

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE BIOLOGIA
DEPARTAMENT DE GENÈTICA

Tesi doctoral presentada per En/Na

Sara CERVANTES ROLDÁN

amb el títol

**"Anàlisi molecular i funcional de la presenilina de
Drosophila"**

per a l'obtenció del títol de Doctor/a en

BIOLOGIA

Barcelona, 19 de desembre de 2002

INTRODUCCIÓ	1
1. LA MALALTIA D'ALZHEIMER	1
1.1. Aspectes generals	1
1.2. Histopatologia: les plaques senils i els feixos neurofibrilars	1
1.3. Tipus d'Alzheimer	3
1.4. Loci associats a la malaltia d'Alzheimer	3
1.5. La producció del pèptid β -amiloide	7
1.6. Efecte de les mutacions FAD en el processament de la β APP	9
2. LES PRESENILINES: UNA NOVA FAMÍLIA GÈNICA IMPLICADA EN PROCESSOS DE TALL TRANSMEMBRANA	10
2.1. La família dels gens de les presenilines en l'escala evolutiva	10
2.2. La proteïna presenilina	11
2.3. Les presenilines i el pèptid $A\beta$	19
2.4. Les presenilines i la senyalització a partir del receptor Notch	20
2.5. Diferències entre l'APP i Notch	25
3. ALTRES FUNCIONS DE LES PRESENILINES	26
4. LA γ -SECRETASA	32
4.1. La presenilina com a γ -secretasa	32
4.2. La γ -secretasa: característiques i substrats de la presenilina- γ -secretasa	33
4.3. Els resultats inexplicats	36
4.4. Altres proteases transmembrana: TFPPs i SPPs	39
4.5. La RIP i la seyalització al nucli	41
OBJECTIUS	45
MATERIALS	47
1. Les cèl·lules	47
2. Les línies de <i>Drosophila melanogaster</i>	48
3. Els anticossos	49
4. El DNA	50
5. Els medis de creixement i els reactius de selecció	64
6. Els oligonucleòtids	65
7. Els reactius	67
MÈTODES	69
1. Mètodes de biologia molecular	69
2. Mètodes de proteïna	72
3. Mètodes d' <i>Escherichia coli</i>	73
4. GST pull-down	76
5. Mètodes de treball amb <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	76
6. Mètodes de treball amb cèl·lules SL2	80
7. Mètodes de treball i creuaments en <i>Drosophila melanogaster</i>	84
8. Mètodes estadístics i informàtics	86

RESULTATS I DISCUSSIÓ	87
CAPÍTOL I. INTERACCIONS DE LA PRESENILINA AMB ALTRES PROTEÏNES	87
1. Triatge d'una genoteca d'expressió mitjançant la tècnica del doble híbrid	87
CAPÍTOL II. INTERACCIONS INTRAMOLECULARS ENTRE DIVERSOS DOMINIS DE LA PRESENILINA EN UN SISTEMA HETERÒLEG	91
1. Cerca d'interaccions intramoleculares mitjançant el doble híbrid	91
2. Interaccions intramoleculares detectades mitjançant el sistema de <i>l'split-ubiquitin</i>	97
3. Estudi de la dimerització del <i>loop</i> hidrofílic HL1	104
4. El motiu PALP en la formació dels dímers CTF:CTF i NTF:CTF	115
CAPÍTOL III. EXPRESSIÓ DE LA PRESENILINA EN UN SISTEMA HOMÒLEG: LES CÈL·LULES SL2 DE <i>DROSOPHILA</i>	119
1. Expressió de la presenilina en cèl·lules SL2	119
2. Expressió de diferents variants mutants de la presenilina	123
3. Expressió de dues presenilines en una mateixa cèl·lula	125
4. Localització subcel·lular de les variants de presenilina en cèl·lules SL2	129
CAPÍTOL IV. SOBREEXPRESSIÓ DE DIFERENTS VARIANTS DE PRESENILINA EN LA LÍNIA GERMINAL DE FEMELLES DE <i>DROSOPHILA</i> PER A L'ESTUDI DEL FENOTIP CUTICULAR DE LES LARVES DIPOSITADES.	133
DISCUSSIÓ	139
1. Les aproximacions per a l'estudi d'interaccions proteïna-proteïna	139
2. El tetràmer de presenilina	143
3. Mecanisme patogènic de les mutacions causants d'Alzheimer	149
4. Altres aspectes del complex presenilina- γ -secretasa	151
5. Consideracions generals	151
6. Feina de futur a curt-mig plaç	155
CONCLUSIONS	159
BIBLIOGRAFIA	161
ANNEX: Treball publicat	185

1. LA MALALTIA D'ALZHEIMER

1.1. Aspectes generals

La malaltia d'Alzheimer (AD) va ser descrita i caracteritzada per Alois Alzheimer l'any 1907, gràcies als avenços en microscòpia i en els mètodes de tinció tissular (revisat per Hardy and Gwinn-Hardy, 1998). S'estima que, actualment, afecta entre un 5 i un 10% de la població que supera els 65 anys i fins a un 40% de la població de més de 85 anys (Cummings and Cole, 2002). L'increment de la incidència de la malaltia d'Alzheimer es posa de manifest si es comparen les xifres actuals amb els dos casos que va trobar Alois Alzheimer a principi de segle (Haass, 1998). Aquesta intensificació dels casos és conseqüència de l'augment de l'esperança de vida durant aquest segle, que s'ha reflectit en un increment del nombre de malalties neurodegeneratives, entre les quals destaca la malaltia d'Alzheimer, que representa un 60-70% dels casos de demència (Selkoe, 1998).

Clínicament, aquesta malaltia es caracteritza per un deteriorament intel·lectual progressiu que afecta la memòria, el llenguatge i l'orientació, entre altres facultats mentals, causat per un dany selectiu de les regions cerebrals i dels circuits neuronals implicats en aquestes funcions, com ara l'escorça cerebral i l'hipocamp (Velez *et al.*, 1998). El gran nombre de casos i el grau de deteriorament dels pacients en els estadis més avançats de la malaltia l'han convertit en un dels problemes sanitaris més importants d'aquest segle.

