

Trabajo Fin de Grado
Grado en Biotecnología

Estudio de la regulación microglial del proteoma local de neuronas en Alzheimer y fisiología

Autora:
Laura Quijano Sárraga

Directora:
Jimena Baleriola Gómez de Pablos

Codirectora:
Maria Antonia Unanue Vivanco

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	1
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	5
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
4.1. ANIMALES.....	5
4.2. CULTIVO DE NEURONAS.....	5
4.3. CULTIVO DE GLÍA.....	6
4.4. CULTIVO DE MICROGLÍA.....	7
4.5. CO-CULTIVO DE NEURONAS Y MICROGLÍA.....	7
4.7. INMUNOCITOQUÍMICA.....	8
4.8. IMÁGENES DE EPIFLUORESCENCIA.....	9
4.9. CUANTIFICACIÓN DE LA FLUORESCENCIA.....	9
4.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE FLUORESCENCIA.....	10
5. RESULTADOS.....	11
6. DISCUSIÓN.....	16
7. CONCLUSIONES.....	17
8. AGRADECIMIENTOS.....	18
9. BIBLIOGRAFÍA.....	18

1. RESUMEN

La mayoría de síntesis proteica neuronal tiene lugar en el soma o cuerpo de la neurona. Sin embargo, la localización de ARN mensajero (ARNm) y ribosomas en los axones y dendritas, permite la síntesis de proteínas en regiones más alejadas del soma y el cumplimiento de su función más rápidamente. En presencia del péptido soluble $A\beta$, estudios demuestran que la síntesis local de proteínas en axones puede contribuir a la muerte neuronal. Además, existen evidencias de que las células gliales también podrían estar implicadas en la modulación del proteoma local. Por ello, el estudio de la traducción local en la Enfermedad de Alzheimer (EA), puede otorgar una nueva comprensión de los mecanismos subyacentes de la evolución de la enfermedad y visibilizar nuevas dianas terapéuticas para frenar su desarrollo. Este trabajo trata de validar un estudio proteómico mediante la detección en los axones de tres proteínas del proteasoma: Psm7, Psmb1 y Psmc2 en respuesta al $A\beta$, y en presencia o ausencia de células de la microglía. Para ello se realizaron cultivos celulares de neuronas y co-cultivos de estas con microglía para observar el efecto de la regulación microglial en la expresión de las proteínas de interés. Los cultivos se trataron con vehículo o con péptido $A\beta$ para mimetizar la patología EA. La presencia de las proteínas de interés en los axones se analizó mediante inmunocitoquímica en un microscopio de epifluorescencia Axio-Observer Z1. Tras la posterior cuantificación de fluorescencia y análisis estadísticos, los resultados muestran la influencia de la microglía y la presencia de $A\beta$ sobre el nivel de expresión de las tres proteínas. Como objetivos futuros relacionados, además de la presencia en los axones ya observada, debería realizarse un rastreo del propio ARNm codificante seguido de la detección de la traducción para poder verificar fielmente que se trata de proteínas traducidas localmente.

2. INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) constituye la mayor causa de demencia entre la población anciana. Se trata de una neuropatología caracterizada por la acumulación anormal del péptido extracelular β -amiloide ($A\beta$) formando placas seniles y la hiperfosforilación de los microtúbulos asociados a la proteína axonal Tau. Consecuentemente, esto deriva en la disminución gradual de las habilidades cognitivas y funcionales del cerebro, siendo la pérdida de las sinapsis y la disfunción axonal dos de los primeros signos patológicos (Gerrits *et al.*, 2021; Qu *et al.*, 2022).

Es importante destacar la existencia de estudios que demuestran que los oligómeros de $A\beta$ solubles ya son impulsores patogénicos de la disfunción cognitiva y axonal mucho antes de la formación de placas seniles en el cerebro con EA (Kokubo *et al.*, 2005; Tolar *et al.*, 2021). Además, se ha demostrado que la presencia de los oligómeros de $A\beta$ solubles puede inducir la traducción local axonal de ARNm, que en un contexto fisiológico podría estar silenciada. Esta síntesis genera un complejo de señalización retrógrado que transmite la información de la lesión neurodegenerativa desde el axón hasta el soma pudiendo inducir cambios en el cuerpo de la célula que llevan a la degeneración neuronal (Walker *et al.*, 2018).

Dicha traducción local neuronal se debe a que las neuronas, al ser células polarizadas, establecen una distribución asimétrica de las proteínas para realizar su función. De esta manera, localizan ARNm y ribosomas en los axones y dendritas, haciendo posible la síntesis más rápida de proteínas en regiones más alejadas del soma a partir de la traducción local. (Sun *et al.*, 2021).

Prueba de ello es el estudio de Baleriola *et al.* (2014), donde se investiga la síntesis local de proteínas en los axones distales inducida por $A\beta$ soluble. Se observó que al aplicar agregados oligoméricos generados a partir del péptido $A\beta_{1-42}$, se producía la sobreexpresión local axonal del factor de transcripción ATF4. En un contexto fisiológico, este factor llevaría a cabo su función sin generar daño neuronal. Sin embargo, en un ambiente de EA, era capaz de propagar una señal de neurodegeneración apoptótica a través de distintas regiones cerebrales. Además, se encontró que el transcriptoma de los axones tratados con $A\beta_{1-42}$ contenía ARNm de muchos genes relacionados con la enfermedad de Alzheimer, incluyendo transcritos para 4 de los 20 loci de susceptibilidad a dicha enfermedad.

De esta manera, el conocimiento de las variaciones en los proteomas dendríticos y axonales mediante el estudio de la traducción localizada de proteínas en presencia de $A\beta$, permitiría incrementar los conocimientos existentes sobre las funciones de dichas proteínas y posible contribución en el desarrollo de la enfermedad, además de identificar posibles dianas terapéuticas para tratarla (Gamarra *et al.*, 2021).

Por otro lado, existen evidencias de que el proteoma axonal también podría estar regulado por la glía. Una de ellas es un estudio realizado con ratones deficientes en degeneración walleriana. En estos ratones, el proceso de desmielinización de los axones distales debido a un daño neuronal en su soma o en el axón proximal se retrasaba durante tres semanas (Mark *et al.*, 2001). Utilizando este ratón como modelo, se demuestra que las células de Schwann

transfieren polirribosomas a los axones dañados, indicando que estas células son capaces de regular la síntesis de proteínas axonales mediante el suministro de ribosomas de forma local (Court *et al.*, 2008). Posteriormente se descubrió que esta transferencia se lleva a cabo mediante vesículas extracelulares que establecen una conexión glia - neurona contribuyendo a la modulación de las funciones axonales (Lopez-Leal & Court, 2016). Igualmente, Eyman *et al.* (2007) sugiere que existe ARNm en células gliales de calamar que puede ser transferido y traducido en el axoplasma (citoplasma axonal). De esta forma, ambos estudios establecen que existe una interacción glia - neurona donde el axón recibe localmente transcritos y componentes de la maquinaria para la síntesis de proteínas (Court *et al.*, 2008).

Siguiendo esta línea de investigación, se realizó un estudio proteómico en el laboratorio. Se observó una serie de proteínas que podrían llevar a cabo la traducción local en las neuritas y que además presentaban una mayor regulación en presencia de células de la glía, en concreto microglía y astrocitos.

