solo agua destilada para corregir los resultados obtenidos con el péptido A β (1-42) por este efecto. La corrección del incremento de fluorescencia asociado al desplegamiento de la estructura de la Cb₅R se ha realizado como se indica en la **Figura 24B** y la dependencia con la concentración del péptido A β (1-42) del incremento de fluorescencia por unión específica a la Cb₅R se presenta en la **Figura 24C**.

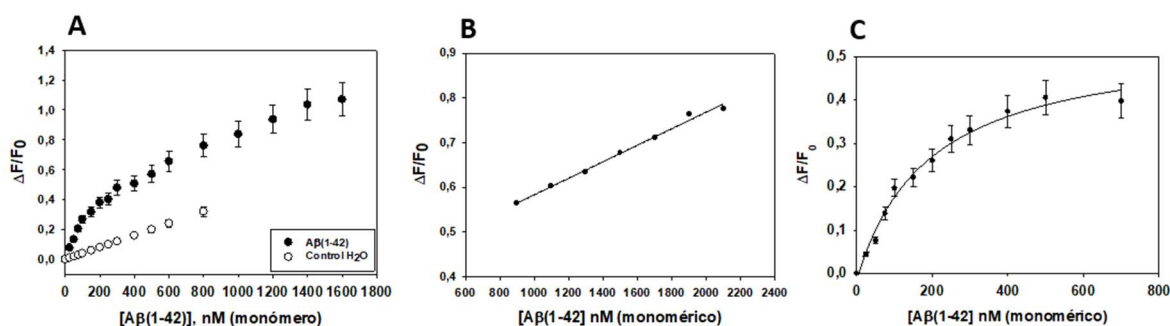


Figura 24. Titulación con el péptido A β (1-42) de la fluorescencia del grupo FAD de la Cb₅R soluble humana recombinante con la cola de poli-His₆. (A) Incremento de la intensidad de la fluorescencia del FAD ($\Delta F/F_0$) con la concentración del péptido. (B) Corrección del incremento de la fluorescencia del FAD asociado a la lenta desnaturalización de la Cb₅R. La línea es el ajuste por regresión lineal de los resultados obtenidos ($y = 0,4112 + 0,0004x$; $R^2 = 0,9875$). (C) Dependencia del incremento de la intensidad de fluorescencia del FAD con la concentración del péptido A β (1-42) por unión específica a la Cb₅R. La línea es el ajuste por regresión de los resultados obtenidos a la ecuación: ($y = -0,0095 + 0,5227x/(96,92 + x)$; $R^2 = 0,9870$). Las medidas de fluorescencia se han realizado como se describe en la sección de los Materiales y Métodos de esta tesis doctoral. Los resultados mostrados son el promedio \pm el error estándar de los resultados obtenidos en triplicados experimentales.

Los resultados de la dependencia con la concentración de A β (1-42) del incremento de fluorescencia por unión específica de este péptido se ajustan bien a la ecuación de interacción ligando-proteína 1:1 (un sitio de unión por molécula de Cb₅R), como se muestra en la **Figura 25**. Los parámetros obtenidos del ajuste de los datos experimentales permiten concluir que a saturación de A β (1-42) el incremento de fluorescencia es de $41 \pm 4\%$ y que la constante de disociación del complejo A β (1-42):Cb₅R es de 75 ± 5 nM de péptido monómero. Ya que en nuestras condiciones experimentales el péptido A β (1-42) es un dímero, la constante de disociación de este complejo más correcta es de $37,5 \pm 2,5$ nM

(dímero). Los resultados obtenidos con el péptido A β (25-35) son idénticos (dentro de las barras de error) a los obtenidos con el péptido A β (1-42) (**Figura 25**), y hasta una concentración de 1 μ M del péptido “scrambled” A β (1-42) no produjo incremento significativo de la fluorescencia de FAD (*resultados no mostrados*). A reseñar que los resultados obtenidos en experimentos de titulación de la fluorescencia de FAD de la Cb₅R con el péptido A β (1-42) en presencia de concentraciones entre 1 y 5 μ M de Cb₅ no fueron significativamente diferentes a los obtenidos en ausencia de Cb₅. Por tanto, el Cb₅ no altera significativamente la interacción entre el péptido A β (1-42) y la Cb₅R con cola de poli-His₆. Este resultado indica que el Cb₅ no une el péptido A β (1-42), confirmando la conclusión alcanzada previamente a partir de los registros de los espectros del Cb₅. Además, este resultado es el esperado si la cola de poli-His₆ es el sitio de interacción que dirige la formación del complejo A β (1-42):Cb₅R. Con el objetivo de obtener más información acerca de la localización del péptido A β (1-42) en el complejo A β (1-42):Cb₅R hemos utilizado el derivado fluorescente A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555, ya que FAD y HiLyteTM-Fluor555 forman un par donador/aceptor de FRET (**Figura 26A**). Hemos calculado la distancia de 50% de eficiencia de FRET (R_0) para este par utilizando la ecuación: $R_0 = 9,7 \cdot 10^3 \cdot [K^2 \cdot \Phi_D \cdot J(\lambda) \cdot n^{-4}]^{1/6}$ Å [Stryer, 1978], operando como se ha hecho en trabajos previos de nuestro laboratorio con otros pares donador/aceptor [Gutierrez-Merino *et al.*, 1989; Centeno and Gutierrez-Merino, 1992; Tiago *et al.*, 2004]. Brevemente, los parámetros utilizados para el cálculo de R_0 del par FAD/HiLyteTM-Fluor555 han sido los siguientes: (1) orientación al azar entre donador y aceptor: $K^2 = 2/3$; (2) el rendimiento cuántico del grupo prostético FAD de la Cb₅R (Φ_D) ha sido determinado en este trabajo utilizando el FMN como referencia: $\Phi_D = 3,96 \cdot 10^{-3}$; (3) la integral de solapamiento $J(\lambda)$ calculada utilizando el espectro de emisión de fluorescencia del FAD de la Cb₅R y el espectro de absorción del derivado fluorescente A β (1-42) HiLyteFluor555: $J(\lambda) = 6,0254174 \cdot 10^{15}$ cm³·M⁻¹; y (4) el índice de refracción relativo de un medio acuoso (n): $n = 1,33$. El valor de R_0 calculado para este par donador/aceptor ha sido de 27,7 Å = 2,77 nm.

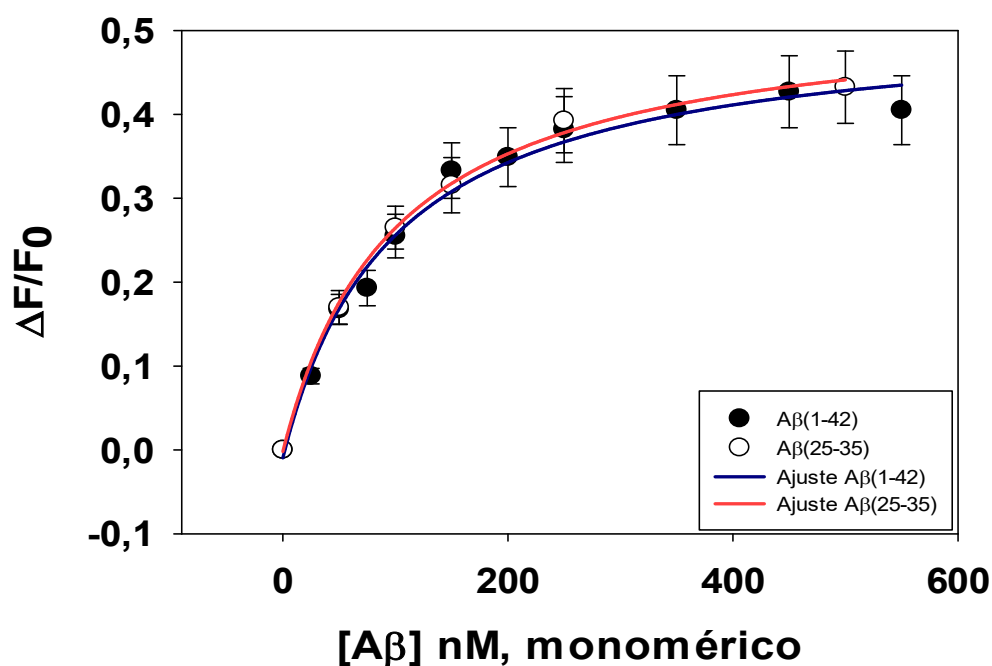


Figura 25. Dependencia del incremento de la intensidad de fluorescencia del FAD ($\Delta F/F_0$) con la concentración de los péptido A β (1-42) y A β (25-35) por unión específica a la Cb₅R soluble humana recombinante con cola de poli-His6. Las líneas son el resultado del ajuste por regresión de los resultados obtenidos a la ecuación de interacción ligando-proteína 1:1 (un sitio de unión por molécula de Cb₅R): el para A β (1-42) ($Y = -0,0095 + \frac{0,5227x}{96,92+x}$; $R^2 = 0,9870$); para A β (25-35) ($Y = -0,0019 + \frac{0,5311x}{99,253+x}$; $R^2 = 0,9974$). Los resultados mostrados son el promedio \pm el error estándar de los resultados obtenidos en triplicados experimentales.

A continuación, con una longitud de onda de excitación de 460 nm hemos registrado el espectro de emisión de la Cb₅R en ausencia y en presencia de 50 nM (dímero) A β (1-42) HiLyteFluor555 y el espectro de emisión de 50 nM A β (1-42) HiLyteFluor555 en ausencia de la Cb₅R (**Figura 26B**). Este último espectro se ha restado del espectro de emisión de la Cb₅R más 50 nM A β (1-42) HiLyteFluor555, para eliminar la contribución de la excitación directa del aceptor HiLyteFluor555 con la longitud de onda de excitación utilizada y el resultado se muestra en la **Figura 26C**. Se ha seleccionado una concentración de 50 nM (dímero) de A β (1-42) HiLyteFluor555 que es casi saturante de la inhibición de la actividad de reducción del Cb₅ dependiente de NADH por la Cb₅R y no una concentración más elevada para evitar una excesiva distorsión del espectro de emisión por un pico muy descompensado de la emisión de A β (1-42) HiLyteFluor555. A partir del resultado presentado en la **Figura 26C** se deriva que

50 nM (dímero) A β (1-42) HiLyteFluor555 ha producido un 45 \pm 5% de extinción de la fluorescencia del FAD de la Cb₅R (donador de FRET), en paralelo a un incremento similar de la fluorescencia del aceptor HiLyteFluor555. Por tanto, hemos calculado una eficiencia de FRET del 45 \pm 5% entre el grupo prostético FAD de la Cb₅R y A β (1-42) HiLyteFluor555. Utilizando la ecuación de FRET para un par donador/aceptor descrita en la sección de los Materiales y Métodos de esta tesis doctoral obtenemos una distancia de separación de 2,9 \pm 0,1 nm entre los sitios de unión de FAD y HiLyteFluor555 en la Cb₅R humana recombinante con la cola de poli-His₆. Si consideramos que con la concentración de 50 nM (dímero) A β (1-42) HiLyteFluor555 la Cb₅R se encuentra entre el 60 y 65% la máxima eficiencia de FRET a saturación de A β (1-42) HiLyteFluor555 subiría al 70 \pm 7% y a partir de este último resultado la distancia de separación sería algo menor, 2,35 \pm 0,1 nm.

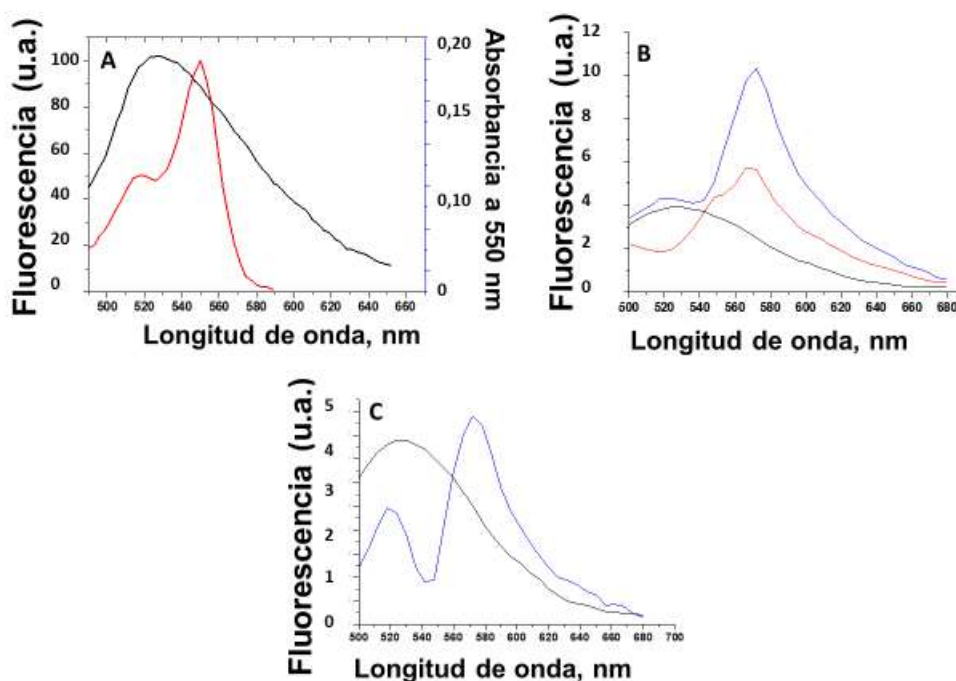


Figura 26. A) Espectro de emisión de la Cb₅R soluble humana recombinante con cola de poli-His₆ con excitación a 460 nm (negro). Espectro de absorción A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555 (rojo). (B) Espectro de emisión de la Cb₅R en ausencia y en presencia de 50 nM (dímero) de A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555 y el espectro de emisión de 50 nM A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555 en ausencia de la Cb₅R. Longitud de onda de excitación = 460 nm, rendijas de excitación y de emisión de 10 nm. (C) Espectro de emisión de la Cb₅R (línea negra) y el resultado de restar el espectro de excitación directa del A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555 al espectro de la Cb₅R más 50 nM A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555 (línea azul).

3.3. Estudios sobre la modulación de la interacción entre el péptido A β (1-42) y la CaM y evaluación experimental de la modulación de la nNOS por el péptido A β (1-42).

3.1. Papel de los cationes metálicos Fe $^{3+}$, Cu $^{2+}$ y Zn $^{2+}$ en la interacción entre el péptido A β (1-42) y la CaM.

El péptido A β (1-42) tiene una elevada afinidad por los cationes metálicos Fe $^{3+}$, Cu $^{2+}$ y Zn $^{2+}$ como se ha documentado en detalle en la sección de Introducción de esta tesis doctoral. Para evaluar la posible implicación de estos cationes metálicos en la interacción del péptido A β (1-42) para formar complejos con la CaM hemos realizado los estudios experimentales que se presentan a continuación. En las titulaciones realizadas utilizando la Badan-CaM con concentraciones crecientes del péptido A β (1-42) tras cada adición de este péptido hemos incubado entre 15 y 20 min con agitación y en la oscuridad, sin irradiación en el compartimento cerrado de la cubeta del fluorímetro, antes de tomar cada lectura de intensidad de fluorescencia de la muestra. Este tiempo de incubación es necesario para completar la cinética de la interacción entre el péptido A β (1-42) y la CaM, como se ha mostrado en las secciones anteriores de los resultados de esta tesis doctoral utilizando el derivado fluorescente A β (1-42) HiLyte $^{\text{TM}}$ -Fluor555.

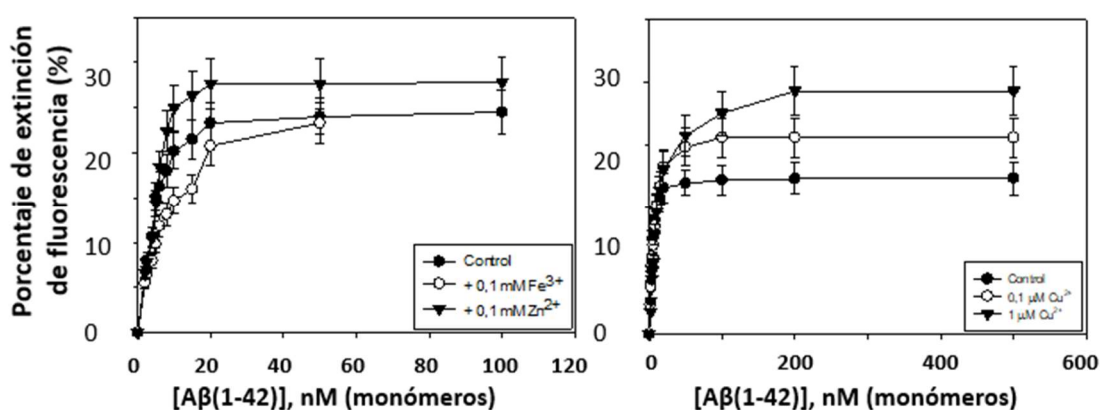


Figura 27. Efecto de metales la interacción de péptido A β (1-42) con la CaM. Titulación de la fluorescencia de 10 nM de Badan-CaM con concentraciones crecientes del péptido A β (1-42) en ausencia y en presencia de las concentraciones indicadas de los iones Fe $^{3+}$ y Zn $^{2+}$ (Panel A) y en ausencia y en presencia de las concentraciones indicadas de ión Cu $^{2+}$ (Panel B). Las medidas de fluorescencia se han realizado como se describe en la sección de los Materiales y Métodos de esta tesis doctoral. Los resultados mostrados

son el promedio \pm el error estándar de los resultados obtenidos en triplicados experimentales.

En la **figura 27A** se muestran los resultados obtenidos para la interacción entre Badan-CaM y el péptido A β (1-42) en ausencia (control) y en presencia de una concentración de 0,1 μ M de Fe $^{3+}$ o Zn $^{2+}$. Los resultados obtenidos en presencia de Fe $^{3+}$ no son significativamente diferentes de los resultados obtenidos en el control. Sin embargo, los resultados obtenidos muestran que Zn $^{2+}$ potencia la interacción entre Badan-CaM y el péptido A β (1-42), resultando en una mayor extinción de la fluorescencia de Badan-CaM a saturación. Sin embargo, no se detectaron cambios significativos en la constante de asociación para la formación del complejo entre estas moléculas (concentración del péptido A β (1-42) que produce el 50% de la máxima extinción de fluorescencia). En la **figura 27B** se presentan los resultados obtenidos para la interacción entre Badan-CaM y el péptido A β (1-42) en ausencia (control), y en presencia de una concentración de 0,1 y 1 μ M de Cu $^{2+}$. De los tres cationes estudiados, Cu $^{2+}$ es el que produce un mayor incremento en la extinción de fluorescencia de la Badan-CaM que monitoriza la formación del complejo entre Badan-CaM y el péptido A β (1-42). En presencia de 1 μ M de Cu $^{2+}$ la máxima extinción de fluorescencia de Badan-CaM es casi el doble de la máxima extinción de fluorescencia medida para el control. Sin embargo, este catión hasta una concentración de 1 μ M tampoco altera significativamente la constante de asociación del péptido A β (1-42) a la Badan-CaM.

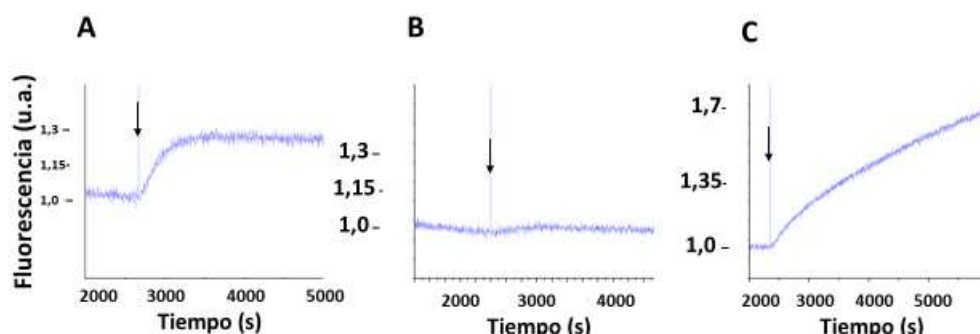


Figura 28. Efecto de la DFA y de Fe $^{3+}$ en la cinética de formación del complejo A β (1-42) HiLyte $^{\text{TM}}$ -Fluor555:CaM. La formación del complejo se midió con concentraciones 10 nM de A β (1-42) HiLyte $^{\text{TM}}$ -Fluor555 y 5 nM de CaM en ausencia (Panel A) y en presencia de 100 μ M DAF (Panel B) o de 1 μ M Fe $^{3+}$ (Panel C). La flecha señala el tiempo

al que se añadió la CaM en la cubeta de medida de la fluorescencia. Las condiciones experimentales de estas medidas de fluorescencia se describen detalladamente en los Materiales y Métodos de esta tesis doctoral. Se muestran los trazos cinéticos promedio de los resultados obtenidos en triplicados experimentales.

Está ampliamente documentado que los tampones contienen cantidades traza de contaminantes de iones metálicos, principalmente Fe^{3+} y Cu^{2+} , por lo que no podemos excluir la presencia de concentraciones nanomolares de estos iones en las titulaciones realizadas de Badan-CaM con concentraciones nanomolares del péptido $\text{A}\beta(1-42)$. Además, las preparaciones comerciales del péptido $\text{A}\beta(1-42)$ contienen Fe^{3+} . Por estas razones, hemos estudiado el efecto de agentes quelantes de estos iones sobre las titulaciones de Badan-CaM con el péptido $\text{A}\beta(1-42)$. Hemos utilizado desferoxamina (DFA) como agente quelante del Fe^{3+} y neocuproína (NCP) como agente quelante de Cu^{2+} . En primer lugar, estudiamos el efecto de la presencia de estos agentes quelantes sobre la cinética de la interacción a concentraciones nanomolares del péptido $\text{A}\beta(1-42)$ y la CaM, mediante la monitorización del cambio de intensidad de la fluorescencia del $\text{A}\beta(1-42)$ HiLyteTM-Fluor555. Los resultados obtenidos en ausencia y en presencia de 100 μM DFA se presentan en la **figura 28A** y **28B**, respectivamente. Puesto que la DFA se añade disuelta en DMSO, la cinética control se ha realizado añadiendo al tampón 20 μL de DMSO, el mismo volumen que se añade con 100 μM DFA. Estos resultados muestran que la DAF disminuye más del 80% el incremento de fluorescencia del $\text{A}\beta(1-42)$ HiLyteTM-Fluor555 tras la adición de la CaM y pusieron de manifiesto el importante papel del ión Fe^{3+} en la interacción de la CaM con el péptido $\text{A}\beta(1-42)$. Sin embargo, esta cinética no se ve significativamente alterada por la adición de 10 μM NCP al tampón de ensayo (*resultados no mostrados*), excluyendo una contaminación relevante de Cu^{2+} en nuestros tampones. La **figura 28C** muestra el efecto potenciador de la cinética de interacción entre el $\text{A}\beta(1-42)$ HiLyteTM-Fluor555 y la CaM que tiene la adición de 1 μM FeCl_3 al tampón de ensayo. Por tanto, variaciones en las cantidades traza de Fe^{3+} del tampón permiten explicar las variaciones anormalmente elevadas que hemos observado en las cinéticas de fluorescencia tras la adición de 5 nM CaM a 10 nM $\text{A}\beta(1-42)$ HiLyteTM-Fluor555 en diferentes series experimentales realizadas durante los dos últimos años.

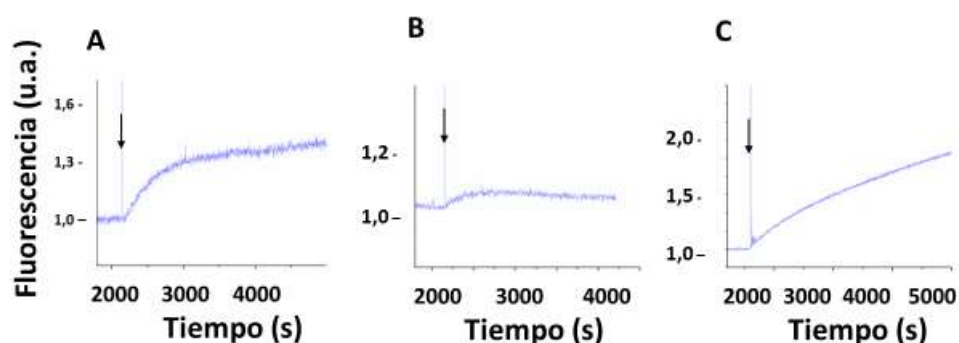


Figura 29. Efecto de la DFA y de Fe^{3+} en la cinética de formación del complejo $\text{A}\beta(1-42)$ HiLyte™-Fluor555:calbindina-D28k. La formación del complejo se midió con concentraciones 10 nM de $\text{A}\beta(1-42)$ HiLyte™-Fluor555 y 5 nM de calbindina-D28k en ausencia (Panel A) y en presencia de 100 μM DAF (Panel B) o de 1 μM Fe^{3+} (Panel C). La flecha señala el tiempo al que se añadió la CaM en la cubeta de medida de la fluorescencia. Las condiciones experimentales de estas medidas de fluorescencia se describen detalladamente en los Materiales y Métodos de esta tesis doctoral. Se muestran los trazos cinéticos promedio de los resultados obtenidos en triplicados experimentales.

Con el objetivo de evaluar si el efecto de DFA sobre la interacción entre el péptido $\text{A}\beta(1-42)$ y la CaM era un efecto específico para esta proteína o es extrapolable a otras proteínas de unión de calcio, hemos medido la cinética de interacción entre 10 nM $\text{A}\beta(1-42)$ HiLyte™-Fluor555 y 5 nM calbindina D28k. Los resultados obtenidos (**Figura 29, paneles A y B**) muestran una atenuación del 60-70% con respecto al control (con DMSO) de la amplitud del incremento de fluorescencia tras la adición de la calbindina D28k en presencia de 100 μM DFA. La **figura 29C** muestra el efecto potenciador de la cinética de interacción entre el $\text{A}\beta(1-42)$ HiLyte™-Fluor555 y la calbindina D28k que tiene la adición de 1 μM FeCl_3 al tampón de ensayo. Estos resultados son similares a los obtenidos previamente con la CaM y permiten concluir que concentraciones submicromolares de Fe^{3+} potencian la interacción entre el péptido $\text{A}\beta(1-42)$ y la calbindina D28k, una proteína de unión de calcio que presenta similitud estructural con la CaM.

Estos resultados nos llevaron a considerar la posibilidad de que Fe^{3+} pueda unirse a los centros de unión del Ca^{2+} en la CaM y que este hecho contribuya a potenciar la interacción entre el péptido $\text{A}\beta(1-42)$ y esta proteína. Puesto que la intensidad de la fluorescencia de la Badan-CaM es fuertemente dependiente del grado de saturación de los sitios de unión a Ca^{2+} [Corbacho *et*

al., 2017], esta hipótesis la hemos evaluado experimentalmente titulando con 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacetato (BAPTA), un agente quelante de Ca^{2+} que no une significativamente a iones Fe^{3+} , en lugar de EGTA, el agente quelante de Ca^{2+} de uso más frecuente. En la **figura 30** se presentan los resultados experimentales obtenidos para las titulaciones de la fluorescencia de Badan-CaM con BAPTA en tampón (control) y en el mismo tampón más 1 μM FeCl_3 o 100 μM DFA. Estos resultados demuestran que en presencia de 100 μM DFA la curva de disminución de la intensidad de fluorescencia de la Badan-CaM se desplaza hacia valores mayores de concentración de BAPTA, mientras que la adición de 1 μM de Fe^{3+} no altera significativamente los valores de intensidad

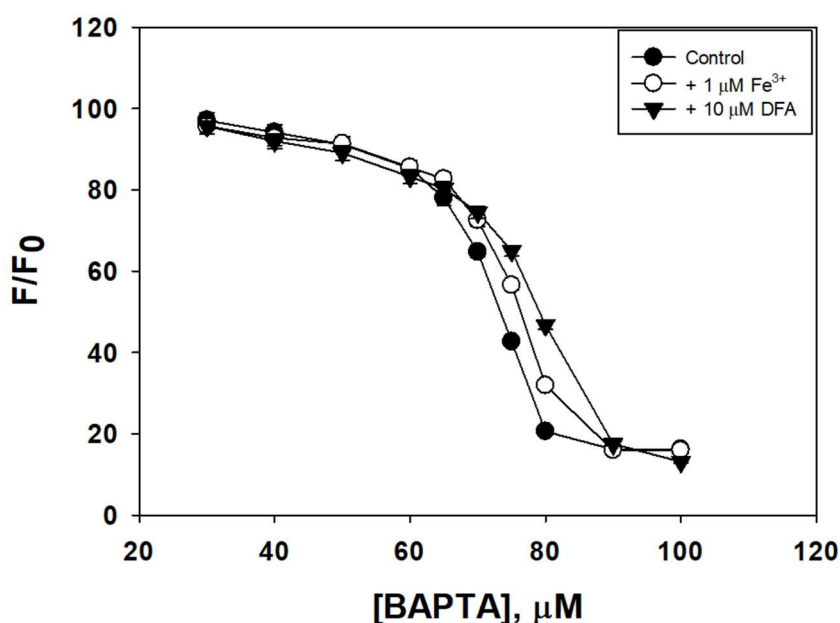


Figura 30. Titulación de la fluorescencia de 10 nM Badan-CaM con la concentración de BAPTA. Efecto de la adición de 1 μM de Fe^{3+} y de 10 μM DFA. Las medidas de fluorescencia se han realizado como se describe en la sección de los Materiales y Métodos de esta tesis doctoral. Los resultados mostrados son el promedio \pm el error estándar de los resultados obtenidos en triplicados experimentales.

de fluorescencia con respecto al control. Por tanto, estos resultados permiten concluir que la concentración de Fe^{3+} presente en el tampón es suficiente para alterar la curva de saturación de Ca^{2+} de la Badan-CaM. Además, los resultados demuestran que la afinidad de la Badan-CaM hacia Ca^{2+} aumenta en presencia del agente quelante de Fe^{3+} (DAF), ya que es necesario aumentar más la concentración de BAPTA para alcanzar el 50% de la disminución máxima de

fluorescencia. Este último resultado es el esperado si Fe^{3+} compite con el ión Ca^{2+} por, al menos, alguno de los 4 sitios de unión de calcio presentes en la CaM. Las medidas de fluorescencia se han realizado como se describe en la sección de los Materiales y Métodos de esta tesis doctoral. Los resultados mostrados son el promedio \pm el error estándar de los resultados obtenidos en triplicados experimentales.