1.2. Histopatologia: les plaques senils i els feixos neurofibril·lars

El diagnòstic de la malaltia d'Alzheimer requereix la realització d'un estudi clínic mitjançant unes proves neurològiques determinades que permeten excloure altres tipus de demència. És necessària una anàlisi histopatològica del teixit cerebral per tal d'obtenir la confirmació definitiva del diagnòstic neurològic. Aquesta confirmació s'obté si s'observen feixos neurofibril·lars (NFTs, de *neurofibrillary tangles*), formats per la proteïna Tau, i plaques senils, formades pel pèptid β -amiloide ($A\beta$), que s'han de trobar en excés respecte d'un individu control de la mateixa edat (figura 1). A més a més, la malaltia d'Alzheimer es caracteritza per una reducció en la densitat sinàptica i per la pèrdua de neurones (revisat per Cummings and Cole, 2002). La presència de dues estructures patològiques diferents va suscitar una controvèrsia al voltant de la importància de cadascuna d'elles en l'inici de la malaltia. Arrel d'això, van sorgir dues tendències: certs investigadors, els anomenats "taoistes", han reivindicat el rol de la proteïna Tau com a desencadenant de tots els esdeveniments patogènics de la malaltia d'Alzheimer, mentre que d'altres, els "baptistes", l'han atribuït al pèptid $A\beta$.

Els feixos neurofibril·lars (NFTs) estan formats essencialment per la proteïna Tau hiperfosforilada. La Tau és una proteïna associada als microtúbuls (MAP de *microtubule associated protein*), als quals estabilitza perquè puguin establir la polaritat cel·lular i intervenir en el transport intracel·lular. En el desenvolupament de la malaltia d'Alzheimer, la Tau és hiperfosforilada anormalment per diferents quinases. Probablement, a causa d'aquesta

hiperfosforilació, la Tau, que habitualment és soluble, es dissocia dels microtúbuls i esdevé insoluble, i forma unes estructures filamentoses, anomenades filaments intracel·lulars helicoidals. Aquestes estructures formen els NFTs, que es troben a les neurites i als cossos neuronals. Un cop s'ha produït la mort de la neurona, els NFTs queden lliures a l'espai extracel·lular (revisat per Mandelkow and Mandelkow, 1998).

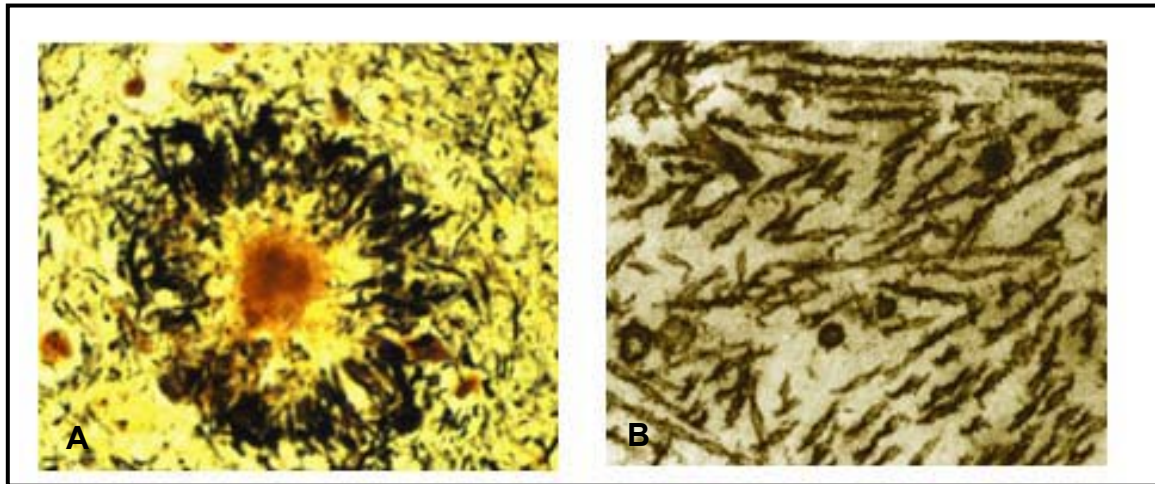


Figura 1. Micrografies corresponents a A) una placa amiloide i B) feixos de neurofibril·les formats per filaments intracel·lulars helicoidals (extret de St George-Hyslop, 2000).

Les plaques senils extracel·lulars estan formades per un nucli central amiloide envoltat d'axons i dendrites degenerants. Els dipòsits amiloides contenen agregats insolubles del pèptid β -amiloide ($A\beta$) (la β fa referència a la conformació del tipus fulla β que adopta el pèptid), que s'organitzen en fibres gruixudes barrejades amb formes no fibril·lars del pèptid. Estan envoltades i envaïdes per un nombre variable de microglia i de cèl·lules de suport, fet que indica l'existència d'un component inflamatori en el procés de neurodegeneració (revisat per De Strooper and Annaert, 2000; Velez *et al.*, 1998).

El pèptid β -amiloide, d'uns 4 kD, es produeix a partir de la proteïna precursora del pèptid β -amiloide (β APP) mitjançant uns talls proteolítics que generen una sèrie de pèptids $A\beta$, de longitud variable (39-43 aminoàcids), però que majoritàriament són $A\beta$ 1-40 i $A\beta$ 1-42 (Ray *et al.*, 1998). Les formes llargues del pèptid β -amiloide ($A\beta$ 42 majoritàriament però també $A\beta$ 43) tenen més tendència a dipositar-se i formar uns agregats que serveixen de nucli per al dipòsit d'altres formes d' $A\beta$. Estudis *in vitro* demostren que, un cop s'ha format un nucli, el creixement de les plaques amiloides és ràpid i és un procés termodinàmicament favorable (Jarrett *et al.*, 1993). És per això que es considera que la forma llarga ($A\beta$ 42) és l'amiloïdògena. El pèptid $A\beta$ també es diposita en les parets dels vasos sanguinis del cervell (dipòsits cerebrovasculars), i genera l'angiopatia cerebral amiloide en un 90% dels casos d'AD (Goate, 1998; Ray *et al.*, 1998).

1.3. Tipus d'Alzheimer

Hi ha diferents criteris que permeten classificar els casos d'Alzheimer en diferents categories o tipus. D'una banda, l'existència o no d'antecedents familiars permet dividir els casos en familiars (Alzheimer familiar o FAD) i esporàdics (Alzheimer esporàdic o SAD). En funció de l'edat d'aparició dels primers símptomes, es pot parlar d'Alzheimer presenil, quan es manifesten abans dels 60-65 anys (*early onset Alzheimer's Disease* o EOAD), i d'Alzheimer senil, quan apareixen posteriorment (Blacker and Tanzi, 1998). Aproximadament, un 45% dels casos d'AD són esporàdics i senils, un 30% són familiars i senils, un 15% són esporàdics i presenils i un 10% són familiars i presenils (Ezquerria, 2000).

