



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**β -ADAPTINA: MOLÉCULA CLAVE EN LA INTERNALIZACIÓN
DEL PÉPTIDO β -AMILOIDE EN CÉLULAS DE MICROGLIA.**

T E S I S
QUE PRESENTA
M. EN C. NATALIA MANZANO LEÓN
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

DIRECTOR DE TESIS: DR. JAIME MAS OLIVA

CIUDAD UNIVERSITARIA

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

“La imaginación nos llevará a menudo a mundos que jamás existieron. Pero sin ella no vamos a ninguna parte”.

Carl Sagan

“La educación no es adiestramiento, sino más bien el proceso que nos da elementos para dialogar con nosotros mismos, con un amigo y con una idea”.

Wallace Sterling

“Si supiera lo que estoy haciendo, no lo llamaría investigación, verdad?”.

Albert Einstein

Esta tesis está dedicada muy especialmente para ti Sergín, porque fuiste siempre un ejemplo de lucha, de fortaleza y de honradez. Te extrañamos mucho.

A mis abuelos que son todo un ejemplo de vida, entre muchas cosas más. Gracias por todo su cariño!

A mi mamá, para quien nunca acabo de encontrar las palabras suficientes para expresarle mi agradecimiento y amor. Te quiero má!!

Con todo mi cariño para Martha, Gerardo, Rogelio y Lourdes por apoyarme siempre.

A mis tías Marie-José, Leti y Estela. A mis primos Nayeli, Amaury, Cintia, Enrique, Rocío y Héctor. A las familias León-Ayala y Jiménez-León. Es un orgullo pertenecer a esta familia.

A Andrés, Mari, Gabi, Raquel, Augusto, Maribel, Michelle, Andrea, Carla, Adrián, Adriancito, Yael, Gerardo, Mauricio y Ami; y a toda la familia Morales-López, porque ya son parte de mí.

A mis amigos que me han acompañado desde hace tanto tiempo y que a pesar de las distancias, las ocupaciones diarias o el tiempo siguen ahí: Sylvia y Brenda por antigüedad!!...a Isa, Tere, Gabi M., Carmen, Cynthia, Rebeca, Rafa, Artemio, Bongo y Moncho porque todos son increíbles!!...a Vero, Toño, Mauricio, Areli, Omar, Nacho, Jorge, Adrián y Martha por los buenos momentos y por su amistad...a Rose y Vero, mis *nigras* amigas!...a Adriana, Gabi A., Gris, Caro F., Víctor, Euclides e Iván porque siguen ahí...a Margarita G. por su enorme apoyo...a Sara por escucharme y aguantarme!...a Paola, Laura, Rocío, Maggy, Roxana y Geraldine por brindarme su amistad. Gracias enormes a cada uno de ustedes...en verdad son importantes.

A mis compañeros de laboratorio y amigos: Margarita, Rocío, Blanca, Maggy, Paola, Salvatore, Ernesto, Pablo, Edu, Malena y la Sra. Lupita. Gracias por hacer más agradable mi estancia en el laboratorio y por su apoyo en todo momento. Mi agradecimiento especial a Margarita por sus aportaciones a este trabajo.

A mi papá y a nuestro encuentro. Gracias también por tu trabajo.

A la UNAM, maravillosa e increíble institución sin la que muchos no hubiéramos podido luchar por nuestros sueños...y principalmente a mi querida Iztacala. Siempre ha sido y será un orgullo ser parte de esta lucha.

Al Dr. Jaime Mas Oliva por su apoyo en todos sentidos y por sus consejos.

A Daniel y a nuestra historia.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| ABREVIATURAS..... | 2 |
| RESUMEN..... | 4 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 6 |
| 1.1 RECEPTORES "SCAVENGER"..... | 6 |
| 1.2 RECEPTOR "SCAVENGER" A..... | 7 |
| 1.3 RECEPTOR "SCAVENGER" B..... | 8 |
| 1.4 ENDOCITOSIS MEDIADA POR CLATRINA..... | 10 |
| 1.5 PÉPTIDO β -AMILOIDE Y SUS RECEPTORES..... | 13 |
| 2. OBJETIVOS..... | 16 |
| 3. HIPÓTESIS..... | 16 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 17 |
| 4.1 MATERIALES..... | 17 |
| 4.2 FORMACIÓN DE FIBRAS DE PÉPTIDO β -AMILOIDE..... | 17 |
| 4.3 CULTIVOS CELULARES..... | 18 |
| 4.4 VIABILIDAD..... | 19 |
| 4.5 ESTRÉS OXIDATIVO..... | 19 |
| 4.6 ENSAYOS DE APOPTOSIS..... | 19 |
| 4.7 ENSAYOS DE INTERNALIZACIÓN..... | 20 |
| 4.8 INMUNOTRANSFERENCIA..... | 20 |
| 4.9 RT-PCR..... | 21 |
| 4.10 INMUNOPRECIPITACIONES..... | 22 |
| 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 23 |
| 5.1 VIABILIDAD CELULAR..... | 23 |
| 5.2 ESTRÉS OXIDATIVO..... | 24 |
| 5.3 APOPTOSIS..... | 26 |
| 5.4 INTERNALIZACIÓN DEL PÉPTIDO β -AMILOIDE..... | 28 |
| 5.5 NIVELES DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS ENDOCÍTICAS..... | 31 |
| 5.6 RT-PCR..... | 36 |
| 5.7 INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA..... | 37 |
| 6. CONCLUSIONES..... | 41 |
| 7. REFERENCIAS..... | 43 |

ABREVIATURAS

AGE- Advanced Glycosylation- End products

ANTH- AP180 N-Terminal Homology

AP2- Adaptor protein 2

APP- Proteína precursora del péptido β -amiloide

ATCC- American Type Culture Collection

β A- Péptido β -amiloide

BCA- Ácido bicinconílico

BrdU- 5-bromo-2'-deoxyuridine

CALM- Clathrin Assembly Lymphoid Myeloid leukaemia

6-carboxy-H₂DCFDA- [6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, di (acetoxymethyl ester)]

DMEM- Dulbecco's modified Eagle's Media

DMSO- Dimetilsulfóxido

DNA- Ácido desoxirribonucléico

EDTA- Ethylenediaminetetraacetic acid

EGTA- Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid

EH- Eps 15 Homology

Eps15- EGF (Epidermal growth factor) receptor pathway substrate clone no. 15

HDL- High density lipoprotein. Lipoproteínas de alta densidad

KDa- Kilodalton

LDL- Low density lipoprotein. Lipoproteínas de baja densidad

LDL-Ac- Lipoproteínas de baja densidad acetiladas

LDL-Ox- Lipoproteínas de baja densidad oxidadas

LPS- Lipopolisacárido

LRP- LDL Related Receptor Protein

LTA- Ácido lipoteicoico

M-BSA- Albúmina sérica bovina maleinada
MEM- Minimum Essential Media
NP40- Nonidet P 40. Nonylphenyl-polyethylenglycol
pb- pares de bases
PBS- Phosphate-Buffered Saline
PCR- Reacción en cadena de la polimerasa
PDMBP- Platelet-Derived Macrophage-Binding Proteoglycan
PMSF- Phenylmethanesulfonyl fluoride
RAGE- Receptor- Advanced Glycation End products
RNA- Ácido ribonucleico
RNAm- Ácido ribonucleico mensajero
ROS- Especies reactivas de oxígeno
RS- Receptor scavenger
RS-A - Receptor scavenger A
RS-B - Receptor scavenger B
RT-PCR- Transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa
SDS-PAGE- Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis
SFB- Suero Fetal Bovino
TBH- ter-butilhidroperóxido
TBS- Tris-Buffered Saline
TUNEL- Terminal deoxynucleotide transferase dUTP Nick End Labeling
VLDL- Very low density lipoprotein. Lipoproteínas de muy baja densidad

RESUMEN

Los receptores "scavenger" o pepenador (RS) son un grupo de receptores de membrana dividido en 6 clases, que se localizan en las membranas de diversas células e internalizan lipoproteínas de baja densidad (LDL) modificadas químicamente y otros ligandos, a través de un proceso conocido como endocitosis mediada por clatrina.

Resultados previos de nuestro grupo, en los que se emplearon células CHO transfectadas con el RS-AI, así como con células C6 y PC12 que poseen de manera natural al RS-BI, mostraron que el estrés oxidativo inducido con ter-butilhidroperóxido (TBH) permite la unión de ^{125}I -LDL-Ac a estos receptores, pero inhibe su internalización (Aguilar-Gaytán y Mas-Oliva, 2003).

En el presente trabajo utilizamos el fragmento 25-35 del péptido β -amiloide (βA_{25-35}) como inductor de estrés oxidativo y como un ligando natural para el RS-AI y el RS-BI y estudiamos los cambios en los niveles de expresión de varias proteínas adaptadoras importantes en la organización de la maquinaria endocítica en células de microglia y macrófagos.

Se realizaron experimentos de expresión diferencial de las proteínas β -adaptina, α -adaptina y CALM (clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia protein), así como de RS-AI y RS-BI en células RAW (macrófagos) y EOC (microglia) con diferentes concentraciones y diferentes tiempos de exposición al βA_{25-35} . Nuestros resultados muestran que de acuerdo a la concentración, el βA_{25-35} produce un estado de estrés oxidativo que afecta de manera importante a la β -adaptina, clave en la formación de vesículas cubiertas de clatrina. En respuesta a esta pérdida, se observó un aumento en la expresión de α -adaptina, de CALM y del RS-B.

Por otra parte, mediante ensayos de inmunoprecipitación se determinó que la proteína β -adaptina forma parte de un complejo preformado con la α -adaptina y

el RS-A, pero una vez en presencia del ligando la β -adaptina interacciona también con el RS-B, de ahí la importancia de esta proteína en el mecanismo de endocitosis mediada por clatrina, en particular para el RS-B.

Bajo estas mismas condiciones se realizaron ensayos de RT-PCR que mostraron que el RNAm de la β -adaptina se sintetiza de manera normal, por lo que podemos pensar que el proceso de traducción de esta proteína, o bien su estructura pueden estar alteradas.

La disminución de los niveles de expresión de la β -adaptina puede ayudarnos a explicar la incapacidad de la célula para endocitar agregados de este péptido, y la consecuente acumulación del β A en el espacio extracelular de neuronas de pacientes afectados con la enfermedad de Alzheimer.

1. INTRODUCCIÓN

Los receptores "scavenger" o pepenador (RS) tienen una amplia variedad de ligandos, tales como lipoproteínas de baja densidad (LDL, Low Density Lipoprotein) modificadas y péptido β -amiloide (β A), y por lo general son internalizados junto con sus ligandos por un proceso de endocitosis mediada por clatrina (Aguilar-Gaytán y Más-Oliva, 2002).

El interés del presente trabajo se centró en estudiar el efecto del estrés oxidativo provocado por el péptido β A, sobre las proteínas implicadas en la endocitosis de los RS, ya que en trabajos previos en el laboratorio se encontró que el estrés oxidativo no inhibe la unión de los ligandos a estos receptores, pero sí su internalización (Aguilar-Gaytán y Más-Oliva, 2003). En este caso, utilizamos al péptido β A como inductor de estrés oxidativo y como ligando de los RS. Los ensayos fueron realizados en células de microglia y macrófagos, por expresar de manera natural a los RS.

1.1 RECEPTORES "SCAVENGER"

Los RS conforman una amplia familia de receptores de membrana dividida en 6 clases. Los RS clases A y B son los más estudiados hasta el momento, sin embargo todos se caracterizan por su habilidad para internalizar LDL acetiladas (LDL-Ac) y LDL oxidadas (LDL-Ox) (Krieger, 1997), además de una gran variedad de ligandos, muchos de ellos caracterizados por sus propiedades polianiónicas (Rohrer et al., 1990). Uno de los ligandos recientemente descritos para el RS-A es la molécula paramiosina, una proteína proveniente de *Taenia soleum*, que parece favorecer la formación de arreglos tridimensionales del propio receptor, que facilitan la formación del pozo cubierto y la endocitosis del mismo (Guaderrama-

Díaz et al., 2005). El contenido de colesterol en la membrana plasmática también influye en la formación de arreglos tridimensionales entre los receptores RS-A (Mas-Oliva et al., 1996); más aún, estos arreglos tridimensionales favorecen la síntesis de proteínas accesorias en el proceso de endocitosis (Guaderrama-Díaz et al., 2005).

Los RS están implicados en la formación de células espumosas (macrófagos altamente cargados con LDL-Ox, implicados en la formación de la placa aterosclerótica), inmunidad innata, eliminación de células apoptóticas y transporte reverso del colesterol (ruta del colesterol desde las células periféricas hacia el hígado). Estos receptores se encuentran ubicados en macrófagos y células afines como la microglia, así como en hepatocitos, ovario, testículo, glándulas suprarrenales y astrocitos (Terpstra et al., 2000).