3.2. Efectos de los antagonistas de la CaM, trifluoperazina y compuesto 48-80, y de los flavonoides, kaempferol y epigallocatequina, sobre la interacción entre el péptido A β (1-42) y la CaM.

Debido al potencial interés farmacológico de compuestos que modulen la interacción entre la CaM y el péptido A β (1-42) para el desarrollo de terapias alternativas para tratar la enfermedad de Alzheimer, en esta tesis hemos estudiado el efecto de dos tipos de compuestos: (1) antagonistas clásicos de la CaM y (2) flavonoides antioxidantes, compuestos que forman complejos con el péptido A β (1-42) [Wang et al., 2015; Andarzi Gargari *et al.*, 2018] con capacidad de unir $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ [Mira et al., 2002].

En primer lugar, seleccionamos dos moléculas ampliamente utilizadas como antagonistas de la CaM en numerosos estudios experimentales, la trifluoperazina (TFP) y el compuesto 48-80 (C48-80), para estudiar su posible efecto modulador de la interacción entre la CaM y el péptido A β (1-42). Con este objetivo hemos realizado medidas de las cinéticas de incremento de la fluorescencia de 10 nM A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555 inducido por 5 nM CaM, en las condiciones experimentales utilizadas en secciones y apartados anteriores, que han sido diseñadas y puestas a punto en esta tesis doctoral. Se han seleccionado concentraciones de TFP y de C48-80 ampliamente utilizadas en estudios experimentales con estos antagonistas. Los resultados mostrados en la **figura 31** demuestran que en presencia de 20 μM TFP o de 10 μM C48-80 se produce un notable aumento de la intensidad de la fluorescencia de A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555 tras la adición de la CaM respecto al control registrado en ausencia de estos antagonistas de la CaM.

Este aumento es claramente más fuerte en el caso de la TFP, cerca de 10 veces superior respecto al control, mientras que en el caso del C48-80 es solo de aproximadamente 2,5 veces. Además, la TFP incrementa muy

significativamente la velocidad de formación del complejo entre A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555 y la CaM, disminuyendo el $t_{1/2}$ de su formación a aproximadamente la mitad respecto al control.

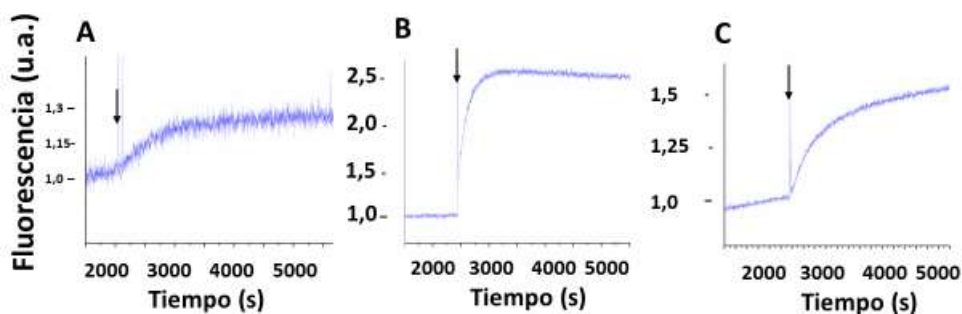


Figura 31. Efecto de la TFP y del compuesto 48-80 (C48-80) en la cinética de formación del complejo A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555:CaM. La formación del complejo se midió con concentraciones 10 nM de A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555 y 5 nM de CaM en ausencia (Panel A) y en presencia de 20 μ M TFP (Panel B) o de 10 μ M C48-80 (Panel C). La flecha señala el tiempo al que se añadió la CaM en la cubeta de medida de la fluorescencia. Las condiciones experimentales se describen detalladamente en los Materiales y Métodos de esta tesis doctoral. Se muestran los trazos cinéticos promedio de los resultados obtenidos en triplicados experimentales.

A continuación, seleccionamos dos flavonoides para los que se han reportado potentes efectos protectores contra procesos neurodegenerativos del cerebro mediados por estrés oxidativo: el kaempferol y la epigallocatequina, incluida la enfermedad de Alzheimer, véase, por ejemplo, [Gutierrez-Merino *et al.*, 2011; Hole and Williams, 2020]. Hemos utilizado medidas de la fluorescencia de Badan-CaM para estudiar los posibles efectos de estos flavonoides sobre la formación del complejo entre el péptido A β (1-42) y la CaM, para prevenir complicaciones en el análisis de las cinéticas de fluorescencia del A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555, derivadas de la interacción directa del flavonoide con este péptido. En la **figura 32** se presentan los resultados obtenidos en ausencia (control) y en presencia de una concentración de 10 μ M de kaempferol o de epigallocatequina, que son concentraciones usualmente utilizadas en estudios de protección de estos flavonoides en cultivos celulares, ver, por ejemplo [Samhan-Arias *et al.*, 2004]. Estos resultados muestran que ni el kaempferol, ni la epigallocatequina tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la

formación del complejo entre el péptido A β (1-42) y la CaM, produciendo menos de un 10% de alteración del quenching de la fluorescencia de la Badan-CaM inducido por el péptido A β (1-42).

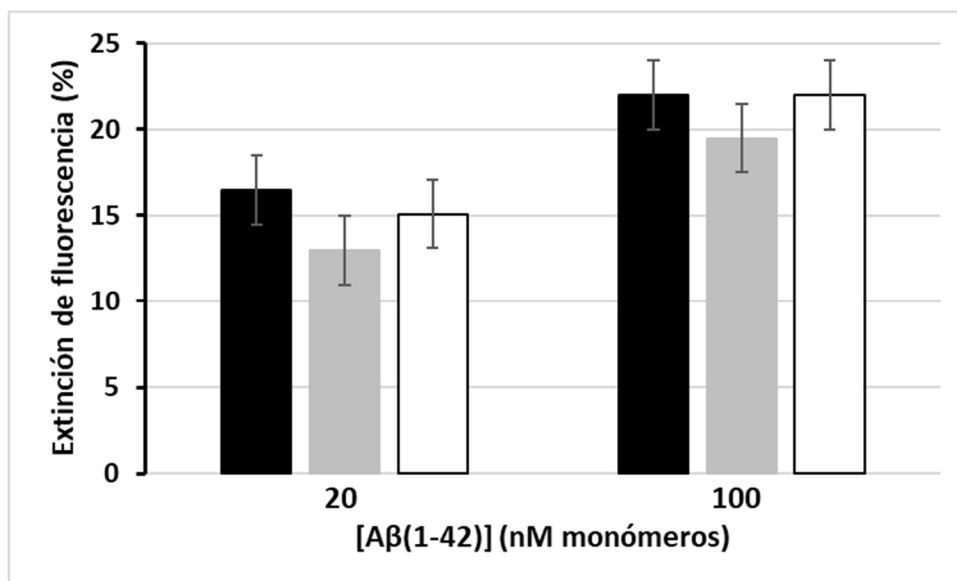


Figura 32. Efecto de los flavonoides kaempferol y epigalocatequina en la formación del complejo Badan-CaM:A β (1-42). Control (negro), 10 μ M de kaempferol (blanco) y 10 μ M epigalocatequina (gris). Las medidas de fluorescencia se han realizado como se describe en la sección de los Materiales y Métodos de esta tesis doctoral. Los resultados mostrados son el promedio \pm el error estándar de los resultados obtenidos en triplicados experimentales.

3.3. La nNOS no se inhibe significativamente por concentraciones del péptido A β (1-42) menores o iguales a 0,5 μ M.

La sobreproducción del óxido nítrico (\bullet NO) en el cerebro produce la generación de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno muy citotóxicas, que han sido implicadas en los procesos neurodegenerativos asociados al desarrollo de la enfermedad de Alzheimer [Malinski, 2007]. Como se ha comentado brevemente en la sección de Introducción de esta tesis doctoral, se han reportado en la bibliografía datos contradictorios sobre la modulación de la nNOS por el péptido A β (1-42). Por esta razón, hemos medido experimentalmente el efecto del péptido A β (1-42) sobre la actividad de la nNOS recombinante humana utilizando dos métodos descritos en la sección de los Materiales y Métodos de esta tesis doctoral.

Los resultados obtenidos en estas medidas experimentales se presentan en la **figura 33**. Puede observarse que solo a concentraciones del péptido A β (1-42) iguales o superiores a 1 μ M se alcanzan niveles de inhibición de la actividad de la nNOS iguales o superiores al 20%, llegando a casi un 30% de inhibición con 2 μ M de A β (1-42). Sin embargo, hasta concentraciones de 0,5 μ M de A β (1-42) la inhibición es menor del 10% y no es estadísticamente significativa. Dado el papel regulador de la actividad de la nNOS por la calmodulina, realizamos también estas medidas de actividad en presencia de hasta 0,5 μ M calmodulina y obtuvimos los mismos resultados. Puesto que las concentraciones intracelulares máximas reportadas para el péptido A β (1-42) son del orden de nanomolar a submicromolar (véase la Introducción de esta tesis doctoral), los resultados obtenidos permiten excluir un efecto directo de modulación de la actividad de la nNOS por este péptido.

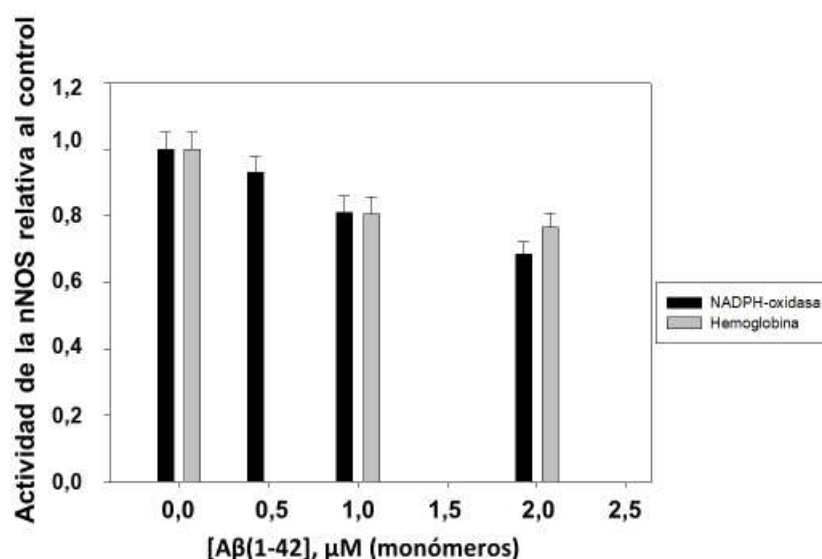


Figura 33. Efecto del péptido A β (1-42) en la actividad de la nNOS humana recombinante medida con los métodos de NADPH-oxidasa (negro) y de la hemoglobina (gris). Las medidas de actividad se han realizado como se describe en la sección de los Materiales y Métodos de esta tesis doctoral. La actividad medida en presencia de las concentraciones indicadas del péptido A β (1-42) se han normalizado con respecto a la actividad del control en ausencia del A β (1-42). Los resultados mostrados son el promedio \pm el error estándar de los resultados obtenidos en triplicados experimentales.

4. Discusión

1. *Diseño y evaluación experimental de un péptido antagonista de las interacciones entre el péptido A β (1-42) y las proteínas de unión de calcio CaM y calbindina-D28k.*

Los resultados de esta tesis doctoral demuestran que concentraciones nanomolares de A β (1-42) interactúan eficientemente con las conformaciones de la CaM y de la calbindina-D28k saturadas por calcio, conduciendo a la formación de complejos estables A β (1-42):CaM y A β (1-42):calbindina-D28k. Este último resultado tiene una especial relevancia en neuronas del cerebro que expresan calbindina-D28k. Como se resaltó en la introducción esta proteína es particularmente abundante en las neuronas piramidales del hipocampo y en neuronas corticales del sistema nervioso central [Baimbridge *et al.*, 1992], que se encuentran en regiones del cerebro altamente sensibles a la neurodegeneración en la enfermedad de Alzheimer. Puesto que en un trabajo previo de nuestro equipo de investigación [Corbacho *et al.*, 2017] se encontró que la afinidad del péptido A β (1-42) hacia la apo-CaM (conformación no unida a Ca²⁺ de esta proteína) es aproximadamente 20 veces menor que la encontrada para la CaM saturada por Ca²⁺, decidimos focalizar este trabajo en las conformaciones de estas proteínas saturadas por Ca²⁺. Además, debe ser resaltado que la apo-CaM tiene un papel regulador de la actividad neuronal mucho más reducido que la CaM saturada por Ca²⁺, véase, por ejemplo, la revisión reciente de nuestro equipo de investigación [Poejo *et al.*, 2021b]. En un trabajo realizado por nuestro equipo de investigación antes del inicio de esta tesis doctoral, se concluyó que se forman complejos (A β (1-42))₂:CaM con una estequiometría 2:1 [Corbacho *et al.*, 2017]. Los resultados de esta tesis doctoral también apoyan la formación de complejos A β (1-42):CaM y A β (1-42):calbindina-D28k pero con una estequiometría molecular 2:2, por unión de una segunda molécula de CaM o de calbindina-D28k al complejo formado previamente con una estequiometría molecular 2:1. Por tanto, la CaM y la calbindina-D28k pueden tamponar la concentración del péptido A β (1-42) no unido alrededor de 1 nM en neuronas que expresan estas dos proteínas. En esta tesis doctoral se ha puesto a punto un nuevo método para monitorizar la formación del complejo entre

concentraciones nanomolares del péptido A β (1-42) y proteínas utilizando el derivado fluorescente A β (1-42) HiLyte™-Fluor555. El análisis cinético de la velocidad de formación de estos complejos pone de manifiesto que la CaM une al péptido A β (1-42) aproximadamente dos veces más rápidamente que la calbindina-D28k. Este resultado indica que la CaM unirá más eficientemente que la calbindina-D28k el péptido A β (1-42). El resultado experimental que muestra que la velocidad de disociación del péptido A β (1-42) de los complejos A β (1-42):CaM sea casi diez veces más lenta que la velocidad de formación de este complejo, apoya fuertemente la hipótesis de que una reorganización conformacional tiene lugar después del evento inicial de formación del complejo. De hecho, la inspección visual directa del dominio localizado entre los aminoácidos 24 y 42 del péptido A β (1-42) en las estructuras modelo 1 y 2 mostradas en las **figuras 6B y 7B**, revela que su estructura está distorsionada con respecto a la estructura de este dominio del péptido en las estructuras registradas en el banco de datos (archivos PDB ID: 1IYT and 1Z0Q). Es importante notar que las estructuras del péptido A β (1-42) registradas en las bases de datos han sido obtenidas mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) en entornos que promueven las estructuras de tipo α -hélice [Crescenzi *et al.*, 2002; Tomaselli *et al.*, 2006], y que los resultados del trabajo previo a esta tesis realizados por nuestro equipo de investigación [Corbacho *et al.*, 2017] permitieron concluir que el sitio de unión del péptido A β (1-42) en la CaM presenta una elevada hidrofobicidad. El péptido A β (1-42) se encuentra en equilibrio entre las conformaciones denominadas α y β , representadas en los archivos PDB precitados, y este equilibrio es fuertemente dependiente de la polaridad del microentorno [Tomaselli *et al.*, 2006]. Por tanto, la distorsión estructural del dominio de los aminoácidos 24 a 42 del péptido A β (1-42), que reportan los modelos 1 y 2 del complejo generados en el análisis de *docking* realizado en esta tesis doctoral, sugiere que la unión de este péptido a la CaM desplaza el equilibrio entre las estructuras α y β del péptido A β (1-42). La necesidad de una distorsión inicial del dominio de los aminoácidos 24 a 42 del péptido A β (1-42) permitiría también explicar la presencia de la fase de retardo observada en la formación de los complejos A β (1-42):calbindina-D28k. En conjunto, nuestros resultados sugieren una significativa flexibilidad conformacional del dominio NH₂-terminal del péptido A β (1-42) cuando este se

une a proteínas. Además, el análisis de *docking* realizado para generar las estructuras modelo del complejo A β (1-42):CaM revela que la Lys28 o la Lys16 del péptido A β (1-42) se encuentran entre los residuos de aminoácidos que interaccionan más fuertemente en la región de la interfaz con la CaM en el modelo del complejo. Por tanto, es probable que la formación de puentes salinos contribuirá a anclar más firmemente el péptido A β (1-42) en el complejo inicialmente formado. La relación entre los valores de los $t_{1/2}$ de los procesos cinéticos de formación y disociación de los complejos A β (1-42):CaM y A β (1-42):calbindina-D28k indica que la constante de velocidad de disociación de estos complejos es notablemente mayor que la de su formación. Pero la constante de velocidad de la disociación del complejo A β (1-42):calbindina-D28k es cerca de diez veces más rápida que la de disociación del complejo A β (1-42):CaM. Por esta razón, podemos concluir que, en neuronas que expresen ambas proteínas, la CaM prevalecerá sobre la calbindina-D28k como agente atrapante de concentraciones nanomolares del péptido A β (1-42).

La velocidad de disociación del péptido A β (1-42) de los complejos A β (1-42):CaM y A β (1-42):calbindina-D28k es muy lenta en comparación con la velocidad y frecuencia de los eventos moleculares asociados a una actividad sináptica repetitiva en las neuronas del sistema nervioso central. Puesto que la actividad sináptica repetitiva desempeña un papel clave en la actividad neuronal durante el aprendizaje y la formación de memoria [Brady *et al.*, 2011] y ha sido demostrado que los oligómeros del péptido A β (1-42) disminuyen significativamente la eficiencia sináptica [Bahr *et al.*, 1998; Wlask *et al.*, 2002; Poejo *et al.*, 2021b], la formación de los complejos A β (1-42):CaM y A β (1-42):calbindina-D28k puede ser visualizada como un mecanismo de protección contra el estrés celular producido por el péptido A β (1-42) en neuronas. En este contexto es especialmente interesante resaltar que una proteína inicialmente encontrada en la piel, similar a la CaM (*CaM-like skin protein*), está presente a concentraciones entre 3 y 6 nM en el líquido cefalorraquídeo [Hashimoto *et al.*, 2017] y produce una protección eficiente contra la pérdida de capacidad de aprendizaje espacial en un modelo de ratón de la enfermedad de Alzheimer [Kusakari *et al.*, 2018]. Esta proteína, además, inhibe la muerte neuronal en un modelo celular de la enfermedad de Alzheimer [Hashimoto *et al.*, 2013].

Adicionalmente, la formación de complejos $A\beta(1-42):CaM$ y $A\beta(1-42):calbindina-D28k$ puede ser visualizada como un mecanismo de respuesta adaptativa al estrés celular producido por los oligómeros del péptido $A\beta(1-42)$, porque es un mecanismo transductor del estrés inicial producido en las neuronas por estos oligómeros en respuestas mediadas por señalización intracelular. Debe resaltarse también que en un trabajo previo de nuestro equipo de investigación [Corbacho *et al.*, 2017] se ha reportado que la CaM tiene la capacidad de unir no solo el péptido $A\beta(1-42)$, sino que une también otros péptidos altamente neurotóxicos derivados de este, como el péptido $A\beta(25-35)$. El péptido $A\beta(25-35)$ es el péptido β -amiloide más corto que retiene la toxicidad del péptido $A\beta(1-42)$ [Millucci *et al.*, 2010] y se ha sugerido que es la región biológicamente más activa del péptido β -amiloide de 42 aminoácidos [Pike *et al.*, 1995]. Otros autores han señalado también que el péptido $A\beta(25-35)$ es muy neurotóxico [Clementi *et al.*, 2005; Frozza *et al.*, 2009; Peters *et al.*, 2016; D'Ezio *et al.*, 2021]. Utilizando resonancia de plasmones superficiales, Guo *et al.* (2006) han demostrado que tau, otro biomarcador clave en la enfermedad de Alzheimer, une a múltiples péptidos β -amiloides neurotóxicos con afinidad nanomolar interaccionando con la región central y próxima al aminoácido COOH-terminal de estos péptidos. Por estas razones, decidimos seleccionar los modelos de *docking* del complejo $A\beta(1-42):CaM$ que presentaban interacciones fuertes con el dominio COOH-terminal del péptido $A\beta(1-42)$, ya que pueden constituir plataformas para el diseño de péptidos con una elevada capacidad de apantallamiento contra este péptido β -amiloide. A continuación, procedimos a evaluar experimentalmente la capacidad del péptido diseñado para actuar como antagonista de la formación del complejo $A\beta(1-42):CaM$.

Las simulaciones de *docking* predicen que los residuos de aminoácidos de la CaM directamente implicados en las interacciones más fuertes con el dominio COOH-terminal del péptido $A\beta(1-42)$ son muy hidrofóbicos. Considerando su organización espacial en la estructura tridimensional de la CaM, hemos incluido algunos aminoácidos hidrofóbicos adicionales como grupos espaciadores en el péptido diseñado en esta tesis doctoral. Hemos demostrado que el péptido diseñado, VF $A\beta$ FAMA $F\beta$ ML (con el aminoácido COOH-terminal amidado), es un potente inhibidor de la formación de los complejos $A\beta(1-$

42):CaM y A β (1-42):calbindina-D28k. Por tanto, este resultado da un fuerte apoyo experimental a la hipótesis de que la formación inicial del complejo A β (1-42):CaM es dependiente de interacciones hidrofóbicas. Para reforzar aún más este punto, hemos realizado simulaciones de *docking* entre el péptido VFAFAMAFML y el péptido A β (1-42) y entre el péptido VFAFAMAFML y la conformación de la CaM saturada por Ca²⁺, utilizando el CABS-dock Web Server, un análisis de *docking* que no requiere ninguna suposición apriorística de la estructura tridimensional del péptido VFAFAMAFML. La inspección visual de las simulaciones *in silico* de estos complejos permite observar que el péptido VFAFAMAFML interacciona con los dominios de la interfaz entre el péptido A β (1-42) y la CaM más fuertemente implicados en la formación de los complejos A β (1-42):CaM y generados por la aproximación de *docking* usando el servidor web ClusPro/PDBePISA. Este resultado provee una explicación racional para el mecanismo molecular de antagonismo de la formación de los complejos A β (1-42):CaM por el péptido VFAFAMAFML. Además, la confirmación experimental de este antagonismo, junto con los resultados de las simulaciones de *docking*, sugiere que la estructura tridimensional del complejo A β (1-42):CaM debe ser muy próxima, sino idéntica, a la utilizada como base para el diseño del péptido antagonista en esta tesis doctoral. En base a que en un estudio previo de nuestro equipo de investigación habíamos obtenido una constante de disociación del complejo A β (1-42):CaM próxima a 1 nM [Corbacho *et al.*, 2017], en esta tesis doctoral hemos diseñado un protocolo experimental basado en medidas de fluorescencia para monitorizar la cinética de interacción entre el péptido A β (1-42) y la CaM con concentraciones nanomolares de ambas moléculas. Sin embargo, la espectroscopía de fluorescencia no permite alcanzar el nivel de resolución atómico en las estructuras de los complejos entre proteínas o entre proteínas y péptidos. Por otra parte, las aproximaciones experimentales que pueden ser utilizadas para la resolución de la estructura de estos complejos a nivel atómico, como RMN o Dispersión de rayos X de bajo ángulo y alta resolución, requieren el uso de concentraciones mucho más elevadas de ambos, péptido A β (1-42) y CaM. Este tipo de estudios quedan fuera de los objetivos de esta tesis doctoral, por su extensión y porque no disponemos en nuestro laboratorio de estas técnicas que utilizan un equipamiento muy costoso, ni de financiación específica para financiar el acceso a las grandes instalaciones

europas en dónde se encuentran (coste de los experimentos y de los gastos de viaje y estancia en ellas).

Debe ser resaltado que existe la posibilidad de que otros péptidos hidrofóbicos con secuencias alternativas de aminoácidos sean también antagonistas potentes de la formación del complejo $A\beta(1-42):CaM$, debido a la contribución dominante de las interacciones hidrofóbicas en la interacción entre el péptido $A\beta(1-42)$ y la CaM. Estas interacciones son débiles y basadas en la sinergia de muchos enlaces débiles de tipo Van der Waals, que presentan una baja selectividad para discriminar entre cadenas laterales de diferentes aminoácidos hidrofóbicos. Este punto lo ilustra el hecho de que los residuos de aminoácidos de la calbindina-D28k que forman pares en las interacciones con los residuos aminoácidos 25 a 42 del péptido $A\beta(1-42)$, en las estructuras obtenidas para las simulaciones del complejo $A\beta(1-42):calbindin-D28k$, son diferentes entre los diferentes modelos generados por el análisis de *docking*, y diferentes a los obtenidos para las simulaciones modelo de los complejos $A\beta(1-42):CaM$. Por ejemplo, los residuos aminoácidos de la calbindina-D28k con valores elevados del parámetro BSA/ASA en la proximidad de la Ile31 del péptido $A\beta(1-42)$ en el complejo $A\beta(1-42):calbindin-D28k$ varían entre las tres estructuras modelo generadas por simulaciones de *docking*, siendo la Val173 en la estructura 1, la Leu89 en la estructura 2 y Asn157 y Gln182 en la estructura 3. De manera similar, los residuos aminoácidos de la calbindina-D28k con valores elevados del parámetro BSA/ASA en la proximidad de la Ile41 del péptido $A\beta(1-42)$ son diferentes en las tres estructuras modelo generadas por simulaciones de *docking* para el complejo $A\beta(1-42):calbindin-D28k$: Ser28, Phe61 y Tyr30 en la estructura 1, Pro172 en la estructura 2 y Ser28 y Phe177 en la estructura 3. Esta variabilidad de los residuos aminoácidos de la calbindina-D28k en el complejo $A\beta(1-42):calbindin-D28k$ se puede observar también en los aminoácidos con valores elevados del parámetro BSA/ASA más próximos a los residuos de cadena lateral muy corta Gly37/38 del péptido $A\beta(1-42)$: Ser28 y Ser156 en la estructura 1, Pro172 y Leu89 en la estructura 2 y Ser28, Asn157, Phe177, Ser156 y Gln182 en la estructura 3. La comparación de los residuos aminoácidos de la calbindina-D28k con los de la CaM abre una vía para diseñar una familia de péptidos alternativos para antagonizar la formación de los complejos $A\beta(1-$

42):CaM y A β (1-42):calbindina-D28k. Sin embargo, debe resaltarse que hacen falta más estudios para resolver la estructura del complejo A β (1-42):calbindina-D28k a nivel atómico. De hecho, dos resultados experimentales obtenidos en esta tesis doctoral permiten catalogar como muy poco probable el modelo estructural 2 del complejo A β (1-42):calbindina-D28k de la **figura 12**. Primero, el peso relativamente elevado de aminoácidos cargados y polares de la calbindina-D28k, en la interfaz del modelo estructural 2 del complejo A β (1-42):calbindina-D28k, no es consistente con el bloqueo de la formación de este complejo por concentraciones nanomolares del péptido muy hidrofóbico VF β FAMAFML (aminoácido COOH-terminal amidado). Segundo, el microentorno del fluoróforo HiLyte™-Fluor555 unido al aminoácido NH₂-terminal del péptido A β (1-42) no se ve significativamente alterado por la formación del complejo A β (1-42):calbindina-D28k en este modelo estructural 2, lo que es contrario a la conclusión derivada de las medidas de las cinéticas de fluorescencia realizadas en esta tesis doctoral.

El péptido antagonista de la formación de los complejos A β (1-42):CaM y A β (1-42):calbindina-D28k diseñado en esta tesis doctoral (VF β FAMAFML - aminoácido COOH-terminal amidado) es fuertemente hidrofóbico y su pequeño tamaño permite prever una rápida internalización en las células. Además, hemos confirmado experimentalmente que la incubación durante 24 horas de células HT-22 en cultivo, una línea neuronal inmortalizada derivada de neuronas del hipocampo de ratón, con concentraciones entre 0,1 y 1 μ M del péptido VF β FAMAFML no tiene efecto significativo sobre la viabilidad celular (**figura 34**). Por tanto, este péptido tiene un valor potencial para su uso terapéutico mediante inyecciones intracraneales. Sin embargo, son necesarios estudios que permitan conocer la viabilidad de esta aplicación, sobre todo en relación a la permeabilidad de este péptido a través de la barrera hematoencefálica para poder evaluar su potencial terapéutico mediante inyecciones intravenosas.

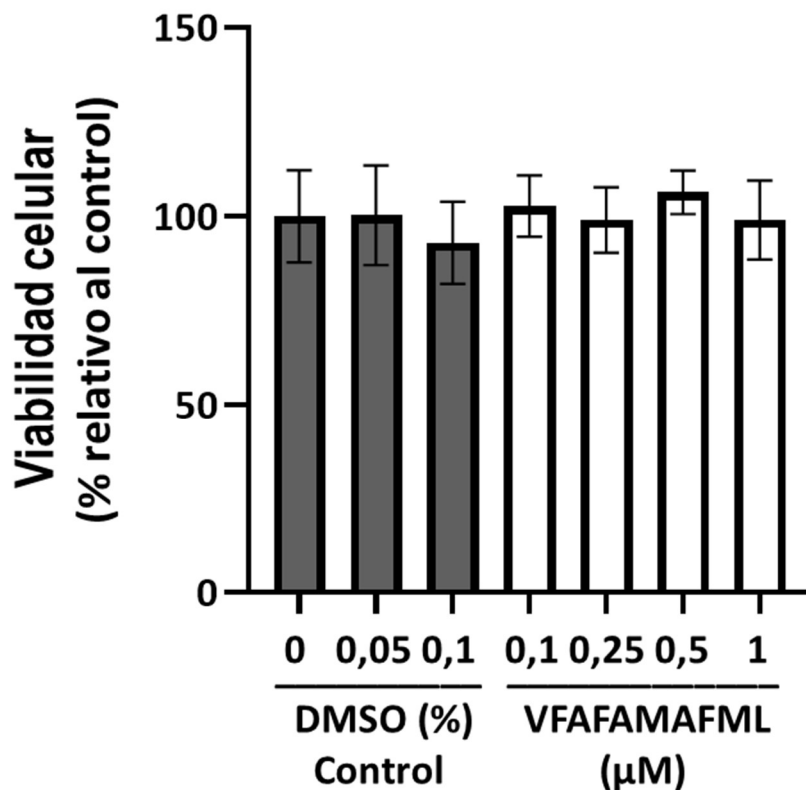


Figura 34. La viabilidad de las células HT-22 (línea celular inmortalizada derivada de neuronas de hipocampo de ratón) no se afecta significativamente por incubación con el péptido VFAFAMAFML a concentraciones (0,1-1 μM) durante 24 horas. Las medidas de la viabilidad celular se han realizado como se indica en la sección de los Materiales y Métodos de esta tesis doctoral. Los controles se realizaron incubando las células HT-22 con las concentraciones de DMSO añadidas con el péptido VFAFAMAFML en estos ensayos, 0,05 and 0,1 % of DMSO. Los resultados se han normalizado a los valores obtenidos con las células no tratadas (0% DMSO), que se han tomado como 100% de viabilidad celular. Los resultados mostrados en esta figura son los valores promedio \pm error estándar de experimentos realizados por triplicado en tres ensayos independientes con preparaciones diferentes de células HT-22.