Aquest elevat grau d'heterogeneïtat en la manifestació de la malaltia —amb la presència de casos esporàdics i familiars— permet preveure una gran diversitat en els factors de risc, que poden ser tant genètics com ambientals. Pel que fa als factors de risc genètics, hi podem incloure els antecedents familiars i la presència de l'al·lel $\epsilon 4$ de l'APOE. En bona part dels casos familiars, no és possible assignar un mode d'herència mendelià, fet que indica una transmissió molt més complexa, com un defecte monogènic autosòmic amb penetració incompleta, un caràcter multigènic o una interacció de factors genètics i de factors ambientals (Fraser and St George-Hyslop, 1998). D'altra banda, l'elevada heterogeneïtat en la manifestació de la malaltia obre la possibilitat que no es tracti d'una síndrome complexa amb molts subtipus, sinó que siguin moltes malalties diferents amb trets fenotípics comuns (revisat per Sorbi *et al.*, 2001).

1.4. Loci associats a la malaltia d'Alzheimer

Malgrat aquesta complexitat de fenotips d'AD, l'1% del total dels casos d'AD, que presenten una herència mendeliana simple autosòmica dominant anomenada ADEOAD (*autosomal dominant EOAD*), han permès identificar 3 gens que en són responsables: els gens de les presenilines 1 i 2 (*PS1* i *PS2*) i el gen de la *β APP*. Mutacions en aquests 3 gens causen un 50% dels casos d'ADEOAD. D'altra banda, la presència de l'al·lel de l'APOE $\epsilon 4$ és l'únic factor de risc confirmat en diferents estudis independents.

Taula 1. Resum dels loci associats a la malaltia d'Alzheimer

LOCUS	GEN	CROMOSOMA	EDAT D'INICI	DURADA	REFERÈNCIES
AD3	<i>PS1</i>	14q24.3	28-62	5.8-7.6	(Kovacs and Tanzi, 1998; Renbaum and LevyLahad, 1998)
AD4	<i>PS2</i>	1q31-q42	40-88	11.3	(Renbaum and LevyLahad, 1998)
AD1	<i>APP</i>	21q21.2	40's-60's	-	(Goate, 1998)
AD2	<i>APO E</i>	19cen-q13.2	LOAD (55-80)	-	(Online Mendelian Inheritance in Man, 2000)

1.4.1. L'APOE

El gen de l'APOE és el primer gen de susceptibilitat per una malaltia complexa que es va trobar mitjançant clonatge posicional (Pericak-Vance *et al.*, 1991). Concretament, es va trobar una associació entre l'al·lel $\epsilon 4$ de l'APOE i una elevada proporció de casos esporàdics i familiars d'Alzheimer senil (revisat per Sorbi *et al.*, 2001). Estudis d'associació genètica estimen que aquest locus (AD2), situat al cromosoma 19, explicaria més del 50% de la susceptibilitat de patir la malaltia d'Alzheimer (Roses, 1996).

L'APOE actua com a proteïna transportadora de fosfolípids i de colesterol al sistema nerviós central. El mecanisme molecular mitjançant el qual la proteïna APOE- $\epsilon 4$ exerceix la seva funció amiloïdogènica encara és parcialment desconegut. Alguns treballs han identificat una interacció entre l'extrem carboxiterminal de l'APOE, que es detecta en els dipòsits amiloides, i la proteïna β APP (Pillot *et al.*, 1999). L'afinitat d'aquesta interacció seria depenent d'isoforma, de manera que la interacció de les isoformes $\epsilon 2$ i $\epsilon 3$ de l'APOE amb l'A β permetria, a través de la interacció de l'APOE amb els seus receptors (LRP i LDL-R) situats al cervell, l'eliminació de les fibres amiloïdogèniques. Altres estudis realitzats en diferents ratolins transgènics i *knock-out* suggereixen que l'APOE participa en la conversió de l'A β a la forma fibril·lar (fulla β) (revisat per Drouet *et al.*, 2000; Holtzman, 2001).

1.4.2. La proteïna precursora del pèptid β -amiloide

Pel que fa al gen de la β APP, situat al cromosoma 21, va ser clonat a partir de l'extracció i la seqüenciació de l'A β de les plaques senils. Només hi ha 20 famílies amb mutacions en el gen β APP (Blacker and Tanzi, 1998), i totes elles presenten mutacions puntuals de canvi d'aminoàcid (*missense*) que acaben produint un increment en la producció d'A β . El fet de poder involucrar una alteració en el metabolisme de la β APP en la patologia de l'AD, va ser de gran importància per tal de poder establir els esdeveniments moleculars inicials d'aquesta patologia (Hardy and Gwinn-Hardy, 1998). Així, es va donar molt pes a la hipòtesi de la cascada amiloide, que atribueix als dipòsits amiloides un paper central en el desenvolupament de l'AD (Hardy, 1997; Hardy and Higgins, 1992).

En total, les mutacions en la β APP expliquen un 5-7% del total de casos d'EAD (Small, 1998). Les mutacions FAD en el gen de la β APP són de penetració completa, però amb una edat de manifestació molt variable, potser per l'efecte modificador de l'al·lel APOE- $\epsilon 4$ (Goate, 1998). Algunes mutacions en el gen de la β APP estan associades a un fenotip diferent de la malaltia d'Alzheimer: l'hemorràgia cerebral hereditària amb amiloïdosi del tipus alemany (HCHWA-D). Aquesta malaltia comparteix algunes característiques amb la malaltia d'Alzheimer com la deposició d'A β a les parets dels vasos sanguinis del cervell i al parènquima cerebral, però no s'observen les plaques senils ni les NFTs, segell de la malaltia d'Alzheimer. Una altra mutació, anomenada flamenca, produeix, en funció del cas, la malaltia d'Alzheimer o l'hemorràgia cerebral (revisat per Goate, 1998).

1.4.3. Contribució dels gens de les presenilines 1 i 2 en l'Alzheimer presenil

Els gens humans de les presenilines 1 i 2 (*PS1* i *PS2*, respectivament) pertanyen a una mateixa família gènica i tenen una identitat a nivell d'aminoàcid del 67%. Són responsables d'un elevat nombre de casos d'ADEOAD i van ser clonats l'any 1995 mitjançant l'estratègia d'anàlisi de lligament i clonatge posicional (Levy-Lahad *et al.*, 1995; Rogaeve *et al.*, 1995; Sherrington *et al.*, 1995).