1.2 RECEPTOR “SCAVENGER” A

El RS-A, que en un principio fue conocido como receptor de LDL-Ac, fue purificado por Kodama y cols. (1988) gracias a su afinidad por este ligando. El RS-A es capaz de unir LDL-Ac, LDL-Ox, albúmina sérica bovina maleinada (M-BSA), ácido polinosínico, ácido poliguanosínico, polisacáridos como el dextrán sulfato y la fucoidina, ácido lipoteicoico (LTA), lipopolisacárido (LPS) y proteínas modificadas por AGE (Advanced Glycosylation- End products) (de Winther et al., 1999; Aguilar-Gaytán y Más-Oliva, 2002). Otro de sus ligandos es el péptido β -amiloides (β A), por lo que se ha relacionado a este receptor con la enfermedad de Alzheimer (Paresce et al., 1996; Honda et al., 1998).

El RS-A es una glicoproteína integral de membrana que se encuentra en forma trimérica y de la cual existen dos tipos principales producidos por corte y empalme alternativo de un mismo producto génico. Los dos tipos principales del

RS-A, los tipo I y II, tienen 6 dominios que incluyen una α -hélice de cola enrollada (coiled-coil) y una región parecida a colágena, la cual es fundamental para la oligomerización de la molécula trimérica (Kodama et al., 1990; Aguilar-Gaytán y Más-Oliva, 2002).

El RS-A puede mediar la internalización de sus ligandos a través de endocitosis o de fagocitosis dependiendo de la naturaleza de los mismos. La endocitosis del RS-A se lleva a cabo mediante la formación de pozos cubiertos en la superficie celular (Esbach et al., 1994; Aguilar-Gaytán y Más-Oliva, 2002). Se han identificado secuencias de aminoácidos dentro de los dominios citoplasmáticos de varios receptores endocíticos que son necesarias para que se lleve a cabo su internalización. La cola citoplasmática del RS-A parece no tener ninguna de estas secuencias, sin embargo todos los dominios de aminoácidos presentes en otros receptores tienen una estructura en forma de giro muy cerrado (tight turn) que está presente dentro del RS-A en las secuencias Asp¹³-Glu¹⁹ y Asn³⁸-Thr⁴¹ (Platt et al., 2002). Trabajos más finos realizados por Morimoto y cols. (1999) parecen indicar que la región que va desde la Thr¹⁸ hasta la Ser²⁷ es la secuencia clave para la endocitosis, siendo de mayor importancia dentro de esta estructura la Val²¹, la Phe²³, la Asp²⁴ y la Val²⁸. Esta estructura, que también se conoce como VXFD adopta una estructura secundaria helicoidal, similar a la de secuencias identificadas en otros receptores y que son importantes para su endocitosis (Morimoto et al., 1999).

1.3 RECEPTOR “SCAVENGER” B

Los RS-B incluyen al RS-BI, RS-BII y al CD36, y fueron identificados por su unión a LDL-Ac, LDL-Ox y LDL nativas, aunque también pueden unir M-BSA, fosfolípidos aniónicos, células apoptóticas, péptido β A, lipoproteínas de muy baja

densidad (VLDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Acton et al., 1994). Los RS-B se han localizado en diversos tipos celulares como hepatocitos, células de Kupffer, glándulas suprarrenales, testículo, ovario, macrófagos, células de glia y microglia (Paresce et al., 1996; Chung et al., 1999; Terpstra et al., 2000; Hussemann et al., 2001; Hussemann y Silverstein, 2001).

El RS-B juega un papel fundamental en el transporte reverso del colesterol por su unión a HDL. Sin embargo, el SR-B no internaliza a las HDL por un proceso "clásico" de endocitosis mediada por receptor, sino que extrae selectivamente los lípidos de estas lipoproteínas y los transfiere a la membrana celular (Krieger, 1999). No obstante, cuando sus ligandos son de carácter protéico se le considera un receptor endocítico pues promueve la captura y degradación de AGE-BSA, M-BSA, LDL-Ox y LDL (Rhainds et al., 1999; Gilotte-Taylor et al., 2001; Ohgami et al., 2001).

El mecanismo de internalización de los RS-B no se conoce con exactitud, pero se cree que puede darse a través de caveolas, ya que aproximadamente el 60% de los RS-B en una célula se encuentran ubicados en dominios lipídicos ricos en colesterol parecidos a estas estructuras. El 40% restante de los RS-B se localizan en zonas pobres en caveolina (Babitt et al., 1997; Graf et al., 1999). Existen evidencias de que la endocitosis de algunos ligandos del RS-B se lleva a cabo predominantemente a través de vesículas cubiertas de clatrina (Hansen et al., 2003).

1.4 ENDOCITOSIS MEDIADA POR CLATRINA

La membrana plasmática es una estructura altamente dinámica que separa el medio intracelular del ambiente extracelular y regula la entrada y salida de diversas moléculas. Existen varias vías de entrada a la célula: fagocitosis, macropinocitosis, endocitosis mediada por clatrina, endocitosis mediada por caveolina y endocitosis independiente de clatrina y de caveolina.

La formación de vesículas cubiertas de clatrina se ha caracterizado principalmente en las terminales nerviosas, donde es importante para el reciclaje de los componentes de las vesículas sinápticas después de la liberación del neurotransmisor. A pesar de que se han encontrado varias proteínas originadas por corte y empalme alternativo o bien isoformas de las proteínas implicadas en la endocitosis mediada por vesículas sinápticas, se cree que es la misma maquinaria básica en las células no neuronales. El proceso por el cual se producen vesículas cubiertas de clatrina involucra interacciones tanto con proteínas adaptadoras multifuncionales como con la membrana plasmática, así como con la misma clatrina y varias proteínas accesorias y fosfoinosítidos. La endocitosis dependiente de clatrina normalmente ocurre en sitios especializados de la membrana donde el pozo cubierto, una estructura compleja, se ensambla con el fin de concentrar proteínas de superficie para la internalización (Schmid, 1997). En células en cultivo, el ensamblaje de una vesícula cubierta de clatrina toma aproximadamente 1 minuto, y se forman varios cientos o miles por minuto (Marsh y McMahon, 1999).

Se han descrito cerca de 30 proteínas que intervienen en el proceso de endocitosis mediada por clatrina, muchas de las cuáles son moléculas accesorias que ayudan en la formación del pozo cubierto. Entre estas destacan además de la clatrina, las proteínas adaptadoras asociadas o adaptinas (que forman el complejo AP2), AP180/CALM (Clathrin Assembly Lymphoid Myeloid leukaemia), Eps15 [cuyo

nombre deriva de EGF (Epidermal growth factor) receptor pathway substrate clone no. 15], epsina, dinamina y anfifisina (Marsh y McMahon, 1999; Mousavi et al., 2004).

Los monómeros de clatrina se agrupan en una estructura denominada triskelion compuesta de 3 cadenas pesadas (190 KDa) y 3 cadenas ligeras (25 KDa), que se unen en estructuras poliédricas, fundamentales para la formación de los pozos cubiertos. La mayor parte de las proteínas que interactúan con clatrina tienen dominios similares en su secuencia llamados dominios de caja de clatrina (Clathrin box) entre los que se encuentra la secuencia LLNLD (Leu-Leu-Asn-Leu-Asp) de la β -adaptina (ter Haar et al., 2000). Tanto la extremidad distal como la proximal de la cadena pesada de clatrina son fundamentales para que se realicen los contactos intramoleculares necesarios para que se formen las estructuras de red del pozo cubierto; además, la extremidad proximal contiene sitios de unión para las cadenas ligeras de clatrina (Kirchhausen, 2000).

El complejo protéico AP2 está compuesto de 4 subunidades: α , β , μ y δ (o α -adaptina, β -adaptina, μ -adaptina y δ -adaptina). La α - y la β -adaptina, que son las proteínas de mayor tamaño (100 kDa), están constituidas por un dominio N-terminal llamado tronco o cabeza y un dominio C-terminal globular, denominado apéndice u oreja, el cual está conectado por una bisagra flexible (Heuser y Keen, 1988). El dominio apéndice de la α -adaptina está involucrado en la unión de AP2 a la membrana plasmática, así como en su interacción con AP180/CALM, anfifisina y proteínas endocíticas que contengan dominios DPF (Asp-Pro-Phe) o DPW (Asp-Pro-Trp) (Pearse et al., 2000).

La β -adaptina posee dos sitios importantes de unión a clatrina: un dominio caja de clatrina en la región de la cabeza y otro en el dominio apéndice (Owen et al., 2000), que promueven el ensamblaje de la estructura poliédrica de clatrina. Asimismo, se sabe que la β -adaptina también puede funcionar en la selección de la molécula cargo (Rapoport et al., 1998).

La μ -adaptina, de tamaño intermedio (50 kDa), contiene un sitio de unión a fosfoinosítidos y funciona principalmente en el reconocimiento y salida de la molécula cargo (Rohde et al., 2002). Esta subunidad es importante también porque interactúa con la β -adaptina y permite el ensamblaje del complejo AP2 (Aguilar et al., 1997). Por otra parte, aunque se conoce que la subunidad pequeña δ -adaptina (16 kDa) interactúa con la α -adaptina, sus funciones aún no se han aclarado (Page y Robinson, 1995).

En cuanto a la proteína adaptadora neuronal AP180 (conocida anteriormente como AP3) y su isoforma ubicua CALM, son proteínas monoméricas con sitios de unión tanto para clatrina como para AP2 (Tebar et al., 1999). El extremo N-terminal de estas proteínas contiene el dominio ANTH (AP180 N-Terminal Homology) que media su interacción con membranas que contienen PtdIns(4,5)P₂ y su extremo carboxilo terminal contiene sitios de unión a clatrina con actividad de ensamblaje (Ford et al., 2001). La región C-terminal también interactúa con la α - y la β -adaptina. Se ha observado en ensayos in vitro que la formación del complejo AP2-AP180 favorece una mayor actividad de ensamblaje de clatrininas que el complejo AP2 o AP180 por sí mismos, sugiriéndose un efecto sinérgico (Hao et al., 1999).

En lo que se refiere a la proteína Eps15 se sabe que su región N-terminal contiene tres copias del dominio EH (Eps15 Homology), el cual interactúa con proteínas que tengan el dominio NPF, incluyendo epsina y AP180/CALM. El extremo C-terminal contiene múltiples copias del dominio DPF, el cual media la unión a la α -adaptina (Salcini et al., 1999).

Otras proteínas que no forman parte del pozo cubierto pero que están involucrados en las últimas etapas de la endocitosis dependiente de clatrina son dinamina, anfifisina y endofilina, las cuales están implicadas en la invaginación y en la separación de la vesícula de la membrana.

1.5 PÉPTIDO β -AMILOIDE Y SUS RECEPTORES

El β A es un péptido de entre 39 y 43 aminoácidos que circula normalmente en bajas concentraciones y en su forma soluble en el líquido cefalorraquídeo y sangre. Con el envejecimiento y sobre todo en la enfermedad de Alzheimer, aumenta su producción y se forman agregados fibrilares insolubles (Yankner, 1996).

El β A tiene un peso molecular de 4 KDa y se deriva de un precursor de mayor tamaño denominado APP (Proteína precursora del péptido β -amiloide) (Glenner y Wong, 1984). La APP es una glicoproteína transmembranal localizada tanto en neuronas como en células no neuronales y en plaquetas. En el caso especial de las plaquetas, la APP se deriva a su vez de un proteoglicano de mayor tamaño denominado PDMBP (Platelet-Derived Macrophage-Binding Proteoglycan) secretado en grandes cantidades por estas (Mas-Oliva et al., 1994) y que inhibe la endocitosis de LDL-Ac en macrófagos (Mas-Oliva et al., 1992).

La APP puede sufrir un procesamiento proteolítico por la α -secretasa, que rompe al dominio que corresponde al péptido β A y que produce un precursor soluble (sAPP) con un peso molecular de entre 90-100 KDa (Sisodia, 1992). Un procesamiento alternativo para APP, llevado a cabo por la β - y γ -secretasas, rompe a la proteína precursora en los dominios extracelular y transmembranal, lo que la llevan a convertirse en el péptido β -amiloide soluble (s β A) (Busciglio et al., 1993).

El β A en concentraciones elevadas adquiere una estructura β -plegada insoluble que lleva a la formación de fibrillas, lo cual está relacionado con la dificultad de ser endocitado por las células y la consecuente acumulación extracelular del péptido, la formación de placas neuríticas, el desarrollo de estrés oxidativo y finalmente la muerte celular (Pike et al., 1993; Iversen et al., 1995; Yankner et al., 1996).

Se ha propuesto la existencia de receptores membranales específicos que median la endocitosis del β A y su citotoxicidad, entre ellos RAGE (Receptor-Advanced Glycation End products) (Lue et al., 2001), LRP (LDL Related Receptor Protein) (Hussain et al., 1991), y la glicoproteína 330 (gp330/megalina) (Zlokovic et al., 1996).

Finalmente, existe evidencia de que los RS están implicados en la internalización del β A. Los RS se expresan en células de glia y microglia y son capaces de internalizar al β A en forma de agregados (Paresce et al., 1996; El Khoury et al., 1996; Aguilar-Gaytán y Más-Oliva, 2002).

Las células de microglia son las células de protección inmunológica del Sistema Nervioso Central y son equivalentes a los macrófagos y otros tipos celulares con funciones similares tales como las células de Kupffer en el hígado. La microglia se activa en respuesta al daño e infección en el Sistema Nervioso Central y se sabe que las placas seniles de los pacientes con Alzheimer se asocian con células de microglia activadas (Bell et al., 1994; Paresce et al., 1996).