Por un lado, la microglia son las células inmunitarias innatas del sistema nervioso central (SNC) y actúan como fagocitos que protegen y mantienen el tejido nervioso. En un contexto de EA, se produce su activación en diferentes grados. A pesar de que existe evidencia de que la microglía genera daño neuronal mediante la eliminación de las sinapsis e inducción de un estado proinflamatorio excesivo, también se ha observado su efecto protector, ya que limitan la acumulación tóxica de $A\beta$ a través de la secreción de citoquinas microgliales previniendo la evolución de la EA (Frost & Li, 2017; Hansen *et al.*, 2018).

Por otro lado, los astrocitos constituyen el elemento principal del SNC, habitando tanto en la sustancia gris como en la blanca. Aseguran el mantenimiento de la homeostasis en el cerebro, el soporte metabólico, la regulación de la barrera hematoencefálica y ayudan a la microglía en la defensa del SNC (Rodríguez *et al.*, 2009). Sin embargo, bajo las diferentes condiciones que se dan durante la evolución de la EA, diversos mediadores inflamatorios liberados por neuronas y distintas células de glía como la microglía, inician una serie de cambios morfológicos y moleculares en algunos astrocitos convirtiéndolos en astrocitos reactivos que contribuyen a la neuroinflamación y la neurodegeneración. Paralelamente, otros sufren un proceso de astrodegeneración (Frost & Li, 2017; Preman *et al.*, 2021). En principio, estos astrocitos reactivos rodean las placas amiloides secretando factores que permiten fagocitar y descomponer $A\beta$. No obstante, estudios sugieren que los astrocitos pueden secretar cantidades significativas de $A\beta$ y contribuir a la carga general de amiloide en el cerebro (Blasko *et al.*, 2000).

En el estudio de proteómica realizado en el laboratorio se observaron 5 clusters de proteínas cuya expresión variaba significativamente en un contexto de EA y en presencia de microglía y astrocitos. Uno de ellos indicaba cambios en la expresión de proteínas metabólicas en presencia de ambos tipos de glía. Otro cluster sugería que los astrocitos regulan la expresión de proteínas implicadas en la síntesis proteica y otros 3 clusters estaban regulados únicamente en presencia de microglía: proteínas relacionadas con (a) el reciclaje de vesículas, (b) el spliceosoma y (c) el proteosoma (**Figura 1**). Además, todas estas proteínas están relacionadas con el metabolismo de ARN y de proteínas.

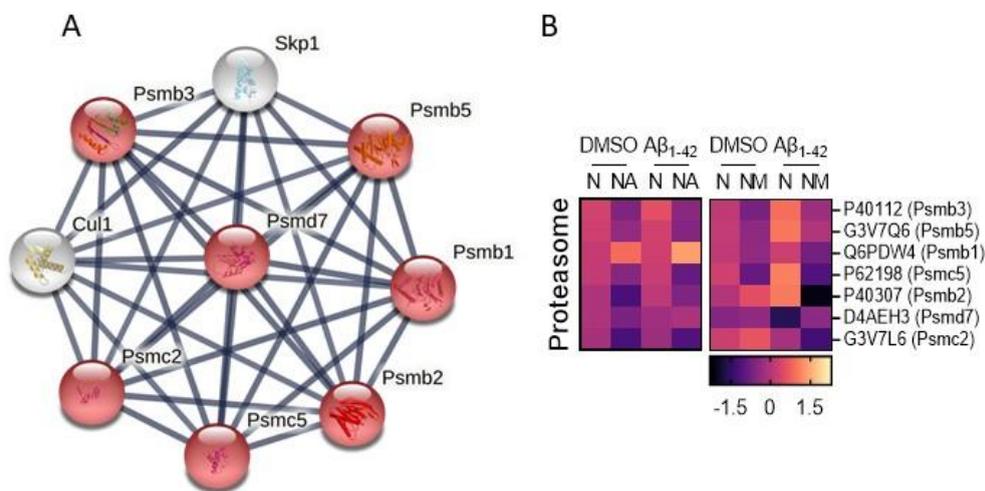


Figura 1. Resultado del estudio proteómico relacionado con el cluster de proteínas del proteosoma reguladas en presencia de la microglía y relacionadas con el metabolismo de proteínas. (A) Conectoma de proteínas proteosomales incluyendo las de interés: Psmc7, Psmb1 y Psmc2. **(B)** Heatmap representando la expresión diferencial de los genes en las neuronas (N) bajo la regulación de astrocitos (NA) y microglía (NM), comparando entre condiciones las control (vehículo DMSO) y tratamiento con $A\beta_{1-42}$. Se muestra regulación de la expresión por parte de la microglía (Gamarra *et al.*, no publicado).

De esta manera, en este estudio se lleva a cabo la validación proteómica mediante la detección por inmunocitoquímica de 3 subunidades del proteosoma: Psmc7, Psmb1 y Psmc2.

Estas proteínas son subunidades del núcleo catalítico 20s del proteosoma 26s implicado en la degradación de proteínas. Los proteosomas constan de múltiples subunidades que permiten la homeostasis de proteínas en el organismo catalizando su degradación selectiva en fragmentos peptídicos.

En este caso, la actividad proteosomal influye en la regulación de múltiples procesos neuronales llevados a cabo por distintas proteínas (Türker et al., 2021). Además, existen estudios que demuestran la inhibición del proteasoma en presencia de $A\beta_{1-42}$ (Oh et al., 2005; Tseng et al., 2008), por lo que el estudio de su expresión en un contexto de EA podría ayudar a comprender en un futuro la función que realizan al expresarse localmente y si influye en el desarrollo o disminución de la enfermedad.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El objetivo del trabajo es la validación del estudio proteómico mediante la detección de la presencia de las proteínas proteosomales Psmc7, Psmb1 y Psmc2 en los axones de la neurona por inmunocitoquímica.

Según el estudio de proteómica, la expresión local axonal de Psmc7 en presencia de $A\beta$ y microglía aumenta en comparación a su expresión en ausencia de microglía. Por su parte, en las proteínas Psmb1 y Psmc2 ocurriría lo opuesto.

Por lo tanto, la hipótesis del estudio es que la microglia y la presencia de $A\beta$ inducen la expresión local de la proteína proteosomal Psmc7, pero reducen la expresión local de Psmb1 y Psmc2.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. ANIMALES

Todos los protocolos de manipulación animal están sujetos a la directiva Europea 2010/63/EU y fueron aprobados por el comité ético de la Universidad del País Vasco UPV/EHU.

4.2. CULTIVO DE NEURONAS

Se diseccionó el tejido hipocampal de embriones de ratas Sprague-Dawley de 18 días (E18) como se describe en Banker y Goslin (1998). Brevemente, el hipocampo diseccionado se recogió en una solución salina equilibrada de Hank (HBSS, Gibco Sigma REF: H2387) fría para conservar el tejido. Posteriormente, se realizó el tratamiento con 1,5 ml de Tryple Express (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, Estados Unidos) durante 15 minutos a 37 °C para su disgregación. Después, se llevaron a cabo 3 lavados con HBSS y se añadieron 500 μ l medio de siembra (L-Glutamina 2 mM, 50 U·ml⁻¹ Penicilina/Estreptomicina

en Neurobasal y suero bovino fetal al 10 %) previamente filtrado, para la inhibición de la reacción de la tripsina. A continuación, se hizo pasar el tejido por puntas de 1000 μl y 200 μl para aumentar el grado de disgregación y se centrifugó durante 5 minutos a 800 rpm. El pellet se resuspendió en 300 μl de medio de siembra y se realizó el conteo de células en la cámara Neubauer a partir de una dilución 1:20.