Les mutacions en *PS1*, situat en el cromosoma 14, expliquen un 50% dels casos d'ADEOAD amb una edat promig de manifestació inferior als 50 anys —entre 25 i 66 anys—. Hi ha discrepàncies en les freqüències de mutació trobades a *PS1* associades a ADEOAD, segurament a causa de les diferències en la composició de la població estudiada (Campion *et al.*, 1999; Cruts *et al.*, 1998). Amb l'excepció d'una família amb un individu portador asimptomàtic de la mutació I143F de 68 anys (Rossor *et al.*, 1996), la resta de les aproximadament 80 mutacions que s'han trobat fins ara són de penetració completa. Tot i que la *PS1* és causant de FAD, s'ha identificat una mutació esporàdica en un pacient japonès de 41 anys (Tanahashi *et al.*, 1996). Pel que fa al tipus de mutacions, la majoria són mutacions puntuals de canvi d'aminoàcid, que modifiquen residus conservats entre la *PS1* i la *PS2* humanes i conservats en les presenilines de ratolí, rata, *M. murinus* i *Xenopus laevis* i, en molts casos, fins i tot *Drosophila* i *C.elegans* (Cruts, 1998).

Altres mutacions identificades a *PS1* que, en principi, no es classifiquen com a mutacions *missense* són les anomenades $\Delta 9$ (delta 9) i $\Delta 4$ (delta 4). La primera consisteix en una mutació en el lloc acceptor d'*splicing* de l'exó 9, que produeix la deleció en pauta d'aquest exó a més d'un canvi d'aminoàcid. Alguns estudis semblen indicar que l'efecte patogènic d'aquesta mutació es deu al canvi d'aminoàcid i no a la deleció mateixa (Steiner *et al.*, 1999b). D'altra banda, també s'ha identificat una deleció de 4,6 kb en el DNA genòmic que inclou l'exó 9 en una família finlandesa. En aquest cas, l'*splicing* aberrant entre els exons 8 i 10, tot i mantenir la pauta, produeix el mateix canvi d'aminoàcid que en el cas anterior (Crook *et al.*, 1998; Hiltunen *et al.*, 2000). La mutació delta 4 està causada per la deleció de la G de la seqüència consens donadora d'*splicing* de l'intró 4 (Tysoe *et al.*, 1998). Com a conseqüència, es produeix una maduració aberrant de l'RNA missatger i es generen diferents tipus de trànscripats madurs. D'aquests, la majoria contenen deleccions totals o parcials de l'exó 4, amb pèrdua de la pauta de lectura, i un d'ells conté una inserció de 3 nucleòtids que codifiquen per treonina a causa de l'activació d'una seqüència críptica d'*splicing* a l'intró 4 (De Jonghe *et al.*, 1999; Tysoe *et al.*, 1998). Si bé aquestes mutacions, identificades inicialment com a deleccions, són de fet mutacions *missense* o bé insercions, sí que s'ha caracteritzat una deleció de dos aminoàcids deltaI83/deltaM84 causada per una deleció de 6 nucleòtids (Steiner *et al.*, 2001).

Algunes mutacions a *PS1* van lligades a l'aparició prèvia d'una patologia anomenada paraparèsia espàstica o SP (*spastic paraparesis*). Aquesta patologia, present també en casos familiars, es troba associada freqüentment amb la demència. Pel que fa a l'associació dels dos fenotips (AD i SP), s'ha identificat en famílies portadores de determinades mutacions a *PS1*, i sembla que el fenotip de SP en aquestes famílies és de penetració incompleta. L'aparició de SP va associada histopatològicament a la presència d'unes plaques senils difuses amb aspecte de

boles de cotó (*cotton wool plaques*), i, molecularment, a mutacions que produeixen una quantitat especialment elevada d'A β 42. Alguns investigadors hipotetitzen que aquest gran increment d'A β 42 genera un efecte fenotípic diferent de l'AD (Houlden *et al.*, 2000).

El gen *PS2*, localitzat al cromosoma 1, va ser clonat per la seva homologia de seqüència amb *PS1*, prèviament identificat com a gen causant de la malaltia d'Alzheimer (Rogaev *et al.*, 1995). Les mutacions a *PS2* són molt menys freqüents que les de *PS1*, amb un total de 6 mutacions puntuals de canvi d'aminoàcid descrites fins avui (Cruts, 1999). El fet que s'hagin trobat menys mutacions a *PS2* que a *PS1* pot ser degut a una edat variable i més avançada, entre 45 i 88 anys, de manifestació de la malaltia dins d'una mateixa família. Aquestes característiques dificulten la determinació del patró d'herència, de manera que alguns casos de mutacions a *PS2* podrien passar com esporàdics (Cruts *et al.*, 1998; Sherrington *et al.*, 1996). D'altra banda, les mutacions FAD de *PS2* no són de penetració completa, ja que s'ha trobat un individu portador asimptomàtic de 89 anys. L'edat d'inici de la malaltia i la penetració i la durada de la malaltia indiquen que les mutacions de *PS2* són molt menys agressives que les de *PS1* (Sherrington *et al.*, 1996).

1.4.4. Altres gens de susceptibilitat

Per tal de dilucidar els gens de risc que intervenen en les formes esporàdiques, s'han dut a terme molts estudis d'associació, la majoria dels quals no han donat resultats repetibles en les diferents poblacions analitzades. Alguns exemples són els treballs realitzats amb el receptor de les VLDL, l' α 2 macroglobulina, l' α 2-antiquimotripsina, un receptor relacionat amb el receptor de les lipoproteïnes de baixa densitat (*low-density lipoprotein receptor-related protein*), la butirilcolinesterasa, l' α 1-quimotripsina, un polimorfisme intrònic a *PS1* (revisat per Sorbi *et al.*, 2001) i un canvi d'aminoàcid al gen de la nicastrina (Dermaut *et al.*, 2002).

El fet que encara no s'hagi realitzat el diagnòstic molecular d'un cert nombre de *pedigrees*, tant d'Alzheimer presenil com senil, indica que encara hi ha alguns gens implicats en la malaltia per caracteritzar (Sherrington *et al.*, 1996), i, com a mínim, un d'ells és responsable de l'ADEOAD. L'estratègia més utilitzada avui dia són els estudis del tipus cas-control. Concretament, es realitzen *screenings* genòmics per tal de delimitar regions genòmiques compartides entre parelles de germans afectats, comparades amb germans no afectats. Els 4 gens que s'han relacionat fins ara amb la malaltia d'Alzheimer tenen en comú que intervindrien en la generació i/o l'eliminació del pèptid A β (revisat per Sorbi *et al.*, 2001). És per això que l'estudi dels fenòmens moleculars que porten en última instància a l'aparició de les NFTs i, principalment, de les plaques senils, és essencial per caracteritzar altres gens candidats de la malaltia d'Alzheimer.