Se ha sugerido la participación del RS-A en la enfermedad de Alzheimer por datos que muestran que este receptor puede promover la adhesión de fibrillas de β A a células de microglia (Honda et al., 1998), además de poder mediar su endocitosis (Paresce et al., 1996) y su degradación (Paresce et al., 1997). Asimismo, la expresión del RS-A está aumentada en la microglia de cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer y en el cerebro de ratones transgénicos que expresan una forma mutada de la proteína precursora del β A (APP23) y los cuales desarrollan una patología parecida a la de la enfermedad de Alzheimer (Bornemann et al., 2001). El RS-BI localizado en microglia neonatal también parece ser parte de la unión del β A a estas células y de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Hussemann et al., 2001; Hussemann y Silverstein, 2001), además de participar en la endocitosis del péptido (Bamberger et al., 2003; Wyss-Coray et al., 2003).

En nuestro laboratorio hemos trabajado con células CHO transfectadas con el RS-AI en condiciones de estrés oxidativo producido por ter-butilhidroperóxido (TBH). Hemos observado que a pesar de que la unión de LDL-Ac al RS-AI puede llevarse a cabo, la internalización de las lipoproteínas prácticamente desaparece (Aguilar-Gaytán y Mas-Oliva, 2003). En células C6 (glia) y PC12 (feocromocitoma utilizado como modelo neuronal), que poseen de manera natural al RS-B se han encontrado resultados similares (datos enviados a publicación). En ambos casos, el estrés oxidativo no alteró los niveles de expresión del RNAm ni de la proteína de los RS. El objetivo principal de este trabajo fue el evaluar las posibles modificaciones en la expresión de una serie de proteínas endocíticas durante el estrés oxidativo natural provocado por el β A. De igual forma, estudiamos por primera vez las interacciones entre los RS y las proteínas de la maquinaria endocítica en respuesta al β A.

2. OBJETIVOS

1. Evaluar las posibles modificaciones en la expresión de proteínas endocíticas durante el estrés oxidativo natural provocado por el β A.
2. Estudiar las interacciones entre los RS y las proteínas de la maquinaria endocítica en respuesta al β A.

3. HIPÓTESIS

Alguna(s) de las proteínas de la maquinaria endocítica encargada de la internalización de los RS, modificarán sus niveles de expresión en respuesta al estrés oxidativo producido por el β A. Por otra parte, los RS interactuarán con alguna(s) de las proteínas de la maquinaria endocítica encargada de su internalización en respuesta a un ligando.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

Los péptidos sintéticos de alta pureza se obtuvieron de PeptidoGenic Research & Co, Inc. (Livermore, CA). Todos los reactivos de cultivo celular se obtuvieron de GIBCO-Invitrogen (Carlsbad, CA) y el material plástico de Nalgene-Nunc (Rochester, NY). El anticuerpo contra el RS-AI/II anti-ratón (hecho en rata) y el anticuerpo secundario anti-rata acoplado a la peroxidasa de rábano, se obtuvieron de Serotec (Raleigh, NC). El anticuerpo contra el RS-BI anti-ratón (proveniente de conejo) fue de Calbiochem-Merck (Darmstadt, Germany). Los anticuerpos policlonales contra las proteínas de endocitosis: CALM, α - y β -adaptina (provenientes de cabra) y Eps15 (hecho en conejo), así como el anticuerpo policlonal (hecho en cabra) contra el extremo C-terminal del β A humano y los anticuerpos secundarios anti-cabra, anti-conejo y anti-ratón, acoplados a la peroxidasa de rábano, se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). El kit de revelado por quimioluminiscencia ECL Plus, así como la proteína G Sepharose 4 Fast Flow se obtuvieron de Amersham Bioscience (Uppsala, Sweden). El 6-carboxy-H₂DCFDA [6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, di (acetoxymethyl ester)] y el kit Apo-BrdU TUNEL se obtuvieron de Molecular Probes (Eugene, OR).

4.2 Formación de fibras de péptido β -amiloide

Para la inducción del estrés oxidativo se utilizó el fragmento del β A que se considera la parte tóxica de esta molécula y que abarca los aminoácidos 25 al 35 (Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met) del péptido original de 40 a 42 aminoácidos (Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-

Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala). El péptido βA_{25-35} se resuspendió en agua desionizada estéril a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ que se mantuvo a -20°C . Con el fin de inducir la formación de fibrillas para los diferentes ensayos se realizaron las diluciones necesarias en medio de cultivo-libre de suero que se incubaron por 3 días a 37°C . La formación de fibrillas se confirmó por microscopía electrónica. Para los ensayos control se utilizó un péptido de 11 aminoácidos, que corresponde a los mismos aminoácidos que el βA_{25-35} pero en orden inverso, es decir: Met-Leu-Gly-Ile-Ile-Ala-Gly-Lys-Asn-Ser-Gly, y al que denominamos βA_{35-25} .

4.3 Cultivos celulares

Las líneas celulares RAW 264.7 (monocitos-macrófagos de ratón) y EOC (microglia de ratón) se adquirieron de ATCC (American Type Culture Collection). Las células RAW se cultivaron en medio MEM (Minimum Essential Media), y las células EOC en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Media) suplementados ambos con penicilina (50 U/ml)/estreptomicina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y suero fetal bovino al 10%. Los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO_2 /95% aire. El medio de cultivo de las células EOC se suplementó también con 20% de medio condicionado LADMAC. Este medio es el medio sobrenadante de la línea celular LADMAC, proveniente de médula ósea de ratón y es rico en el factor de crecimiento estimulante de colonias 1. Las células LADMAC se cultivaron en medio MEM suplementado con 1 mM de piruvato de sodio, penicilina (50 U/ml)/estreptomicina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y suero fetal bovino al 10%.

4.4 Viabilidad

La viabilidad de células RAW y EOC expuestas por 24 horas a diferentes concentraciones del βA_{25-35} (0-200 $\mu\text{g/ml}$) se evaluó mediante la técnica de exclusión de azul tripano (Sigma-Aldrich) y una cámara de Neubauer. Los experimentos se realizaron por triplicado.

4.5 Estrés oxidativo

El 6-carboxy- H_2DCFDA se conservó a -20°C en una solución concentrada de 10 mM disuelto en DMSO hasta su uso. Células RAW y EOC se expusieron a diferentes concentraciones del βA_{25-35} (0-200 $\mu\text{g/ml}$) por 24 horas en ausencia de suero, junto con 1 (RAW) ó 20 μM (EOC) del reactivo 6-carboxy- H_2DCFDA . La intensidad de fluorescencia de las células se cuantificó en el citómetro de flujo FACScalibur instrument de Becton-Dickinson (NJ, USA).

4.6 Ensayos de Apoptosis

Las células RAW y EOC se trataron con βA_{25-35} (0-200 $\mu\text{g/ml}$) por 24 horas en medio libre de suero y se lavaron con PBS, pH 7.4 (Phosphate-Buffered Saline). Las células se fijaron con 1% de paraformaldehído en PBS por 15 minutos, se lavaron con PBS y se manuvieron a -20°C en etanol al 70% hasta su uso para los ensayos de TUNEL. La muerte por apoptosis se determinó mediante el kit APO-BrdU TUNEL (Terminal deoxynucleotide transferase dUTP Nick End Labeling) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Si las células presentan cadenas de DNA rotas, estas son marcadas mediante la incorporación del BrdUTP con ayuda de la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). El BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) se detectó usando un anticuerpo monoclonal anti-BrdU acoplado al fluoróforo Alexa Flour 488. Las células se observaron en un microscopio confocal usando una

longitud de onda de excitación de 488 nm y una de emisión de 494 nm. Asimismo, la fluorescencia se cuantificó con un citómetro de flujo FACScalibur instrument (Becton-Dickinson).

4.7 Ensayos de internalización

Las células se cultivaron en cubreobjetos y se expusieron al péptido βA_{25-35} (0, 10, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) por 1 hora. Posteriormente se lavaron con PBS y se fijaron por 20 minutos con formaldehído al 4% en PBS, se permeabilizaron por 30 minutos con 0.2% Triton X-100 en PBS y se bloquearon a 4°C toda la noche (PBS, 0.2% tritón X-100, 1% BSA, 1% suero fetal bovino). Las preparaciones se incubaron a temperatura ambiente toda la noche con 15 $\text{ng}/\mu\text{l}$ del anticuerpo anti- βA en PBS 0.2% Tritón x-100, 1% BSA, y después 2 horas con un anticuerpo secundario anti-cabra acoplado a rodamina (1:500) (Santa Cruz Biotechnology) en la misma solución, para después visualizarlo con un microscopio confocal usando una longitud de onda de excitación de 605 nm.

4.8 Inmunotransferencia

Después de tratar a las células por diferentes tiempos y con diversas concentraciones del péptido βA_{25-35} , se lavaron con PBS y se lisaron por 45 minutos a 4°C en buffer de lisis (150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.4, 1% Triton X-100, 0.5% NP40, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.2 mM ortovanadato de sodio, 10 mM benzamidina, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptina, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinina, y 250 μM de PMSF) en agitación. Este lisado se pasó 5 veces a través de un jeringa de insulina y se centrifugó a 2,500 r.p.m. por 5 minutos, se conservó el sobrenadante, al cual se le determinó la concentración de proteína por el método de BCA (del ácido bicinonílico) (Pierce). Las proteínas (10 μg) se fraccionaron en geles

desnaturalizantes de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 10% y se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa (BioRad) durante toda la noche a 4°C a 80 mA en buffer de transferencia que contenía 150 mM glicina, 25 mM Tris-HCl pH 8.8 y metanol al 20%. La transferencia de proteínas se verificó por la tinción con rojo de Ponceau (Sigma Chemicals). Las membranas se bloquearon durante toda la noche a 4°C en una solución de TBS (Tris-Buffered Saline, pH 7.6) -Tween-20 al 1% y leche al 5%. Se utilizaron los siguientes anticuerpos policlonales: anti-CALM, anti- β -adaptina, anti- α -adaptina y anti-Eps15, todos en diluciones 1:500 en TBS-Tween 20 al 1% y 5% de leche. El anticuerpo policlonal contra el RS-BI se utilizó en estas mismas condiciones. El anticuerpo anti-ratón anti-RS-AI se utilizó en una dilución 1:100 en TBS-Tween al 0.1%. Los anticuerpos secundarios anti-cabra IgG, el anti-conejo IgG y el anticuerpo anti-ratón todos conjugados con peroxidasa de rábano, así como el anticuerpo anti-rata acoplado a peroxidasa, se utilizaron en diluciones de 1:5000. La actividad de la peroxidasa de rábano se detectó con ayuda del kit ECL Plus de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El análisis densitométrico se realizó con ayuda del programa ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>; Open Source, Public Domain).

4.9 RT-PCR

Las células RAW y EOC se trataron con βA_{25-35} (0-200 μ g/ml) por 24 h en medio libre de suero. Se aisló RNA total con Trizol (Invitrogen Co) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los niveles de los transcritos de RNA de los RS-A y RS-B, así como de las proteínas endocíticas se determinaron por RT-PCR a partir de 2 μ g de RNA total usando el Kit GeneAmp RNA (Applied Biosystems). Los primers utilizados fueron: RS-AI sentido CTGGAC AACTG GTCCAC CT y antisentido TCCCCT TCTCTC CCTTTT GT. RS-BI sentido CAGGCT GTGGGA ACTCTA GC y

antisentido GAAAAA GCGCCA GATACA GC. α -adaptina sentido TTTGTG GGCATT GGACTG TA y antisentido AGACCC GTGCAT AACTGA CC. β -adaptina sentido CGCTCC TTCACC TACTCC TG y antisentido GTGAGT AAACGT CCCC GA AA. CALM sentido GGAAAA GCAGGC AGCATT AG y antisentido GCAGCT TGGATG TGCTGT TA. Clatrina sentido GTGAGC ACAGGA ATCTGC AA y antisentido CAATCA ACACCT GCACTG CT. Eps15 sentido TGATCC ATTTCA GCCTTT CC y antisentido CTGTTC TTCTTC CCGCTC AC. β -actina sentido GGGTCA GAAGGA TTCCTA TG y antisentido GGTCTC AACAT GATCTG GG.

4.10 Inmunoprecipitaciones

Las células se trataron con βA_{25-35} (20 μ g/ml) por 0, 5, 10, 15 y 30 minutos y se lisaron como se describió previamente. 500 μ g del lisado celular se incubaron con el anticuerpo policlonal anti- β -adaptina o anti-CALM (1:50) por 1 h a 4°C, y los complejos inmunes se precipitaron con Proteína G Sepharosa 4 Fast Flow toda la noche a 4°C. Las proteínas inmunoprecipitadas se lavaron con buffer de lisis y se resuspendieron en 40 μ l de buffer de carga-SDS. Se corrieron 20 μ l de muestra en geles desnaturizantes de poli(acrilamida) al 10%, que se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Se realizaron inmunoblots como se describió anteriormente, pero con diluciones de los anticuerpos 10 veces mayores.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Viabilidad celular

Se evaluó la viabilidad de las células en contacto con diferentes concentraciones del βA_{25-35} durante 24 horas por el método de azul tripano. El porcentaje de viabilidad en estos cultivos decrece hasta el 50% utilizando 200 $\mu g/ml$, tanto en células RAW como en células EOC (Figura 1).