La siembra se llevó a cabo en placas de 24 pocillos de 1 cm^2 / pocillo, con cubreobjetos tratados previamente con 500 μl / pocillo de Poli-D-Lysine (PDL, Sigma; Ref. No P0899) durante 1 hora y posteriormente lavados con agua autoclavada (ddH_2O). Esto facilitó la adhesión de las células a los cubreobjetos. La densidad a sembrar fue de 15.000 neuronas / cm^2 en un volumen de 500 μl de medio de siembra. Una vez llevada a cabo la siembra, se incubaron a 37 °C en una incubadora humidificada con CO_2 al 5 %.

Al día siguiente, día *in vitro* 1 (DIV 1), se cambió el 100 % del medio siembra a medio de mantenimiento (L-Glutamina 2 mM, 50 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ de penicilina-estreptomicina en Neurobasal y B27) y al DIV 3, se cambió solo el 50 % del medio. En ambos casos se añadió 5-fluorodesoxiuridina y uridina 20 mM (Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Alemania) para inhibir el crecimiento de la glía.

4.3. CULTIVO DE GLÍA

Simultáneamente al cultivo de neuronas se llevó a cabo el cultivo de glía. Los reservorios (o frascos) de siembra se trataron durante 1 h con PDL (1 μg PDL / ml ddH_2O). Después se realizaron 3 lavados de 10 minutos con ddH_2O y se dejaron secar.

Posteriormente, se diseccionaron los cerebros de las dos ratas Sprague-Dawley de 0 a 2 días postnatales (P0 - P2) y se eliminaron los restos de meninges a la lupa. Cada corteza (2 hemisferios) se recogió en una placa petri con la solución salina equilibrada de Hank fría para conservar el tejido. Después, se traspasó el contenido de cada placa a un tubo cónico de 15 ml con ayuda de una pipeta de 1000 μl y se llevó a cabo la incubación con 400 μl de TrypLE Express y 40 μl de DNAsa para la disgregación las cortezas, durante 15 minutos a 37 °C y 5 % CO_2 . Con el fin de detener la reacción enzimática de la tripsina, se añadió IMDM 10 % FBS Hyclone (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Gibco REF:42200-014.) en la misma proporción que el contenido de cada tubo. Se centrifugaron 6 minutos a 1200 rpm y se retiró el sobrenadante. Posteriormente se resuspendieron los pellet y las suspensiones de tejido y se hicieron pasar por jeringa con agujas de 21 G y 23 G (10 pases con cada aguja) para

aumentar el grado de disgregación. Se centrifugó de nuevo durante 6 minutos a 800 rpm. Cada pellet se resuspendió en 1 ml de medio IMDM 10 % FBS Hyclone.

La siembra se realizó en los frascos tratados previamente con PDL, añadiendo 1 ml de la suspensión celular y 7 ml de IMDM 10% FBS Hyclone. Se incubaron a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 %. Al día siguiente (DIV 1), se cambió a medio de glía. Después, se cambió el medio a los 6 días.

4.4. CULTIVO DE MICROGLÍA

La microglía se obtuvo a partir del cultivo mixto de glía (DIV 10) (microglía y astrocitos) agitado durante 4,25 horas a 185 rpm a 37 °C. En un Falcon de 15 ml se recogió el medio con la microglía, que había quedado en suspensión tras la agitación, y se centrifugó a 1200 rpm durante 6 minutos. Paralelamente se incubó a 37 °C por 15 minutos el mismo Flask con 8 ml de tripsina para despegar los astrocitos de la base y darles aplicación en otros experimentos. Una vez acabada la centrifugación, se resuspendió el pellet de microglía en 1 ml de medio de mantenimiento y se diluyó 1:20 para el conteo y su posterior co-cultivo con las neuronas.

4.5. CO-CULTIVO DE NEURONAS Y MICROGLÍA

Para realizar el co-cultivo, las neuronas (DIV 7) sembradas en los cubreobjetos se incubaron junto con la microglía (DIV 10) sembrada en insertos de cultivo o *transwell* (TW) con un tamaño de poro de 0,4 µm. Esto permite la evaluación de la influencia de la microglía sobre las neuronas en ausencia de contacto célula-célula, pudiendo diferenciar entre neuronas influenciadas por este tipo celular y neuronas control.

La proporción neurona:microglía era de 1:3. Como se sembraron 15.000 neuronas / pocillo, después se sembraron 5.000 células de microglía / TW. Para ello se añadió el volumen adecuado en función del conteo de microglía en la parte de abajo del TW y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C para permitir que se asentaran las células en la membrana. Finalmente se colocó cada TW en su pocillo correspondiente y se añadió 100 µl de medio de mantenimiento en la parte superior del TW.

De los 24 pocillos de la placa, solo se añadió la microglía al TW a 12 de ellos para poder comparar el resultado con las neuronas que no fueron sometidas a la regulación microglial. En los *transwell* que no llevan glía, se añadieron 50 µl de medio de cultivo.

4.6. TRATAMIENTO CON PÉPTIDO β -AMILOIDE ($A\beta_{1-42}$)

Al día siguiente del co-cultivo, se preparó un stock 100 mM de $A\beta_{1-42}$ como se describe en Quintela-López et al. (2019). Brevemente, la formación de oligómeros se dio a partir de $A\beta_{1-42}$ liofilizada junto con tampón Hams F-12 (PromoCell Labclinics, Barcelona, España) a pH 7,4 que ayudó a la oligomerización y dimetilsulfóxido anhidro (DMSO; 5 mM, Sigma Aldrich). Se mantuvo durante 24 horas a 4 °C para que se produjera la oligomerización.

Tras 24 horas, se trató el co-cultivo de neuronas (DIV 9) con una solución de $A\beta_{1-42}$ 3 μ M y se dejó incubar otras 24 horas a 37 °C. De los 12 pocillos de neuronas incubadas con microglía sólo se trataron 6. Ocurrió lo mismo con las neuronas sin la regulación microglial. Los pocillos restantes se trataron con el vehículo DMSO generando la condición de control (C), tanto en las neuronas sin la microglía como en las neuronas con ella.

Por cada experimento se obtuvieron varios cubreobjetos con neuronas cultivadas en cada una de las 4 condiciones: neuronas control (N C), neuronas tratadas con $A\beta_{1-42}$ (N $A\beta$), neuronas en presencia de microglía y sin tratamiento con $A\beta_{1-42}$ (NM C) y neuronas en presencia de microglía tratadas con $A\beta_{1-42}$ (MN $A\beta$).

Finalmente, a las 24 horas las neuronas se fijaron con paraformaldehído (PFA) y sacarosa al 4% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente y se mantuvieron a 4 °C en PBS (Sigma Aldrich).

4.7. INMUNOCITOQUÍMICA

Las neuronas fijadas y en PBS se lavaron 3 veces durante 5 minutos con PBS y se bloquearon incubando a temperatura ambiente con BGT (PBS 1X, Glicina 100 mM, Triton 0,25 % y BSA 3 %) durante 30 minutos.

En cada experimento se evaluó la presencia de cada proteína de interés en cada una de las 4 condiciones experimentales. Por ende, cada anticuerpo primario frente a cada una de las proteínas en estudio solo se añadió a los 4 cubreobjetos correspondientes a las 4 condiciones por experimento. Una vez añadido cada anticuerpo primario diluído en BGT, se dejó incubar a 4 °C hasta el día siguiente. En este caso se usaron los siguientes anticuerpos: α -Psmc7 rb (1:200, ab178417, Abcam), α -Psmc1 rb (1:100, ab196623, Abcam) y α -Psmc2 rb (1:100, PA5-96024, Invitrogen). También se añadió un anticuerpo primario contra la proteína Tau propia del axón y contra la proteína Map2 localizada principalmente en las dendritas: α -Tau 647 (1:200, ab206061, Abcam) y α -Map2 Ck (1:1000, AB5543, Merck Millipore).

Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 5 - 10 minutos en PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios diluidos en BGT durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios con fluoróforos conjugados fueron los siguientes: α -anti-Ck 350 (1:200, SA5-10069, Invitrogen) y α -anti-Rb 488 (1:500, A21206, Invitrogen). Se llevaron a cabo de nuevo 3 lavados con PBS, un lavado con dH_2O y se montaron los cristales en portaobjetos nuevos con el líquido de montaje (*ProLong Gold* sin DAPI).

4.8. IMÁGENES DE EPIFLUORESCENCIA

Se realizaron 5 experimentos independientes de inmunocitoquímica. En cada uno se analizó la fluorescencia de las cuatro condiciones N C, N $A\beta$, NM C y MN $A\beta$ en cada una de las 3 proteínas en estudio.

Las imágenes fueron adquiridas usando un objetivo EC Plan-Neofluar 20 x / 0,5 (zoom de 1,6 x) en un microscopio Axio-Observer Z1. Está equipado con las cámaras digitales AxioCam MRm Rev. 3 (Zeiss, Oberkochen, Alemania) y Hamamatsu EM-CCD ImagEM (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japón).

Se tomaron imágenes de cinco campos aleatorios por cubreobjetos y se repitió el proceso a lo largo de los 5 experimentos independientes. Además cada imagen se tomó por triplicado: en el espectro de fluorescencia del rojo lejano a 647 nm para visualizar el anticuerpo fluorescente anti-Tau en los axones; en el espectro a 350 nm marcado en azul mostrando la el anticuerpo secundario anti-Map2 de las dendritas; y en verde, el espectro a 488 nm para la identificación del anticuerpo contra la proteína de interés. En todos los casos se ajustaron el fondo, el contraste y la nitidez y se mantuvieron idénticos para todas las condiciones de un mismo experimento. También se aseguró que las intensidades de píxeles estaban dentro del rango lineal y que no se generaba saturación.

Las imágenes fueron tomadas con ZEN 2 (edición azul) versión 2.0.0.0. software (Zeiss). La mayoría se adquirieron con AxioCam, a excepción de las realizadas en el espectro rojo lejano, donde se utilizó la cámara Hamamatsu.

4.9. CUANTIFICACIÓN DE LA FLUORESCENCIA

Se realizó una cuantificación de la fluorescencia de cada imagen mediante el programa ImageJ.

Para cuantificar la intensidad fluorescente de las 3 proteínas en estudio, se llevó a cabo este proceso con cada imagen tomada. Como se estaba investigando el efecto en axones, se seleccionaron las imágenes en los espectros rojo (marcaje de Tau) lejano y azul (marcaje de Map2). Así, se eligió la neurita más positiva para Tau y menos enriquecida en Map2. Posteriormente, se enderezó con la herramienta Línea segmentada en FIJI/ImagenJ:

FIJI/ImageJ > Archivo > Abrir (no escalar automáticamente) > línea segmentada (40 píxeles de ancho) > Selección > Enderezar

En esta neurita enderezada, se ejecutó una medición a intervalos de 10 μm que emergen del centro del soma en el espectro verde (marcaje para la proteína de interés). Esto se generó con una macro del programa diseñada internamente, y denominada círculos concéntricos (Quintela-López et al., 2019). Gracias a ella se pudo analizar la intensidad de fluorescencia de 17 intervalos cubriendo una longitud de 170 μm por neurita respecto del centro del soma. También se midió la intensidad del píxel de fondo, fuera del área cubierta por la neurita para un mayor ajuste de la medición. Este proceso se lleva a cabo con todas las imágenes.

Brevemente, de cada imagen se obtienen los valores de intensidad de 17 intervalos. A su vez, de cada cubreobjetos, que corresponde con una condición de una de las tres proteínas, existen 5 imágenes. Cada proteína tiene 4 condiciones por experimento y se realizan 5 experimentos. De esta manera, se realizó un promedio de las medias de cada intervalo de las 5 imágenes por condición y proteína en cada experimento, generando unos valores promedio en función de la distancia que podrán ser analizados estadísticamente.

4.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE FLUORESCENCIA

Los datos promedio obtenidos se procesaron y compararon estadísticamente usando GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, Estados Unidos).

Para el análisis estadístico se seleccionaron 3 distancias representativas del axón tomando como referencia el centro del soma: de la parte proximal (bin 61 - 70 μm), parte medial (bin 111 - 120 μm) y parte distal (bin 161 - 170 μm).

Recapitulando a la hipótesis del estudio, y con el fin de observar la influencia de la microglía junto con $A\beta$ en la presencia de las proteínas de interés en los axones, se trató de comparar las medidas de intensidad de las condiciones, N $A\beta$ y MN $A\beta$.

En primer lugar, se normalizaron los datos relativizando el valor de cada dato medido respecto al total de la intensidad en cada condición. De esta manera se generaron las

frecuencias de intensidad manifestadas en el axón en función de la distancia (**Figura 3-A**, **Figura 4-A** y **Figura 5-A**). Los ejes Y se representaron como Log_2 de los valores relativos para visualizar mejor los resultados.

Posteriormente, con los datos de las variables N $A\beta$ y MN $A\beta$ de cada intervalo se llevó a cabo la prueba t (unpaired). Mediante este método se permite la comparación de los datos de intensidad de estas dos condiciones en el conjunto de todos los experimentos realizados para cada proteína, otorgando información acerca de la igualdad o diferencia de las medidas de estas dos variables.

5. RESULTADOS

Los primeros resultados que apoyan el buen cauce del estudio son las imágenes tomadas en el microscopio Axio-Observer Z1, puesto que permiten detectar la presencia de las tres proteínas del proteasoma en los axones neuronales. Un ejemplo de ello se muestra en la **Figura 2**, donde se observa una neurona que ha sido sometida al tratamiento de $A\beta_{1-42}$ en presencia de microglía (condición experimental MN $A\beta$). En este caso, en el espectro verde (**Figura 2-A**), se observa la fluorescencia emitida debido a la presencia de la proteína Psmb1.