1.5. La producció del pèptid β -amiloide

1.5.1. La proteïna precursora del pèptid β -amiloide

La proteïna precursora del pèptid β -amiloide (β APP) forma part de la família de proteïnes APP, que té 3 membres en mamífers: l'APP, i les proteïnes tipus APP 1 i 2 anomenades APLP1 i APLP2 (*APP-like proteins*). S'han trobat homòlegs d'APP a *Drosophila melanogaster*, *C. elegans* i *Xenopus*. Es tracta d'una família de proteïnes transmembrana de tipus I, amb un fragment extracel·lular llarg i un domini intracel·lular curt (De Strooper and Annaert, 2000). D'expressió relativament ubíqua, presenta diferents isoformes produïdes per *splicings* alternatius que generen pèptids de 695 a 770 aminoàcids (Sinha and Lieberburg, 1999). Tot i que els *splicings* no són específics de teixit (De Strooper and Annaert, 2000), el pèptid de 695 aminoàcids (APP₆₉₅) és el més abundant en neurones (Mills and Reiner, 1999). Des de la seva inserció en el reticle endoplasmàtic mitjançant un pèptid senyal durant la traducció, la β APP experimenta una sèrie de modificacions posttraduccionals que inclouen processos de N- i O-glicosilació, de sulfatació i de fosforilació. El més destacable pel que fa a les modificacions posttraduccionals són una sèrie de talls proteolítics que alliberen el domini extracel·lular soluble de β APP (APPs) i, d'altra banda, el pèptid A β (revisat per De Strooper and Annaert, 2000; Sisodia and St George-Hyslop, 2002).

Quant a la funció de la β APP, s'han identificat diversos dominis funcionals com per exemple un domini inhibidor de proteases que actuaria sobre les proteïnes del complement, i un domini d'unió a cations divalents com el Cu²⁺ i el Zn²⁺, entre d'altres. Els estudis *in vivo* atribueixen a la β APP un rol en processos relacionats amb el desenvolupament del sistema nerviós —axogènesi, diferenciació sinàptica, adhesió cel·lular i migració de cèl·lules neuronals—, regulació de l'apoptosi, l'homeòstasi del coure i el transport de vesícules axonals (revisat per Multhaup *et al.*, 1998; Muller and Kins, 2002).

1.5.2. Processament de la proteïna precursora del pèptid β -amiloide

La β APP pot ser substrat de tres activitats proteolítiques anomenades α -, β - i γ -secretasa. Inicialment, es va observar que l' α -secretasa talla dins de la seqüència corresponent al pèptid A β —entre els residus 16 i 17 de l'A β — i n'impedeix la formació; per això, es va considerar que aquest seria el tall fisiològic o "normal" que evitaria la formació de pèptid A β . Posteriorment, però, es va comprovar que les activitats β - i γ -secretasa, productores del pèptid A β , també actuen en condicions fisiològicament normals, ja que tallen en els seus extrems aminoterminal i carboxiterminal, respectivament (revisat per De Strooper and Annaert, 2000). La presència d'A β en el medi de cèl·lules transfectades amb β APP i en el líquid cefalorraquidi i el plasma de diverses espècies, va confirmar que la producció del pèptid A β es produeix en condicions no patològiques (Haass *et al.*, 1992; Seubert *et al.*, 1992).

L'activitat α -secretasa genera un domini extracel·lular soluble anomenat APPs- α , que s'allibera al líquid cefalorraquidi, i un fragment carboxiterminal de 83 aminoàcids, que queda retingut a la membrana (C83 o CTF- α) (figura 2) (Selkoe, 1998). El tall α -secretasa és un procés, en part, constitutiu i, en part, regulat per la via de la proteïna quinasa C (PKC). Estudis recents semblen indicar que l'enzim conversor del factor de necrosi tumoral α (TACE) o ADAM-

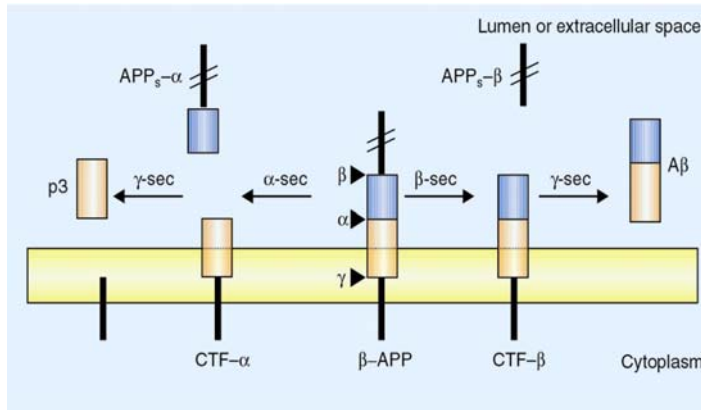


Figura 2. Esquema del processament de la proteïna precursora del pèptid β-amiloide, βAPP, i dels pèptids que es generen (extret de Walter *et al.*, 2001).

tall constitutiu com el regulat (De Strooper and Annaert, 2000; Esler and Wolfe, 2001; Nunan and Small, 2000). L'activitat α-secretasa reconeix estructures d'α-hèlix pròximes al punt de tall, que està situat a una distància de 12 aminoàcids respecte de la membrana plasmàtica, independentment de la seqüència aminoacídica (revisat per Selkoe, 1998; Sisodia and St George-Hyslop, 2002) (figures 2 i 3). Tot i que s'han dut a terme un gran nombre d'estudis, encara no s'ha confirmat la identitat de l'α-secretasa.