Además de su potencial uso terapéutico, el péptido antagonista VFAFAMAFML diseñado y evaluado experimentalmente en esta tesis doctoral puede ser un buen candidato para la evaluación experimental en cultivos celulares de la relevancia de los complejos $\text{A}\beta(1-42):\text{CaM}$ y $\text{A}\beta(1-42):\text{calbindina-D28k}$ en las alteraciones metabólicas y funcionales (excitabilidad y plasticidad neuronal entre otras) inducidas por el péptido $\text{A}\beta(1-42)$. Deseamos resaltar que este péptido antagonista proporciona la primera secuencia de aminoácidos de referencia para la búsqueda de neuropéptidos endógenos que puedan generar

protección contra la neurotoxicidad inducida por el péptido A β (1-42) a través de la formación de complejos A β (1-42):CaM y A β (1-42):calbindina-D28k. El papel de algunos neuropéptidos endógenos como agentes neuroprotectores contra el avance de los procesos neurodegenerativos asociados a la enfermedad de Alzheimer es una línea de investigación prometedora, como lo ilustran las dos publicaciones seleccionadas sobre este punto [Rose *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2019]. Es de reseñar que en el artículo publicado por Chen *et al.* (2019) se revisan los datos publicados que apoyan la implicación de los neuropéptidos grelina, neurotensina, polipéptido activador de la adenilato ciclasa (PACAP), neuropéptido Y, sustancia P y orexina en la patofisiología de la enfermedad de Alzheimer y su potencial valor terapéutico. Destacaremos que los residuos aminoácidos en el extremo NH₂-terminal de la grelina son muy hidrofóbicos, ver [UniProtKB - Q9UBU3 (GHRL_HUMAN)] y que hay dos evidencias experimentales muy significativas que relacionan a este neuropéptido con la enfermedad de Alzheimer: (1) una reducción significativa del mRNA que codifica a la grelina se ha descrito en el giro temporal de los enfermos de Alzheimer [Gahete *et al.*, 2010] y (2) la mutación derivada de un único polimorfismo que produce una sustitución Gln/Leu está asociada con la edad de inicio de la enfermedad de Alzheimer [Shibata *et al.*, 2011].

En resumen, los principales nuevos hallazgos reportados en esta tesis doctoral son: (1) la formación de complejos A β (1-42):calbindina-D28k a concentraciones nanomolares de A β (1-42) y de calbindina-D28k, y (2) concentraciones submicromolares (que no tienen una significativa toxicidad celular) del péptido VFAFAMAFML diseñado en esta tesis doctoral bloquean eficientemente la formación de los complejos A β (1-42):CaM y A β (1-42):calbindina-D28k. Estos últimos resultados sugieren que el péptido fuertemente hidrofóbico de secuencia VFAFAMAFML podría ser útil como herramienta metodológica para evaluar la relevancia de las vías de señalización mediadas por los complejos A β (1-42):CaM y A β (1-42):calbindina-D28k en la neurotoxicidad del péptido A β (1-42).

2. Hexa-histidina, un péptido con aplicaciones versátiles en el desarrollo de estudios sobre mecanismos moleculares de acción de oligómeros de A β (1-42).

Los estudios preliminares realizados con la proteína recombinante Cb₅R soluble humana (con una cola de poli-His₆ insertada para su purificación) parecían sugerir que esta proteína podría ser una diana intracelular de los dímeros del péptido A β (1-42) a concentración nanomolar. A priori, esta hipótesis podría contribuir a explicar algunas de las disfunciones del metabolismo lipídico observadas en la enfermedad de Alzheimer [Rojó *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2014], debido al importante papel que desempeña el sistema redox Cb₅/Cb₅R en la introducción de insaturaciones en los ácidos grasos y en algunas etapas de la biosíntesis del colesterol y de derivados de colesterol, como hidroxicolesteroles y hormonas esteroideas (brevemente comentadas en la sección de Introducción de esta tesis doctoral). Pero, puesto que no había nada reportado previamente sobre la Cb₅R como una diana molecular para el péptido A β (1-42) en publicaciones registradas en bases de datos internacionales, decidimos tomar este resultado con extrema cautela.

En primer lugar, evaluamos experimentalmente la colocalización en nanodominios intracelulares de la Cb₅R con el péptido A β (1-42) en células permeabilizadas utilizando FRET. Hemos elegido neuronas primarias del cerebelo de rata para este estudio, porque estas neuronas se encuentran entre las que expresan más Cb₅R en el cerebro de la rata [Samhan-Arias *et al.*, 2016]. Para visualizar la Cb₅R en las células hemos utilizado una aproximación de FRET basada en el uso de un anticuerpo fluorescente secundario etiquetado con el fluoróforo Alexa488 para visualizar el anticuerpo anti-Cb₅R. Para visualizar el péptido A β (1-42) hemos utilizado el derivado fluorescente A β (1-42) HiLyte™-Fluor555. Los fluoróforos Alexa488 y HiLyte™-Fluor555 forman un par donador/aceptor de FRET y con esta aproximación podemos determinar si Cb₅R y A β (1-42) se encuentran en nanodominios intracelulares de una dimensión ≤ 40 nm, véase Poejo *et al.* (2021a). Los resultados de microscopía de fluorescencia mostraron una fuerte colocalización de la Cb₅R y el péptido A β (1-42) en nanodominios intracelulares de estas dimensiones tras tinción con concentraciones de 50 a 100 nM de A β (1-42) HiLyte™-Fluor555. Aunque este resultado sería consistente con la hipótesis de interacción directa entre la Cb₅R

y el péptido A β (1-42) *in vivo*, no es por sí mismo concluyente porque el tamaño de estas moléculas es mucho menor que el de nanodominios de hasta 40 nm. Por esta razón, medimos si las concentraciones del péptido A β (1-42) que nuestros resultados mostraban que inhibían a la Cb₅R humana recombinante inhibían también la actividad de reducción del Cb₅ dependiente de NADH, la principal actividad específica de la Cb₅R en las células, en preparaciones de sinaptosomas lisados y de membranas sinápticas de cerebro de rata y de cerdo. Los resultados obtenidos mostraron que hasta una concentración de 2 μ M de dímeros del péptido A β (1-42) no hay una inhibición significativa de esta actividad, que es la suma de las actividades de las isoformas soluble y de membrana de la Cb₅R. en las muestras biológicas preparadas. No usamos concentraciones más elevadas de dímeros del péptido A β (1-42) en nuestros ensayos porque los datos bibliográficos indican que no se alcanzan concentraciones micromolares de oligómeros de péptidos β -amiloides en el espacio intracelular en las células del sistema nervioso central durante los procesos neurodegenerativos de las amiloidopatías. Estos resultados sugirieron la posibilidad de que la interacción entre la poli-His₆ y el péptido A β (1-42) estaba mediando la inhibición de la Cb₅R humana recombinante (con una cola de poli-His₆ insertada) por concentraciones nanomolares de dímeros de este péptido β -amiloide. Esta hipótesis ha sido confirmada utilizando Cb₅R humana recombinante a la que le eliminamos la cola de poli-His₆ como se ha indicado en la sección de los Materiales y Métodos de esta tesis doctoral.

Para confirmar la interacción entre la poli-His₆ y concentraciones nanomolares del péptido A β (1-42) hemos utilizado la aproximación de fluorescencia que habíamos puesto a punto para los estudios de las interacciones entre el péptido A β (1-42) y la CaM y entre el péptido A β (1-42) y la calbindina-D28k. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que concentraciones submicromolares de His₆ producen un incremento de aproximadamente un 10% en la intensidad de la fluorescencia de 10 nM A β (1-42) HiLyte™-Fluor555. Además, la His₆ antagoniza eficientemente la formación de los complejos A β (1-42):CaM y A β (1-42):calbindina-D28k, con valores de IC₅₀ de 1 y 0,1 μ M, respectivamente. La cinética de aumento de la intensidad de la fluorescencia de A β (1-42) HiLyte™-Fluor555 inducido por la adición de His₆ tiene

una fase de retardo inicial de 60 a 120 segundos y es un proceso lento, con un valor de $t_{1/2}$ de 480 a 540 segundos. Por tanto, estos resultados implican que la formación del complejo entre His₆ y el derivado fluorescente de A β (1-42) cursa con un cambio conformacional del A β (1-42) HiLyte™-Fluor555. El análisis de *docking* entre His₆ y A β (1-42) da un apoyo racional adicional a la formación de complejos entre estas dos moléculas. El análisis de *docking* se ha hecho utilizando el servidor CABS-dock Web Server, que no requiere la definición inicial de la conformación espacial del hexapéptido de His. Los modelos estructurales generados por el análisis de *docking* muestran una His₆ con diferentes estructuras tridimensionales en el complejo His₆:A β (1-42). Pero adicionalmente estos modelos muestran que diferentes conformaciones de la His₆ se asocian con diferentes dominios del péptido A β (1-42). Parece probable que la fase de retardo inicial del proceso cinético de formación del complejo entre estas dos moléculas esté asociada al cambio de la conformación de la His₆ prevalente en el tampón cuando se une al péptido A β (1-42). Por otra parte, de entre los tres modelos estructurales mostrados en los resultados, en solo uno de ellos (el modelo 1 mostrado en la **figura 15**), el más probable según los datos del servidor CABS-dock Web Server, la His₆ estaría asociada al dominio de los residuos aminoácidos 24 a 42 del péptido A β (1-42). Como se ha analizado previamente en esta sección de Discusión de la tesis doctoral, este dominio del péptido A β (1-42) es el más relevante para la formación del complejo A β (1-42):CaM y también del complejo A β (1-42):calbindina-D28k. Puesto que His₆ antagoniza eficientemente la formación de estos complejos, la integración de los resultados experimentales con los de *docking* apoya que el modelo más probable (modelo 1 de la **figura 15**) generado por el servidor CABS-dock Web Server es el que se aproxima más a la estructura tridimensional del complejo His₆:A β (1-42) en el tampón utilizado para el estudio experimental. Sin embargo, debe notarse que el fluoróforo HiLyte™-Fluor555 se encuentra unido covalentemente al aminoácido NH₂-terminal del péptido A β (1-42), que está muy distante de los puntos de anclaje de la His₆ en el modelo 1 estructural del complejo His₆:A β (1-42). Por tanto, el hecho experimental de que las medidas de fluorescencia indican que la unión de la His₆ altera el microentorno del fluoróforo HiLyte™-Fluor555, sugiere que la segunda estructura más probable generada por los estudios de *docking* (modelo 2 de la **figura 15**) tiene también una contribución significativa a la

estructura del complejo His₆:Aβ(1-42). Teniendo en cuenta que el aumento de la fluorescencia del fluoróforo HiLyte™-Fluor555 es un proceso cinético lento, una explicación sencilla podría ser que inicialmente se formara un complejo con una estructura tridimensional similar (sino idéntica) a la del modelo 1, que después se distorsiona a una estructura intermedia entre la del modelo 1 y 2. Serán necesarios estudios experimentales de resolución a nivel atómico para resolver esta estructura, pero estos estudios quedan fuera de los objetivos de esta tesis doctoral, por las razones indicadas previamente en esta sección de Discusión.

Un resultado obtenido en esta tesis doctoral, que tiene un elevado valor metodológico, es que una cola de poli-His₆ sensibiliza fuertemente la modulación funcional de una proteína por el péptido Aβ(1-42), en este caso a la isoforma soluble de la Cb₅R humana recombinante. Esta es una observación experimental novedosa que tiene importantes implicaciones para los estudios utilizando proteínas recombinantes, dado que la introducción de una cola de poli-His₆ es una estrategia metodológica muy utilizada para posibilitar después la purificación de la proteína recombinante. La integración de los resultados experimentales obtenidos en esta tesis doctoral con la isoforma soluble de la Cb₅R humana recombinante (con y sin cola de poli-His₆) con los resultados de los estudios de *docking* entre los péptidos β-amiloides (Aβ(1-42), Aβ(25-35) y Aβ(1-40)) y la Cb₅R de eritrocitos (que es la isoforma soluble de esta proteína) permite obtener varias conclusiones metodológicamente relevantes. En primer lugar, destacaremos que estos resultados demuestran que el anclaje del péptido Aβ(1-42) a la His₆ es un anclaje más fuerte que otros posibles anclajes a secuencias de aminoácidos específicas de la Cb₅R. Nótese que la actividad de reducción del Cb₅ dependiente de NADH no se inhibe significativamente en la Cb₅R sin cola de poli-His₆ al menos hasta concentraciones aproximadamente 100 veces mayores del péptido Aβ(1-42) que las que inhiben a la Cb₅R con cola de poli-His₆. Este mismo argumento es aplicable a la interacción entre el péptido Aβ(25-35) y la Cb₅R modificada con una cola de poli-His₆. Puesto que la cola de poli-His₆ no se encuentra en la estructura de la Cb₅R registrada en la base de datos UniProt la contribución de este anclaje con respecto a los otros posibles anclajes no puede ser evaluada por el análisis de *docking*. Los resultados de las medidas de actividad, por tanto, llevan a concluir que las estructuras generadas por

docking entre el péptido A β (1-42) y la Cb₅R y entre el péptido A β (25-35) y la Cb₅R que no impliquen al dominio de la Cb₅R próximo al aminoácido NH₂-terminal de esta proteína (dónde se une covalentemente la cola de poli-His₆) son muy poco probables. Nótese que algunas de las estructuras de los complejos generados por *docking* con valores más favorables de energía libre y mayor densidad de agrupaciones no cumplen este requisito derivado de los resultados experimentales: modelos 1 y 2 del complejo A β (1-42):Cb₅R mostrados en las **figuras 17** y **18**, respectivamente, y modelos 1 y 2 del complejo A β (25-35):Cb₅R mostrados en las **figuras 19** y **20**, respectivamente. Así pues, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral evidencian que los resultados de *docking* deben ser contrastados experimentalmente, ya que los parámetros más frecuentemente utilizados para la selección de las simulaciones *in silico*, energía libre y densidad de agrupaciones, no generan predicciones suficientemente fiables.

Las medidas del efecto de los péptidos A β (1-42) y A β (25-35) sobre la fluorescencia del grupo prostético de la Cb₅R recombinante (FAD) modificada con la cola de poli-His₆ permite alcanzar dos conclusiones relevantes: (1) la inhibición de la actividad de reducción del Cb₅ está causada por la unión del péptido β -amiloide a la Cb₅R, ya que el valor de *K_i* es muy próximo, dentro de los márgenes de error experimental, con el valor de la constante de disociación del sitio de unión de estos péptidos a la enzima; y (2) la unión de los péptidos A β (1-42) y A β (25-35) distorsiona significativamente la estructura del microentorno del FAD en el centro catalítico, produciendo un aumento muy significativo de la fluorescencia de este grupo prostético. Por tanto, la distorsión estructural del centro catalítico de la Cb₅R recombinante modificada con la cola de poli-His₆ es un requisito exigible para dar validez o excluir modelos estructurales de los complejos formados por estos péptidos β -amiloide con esta proteína generados *in silico*. Podemos observar que todos los modelos seleccionados del análisis de *docking* realizado en este trabajo y presentados en las **figuras 17** a **21** muestran una fuerte interacción de los péptidos β -amiloide con aminoácidos próximos al FAD, que sirve de marcador visual de la posición del centro catalítico. Otros modelos generados por el análisis de *docking* (no mostrados) fueron excluidos por no cumplir con este requisito estructural.

FRET es una aproximación experimental particularmente útil en este sentido, cuando los dos componentes del complejo que se forma tienen fluoróforos que forman un par donador/aceptor, ya que permite eliminar las predicciones estructurales que no satisfagan el criterio estructural medible experimentalmente de distancia entre ellos. Con esta finalidad, en esta tesis doctoral hemos utilizado como donador el FAD, grupo prostético de la *Cb₅R*, y como aceptor el fluoróforo HiLyte™-Fluor555, que se encuentra unido covalentemente al aminoácido NH₂-terminal (residuo número 1) del péptido Aβ(1-42). Utilizando un valor del parámetro $R_0 = 2,77$ nm, calculado a partir de las medidas experimentales pertinentes en esta tesis doctoral, hemos obtenido una distancia de separación de $2,35 \pm 0,1$ nm entre el FAD y el HiLyte™-Fluor555 en el complejo formado entre el péptido Aβ(1-42) y la isoforma soluble de la *Cb₅R* humana recombinante (con cola de poli-His₆). Para evaluar más críticamente el grado de certeza de la distancia de separación calculada entre el donador y aceptor con la suposición de orientación al azar, son necesarias medidas de la anisotropía de fluorescencia del donador, ver [Stryer, 1978]. Las medidas de la anisotropía de fluorescencia del FAD unido a la *Cb₅R* dan valores menores a 0,005, revelando que la emisión de fluorescencia de este grupo prostético está fuertemente despolarizada. Operando como se indica en el artículo de Stryer (1978), este valor de la anisotropía de fluorescencia del donador nos permite afirmar que hay una probabilidad >90% de que la distancia calculada entre el FAD unido a la *Cb₅R* y el HiLyte™-Fluor555 unido al péptido Aβ(1-42) sea correcta. De todas las simulaciones de *docking* entre péptidos β-amiloides y la *Cb₅R* incluidos en los resultados de esta tesis el que más se aproxima a cumplir este requisito es el mostrado con el péptido Aβ(1-40) en la **figura 21**. Esta simulación también predice interacciones fuertes con el dominio de la *Cb₅R* próximo al aminoácido NH₂-terminal de esta enzima.

Por tanto, la integración de los resultados de *docking* y los experimentales obtenidos con la isoforma soluble de la *Cb₅R* humana recombinante modificada con cola de poli-His₆ permite concluir que la estructura más probable del complejo formado entre el péptido Aβ(1-42) y esta proteína es una estructura distorsionada con respecto a todas las generadas por las simulaciones *in silico*, debido a la presencia de la poli-His₆ como punto de anclaje dominante, pero

compartiendo características básicas comunes entre estas, relativas a las interacciones de la secuencia de aminoácidos 24 a 42 del péptido A β (1-42) con el dominio del centro catalítico de la Cb₅R.

Finalmente, destacaremos otro punto metodológico relevante derivado de este estudio, el hecho de que no es condición suficiente que dos moléculas colocalicen en nanodominios de dimensiones de varias decenas de nanómetros (como se deriva de las imágenes de FRET obtenidas por microscopía de fluorescencia) para hipotetizar efectos reguladores por interacción directa entre ambas. Para este fin, el trabajo realizado en esta tesis pone de manifiesto la necesidad de evaluar con técnicas experimentales bioquímicas y biofísicas la existencia de modulación funcional y de interacciones a nivel molecular.

3. Estudios sobre la modulación de la interacción entre el péptido A β (1-42) y la CaM y evaluación experimental de la modulación de la nNOS por el péptido A β (1-42).

En la primera parte de esta sección de Discusión de la tesis doctoral hemos comentado brevemente la posible modulación de la interacción entre el péptido A β (1-42) y la CaM por neuropéptidos endógenos. En la última parte de los resultados de esta tesis doctoral hemos estudiado el efecto de los cationes metálicos Fe³⁺, Cu²⁺ y Zn²⁺ sobre la formación del complejo A β (1-42):CaM, ya que las placas seniles formadas por depósitos de agregados fibrilares de péptidos β -amiloide de enfermos de Alzheimer contienen concentraciones de estos cationes de 3 a 5 veces más elevadas que las aisladas de cerebros humanos de la misma edad [Lee *et al.*, 2014]. Otros estudios *in vitro* han demostrado que los oligómeros del péptido A β (1-42) unen estos cationes con alta afinidad y han identificado los residuos aminoácidos implicados en su unión [Faller y Hureau, 2012; Hureau, 2012; Kepp, 2012; Savelieff *et al.*, 2013]. Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral indican que estos cationes potencian la interacción entre el péptido A β (1-42) y la CaM. Aunque las titulaciones de la fluorescencia de la Badan-CaM con estos cationes indican que el efecto mayor de potenciación de esta interacción se observa con concentraciones entre 0,1 y 1 μ M del ión Cu²⁺, hemos focalizado nuestro estudio hacia el efecto del ión Fe³⁺,

por las razones que se indican a continuación. La principal razón es que la desregulación de la homeostasis del $\text{Fe}^{2+/3+}$ ha sido implicada en los procesos neurodegenerativos asociados al desarrollo de la enfermedad de Alzheimer [Du *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2022]. Además, solo los cationes $\text{Fe}^{2+/3+}$ y $\text{Cu}^{1+/2+}$ forman ciclos redox asociados a la citotoxicidad por la actividad pro-oxidante del péptido $\text{A}\beta(1-42)$ [Lee *et al.*, 2014] y Fe^{3+} es el catión más frecuente como contaminante en los tampones utilizados en nuestro laboratorio, y también el que es más frecuente en las preparaciones comerciales del péptido $\text{A}\beta(1-42)$. Así lo confirma el fuerte efecto de la DFA (agente quelante de Fe^{3+}) sobre la cinética de la interacción entre el $\text{A}\beta(1-42)$ HiLyte™-Fluor555 y la CaM y la ausencia de efecto de la NCP (agente quelante de $\text{Cu}^{+/2+}$) sobre esta cinética en los tampones utilizados en estos estudios. El efecto de DFA es claro a una concentración de 100 μM , pero muy débil a una concentración de 10 μM . Este hecho unido al potente efecto potenciador de 1 μM de Fe^{3+} en el aumento de la fluorescencia del $\text{A}\beta(1-42)$ HiLyte™-Fluor555 inducido por la adición de 5 nM CaM, indica que concentraciones de Fe^{3+} submicromolares o incluso nanomolares son efectivas para potenciar la interacción entre concentraciones nanomolares del péptido $\text{A}\beta(1-42)$ y de la CaM. Al menos en parte, la elevada afinidad del péptido $\text{A}\beta(1-42)$ por el Fe^{3+} [Atwood *et al.*, 2000] permite racionalizar estos resultados. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral para la titulación de la fluorescencia de la Badan-CaM con el péptido $\text{A}\beta(1-42)$ muestra que la presencia de estas concentraciones de Fe^{3+} no producen una alteración significativa de la constante de disociación del complejo $\text{A}\beta(1-42):\text{CaM}$. Una explicación sencilla para estos resultados es que el Fe^{3+} potencia la formación de puentes salinos que estabilizan y producen cambios conformacionales tras la formación del complejo $\text{A}\beta(1-42):\text{CaM}$, pero que no tienen una implicación significativa en la formación inicial del complejo, que está dirigida por interacciones de tipo hidrofóbico, como se ha analizado previamente en esta sección de Discusión. Por otra parte, la coordinación del Fe^{2+} con el péptido $\text{A}\beta(1-42)$ implica directamente a los residuos aminoácidos Asp1, Glu3 y His6/13/14 [Hureau, 2012], residuos aminoácidos que incluyen al aminoácido NH_2 -terminal del péptido $\text{A}\beta(1-42)$ y otros que se encuentran muy próximos a este aminoácido. Puesto que el HiLyte™-Fluor555 está covalentemente unido al aminoácido NH_2 -terminal en el derivado fluorescente $\text{A}\beta(1-42)$ HiLyte™-

Fluor555, la proximidad espacial permite racionalizar la elevada sensibilidad de la fluorescencia de este cromóforo a cambios de la concentración de Fe^{3+} en el tampón de ensayo. Además, el análisis de los resultados de *docking* entre el péptido $\text{A}\beta(1-42)$ y la CaM realizado previamente sugería la posible formación de varios puentes salinos en el complejo, implicando a los residuos Lys28 y Lys16 del péptido $\text{A}\beta(1-42)$, este último residuo muy próximo a las His 13/14 involucradas en la coordinación del Fe^{3+} . Pero el motivo estructural compuesto por los residuos aminoácidos 24 a 42 del péptido $\text{A}\beta(1-42)$ se encuentra alejado del dominio hidrofóbico que dirige la interacción con la CaM para formar el complejo entre esta dos moléculas. El sitio de unión del Cu^{2+} en el péptido $\text{A}\beta(1-42)$ ha sido el más estudiado y también involucra directamente al grupo amino terminal y a los residuos aminoácidos Asp1, His6/13 y 14 (próximos al aminoácido NH_2 -terminal). Por esta razón, los efectos de Cu^{2+} sobre la interacción entre el péptido $\text{A}\beta(1-42)$ y la CaM son cualitativamente similares a los efectos del Fe^{3+} .

Los resultados obtenidos en la titulación de la fluorescencia de Badan-CaM con BAPTA en presencia de DFA indican adicionalmente que el catión Fe^{3+} compite con alguno de los centros de unión de Ca^{2+} en la CaM, alterando la constante de disociación del Ca^{2+} de esta proteína. Este resultado es consistente con la baja especificidad hacia iones metálicos de los sitios de unión de Ca^{2+} en la CaM reportada por otros investigadores [Mills y Johnson, 1985; Ouyang y Vogel, 1998] y sugiere que la sobrecarga de hierro en el cerebro afecta de una manera dual a la funcionalidad de la CaM, por un lado afectando directamente a las interacciones entre el péptido $\text{A}\beta(1-42)$ y la CaM en el complejo $\text{A}\beta(1-42)$:CaM, como se ha comentado previamente, y, por otro lado, indirectamente al desplazar el equilibrio hacia la conformación no saturada por calcio de la CaM, que tiene menos afinidad por el péptido $\text{A}\beta(1-42)$ [Corbacho *et al.*, 2017].

Ante la falta de terapias exitosas contra la enfermedad de Alzheimer, la búsqueda de compuestos que antagonicen las acciones citotóxicas del péptido $\text{A}\beta(1-42)$ es una vía para el desarrollo de nuevos tratamientos farmacológicos contra el avance de los procesos neurodegenerativos en esta enfermedad. Debido a que la CaM es una de las moléculas intracelulares con mayor afinidad hacia el péptido $\text{A}\beta(1-42)$ y con mayor capacidad de unión de este péptido en las

neuronas, como ya se ha analizado previamente en esta tesis doctoral, hemos evaluado los efectos de dos flavonoides antioxidantes, el kaempferol y la epigallocatequina, sobre la formación del complejo $A\beta(1-42):CaM$. Estos flavonoides han sido utilizados con cierto grado de éxito en modelos animales de experimentación para atenuar los procesos neurodegenerativos inducidos en el sistema nervioso central por las enfermedades de Alzheimer, Parkinson, Huntington y otras, revisado en [Gutierrez-Merino *et al.*, 2011]. Además, se ha reportado que los flavonoides con grupos fenólicos tienen la capacidad de suprimir la formación de fibras amiloides porque desestabilizan la conformación de hoja plegada del monómero del péptido $A\beta(17-42)$ [Andarzi Gargari *et al.*, 2018]. Los flavonoides epigallocatequina y kaempferol tienen grupos fenólicos y ha sido reportado que la epigallocatequina administrada oral e intraperitonealmente es beneficiosa para los enfermos de Alzheimer porque atenúa la disfunción cognitiva en modelos animales de Alzheimer [Rezai-Zadeh *et al.*, 2008] y que el kaempferol protege fuertemente contra las disfunciones neurológicas y la degeneración del cerebro de ratas Wistar inducida por la neurotoxina ácido 3-nitropropiónico [Lagoa *et al.*, 2009], un modelo animal de la enfermedad de Huntington [Brouillet *et al.*, 2005] para el que recientemente se ha demostrado que: (1) es una tauopatía [Lahiani-Cohen *et al.*, 2020] (como la enfermedad de Alzheimer) y (2) es un proceso degenerativo donde hemos reportado que se inducen también niveles elevados de péptidos β -amiloides neurotóxicos [Lopez-Sanchez, Poejo *et al.*, 2022]. Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral permiten excluir que los efectos protectores de la administración intraperitoneal u oral de epigallocatequina y del kaempferol contra la neurodegeneración inducida por péptidos β -amiloides estén mediados por una alteración significativa de la formación del complejo $A\beta(1-42):CaM$, ya que concentraciones $10 \mu M$ de estos flavonoides tienen un efecto poco significativo sobre la formación de este complejo. Es importante reseñar que las concentraciones de flavonoides que se alcanzan en el cerebro tras ingesta oral de extractos enriquecidos en estos compuestos en seres humanos son submicromolares [Gutierrez-Merino *et al.*, 2011]. Sin embargo, es importante reseñar que la administración oral o intraperitoneal de estos flavonoides reducen los niveles de péptidos β -amiloides neurotóxicos en los animales modelo estudiados [Rezai-Zadeh *et al.*, 2005; Lopez-Sanchez, Poejo *et al.*, 2022], por lo

que en el cerebro de estos animales modelo también se reduce de manera proporcional la concentración de complejo entre estos péptidos y la CaM.