La viabilidad se cuantificó tanto en células control con suero como en ausencia de este, debido a que los ensayos se hicieron siempre libres de suero para evitar la presencia de otros ligandos de los RS o de otros receptores. La viabilidad, además de otros parámetros evaluados en este estudio, no se vio afectada por la ausencia de suero.

El péptido control βA_{35-25} no afectó la viabilidad de las células RAW o EOC (datos no mostrados).

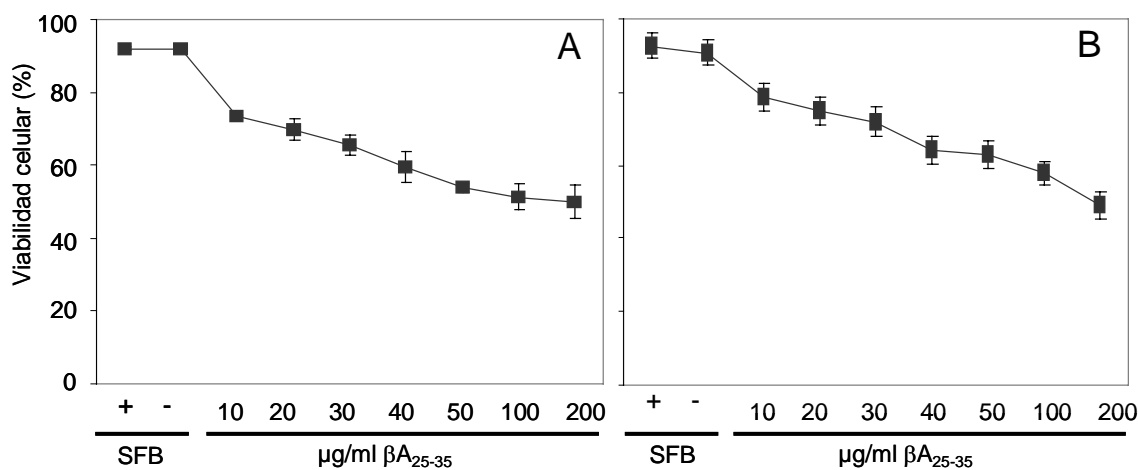


Fig. 1. Porcentajes de viabilidad de (A) células RAW y (B) células EOC tratadas con diferentes concentraciones de βA_{25-35} (0-200 $\mu g/ml$) por 24 horas. Después del tratamiento, las células fueron recuperadas y su viabilidad fue cuantificada por el método de exclusión de azul tripano. Los valores están expresados como el promedio de 3 experimentos diferentes \pm desviación estándar. Suero fetal bovino (SFB).

Otros autores han reportado porcentajes de viabilidad de células tratadas con el βA_{25-35} menores a los obtenidos en el presente trabajo. Liu y Zhao (2004) reportan un 50% de viabilidad de neuronas de hipocampo tratadas por 24 horas con 50 $\mu\text{g/ml}$ de este péptido, y Zeng et al. (2004) reportan el mismo porcentaje, también en neuronas de hipocampo pero con una concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$ de βA_{25-35} . En células PC12 se ha observado un descenso del 50% en la viabilidad después de 36 horas de tratamiento con 25 μM de βA_{25-35} (Jang et al., 2004), y en la línea celular BV2 (microglia), se alcanza un 50% de viabilidad después de 24 horas de tratamiento con 10 $\mu\text{g/ml}$ del péptido (Jang et al., 2005).

Se observó que las células EOC y RAW fueron particularmente resistentes al daño provocado por el péptido βA_{25-35} al comparar nuestros resultados con lo reportado en la literatura tanto en la viabilidad, como en el estrés oxidativo y la apoptosis, que se describirán más adelante. Este hecho puede explicarse por la función de defensa y protección que realizan estos tipos celulares dentro del organismo, por lo que están expuestos de manera habitual a diferentes agentes agresores y deben poseer mecanismos de autodefensa al estrés oxidativo muy eficientes. De hecho, se ha encontrado que las células de microglia expresan un fuerte sistema de defensa contra el daño oxidativo basado en el glutatión (Hirrlinger et al., 2000 y 2002).

5.2 Estrés oxidativo

Para determinar si las células en contacto con el péptido βA_{25-35} se encontraban en un estado de estrés oxidativo, se utilizó el reactivo 6-carboxi- H_2DCFA que es una molécula que pasa fácilmente a través de la membrana celular y reacciona con las especies reactivas de oxígeno (ROS). En la figura 2A se muestra la intensidad de fluorescencia en unidades relativas de células RAW expuestas a concentraciones crecientes del βA_{25-35} . Puede observarse que en las

células RAW control sin suero existe una fluorescencia basal, que es similar a la fluorescencia de las células control con suero. Una vez expuestas al péptido βA_{25-35} , la fluorescencia de las células RAW aumenta de forma gradual pero no alcanza los niveles que se observan con inductores artificiales de estrés oxidativo como el TBH (datos no mostrados). En las células EOC tratadas con diferentes concentraciones del βA_{25-35} (0-200 $\mu g/ml$) por 24 horas en ausencia de suero, junto con 20 μM del 6-carboxi- H_2DCFA se observa la misma tendencia en el incremento de la fluorescencia (Figura 2B).

El hecho de que las células RAW y EOC se encuentren en un estado de estrés oxidativo producido por el βA_{25-35} , es consistente con reportes previos en los que se observa que este péptido produce niveles altos de ROS en neuronas corticales de rata (Xiao et al., 2002) y en neuronas de hipocampo en cultivo (Zeng et al., 2004).

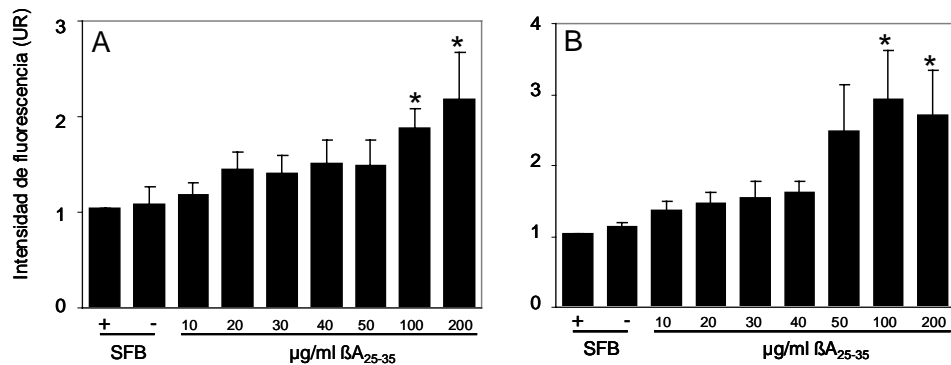


Fig. 2. Intensidad de fluorescencia analizada por citometría de flujo de (A) células RAW y (B) células EOC, expuestas al βA_{25-35} (0-200 $\mu g/ml$) por 24 horas. Monocapas de células RAW y EOC fueron crecidas en presencia de βA_{25-35} y expuestas a (A) 1 μM o (B) 20 μM 6-carboxi- H_2DCFA , lavadas, recuperadas y resuspendidas en PBS. Los valores están expresados como el promedio de 3 experimentos diferentes \pm desviación estándar. * $p < 0.05$ vs. control. Suero fetal bovino (SFB).

5.3 Apoptosis

El β A puede desencadenar procesos apoptóticos en neuronas expuestas a este compuesto (Anderson et al., 1996). En este estudio se evaluó por medio de la técnica de TUNEL, la apoptosis provocada por la exposición a concentraciones crecientes de β A₂₅₋₃₅ en células RAW y EOC por 24 horas, con el fin de evaluar si éste péptido estaba ejerciendo su efecto tóxico a este nivel en las células estudiadas.

Se observaron células apoptóticas en ambas líneas celulares desde las concentraciones de 10 μ g/ml y 20 μ g/ml (Fig. 3D) incluyendo cuerpos apoptóticos a partir de los 40 μ g/ml (Fig. 3G) hasta los 200 μ g/ml, asociados a un aumento de la fluorescencia verde (Fig. 3C, F e I). Sin embargo, a diferencia de las neuronas, los macrófagos (RAW) y las células de microglia (EOC) necesitan cantidades más altas del β A para que se desencadene la muerte apoptótica (Peng et al., 2002; Jang et al., 2004; Ding et al., 2006).

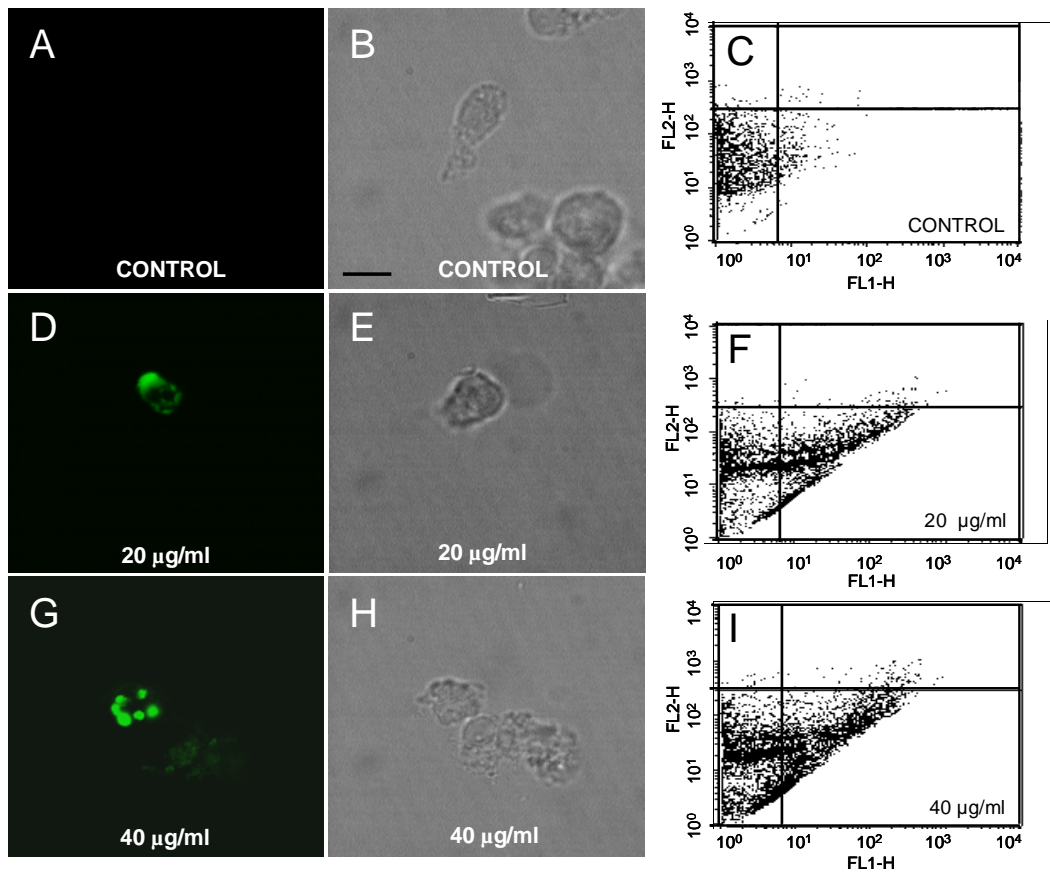


Fig. 3. Imágenes de células RAW apoptóticas bajo un estado de estrés oxidativo producido por el βA_{25-35} . Las células fueron tratadas por 24 horas con βA_{25-35} (0-40 $\mu g/ml$) y analizadas con la técnica de TUNEL. Imágenes de microscopía confocal de (A) células control, células expuestas a (D) 20 $\mu g/ml$ y (G) 40 $\mu g/ml$ de βA_{25-35} , muestran cuerpos apoptóticos observados por fluorescencia verde. (B), (E) y (H) Imágenes de transmisión de las células correspondientes. Gráficas de citometría de flujo de (C) células control y (F,I) células expuestas a 20 y 40 $\mu g/ml$ de βA_{25-35} . La barra en la imagen corresponde a 10 μm .

5.4 Internalización del péptido β -amiloide

Se ha reportado con anterioridad la internalización del β A en células CHO y microglia transfectadas con el RS (Parece et al., 1996). El papel que juegan los RS en la internalización del β A es avalado por otros estudios que han mostrado que tanto el RS-AI como el RS-BI son esenciales en la activación de la microglia y la captura de este péptido (El Khoury et al., 1996; Paresce et al., 1997; Chung et al., 1999; Hussemann et al., 2001; Hussemann y Silverstein, 2001; Webster et al., 2000 y 2001).

En este trabajo se evaluó la internalización del β A₂₅₋₃₅ mediante ensayos de inmunofluorescencia con un anticuerpo anti- β A y un anticuerpo secundario conjugado con rodamina en células RAW y EOC expuestas a diferentes concentraciones del β A₂₅₋₃₅ (0-200 μ g/ml) por 1 hora. En estos ensayos se pudo observar que las células RAW y EOC internalizaron al péptido β A₂₅₋₃₅ y que éste péptido se encontraba distribuido en todo el citoplasma.