El primer dels talls que genera el pèptid Aβ es produeix en el seu extrem aminoterminal per l'activitat β-secretasa, que allibera un pèptid soluble anomenat APPs-β i un fragment ancorat a la membrana de 99 aminoàcids, que conté la regió del pèptid Aβ que s'anomena C99 o CTFβ (figures 2 i 3). L'enzim amb activitat β-secretasa és l'aspartil proteasa BACE (*β-site APP cleaving enzyme*), també anomenada asp2 (Yan *et al.*, 1999) o memapsin2 (Lin *et al.*, 2000) i que va ser clonada i caracteritzada per 5 grups diferents l'any 1999. Posteriorment, es va identificar un gen paràleg, BACE-2, amb un 64% d'homologia (revisat per De Strooper and Annaert, 2000; Vassar and Citron, 2000). BACE, que té un domini transmembrana, se sintetitza com a proenzim en el reticle endoplasmàtic. En el trànsit pel Golgi, el prodomini és processat i BACE queda localitzat a la membrana plasmàtica, els endosomes i vesícules trans-Golgi. La localització en aquests compartiments àcids concorda amb la localització de l'activitat β-secretasa així com amb la seva activitat catalítica (revisat per Walter *et al.*, 2001).

17, una metal·loproteasa, podria ser l'encarregat d'alliberar els dominis extracel·lulars (*ectodomain shedding*) de proteïnes transmembrana de tipus I ancorades a la membrana plasmàtica, com la βAPP. Recentment, s'ha identificat una altra proteasa de la mateixa família que TACE (família ADAM: *α disintegrin and metalloproteinase*), l'ADAM10 o kuzbanian, que produiria tant el

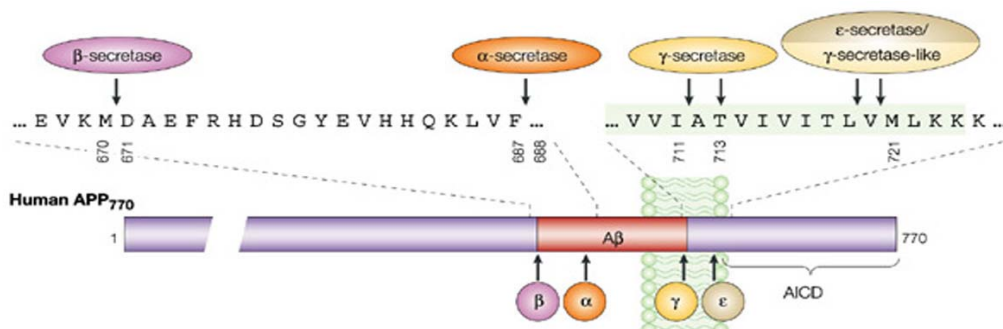


Figura 3. Localització dels talls α-, β- i γ-secretasa dins de la βAPP (extret de Sisodia and St George-Hyslop, 2002)

Els substrats de la γ -secretasa poden ser tant el fragment C83 o CTF α , generat per l' α -secretasa, com el fragment C99 o CTF β , generat per la β -secretasa. Els talls proteolítics successius de la β - i la γ -secretasa constitueixen la ruta amiloïdògena, ja que acaben produint el pèptid A β . Aquest tipus de tall proteolític és molt peculiar, ja que es dona en la regió transmembrana, en el medi altament hidrofòbic de les membranes cel·lulars, que dificulta l'entrada de la molècula d'aigua necessària per a la hidròlisi d'enllaços peptídics. L'acció de la γ -secretasa sobre el pèptid C83, genera un pèptid de 3 kD, anomenat pèptid p3, de naturalesa soluble i no amiloïdògenic però que s'ha trobat en les plaques senils (figures 2 i 3). Una altra peculiaritat de l'activitat γ -secretasa és la inespecificitat de tall, ja que pot tallar en els residus 40 o 42 (majoritàriament), i genera, així, les formes curta (A β 40) i llarga (A β 42) del pèptid A β . A més a més, es dona una proteòlisi en el residu 49, encara que s'hagi produït un altre tall al residu 40 o 42, tall anomenat ϵ , que també depèn de la γ -secretasa (figura 3) (Gu *et al.*, 2001; Sastre *et al.*, 2001; Weidemann *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2001). Les formes llarga i curta de l'A β es produeixen en condicions normals en una proporció del 10% i del 90%, respectivament. La identitat de la γ -secretasa és encara motiu de controvèrsia per la comunitat científica, malgrat que és de gran interès, ja que, en última instància, és la productora del pèptid β -amiloide (revisat per De Strooper and Annaert, 2000; Vassar and Citron, 2000).

1.6. Efecte de les mutacions FAD en el processament de β APP

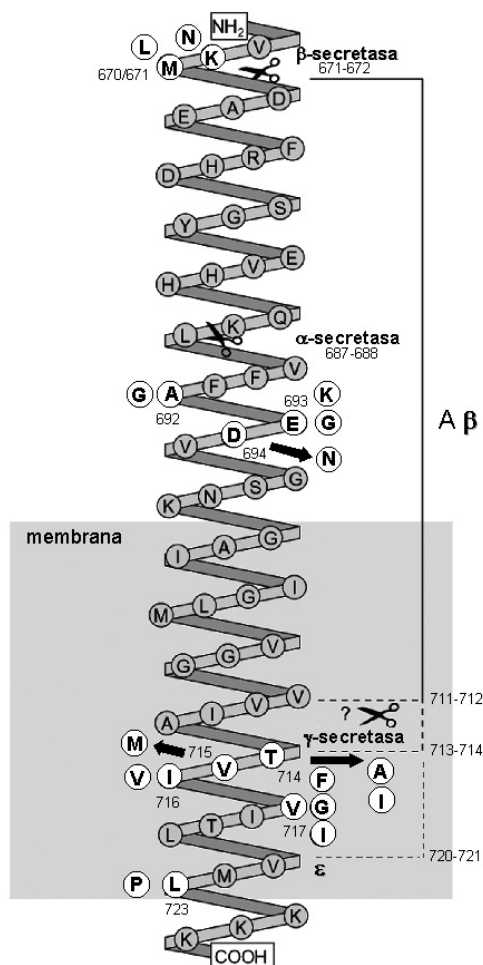


Figura 4. Esquema de les mutacions responsables d'EOAD i de la seva localització (modificat de Hardy, 1997).

S'han descrit 14 mutacions puntuals de canvi d'aminoàcid responsables d'EOAD en el gen de la β -APP. Aquestes mutacions es localitzen al voltant del pèptid β -amiloide que correspon als residus 671-713/714 de la β APP (revisat i actualitzat *online* a Hardy, 1996a; Cruts, 1999 i Nilsberth *et al.*, 2001). L'efecte bioquímic de les mutacions a la β APP en el seu processament ha estat molt estudiat i s'ha observat que les mutacions associades a la malaltia d'Alzheimer es localitzen al voltant de la regió dels talls generadors de l'A β , mentre que les mutacions que produeixen hemorràgies cerebrals (HCHWA-D) es troben dins de l'A β (Goate, 1998).