Los antagonistas de la CaM se encuentran entre los fármacos de uso clínico para el tratamiento de desórdenes neurológicos, por ejemplo, la TFP [<https://www.healthline.com/health/drugs/trifluoperazine-oral-tablet#take-as-directed>]. La posibilidad de que los antagonistas clásicos de la CaM pudieran antagonizar la formación del complejo A β (1-42):CaM ha sido evaluada experimentalmente en esta tesis doctoral con la TFP y el C48-80. Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral muestran que estos antagonistas de la CaM potencian la formación del complejo A β (1-42):CaM. El efecto sinérgico observado probablemente esté asociado a la hidrofobicidad de estos antagonistas, que al asociarse a dominios de la CaM próximos a los que interaccionan con el péptido A β (1-42) contribuyan a potenciar las interacciones hidrofóbicas entre el péptido A β (1-42) y la CaM, las predominantes para la formación del complejo A β (1-42):CaM como se ha discutido en la primera parte de la Discusión de esta tesis doctoral. Por tanto, es muy cuestionable el uso terapéutico de estos antagonistas de la CaM en amiloidopatías. Sin embargo, los resultados sugieren la posibilidad de usar estos antagonistas de la CaM como herramienta metodológica, para evaluar la relevancia biológica de la formación de complejo A β (1-42):CaM en cultivos celulares.

Finalmente, los resultados de esta tesis doctoral muestran que la nNOS no se inhibe significativamente, tampoco se activa, por concentraciones submicromolares de oligómeros del péptido A β (1-42) y solo se inhibe parcialmente (30%) con una concentración 2 μ M. Puesto que los datos bibliográficos (citados en la sección de la Introducción de esta tesis doctoral) indican que no se alcanzan concentraciones micromolares de oligómeros de péptidos β -amiloides intracelulares en las neuronas, los resultados obtenidos en esta tesis permiten excluir una inhibición significativa de la nNOS *in vivo* por el péptido A β (1-42). Esta conclusión permite racionalizar la activación de la nNOS como consecuencia de la elevación de la concentración del Ca²⁺ citosólico derivada de la desregulación de la homeostasis intracelular del Ca²⁺ por los péptidos β -amiloides neurotóxicos, que ha sido ampliamente documentada y analizada en la sección de Introducción de esta tesis doctoral. De esta conclusión

se deriva que la generación de especies reactivas del nitrógeno muy citotóxicas, que ha sido reportada en la enfermedad de Alzheimer [Malinski, 2007], es una consecuencia de la desregulación de la homeostasis intracelular del Ca^{2+} en neuronas y células del endotelio vascular del cerebro o deriva de la inducción de la expresión de la iNOS. Teniendo en cuenta la relevancia de la inflamación del cerebro en la etiopatología de la enfermedad de Alzheimer [Fakhoury, 2018; Kinney *et al.*, 2018], esta última es la hipótesis más probable que acontezca en las etapas iniciales del proceso neurodegenerativo cerebral porque la expresión de la iNOS se induce fuertemente por las citoquinas proinflamatorias secretadas por la microglía activada [Gutierrez-Merino *et al.*, 2011].

5. Materiales y métodos

Materiales

El A β (1-42)-HiLyteTM-Fluor555 humano se obtuvo de AnaSpec (Freemont, CA, EE.UU.). StabVida (Caparica, Portugal) y GenicBio Limited (Shangai, República Popular de China) sintetizaron y suministraron A β (1-42) sin derivarizar. El péptido VFAFAMAFML (aminoácido C-terminal amidado), sintetizado y suministrado por GenicBio Limited (Shangai, República Popular de China), se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 10 mM y se almacenó a -20 °C hasta su uso. El plásmido pET-15b con el inserto correspondiente al cDNA de la CALB1 optimizado para la expresión de la proteína humana en *E.coli* fue comprado a GenScript (Piscataway, NJ, EE.UU). CaM de cerebro bovino purificado, nNOS humana recombinante, HisTrapTM FF y un kit Thrombin Clean CleavageTM se adquirieron de Sigma-Aldrich (Madrid, España). Las microcolumnas NZYMiniPrep fueron adquiridas de NZYTech (Lisboa, Portugal). Anticuerpos: anti-Cb₅R de conejo (anti-DIA1; Protein Tech Group, número de catálogo: 10894-1-AP), anticuerpo secundario anti-IgG de conejo marcado con Alexa488 (Invitrogen, número de catálogo: A11008). Los anticuerpos se han utilizado a diluciones recomendadas para inmunofluorescencia o *western blotting* en las hojas de especificaciones técnicas de las casas comerciales que los han suministrado.

Todos los demás reactivos y productos químicos utilizados han sido de grado analítico y suministrados por las empresas: Sigma-Aldrich (Madrid, España), Roche-Merck (Darmstadt, Alemania) y ThermoFisher Scientific (Madrid, España).

Soluciones y estado de agregación del péptido A β (1-42).

Las soluciones de A β (1-42) se prepararon disolviendo el péptido liofilizado en NH₄OH al 1 % y se diluyeron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) hasta la concentración deseada, tal y como se indica en la ficha técnica del producto. El estado de agregación de las soluciones madre de A β (1-42) utilizadas en este trabajo se evaluó utilizando el método de entrecruzamiento fotoinducido rápido de proteínas no modificadas [Bitan y Teplow, 2004], utilizado en artículos publicados por nuestro equipo de investigación [Poejo *et al.*, 2021a; Salazar *et al.*, 2022]. Los resultados obtenidos presentados en la **figura 35** muestran que los dímeros son el estado de agregación predominante de A β (1-42) en nuestras soluciones madre de 2 μ M, con una contribución menor (<10%) de trímeros y una concentración indetectable de monómeros de A β (1-42).

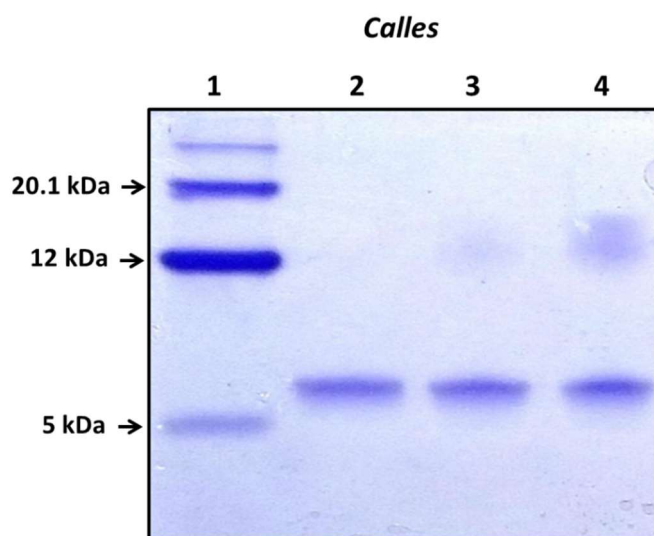


Figura 35. Resultado de la electroforesis (tricina-SDS PAGE) de las soluciones del péptido A β (1-42) utilizadas en esta tesis doctoral. Calles: (1) Marcadores de bajo peso molecular; (2) 177 μ M A β (1-42) en PBS suplementado con 60 mM NaOH después de una preincubación de 2 horas a 37 °C; (3) 177 μ M A β (1-42) en PBS después de una preincubación de 2 horas a 37°C; (4) 177 μ M A β (1-42) en PBS sin preincubación a 37°C. Peso molecular del monómero del péptido A β (1-42) = 4,514 kDa.

Expresión y purificación de la calbindina-D28k humana recombinante.

El protocolo utilizado para expresar y purificar la calbindina-D28k ha sido el descrito en [Noble et al. 2018] con pequeñas modificaciones. Compramos un plásmido pET-15b con el inserto correspondiente al cDNA de la CALB1 optimizado para la expresión de la proteína humana en *E.coli* (GenScript, Piscataway, NJ, EE.UU). El cDNA fue insertado en el vector pET-15b usando los sitios de restricción de las enzimas NcoI y BamHI presentes en la secuencia del plásmido (**Figura 36**).

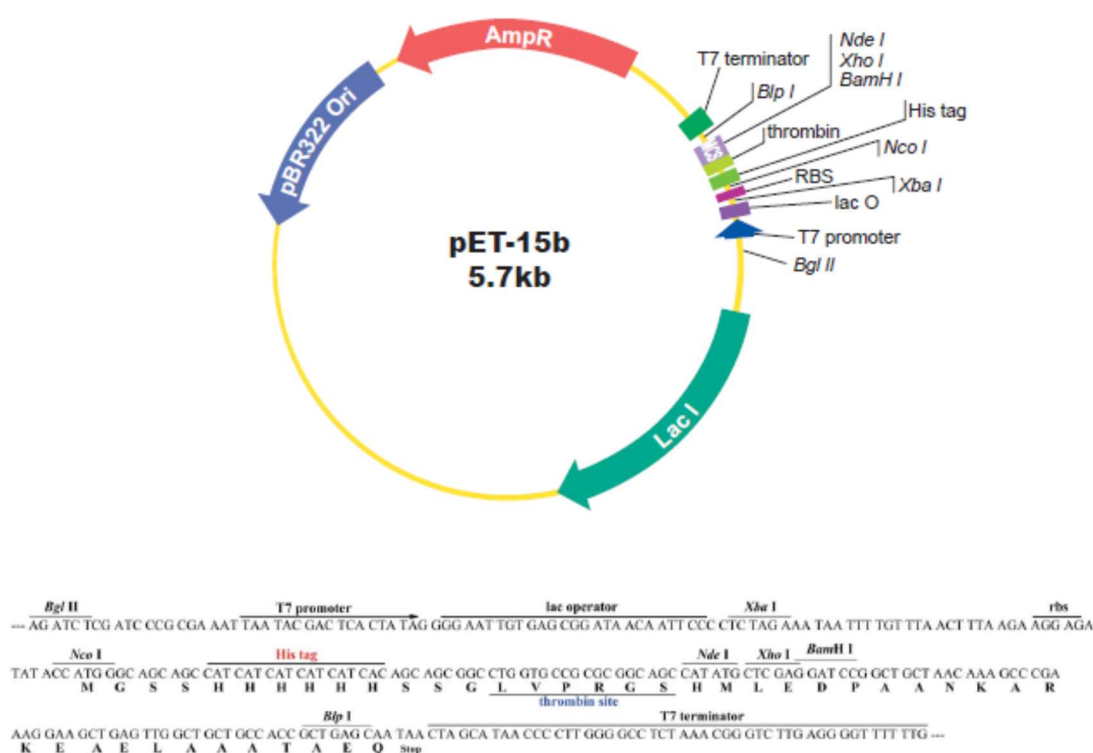


Figura 36. Mapa del vector pET-15b de GenScript [<https://www.genscript.com/gsfiles/vector-map/bacteria/pET-15b.pdf?1617385216>].

Para la sobreexpresión de proteína, se usaron células quimiocompetentes BL-21 (DE3) preparadas en el laboratorio tal y como se describe en la bibliografía [Maniatis et al., 1982]. Las células competentes se transformaron con 25 ng del plásmido recombinante pET-15bCALB1 y los transformantes se sembraron en placas con medio Luria Bertani (LB) suplementado con 100 µg/mL de ampicilina.

Las células fueron incubadas toda la noche a 37 °C. Se extrajo una colonia positiva que contenía el plásmido recombinante y se inoculó en 5 ml de medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL) que se incubó a 37 °C durante 12 h con agitación. Este cultivo se usó para inocular 1 L del mismo medio en las mismas condiciones de crecimiento. Una vez que la densidad óptica celular alcanzó 0,6 D.O., se indujo la expresión de la proteína añadiendo 0,4 mM de isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG). El cultivo se mantuvo en agitación a 200 rpm a 25 °C durante 10-12 h.

A continuación, las células se recolectaron por centrifugación a 6.000 x g durante 30 min. Se recogió el sedimento y se resuspendió en el siguiente tampón: 150 mM de tris-(hidroximetil) aminometano (Tris-HCl), 150 mM de NaCl, 50 mM MgCl₂, 1 mM de fenilmetilsulfonilo y 1 mg/mL de lisozima pH 8, y se mantuvo en agitación durante 90 min a 4 °C. Las células se lisaron con dos ciclos de congelación/descongelación a -80 °C y a temperatura ambiente. Después de este punto, se añadió desoxicolato de sodio al 0,2 % para asegurar una mejor solubilización del contenido celular. El ADN liberado por las células se eliminó mediante la adición de 0,05 mg/mL de DNasa. El lisado se centrifugó a 8.000 x g durante 30 min y el sobrenadante se recogió y se llevó a pH 8. La proteína CALB1 recombinante que conteniendo una cola de poli-His fue purificada usando columnas cromatográficas de afinidad (HisTrapTM-FF). El sobrenadante se cargó en 10 mL de matriz cromatográfica preempaquetada HisTrapTM-FF, equilibrada con un tampón compuesto por 20 mM de Tris-HCl, 0,5 mM de NaCl, y 10 mM de imidazol (pH 7,4). Después de lavar con tampón (10 volúmenes de columna), las proteínas retenidas en la matriz se eluyeron con un tampón suplementado con 250 mM de imidazol. La calbindina-D28k recombinante casi pura se cargó en una matriz de Sephadex G50 (1x50 cm) equilibrada con 50 mM de Tris-HCl (pH 7,5) para eliminar posibles contaminantes de alto peso molecular. Después de este paso, la pureza de la proteína se evaluó mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). El rendimiento de proteína obtenido después de cada uno de los pasos de purificación se enumera en la tabla 4 y en la figura 37. Los lotes de proteína se mantuvieron a -80 °C hasta su uso.

Tabla 4. Resultados de una de las purificaciones realizadas de la calbindina-D28k humana recombinante.

<i>Paso de la purificación</i>	Calbindina-D28k (mg/mL)	Volumen (mL)	Calbindina-D28k (mg)	Rendimiento (%)
Lisado celular	99,8	17,5	1747	100,0
Sobrenadante	35,2	21,3	750	43,0
Niquel NTA	0,96	50,0	48	2,7
Sephadex G75	0,70	60,0	42	2,4

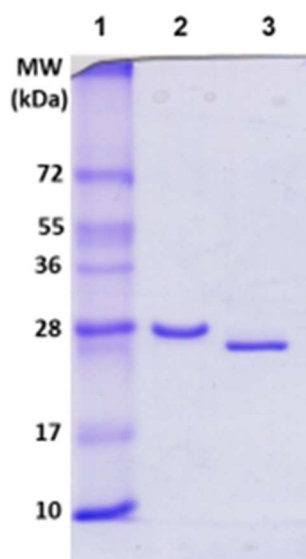


Figura 37 La electroforesis SDS-PAGE incluida en esta figura demuestra el elevado grado de pureza de la calbindina-D28k humana recombinante purificada en esta tesis doctoral y la eliminación de la cola de poli-His₆ por tratamiento con el kit Thrombin Clean Cleavage™. Calles: (1) marcadores de peso molecular -el peso molecular (MW) se da en el lado izquierdo de esta calle, (2) calbindina-D28k recombinante purificada con la cola de poli-His₆, y (3) calbindina-D28k recombinante tratada con el kit Thrombin Clean Cleavage™.

La cola de poli-Histidinas₆ se cortó incubando toda la noche a 4-5 °C con el kit Thrombin Clean Cleavage™. La proteína recombinante calbindina-D28k purificada se separó del péptido generado por cromatografía usando una columna Sephadex G75 de (1 x 25 cm). La eficiencia del tratamiento para la eliminación de la cola de poli-His₆ se evaluó mediante SDS-PAGE (figura 37). La concentración de calbindina-D28k se determinó utilizando un coeficiente de extinción de 27.957-28.037 M⁻¹·cm⁻¹ a 280 nm [Tao et al. 2002; Bauer et al. 2008]. En este trabajo hemos obtenido de forma rutinaria fracciones de calbindina-D28k recombinante purificada con concentraciones en el intervalo de 15-20 µM por lote, es decir entre 0,48 y 0,64 mg de proteína/mL.

Clonación de la isoforma soluble de la Cb₅R humana.

Se usó una construcción comercialmente disponible para CYB5R3 (GeneScript; Clone ID: OHu12696) con la secuencia insertada de NADH-citocromo b5 reductasa 3, isoforma2 como molde para la clonación en un pET-22b. Los cebadores se diseñaron para incorporar un sitio de corte de trombina para liberar la etiqueta de His cuando sea necesario en nuestros experimentos. Cebadores (0,1 µM) FW- 5'-CAATGCCATGGCTATGAAGCTGTTCCAGCGC-3' y RW-5'CCCAAGCTTGCCCCGTCCGAAGACGAAGCAGCGCTC-3') y se añadió el plásmido comercial (20 ng) al tampón (1,5 mM de MgCl₂, dNTP (0,25 mM) y enzima (kit de polimerasa de ADN a prueba de NZY, # de catálogo MB14601, NZYtech), y se usó PCR para preparar el inserto. Los parámetros de PCR ajustados fueron: 30 s a 95 °C, 30 s a 60 °C, 60 s a 72 °C para los pasos de desnaturalización, hibridación y extensión. Las enzimas de restricción seleccionadas para la inserción en el sitio de multiclonación del plásmido pET-22b fueron NcoI y HindIII. La preparación y purificación del plásmido linealizado y del producto de PCR se realizó siguiendo las instrucciones indicadas por el proveedor de las enzimas de restricción comerciales (Invitrogen). El inserto se ligó al plásmido pET-22b cortado y desfosforilado. La desfosforilación se realizó siguiendo las instrucciones del proveedor comercial con una fosfatasa alcalina termosensible TSAP (cat#11635337001, Roche). Se logró la transformación y se recogieron colonias positivas para crecer en LB AMPICILINA. Se logró purificar

del plásmido para obtener una solución madre del plásmido clonado para CYBR53 (Hcybr53) se almacenó a -80°C .

Expresión y purificación de la isoforma soluble de la Cb₅R humana recombinante.

Se transformaron células quimiocompetentes Rosetta2 (DE3) (Novagen) con el plásmido hCYB5R3 y se sembraron en agar LB con ampicilina y cloranfenicol. Se recogió una colonia y se cultivó durante 12 h a 37°C en 50 ml de medio Caldo Terrific (TB) suplementado con riboflavina 0,1 mM. El medio TB (5mL) se transfirió a 1 L de medio TB suplementado y se cultivó durante 24 h a 37°C . La inducción de la expresión se realizó a 25°C durante 8 h, después de la adición de 0,5 mM de IPTG. Las células se sedimentaron mediante centrifugación a $5.000 \times g$ durante 25 min y se suspendieron en 150 ml de tampón: 50 mM de Tris, 150 mM de NaCl, 1 mM de PMSF y 1 mg/mL lisozima a pH 7,4. El lisado se incubó durante 2 h en hielo. La suspensión se congeló y descongeló 3 veces a 4°C , 50 mM MgCl_2 en presencia de 0,05 mg/mL desoxirribonucleasa (Sigma, D5025); la mezcla se incubó a 4°C durante 1 h, con agitación suave. La fracción soluble se separó del sedimento celular completo mediante centrifugación a $20.000 \times g$ durante 30 min [Lloyd E. et al 1994, Dell'Acqua S. et al 2012] y al pH se ajustó a pH 8,1 después de la adición de 70 mM de imidazol (las condiciones de la proteína para unirse a Ni Sepharosa). La fracción soluble se dividió en dos alícuotas de aproximadamente 50 mL, que se cargaron secuencialmente después de la elución de la fracción de Cb₅R en una matriz de Ni^{2+} -Sepharosa 6 Fast Flow (# de catálogo 17351802, GE Healthcare), 2,5 x 5 cm previamente equilibrado con tampón A: 20 mM de Tris, 150 mM de NaCl, 70 mM de imidazol, 1 mM de benzamidina pH 8,1. Después de cargar la muestra, la columna se lavó con 300 mL de tampón B: 20 mM de Tris, 150 mM de NaCl, 70 mM de imidazol, 1 mM PMSF, 1 mM de benzamidina pH 7,5. Al finalizar el lavado de la matriz era visible una banda amarilla unida a la matriz, el color del grupo prostético FAD de la Cb₅R. La proteína se eluyó con tampón C: 20 mM de Tris, 150 mM NaCl, 250 mM imidazol, 1 mM de PMSF, 1 mM de benzamidina pH 7,5. Después de la diálisis, la muestra se concentró y se cargó en una columna Sephadex G75 previamente equilibrada con 150 mM de Tris pH 7,5. La Cb₅R purificada se eluyó de la matriz casi pura y se concentró con un

filtro Amicon de 10 kDa. Se añadió glicerol al 30 % antes de la congelación, para su criopresevación a -80 °C.

La cola de poli-Histidina₆ se cortó incubando toda la noche a 4-5 °C con el kit Thrombin Clean Cleavage™. La proteína recombinante Cb₅R soluble purificada se separó del péptido generado por cromatografía usando una columna Sephadex G75 (1 x 25 cm). La eficiencia del tratamiento para la eliminación de la cola de poli-His₆ se evaluó mediante SDS-PAGE.

La concentración de la Cb₅R recombinante se determinó a partir de medidas de absorbancia a 450 nm utilizando un coeficiente de extinción del grupo prostético FAD de 11,3 mM⁻¹.cm⁻¹, como en [van den Berg *et al.*, 2001; Samhan-Arias *et al.*, 2017] o con el método de Bradford utilizando la albúmina de suero bovino (BSA) como estándar.

Purificación de la isoforma soluble del Cb₅ humano recombinante.

El Cb₅ soluble humano recombinante se expresó y purificó como describió anteriormente Lloyd [Lloyd E. *et al.*, 1994], con pequeñas modificaciones indicadas en artículos publicados de nuestro equipo de investigación [Samhan-Arias *et al.*, 2017; Gómez-Tabales *et al.*, 2020]. Brevemente, después de la expresión de la proteína, las células se incubaron en 50 mM de Tris, 1 mM de EDTA, 1 mM PMSF pH 8,1 y 1 mg/ml de lisozima durante 1 h y se rompieron mediante prensa francesa. Después de la lisis, se añadieron 50 mM de MgCl₂ y 0,05 mg/ml de desoxirribonucleasa y el lisado se incubó durante 30 min a 30 °C. La fracción soluble se separó de los desechos mediante centrifugación a 9.000 x g durante 30 min a 4 °C. Se añadió gota a gota sulfato de amonio saturado hasta alcanzar el 50 % (v/v). El precipitado se separó de la fracción soluble por centrifugación a 9.000 x g durante 30 min a 4 °C. el sobrenadante se dializó extensamente frente a 10 mM de Tris, 1 mM de EDTA pH 8,1 a 4 °C y se cargó en una columna de dietilaminoetil Sepharosa (2,5 x 30 cm) (GE Healthcare previamente equilibrada en 10 mM de Tris, 1 mM de EDTA pH 8,1. Se realizó un gradiente paso a paso mediante la adición de concentraciones crecientes de tampón Tris (hasta 200) al tampón en presencia de 1 mM de EDTA, TX-100 (0,5%) y desoxicolato (0,2%). El Cb₅ se eluyó en 10 mM de Tris, 1 mM de EDTA y 250 mM de tiocianato de potasio, pH 8,1. El eluyente se limpió de

contaminantes mediante la adición de 1,1 M sulfato de amonio y pasándolo a través de una columna CL Sepharosa 4B (2,5 X 10 cm) (equilibrada con 100 mM de Tris, 1 mM de EDTA) sin retención. Después de la elución, el Cb₅ se concentró con un filtro Amicon (límite de 10 kDa) y se añadió glicerol antes de congelar a -80 °C.

La concentración del Cb₅ recombinante se determinó a partir de medidas de absorbancia a 550 nm utilizando un coeficiente de extinción diferencial entre las formas reducida y oxidada de 16,5 mM⁻¹.cm⁻¹, como en [Samhan-Arias *et al.*, 2017; Gómez-Tabales *et al.*, 2020] o con el método de Bradford utilizando la BSA como estándar.

Preparación de sinaptosomas y de membranas sinápticas.

En esta tesis se han utilizado sinaptosomas y membranas sinápticas de cerebro de rata del *stock* almacenado a -80 °C en nuestro laboratorio, preparadas en estudios previos realizados durante el desarrollo del proyecto BFU2014-53641P del Plan Nacional de I+D (Ministerio de Economía y Competitividad). Estas muestras se prepararon como se describe en artículos publicados de nuestro equipo de investigación, ver, por ejemplo, [Samhan-Arias y Gutierrez-Merino, 2014; Samhan-Arias *et al.*, 2018].

Además, se han preparado sinaptosomas de un cerebro de cerdo recién sacrificado, suministrado por un matadero local. A partir de estos, los sinaptosomas se prepararon membranas sinápticas siguiendo el protocolo utilizado previamente con cerebros de rata y que se describe a continuación. Se desmenuzó el cerebro en una solución tampón de extracción (sacarosa 0,32 M, MgSO₄, 0,5 mM, PMSF 0,1 mM, Tes 10 mM, pH 7,4) a una temperatura de 4 °C. A continuación se homogeneizó con un homogeneizador de vidrio esmerilado controlado mecánicamente a una temperatura de 4 °C. El homogeneizado se centrifugó primero a 1.500 x g durante 10 minutos a 4 °C y el sobrenadante se centrifugó a 20.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. El precipitado se resuspendió y se centrifugó a 63.000 x g durante 60 minutos a 4 °C, en un gradiente discontinuo de sacarosa con dos capas (al 38,5% y al 20%) preparado en tampón Tes 10 mM (pH 7,4) suplementado con EDTA 1 mM. Tras la centrifugación, se extrajo el material de la interfase del gradiente de sacarosa, se homogeneizó y

se dividió en alícuotas de pequeño volumen que fueron congeladas a -80 °C hasta su uso.

Para la preparación de vesículas de membrana plasmática, una fracción de sinaptosomas se lisó por dilución en un volumen final 100 veces mayor con una solución de lisis (EDTA 1 mM, Tes 5 mM -pH 7,4) y se incubó en este tampón a 4 °C durante 60 minutos. Después, la muestra se centrifugó a 8.000 x g durante 10 minutos a 4 °C (para eliminar la contaminación mitocondrial) y el sobrenadante se centrifugó en un gradiente de sacarosa con dos capas (al 36% y al 20%) en el tampón Tes 5 mM (pH 7,4) suplementado con EDTA 1 mM y MgCl₂ 2 mM, a una velocidad de 63.000 x g durante 60 minutos a 4 °C. Las muestras obtenidas de la interfase de las dos capas de sacarosa se concentraron por centrifugación a 100.000 x g durante 30 minutos. El precipitado se resuspendió con el volumen deseado en el tampón del gradiente de sacarosa al 20%, se dividió en alícuotas de pequeño volumen y se congeló a -80 °C hasta su uso.

La concentración de proteínas de estas muestras se determinó con el método de Bradford, utilizando la BSA como estándar.

Cultivos de células HT-22 y medidas de la viabilidad celular.

La línea celular HT-22, células inmortalizadas derivadas de neuronas del hipocampo de ratón, se han cultivado en medio Dulbecco modificado (DMEM, Dulbecco's modified Eagle's médium) rico en glucosa, suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 4 mM glutamina, 1 mM ácido pirúvico, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina. Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera con 5% CO₂ humidificada hasta que alcanzaron entre el 70 y 80% de confluencia en un *T-flask*. Las células HT-22 fueron posteriormente sembradas en placas de 35 mm a una densidad de 8.000 células/cm² en el medio de cultivo descrito anteriormente y se crecieron durante 48 horas a 37°C en una estufa de cultivos con 5% CO₂ antes de realizar los experimentos.

Para las medidas de la viabilidad celular, las células HT-22 se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 8.800 células/cm² en el medio de

cultivo DMEM rico en glucosa, suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor, 4 mM glutamina, 1 mM ácido pirúvico, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina. Las células se crecieron durante 48 horas a 37°C en una estufa de cultivo con atmósfera 5% de CO₂ humidificada. A continuación, se añadieron diferentes concentraciones del péptido VFAFAMAFML (COOH-terminal amidado), entre 0,1 y 1 µM, y se incubaron en el medio de cultivo indicado más arriba durante 24 horas a 37 °C en una estufa de cultivo con una atmósfera 5% de CO₂. Los controles experimentales se hicieron con la adición de 0,05% y 0,1% DMSO, que han sido las concentraciones de este disolvente añadidas con el péptido VFAFAMAFML en los ensayos de viabilidad realizados. La viabilidad celular se determinó midiendo la cantidad de formazán formado por la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), como en publicaciones previas de nuestro equipo de investigación [Marques-da-Silva *et al.*, 2014; Fortalezas *et al.*, 2018a; Poejo *et al.*, 2021a]. Brevemente, las células control y tratadas con el péptido VFAFAMAFML (COOH-terminal amidado) se lavaron con 1 mL de medio tamponado a pH 7,4 termostatizado a 37 °C, se les añadió una disolución de 0,3 mg/mL de MTT y se incubaron durante 20 minutos a 37 °C en la estufa de cultivos con una atmósfera 5% de CO₂. Después se eliminó el sobrenadante y se añadieron 100 µL de DMSO por pocillo para solubilizar el formazán de color púrpura producido por las células. La cantidad de formazán formado por la reducción de MTT se determinó a partir de medidas de la absorbancia a 490 nm, utilizando como referencia las medidas de absorbancia a 700 nm. Los valores obtenidos para células no tratadas (control 0% DMSO) se han tomado como 100% de viabilidad celular y los resultados se han expresado como porcentaje respecto al control 0% DMSO. Los resultados mostrados son los valores promedio de experimentos independientes realizados por triplicado ± el error estándar de la media.

Preparación de cultivos primarios de neuronas granulares del cerebelo (CGN).

Las CGN se han preparado a partir de cerebros de ratas neonatas de 7 días de edad, siguiendo el protocolo utilizado en estudios previos y descritos en

varias publicaciones de nuestro equipo de investigación [Samhan-Arias *et al.*, 2012; Marques-da-Silva y Gutierrez-Merino, 2014; Fortalezas *et al.*, 2018b; Poejo *et al.*, 2021]. Brevemente, las CGN se sembraron en placas Corning de 35 mm de diámetro pretratadas con poli-D-lisina a una densidad de $2,5 \times 10^6$ células/placa en DMEM suplementado con 10% de FBS inactivado por calor, 5 mM glucosa, 19,63 mM KCl, 3,7 ng/mL insulina, 7 μ M ácido 4-aminobenzoico, 50 U/mL penicilina, 25 U/mL estreptomicina, 0,91 mM piruvato y 2 mM glutamina. Los cultivos de las CGN se mantuvieron en una estufa de cultivos 37 °C en atmósfera humidificada con 5% CO₂/95% aire. Dos días después, las CGN se trataron con citosina arabinofuranosido (10 μ M) para prevenir la replicación de células no-neuronales. A los siete días *in vitro* el medio de cultivo se cambió por un medio libre de suero DMEM:F12 (1:1) suplementado con 12,5 mM glucosa, 20,82 mM KCl, 5 μ g/mL insulina, 0,1 mg/mL apo-transferrina, 20 nM progesterona, 50 U/mL penicilina, 25 U/mL estreptomicina, 0,1 mg/mL piruvato y 2 mM L-glutamina. Las CGN se mantuvieron en la estufa de cultivos hasta su uso en los experimentos, realizados entre los días *in vitro* 8 y 10.