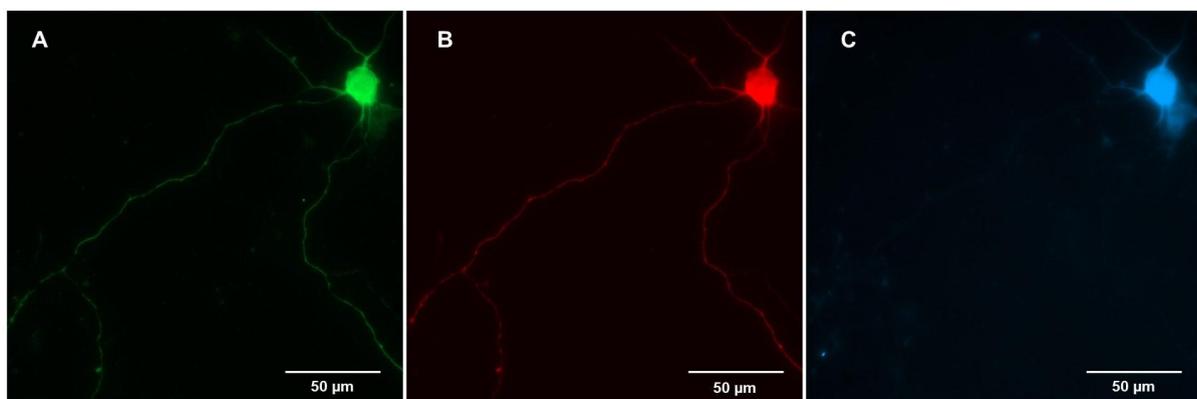


Figura 2. Espectros de fluorescencia de las imágenes de epifluorescencia de la proteína Psmb1 en la condición experimental MN $A\beta$ tras la realización de la técnica de inmunocitoquímica. Objetivo EC Plan-Neofluar 20 x / 0,5 (zoom de 1,6 x). (A) Espectro verde (488 nm) representando la intensidad de fluorescencia en función de la cantidad de proteína Psmb1 presente. Uso de anticuerpo primario α -Psmb1 rb (1:100, ab196623, Abcam) y secundario α -Rb 488 (1:500, A21206, Invitrogen). (B) Espectro rojo lejano (647 nm) representando la intensidad de fluorescencia en función de la cantidad presente de proteína axonal Tau. Uso de anticuerpo fluorescente α -Tau 647 (1:200, ab206061, Abcam). (C) Espectro azul (350 nm) representando la intensidad de fluorescencia en función de la cantidad presente de proteína Map2 más abundante

en las dendritas. Uso de anticuerpo primario α -Map2 Ck (1:1000, AB5543, Merck Millipore) y anticuerpo secundario α -Ck 35 (1:200, SA5-10069, Invitrogen).

Además, permite confirmar que la cuantificación posterior de la fluorescencia mediante el programa ImageJ realmente se realiza en las neuritas más cercanas a convertirse en axones que en dendritas. Esto se demuestra observando cómo en el espectro rojo lejano, representando la proteína axonal Tau, se percibe la presencia de axones (**Figura 2-B**). Sin embargo, no se manifiesta ninguna presencia en la imagen del espectro azul que muestra la fluorescencia de la proteína dendrítica Map2 (**Figura 2-C**).

Una vez cuantificada la intensidad de las imágenes y llevado a cabo el proceso de análisis estadístico se puede observar que, en las tres proteínas, y en las cuatro condiciones experimentales, el perfil de intensidades relativas en función de la distancia en μm desde el centro del soma (**Figura 3-A**, **Figura 4-A** y **Figura 5-A**), disminuye exponencialmente en los primeros 20 μm y continúa decreciendo más suavemente a medida que aumenta la distancia a lo largo del axón. Esto se debe a que esos primeros μm constituyen el soma, lugar donde se produce la mayor proporción de síntesis proteica gracias a su alto contenido en maquinaria de traducción.

Por otro lado, en relación a la proteína Psmd7, ni en el intervalo proximal (**Figura 3-B**) ni en el distal (**Figura 3-D**) se observan diferencias significativas entre las neuronas tratadas con $A\beta_{1-42}$ y su equivalente en presencia de microglía. Sin embargo, observamos una disminución ($p = 0,0225 < 0,05$ para $n = 5$) entre N $A\beta$ y MN $A\beta$ en el intervalo intermedio, a 111 - 120 μm respecto del soma neuronal (**Figura 3-C**).

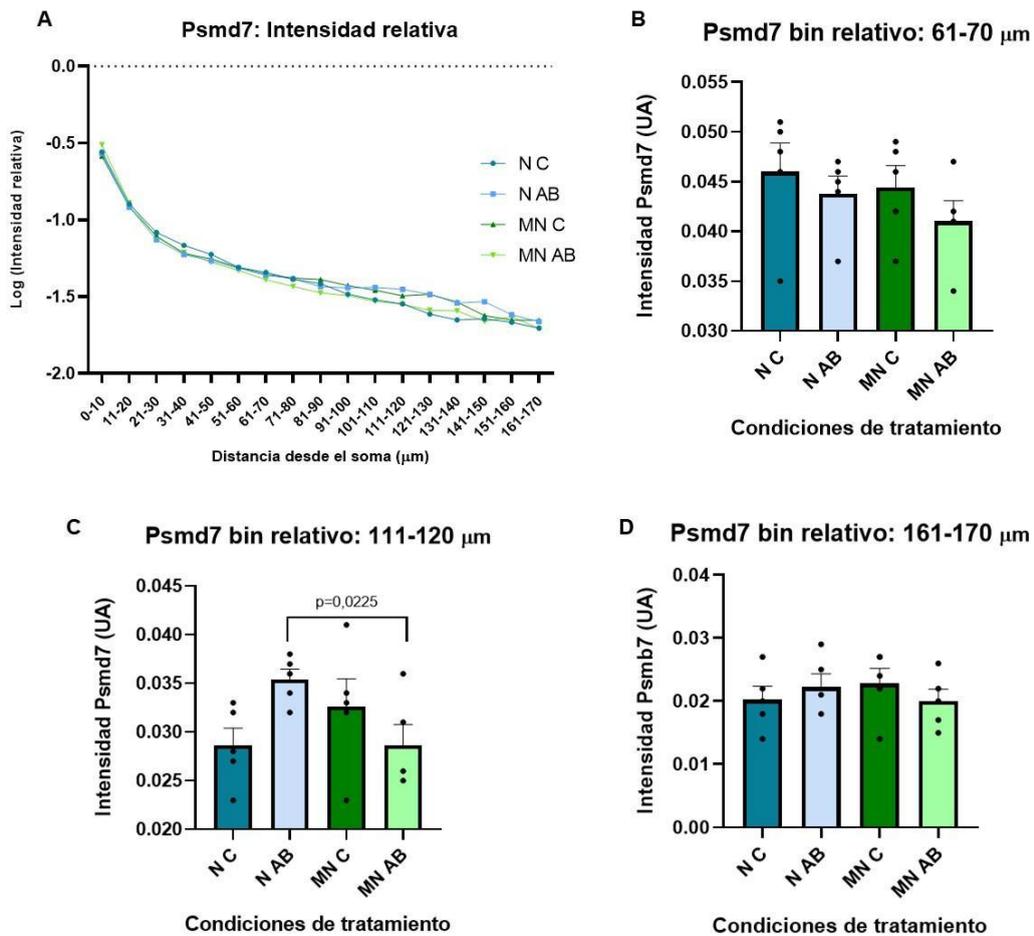


Figura 3. Resultados del procesamiento de datos de la intensidad de la proteína proteosomal Psm7 en los axones neuronales. (A) Perfiles de intensidad promedio relativa al total de intensidad de cada condición experimental, en función de la distancia respecto del centro del soma en μm . En escala logarítmica para facilitar la observación de su tendencia. (B) Representación de la intensidad de Psm7 en unidades arbitrarias (UA) en función de las condiciones experimentales en un intervalo de distancia respecto del soma de 61 - 70 μm . (C) Representación de la intensidad de Psm7 en unidades arbitrarias (UA) en función de las condiciones experimentales en un intervalo de distancia respecto del soma de 111 - 120 μm . Diferencia significativa entre las condiciones N A β y MN A β $p < 0,05$ ($n=5$). (D) Representación de la intensidad de Psm7 en unidades arbitrarias (UA) en función de las condiciones experimentales en un intervalo de distancia respecto del soma de 161 - 170 μm . En las tres figuras B, C y D se muestra el promedio de la intensidad medida en cada condición más el error estándar de la media (sem). Condiciones de tratamiento: neurona control (N C); neurona tratada con A β (N A β), co-cultivo neurona-microglía control (MN C); co-cultivo neurona-microglía tratado con A β (MN A β).