La localització de les mutacions suggereix una alteració en el processament normal de la β APP (Goate, 1998), tot i que per mecanismes diferents. En són exemples les mutacions en la valina 717, la mutació E693G i la mutació doble KM670/671NL. Les mutacions en la valina 717 (figura 4) no alteren la producció total d'A β , sinó que produeixen un increment selectiu de la forma llarga, l'A β 42, que passa d'un 10% total d'A β a un

20% (revisat per Sinha and Lieberburg, 1999). En canvi, la mutació doble KM670/671NL (figura 4) produeix un increment total en la producció d'A β (revisat per Small, 1998). Pel que fa a la mutació E693G, situada dins de l'A β (figura 4), produeix una davallada dels nivells plasmàtics d'A β 40-42, però el pèptid A β que es produeix té més tendència a agregar-se i a formar les fibres amiloides (Nilsberth *et al.*, 2001). En conjunt, excepte la mutació E693G, les mutacions en la β APP amb fenotip AD produeixen un increment en la producció de la forma llarga (A β 42) del pèptid β -amiloide (figura 4) (Hardy, 1997).

Pel que fa a les mutacions en els gens de les presenilines 1 i 2, s'ha observat tant en cultius de fibroblasts de pacients, com en cèl·lules transfectades, com en ratolins transgènics, que produeixen un increment selectiu de la forma amiloïdogènica del pèptid β -amiloide (A β -42 o A β -43), igual que les mutacions en la β APP situades al voltant de la regió de tall de la γ -secretasa (Borchelt *et al.*, 1996; Citron *et al.*, 1997; Duff *et al.*, 1996; Oyama *et al.*, 1998; Scheuner *et al.*, 1996) (vegeu l'apartat 2.3.1.). Aquest fet, conjuntament amb el mode d'herència de la malaltia, fan considerar que les mutacions en els gens de les presenilines són de guany de funció, o de guany de "malfunció", i que la proteïna mutant actuaria com a dominant negatiu sobre la proteïna silvestre.

2. LES PRESENILINES: UNA NOVA FAMÍLIA GÈNICA IMPLICADA EN PROCESSOS DE TALL TRANSMEMBRANA

2.1. La família dels gens de les presenilines en l'escala evolutiva

Després del clonatge i la caracterització dels gens de les presenilines en humans com a responsables de la majoria de casos d'ADEOAD, es van identificar ortòlegs en els organismes eucariotes pluricel·lulars i, igual que en humans, se'n van identificar dues a la resta de mamífers. Pel que fa a altres vertebrats, com *Danio rerio* i *Xenopus laevis*, també tenen dos gens de presenilina. Quant als invertebrats model, *Drosophila melanogaster* només té un gen (*psn*) i *C.elegans* en té 3: *sel-12*, *spe-4* i *hop-1*. D'aquests últims, els 2 primers no van ser identificats per la seva relació amb la malaltia d'Alzheimer, sinó que es van trobar en cerques sistemàtiques de gens implicats en altres processos (Levitan and Greenwald, 1995; L'Hernault and Arduengo, 1992). Recentment, mitjançant cerques molt específiques en bases de dades de proteïnes i de seqüències nucleotídiques, s'ha identificat *in silico* una nova família molt similar a la de les presenilines. La família dels homòlegs de presenilina (PSH) o també anomenades IMPAS, té representants en tota l'escala evolutiva, des de procariotes i llevats —on no s'havia identificat cap presenilina— fins a plantes, artròpodes, nemàtodes i vertebrats (Grigorenko *et al.*, 2002; Ponting *et al.*, 2002).

2.1.1. Els gens de les presenilines en humans

Els gens *PS1* i *PS2*, que codifiquen per proteïnes de 467 i 448 aminoàcids respectivament (Cruts *et al.*, 1996), mantenen la seva homologia, tant a nivell de seqüència codificant, amb un 67% d'identitat aminoacídica, com en la seva organització genòmica, ja que

els 10 exons codificants i els límits intró-exó es mantenen (Levy-Lahad *et al.*, 1996). Tot i l'elevat grau de conservació, es troben algunes diferències en el patró d'expressió i en alguns dels productes d'*splicing* que s'han identificat.

Ambdós gens són d'expressió molt generalitzada. Els RNAs missatgers majoritaris de *PS1* i de *PS2*, de 2.7kb i de 2.3kb, respectivament (Rogaev *et al.*, 1995; Sherrington *et al.*, 1995), es troben en les neurones de la majoria de regions del cervell analitzades on, a més a més, *PS1* s'expressa més que no pas *PS2* (Rogaev *et al.*, 1995). Pel que fa a la resta de teixits, s'ha detectat expressió al cor, la placenta, el ronyó, el pulmó, el múscul esquelètic, el pàncreas i el fetge d'ambdues presenilines, tot i que *PS2* presenta un nivell d'expressió molt baix, excepte en alguns teixits (Levy-Lahad *et al.*, 1996; Rogaev *et al.*, 1995; Sherrington *et al.*, 1995).

Tant *PS1* com *PS2* presenten *splicings* alternatius, dels quals el de l'exó 8 és comú pels 2 gens però amb diferent especificitat de teixit: la isoforma curta de *PS1* només es detecta a leucòcits (Rogaev *et al.*, 1995; Rogaev *et al.*, 1997). Aquesta isoforma (delta exó 8 o $\Delta 8$) es tradueix, a nivell de proteïna, en una deleció de 33 aminoàcids i el canvi de l'aspàrtic 257 de *PS1* per una alanina (Rogaev *et al.*, 1997).

2.1.2. El gen de la presenilina de *Drosophila*

El gen de la presenilina de *Drosophila* (*psn*) està situat al cromosoma III i mapa a la banda 77 3C (*flybase*). S'organitza en 9 exons i genera un missatger de 2kb present en tots els estadis del desenvolupament, excepte a pupa, i majoritari en els estadis embrionaris. Pel que fa a l'expressió espacial, s'ha trobat el transcrit per hibridació *in situ whole mount* en tots els teixits, com les *nurse cells*, l'ovòcit, el blastodem sincicial, en tots els teixits embrionaris i en discs imaginals d'ull-antena i de pota (Boulianne *et al.*, 1997; Hong and Koo, 1997; Marfany *et al.*, 1998; Ye and Fortini, 1998). Presenta un exó alternatiu, a causa de la presència de dues seqüències donadores d'*splicing* a l'intró 7, de 42 nucleòtids que codifica per 14 aminoàcids, de manera que es poden generar dues isoformes de presenilina: una llarga, de 541 aminoàcids i una curta, de 527. En adults, s'han trobat els dos tipus de transcrits (Marfany *et al.*, 1998).