Experimentos de docking in silico entre el péptido A β (1-42) y las proteínas CaM, calbindina-D28k y Cb₅R y entre el péptido A β (1-40) y la Cb₅R.

Los experimentos de *docking* se realizaron utilizando ClusPro, un servidor web que realiza el análisis de interacción entre dos proteínas mediante el muestreo de miles de millones de conformaciones posibles. Este servidor realiza los siguientes pasos computacionales. (i) acoplamiento de cuerpo rígido mediante muestreo de billones de conformaciones: (ii) cálculo de la desviación cuadrática media del agrupamiento base de las 1000 estructura con la menor energía generado, para encontrar los agrupamientos que representarán los modelos más probables del complejo; (iii) el refinamiento de la estructura seleccionado usando minimización de la energía. Los siguientes archivos PDB fueron usados para generar los modelos para la formación del complejo entre A β (1-42) y CaM y calbindina-D28k: CaM saturada con calcio (PDB ID: 1CLL), calbindina-D28k saturada con calcio (PDB ID: 6FIE), y las estructuras A β (1-42) (PDB ID: 1IYT y/o 1Z0Q según se indique para cada caso). Para la determinación

de la interfaz de interacción entre A β (1-42) y la Cb₅R (PDB ID: 1UMK), se han utilizado las estructuras A β (1-42) (PDB ID: 1IYT y/o 1Z0Q según se indica para cada caso). Debido a los cambios conformacionales reportados en el dominio C-terminal de A β (1-42) inducidos por cambios conformacionales en la hidrofobicidad del microentorno [Tomaselli *et al.*, 2006], hemos utilizado dos archivos PDB ID para A β (1-42), es decir, PDB ID 1Z0Q y 1IYT, como representantes de las conformaciones A β (1-42) predominantes en agua y en un ambiente fuertemente hidrofóbico, respectivamente. Los 10 modelos mejor puntuados por el servidor para la formación de complejos fueron seleccionados para el análisis inicial, con el fin de cuantificar los residuos de aminoácidos que conformaban la interfaz de interacción. El análisis de interfaz se llevó a cabo a través del servidor PDBePISA (Protein, Interface, Surface, and Assemblies), disponible en <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/pisa>. La relación entre el área de superficie no accesible/accesible (relación BSA/ASA) de las simulaciones de los complejos más probables se ha utilizado para cuantificar el grado de participación de cada residuo de aminoácido en la formación del complejo. Se eligió un nivel umbral de 0,5 a 0,6 para seleccionar los residuos de aminoácidos que contribuyen más fuertemente a la interacción entre las moléculas que forman el complejo. Los gráficos y el análisis molecular se realizaron con el paquete UCSF Chimera. El modelado de las interacciones proteína-péptido A β (25-35) se realizó utilizando el servidor web CABS.dock (<http://biocomp.chem.uw.pl/CABSdock>) [Błaszczuk *et al.*, 2016; Kurcinski *et al.*, 2015], como se indica en nuestro trabajo anterior [Corbacho *et al.* 2017]. Los archivos PDB utilizados en este análisis de *docking* han sido: 1CLL para CaM saturada con Ca²⁺ y 1IYT para A β (1-42).

Estudios de docking entre A β (1-42) y Hexa-histidina.

Para estas simulaciones se ha utilizado el servidor MDockPeP <https://zougrouptoolkit.missouri.edu/mdockpep/index.html>. Este servidor predice estructuras complejas de proteínas y péptidos a partir de la estructura de la proteína (1IYT) y la secuencia del péptido. El proceso de predicción consta de tres pasos: (1) modelado de confórmers peptídicos; (2) muestreo global y

flexible de los modos de unión proteína-péptido; (3) puntuación y clasificación de los modos de enlace evaluados [Xu *et al.*, 2018].

Medidas de la interacción entre A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555 con CaM y calbindina-D28k.

Las medidas de fluorescencia se realizaron utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia Fluoromax+ (Jovin Yvon) a temperatura ambiente (24-25 °C) en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de paso óptico, con rendijas de excitación y emisión de 5 nm. Las medidas de la cinética de interacción se realizaron con 10 nM de A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555 en tampón 50 mM de N-[2-hidroxietil] piperazina-N'-[ácido 2 etanosulfónico] (Hepes), 100 mM de KCl y 50 μ M de CaCl₂ (pH 7,05). La muestra se mantuvo con agitación magnética en oscuridad dentro del portacubetas del fluorímetro hasta estabilización de la intensidad de fluorescencia, habitualmente entre 20 y 40 min. Luego, se agregó CaM o calbindina a la cubeta a las concentraciones indicadas en las figuras, y se registró la cinética de aumento de la intensidad de fluorescencia con longitudes de onda de excitación y emisión de 520 nm y 567 nm, respectivamente.

Evaluación experimental de la eficiencia del péptido diseñado para antagonizar la interacción entre A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555 y CaM o calbindina-D28k.

Las medidas de evaluación experimental de la eficacia del péptido diseñado para antagonizar la interacción entre A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555 y CaM o calbindina-D28k se realizaron con 10 nM de A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555 preincubado durante 10-15 min con diferentes concentraciones del péptido, en tampón 40 mM de Hepes, 100 mM de KCl y 50 μ M de CaCl₂ (pH 7,05) antes de la adición de CaM o calbindina-D28k. El péptido VFAFAMAFML (aminoácido C-terminal amidado) se añadió a partir de soluciones stock concentradas en DMSO, cuidando que la concentración de DMSO estuviera siempre entre 0,05 y 0,1 % en la cubeta de medidas de fluorescencia. Los ensayos cinéticos se realizaron con longitudes de onda excitación y emisión de 520 nm y 567 nm,

respectivamente. La cinética de incremento de la intensidad de fluorescencia se registró después de la adición de CaM o calbindina-D28k en las concentraciones indicadas en los pies de las figuras. Los experimentos llevados a cabo con 0,05 y 0,1 % de DMSO no mostraron ningún efecto de estas concentraciones de DMSO sobre estas cinéticas de fluorescencia en ausencia del péptido.

Antagonismo de la interacción de A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555 y CaM o calbindina-D28k por la hexa-histidina.

Las medidas de antagonismo se llevaron a cabo a 25 °C con 10 nM de A β (1-42) HiLyteTM-Fluor555 preincubado durante 10-15 min con diferentes concentraciones del péptido, en tampón 50 mM de Hepes, 100 mM de KCl y 50 μ M de CaCl₂ (pH 7,05) antes de la adición de CaM o calbindina-D28k. El péptido poli-His₆ se añadió a partir de soluciones stock concentradas en agua destilada, de manera que el volumen añadido no superara el 0,1 % del volumen total de tampón en la cubeta de medidas de fluorescencia. Los ensayos cinéticos se realizaron con longitudes de onda de excitación y emisión de 520 nm y 567 nm, respectivamente. La cinética de fluorescencia se registró después de la adición de CaM o calbindina-D28k en las concentraciones indicadas en las leyendas de las figuras.

Titulación con A β (1-42) de la fluorescencia de la isoforma soluble de la Cb₅R humana recombinante con una cola de hexa-histidina.

Los ensayos de titulación con A β (1-42) de la fluorescencia del grupo FAD de la Cb₅R soluble recombinante con la cola de His₆ (10,2 μ g/ml) y Cb₅ (1 μ M) se han hecho a 25 °C en un fluorímetro Perkin Elmer 650-40 en una cubeta de cuarzo de 2 ml con tampón 20 mM fosfato más 0,1 mM DPTA (pH 7), con longitud de onda de emisión de 520 nm y longitud de onda de excitación de 460 nm (rendijas de emisión y excitación 10/10 nm). Tras registrar la señal de intensidad de fluorescencia en ausencia de péptido β -amiloide se añadieron al tampón las concentraciones del péptido de A β (1-42) o A β (25-35) indicadas en las figuras de

la sección de los resultados de esta tesis doctoral y se registró la intensidad de fluorescencia durante unos minutos después de cada adición.

Titulación de la fluorescencia de Badan-CaM con A β (1-42) en presencia de una concentración micromolar de los cationes metálicos Fe³⁺, Zn²⁺ y Cu²⁺.

Las medidas experimentales se realizaron a 25 °C en un fluorímetro Perkin Elmer 650-40 con cubetas de cuarzo de 2 mL en tampón 50 mM HEPES-KOH, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂ y 50 μ M CaCl₂ (pH 7,05). Se registró la intensidad de fluorescencia de 10 nM Badan-CaM (longitudes de onda de excitación y de emisión de 385 y 495 nm, respectivamente) en ausencia y presencia de 0,1 y 1 μ M de los iones metálicos y después se tituló la fluorescencia de Badan-CaM con las concentraciones de A β (1-42) indicadas en las figuras de la sección de los resultados de esta tesis doctoral.

Efecto de los agentes quelantes de los cationes metálicos neocuproína, desferoxamina (DFA) y TPEN (N,N,N',N'-tetrakis(2-piridinilmetil)-1,2-etanodiamina) sobre la titulación de la fluorescencia de Badan-CaM con A β (1-42).

Las medidas se realizaron a 25 °C en un fluorímetro Perkin Elmer 650-40 con cubetas de cuarzo de 2 mL en tampón 50 mM HEPES-KOH, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂ y 50 μ M CaCl₂ (pH 7,05). Se registró la intensidad de fluorescencia de 10 nM Badan-CaM (longitudes de onda de excitación y de emisión de 385 y 495 nm, respectivamente) en ausencia y presencia de 10 μ M de los agentes quelantes neocuproína, desferoxamina y TPEN y después se tituló la fluorescencia de Badan-CaM con las concentraciones de A β (1-42) indicadas en las figuras de la sección de los resultados de esta tesis doctoral.

Titulación de la fluorescencia de Badan-CaM con BAPTA (1,2-bis(o-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-ácido tetraacético) en ausencia y presencia de Fe³⁺ o DFA.

Las medidas se realizaron a 25 °C en un fluorímetro Perkin Elmer 650-40 con cubetas de cuarzo de 2 mL. al tampón 50 mM Hepes-KOH, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂ y 50 μM CaCl₂ (pH 7,05). Se registró la intensidad de fluorescencia de 10 nM Badan-CaM (longitudes de onda de excitación y de emisión de 385 y 495 nm, respectivamente) en ausencia y presencia de 1 μM de Fe³⁺ o 10 μM de DFA y después se tituló la fluorescencia de Badan-CaM con las concentraciones de BAPTA indicadas en las figuras de la sección de los resultados de esta tesis doctoral.

Medidas de colocalización y transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET, Fluorescence Resonance Energy Transfer) utilizando microscopía de fluorescencia.

Las imágenes de microscopía de fluorescencia y el análisis de FRET utilizando microscopía de fluorescencia se han realizado como se ha descrito en artículos publicados por nuestro equipo de investigación [Marques-da-Silva *et al.*, 2010; Marques-da-Silva y Gutierrez-Merino, 2014; Poejo *et al.*, 2021a].

Las CGN se lavaron con tampón MLocke-K25 (pH 7,4 a 37 °C), cuya composición es la siguiente: 4 mM NaHCO₃, 10 mM tricina, 5 mM glucosa, 2,3 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 134 mM NaCl y 25 mM KCl. A continuación, las CGN se fijaron en las placas con 2.5% para formaldehído, 3 mM MgCl₂, 2 mM EDTA y 0,32 M sacarosa en PBS (5 mM fosfato sódico, 137 mM NaCl y 27 mM KCl, pH 7). Las células fijadas se bloquearon con 1% de albúmina de suero bovino en PBS suplementado con 0,2% Tritón X-100 (PBST) durante una hora a 37 °C, se lavaron tres veces con PBS y se incubaron durante una hora a 37 °C con el anticuerpo anti-Cb₅R de conejo [anti-DIA1; Protein Tech Group, número de catálogo: 10894-1-AP, dilución 1:100 en PBS]. En los lisados de las CGN hemos confirmado por *western blotting* que este anticuerpo reacciona de manera específica con una proteína con peso molecular ≈33 kDa, que es el peso molecular esperado para la Cb₅R (resultados no mostrados y Marques-da-Silva y Gutierrez-Merino, 2014). Tras la incubación con el anticuerpo anti- Cb₅R las células se lavaron con PBS y se incubaron durante una hora con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo marcado con Alexa488 [Invitrogen, número de

catálogo: A11008, dilución 1:200 en PBST]. Después se lavaron las células con PBS y se colocaron en el microscopio para la adquisición de imágenes de las células marcadas con Alexa488, el fluoróforo donador de FRET.

Las imágenes de fluorescencia de las CGN fueron adquiridas con un tiempo de exposición prefijado (indicado en la leyenda de las figuras) utilizando un filtro de excitación de 470 nm y un espejo dicróico de 510 nm con filtro de emisión de 520 nm (fluorescencia verde = GF) o un espejo dicróico de 580 nm con filtro de emisión de 590 nm (fluorescencia roja = RF). Una vez adquiridas las imágenes del donador FRET, las CGN se incubaron con 100 nM A β (1-42) HiLyte™-Fluor555 (en PBS) durante una hora a 37 °C con agitación suave en la estufa de cultivos (atmósfera humidificada con 5% CO₂) y se volvieron a adquirir imágenes de GF y de RF con las mismas condiciones instrumentales utilizadas previamente, para adquirir las imágenes de microscopía de fluorescencia de las células teñidas solo con el donador (anticuerpo secundario marcado con Alexa488). La contribución de la autofluorescencia de las CGN y de la unión inespecífica del anticuerpo secundario conjugado con Alexa488, en ausencia del anticuerpo primario anti-Cb₅R de conejo, se ha evaluado en placas control adicionales y hemos encontrado que es menor del 10% de la intensidad de fluorescencia promedio por pixel obtenida en la tinción con el anticuerpo primario y se han sustraído como señal de fondo para calcular la relación RF/GF de los somas neuronales de las CGN. Puesto que el espectro de absorción del A β (1-42) HiLyte™-Fluor555 es muy similar al de la molécula fluorescente Cy3, la existencia de una eficiencia de FRET significativa entre el secundario fluorescente conjugado con Alexa488 y el A β (1-42) HiLyte™-Fluor555 implica una separación menor de 40 nm entre el donador (Alexa488) y el aceptor (HiLyte™-Fluor555), como se deriva del análisis metodológico realizado en los siguientes artículos de nuestro equipo de investigación [Marques-da-Silva *et al.*, 2010; Marques-da-Silva y Gutierrez-Merino, 2014; Poejo *et al.*, 2021a].

El análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia promedio por pixel de somas neuronales ha sido realizado utilizando la herramienta ROI del software HCLImage, tal y como se describe en los artículos publicados citados en el párrafo anterior de nuestro equipo de investigación. Los resultados mostrados son los valores medios \pm error estándar de la intensidad de fluorescencia por

pixel en somas de las CGN obtenidos en experimentos realizados por triplicado (n>100 somas en cada caso).

Titulaciones de la actividad de reducción de Cb₅ dependiente de NADH por la Cb₅R con Aβ(1-42) y Aβ(25-35).

Las medidas se llevaron a cabo a 25 °C en un espectrofotómetro Shimatzu UV1800 o UVMini1240, a una longitud de onda de 550 nm en tampón 20 mM de fosfato más 0,1 mM de DPTA (pH 7), con una concentración de Cb₅R de 0,11 µg/ml y una concentración de Cb₅ de 5 µM, en ausencia y presencia de las concentraciones de Aβ(1-42) o Aβ(25-35) indicadas en las figuras de los resultados de esta tesis doctoral. Tras una incubación de 10 minutos de la Cb₅R en el tampón de ensayo, la reacción se disparó con 0,25 mM de NADH. La actividad de reducción del Cb₅ se calculó a partir de las medidas de absorbancia a 550 nm utilizando un coeficiente de extinción diferencial entre las formas reducida y oxidada de 16,5 mM⁻¹·cm⁻¹, como en [Samhan-Arias *et al.*, 2017; Gómez-Tabales *et al.*, 2020].

Titulaciones de la actividad NADH:ferricianuro reductasa de Cb₅R recombinante humana con la concentración de Aβ(1-42).

Las medidas se realizaron a 25 °C en un espectrofotómetro Shimatzu UV1800 o UVMini1240 a una longitud de onda de 420 nm y usando tampón 20 mM fosfato más 0,1 mM de DPTA (pH 7), suplementado con ferricianuro de potasio (1 mM) y con una concentración de Cb₅R humana recombinante soluble de 0,06 µg/ml, en ausencia y presencia de las concentraciones de Aβ(1-42) indicadas en las figuras de los resultados de esta tesis doctoral. Tras una incubación de 10 minutos de la Cb₅R en el tampón de ensayo, la reacción se disparó con 0,25 mM de NADH. La actividad de reducción del ferricianuro se calculó utilizando un coeficiente de extinción a 420nm de 1 mM⁻¹·cm⁻¹, como en [Samhan-Arias y Gutierrez-Merino, 2014].

Medidas de la actividad de la nNOS.

Para medir el efecto del péptido A β (1-42) sobre la nNOS se ha utilizado la nNOS recombinante humana, suministrada por SIGMA con una actividad indicada en el bote de muestra entre 350 y 450 unidades/mg de proteína. Esta actividad se ha medido a 37 °C en ausencia y en presencia de las diferentes concentraciones del péptido A β (1-42) indicadas en los resultados de esta tesis doctoral utilizando los dos métodos que se describen a continuación.

1. Método de la hemoglobina [Hevel y Marletta, 1994; Lowe *et al.*, 1996]. Las medidas de velocidad inicial se han obtenido a partir de los registros cinéticos de la absorbancia a 404 nm en función del tiempo tras la adición de NADPH.

Medio de ensayo: tampón MOPS 50 mM (pH 7,2) suplementado con HbO₂ (10 μ M), CaCl₂ (1 mM), Zn(Ac)₂ (5 μ M), FAD (5 μ M), FMN (5 μ M), H₄B (5 μ M), L-arginina (0,1 mM), BSA (0,1 mg/mL), CaM (0,1 μ M), SOD (5 U/mL), nNOS recombinante humana (0,5 U/mL) y NADPH (0,23 mM).

2. Medida de la actividad NADPH-oxidasa. Las medidas de velocidad inicial se han obtenido a partir de los registros cinéticos de la absorbancia a 340 nm en función del tiempo tras la adición de NADPH.

Medio de ensayo: tampón MOPS 50 mM (pH 7,2) suplementado con CaCl₂ (1 mM), Zn(Ac)₂ (5 μ M), FAD (5 μ M), FMN (5 μ M), H₄B (5 μ M), L-arginina (0,1 mM), BSA (0,1 mg/mL), CaM (0,1 μ M y 0,5 μ M), nNOS recombinante humana (0,5 U/mL) y NADPH (0,23 mM).

Análisis estadístico

Los resultados de esta tesis doctoral se dan como valores promedio \pm error estándar de los resultados obtenidos en experimentos realizados por triplicado. Cuando se indica,

las diferencias de valores se ha considerado significativa si $p < 0,05$ utilizando la prueba t de Student. Diferencias que dieron valores de $p \geq 0,05$ se han considerado no significativas.

6. Conclusiones

1. El péptido A β (1-42) forma complejos estables con la CaM y la calbindina-D28k a concentraciones nanomolares de A β (1-42), aunque en neuronas que expresan ambas proteínas la CaM es más potente que la calbindina-D28k como agente atrapante de concentraciones nanomolares del péptido A β (1-42).
2. En esta tesis doctoral se ha desarrollado un nuevo método de fluorescencia para medir la cinética de formación de complejos entre concentraciones nanomolares del péptido A β (1-42) y de proteínas. Este método se ha aplicado para medir la formación de complejos de este péptido con la CaM y la calbindina-D28k.
3. La velocidad de disociación del péptido A β (1-42) de estos complejos es muy lenta en comparación con la velocidad y frecuencia de los eventos moleculares asociados a la actividad sináptica repetitiva de los procesos de facilitación sináptica, que median los procesos de aprendizaje en el sistema nervioso central. Por tanto, los resultados sugieren que los complejos A β (1-42):CaM y A β (1-42):calbindina-D28k probablemente están implicados en un número significativo de las alteraciones sinápticas reportadas para el péptido A β (1-42).
4. Se ha diseñado un péptido, VFAFAMAFML (con el aminoácido COOH-terminal amidado), que a concentraciones submicromolares no citotóxicas para la línea neuronal HT-22 es un potente inhibidor de la formación de los complejos A β (1-42):CaM y A β (1-42):calbindina-D28k.
5. La hexa-histidina ha sido otro péptido identificado en esta tesis que une al péptido A β (1-42) antagonizando la formación de los complejos A β (1-42):CaM y A β (1-42):calbindina-D28k y que, unida al aminoácido NH₂-terminal de la isoforma soluble de la Cb₅R humana recombinante, potencia la interacción de esta enzima con péptidos β -amiloide.
6. Hemos demostrado que los resultados de análisis de *docking* entre péptidos β -amiloide y las proteínas estudiadas en esta tesis doctoral deben ser contrastados experimentalmente, ya que los parámetros más frecuentemente

utilizados para la selección de las simulaciones *in silico*, energía libre y densidad de agrupaciones, no generan predicciones suficientemente fiables.

7. Concentraciones submicromolares del ión Fe^{3+} tienen efectos sobre la cinética de formación del complejo $\text{A}\beta(1-42):\text{CaM}$, pero no alteran significativamente la afinidad del péptido $\text{A}\beta(1-42)$ hacia la CaM.

8. Los iones Fe^{3+} afectan directamente a las interacciones entre el péptido $\text{A}\beta(1-42)$ y la CaM, e indirectamente por su efecto sobre la afinidad de la CaM por los iones Ca^{2+} .

9. Trifluoperazina y el compuesto 48-80, antagonistas de la CaM, potencian la formación del complejo $\text{A}\beta(1-42):\text{CaM}$, por lo que son de uso potencial como herramienta metodológica para evaluar efectos de la formación de complejo $\text{A}\beta(1-42):\text{CaM}$ en cultivos celulares

10. La elevación de la producción de óxido nítrico reportada en la neurodegeneración cerebral en Alzheimer no es una consecuencia de la modulación de la actividad de la nNOS por interacción con el péptido $\text{A}\beta(1-42)$.

7. Publicaciones

Durante el periodo de matrícula en el programa de doctorado he participado como co-autor en las publicaciones que se relacionan a continuación por orden de mayor a menor relación con el contenido de esta tesis doctoral:

1. **Salazar J**, Poejo J, Mata AM, Samhan-Arias AK, Gutierrez-Merino C. (2022) Design and Experimental Evaluation of a Peptide Antagonist against Amyloid β (1–42) Interactions with Calmodulin and Calbindin-D28k. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 2289, doi: 10.3390/ijms23042289. Revista con índice de impacto (2021-último publicado) **6,208** indexada en el primer cuartil (**Q1**) del campo: Biochemistry and Molecular Biology del JCR.
2. Poejo J, **Salazar J**, Mata AM, Gutierrez-Merino C. (2021) The Relevance of Amyloid β -Calmodulin Complexation in Neurons and Brain Degeneration in Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 4976, doi: 10.3390/ijms22094976. Revista con índice de impacto (2021) **6,208** indexada en el primer cuartil (**Q1**) del campo: Biochemistry and Molecular Biology del JCR.
3. Poejo J, **Salazar J**, Mata AM, Gutierrez-Merino C. (2021) Binding of Amyloid β (1-42)-Calmodulin Complexes to Plasma Membrane Lipid Rafts in Cerebellar Granule Neurons Alters Resting Cytosolic Calcium Homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 1984, doi:10.3390/ijms22041984. Revista con índice de impacto (2021) **6,208** indexada en el primer cuartil (**Q1**) del campo: Biochemistry and Molecular Biology del JCR.
4. Lopez-Sanchez C, Garcia-Martinez V, Poejo J, Garcia-Lopez V, **Salazar J**, Gutierrez-Merino C. (2020) Early Reactive A1 Astrocytes Induction by the Neurotoxin 3-Nitropropionic Acid in Rat Brain. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 3609; doi:10.3390/ijms21103609. Revista con índice de impacto (2020) **5,924** indexada en el primer cuartil (**Q1**) del campo: Biochemistry and Molecular Biology del JCR.
5. Lopez-Sanchez* C, Poejo* J, Garcia-Lopez V, **Salazar J**, Garcia-Martinez V, Gutierrez-Merino C. (2022) (*Primeros autores) Kaempferol prevents the activation of complement C3 protein and the generation of reactive A1 astrocytes that mediate rat brain degeneration induced by 3-nitropropionic acid. *Food and Chemical Toxicology* 164, 113017, doi: 10.1016/j.fct.2022.113017. Revista con índice de impacto (2021-último publicado) **5,572** indexada en el primer cuartil (**Q1**) de los campos: Toxicology y Food Science and Technology del JCR.

Se encuentran en preparación dos artículos más (primer autor: Jairo Salazar) derivados del contenido de esta tesis.

8. Referencias

1. Abouraya M, Sacco JC, Kahl BS, Trepanier LA. Evaluation of sulfonamide detoxification pathways in haematologic malignancy patients prior to intermittent trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis. *Br J Clin Pharmacol.* 2011 Apr;71(4):566-74. doi: 10.1111/j.1365-2125.2010.03889.x. PMID: 21204907; PMCID: PMC3080645.
2. Ahmadian, S.S.; Rezvanian, A.; Peterson, M.; Weintraub, S.; Bigio, E.H.; Mesulam, M.M.; Geula, C. Loss of calbindin-D28K is associated with the full range of tangle pathology within basal forebrain cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **2015**, 36, 3163–3170.
3. Akerfeldt KS, Coyne AN, Wilk RR, Thulin E, Linse S. Ca²⁺-binding stoichiometry of calbindin D28k as assessed by spectroscopic analyses of synthetic peptide fragments. *Biochemistry.* 1996 Mar 26;35(12):3662-9. doi: 10.1021/bi9527956. PMID: 8619985.
4. Ali, F.; Baringer, S.L.; Neal, A.; Cho, E.Y.; Kwan, A.C. Parvalbumin-Positive Neuron Loss and Amyloid- Deposits in the Frontal Cortex of Alzheimer's Disease-Related Mice. *J. Alzheimer's Dis.* **2019**, 1–17.
5. Altamura S, Muckenthaler MU. Iron toxicity in diseases of aging: Alzheimer's disease, Parkinson's disease and atherosclerosis. *J Alzheimers Dis.* 2009; 16:879–95. [PubMed: 19387120]
6. Alzheimer's Association Calcium Hypothesis Workgroup; Khachaturian, Z.S. Calcium hypothesis of Alzheimer's disease and brain aging: A framework for integrating new evidence into a comprehensive theory of pathogenesis. *Alzheimer's Dement.* **2017**, 13, 178–182.e17
7. Ames, A., III. CNS energy metabolism as related to function. *Brain Res. Rev.* **2000**, 34, 42–68.
8. Antharam V, Collingwood JF, Bullivant JP, et al. High field magnetic resonance microscopy of the human hippocampus in Alzheimer's disease: quantitative imaging and correlation with iron. *Neuroimage.* 2012; 59:1249–60. [PubMed: 21867761]
9. Aquino D, Bizzi A, Grisoli M, et al. Age-related iron deposition in the basal ganglia: quantitative analysis in healthy subjects. *Radiology.* 2009; 252:165–72. [PubMed: 19561255]
10. Area-Gomez, E.; de Groof, A.J.; Boldogh, I.; Bird, T.D.; Gibson, G.E.; Koehler, C.M.; Yu, W.H.; Du, K.E.; Ya, M.P.; Pon, L.A.; et al. Presenilins are enriched in endoplasmic reticulum membranes associated with mitochondria. *Am. J. Pathol.* **2009**, 175, 1810–1816.
11. Area-Gomez, E.; Del Camen Lara Castillo, M.; Tambini, M.D.; Guardia-Laguarta, C.; De Groof, A.J.; Madra, M.; Ikenouchi, J.; Umeda, M.; Bird, T.D.; Sturley, S.; et al. Upregulated function of mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease. *EMBO J.* **2012**, 31, 4106–4123.
12. Arnold DB, Heintz N. A calcium responsive element that regulates expression of two calcium binding proteins in Purkinje cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Aug 5;94(16):8842-7. doi: 10.1073/pnas.94.16.8842. PMID: 9238065; PMCID: PMC23159.
13. Atwood, C.S., Scarpa, R.C., Huang, X., Moir, R.D., Jones, W.D., Fairlie, D.P., Tanzi, R.E., Bush, A.I. (2000) Characterization of copper

- interactions with Alzheimer amyloid beta peptides: identification of an attomolar affinity copper binding site on amyloid beta1–42, *J. Neurochem.* **75**, 1219–1233.
14. Bach, M.E.; Hawkins, R.D.; Osman, M.; Kandel, E.R.; Mayford, M. Impairment of spatial but not contextual memory in CaMKII mutant mice with a selective loss of hippocampal Itp in the range of the θ frequency. *Cell* **1995**, *81*, 905–915, doi:10.1016/0092-8674(95)90010-1.
 15. Balaban, R.S. The role of Ca²⁺ signaling in the coordination of mitochondrial ATP production with cardiac work. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Bioenerg.* **2009**, 1787, 1334–1341.
 16. Barcomb, K.; Hell, J.W.; Benke, T.A.; Bayer, K.U. The CaMKII/GluN2B Protein Interaction Maintains Synaptic Strength. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 16082–16089, doi:10.1074/jbc.M116.734822.
 17. Bartzokis G, Tishler TA, Lu PH, et al. Brain ferritin iron may influence age- and gender-related risks of neurodegeneration. *Neurobiol Aging.* **2007**; *28*:414–23. [PubMed: 16563566]
 18. Bartzokis G, Lu PH, Tingus K, et al. Gender and iron genes may modify associations between brain iron and memory in healthy aging. *Neuropsychopharmacology.* **2011**; *36*:1375–84. [PubMed: 21389980]
 19. Baumgärtel, K.; Mansuy, I.M. Neural functions of calcineurin in synaptic plasticity and memory. *Learn. Mem.* **2012**, *19*, 375–384, doi:10.1101/lm.027201.112.
 20. Baughman, J.M.; Perocchi, F.; Girgis, H.S.; Plovanich, M.; Belcher-Trimme, C.A.; Sancak, Y.; Bao, X.; Strittmatter, L.; Goldberger, O.; Bogorad, R.L.; et al. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* **2011**, *476*, 341–345.
 21. Bayer, K.U.; Schulman, H. CaM Kinase: Still Inspiring at 40. *Neuron* **2019**, *103*, 380–394, doi:10.1016/j.neuron.2019.05.033.
 22. Bellido T, Huening M, Raval-Pandya M, Manolagas SC, Christakos S. Calbindin-D28k is expressed in osteoblastic cells and suppresses their apoptosis by inhibiting caspase-3 activity. *J Biol Chem.* **2000 Aug 25**; *275*(34):26328-32. doi: 10.1074/jbc.M003600200. PMID: 10835428.
 23. Berberich, S.; Punnakkal, P.; Jensen, V.; Pawlak, V.; Seeburg, P.H.; Hvalby, Ø.; Köhr, G. Lack of NMDA Receptor Subtype Selectivity for Hippocampal Long-Term Potentiation. *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 6907–6910, doi:10.1523/jneurosci.1905-05.2005.
 24. Berchtold MW, Villalobo A. The many faces of calmodulin in cell proliferation, programmed cell death, autophagy, and cancer. *Biochim Biophys Acta.* **2014 Feb**; *1843*(2):398-435. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.10.021. Epub 2013 Nov 2. PMID: 24188867.
 25. Berggård T, Miron S, Onnerfjord P, Thulin E, Akerfeldt KS, Enghild JJ, Akke M, Linse S. Calbindin D28k exhibits properties characteristic of a Ca²⁺ sensor. *J Biol Chem.* **2002 May 10**; *277*(19):16662-72. doi: 10.1074/jbc.M200415200. Epub 2002 Feb 28. PMID: 11872749.
 26. Berggård T, Silow M, Thulin E, Linse S. Ca²⁺- and H⁺-dependent conformational changes of calbindin D(28k). *Biochemistry.* **2000 Jun 13**; *39*(23):6864-73. doi: 10.1021/bi992394g. PMID: 10841767.