En el caso de Psm1, no observamos diferencias significativas en ninguno de los intervalos elegidos (Figura 4-B, Figura 4-C y Figura 4-D). No obstante, a 161 - 170 μm se detecta una

tendencia a la reducción de la proteína entre N A β y MN A β ($p = 0,1433$ para $n = 5$) (**Figura 4-D**).

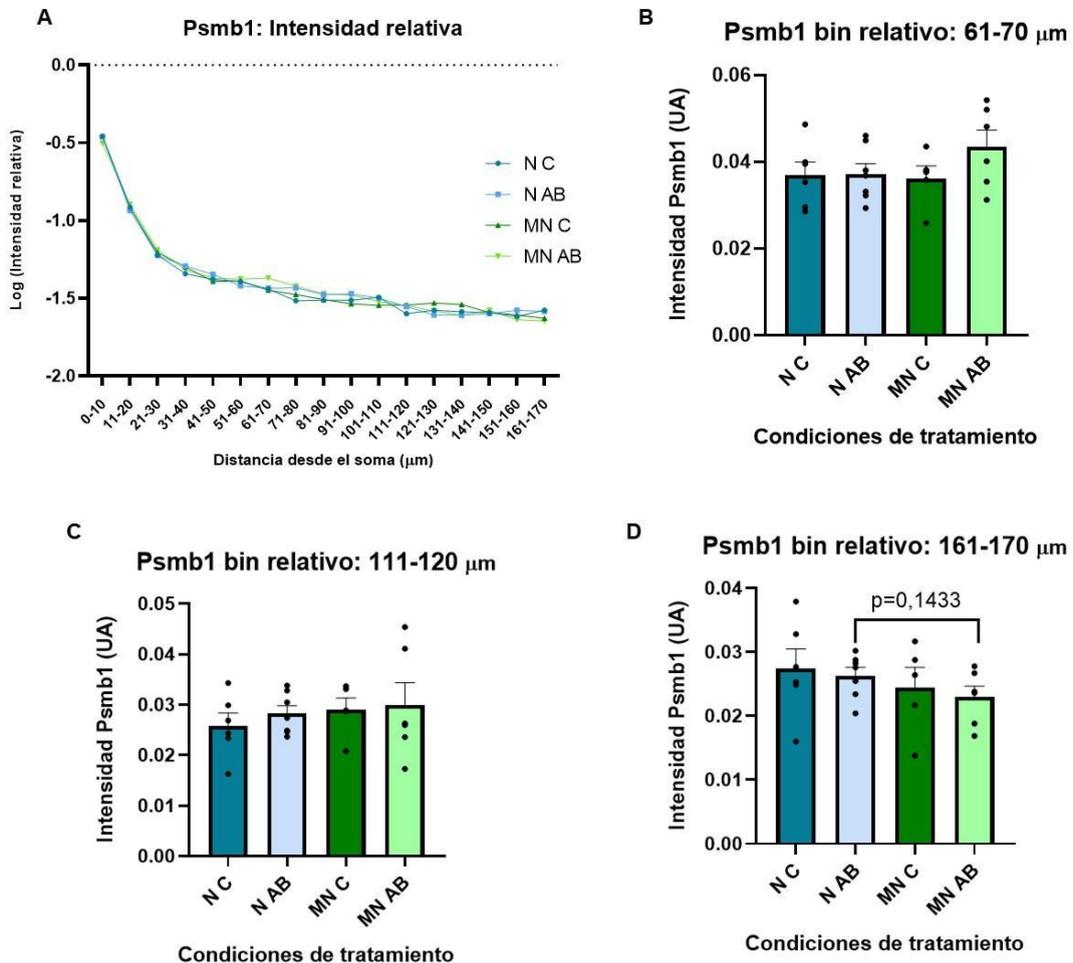


Figura 4. Resultados del procesamiento de datos de la intensidad de la proteína proteosomal Psmb1 en los axones neuronales. (A) Perfiles de intensidad promedio relativa al total de intensidad de cada condición experimental, en función de la distancia respecto del centro del soma en μm . En escala logarítmica para facilitar la observación de su tendencia. (B) Representación de la intensidad de Psmb1 en unidades arbitrarias (UA) en función de las condiciones experimentales en un intervalo de distancia respecto del soma de 61 - 70 μm . (C) Representación de la intensidad de Psmb1 en unidades arbitrarias (UA) en función de las condiciones experimentales en un intervalo de distancia respecto del soma de 111 - 120 μm . (D) Representación de la intensidad de Psmb1 en unidades arbitrarias (UA) en función de las condiciones experimentales en un intervalo de distancia respecto del soma de 161 - 170 μm . Tendencia entre las condiciones N A β y MN A β ($n=5$). En las tres figuras B, C y D se muestra el promedio de la intensidad medida en cada condición más el error estándar de la media (sem). Condiciones de tratamiento: neurona control (N C); neurona tratada con A β (N A β), co-cultivo neurona-microglía control (MN C); co-cultivo neurona-microglía tratado con A β (MN A β).

Igualmente sucede con la proteína Psmc2 (**Figura 5-B**, **Figura 5-C** y **Figura 5-D**), donde únicamente se manifiesta una tendencia en el en el intervalo 111 - 120 μm desde el soma ($p = 0,0735$ para $n = 5$) (**Figura 5-C**).