Se observó una mayor fluorescencia a concentraciones más altas del péptido, sin embargo a los 200 μ g/ml la fluorescencia se pierde. La exposición a concentraciones altas del β A₂₅₋₃₅ provoca que la célula pierda la capacidad de internalizar este péptido a través de los RS (Figuras 4 y 5). Entre los mecanismos posibles que explican este fenómeno está el que modificaciones en los lípidos de membrana puedan afectar la función normal de los RS. También es posible que a causa del estrés oxidativo, se den modificaciones en la estructura del receptor o bien en la de alguna de las proteínas accesorias para la endocitosis de este receptor, lo cual puede afectar la organización en conjunto de la maquinaria endocítica.

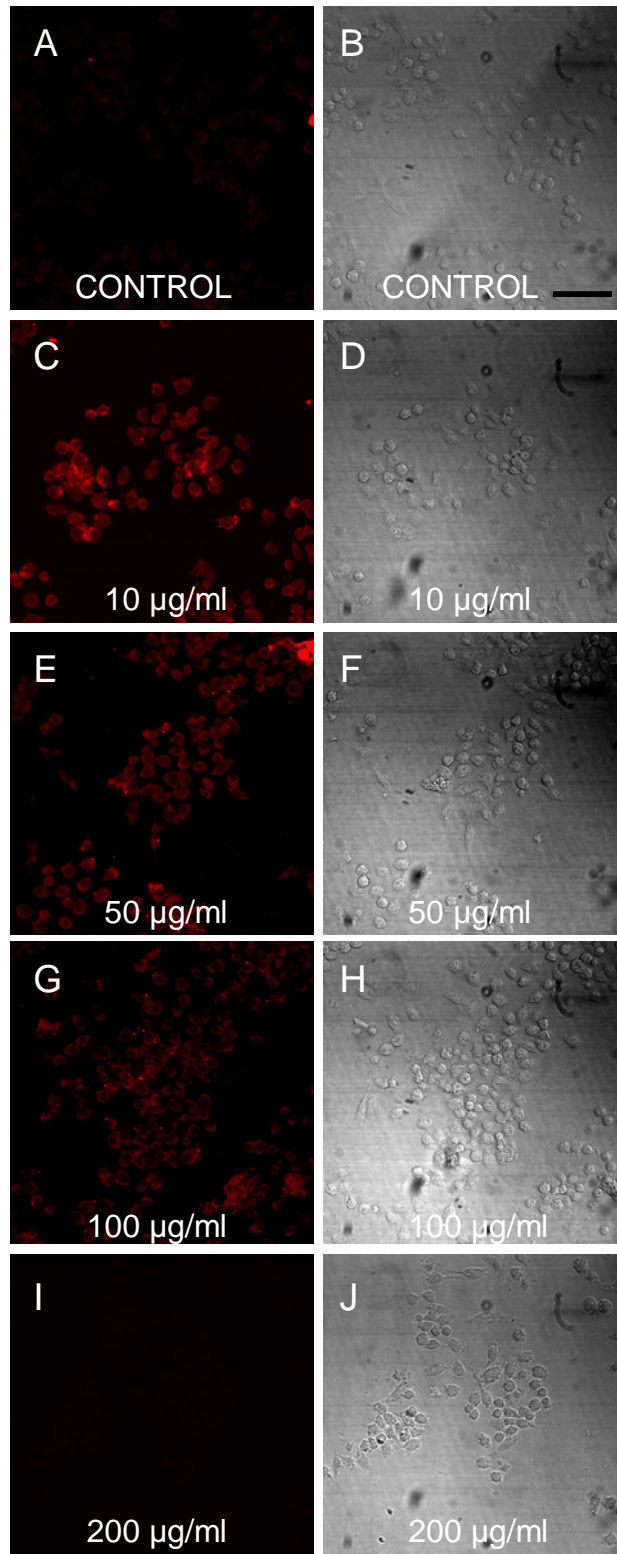


Fig. 4. Imágenes de microscopía confocal de la internalización del βA_{25-35} . (A), (C), (E), (G) e (I) muestran a células RAW después de 1 hora de exposición a diferentes concentraciones de βA_{25-35} (0-200 $\mu\text{g/ml}$) que fueron tratadas con un anticuerpo anti- βA y un anticuerpo secundario acoplado a rodamina. (B), (D), (F), (H) y (J). Imágenes de microscopía de transmisión. La barra en la imagen corresponde a 50 μm .

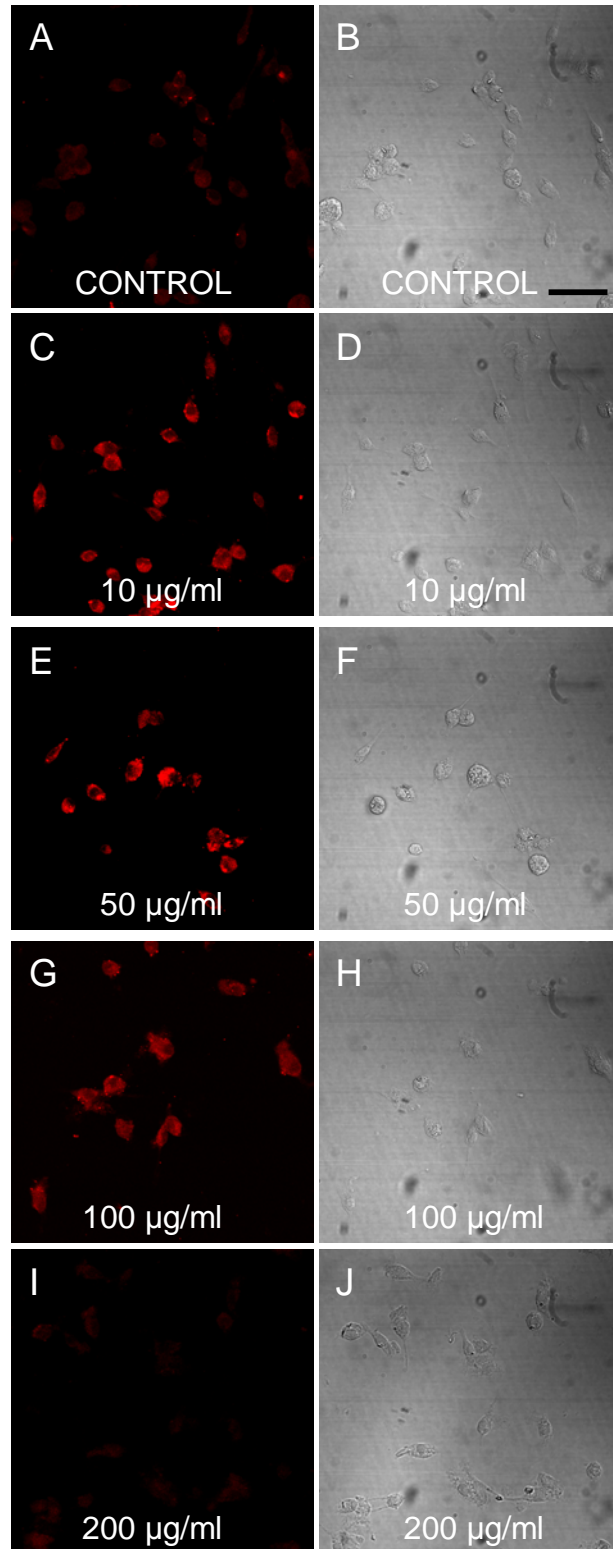


Fig. 5. Imágenes de microscopía confocal de la internalización del βA_{25-35} . (A), (C), (E), (G) e (I) muestran a células EOC después de 1 hora de exposición a diferentes concentraciones de βA_{25-35} (0-200 $\mu\text{g/ml}$) que fueron tratadas con un anticuerpo anti- βA y un anticuerpo secundario acoplado a rodamina. (B), (D), (F), (H) y (J). Imágenes de microscopía de transmisión. La barra en la imagen corresponde a 50 μm .

5.5 Niveles de expresión de proteínas endocíticas

Hasta el momento existen muy pocos datos acerca de la influencia que pudiera tener el β A sobre las proteínas de la maquinaria endocítica celular, todos estos obtenidos en neuronas de pacientes con enfermedad de Alzheimer (Yao et al., 1998, 1999, 2000 y 2003). En estos trabajos se ha observado un descenso en los niveles de AP180, α -adaptina y dinamina en neuronas de la neocorteza que podrían explicar la pérdida sináptica de los pacientes con Alzheimer al impedir el reciclamiento de las vesículas sinápticas cargadas de neurotransmisores. Sin embargo, no existe información para células de glia y microglia, encargadas de la endocitosis y degradación del β A.

En este trabajo estudiamos por primera vez el efecto del estrés oxidativo provocado por la internalización del β A₂₅₋₃₅ (Fig. 2) en la expresión de proteínas involucradas en el proceso de endocitosis mediada por receptor en líneas celulares que poseen a los RS y que de forma natural están en contacto con los depósitos de este péptido. Para estudiar este fenómeno, se analizaron los niveles de expresión de las proteínas α -adaptina, β -adaptina, CALM y eps15, involucradas en la endocitosis mediada por receptor, así como la expresión del RS-AI y RS-BI.

Se utilizaron extractos protéicos totales de células RAW y EOC tratadas por 24 horas con diferentes concentraciones del péptido inverso β A₃₅₋₂₅ (0-200 μ g/ml) como ensayos control. En las inmunotransferencias realizadas no se detectaron cambios en los niveles de la α -adaptina, β -adaptina, CALM, eps15, RS-AI o RS-BI (Figura 6A y 6C).

De igual forma, se estudiaron los niveles de expresión de las mismas proteínas y de los RS en células RAW y EOC tratadas con el péptido β A₂₅₋₃₅ (0-200 μ g/ml) por 24 horas. En estos ensayos observamos una correlación directa entre la concentración del β A₂₅₋₃₅ empleada y una disminución en la expresión de la β -adaptina (Figura 6B y 6D). Los valores de densitometría mostrados en la Figura 7,

muestran claramente un decremento en el nivel de β -adaptina a una concentración moderada del βA_{25-35} (50 $\mu\text{g/ml}$).

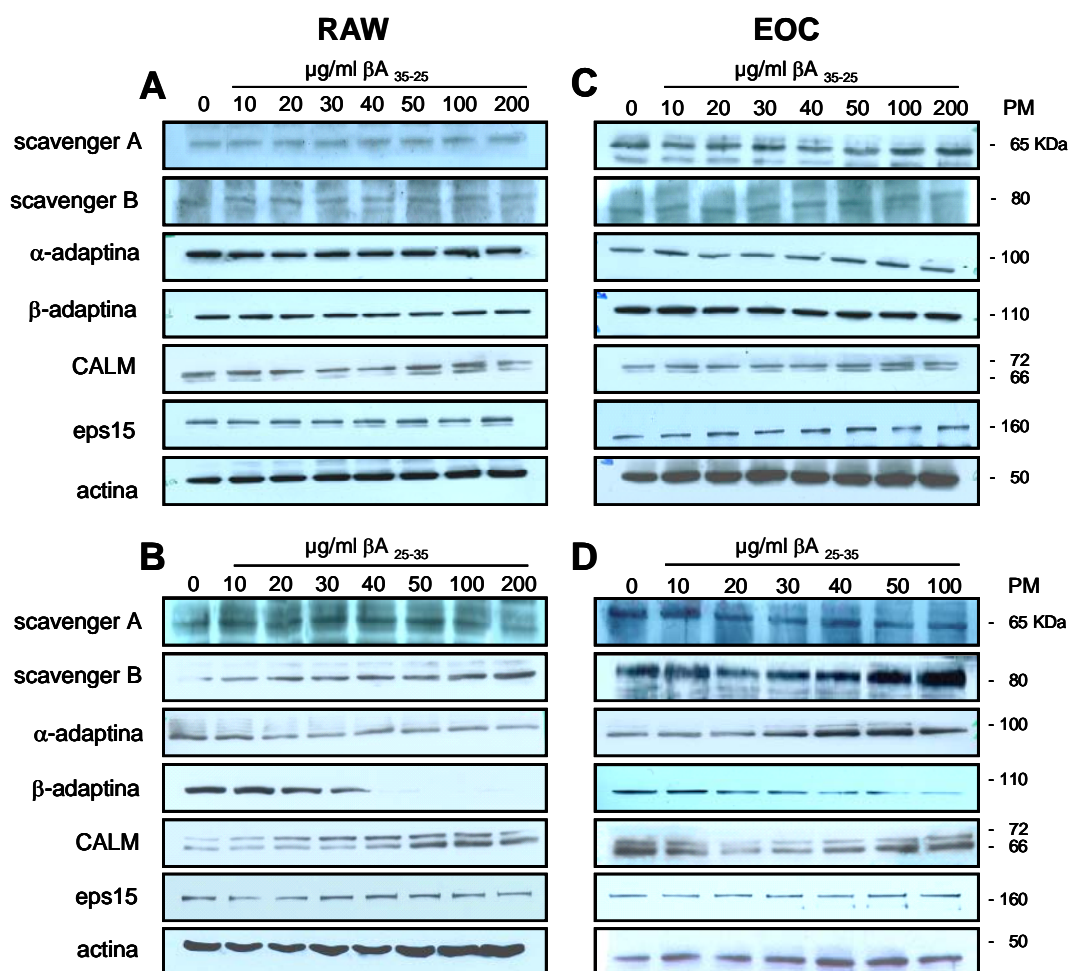


Fig. 6. Niveles de expresión de las proteínas endocíticas α - y β -adaptina, CALM, eps15, RS-AI y RS-BI. (A) Células RAW tratadas con diferentes concentraciones (0-200 $\mu\text{g/ml}$) de βA_{35-25} (péptido control), (B) células RAW incubadas con βA_{25-35} (0-200 $\mu\text{g/ml}$), (C) células EOC tratadas con βA_{35-25} , y (D) células EOC expuestas a βA_{25-35} . Todos los experimentos fueron realizados en medio libre de suero durante un periodo de 24 horas. Experimentos representativos de al menos tres ensayos independientes.