27. Berggard T, Szczepankiewicz O, Thulin E, Linse S. Myo-inositol monophosphatase is an activated target of calbindin D28k. *J Biol Chem.* 2002 Nov 1;277(44):41954-9. doi: 10.1074/jbc.M203492200. Epub 2002 Aug 9. PMID: 12176979.
28. Berger, S.M.; Bartsch, D. The role of L-type voltage-gated calcium channels Cav1.2 and Cav1.3 in normal and pathological brain function. *Cell Tissue Res.* **2014**, *357*, 463–476, doi:10.1007/s00441-014-1936-3.
29. Berridge, M.J. Calcium Signalling and Alzheimer's Disease. *Neurochem Res.* **2011**, *36*, 1149–1156.
30. Berridge, M.J. Neuronal Calcium Signaling. *Neuron* **1998**, *21*, 13–26, doi:10.1016/s0896-6273(00)80510-3.
31. Biber A, Schmid G, Hempel K. Calmodulin content in specific brain areas. *Exp Brain Res.* 1984;56(2):323-6. doi: 10.1007/BF00236287. PMID: 6479265.
32. Bilgic B, Pfefferbaum A, Rohlfing T, Sullivan EV, Adalsteinsson E. MRI estimates of brain iron concentration in normal aging using quantitative susceptibility mapping. *Neuroimage.* 2012; 59:2625–35. [PubMed: 21925274]
33. Birnbaum, J.; Bali, J.; Rajendran, L.; Nitsch, R.M.; Tackenberg, C. Calcium flux-independent NMDA receptor activity is required for A_β oligomer-induced synaptic loss. *Cell Death Dis.* **2015**, *6*, e1791. [CrossRef] [PubMed]
34. Bobay BG, Stewart AL, Tucker AT, Thompson RJ, Varney KM, Cavanagh J. Structural insights into the calcium-dependent interaction between calbindin-D28K and caspase-3. *FEBS Lett.* 2012 Oct 19;586(20):3582-9. doi: 10.1016/j.febslet.2012.08.032. Epub 2012 Sep 13. PMID: 22982862.
35. Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci.* 2007; 8:57–69. [PubMed: 17180163]
36. Bojarski L, Herms J, Kuznicki J. Calcium dysregulation in Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 2008 Mar-Apr;52(4-5):621-33. doi: 10.1016/j.neuint.2007.10.002. Epub 2007 Oct 5. PMID: 18035450.
37. Boyman, L.; Williams, G.S.; Khananshvil, D.; Sekler, I.; Lederer, W.J. NCLX: The mitochondrial sodium calcium exchanger. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2013**, *59*, 205–213.
38. Briggs, C.A.; Chakroborty, S.; Stutzmann, G.E. Emerging pathways driving early synaptic pathology in Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *483*, 988–997.
39. Braunevel KH, Gundelfinger ED. Intracellular neuronal calcium sensor proteins: a family of EF-hand calcium-binding proteins in search of a function. *Cell Tissue Res.* 1999 Jan;295(1):1-12. doi: 10.1007/s004410051207. PMID: 9931348.
40. Brini, M.; Cali, T.; Ottolini, D.; Carafoli, E. Neuronal calcium signaling: Function and dysfunction. *Cell. Mol. Life Sci.* **2014**, *71*, 2787–2814.
41. Brini, M.; Carafoli, E. Calcium Pumps in Health and Disease. *Physiol. Rev.* **2009**, *89*, 1341–1378, doi:10.1152/physrev.00032.2008.
42. Brouillet, E.; Jacquard, C.; Bizat, N.; Blum, D. (2005) 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms

- underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *J. Neurochem.* 95, 1521-1540.
43. Brunelle P, Rauk A. The radical model of Alzheimer's disease: specific recognition of Gly29 and Gly33 by Met35 in a beta-sheet model of Abeta: an ONIOM study. *J Alzheimers Dis.* 2002 Aug;4(4):283-9. doi: 10.3233/jad-2002-4403. PMID: 12446930.
 44. Butterfield D. A., Alzheimer's b-Amyloid Peptide and Free Radical Oxidative Stress, in *Reactive Oxygen Species in Biological Systems*, ed. D. L. Gilbert and C. A. Colton, Kluwer Academic/Plenum, New York, 1999, pp. 609–638.
 45. Calvo-Rodriguez, M.; Hou, S.H.; Synder, A.C.; Kharitonova, E.K.; Russ, A.N.; Das, S.; Fan, Z.; Muzikansky, A.; Gracia-Alloza, M.; Serrano-Pozo, A.; et al. Increased mitochondrial calcium levels associated with neuronal death in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat. Commun.* **2020**, 11, 1–17.
 46. Carafoli, E. The fateful encounter of mitochondria with calcium: How did it happen? *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Bioenerg.* **2010**, 1797, 595–606.
 47. Catalá A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem Phys Lipids.* 2009; 157:1–11. [PubMed: 18977338]
 48. Cenini, G.; Voos, W. Mitochondria as potential targets in Alzheimer disease therapy: An update. *Front. Pharmacol.* **2019**, 10, 902.
 49. Centeno F, Gutierrez-Merino C (1992) Location of functional centers in the microsomal cytochrome P450 system. *Biochemistry* 31:8473–8481.
 50. Chan, S.L.; Mayne, M.; Holden, C.P.; Geiger, J.D.; Mattson, M.P. Presenilin-1 mutations increase levels of ryanodine receptors and calcium release in PC12 cells and cortical neurons. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 18195–18200.
 51. Chen, J.; Tu, Y.; Moon, C.; Matarazzo, V.; Palmer, A.M.; Ronnett, G.V. The localization of neuronal nitric oxide synthase may influence its role in neuronal precursor proliferation and synaptic maintenance. *Dev. Biol.* **2004**, 269, 165–182, doi:10.1016/j.ydbio. 2004.01.024.
 52. Cheung WY. Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science.* 1980 Jan 4;207(4426):19-27. doi: 10.1126/science.6243188. PMID: 6243188.
 53. Cheung, K.-H.; Shineman, D.; Muller, M.; Cardenas, C.; Mei, L.; Yang, J.; Tomita, T.; Iwatsubo, T.; Lee, V.M.; Foskett, J.K. Mechanism of Ca²⁺ disruption in Alzheimer's disease by presenilin regulation of InsP₃ receptor channel gating. *Neuron* **2008**, 58, 871–883.
 54. Cheung, K.-H.; Mei, L.; Mak, D.O.; Hayashi, I.; Iwatsubo, T.; Kang, D.E.; Foskett, J.K. Gain-of-function enhancement of IP₃ receptor modal gating by familial Alzheimer's disease–linked presenilin mutants in human cells and mouse neurons. *Sci. Signal.* **2010**, 3, ra22.
 55. Christakos S, Gabrielides C, Rhoten WB. Vitamin D-dependent calcium binding proteins: chemistry, distribution, functional considerations, and molecular biology. *Endocr Rev.* 1989 Feb;10(1):3-26. doi: 10.1210/edrv-10-1-3. PMID: 2666110.

56. Ciccotosto GD, Tew D, Curtain CC, Smith D, Carrington D, Masters CL, Bush AI, Cherny RA, Cappai R, Barnham KJ. Enhanced toxicity and cellular binding of a modified amyloid beta peptide with a methionine to valine substitution. *J Biol Chem*. 2004 Oct 8;279(41):42528-34. doi: 10.1074/jbc.M406465200. Epub 2004 Jul 28. PMID: 15292164.
57. Chin, D.; Means, A.R. Calmodulin: A prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol*. **2000**, *10*, 322–328, doi:10.1016/s0962-8924(00)01800-6.
58. Cohen E, Bieschke J, Perciavalle RM, Kelly JW, Dillin A. Opposing activities protect against age-onset proteotoxicity. *Science*. 2006 Sep 15;313(5793):1604-10. doi: 10.1126/science.1124646. Epub 2006 Aug 10. PMID: 16902091.
59. Conde JR, Streit WJ. Microglia in the aging brain. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006; 65:199–203. [PubMed: 16651881]
60. Connor JR, Menzies SL. Relationship of iron to oligodendrocytes and myelination. *Glia*. 1996; 17:83–93. [PubMed: 8776576]
61. Connor JR, Menzies SL. Cellular management of iron in the brain. *J Neurol Sci*. 1995; 134(suppl): 33–44.
62. Conti, A.C.; Maas, J.W.; Muglia, L.M.; Dave, B.A.; Vogt, S.K.; Tran, T.T.; Rayhel, E.J.; Muglia, L.J. Distinct regional and subcellular localization of adenylyl cyclases type 1 and 8 in mouse brain. *Neuroscience* **2007**, *146*, 713–729.
63. Corbacho I, Berrocal M, Török K, Mata AM, Gutierrez-Merino C. High affinity binding of amyloid β -peptide to calmodulin: Structural and functional implications. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 May 13;486(4):992-997. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.03.151. Epub 2017 Mar 29. PMID: 28363865.
64. Cornett CR, Markesbery WR, Ehmann WD. Imbalances of trace elements related to oxidative damage in Alzheimer's disease brain. *Neurotoxicology*. 1998 Jun;19(3):339-45. PMID: 9621340.
65. Coultrap, S.J.; Bayer, K.U. CaMKII regulation in information processing and storage. *Trends Neurosci*. **2012**, *35*, 607–618, doi:10.1016/j.tins.2012.05.003.
66. Crichton, RR., Ward, RJ. Metal based neurodegeneration: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. 2. Chichester: J Wiley & Sons; 2014.
67. Crivic, A.; Ikura, M. Molecular and structural basis of target recognition by calmodulin. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1995**, *24*, 85–116.
68. Cuajungco MP, Goldstein LE, Nunomura A, Smith MA, Lim JT, Atwood CS, Huang X, Farrag YW, Perry G, Bush AI. Evidence that the beta-amyloid plaques of Alzheimer's disease represent the redox-silencing and entombment of abeta by zinc. *J Biol Chem*. 2000 Jun 30;275(26):19439-42. doi: 10.1074/jbc.C000165200. PMID: 10801774.
69. Daigle, I.; Li, C. Apl-1, a Caenorhabditis elegans gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 12045–12049.
70. Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med*. 2003; 9:169–76. [PubMed: 12727143]
71. Deane R, Du Yan S, Subramanian RK, LaRue B, Jovanovic S, Hogg E, Welch D, Manness L, Lin C, Yu J, Zhu H, Ghiso J, Frangione B, Stern A,

- Schmidt AM, Armstrong DL, Arnold B, Liliensiek B, Nawroth P, Hofman F, Kindy M, Stern D, Zlokovic B. RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med.* 2003 Jul;9(7):907-13. doi: 10.1038/nm890. PMID: 12808450.
72. Denton, R.M. Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Bioenerg.* **2009**, 1787, 1309–1316.
73. Del Prete, D.; Suski, J.M.; Oules, B.; Debayle, D.; Gay, A.S.; Lacas-Gervais, S.; Bussiere, R.; Bauer, C.; Pinton, P.; Paterlini-Brechot, P.; et al. Localization and processing of the amyloid- β protein precursor in mitochondria-associated membranes. *J. Alzheimer's Dis.* **2017**, 55, 1549–1570.
74. De Stefani, D.; Ra_ aello, A.; Teardo, E.; Szabo, I.; Rizzuto, R. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* **2011**, 476, 336–340.
75. Di Monte DA, Schipper HM, Hetts S, Langston JW. Iron-mediated bioactivation of 1-methyl-4- phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in glial cultures. *Glia.* 1995; 15:203–06. [PubMed: 8567072]
76. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell.* 2012; 149:1060–72. [PubMed: 22632970]
77. Du, L., Zhao, Z., Cui, A., Zhu, Y., Zhang, L., Liu, J., et al. (2018). Increased iron deposition on brain quantitative susceptibility mapping correlates with decreased cognitive function in Alzheimer's disease. *ACS Chem. Neurosci.* 9, 1849–1857. doi: 10.1021/acscchemneuro.8b00194.
78. Duce JA, Tsatsanis A, Cater MA, et al. Iron-export ferroxidase activity of β -amyloid precursor protein is inhibited by zinc in Alzheimer's disease. *Cell.* 2010; 142:857–67. [PubMed: 20817278]
79. Dunning CJ, McGauran G, Willén K, Gouras GK, O'Connell DJ, Linse S. Direct High Affinity Interaction between A β 42 and GSK3 α Stimulates Hyperphosphorylation of Tau. A New Molecular Link in Alzheimer's Disease? *ACS Chem Neurosci.* 2016 Feb 17;7(2):161-70. doi: 10.1021/acscchemneuro.5b00262. Epub 2015 Dec 15. PMID: 26618561; PMCID: PMC4759616.
80. Ebrahimi KH, Hagedoorn PL, Hagen WR. A synthetic peptide with the putative iron binding motif of amyloid precursor protein (APP) does not catalytically oxidize iron. *PLoS One.* 2012; 7:e40287. [PubMed: 22916096]
81. Ehlers, M.D.; Zhang, S.; Bernhardt, J.P.; Huganir, R.L. Inactivation of NMDA Receptors by Direct Interaction of Calmodulin with the NR1 Subunit. *Cell* **1996**, 84, 745–755, doi:10.1016/s0092-8674(00)81052-1.
82. Elgersma, Y.; Sweatt, J.D.; Giese, K.P. Mouse Genetic Approaches to Investigating Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Function in Plasticity and Cognition. *J. Neurosci.* **2004**, 24, 8410–8415, doi:10.1523/JNEUROSCI.3622-04.2004.
83. Emilsson, L.; Saetre, P.; Jazin, E. Alzheimer's disease: mRNA expression profiles of multiple patients show alterations of genes involved with calcium signaling. *Neurobiol. Dis.* **2006**, 21, 618–625.
84. Erondy, N.E.; Kennedy, M.B. Regional distribution of type II Ca $^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase in rat brain. *J. Neurosci.* **1985**, 5, 3270–3277, doi:10.1523/jneurosci.05-12-03270.1985.

86. Etcheberrigaray, R.; Hirashima, N.; Nee, L.; Prince, J.; Govoni, S.; Racchi, M.; Tanzi, R.E.; Alkon, D.L. Calcium responses in fibroblasts from asymptomatic members of Alzheimer's disease families. *Neurobiol. Dis.* **1998**, *5*, 37–45.
87. Exley C. Aluminum and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2001 Dec;3(6):551-552. doi: 10.3233/jad-2001-3605. PMID: 12214021.
88. Fakhoury M. (2018) Microglia and Astrocytes in Alzheimer's Disease: Implications for Therapy. *Curr. Neuropharmacol.* *16*:508-518.
89. Falangola MF, Lee SP, Nixon RA, Duff K, Helpert JA. Histological colocalization of iron in Abeta plaques of PS/APP transgenic mice. *Neurochem Res.* 2005; *30*:201–05. [PubMed: 15895823]
90. Faller, P., Hureau, C. (2012) A Bioinorganic View of Alzheimer's Disease: When Misplaced Metal Ions (Re)direct the Electrons to the Wrong Target. *Chem.–Eur. J.*, 2012, *18*, 15910–15920. <https://doi.org/10.1002/chem.201202697>
91. Fan, M.; Zhang, J.; Tsai, C.-W.; Orlando, B.J.; Rodriguez, M.; Xu, Y.; Liao, M.; Tsao, M.-F.; Feng, L. Structure and mechanism of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter holocomplex. *Nature* **2020**, *582*, 1–5.
92. Farrall AJ, Wardlaw JM. Blood-brain barrier: ageing and microvascular disease--systematic review and meta-analysis. *Neurobiol Aging.* 2009; *30*:337–52. [PubMed: 17869382]
93. Ferreira, I.L.; Ferreira, E.; Schmidt, J.; Cardoso, J.M.; Pereira, C.M.; Carvalho, A.L.; Oliveira, C.R.; Rego, A.C. A_β and NMDAR activation cause mitochondrial dysfunction involving ER calcium release. *Neurobiol. Aging*, **2015**, *36*, 680–692.
94. Fortalezas S, Poejo J, Samhan-Arias AK, Gutierrez-Merino C (2019) Cholesterol-rich plasma membrane submicrodomains can be a major extramitochondrial source of reactive oxygen species in partially depolarized mature cerebellar granule neurons in culture. *J Neurophysiol and Neurol Disord* *5*:1-22.
95. Fox, C.J.; Russell, K.I.; Wang, Y.T.; Christie, B.R. Contribution of NR2A and NR2B NMDA subunits to bidirectional synaptic plasticity in the hippocampus in vivo. *Hippocampus* **2006**, *16*, 907–915, doi:10.1002/hipo.20230.
96. Frankland, P.W.; O'Brien, C.; Ohno, M.; Kirkwood, A.; Silva, A.J. α-CaMKII-dependent plasticity in the cortex is required for permanent memory. *Nature* **2001**, *411*, 309–313.
97. Fujimoto, M.; Hayashi, T. New insights into the role of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **2011**, *73*–117.
98. Gaggelli E, Kozłowski H, Valensin D, Valensin G. Copper homeostasis and neurodegenerative disorders (Alzheimer's, prion, and Parkinson's diseases and amyotrophic lateral sclerosis). *Chem Rev.* 2006 Jun;106(6):1995-2044. doi: 10.1021/cr040410w. PMID: 16771441.
99. Garcia, M.L.; Strehler, E.E. Plasma membrane calcium ATPases as critical regulators of calcium homeostasis during neuronal cell function. *Front. Biosci.* **1999**, *4*, D869–D882.
100. Goraya, T.A.; Masada, N.; Ciruela, A.; Willoughby, D.; Clynes, M.A.; Cooper, D.M.F. Kinetic properties of Ca²⁺/calmodulin-independent

- phosphodiesterase isoforms dictate intracellular cAMP dynamics in response to elevation of cy-tosolic Ca²⁺. *Cell Signal*. **2008**, *20*, 359–374.
101. Green, K.; Demuro, A.; Akbari, Y.; Hitt, B.D.; Smith, I.F.; Parker, I.; LaFerla, F.M. SERCA pump activity is physiologically regulated by presenilin and regulates amyloid beta production. *J. Cell Biol.* **2008**, *181*, 1107–1116.
 102. Groth, R.D.; Dunbar, R.L.; Mermelstein, P.G. Calcineurin regulation of neuronal plasticity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *311*, 1159–1171, doi:10.1016/j.bbrc.2003.09.002.
 103. Guillemot J, Canuel M, Essalmani R, Prat A, Seidah NG. Implication of the proprotein convertases in iron homeostasis: proprotein convertase 7 sheds human transferrin receptor 1 and furin activates hepcidin. *Hepatology*. 2013; *57*:2514–24. [PubMed: 23390091].
 104. Gutierrez-Merino, C.; Marques-Da-Silva, D.; Fortalezas, S.; Samhan-Arias, A.K. Cytosolic Calcium Homeostasis in Neurons—Control Systems, Modulation by Reactive Oxygen and Nitrogen Species, and Space and Time Fluctuations. In *Neurochemistry*; Heinbockel, T., Ed.; InTech: Rijeka, Croatia, 2014; Chapter 3, pp. 59–110.
 105. Gutierrez-Merino C, Molina A, Escudero B, Diez A, Laynez J (1989) Interaction of local anesthetics with sarcoplasmic reticulum. Differential scanning calorimetry and fluorescence studies. *Biochemistry* *28*:3398-3406.
 106. Hallgren B, Sourander P. The effect of age on the non-haemin iron in the human brain. *J Neurochem.* 1958; *3*:41–51. [PubMed: 13611557]
 43. Ramos P, Santos A, Pinto NR, Mendes R, Magalhães T, Almeida A. Iron levels in the human brain: a post-mortem study of anatomical region differences and age-related changes. *J Trace Elem Med Biol.* 2014; *28*:13–17. [PubMed: 24075790]
 107. Halt, A.R.; Dallapiazza, R.F.; Zhou, Y.; Stein, I.S.; Qian, H.; Juntti, S.; Wojcik, S.; Brose, N.; Silva, A.J.; Hell, J.W. CaMKII binding to GluN2B is critical during memory consolidation. *EMBO J.* **2012**, *31*, 1203–1216, doi:10.1038/emboj.2011.482.
 108. Hammond, J.W.; Cai, D.; Verhey, K.J. Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2008**, *20*, 71–76.
 109. Harris, J.J.; Jolivet, R.; Attwell, D. Synaptic energy use and supply. *Neuron* **2012**, *75*, 762–777.
 110. Hare DJ, Adlard PA, Doble PA, Finkelstein DI. Metallobiology of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine neurotoxicity. *Metallomics.* 2013; *5*:91–109. [PubMed: 23322189]
 111. Harper JD, Wong SS, Lieber CM, Lansbury PT Jr. Assembly of A beta amyloid protofibrils: an in vitro model for a possible early event in Alzheimer's disease. *Biochemistry.* 1999 Jul 13; *38*(28):8972-80. doi: 10.1021/bi9904149. PMID: 10413470.
 112. Hartley DM, Walsh DM, Ye CP, Diehl T, Vasquez S, Vassilev PM, Teplow DB, Selkoe DJ. Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J Neurosci.* 1999 Oct 15; *19*(20):8876-84. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-20-08876.1999. PMID: 10516307; PMCID: PMC6782787.

113. Harwood AJ. Lithium and bipolar mood disorder: the inositol-depletion hypothesis revisited. *Mol Psychiatry*. 2005 Jan;10(1):117-26. doi: 10.1038/sj.mp.4001618. PMID: 15558078.
114. Hebbrecht G, Maenhaut W, De Reuck J. Brain trace elements and aging. *Nucl Instrum Methods Phys Res B*. 1999; 150:208–13. 45. Zecca L, Shima T, Stroppolo A, et al. Interaction of Neuromelanin and iron in substantia nigra and other areas of human brain. *Neuroscience*. 1996; 73:407–15. [PubMed: 8783258]
115. Hedskog, L.; Pinho, C.M.; Filadi, R.; Ronnback, A.; Hertwig, L.; Wiehager, B.; Larssen, P.; Gellhaar, S.; Sandebring, A.; Westerlund, M.; et al. Modulation of the endoplasmic reticulum–mitochondria interface in Alzheimer’s disease and related models. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, 110, 7916–7921.
116. Hell, J.W.; Westenbroek, R.E.; Warner, C.; Ahlijanian, M.K.; Prystay, W.; Gilbert, M.M.; Snutch, T.P.; Catterall, W.A. Identification and differential subcellular localization of the neuronal class C and class D L-type calcium channel $\alpha 1$ subunits. *J. Cell Biol.* **1993**, 123, 949–962.
117. Hevel JM, Marletta MA (1994): Nitric-oxide synthase assays. In *Methods in Enzymology*, Vol. 233. San Diego, CA, Academic Press, pp. 250–258.
118. Holland D, Brewer JB, Hagler DJ, Fennema-Notestine C, Dale AM. and the Alzheimer’s Disease Neuroimaging Initiative. Subregional neuroanatomical change as a biomarker for Alzheimer’s disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106:20954–59. [PubMed: 19996185]
119. Honarmand Ebrahimi K, Dienemann C, Hoefgen S, Than ME, Hagedoorn PL, Hagen WR. The amyloid precursor protein (APP) does not have a ferroxidase site in its E2 domain. *PLoS One*. 2013; 8:e72177. [PubMed: 23977245]
120. Holcomb L, Gordon MN, McGowan E, et al. Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat Med*. 1998; 4:97–100. [PubMed: 9427614]
121. Horowitz MP, Greenamyre JT. Mitochondrial iron metabolism and its role in neurodegeneration. *J Alzheimers Dis*. 2010; 20(suppl 2):S551–68. [PubMed: 20463401]
122. House E, Esiri M, Forster G, Ince PG, Exley C. Aluminium, iron and copper in human brain tissues donated to the Medical Research Council’s Cognitive Function and Ageing Study. *Metallomics*. 2012; 4:56–65. [PubMed: 22045115]
123. House E, Collingwood J, Khan A, Korchazkina O, Berthon G, Exley C. Aluminium, iron, zinc and copper influence the in vitro formation of amyloid fibrils of A β 42 in a manner which may have consequences for metal chelation therapy in Alzheimer’s disease. *J Alzheimers Dis*. 2004 Jun;6(3):291-301. doi: 10.3233/jad-2004-6310. PMID: 15201484.
124. Huang X, Cuajungco MP, Atwood CS, Hartshorn MA, Tyndall JD, Hanson GR, Stokes KC, Leopold M, Multhaup G, Goldstein LE, Scarpa RC, Saunders AJ, Lim J, Moir RD, Glabe C, Bowden EF, Masters CL, Fairlie DP, Tanzi RE, Bush AI. Cu(II) potentiation of alzheimer abeta neurotoxicity. Correlation with cell-free hydrogen peroxide production and

- metal reduction. *J Biol Chem.* 1999 Dec 24;274(52):37111-6. doi: 10.1074/jbc.274.52.37111. PMID: 10601271.
125. Hudmon, A.; Schulman, H. Neuronal Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II: The Role of Structure and Autoregulation in Cellular Function. *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 473–510.
 126. Hui Y, Wang D, Li W, et al. Long-term overexpression of heme oxygenase 1 promotes tau aggregation in mouse brain by inducing tau phosphorylation. *J Alzheimers Dis.* 2011; 26:299–313. [PubMed: 21613741]
 127. Hureau, C. (2012) Coordination of redox active metal ions to the amyloid precursor protein and to amyloid- β peptides involved in Alzheimer disease. Part 1: An overview. *Coord. Chem. Rev.* 256, 2164–2174. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.03.037>.
 128. Ito, E.; Oka, K.; Etcheberrigaray, R.; Nelson, T.J.; McPhie, D.L.; Tofel-Grehl, B.; Gibson, G.E.; Alkon, D.L. Internal Ca²⁺ mobilization is altered in fibroblasts from patients with Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 534–538.
 129. Ivannikov, M.V.; Macleod, G.T. Mitochondrial free Ca²⁺ levels and their effects on energy metabolism in *Drosophila* motor nerve terminals. *Biophys. J.* **2013**, *104*, 2353–2361.
 130. Jack CR Jr, Wengenack TM, Reyes DA, et al. In vivo magnetic resonance microimaging of individual amyloid plaques in Alzheimer's transgenic mice. *J Neurosci.* 2005; 25:10041–48. [PubMed: 16251453]
 131. Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT Jr. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry.* 1993 May 11;32(18):4693-7. doi: 10.1021/bi00069a001. PMID: 8490014.
 132. Johnson WG. Late-onset neurodegenerative diseases--the role of protein insolubility. *J Anat.* 2000 May;196 (Pt 4)(Pt 4):609-16. doi: 10.1046/j.1469-7580.2000.19640609.x. PMID: 10923991; PMCID: PMC1468101.
 133. Jouaville, L.; Pinton, P.; Bastianutto, C.; Rutter, G.A.; Rizzuto, R. Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: Evidence for a long-term metabolic priming. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 13807–13812.
 134. Jurado LA, Chockalingam PS, Jarrett HW. Apocalmodulin. *Physiol Rev.* 1999 Jul;79(3):661-82. doi: 10.1152/physrev.1999.79.3.661. PMID: 10390515.
 135. Kaleka, K.S.; Petersen, A.N.; Florence, M.A.; Gerges, N.Z. Pull-down of Calmodulin-binding Proteins. *J. Vis. Exp.* **2012**, *59*, e3502, doi:10.3791/3502.
 136. Kamer, K.J.; Mootha, V.K. The molecular era of the mitochondrial calcium uniporter. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2015**, *16*, 545–553.
 137. Karr JW, Kaupp LJ, Szalai VA. Amyloid-beta binds Cu²⁺ in a mononuclear metal ion binding site. *J Am Chem Soc.* 2004 Oct 20;126(41):13534-8. doi: 10.1021/ja0488028. PMID: 15479110.
 138. Kawamoto, E.M.; Vivar, C.; Camandola, S. Physiology and pathology of calcium signaling in the brain. *Front. Pharmacol.* **2012**, *3*, 61.