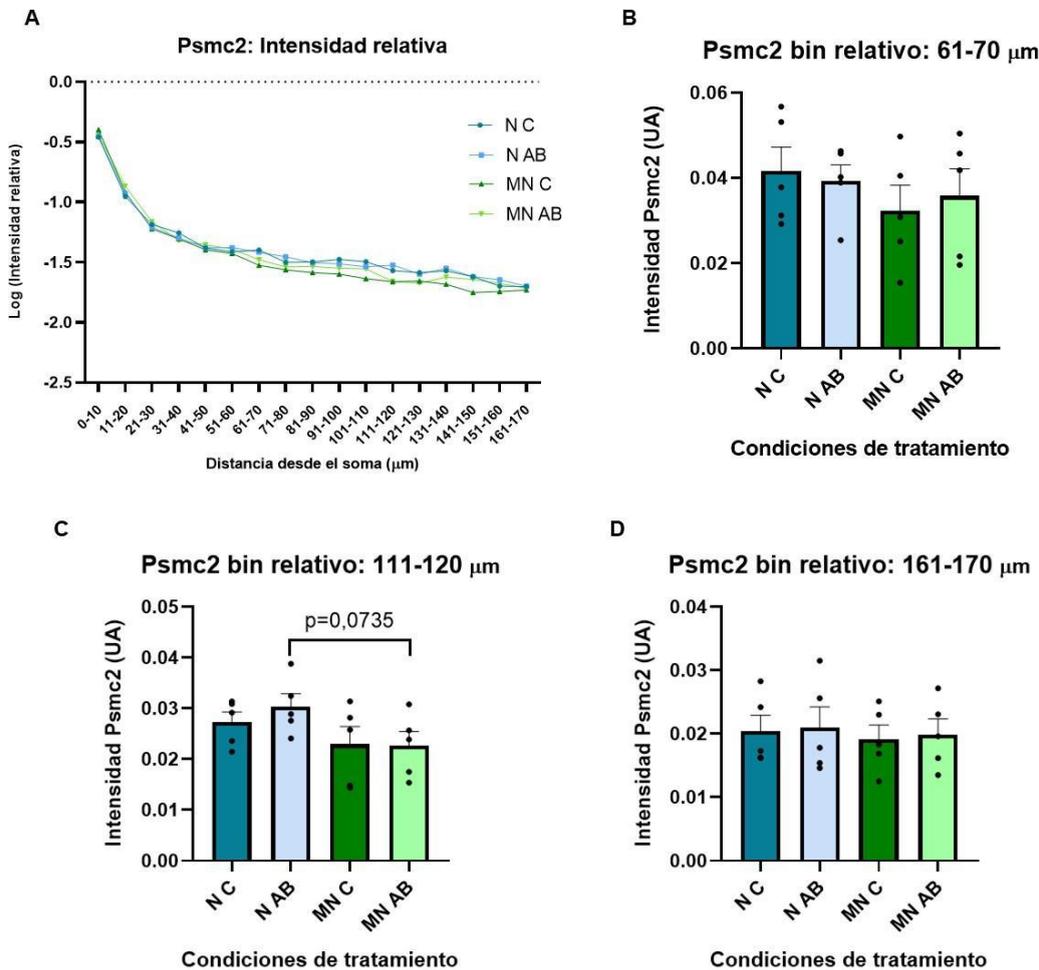


Figura 5. Resultados del procesamiento de datos de la intensidad de la proteína proteosomal Psmc2 en los axones neuronales. (A) Perfiles de intensidad promedio relativa al total de intensidad de cada condición experimental, en función de la distancia respecto del centro del soma en μm . En escala logarítmica para facilitar la observación de su tendencia. (B) Representación de la intensidad de Psmc2 en unidades arbitrarias (UA) en función de las condiciones experimentales en un intervalo de distancia respecto del soma de 61 - 70 μm . (C) Representación de la intensidad de Psmc2 en unidades arbitrarias (UA) en función de las condiciones experimentales en un intervalo de distancia respecto del soma de 111 - 120 μm . Tendencia entre las condiciones N A β y MN A β ($n=5$). (D) Representación de la intensidad de Psmc2 en unidades arbitrarias (UA) en función de las condiciones experimentales en un intervalo de distancia respecto del soma de 161 - 170 μm . En las tres figuras B, C y D se muestra el promedio de la intensidad medida en cada condición más el error estándar de la media (sem). Condiciones de tratamiento: neurona control (N C); neurona tratada con A β (N A β), co-cultivo neurona-microglía control (MN C); co-cultivo neurona-microglía tratado con A β (MN A β).

6. DISCUSIÓN

En resumen, para alcanzar el objetivo de validar del estudio proteómico mediante la detección de las proteínas de interés Psmd7, Psmb1 y Psmc2 en los axones, se empleó la técnica de inmunocitoquímica, confirmando su presencia.

Por otro lado, no se verifica la hipótesis establecida en la que la microglía y la presencia de $A\beta$ inducirían la expresión local de la proteína proteosomal Psmd7, pero reducirían la expresión local de Psmb1 y Psmc2. En contra de lo esperado, a nivel experimental se observa que la expresión local axonal de Psmd7 en presencia de $A\beta_{1-42}$ y microglía disminuye en comparación a su expresión sin la presencia de microglía, existiendo incluso una diferencia significativa entre dichas condiciones.

Esta diferencia entre los datos esperados por el estudio de proteómica y los obtenidos experimentalmente a través de la cuantificación de fluorescencia, puede deberse a los métodos de normalización que suele emplear la técnica de proteómica. La normalización de los datos para su posterior análisis estadístico en proteómica se realiza respecto a la cantidad de proteínas detectadas, en este caso, superando las 1800. Sin embargo, los resultados experimentales obtenidos en este estudio se normalizan respecto al área y cantidad total de proteína de interés.

En el caso de Psmb1 y Psmc2, a pesar de no haber detectado cambios significativos entre las condiciones en estudio, sí se aprecia una tendencia en dirección a la hipótesis establecida ya que su expresión local en presencia de $A\beta_{1-42}$ y microglía disminuye en comparación a su expresión sin la presencia microglial. Por ello, si se contara con un mayor número de experimentos, estas proteínas podrían ser finalmente validadas en un futuro.

Mediante inmunocitoquímica observamos una disminución de la expresión de las proteínas en estudio en presencia de microglía y de $A\beta_{1-42}$ en comparación con los cultivos de neuronas, lo que sugiere que la microglía juega un papel inhibitorio en la expresión de las mismas en los axones.

La inhibición del proteosoma implica que este no pueda cumplir su función de mantener la homeostasis de proteínas en el organismo catalizando su degradación selectiva. De esta manera, se va a generar la acumulación de proteínas que deberían ser eliminadas. Estudios demuestran que durante la evolución de la EA se produce la acumulación de proteínas aberrantes y mal plegadas que exhiben funciones neurotóxicas (Bhatia *et al.*, 2023). Por ello,

esta inhibición mediada por la microglía puede tener consecuencias en el proteoma local que contribuyan al desarrollo de la enfermedad.

Como ya se comentó anteriormente, existen evidencias de que las células de Schwann suministran polirribosomas a axones dañados, indicando que estas células son capaces de regular la síntesis de proteínas axonales a través de la transferencia de ribosomas localmente (Court *et al.*, 2008). Parece ser que esta transferencia se lleva a cabo mediante vesículas extracelulares que establecen una conexión glia - neurona contribuyendo a la modulación del proteoma local (Lopez-Leal & Court, 2016).

Ya se conocen casos en los que las vesículas extracelulares gliales afectan al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Parece que las vesículas microgliales pueden contener formas tóxicas de $A\beta_{1-42}$ y $A\beta_{1-40}$ que contribuyen a la propagación de especies amiloides neurotóxicas por el cerebro. Además, también pueden portar miARN específicos que inhiban la traducción de proteínas (Pistono *et al.*, 2021).

Esto expone una posible hipótesis basada en la liberación de componentes vesiculares microgliales que de alguna manera contribuya a la inhibición proteasomal. Hipótesis apoyada por estudios realizados en el laboratorio, que exponen a la luz antecedentes de la transferencia de vesículas astrogliales con ribosomas desde los astrocitos hasta los axones neuronales. En primer lugar, se observó un enriquecimiento de las proteínas ribosomales al secuenciar vesículas astrogliales. Después, se detectó el aumento de ribosomas en los axones neuronales al co-cultivar las neuronas y astrocitos, lo que demuestra la transferencia de estas proteínas ribosomales vía vesicular. Esto concuerda con el estudio proteómico donde uno de los cluster sugería que los astrocitos regulan la expresión de proteínas implicadas en la síntesis proteica.

En el caso de la microglía, en el estudio proteómico no se observa la regulación de las proteínas ribosomales pero sí de las proteosomales. Por ello, es posible que la microglia pueda liberar componentes vesiculares que inhiban la expresión del proteosoma influyendo en la modulación del proteoma local y favoreciendo la evolución de la EA.

7. CONCLUSIONES

En este trabajo confirmamos la presencia de Psm7, Psm1 y Psm2 en los axones neuronales. Sin embargo, mientras que Psm7 muestra una expresión en presencia de microglía contraria a los estudios proteómicos, probablemente debido a las diferencias en la

normalización de los datos entre ambos métodos, Psmbl y Psmc2 sí muestran tendencias en línea a lo esperado. Además, se observa una tendencia inhibitoria de la expresión de las subunidades del proteasoma por parte de la microglía, lo que sugiere la necesidad de investigaciones posteriores para definir las causas y consecuencias de esta inhibición. Por ejemplo, estudios relacionados con la supervivencia neuronal cuando se inhibe por completo la expresión del proteasoma o al administrar vesículas microgliales aisladas en un contexto de EA.