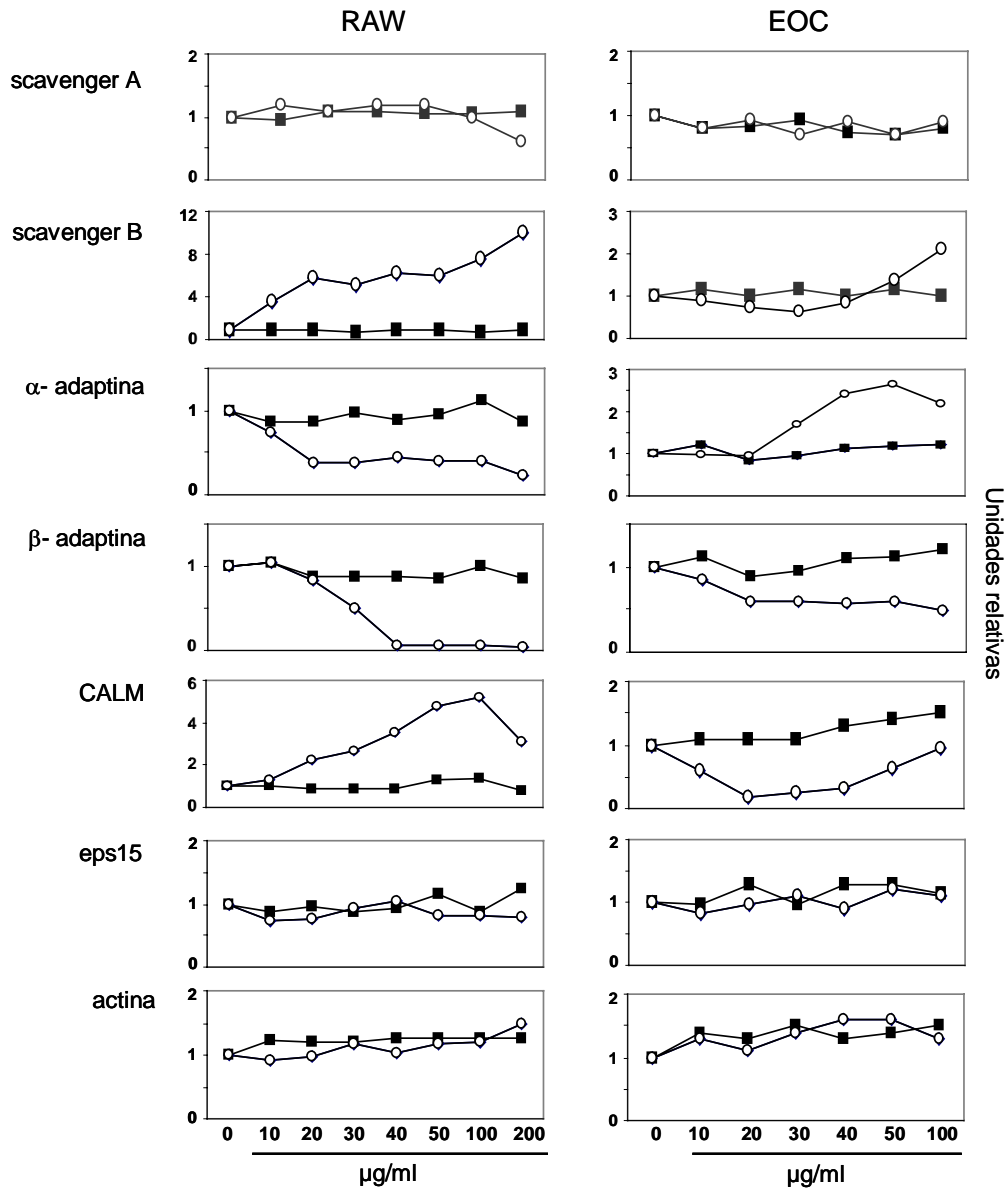


Fig. 7. Valores densitométricos expresados como unidades relativas de los inmunoblots de la Figura 6. Experimentos representativos de al menos tres ensayos independientes. Ensayos control (βA_{35-25}) (■) y ensayos con el βA_{25-35} (○).

La importancia de la β -adaptina recae en que posee dos sitios de unión a clatrina: un dominio caja de clatrina en la región de la bisagra y un sitio en la región de la oreja (Owen et al., 2000). La β -adaptina interviene también en la selección de la molécula cargo de la vesícula (Rapoport et al., 1998). El hecho de que los niveles de expresión de la proteína β -adaptina disminuyan puede ser una de las razones por las que las células en contacto con el βA_{25-35} sean incapaces de endocitarlo cuando se encuentra en altas concentraciones.

En células RAW y EOC tratadas por 24 horas con βA_{25-35} , se observó también un aumento en los niveles de expresión de la proteína CALM y del RS-BI de acuerdo a la concentración del βA (Figura 6B y D). En células EOC se encontró un aumento en la α -adaptina conforme a la concentración del βA_{25-35} . Nosotros pensamos que los cambios en la expresión de estas proteínas accesorias, así como en el RS-BI, son mecanismos compensatorios que ejerce la célula en respuesta al descenso en los niveles de β -adaptina durante un estado de estrés oxidativo.

La proteína CALM es una proteína monomérica importante para el proceso de endocitosis porque posee sitios de unión tanto para clatrina como para AP-2 (Tebar et al., 1999). El extremo N-terminal de CALM posee un dominio ANTH (AP180N-terminal homology), que es importante para su unión con membranas que contengan $PtdIns(4,5)P_2$ (Ford et al., 2001). El extremo C-terminal de AP180/CALM contiene sitios de unión a clatrina que favorecen el ensamblaje de la clatrina (Hao et al., 1999). El extremo C-terminal puede interaccionar también con la α - y β -adaptinas del complejo AP2. Por ensayos in vitro se sabe que la formación de un complejo entre AP2 y CALM promueve el ensamblaje de clatrina, de mejor forma que cada una de estas proteínas por si misma, lo que lleva a pensar que hay un efecto sinérgico entre CALM y AP2 para el ensamblaje de la clatrina (Hao et al., 1999).

Con el fin de conocer el periodo de tiempo necesario para detectar el descenso en los niveles de expresión de la proteína β -adaptina se realizaron

ensayos a 1 y 4 horas, en los que se incluyeron LDL-Ac (40 $\mu\text{g/ml}$) por ser otro de los ligandos de los RS. Se observó un aumento en los niveles de expresión de la β -adaptina en respuesta a ambos ligandos después de una hora de tratamiento. Sin embargo, la β -adaptina disminuyó notablemente a las 4 horas en células tratadas con βA_{25-35} (50 $\mu\text{g/ml}$) pero se mantiene elevada con LDL-Ac. Este resultado es relevante por el hecho de que ambos ligandos son reconocidos por los RS, pero solo uno de ellos es capaz de afectar los niveles de β -adaptina. Esto puede estar relacionado con el hecho de que el βA_{25-35} es capaz de iniciar y mantener un estado de estrés oxidativo, en contraste con las LDL-Ac. En cuanto a la expresión de la proteína CALM, reportamos un aumento en respuesta a ambos ligandos después de 1 y 4 horas de exposición, por lo que podemos concluir que esta proteína es importante durante el proceso de endocitosis de los RS durante un estado de estrés oxidativo (Figura 8).

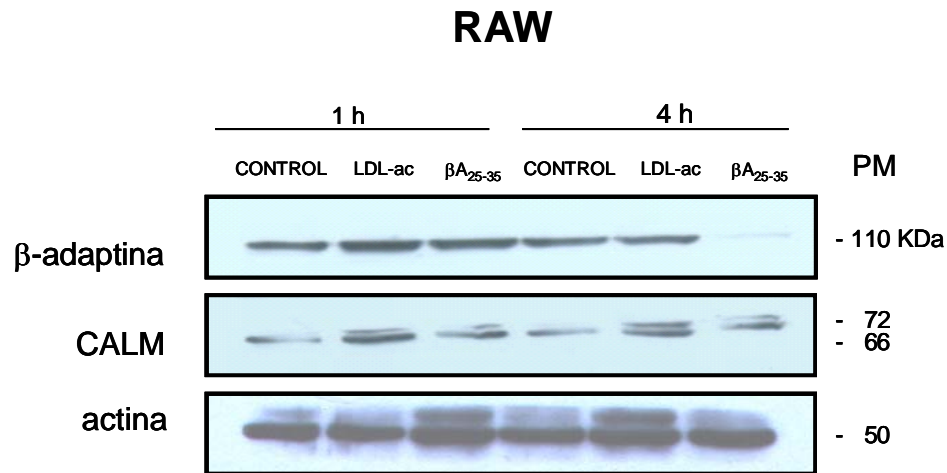


Fig. 8. Experimentos a corto plazo que muestran los niveles de expresión de la β -adaptina y CALM de células RAW tratadas por 1 y 4 horas con LDL-Ac (40 $\mu\text{g/ml}$) y βA_{25-35} (50 $\mu\text{g/ml}$). Imágenes representativas de al menos 3 experimentos independientes.

5.6 RT-PCR

En este trabajo se reporta por primera vez los efectos de la exposición al βA_{25-35} sobre los niveles de los transcritos de RNAm de la α -adaptina, β -adaptina, CALM, clatrina, RS-AI y RS-BI. Por ensayos de RT-PCR se observó que en general no existen cambios en la expresión de estos genes en células RAW y EOC (Figura 9).

Si bien en los ensayos de inmunotransferencia encontramos un importante descenso en la β -adaptina en ambas líneas celulares en respuesta al estrés oxidativo; los niveles de expresión del RNAm no se modificaron. Nuestros resultados indican que posiblemente el descenso en los niveles de la β -adaptina esté mediado por un mecanismo a un nivel traduccional o post-traduccional.

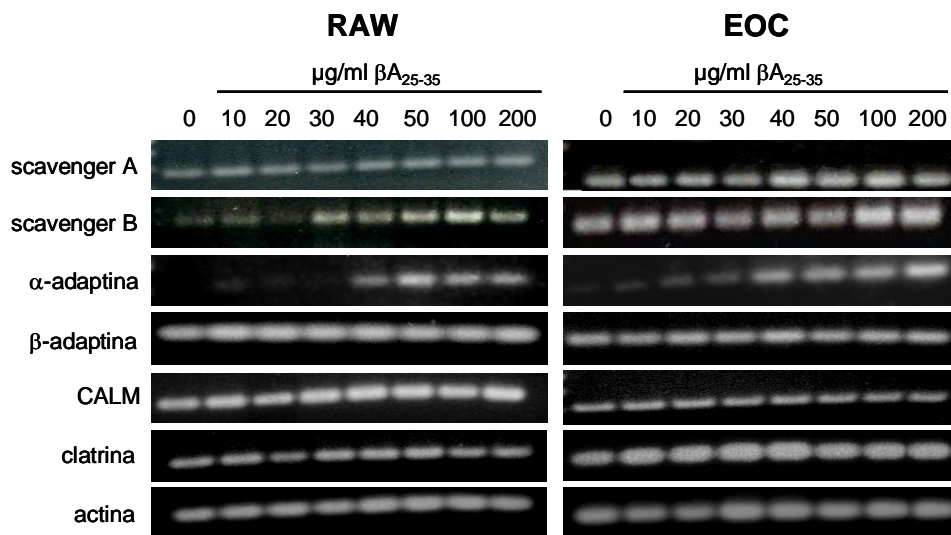


Fig. 9. Geles teñidos con bromuro de etidio que ejemplifican los ensayos de RT-PCR de α -y β -adaptina, CALM, clatrina, RS-AI y RS-BI de células RAW y EOC tratadas por 24 horas con βA_{25-35} (0-200 $\mu\text{g/ml}$). Imágenes representativas de al menos 3 experimentos independientes.

Sin embargo, se observó un aumento en la expresión del RNAm de la α -adaptina y del RS-BI de acuerdo a la concentración del βA_{25-35} al que fueron expuestas las células RAW y EOC (Figura 9). Nosotros pensamos que este fenómeno es una respuesta de la célula para tratar de hacer mas eficiente la endocitosis del ligando, como un mecanismo compensatorio al descenso en los niveles de la proteína β -adaptina.

5.7 Interacción proteína-proteína

Aunque se conocen con cierto detalle las interacciones entre las diversas proteínas de la maquinaria de endocitosis en relación a algunos receptores, no se tienen datos específicos de este fenómeno en cuanto a los RS. Con el fin de realizar experimentos más detallados de los cambios en las interacciones entre las proteínas de endocitosis mediada por clatrina que se pudieran dar por efecto del estrés oxidativo producido por el βA_{25-35} , se realizaron ensayos de inmunoprecipitación utilizando el anticuerpo contra β -adaptina y proteína G-Sepharosa. Esta proteína forma parte del complejo AP-2, que es fundamental para la endocitosis mediada por clatrina, al unir al receptor con las cubiertas de clatrina.