139. Kepp, K.P. (2012) Bioinorganic chemistry of Alzheimer's disease. *Chem. Rev.*, 2012, 112, 5193–5239. doi: 10.1021/cr300009x.
140. Khachaturian, Z.S. Introduction and overview. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1989**, 568, 1–4.
141. Khachaturian, Z.S. Calcium Hypothesis of Alzheimer's Disease and Brain Aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1994**, 747, 1–11.
142. Killilea DW, Wong SL, Cahaya HS, Atamna H, Ames BN. Iron accumulation during cellular senescence. *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1019:365–67. [PubMed: 15247045]
143. Kim, A. C., Lim, S., and Kim, Y. K. (2018). Metal ion effects on A β and tau aggregation. *Int. J. Mol. Sci.* 19:128. doi: 10.3390/ijms19010128.
144. Kim, G.H.; Kim, J.E.; Rhie, S.J.; Yoon, S. The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Exp. Neurobiol.* **2015**, 24, 325.
145. Kinney, J.W., Bemiller, S.M., Murtishaw, A.S., Leisgang, A.M., Salazar, A.M., Lamb, B.T. (2018) Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Intervention*, 4, 575-590.
<https://doi.org/10.1016/j.trci.2018.06.014>.
146. Klee, C.B.; Ren, H.; Wang, X. Regulation of the Calmodulin-stimulated Protein Phosphatase, Calcineurin. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 13367–13370, doi:10.1074/jbc.273.22.13367.
147. Kojetin DJ, Venters RA, Kordys DR, Thompson RJ, Kumar R, Cavanagh J. Structure, binding interface and hydrophobic transitions of Ca²⁺-loaded calbindin-D(28K). *Nat Struct Mol Biol.* 2006 Jul;13(7):641-7. doi: 10.1038/nsmb1112. Epub 2006 Jun 25. PMID: 16799559.
148. Kook SY, Jeong H, Kang MJ, Park R, Shin HJ, Han SH, Son SM, Song H, Baik SH, Moon M, Yi EC, Hwang D, Mook-Jung I. Crucial role of calbindin-D28k in the pathogenesis of Alzheimer's disease mouse model. *Cell Death Differ.* 2014 Oct;21(10):1575-87. doi: 10.1038/cdd.2014.67. Epub 2014 May 23. PMID: 24853300; PMCID: PMC4158683.
149. Kovalevskaya NV, van de Waterbeemd M, Bokhovchuk FM, Bate N, Bindels RJ, Hoenderop JG, Vuister GW. Structural analysis of calmodulin binding to ion channels demonstrates the role of its plasticity in regulation. *Pflugers Arch.* 2013 Nov;465(11):1507-19. doi: 10.1007/s00424-013-1278-0. Epub 2013 Apr 23. PMID: 23609407.
150. Kozakov D, Hall DR, Xia B, Porter KA, Padhorny D, Yueh C, Beglov D, Vajda S. (2017) The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nature Protocols* 12(2):255-278.
151. Kwok JB. Role of epigenetics in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Epigenomics.* 2010; 2:671– 82. [PubMed: 22122050]
152. Kuchibhotla, K.V.; Goldman, S.T.; Lattarulo, C.R.; Wu, H.-Y.; Hyman, B.T.; Bacskai, B.J. A β Plaques Lead to Aberrant Regulation of Calcium Homeostasis In Vivo Resulting in Structural and Functional Disruption of Neuronal Networks. *Neuron* **2008**, 59, 214–225, doi:10.1016/j.neuron.2008.06.008.
153. Kuno, T.; Mukai, H.; Ito, A.; Chang, D.; Kishima, K.; Saito, N.; Tanaka, C. Distinct Cellular Expression of Calcineurin A α and A β in Rat Brain. *J. Neurochem.* **1992**, 58, 1643–1651.
154. Kurcinski, M.; Jamroz, M.; Blaszczyk, M.; Kolinski, A.; Kmiecik, S. (2015) CABS-dock web server for the flexible docking of peptides to

- proteins without prior knowledge of the binding site. *Nucleic Acids Res.* 43, W419eW424.
155. Lackner, L.L.; Voeltz, G.K. The mechanisms and functions of interorganelle interactions. *Mol. Biol. Cell* **2017**, 28, 703–704.
 156. Lacobucci, G.J.; Popescu, G.K. Resident Calmodulin Primes NMDA Receptors for Ca²⁺-Dependent Inactivation. *Biophys. J.* **2017**, 113, 2236–2248, doi:10.1016/j.bpj.2017.06.035.
 157. LaFerla, F.M. Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **2002**, 3, 862–872.
 158. Lagoa, R.; Lopez-Sanchez, C.; Samhan-Arias, A.K.; Gañan, C.M.; Garcia-Martinez, V.; Gutierrez-Merino, C. (2009) Kaempferol protects against rat striatal degeneration induced by 3-nitropropionic acid. *J. Neurochem.* 111, 473-487.
 159. Lahiani-Cohen, I., Touloumi, O., Lagoudaki, R., Grigoriadis, N., Rosenmann, H. (2020) Exposure to 3-Nitropropionic Acid Mitochondrial Toxin Induces Tau Pathology in Tangle-Mouse Model and in Wild Type-Mice. *Front. Cell Dev. Biol.* 7, 321.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00321>
 160. Lambers TT, Mahieu F, Oancea E, Hoofd L, de Lange F, Mensenkamp AR, Voets T, Nilius B, Clapham DE, Hoenderop JG, Bindels RJ. Calbindin-D28K dynamically controls TRPV5-mediated Ca²⁺ transport. *EMBO J.* 2006 Jul 12;25(13):2978-88. doi: 10.1038/sj.emboj.7601186. Epub 2006 Jun 8. PMID: 16763551; PMCID: PMC1500989.
 161. Lashuel, H.A.; Hartley, D.; Petre, B.M.; Walz, T.; Lansbuty, P.T., Jr. Neurodegenerative disease: Amyloid pores from pathogenic mutations. *Nature* **2002**, 418, 291.
 162. Laurén J, Gimbel DA, Nygaard HB, Gilbert JW, Strittmatter SM. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature.* 2009 Feb 26;457(7233):1128-32. doi: 10.1038/nature07761. PMID: 19242475; PMCID: PMC2748841.
 163. Lei P, Ayton S, Finkelstein DI, et al. Tau deficiency induces parkinsonism with dementia by impairing APP-mediated iron export. *Nat Med.* 2012; 18:291–95. [PubMed: 22286308]
 164. Leskovjan AC, Kretlow A, Lanzirotti A, Barrea R, Vogt S, Miller LM. Increased brain iron coincides with early plaque formation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroimage.* 2011; 55:32–38. [PubMed: 21126592]
 165. Lee, H.J., Korshavn, K.J., Kochi, A., Derrick, J.S., Lim, M.H. (2014) Cholesterol and metal ions in Alzheimer's disease. *Chem. Soc. Rev.* 43, 6672-6682. DOI: 10.1039/c4cs00005f
 166. Lee P, Peng H, Gelbart T, Beutler E. The IL-6- and lipopolysaccharide-induced transcription of hepcidin in HFE-, transferrin receptor 2-, and beta 2-microglobulin-deficient hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101:9263–65. [PubMed: 15192150]
 167. Lee, S.Y.; Hwang, D.Y.; Kim, Y.K.; Lee, J.W.; Shin, I.C.; Oh, K.W.; Lee, M.K.; Lim, J.S.; Yoon, D.Y.; Hwang, S.J.; et al. PS2 mutation increases neuronal cell vulnerability to neurotoxicants through activation of

168. caspase-3 by enhancing of ryanodine receptor-mediated calcium release. *FASEB J.* **2006**, *20*, 151–153.
169. Lei, S.; Czerwinska, E.; Czerwinski, W.; Walsh, M.P.; Macdonald, J.F. Regulation of NMDA Receptor Activity by F-Actin and Myosin Light Chain Kinase. *J. Neurosci.* **2001**, *21*, 8464–8472, doi:10.1523/JNEUROSCI.21-21-08464.2001.
170. Leissring, M.A.; Murphy, M.P.; Mead, T.R.; Akbari, Y.; Sugarman, M.C.; Jannatipour, P.; Anliker, B.; Muller, S.; Saftig, P.; De Strooper, B.; et al. A physiologic signaling role for the γ -secretase-derived intracellular fragment of APP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 4697–4702.
171. Levi I, Eskira Y, Eisenstein M, Gilon C, Hoffman A, Tal-Gan Y, Fanous J, Bersudsky Y, Belmaker RH, Agam G, Almog O. Inhibition of inositol monophosphatase (IMPase) at the calbindin-D28k binding site: molecular and behavioral aspects. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2013 Dec;23(12):1806-15. doi: 10.1016/j.euroneuro.2013.02.004. Epub 2013 Apr 22. Erratum in: *Eur Neuropsychopharmacol.* 2015 Nov;25(11):2185. Talgan, Yiftach [corrected to Tal-Gan, Yftah]. PMID: 23619164.
172. Li, L.; Wu, X.; Yue, H.; Zhu, Y.; Xu, J. Myosin light chain kinase facilitates endocytosis of synaptic vesicles at hippocampal boutons. *J. Neurochem.* **2016**, *138*, 60–73, doi:10.1111/jnc.13635.
173. Li, S.; Tian, X.; Hartley, D.M.; Feig, L.A. Distinct Roles for Ras-Guanine Nucleotide-Releasing Factor 1 (Ras-GRF1) and Ras-GRF2 in the Induction of Long-Term Potentiation and Long-Term Depression. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 1721–1729, doi:10.1523/JNEUROSCI.3990-05.2006.
174. Li WJ, Jiang H, Song N, Xie JX. Dose- and time-dependent alpha-synuclein aggregation induced by ferric iron in SK-N-SH cells. *Neurosci Bull.* 2010; *26*:205–10. [PubMed: 20502498]
175. Liang, H.; DeMaria, C.D.; Erickson, M.G.; Mori, M.X.; Alseikhan, B.A.; Yue, D.T. Unified Mechanisms of Ca²⁺ Regulation across the Ca²⁺ Channel Family. *Neuron* **2003**, *39*, 951–960, doi:10.1016/s0896-6273(03)00560-9.
176. Liu, C.-H.; Rasband, M.N. Axonal Spectrins: Nanoscale Organization, Functional Domains and Spectrinopathies. *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *13*, 234, doi:10.3389/fncel.2019.00234.
177. Liu Y, Connor JR. Iron and ER stress in neurodegenerative disease. *Biometals.* 2012; *25*:837–45. [PubMed: 22526559]
178. Liu, J.-L., Fan, Y.-G., Yang, Z.-S., Wng, Z.-Y., Guo, C. (2018) Iron and Alzheimer's Disease: From Pathogenesis to Therapeutic Implications. *Front. Neurosci.* *12*:632. DOI: 10.3389/fnins.2018.00632.
179. Lloyd, E.; Ferrer, J.C.; Funk, W.D.; Mauk, M.R.; A.G. Mauk, A.G. (1994) Recombinant human erythrocyte cytochrome *b₅*. *Biochemistry* *33* (38), 11432–11437.
180. Lopes KO, Sparks DL, Streit WJ. Microglial dystrophy in the aged and Alzheimer's disease brain is associated with ferritin immunoreactivity. *Glia.* 2008; *56*:1048–60. [PubMed: 18442088]
181. Lopez, J.R.; Lyckman, A.; Oddo, S.; LaFerla, F.M.; Querfurth, H.W.; Shtifman, A. Increased intraneuronal resting [Ca²⁺] in adult

- Alzheimer's disease mice. *J. Neurochem.* **2008**, *105*, 262–271, doi:10.1111/j.1471-4159.2007.05135.x.
182. Lopez-Sanchez, C., Poejo, J., Garcia-Lopez, V., Salazar, J., Garcia-Martinez, V., Gutierrez-Merino, C. (2022) Kaempferol Prevents the Activation of Complement C3 Protein and the Generation of Reactive A1 Astrocytes that Mediate Rat Brain Degeneration Induced by 3-Nitropropionic Acid. *Food and Chemical Toxicology* *164*, 113017. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113017>.
 183. Lopreiato, R.; Giacomello, M.; Carafoli, E. The Plasma Membrane Calcium Pump: New Ways to Look at an Old Enzyme. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 10261–10268, doi:10.1074/jbc.o114.555565.
 184. Losic D, Martin LL, Mechler A, Aguilar MI, Small DH. High resolution scanning tunnelling microscopy of the beta-amyloid protein (Abeta1-40) of Alzheimer's disease suggests a novel mechanism of oligomer assembly. *J Struct Biol.* 2006 Jul;155(1):104-10. doi: 10.1016/j.jsb.2006.02.013. Epub 2006 Mar 31. PMID: 16650774.
 185. Lovell MA, Robertson JD, Teesdale WJ, Campbell JL, Markesbery WR. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J Neurol Sci.* 1998 Jun 11;158(1):47-52. doi: 10.1016/s0022-510x(98)00092-6. PMID: 9667777.
 186. Lovell MA, Xie C, Markesbery WR. Protection against amyloid beta peptide toxicity by zinc. *Brain Res.* 1999 Mar 27;823(1-2):88-95. doi: 10.1016/s0006-8993(99)01114-2. PMID: 10095015.
 187. Lowe PN, Smith D, Stammers DK, Riveros-Moreno V, Moncada S, Charles I, Boyhan A (1996): Identification of the domains of neuronal nitric oxide synthase by limited proteolysis. *Biochem J* *314*:55–62
 188. Lustbader JW, Cirilli M, Lin C, Xu HW, Takuma K, Wang N, Caspersen C, Chen X, Pollak S, Chaney M, Trinchese F, Liu S, Gunn-Moore F, Lue LF, Walker DG, Kuppusamy P, Zewier ZL, Arancio O, Stern D, Yan SS, Wu H. ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease. *Science.* 2004 Apr 16;304(5669):448-52. doi: 10.1126/science.1091230. PMID: 15087549.
 189. Malinow, R.; Schulman, H.; Tsien, R.W. Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science* **1989**, *245*, 862–866, doi:10.1126/science.2549638.
 190. Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. (1982) *Molecular cloning : a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
 191. Manyes, L.; Holst, S.; Lozano, M.; Santos, E.; Fernandez-Medarde, A. Spatial learning and long-term memory impairments in RasGrf1 KO, Pttg1 KO, and double KO mice. *Brain Behav.* **2018**, *8*, e01089, doi:10.1002/brb3.1089.
 192. Marques-da-Silva D, Samhan-Arias AK, Tiago T, Gutierrez-Merino C (2010) L-type calcium channels and cytochrome *b5* reductase are components of protein complexes tightly associated with lipid rafts microdomains of the neuronal plasma membrane. *J Proteomics* *73*:1502-1510.
 193. Marques-da-Silva D, Gutierrez-Merino C (2012) L-type voltage-operated calcium channels, N-methyl-D-aspartate receptors and

- neuronal nitric-oxide synthase form a calcium/redox nano-transducer within lipid rafts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 420:257-262.
194. Marques-da-Silva D, Gutierrez-Merino C (2014) Caveolin-rich lipid rafts of the plasma membrane of mature cerebellar granule neurons are microcompartments for calcium/reactive oxygen and nitrogen species cross-talk signaling. *Cell Calcium* 56:108-123.
 195. Mastroberardino PG, Hoffman EK, Horowitz MP, et al. A novel transferrin/TfR2-mediated mitochondrial iron transport system is disrupted in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2009; 34:417–31. [PubMed: 19250966]
 196. Mata, A.M. Functional interplay between plasma membrane Ca²⁺-ATPase, amyloid β -peptide and tau. *Neurosci. Lett.* **2018**, 663, 55–59, doi:10.1016/j.neulet.2017.08.004.
 197. Matsuo, N.; Yamasaki, N.; Ohira, K.; Keizo, T.; Keiko, T.; Megumi, E.; Shun, Y.; Tsuyoshi, M. Neural activity changes underlying the working memory deficit in alpha-CaMKII heterozygous knockout mice. *Front. Behav. Neurosci.* **2009**, 3, 1–10
 198. Mayford, M.; Bach, M.E.; Huang, Y.-Y.; Wang, L.; Hawkins, R.D.; Kandel, E.R. Control of Memory Formation Through Regulated Expression of a CaMKII Transgene. *Science* **1996**, 274, 1678–1683, doi:10.1126/science.274.5293.1678.
 199. McLachlan, D.R.; Wong, L.; Bergeron, C.; Baimbridge, K.G. Calmodulin and calbindin D28K in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **1987**, 1, 171–179.
 200. Melis JP, van Steeg H, Luijten M. Oxidative DNA damage and nucleotide excision repair. *Antioxid Redox Signal.* 2013; 18:2409–19. [PubMed: 23216312]
 201. Menyhard K, Dora, Keseru M, Gyorgy and Naray-Szabo Gabor, Calmodulin in Complex with Proteins and Small Molecule Ligands: Operating with the Element of Surprise; Implications for Structure-Based Drug Design, *Current Computer-Aided Drug Design* 2009; 5(4) . <https://dx.doi.org/10.2174/157340909789577874>
 202. Mills, J.S., Johnson, J.D. (1985) Metal Ions as Allosteric Regulators of Calmodulin. *J. Biol. Chem.* 260, 15100-15105.
 203. Millucci, L.; Ghezzi, L.; Bernardini, G.; Santucci, A. (2010) Conformations and biological activities of amyloid beta peptide 25-35. *Curr. Protein Pept. Sci.* 11, 54–67. <https://doi.org/10.2174/138920310790274626>.
 204. Milton NG. Amyloid-beta binds catalase with high affinity and inhibits hydrogen peroxide breakdown. *Biochem J.* 1999 Dec 1;344 Pt 2(Pt 2):293-6. PMID: 10567208; PMCID: PMC1220643.
 205. Milton NG, Mayor NP, Rawlinson J. Identification of amyloid-beta binding sites using an antisense peptide approach. *Neuroreport.* 2001 Aug 8;12(11):2561-6. doi: 10.1097/00001756-200108080-00054. PMID: 11496149.
 206. Mink, J.W.; Blumenschine, R.J.; Adams, D.B. Ratio of central nervous system to body metabolism in vertebrates: Its constancy and functional basis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **1981**, 241, R203–R212.

207. Mirzaei, S.A., Yazdi, M.T. & Sepehrizadeh, Z. Secretory expression and purification of a soluble NADH cytochrome b5 reductase enzyme from *Mucor racemosus* in *Pichia pastoris* based on codon usage adaptation. *Biotechnol Lett* **32**, 1705–1711 (2010). <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0348-z>
208. Mishra, J.; Jhun, B.S.; Hurst, S.; O-Uchi, J.; Csordas, G.; Sheu, S.-S. The Mitochondrial Ca²⁺ uniporter: Structure, function, and pharmacology. In *Pharmacology of Mitochondria*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2017; pp. 129–156.
209. Moreira, P.I.; Carvalho, C.; Zhu, X.; Smith, M.A.; Perry, G. Mitochondrial dysfunction is a trigger of Alzheimer's disease pathophysiology. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Mol. Basis Dis.* **2010**, 1802, 2–10.
210. Morris, R.G. Long-term potentiation and memory. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* **2003**, 358, 643–647.
211. Nabuurs RJ, Hegeman I, Natté R, et al. High-field MRI of single histological slices using an inductively coupled, self-resonant microcoil: application to ex vivo samples of patients with Alzheimer's disease. *NMR Biomed.* 2011; 24:351–57. [PubMed: 20960578]
212. Nadeau, O.W.; Fontes, J.D.; Carlson, G.M. The regulation of glycogenolysis in the brain. *J. Biol. Chem.* **2018**, 293, 7099–7107, doi:10.1074/jbc.r117.803023.
214. Nagele RG, D'Andrea MR, Anderson WJ, Wang HY. Intracellular accumulation of beta-amyloid(1-42) in neurons is facilitated by the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 2002;110(2):199-211. doi: 10.1016/s0306-4522(01)00460-2. PMID: 11958863.
215. Nanou, E.; Catterall, W.A. Calcium Channels, Synaptic Plasticity, and Neuropsychiatric Disease. *Neuron* **2018**, 98, 466–481, doi:10.1016/j.neuron.2018.03.017.
216. Nellikka, R.K.; Sreeja, J.S.; Dharmapal, D.; John, R.; Monteiro, A.; Macedo, J.C.; Conde, C.; Logarinho, E.; Sunkel, C.E.; Sengupta, S. α -Fodrin is required for the organization of functional microtubules during mitosis. *Cell Cycle* **2019**, 18, 2713–2726, doi:10.1080/15384101.2019.1656476.
217. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, et al. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest.* 2004; 113:1271–76. [PubMed: 15124018]
218. Nielsen, M.D.; Chan, G.C.K.; Poser, S.W.; Storm, D.R. Differential Regulation of Type I and Type VIII Ca²⁺-stimulated Adenylyl Cyclases by Gi-coupled Receptors in Vivo. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 33308–33316, doi:10.1074/jbc.271.52.33308.
219. Nunan J, Small DH. Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases. *FEBS Lett.* 2000 Oct 13;483(1):6-10. doi: 10.1016/s0014-5793(00)02076-7. PMID: 11033346.
220. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis.* 2007; 12:913–22. [PubMed: 17453160]

221. Ouyang, H., Vogel, H.J. (1998) Metal ion binding to calmodulin: NMR and fluorescence studies. *Biometals*. 11, 213-222. doi: 10.1023/a:1009226215543.
222. Pallafacchina, G.; Zanin, S.; Rizzuto, R. Recent advances in the molecular mechanism of mitochondrial calcium uptake. *F1000Research* **2018**, 7.
223. Panel, M.; Ghaleh, B.; Morin, D. Mitochondria and aging: A role for the mitochondrial transition pore? *Aging Cell* **2018**, 17, e12793.
224. Paris I, Martinez-Alvarado P, Cárdenas S, et al. Dopamine-dependent iron toxicity in cells derived from rat hypothalamus. *Chem Res Toxicol*. 2005; 18:415–19.
225. Patron, M.; Checchetto, V.; Ra_aello, A.; Teardo, E.; Vecellio Reane, D.; Mantoan, M.; Granatiero, V.; Szabo, I.; De Stefani, D.; Rizzuto, R. MICU1 and MICU2 finely tune the mitochondrial Ca²⁺ uniporter by exerting opposite effects on MCU activity. *Mol. Cell* **2014**, 53, 726–737.
226. Patron, M.; Granatiero, V.; Espino, J.; Rizzuto, R.; De Stefani, D. MICU3 is a tissue-specific enhancer of mitochondrial calcium uptake. *Cell Death Differ.* **2019**, 26, 179–195.
227. Perluigi M, Coccia R, Butterfield DA. 4-Hydroxy-2-nonenal, a reactive product of lipid peroxidation, and neurodegenerative diseases: a toxic combination illuminated by redox proteomics studies. *Antioxid Redox Signal*. 2012; 17:1590–609. [PubMed: 22114878]
228. Perocchi, F.; Gohil, V.M.; Girgis, H.S.; Bao, X.R.; McCombs, J.E.; Palmer, A.E.; Mootha, V.K. MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca²⁺ uptake. *Nature* **2010**, 467, 291–296.
229. Peng ZF, Koh CH, Li QT, Manikandan J, Melendez AJ, Tang SY, Halliwell B, Cheung NS. Deciphering the mechanism of HNE-induced apoptosis in cultured murine cortical neurons: transcriptional responses and cellular pathways. *Neuropharmacology*. 2007 Oct;53(5):687-98. doi: 10.1016/j.neuropharm.2007.07.016. Epub 2007 Aug 15. PMID: 17889908.
230. Percy MJ, Lappin TR. Recessive congenital methaemoglobinaemia: cytochrome b(5) reductase deficiency. *Br J Haematol*. 2008 May;141(3):298-308. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07017.x. Epub 2008 Mar 3. PMID: 18318771.
231. Perry G, Nunomura A, Hirai K, et al. Is oxidative damage the fundamental pathogenic mechanism of Alzheimer's and other neurodegenerative diseases? *Free Radic Biol Med*. 2002; 33:1475–79. [PubMed: 12446204]
232. Peterson, C.; Gibson, G.; Blass, J. Altered calcium uptake in cultured skin fibroblasts from patients with Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* **1985**, 312, 1063.
233. Pierrot, N.; Ferrao Santos, S.; Feyt, C.H.; Morel, M.; Brion, J.-P.; Octave, J.-N. Calcium-mediated transient phosphorylation of tau and amyloid precursor protein followed by intraneuronal amyloid- accumulation. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 39907–39914.
234. Pietrini G, Carrera P, Borgese N. Two transcripts encode rat cytochrome b5 reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988

- Oct;85(19):7246-50. doi: 10.1073/pnas.85.19.7246. PMID: 3174630; PMCID: PMC282162.
235. Pinton, P. Mitochondria-Associated Membranes (MAMs) and Pathologies. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 413.
236. Pivovarova, N.B.; Andrews, S.B. Calcium-dependent mitochondrial function and dysfunction in neurons. *FEBS J.* **2010**, *277*, 3622–3636.
237. Plovanich, M.; Bogorad, R.L.; Sancak, Y.; Kamer, K.J.; Strittmatter, L.; Li, A.A.; Girgis, H.S.; Kuchimanchi, S.; De Groot, J.; Speciner, L.; et al. MICU2, a paralog of MICU1, resides within the mitochondrial uniporter complex to regulate calcium handling. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e55785.
238. Poejo, J.; Salazar, J.; Mata, A.M.; Gutierrez-Merino, C. (2021a) Binding of Amyloid β (1–42)-Calmodulin Complexes to Plasma Membrane Lipid Rafts in Cerebellar Granule Neurons Alters Resting Cytosolic Calcium Homeostasis. *Int. J. Mol. Sci.* *22*, 1984. <https://doi.org/10.3390/ijms22041984>.
239. Poejo, J.; Salazar, J.; Mata, A.M.; Gutierrez-Merino, C. (2021b) The Relevance of Amyloid β -Calmodulin Complexation in Neurons and Brain Degeneration in Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* *22*, 4976. <https://doi.org/10.3390/ijms22094976>
240. Poejo, J. (2022) Mecanismos moleculares tempranos de la desregulación de la homeostasis del calcio inducida por péptidos β -amiloides y estrategias de neuroprotección (Molecular mechanisms of early cytosolic calcium dysregulation induced by amyloid β peptides and neuroprotection strategies). Tesis doctoral. Universidad de Extremadura.
241. Pogocki D, Schöneich C. Redox properties of Met(35) in neurotoxic beta-amyloid peptide. A molecular modeling study. *Chem Res Toxicol.* 2002 Mar;15(3):408-18. doi: 10.1021/tx0101550. PMID: 11896689.
242. Querfurth, H.W.; Selkoe, D.J. Calcium ionophore increases amyloid. beta. Peptide production by cultured cells. *Biochemistry* **1994**, *33*, 4550–4561.
243. Raffa DF, Gómez-Balderas R, Brunelle P, Rickard GA, Rauk A. Ab initio model studies of copper binding to peptides containing a His-His sequence: relevance to the beta-amyloid peptide of Alzheimer's disease. *J Biol Inorg Chem.* 2005 Dec;10(8):887-902. doi: 10.1007/s00775-005-0038-9. Epub 2005 Nov 3. PMID: 16267663.
244. Raffa DF, Rickard GA, Rauk A. Ab initio modelling of the structure and redox behaviour of copper(I) bound to a His-His model peptide: relevance to the beta-amyloid peptide of Alzheimer's disease. *J Biol Inorg Chem.* 2007 Feb;12(2):147-64. doi: 10.1007/s00775-006-0175-9. Epub 2006 Sep 30. PMID: 17013614.
245. Raffa DF, Rauk A. Molecular dynamics study of the beta amyloid peptide of Alzheimer's disease and its divalent copper complexes. *J Phys Chem B.* 2007 Apr 12;111(14):3789-99. doi: 10.1021/jp0689621. Epub 2007 Mar 22. PMID: 17388547.
246. Rathore KI, Redensek A, David S. Iron homeostasis in astrocytes and microglia is differentially regulated by TNF- α and TGF- β 1. *Glia.* 2012; *60*:738–50. [PubMed: 22298416]

247. Rauk A, Yu D, Taylor J, Shustov GV, Block DA, Armstrong DA. Effects of structure on alpha C-H bond enthalpies of amino acid residues: relevance to H transfers in enzyme mechanisms and in protein oxidation. *Biochemistry*. 1999 Jul 13;38(28):9089-96. doi: 10.1021/bi990249x. PMID: 10413483.
248. Resende, R.; Ferreiro, E.; Pereira, C.; de Oliveira, C.R. Neurotoxic effect of oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptide 1-42: Involvement of endoplasmic reticulum calcium release in oligomer-induced cell death. *Neuroscience* **2008**, 155, 725–737.
249. Rezai-Zadeh, K.; Shytle, D.; Sun, N.; Mori, T.; Hou, H.; Jeanniton, D.; Ehrhart, J.; Townsend, K.; Zeng, J.; Morgan, D.; Hardy, J.; Town, T.; Tan, J. (2005) Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) modulates amyloid precursor protein cleavage and reduces cerebral amyloidosis in Alzheimer transgenic mice. *J. Neurosci.* 25, 8807-8814.
250. Rezai-Zadeh, K.; Arendash, G.W.; Hou, H.; Fernandez, F.; Jensen, M.; Runfeldt, M.; Shytle, R.D.; Tan, J. (2008) Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces β -amyloid mediated cognitive impairment and modulates tau pathology in Alzheimer transgenic mice. *Brain Res.* 1214, 177-187
251. Riascos, D.; de Leon, D.; Baker-Neigh, A.; Nicholas, A.; Yukhananov, R.; Bu, J.; Wu, C.-K.; Geula, C. Age-related loss of calcium buffering and selective neuronal vulnerability in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **2011**, 122, 565.
252. Rhoads K, Sacco JC, Drescher N, Wong A, Trepanier LA. Individual variability in the detoxification of carcinogenic arylhydroxylamines in human breast. *Toxicol Sci.* 2011 Jun;121(2):245-56. doi: 10.1093/toxsci/kfr073. Epub 2011 Mar 29. PMID: 21447608; PMCID: PMC3098962.
253. Rizzuto, R.; Pinton, P.; Carrington, W.; Fay, F.S.; Fogarty, K.E.; Lifshitz, L.M.; Tuft, R.A.; Pozzan, T. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science* **1998**, 280, 1763–1766.
254. Roberts BR, Ryan TM, Bush AI, Masters CL, Duce JA. The role of metallobiology and amyloid- β peptides in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2012; 120(suppl 1):149–66. [PubMed: 22121980]
255. Rogers JT, Randall JD, Cahill CM, et al. An iron-responsive element type II in the 5'-untranslated region of the Alzheimer's amyloid precursor protein transcript. *J Biol Chem.* 2002; 277:45518–28. [PubMed: 12198135]
256. Rojas, G.; Cardenas, A.M.; Fernandez-Olivares, P.; Shimahara, T.; Segura-Aguilar, J.; Caviedes, R.; Caviedes, P. Effect of the knockdown of amyloid precursor protein on intracellular calcium increases in a neuronal cell line derived from the cerebral cortex of a trisomy 16 mouse. *Exp. Neurol.* **2008**, 209, 234–242.
257. Rojo, L., Sjöberg, M.K., Hernández, P., Zambrano, C., Maccioni, R.B. (2006) Roles of Cholesterol and Lipids in the Etiopathogenesis of Alzheimer's Disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2006, Article ID 73976, Pages 1–17. DOI 10.1155/JBB/2006/73976.
258. Roma GW, Crowley LJ, Barber MJ. Expression and characterization of a functional canine variant of cytochrome b5