Finalmente, para terminar de validar sólidamente este estudio proteómico, debería realizarse la detección de la presencia del propio mRNA de las proteínas de interés en las neuritas por PCR y analizar la traducción local de cada una de ellas. Esto permitiría abrir futuras líneas de investigación a la hora de determinar las funciones del proteoma local durante la EA, con el fin de establecer nuevas dianas terapéuticas que disminuyan la progresión de la enfermedad.

8. AGRADECIMIENTOS

Gracias a Jimena Baleriola Gómez de Pablos, PhD, directora del *Laboratory of Local Translation in Neurons and Glia*, en *Achucarro Basque Center for Neuroscience*, y a todo su equipo, por acogerme y enseñarme tanto durante estos meses.

9. BIBLIOGRAFÍA

Baleriola, J., Walker, C. L., Jean, Y. Y., Crary, J. F., Troy, C. M., Nagy, P. B., & Hengst, U. (2014). Axonally Synthesized ATF4 Transmits a Neurodegenerative Signal across Brain Regions. *Cell*, *158*(5), 1159-1172. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.001>

Banker, G., and Goslin, K. (1998). *Culturing Nerve Cells*, 2nd Edn. Cambridge: MIT Press eBooks. ISBN: 9780262024389

Blasko, I., Veerhuis, R., Stampfer-Kountchev, M., Saurwein-Teissl, M., Eikelenboom, P., & Grubeck-Loebenstein, B. (2000). Costimulatory effects of interferon-gamma and interleukin-1beta or tumor necrosis factor alpha on the synthesis of Abeta1-40 and Abeta1-42 by human astrocytes. *Neurobiology of disease*, *7*(6 Pt B), 682–689. <https://doi.org/10.1006/nbdi.2000.0321>

Bhatia, S., Singh, M., Singh, T., & Singh, V. (2023). Scrutinizing the Therapeutic Potential of PROTACs in the Management of Alzheimer's Disease. *Neurochemical Research*, *48*, 13–25. <https://doi.org/10.1007/s11064-022-03722-w>

Court, F. A., Hendriks, W. T., MacGillavry, H. D., Alvarez, J., & van Minnen, J. (2008). Schwann cell to axon transfer of ribosomes: toward a novel understanding of the role of glia in the nervous system. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *28*(43), 11024–11029. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2429-08.2008>

Frost, G. R., & Li, Y. M. (2017). The role of astrocytes in amyloid production and Alzheimer's disease. *Open biology*, *7*(12), 170228. <https://doi.org/10.1098/rsob.170228>

Gerrits, E., Brouwer, N., Kooistra, S. M., Woodbury, M. E., Vermeiren, Y., Lambourne, M., Mulder, J., Kummer, M., Möller, T., Biber, K., Dunnen, W. F. A. D., De Deyn, P. P., Eggen, B. J. L., & Boddeke, E. (2021). Distinct amyloid- β and tau-associated microglia profiles in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, *141*(5), 681-696. <https://doi.org/10.1007/s00401-021-02263-w>

Gamarra, M. L., De La Cruz, A., Blanco-Urrejola, M., & Baleriola, J. (2021). Local Translation in Nervous System Pathologies. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, *15*(547). <https://doi.org/10.3389/fnint.2021.689208>

Hansen, D. J., Hanson, J. E., & Sheng, M. (2018). Microglia in Alzheimer's disease. *The Journal of Cell Biology*, *217*(2), 459-472. <https://doi.org/10.1083/jcb.201709069>

Kokubo, H., Kaye, R., Glabe, C. G., & Yamaguchi, H. (2005). Soluble Abeta oligomers ultrastructurally localize to cell processes and might be related to synaptic dysfunction in Alzheimer's disease brain. *Brain Research*, *1031*(2), 222–228. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.10.041>

Lopez-Leal, R., & Court, F. A. (2016). Schwann Cell Exosomes Mediate Neuron-Glia Communication and Enhance Axonal Regeneration. *Cellular and molecular neurobiology*, *36*(3), 429–436. <https://doi.org/10.1007/s10571-015-0314-3>

Mack, T. G., Reiner, M., Beirowski, B., Mi, W., Emanuelli, M., Wagner, D., Thomson, D., Gillingwater, T., Court, F., Conforti, L., Fernando, F. S., Tarlton, A., Andressen, C., Addicks, K., Magni, G., Ribchester, R. R., Perry, V. H., & Coleman, M. P. (2001). Wallerian degeneration of injured axons and synapses is delayed by a Ube4b/Nmnat chimeric gene. *Nature neuroscience*, *4*(12), 1199–1206. <https://doi.org/10.1038/nn770>

Oh, S., Hong, H. S., Hwang, E., Sim, H. J., Lee, W., Shin, S. J., et al. (2005). Amyloid peptide attenuates the proteasome activity in neuronal cells. *Mechanisms of Ageing and Development Journal*, *126*(12), 1292–1299. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2005.07.006>

Pistono, C., Bister, N., Stanová, I., & Malm, T. (2021). Glia-Derived Extracellular Vesicles: Role in Central Nervous System Communication in Health and Disease. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 623771. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.623771>

Preman, P., Alfonso-Triguero, M., Alberdi, E., Verkhratsky, A., & Arranz, A. M. (2021). Astrocytes in Alzheimer's Disease: Pathological Significance and Molecular Pathways. *Cells*, 10(3), 540. <https://doi.org/10.3390/cells10030540>

Quintela-López, T., Ortiz-Sanz, C., Serrano-Regal, M. P., Gaminde-Blasco, A., Valero, J., Baleriola, J., Sánchez-Gómez, M. V., Matute, C., & Alberdi, E. (2019). A β oligomers promote oligodendrocyte differentiation and maturation via integrin β 1 and Fyn kinase signaling. *Cell Death and Disease*, 10(6). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1636-8>

Qu, X., Lin, L., Yi, W., Sun, C., Chen, Y., & Chen, Y. (2022). Early Changes in Transcriptomic Profiles in Synaptodendrosomes Reveal Aberrant Synaptic Functions in Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 8888. <https://doi.org/10.3390/ijms23168888>

Rodríguez, J. J., Olabarria, M., Chvatal, A., & Verkhratsky, A. (2009). Astroglia in dementia and Alzheimer's disease. *Cell death and differentiation*, 16(3), 378–385. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.172>

Sun, C., Nold, A., Fusco, C., Rangaraju, V., Tchumatchenko, T., Heilemann, M., & Schuman, E. M. (2021). The prevalence and specificity of local protein synthesis during neuronal synaptic plasticity. *Science Advances*, 7(38). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abj0790>

Tseng, B. P., Green, K. N., Chan, J. L., Blurton-Jones, M., and Laferla, F. M. (2008). A β inhibits the proteasome and enhances amyloid and tau accumulation. *Neurobiology of aging*, 29(11), 1607–1618. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.014>

Tolar, M., Hey, J., Power, A., & Abushakra, S. (2021). Neurotoxic Soluble Amyloid Oligomers Drive Alzheimer's Pathogenesis and Represent a Clinically Validated Target for Slowing Disease Progression. *International journal of molecular sciences*, 22(12), 6355. <https://doi.org/10.3390/ijms22126355>

Türker, F., Cook, E. K., & Margolis, S. S. (2021). The proteasome and its role in the nervous system. *Cell chemical biology*, 28(7), 903–917. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2021.04.003>

Walker, C. A., Randolph, L. K., Matute, C., Alberdi, E., Baleriola, J., & Hengst, U. (2018). A β 1–42 triggers the generation of a retrograde signaling complex from sentinel mRNAs in axons. *EMBO Reports*, 19(7). <https://doi.org/10.15252/embr.201745435>