Los ensayos se realizaron en células RAW y EOC a 0, 5, 10, 15 y 30 minutos, a una sola concentración del βA_{25-35} (20 μ g/ml). Se encontró que la proteína β -adaptina inmunoprecipita junto con la α -adaptina y el RS-AI, incluso en ausencia del ligando. En contraste, el RS-BI sólo inmunoprecipita junto con la β -adaptina cuando es estimulado por la presencia del βA_{25-35} (Figura 10A y 11). De estos ensayos se puede concluir que la β -adaptina interacciona con la α -adaptina, lo cual es apoyado por diversos trabajos (Heuser y Keen, 1988; Pearse et al., 2000) que muestran que estas dos proteínas forman parte del complejo AP-2.

En este trabajo se reporta por primera vez que la β -adaptina interacciona directamente con el RS-AI y con el RS-BI. La interacción entre la β -adaptina y el

RS-AI puede considerarse como un complejo de proteínas preformado que no cambia en respuesta al ligando (Figuras 10A y 11). Por el contrario, la interacción entre la β -adaptina y el RS-BI se lleva a cabo sólo en presencia del ligando, en este caso β A, y esta interacción proteína-proteína aumenta con respecto a la concentración del β A₂₅₋₃₅ a la que son expuestas tanto las células RAW como las células EOC (Figuras 10A y 11).

Se realizó un ensayo similar en células RAW, inmunoprecipitando con un anticuerpo anti-CALM, y se observó que al parecer esta proteína no coinmunoprecipita con ninguna otra de las proteínas de la maquinaria endocítica ni con los RS (Figura 10B). Sin embargo, observamos un aumento en sus niveles de expresión con respecto al tiempo, lo cual es consistente con los ensayos realizados en periodos de 1 y 4 horas en los que se observó un aumento de esta proteína en respuesta a la estimulación con ligandos (Figura 8). El hecho de no detectar una interacción entre la proteína CALM y las adaptinas puede deberse a que las interacciones proteína-proteína que establece la proteína CALM con las adaptinas puedan ser de baja afinidad.

RAW

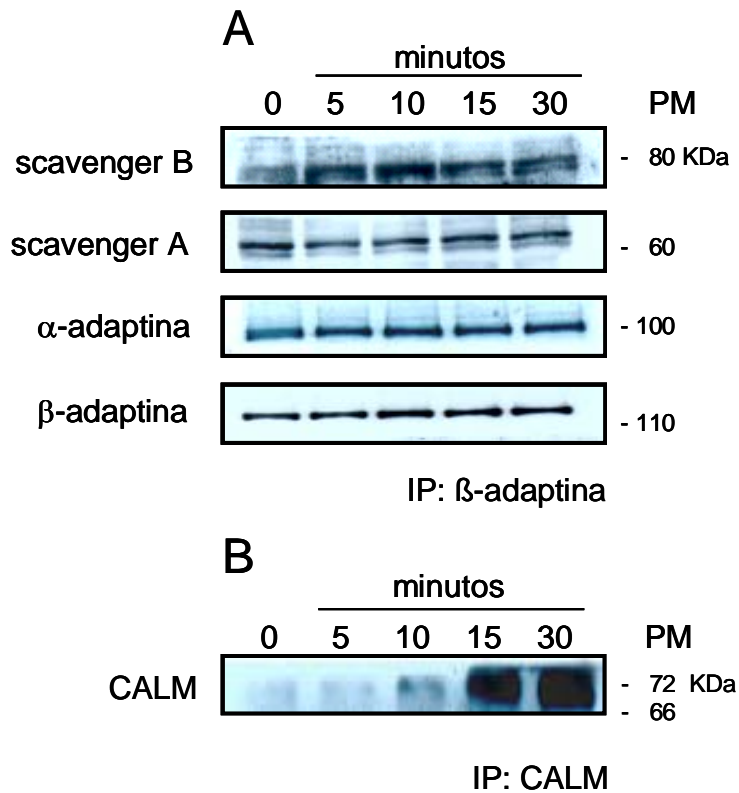


Fig. 10. Ensayos de inmunoprecipitación utilizando anticuerpos (A) anti- β -adaptina y (B) anti-CALM de células RAW expuestas al βA_{25-35} (20 $\mu g/ml$) por 0, 5, 10, 15 y 30 minutos en medio libre de suero. Inmunoblots representativos de al menos 3 experimentos independientes.

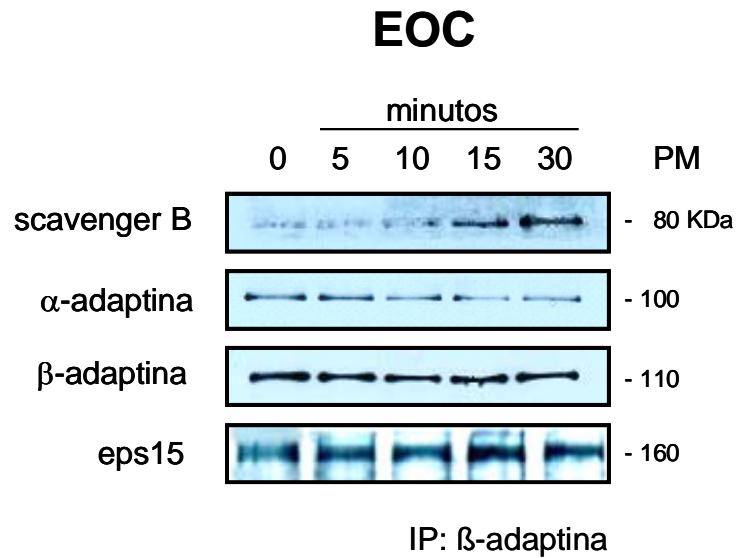


Fig. 11. Ensayos de inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo anti- β -adaptina de células EOC expuestas al βA_{25-35} (20 μ g/ml) por 0, 5, 10, 15 y 30 minutos en medio libre de suero. Inmunoblots representativos de al menos 3 experimentos independientes.

6. CONCLUSIONES

Resultados previos de nuestro grupo, en los que se emplearon células CHO transfectadas con el RS-AI, así como con células C6 y PC12 que poseen de manera natural al RS-BI, mostraron que el estrés oxidativo inducido con ter-butil-hidroperóxido (TBH) permite la unión de ^{125}I -LDL-Ac a estos receptores, pero inhibe su internalización.

En el presente trabajo utilizamos el fragmento 25-35 del péptido β -amiloide (βA_{25-35}) como inductor de estrés oxidativo y como un ligando natural para el RS-AI y el RS-BI y estudiamos los cambios en los niveles de expresión de varias proteínas adaptadoras importantes en la organización de la maquinaria endocítica en células de microglia y macrófagos.

En resumen, nosotros encontramos que la proteína β -adaptina es parte importante de la maquinaria protéica de la endocitosis mediada por clatrina y en particular para los RS. Su nivel de expresión disminuye notablemente en respuesta a la exposición al péptido βA_{25-35} , molécula que media un estado de estrés oxidativo. La unión de ligandos como las LDL-Ac, que no promueven un estado de estrés oxidativo en concentraciones bajas, no afectan los niveles de la β -adaptina independientemente del tiempo de incubación.

Por otra parte, la proteína CALM, que ejerce un efecto sinérgico con el complejo AP2 para la formación del pozo cubierto aumenta su expresión, posiblemente como un mecanismo compensatorio a la disminución de β -adaptina.

Aunque existen varios reportes de que en algunos casos la célula puede prescindir del complejo AP2 para la formación de la vesícula cubierta de clatrina y la endocitosis de ciertos receptores (Conner y Schmid, 2003; Motley et al., 2003; Rappoport et al., 2003) de acuerdo a nuestros resultados el complejo AP2 es fundamental para la endocitosis de los RS, en particular para el RS-B que interacciona con este complejo en respuesta al βA_{25-35} .

Es interesante mencionar que aunque no existe similitud entre el RS-A y el RS-B, ambos receptores disminuyen su capacidad endocítica frente a concentraciones altas del péptido β A. Como se ha visto en trabajos previos de nuestro laboratorio, la unión de ligandos no se modifica por el estrés oxidativo, por lo que pensamos que es probable que la incapacidad de internalización de los ligandos sea una consecuencia de la pérdida en la organización de la maquinaria endocítica, secundaria al establecimiento de un estado de estrés oxidativo y no de la posibilidad de que los RS están afectados per se. La disminución de la β -adaptina parece jugar entonces, un papel clave en la explicación de la pérdida de la capacidad endocítica del β A₂₅₋₃₅ por medio de los RS.

Tomando en cuenta los ensayos de RT-PCR que muestran que los niveles de RNAm de la β -adaptina son sintetizados de forma normal bajo condiciones de estrés oxidativo, nuestros resultados dan cuenta de la posibilidad de que este estado de emergencia puede estar afectando la traducción de la proteína, o directamente su estructura.

De esta forma, nuestros hallazgos identifican a la proteína β -adaptina como una molécula clave en el procesamiento del β A, que podría ayudarnos a entender los mecanismos involucrados en la acumulación de este péptido en el espacio extracelular de neuronas de pacientes con enfermedad de Alzheimer.

Futuras investigaciones podrían estar encaminadas a: a) detallar la interacción de la β -adaptina con otras proteínas de endocitosis y con los RS, b) estudiar el mecanismo por el cual los niveles de la proteína β -adaptina y no así su transcrito disminuyen en respuesta a la exposición al β A₂₅₋₃₅, c) estudiar las características estructurales de la β -adaptina, d) evaluar el estado de fosforilación en el que se encuentra esta proteína en respuesta al β A₂₅₋₃₅ y e) estudiar los cambios en los niveles de expresión de la proteína CALM observados en este trabajo.

7. REFERENCIAS

Acton, S.L., Scherer, P.E., Lodish, H.F. y Krieger, M. (1994) Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J. Biol. Chem.* 269: 21003-21009.

Aguilar-Gaytán, R. y Mas-Oliva, J. (2002) El receptor "pepenador" y su importancia en procesos amiloidóticos. *Gaceta Médica de México.* 138: 445-460.

Aguilar-Gaytán, R. y Mas-Oliva, J. (2003) Oxidative stress impairs endocytosis of the scavenger receptor class A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305: 510-7.

Aguilar, R.C., Ohno, H., Roche, K.W. y Bonifacio, J.S. (1997) Functional domain mapping of the clathrin-associated adaptor medium chains mu1 and mu2. *J. Biol. Chem.* 272: 27160-27166.

Anderson, A.J., Su, J.H. y Cotman, C.W. (1996) DNA damage and apoptosis in Alzheimer's disease: colocalization with c-jun immunoreactivity, relationship to brain area, and effect of postmortem delay. *J. Neurosci.* 16: 1710-1719.

Babitt, J., Trigatti, B., Rigotti, A., Smart, E.J., Anderson, R.G.W., Xu, S. y Krieger, M. (1997) Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. *J. Biol. Chem.* 272: 13242-13249.

Bamberger, M.A., Harris, M.E., McDonald, D.R., Hussemann, J. y Landreth, G.E. (2003) A cell surface receptor complex for fibrillar β -amyloid mediates microglial activation. *J. Neurosci.* 23: 2665-2674.

Bell, M.D., Lopez-Gonzalez, R., Lawson, L., Highes, D., Fraser, I., Gordon, S. y Perry, V.H. (1994). Upregulation of the macrophage scavenger receptor in response to different forms of injury in the CNS. *J. Neurocytol.* 23: 605-613.

Bornemann, K.D., Wiederhold, K.H., Pauli, C., Ermini, F., Stalder, M. y Schnell, L. (2001) A β - induced inflammatory processes in microglia cells of APP23 transgenic mice. *Am. J. Pathol.* 158: 63-73.

Busciglio, J., Gabuzda, D.H., Matsudaira, P. y Yankner, B.A. (1993) Generation of β -amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 2092-2096.

Chung, H., Brazil, M.I., Soe, T.T. y Maxfield, F.R. (1999) Uptake, degradation, and release of fibrillar and soluble forms of Alzheimer's amyloid beta-peptide by microglial cells. *J. Biol. Chem.* 274: 32301-32308.

Conner, S.D. y Schmid, S.L. (2003) Differential requirements for AP-2 in clathrin-mediated endocytosis. *J. Cell Biol.* 162: 773-779.

Ding, X., MacTavish, D, Kar, S., Jhamandas, J.H. (2006) Galanin attenuates beta-amyloid toxicity in rat cholinergic basal forebrain neurons, *Neurobiol. Dis.* 21: 413-420.

El Khoury, J., Hickman, S.E., Thomas, C.A., Cao, L., Silverstein, S.C. y Loike, J.D. (1996) Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils. *Nature* 382: 716-719.

Esbach, S., Stins, M.F., Brouwer, A., Roholl, P.J., van Berkel, T.J. y Knook, D.L. (1994) Morphological characterization of scavenger receptor-mediated processing of modified lipoproteins by rat liver endothelial cells. *Exp. Cell Res.* 210: 62-70.

Ford, M.G., Pearse, B.M., Higgins, M.K., Vallis, Y., Owen, D.J., Gibson, A., Hopkins, C.R., Evans, P.R. y McMahon, H.T. (2001) Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P₂ and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes. *Science* 291: 1051-1055.