- reductase. Arch Biochem Biophys. 2006 Aug 1;452(1):69-82. doi: 10.1016/j.abb.2006.04.021. Epub 2006 May 24. PMID: 16814740.
259. Roses, M.; Allen, D. Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer's disease. Annu. Rev. Med. **1996**, 47, 387–400.
260. Ryan KC, Ashkavand Z, Norman KR. The Role of Mitochondrial Calcium Homeostasis in Alzheimer's and Related Diseases. Int J Mol Sci. 2020 Dec 1;21(23):9153. doi: 10.3390/ijms21239153. PMID: 33271784; PMCID: PMC7730848.
261. Sadowski MJ, Pankiewicz J, Scholtzova H, Mehta PD, Prelli F, Quartermain D, Wisniewski T. Blocking the apolipoprotein E/amyloid-beta interaction as a potential therapeutic approach for Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Dec 5;103(49):18787-92. doi: 10.1073/pnas.0604011103. Epub 2006 Nov 20. PMID: 17116874; PMCID: PMC1654132.
262. Salazar, J.; Poejo, J.; Mata, A.M.; Samhan-Arias, A.K.; Gutierrez-Merino, C. (2022) Design and Experimental Evaluation of a Peptide Antagonist against Amyloid $\beta(1-42)$ Interactions with Calmodulin and Calbindin-D28k. Int. J. Mol. Sci. 23, 2289. <https://doi.org/10.3390/ijms23042289>.
263. Samhan-Arias, A., Duarte, R., Martín-Romero, F.J., Moura, J.J.G. y Gutiérrez-Merino, C. (2008) Reduction of ascorbate free radical by the plasma membrane of synaptic terminals from rat brain. Archives Biochemistry and Biophysics, 469, 243-254.
264. Samhan-Arias, A.K., García-Bereguiaín, M.A., Martín-Romero, F.J. y Gutiérrez-Merino, C. (2009) Clustering of plasma membrane-bound cytochrome *b*₅ reductase within 'lipid rafts' microdomains of the neuronal plasma membrane. Molecular and Cellular Neuroscience 40, 14-26.
265. Samhan-Arias, A.K.; Marques-da-Silva, D.; Yanamala, N.; Gutierrez-Merino, C. (2012) Stimulation and clustering of cytochrome *b*₅ reductase in caveolin-rich lipid microdomains is an early event in oxidative stress-mediated apoptosis of cerebellar granule neurons. J. Proteomics 75, 2934-2949.
266. Samhan-Arias, A.K. and Gutierrez-Merino, C. (2014a) Purified NADH-Cytochrome *b*₅ Reductase Is a Novel Superoxide Anion Source Inhibited by Apocynin: Sensitivity to nitric oxide and peroxyxynitrite. Free Radic Biol Med 73, 174-189.
267. Samhan-Arias, A.K.; Gutierrez-Merino, C. (2014b) "Cytochrome *b*₅ as a pleiotropic metabolic modulator in mammalian cells", en "Cytochromes *b* and *c*: Biochemical properties, biological functions and electrochemical analysis" (ISBN 978-1-63117-467-4; ebook ISBN 978-1-63117-468-1), Capítulo 2, pags. 39-80. Editor Rurik Thom, editorial Nova Science Publishers, Hauppauge, N.Y. USA.
268. Samhan-Arias, A.K., López-Sánchez, C., Marques-da-Silva, D., Lagoa, R., Garcia-Lopez, V., García-Martínez, V.; Gutierrez-Merino, C. (2016) High expression of cytochrome *b*₅ reductase isoform 3/cytochrome *b*₅ system in the cerebellum and pyramidal neurons of adult rat brain. Brain Structure and Function 221, 2147-2162.
269. Samhan-Arias A.K., Fortalezas S., Cordas C.M., Moura I., Moura J.J.G. and Gutierrez-Merino C. (2018) Cytochrome *b*₅ reductase is the

- component from neuronal synaptic plasma membrane vesicles that generates superoxide anion upon stimulation by cytochrome c. *Redox Biology* 15, 109-114.
270. Samhan-Arias AK, Almeida RM, Ramos S, Cordas CM, Moura I, Gutierrez-Merino C, Moura JJG (2018a) Topography of human cytochrome b5/cytochrome b5 reductase interacting domain and redox alterations upon complex formation. *BBA-Bioenergetics* 1859:78-87.
271. Samhan-Arias AK, Maia LB, Cordas CM, Moura I, Gutierrez-Merino C, Moura JJG (2018b) Peroxidase-like activity of cytochrome b5 is triggered upon hemichrome formation in alkaline pH. *BBA-Proteins and Proteomics* 1866:373-378.
272. Samhan-Arias AK, Cordas CC, Carepo M, Maia LB, Gutierrez-Merino C, Moura I, Moura JJG (2019) Ligand accessibility to heme cytochrome b5 coordinating sphere and enzymatic activities enhancement upon tyrosine ionization. *J Biol Inorg Chem* 24:317-330.
273. Sánchez, C.; Díaz-Nido, J.; Avila, J. Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Prog. Neurobiol.* **2000**, *61*, 133–168, doi:10.1016/s0301-0082(99)00046-5.
274. Sangeetha N, Viswanathan P, Balasubramanian T, Nalini N. Colon cancer chemopreventive efficacy of silibinin through perturbation of xenobiotic metabolizing enzymes in experimental rats. *Eur J Pharmacol.* 2012 Jan 15;674(2-3):430-8. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.11.008. Epub 2011 Nov 12. PMID: 22115893.
275. Sanz-Blasco, S.; Valero, R.A.; Rodriguez-Crespo, I.; Villalobos, C.; Nunez, L. Mitochondrial Ca²⁺ overload underlies A_β oligomers neurotoxicity providing an unexpected mechanism of neuroprotection by NSAIDs. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e2718.
276. Sarkar S, Floto RA, Berger Z, Imarisio S, Cordenier A, Pasco M, Cook LJ, Rubinsztein DC. Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *J Cell Biol.* 2005 Sep 26;170(7):1101-11. doi: 10.1083/jcb.200504035. PMID: 16186256; PMCID: PMC2171537.
277. Sarasija, S.; Norman, K.R. A -secretase independent role for presenilin in calcium homeostasis impacts mitochondrial function and morphology in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **2015**, *201*, 1453–1466.
278. Savelieff, M.G., Lee, S., Liu, Y., Lim, M.H. (2013) Untangling amyloid-β, tau, and metals in Alzheimer's disease. *ACS Chem. Biol.* *8*, 856–865. DOI: 10.1021/cb400080f
279. Sayre LM, Perry G, Harris PL, Liu Y, Schubert KA, Smith MA. In situ oxidative catalysis by neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease: a central role for bound transition metals. *J Neurochem.* 2000; *74*:270–79. [PubMed: 10617129]
280. Schenck JF. Magnetic resonance imaging of brain iron. *J Neurol Sci.* 2003; *207*:99–102. [PubMed: 12614939] 87. Haacke EM, Cheng NY, House MJ, et al. Imaging iron stores in the brain using magnetic resonance imaging. *Magn Reson Imaging.* 2005; *23*:1–25. [PubMed: 15733784]
281. Schmidt H. Three functional facets of calbindin D-28k. *Front Mol Neurosci.* 2012 Mar 15;5:25. doi: 10.3389/fnmol.2012.00025. PMID: 22435048; PMCID: PMC3304297.

282. Schipper HM, Kotake Y, Janzen EG. Catechol oxidation by peroxidase-positive astrocytes in primary culture: an electron spin resonance study. *J Neurosci*. 1991; 11:2170–76. [PubMed: 1712380]
283. Schipper HM, Cissé S, Stopa EG. Expression of heme oxygenase-1 in the senescent and Alzheimer-diseased brain. *Ann Neurol*. 1995; 37:758–68. [PubMed: 7778849]
284. Schipper HM, Bennett DA, Liberman A, et al. Glial heme oxygenase-1 expression in Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging*. 2006; 27:252–61. [PubMed: 16399210]
285. Schipper HM, Song W, Zukor H, Hascalovici JR, Zeligman D. Heme oxygenase-1 and neurodegeneration: expanding frontiers of engagement. *J Neurochem*. 2009; 110:469–85. [PubMed: 19457088]
286. Sharma, R.K.; Parameswaran, S. Calmodulin-binding proteins: A journey of 40 years. *Cell Calcium* **2018**, 75, 89–100, doi:10.1016/j.ceca.2018.09.002.
287. Shirwany, N.A.; Payette, D.; Xie, J.; Guo, Q. The amyloid beta ion channel hypothesis of Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **2007**, 3, 597.
288. Schreiner, B.; Hedskog, L.; Weihager, H.; Ankarcrona, M. Amyloid-_β peptides are generated in mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes. *J. Alzheimer's Dis.* **2015**, 43, 369–374.
289. Schröder N, Figueiredo LS, de Lima MN. Role of brain iron accumulation in cognitive dysfunction: evidence from animal models and human studies. *J Alzheimers Dis.* 2013; 34:797– 812. [PubMed: 23271321]
290. Schwaller, B. Cytosolic Ca²⁺ buffers. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, 2, a004051.
291. Silva, A.J.; Paylor, R.; Wehner, J.M.; Tonegawa, S. Impaired spatial learning in α -calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* **1992**, 257, 206–211.
292. Silvestri L, Camaschella C. A potential pathogenetic role of iron in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med.* 2008; 12:1548–50. [PubMed: 18466351]
293. Smith MA, Hirai K, Hsiao K, et al. Amyloid-beta deposition in Alzheimer transgenic mice is associated with oxidative stress. *J Neurochem*. 1998; 70:2212–15. [PubMed: 9572310]
294. Smith IF, Hitt B, Green KN, Oddo S, LaFerla FM. Enhanced caffeine-induced Ca²⁺ release in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2005 Sep;94(6):1711-8. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03332.x. PMID: 16156741.
295. Sokoloff, L. The metabolism of the central nervous system in vivo. In *Handbook of Physiology, Section I; Neurophysiology*: Washington, DC, USA, 1960; Volume 3, pp. 1843–1864.
296. Solà, C.; Tusell, J.M.; Serratosa, J. Comparative study of the distribution of calmodulin kinase II and calcineurin in the mouse brain. *J. Neurosci. Res.* **1999**, 57, 651–662.
297. Sooy K, Schermerhorn T, Noda M, Surana M, Rhoten WB, Meyer M, Fleischer N, Sharp GW, Christakos S. Calbindin-D(28k) controls [Ca(2+)](i) and insulin release. Evidence obtained from calbindin-d(28k)

- knockout mice and beta cell lines. *J Biol Chem.* 1999 Nov 26;274(48):34343-9. doi: 10.1074/jbc.274.48.34343. PMID: 10567411.
298. Striessnig, J.; Pinggera, A.; Kaur, G.; Bock, G.; Tuluc, P. L-type Ca²⁺ channels in heart and brain. *Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal.* **2014**, 3, 15–38.
299. Stryer L (1978) Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu Rev Biochem* 47:819-846.
300. Stutzmann, G.E.; Caccamo, A.; Laferla, F.M.; Parker, I. Dysregulated IP3 signaling in cortical neurons of knock-in mice expressing an Alzheimer's-linked mutation in presenilin1 results in exaggerated Ca²⁺ signals and altered membrane excitability. *J. Neurosci.* **2004**, 24, 508–513.
301. Subasinghe S, Unabia S, Barrow CJ, Mok SS, Aguilar MI, Small DH. Cholesterol is necessary both for the toxic effect of Abeta peptides on vascular smooth muscle cells and for Abeta binding to vascular smooth muscle cell membranes. *J Neurochem.* 2003 Feb;84(3):471-9. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01552.x. PMID: 12558967.
302. Supnet, C. Bezprozvanny I the dysregulation of intracellular calcium in Alzheimer disease. *Cell Calcium.* **2010**, 47, 183–189.
303. Swerdlow, R.H.; Burns, J.M.; Khan, S.M. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: Progress and perspectives. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Mol. Basis Dis.* **2014**, 1842, 1219–1231.
304. Syme CD, Nadal RC, Rigby SE, Viles JH. Copper binding to the amyloid-beta (Abeta) peptide associated with Alzheimer's disease: folding, coordination geometry, pH dependence, stoichiometry, and affinity of Abeta-(1-28): insights from a range of complementary spectroscopic techniques. *J Biol Chem.* 2004 Apr 30;279(18):18169-77. doi: 10.1074/jbc.M313572200. Epub 2004 Feb 20. PMID: 14978032.
305. Sulzer D, Zecca L. Intraneuronal dopamine-quinone synthesis: a review. *Neurotox Res.* 2000; 1:181–95. [PubMed: 12835101]
306. Takemoto-Kimura, S.; Suzuki, K.; Horigane, S.-I.; Kamijo, S.; Inoue, M.; Sakamoto, M.; Fujii, H.; Bito, H. Calmodulin kinases: Essential regulators in health and disease. *J. Neurochem.* **2017**, 141, 808–818, doi:10.1111/jnc.14020.
307. Tambini, M.D.; Pera, M.; Kanter, E.; Yang, H.; Guardia-Laguarta, C.; Holtzman, D.; Sulzer, D.; Area-Gomez, E.; Schon, E.A. ApoE4 upregulates the activity of mitochondria-associated ER membranes. *EMBO Rep.* **2016**, 17, 27–36.
308. Tang, Y.-P.; Shimizu, E.; Dube, G.R.; Rampon, C.; Kerchner, G.A.; Zhuo, M.; Liu, G.; Tsien, J.Z. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nat. Cell Biol.* **1999**, 401, 63–69, doi:10.1038/43432.
309. Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol.* 1991 Oct;30(4):572-80. doi: 10.1002/ana.410300410. PMID: 1789684.
310. Tiago T, Aureliano M, Gutierrez-Merino C (2004) Decavanadate binding to a high affinity site near the myosin catalytic centre inhibits F-actin-stimulated myosin ATPase activity. *Biochemistry* 43:5551-5561.

311. Tjernberg LO, Lilliehöök C, Callaway DJ, Näslund J, Hahne S, Thyberg J, Terenius L, Nordstedt C. Controlling amyloid beta-peptide fibril formation with protease-stable ligands. *J Biol Chem*. 1997 May 9;272(19):12601-5. doi: 10.1074/jbc.272.19.12601. Erratum in: *J Biol Chem* 1997 Jul 11;272(28):17894. PMID: 9139713.
312. Todorova, V.; Blokland, A. Mitochondria and synaptic plasticity in the mature and aging nervous system. *Curr. Neuropharmacol.* **2017**, *15*, 166–173.
313. Tomaselli, S.; Esposito, V.; Vangone, P.; van Nuland, N.A.J.; Bonvin, A.M.J.J.; Guerrini, R.; Tancredi, T.; Temussi, P.A.; Picone, D. (2006) The α -to- β Conformational Transition of Alzheimer's A β -(1–42) Peptide in Aqueous Media is Reversible: A Step by Step Conformational Analysis Suggests the Location of β Conformation Seeding. *ChemBioChem* 2006, *7*, 257–267. <https://doi.org/10.1002/cbic.200500223>.
314. Tu, H.; Nelson, O.; Bezprozvanny, A.; Wang, Z.; Lee, S.-F.; Hao, Y.-H.; Serneels, L.; De Strooper, B.; Yu, G.; Bezprozvanny, I. Presenilins form ER Ca²⁺ leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer's disease-linked mutations. *Cell* **2006**, *126*, 981–993.
315. Turner, R.W.; Anderson, D.; Zamponi, G.W. Signaling complexes of voltage-gated calcium channels. *Channels* **2011**, *5*, 440–448, doi:10.4161/chan.5.5.16473.
316. Urrutia P, Aguirre P, Esparza A, et al. Inflammation alters the expression of DMT1, FPN1 and hepcidin, and it causes iron accumulation in central nervous system cells. *J Neurochem*. 2013; *126*:541–49. [PubMed: 23506423]
317. van den Berg, P. A. W., Widengren, J., Hink, M. A., Rigler, R., and Visser, A. J. W. G. (2001) Fluorescence correlation spectroscopy of flavins and flavoenzymes: photochemical and photophysical aspects, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* *57*, 2135-2144.
318. Varadarajan S, Kanski J, Aksenova M, Lauderback C, Butterfield DA. Different mechanisms of oxidative stress and neurotoxicity for Alzheimer's A beta(1--42) and A beta(25--35). *J Am Chem Soc*. 2001 Jun 20; *123*(24):5625-31. doi: 10.1021/ja010452r. PMID: 11403592.
319. Venters RA, Benson LM, Craig TA, Bagu J, Paul KH, Kordys DR, Thompson R, Naylor S, Kumar R, Cavanagh J. The effects of Ca(2+) binding on the conformation of calbindin D(28K): a nuclear magnetic resonance and microelectrospray mass spectrometry study. *Anal Biochem*. 2003 Jun 1; *317*(1):59-66. doi: 10.1016/s0003-2697(03)00084-8. Erratum in: *Anal Biochem*. 2003 Nov 15; *322*(2):292. PMID: 12729601.
320. Villarroel A, Taglialatela M, Bernardo-Seisdedos G, Alaimo A, Agirre J, Alberdi A, Gomis-Perez C, Soldovieri MV, Ambrosino P, Malo C, Areso P. The ever changing moods of calmodulin: how structural plasticity entails transductional adaptability. *J Mol Biol*. 2014 Jul 29; *426*(15):2717-35. doi: 10.1016/j.jmb.2014.05.016. Epub 2014 May 22. PMID: 24857860.
321. Walsh, D.M.; Klyubin, I.; Fadeeva, J.V.; Cullen, W.K.; Anwyl, R.; Wolfe, M.S.; Rowan, M.J.; Selkoe, D.J. (2002) Naturally secreted

- oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416, 535–539.
322. Wang, J.Z.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K. (2007) Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *Eur. J. Neurosci.* 25, 59–68.
323. Wang, R.; Reddy, P.H. (2017) Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis.* 57, 1041–1048, doi:10.3233/jad-160763.
- 324.
- 325.
326. Wang, H.; Ferguson, G.D.; Pineda, V.V.; Cundiff, P.E.; Storm, D.R. Overexpression of type-1 adenylyl cyclase in mouse forebrain enhances recognition memory and LTP. *Nat. Neurosci.* **2004**, 7, 635–642.
327. Wang, H.; Storm, D.R. Calmodulin-Regulated Adenylyl Cyclases: Cross-Talk and Plasticity in the Central Nervous System. *Mol. Pharmacol.* **2003**, 63, 463–468, doi:10.1124/mol.63.3.463.
328. Wang HY, Lee DH, Davis CB, Shank RP. Amyloid peptide Abeta(1-42) binds selectively and with picomolar affinity to alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurochem.* 2000 Sep;75(3):1155-61. doi: 10.1046/j.1471-4159.2000.0751155.x. PMID: 10936198.
329. Wang, F., Wang, J., Shen, Y., Li, H., Rausch, W.-D., Huang, X. (2022) Iron Dyshomeostasis and Ferroptosis: A New Alzheimer's Disease Hypothesis? *Front. Aging Neurosci.* 14:830569. DOI: 10.3389/fnagi.2022.830569
330. Wang, C.; Wang, H.-G.; Xie, H.; Pitt, G.S. Ca²⁺/CaM Controls Ca²⁺-Dependent Inactivation of NMDA Receptors by Dimerizing the NR1 C Termini. *J. Neurosci.* **2008**, 28, 1865–1870, doi:10.1523/jneurosci.5417-07.2008.
331. Wang, H.; Shimizu, E.; Tang, Y.-P.; Cho, M.; Kyin, M.; Zuo, W.; Robinson, D.A.; Alaimo, P.J.; Zhang, C.; Morimoto, H.; et al. Inducible protein knockout reveals temporal requirement of CaMKII reactivation for memory consolidation in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 4287–4292, doi:10.1073/pnas.0636870100.
332. Wang, Y.; Greig, N.H.; Yu, Q.-S.; Mattson, M.P. Presenilin-1 mutation impairs cholinergic modulation of synaptic plasticity and suppresses NMDA currents in hippocampus slices. *Neurobiol. Aging* **2009**, 30, 1061–1068.
333. Wang, C.; Jacewicz, A.; Delgado, B.D.; Baradaran, R.; Long, S.B. Structures reveal gatekeeping of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter by MICU1-MICU2. *eLife* **2020**, 9, e59991.
334. Wasserman RH, Corradino RA, Taylor AN. Binding proteins from animals with possible transport function. *J Gen Physiol.* 1969 Jul 1;54(1):114-37. doi: 10.1085/jgp.54.1.114. PMID: 19873640; PMCID: PMC2225897.
335. Wayman, G.A.; Lee, Y.-S.; Tokumitsu, H.; Silva, A.; Soderling, T.R. Calmodulin-Kinases: Modulators of Neuronal Development and Plasticity. *Neuron* **2008**, 59, 914–931, doi:10.1016/j.neuron.2008.08.021.

336. Weiss B, Prozialeck W, Cimino M, Barnette MS, Wallace TL. (1980) Pharmacological regulation of calmodulin. *Ann N Y Acad Sci*. 1980;356:319-45. doi: 10.1111/j.1749-6632.1980.tb29621.x. PMID: 6112947.
337. West, M.; Coleman, P.; Flood, D.; Troncoso, J. (1994) Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet* 344, 769–772, doi:10.1016/s0140-6736(94)92338-8.
338. Williams R, Buchheit CL, Berman NE, LeVine SM. Pathogenic implications of iron accumulation in multiple sclerosis. *J Neurochem*. 2012; 120:7–25. [PubMed: 22004421].
339. Williamson, R.; Usardi, A.; Hanger, D.P.; Anderton, B.H. (2008) Membrane-bound β -amyloid oligomers are recruited into lipid rafts by a fyn-dependent mechanism. *FASEB J*. 22, 1552–1559.
340. Willis, M.; Kaufmann, W.A.; Wietzorrek, G.; Hutter-Paier, B.; Moosmang, S.; Humpel, C.; Hofmann, F.; Windisch, M.; Knaus, H.-G.; Marksteiner, J. (2010) L-Type Calcium Channel CaV 1.2 in Transgenic Mice Overexpressing Human A β PP751 with the London (V717I) and Swedish (K670M/N671L) Mutations. *J. Alzheimer's Dis*. 20, 1167–1180, doi:10.3233/jad-2010-091117.
341. Wong, S.T.; Athos, J.; Figueroa, X.A.; Pineda, V.V.; Schaefer, M.L.; Chavkin, C.C.; Muglia, L.J.; Storm, D.R. Calcium-Stimulated Adenylyl Cyclase Activity Is Critical for Hippocampus-Dependent Long-Term Memory and Late Phase LTP. *Neuron* **1999**, 23, 787–798, doi:10.1016/s0896-6273(01)80036-2.
342. Wood, W.; Schroeder, F.; Igbavboa, U.; Avdulov, N.; Chochina, S.V.; Avdulov, N. (2002) Brain membrane cholesterol domains, aging and amyloid beta-peptides. *Neurobiol. Aging* 23, 685–694.
343. Wu, Z.; Wong, S.T.; Storm, D.R. Modification of the calcium and calmodulin sensitivity of the type I adenylyl cyclase by mutagenesis of its calmodulin binding domain. *J. Biol. Chem*. **1993**, 268, 23766–23768.
344. Xia Z, Storm DR. The role of calmodulin as a signal integrator for synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*. 2005 Apr;6(4):267-76. doi: 10.1038/nrn1647. PMID: 15803158.
345. Xia, Z.; Refsdal, C.D.; Merchant, K.M.; Dorsa, D.M.; Storm, D.R. Distribution of mRNA for the calmodulin-sensitive adenylyl cyclase in rat brain: Expression in areas associated with learning and memory. *Neuron* **1991**, 6, 431–443, doi:10.1016/0896-6273(91)90251-t.
346. Xing, Y.; Wang, M.; Wang, J.; Nie, Z.; Wu, G.; Yang, X.; Shen, Y. Dimerization of MICU proteins controls Ca²⁺ influx through the mitochondrial Ca²⁺ uniporter. *Cell Rep*. **2019**, 26, 1203–1212.e4.
347. Xu J, Jia Z, Knutson MD, Leeuwenburgh C. Impaired iron status in aging research. *Int J Mol Sci*. 2012; 13:2368–86. [PubMed: 22408459]
348. Xu X, Yan C, Zou X. (2018) MDockPeP: An ab-initio protein-peptide docking server. *J Comput Chem* 39: 2409-2413.
349. Yamamoto A, Shin RW, Hasegawa K, et al. Iron (III) induces aggregation of hyperphosphorylated tau and its reduction to iron (II) reverses the aggregation: implications in the formation of neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2002; 82:1137–47. [PubMed: 12358761]

350. Yao ZX, Papadopoulos V. Function of beta-amyloid in cholesterol transport: a lead to neurotoxicity. *FASEB J.* 2002 Oct;16(12):1677-9. doi: 10.1096/fj.02-0285fje. Epub 2002 Aug 21. PMID: 12206998.
351. Yang, P.S.; Alseikhan, B.A.; Hiel, H.; Grant, L.; Mori, M.X.; Yang, W.; Fuchs, P.A.; Yue, D.T. Switching of Ca²⁺-Dependent Inactivation of CaV1.3 Channels by Calcium Binding Proteins of Auditory Hair Cells. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 10677–10689, doi:10.1523/jneurosci.3236-06.2006.
352. Yenari MA, Minami M, Sun GH, Meier TJ, Kunis DM, McLaughlin JR, Ho DY, Sapolsky RM, Steinberg GK. Calbindin d28k overexpression protects striatal neurons from transient focal cerebral ischemia. *Stroke.* 2001 Apr;32(4):1028-35. doi: 10.1161/01.str.32.4.1028. PMID: 11283407.
353. Younkin, S.G. (1998) The role of A β 42 in Alzheimer's disease. *J. Physiol. Paris* *92*, 289–292.
354. Yu, D.-Y.; Tong, L.; Song, G.-J.; Lin, W.-L.; Zhang, L.-Q.; Bai, W.; Gong, H.; Yin, Y.-X.; Wei, Q. Tau binds both subunits of calcineurin, and binding is impaired by calmodulin. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2008**, *1783*, 2255–2261.
355. Yue, D. Towards a unified theory of calmodulin regulation (calmodulation) of voltage-gated calcium and sodium channels. *Curr. Mol. Pharmacol.* **2016**, *8*, 188–205.
356. Yuan HH, Chen RJ, Zhu YH, Peng CL, Zhu XR. The neuroprotective effect of overexpression of calbindin-D(28k) in an animal model of Parkinson's disease. *Mol Neurobiol.* 2013 Feb;47(1):117-22. doi: 10.1007/s12035-012-8332-3. Epub 2012 Aug 25. PMID: 22923348.
357. Zalzman, G.; Federman, N.; Romano, A. CaMKII Isoforms in Learning and Memory: Localization and Function. *Front. Mol. Neurosci.* **2018**, *11*, 445, doi:10.3389/fnmol.2018.00445.
358. Zampese, E.; Fasolato, C.; Kipanyula, M.J.; Bortolozzi, M.; Pozzan, T.; Pizzo, P. Presenilin 2 modulates endoplasmic reticulum (ER)–mitochondria interactions and Ca²⁺ cross-talk. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 2777–2782.
359. Zhang, M.; Tanaka, T.; Ikura, M. Calcium-induced conformational transition revealed by the solution structure of apo calmodulin. *Nature* **1995**, *2*, 758–767.
360. Zhang, Y.; McLaughlin, R.; Goodyer, C.G.; Leblanc, A.C. (2002) Selective cytotoxicity of intracellular amyloid β peptide 1–42 through p53 and Bax in cultured primary human neurons. *J. Cell Biol.* *156*, 519–529.
361. Zhao, D.; Watson, J.B.; Xie, C.-W. (2004) Amyloid β Prevents Activation of Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II and AMPA Receptor Phosphorylation During Hippocampal Long-Term Potentiation. *J. Neurophysiol.* *92*, 2853–2858, doi:10.1152/jn.00485.2004.
362. Zecca L, Tampellini D, Rizzio E, Giaveri G, Gallorini M. The determination of iron and other metals by INAA in cortex, cerebellum and putamen of human brain and in their neuromelanins. *J Radioanal Nucl Chem.* 2001; *248*:129–31.
363. Zecca L, Bellei C, Costi P, et al. New melanic pigments in the human brain that accumulate in aging and block environmental toxic

- metals. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105:17567–72. [PubMed: 18988735]
364. Zhou, L.; Zhu, D.-Y. Neuronal nitric oxide synthase: Structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide* **2009**, 20, 223–230, doi:10.1016/j.niox.2009.03.001
365. Zhou, Y.; Takahashi, E.; Li, W.; Halt, A.; Wiltgen, B.; Ehninger, D.; Li, G.-D.; Hell, J.W.; Kennedy, M.B.; Silva, A.J. Interactions between the NR2B Receptor and CaMKII Modulate Synaptic Plasticity and Spatial Learning. *J. Neurosci.* **2007**, 27, 13843–13853, doi:10.1523/jneurosci.4486-07.2007.
366. Zucca FA, Bellei C, Giannelli S, et al. Neuromelanin and iron in human locus coeruleus and substantia nigra during aging: consequences for neuronal vulnerability. *J Neural Transm.* 2006; 113:757–67. [PubMed: 16755380]