Gilotte- Taylor, K., Boullier, A., Witztum, J.L., Steinberg, D. y Quehenberger, O. (2001) Scavenger receptor class B type I as a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J. Lipid. Res.* 42: 1474-1482.

Glenner, G.G. y Wong, C.W. (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120: 885-890

Guaderrama-Díaz, M., Solis, C.F., Velasco-Loyden, G., Lacleste, J.P. y Mas-Oliva, J. (2005) Control of scavenger receptor-mediated endocytosis by novel ligand of different length. *Mol. Cell Biochem.* 271: 123-132.

ter Haar, E., Harrison, S.C. y Kirchhausen, T. (2000) Peptide-in-groove interactions link target proteins to the beta-propeller of clathrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 1096-1100.

Hansen, G.H., Niels-Christiansen, L.L., Immerdal, L. y Danielsen, E.M. (2003) Scavenger receptor class B type I (SR-BI) in pig enterocytes: trafficking from the brush border to lipid droplets during fat absorption. *Gut* 52: 1424-1431.

Hao, W., Luo, Z., Zheng, L., Prasad, K. y Lafer, E.M. (1999) AP180 and AP-2 interact directly in a complex that cooperatively assembles clathrin. *J. Biol. Chem.* 274: 22785-22794.

Hirrlinger, J., Gutterer, J.M., Kussmaul, L., Hamprecht, B. y Dringen, R. (2000) Microglial cells in culture express a prominent glutathione system for the defense against reactive oxygen species. *Dev. Neurosci.* 22: 384-392.

Hirrlinger, J., Resch, A., Gutterer, J.M., y Dringen, R. (2002) Oligodendroglial cells in culture effectively dispose of exogenous hydrogen peroxide: comparison with cultured neurons, astroglial and microglial cells. *J. Neurochem.* 82: 635-644.

Heuser, J.E. y Keen, J. (1988) Deep-etch visualization of proteins involved in clathrin assembly. *J. Cell Biol.* 107: 877-886.

Honda, M., Akiyama, H., Yamada, Y., Kondo, H., Kawabe, Y., Takeya, M., Takahashi, K., Suzuki, H., Doi, T., Sakamoto, A., Ookawara, S., Mato, M., Gough, P.J., Greaves, D.R., Gordon, S., Kodama, T. y Matsushita, M. (1998) Immunohistochemical evidence for a macrophage scavenger receptor in Mato cells and reactive microglia of ischemia and Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245: 734-740.

Hussain, M.M., Maxfield, F.R., Mas-Oliva, J., Tabas, I., Ji, Z.S., Innerarity, T.L. y Mahley, R. W. (1991) Clearance of chylomicron remnants by the low density lipoprotein receptor-related protein/ α 2-macroglobulin receptor. *J. Biol. Chem.* 266: 13936-13940.

Hussemann, J., Loike, J.D., Kodama, T. y Silverstein, S.C. (2001) Scavenger receptor class type (SR-BI) mediates adhesion of neonatal murine microglia to fibrillar β -amyloid. *J. Neuroimmunol.* 114: 142-150.

Hussemann, J. y Silverstein, S.C. (2001) Expression of scavenger receptor class B, type I, by astrocytes and vascular smooth muscle cells in normal adult mouse and human brain and in Alzheimer's disease brain. *Am. J. Pathol.* 158: 825-832.

Iversen, L.L., Morishire-Smith, R.J., Pollack, S.J. y Shearman, M.S. (1995) The toxicity in vitro of β - amyloid protein. *Biochem. J.* 311: 1-16.

Jang, J.H., Aruoma, O.I., Jen, L.S., Chung, H.Y., Surh, Y.J. (2004) Ergothioneine rescues PC12 cells from beta-amyloid-induced apoptotic death, *Free Rad. Biol. Med.* 36: 288-299.

Jang, M.H., Jung, S.B., Lee, M.H., Kim, C.J., Oh, Y.T., Kang, I., Kim, J. y Kim, E.H. (2005) Melatonin attenuates amyloid β_{25-35} -induced apoptosis in mouse microglial BV2 cells. *Neurosci. Letters* 380: 26-31.

Kirchhausen, T. (2000) Clathrin. *Annu Rev Biochem* 69: 699-727.

Kodama, T., Reddy, P., Kishimoto, C. y Krieger, M. (1988) Purification and characterization of a bovine acetyl low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 9238-9242.

Kodama, T., Freeman, M., Rohrer, L., Zabrecky, J., Matsudaira, P. y Krieger, M. (1990) Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. *Nature* 343: 531-535.

Krieger, M. (1997) The other side of scavenger receptors: pattern recognition for host defense. *Curr. Opin. Lipidol.* 8: 275-280.

Krieger, M. (1999) Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SRBI. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 523-558.

Liu, Q. y Zhao, B. (2004) Nicotine attenuates β -amyloid peptide-induced neurotoxicity, free radical and calcium accumulation in hippocampal neuronal cultures. *British J. Pharmacol.* 141: 746-754.

Lue, L.F., Walker, D.G y Rogers, J. (2001) Modeling microglial activation in Alzheimer's disease with human postmortem microglial cultures. *Neurobiol. Aging* 22: 945-56.

Marsh, M. y McMahon, H.T. (1999) The structural era of endocytosis. *Science* 285: 215-220.

Mas-Oliva, J., Arnold, K.S., Wagner, W.D., Phillips, D.R., Pitas, R.E. e Innerarity, T.L. (1994) Isolation and characterization of a platelet-derived macrophage-binding proteoglycan. *J. Biol. Chem.* 269: 10177-100183.

Mas-Oliva, J., Arnold, K.S., Wagner, W.D. e Innerarity, T.L. (1992) Isolation of a platelet proteoglycan that inhibits the uptake of acetyl LDL by macrophages. *Circulation* 86: I-156.

Mas-Oliva, J., Velasco-Loyden, G. y Haines, T.H. (1996) Receptor pattern formation as a signal for the capture of lipoproteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224: 212-218.

Morimoto, K., Wada, Y., Hinagata, J., Imanishi, T., Kodama, T.U. y Doi, T. (1999) VXF_D in the cytoplasmic domain of macrophage scavenger receptors mediates their efficient internalization and cell-surface expression. *Biol. Pharm. Bull.* 22: 1022-1026.

Motley, A., Bright, N.A., Seaman, M.N.J. y Robinson, M.S. (2003) Clathrin-mediated endocytosis in AP-2 depleted cells. *J. Cell Biol.* 162: 909-918.

Mousavi, S.A., Malerod, L. y Kjekens, R. (2004) Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem. J.* 377: 1-16.

Ohgami, N., Nagai, R., Miyazaki, A., Ikemoto, M., Arai, H., Horiuchi, S. y Nakayama, H. (2001) Scavenger receptor class B type I-mediated reverse cholesterol transport is inhibited by advanced glycation end products. *J. Biol. Chem.* 276: 13348-13355.

Owen, D.J., Vallis, Y., Pearse, B.M., McMahon, H.T. y Evans, P.R. (2000) The structure and function of the beta 2-adaptin appendage domain. *EMBO J.* 19: 4216-4227.

Page, L.J. y Robinson, M.S. (1995) Targeting signals and subunit interactions in coated vesicle adaptor complex. *J. Cell Biol.* 131: 619-630.

Paresce, D.M., Chung, H. y Maxfield, F.R. (1997) Slow degradation of aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein by microglial cells. *J. Biol. Chem.* 272: 29390-29397.

- Paresce, D.M., Ghosh, R.N. y Maxfield, F.R. (1996) Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein via a scavenger receptor. *Neuron* 17: 553-565.
- Pearse, D.M., Smith, C.J. y Owen, D.J. (2000) Clathrin coat construction in endocytosis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10: 220-228.
- Peng, Q.L., Buz´Zard, A.R., Lau, B.H.S. B.H.S. (2002) Pycnogenol protects neurons from amyloid-beta peptide-induced apoptosis, *Mol. Brain Res.* 104: 55-65.
- Pike, C.J., Burdick, D., Walencewicz, A.J., Glabe, C.G. y Cotman, C.W. (1993) Neurodegeneration induced by β - amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J. Neurosci.* 13: 1676-1687.
- Platt, N., Haworth, R., Darley, L. y Gordon, S. (2002) The many roles of the class A macrophage scavenger receptor. *Int. Rev. Cytol.* 212: 1-40.
- Rapoport, I., Chen, Y.C., Cupers, P., Shoelson, S.E. y Kirchhausen, T. (1998) Dileucine-based sorting signals bind to the beta chain of AP-1 at a site distinct and regulated differently from the tyrosine-based motif-binding site. *EMBO J.* 19: 2148-2155.
- Rappoport, J.Z., Taha, B.W., Lemeer, S., Benmerah, A. y Simon, S.M. (2003) The AP-2 complex is excluded from the dynamic population of plasma membrane-associated clathrin. *J. Biol. Chem.* 278: 47357-47360.
- Rhains, D., Faltrault, L., Tremblay, C. y Brissette, L. (1999) Uptake and fate of class B scavenger ligands in HepG2 cells. *Eur. J. Biochem.* 261: 227-235.
- Rohde, G., Wenzel, D. y Haucke, V. (2002) A phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding site within mu-2-adaptin regulates clathrin-mediated endocytosis. *J. Cell Biol.* 158: 209-214.
- Rohrer, L., Freeman, M., Kodama, T., Penman, M. y Krieger, M. (1990) Coiled-coil fibrous domains mediate ligand binding by macrophage scavenger receptor type II. *Nature* 343: 570-572.
- Salcini, A.E., Chen, H., Iannolo, G., De Camilli, P. y Di Fiore, P.P. (1999) Epidermal growth factor pathway substrate 15, Eps15. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31: 805-809.
- Schmid, S.L. (1997) Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu. Rev. Biochem.* 66: 511-548.
- Sisodia, S.S. (1992) β -amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 6075-6079.

Tebar, F., Bohlander, S.K. y Sorkin, A. (1999) Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia (CALM) protein: localization in endocytic-coated pits, interactions with clathrin, and the impact of over expression on clathrin-mediated traffic. *Mol. Biol. Cell* 10: 2687-2702.

Terpstra, V., van Amersfoort, E.S., van Velzen, A.G., Kuiper, J. y van Berkel, T.J.C. (2000) Hepatic and extrahepatic scavenger receptors: function in relation to disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20: 1860-1872.

de Winther, M.P.J., van Dijk, K.W., Havekes, L.M. y Hofker, M.H. (1999) Macrophage scavenger receptor class A: a multifunctional receptor in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20: 290-297.

Webster, S.D., Galvan, M.D., Ferran, E, Garzon-Rodriguez, W. W., Glabe, C.G. y Tenner, A.J. (2001) Antibody-mediated phagocytosis of the amyloid beta-peptide in microglia is differentially modulated by C1q. *J. Immunol.* 166: 7496-7503.

Webster, S.D., Yang, A.J., Margol, L., Garzon-Rodriguez, W., Glabe, C.G. y Tenner, A.J. (2000) Complement component C1q modulates the phagocytosis of Abeta by microglia. *Exp. Neurol.* 161: 127-138.

Wyss-Coray, T., Loike, J.D., Brionne, T.C., Lu, E., Anankov, R. y Yan, F. (2003) Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat. Med.* 9: 453-457.

Xiao, X.Q., Zhang, H.Y. y Tang, X.C. (2002) Huperzine A attenuates amyloid beta-peptide fragment 25-35-induced apoptosis in rat cortical neurons via inhibiting reactive oxygen species formation and caspase-3 activation. *J. Neurosci. Res.* 67: 30-36.

Yankner, B.A. (1996) Mechanism of neuronal degeneration in Alzheimer´s disease. *Neuron* 16: 921-932.

Yao, P.J. y Coleman, P.D. (1998) Reduced *O*-glycosylated clathrin assembly protein AP180: implication for synaptic vesicle recycling dysfunction in Alzheimer's disease. *Neurosci. Letters* 252: 33-36.

Yao, P.J., Morsch, L.M., Callahan, M. y Coleman, P.D. (1999) Changes in synaptic expression of clathrin assembly protein AP180 in Alzheimer`s disease analysed by immunohistochemistry. *Neurosci.* 94: 389-394.

Yao, P.J., Weimer, J.M., O`Herron, T.M. y Coleman, P. (2000) Clathrin assembly protein AP-2 is detected in both neurons and glia, and its reduction is prominent in layer II of frontal cortex in Alzheimer`s disease. *Neurobiol. of Aging* 21: 921-929.

Yao, P.J., Zhu, M., Pyun, E.I., Brooks, A.I., Therianos, S., Meyers, V. E. y Coleman, P.D. (2003) Defects in expression of genes related to synaptic vesicle trafficking in frontal cortex of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 12: 97-105.

Zeng, H., Chen, Q. y Zhao, B. (2004) Genistein ameliorates beta-amyloid peptide (25-35)-induced hippocampal neuronal apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 36: 180-188.

Zlokovic, B.V., Martel, C.L., Matsubara, E., McComb, J.G., Zheng, G., McCluskey, R.T., Frangione, B. y Ghiso, J. (1996) Glycoprotein 330/megalin: probable role in receptor-mediated transport of apolipoprotein J alone and in a complex with Alzheimer's disease amyloid- β at the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 4229-4234.