2.2. La proteïna presenilina

2.2.1. Característiques de la presenilina

2.2.1.1. Topologia

Les prediccions d'hidrofobicitat de les presenilines indiquen que es tracta de proteïnes amb diverses regions hidrofòbiques, previsiblement ancorades a la membrana. Del total de 10 regions hidrofòbiques que es prediuen, s'ha demostrat que 8 d'elles són dominis transmembrana. Els experiments per determinar la topologia duts a terme *in vivo* en *C.elegans* amb sel-12 i *PS1* conclouen que hi ha 8 dominis transmembrana i que els extrems aminoterminal i carboxiterminal, així com una gran regió hidrofílica entre els dominis transmembrana VI i VII, es troben encarats al citoplasma (Li and Greenwald, 1996; Li and Greenwald, 1998) (figura 5).

condicions de sobreexpressió de presenilines, així com d'inducció d'apoptosi, i té lloc en el *loop* entre les transmembranes VI i VII, a C-terminal del tall endoproteolític (figura 6) (Kim *et al.*, 1997b; Loetscher *et al.*, 1997). Les dades obtingudes per Grunberg *et al.*, (1998) indiquen que el substrat de les caspases, proteases associades a processos apoptòtics, seria el fragment CTF i no l'holoproteïna.

Les presenilines experimenten altres modificacions posttraduccional no relacionades amb mecanismes de processament. Concretament, s'han descrit fosforilacions en residus serina en el CTF de la PS1, segurament per la proteïna quinasa C (PKC) i la proteïna quinasa A (PKA). Aquestes quinases actuen només sobre els fragments endoproteolítics (Seeger *et al.*, 1997; Walter *et al.*, 1997). També es troben dianes consens de fosforilació per la Glicogen sintasa quinasa 3 β (GSK-3 β) (vegeu l'apartat 3.1.) (Kirschenbaum *et al.*, 2001). En el cas de la PS2, es troben dianes de fosforilació per a caseïna quinases (CK) que actuen de forma constitutiva (Walter *et al.*, 1996; Walter *et al.*, 1998) (figura 6).

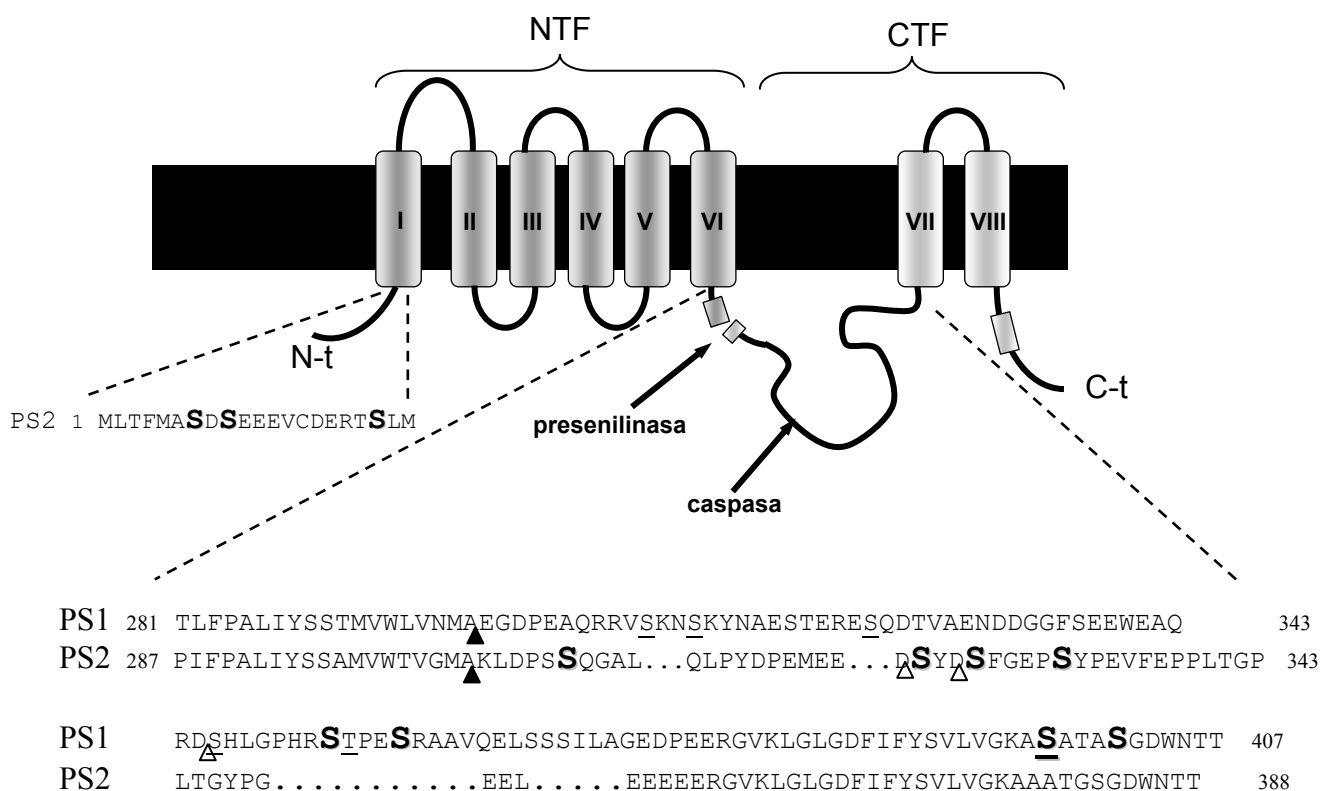


Figura 6. Modificacions posttraduccional de les presenilines. Es representen els llocs de proteòlisi presenilinas i caspasa així com les seqüències aminoacídiques de les regions que presenten fosforilacions. **S**, fosforilacions per la CK1 de PS2 i per la GSK-3 β de PS1 i 2, **S**, fosforilacions per la PKC i/o la PKA. Triangles negres, talls endoproteolítics. Triangles buits, talls per caspases.

2.2.2. Localització subcel·lular

S'han realitzat moltes aproximacions metodològiques en una gran diversitat de teixits i tipus cel·lulars amb l'objectiu de resoldre la manca de consens sobre la localització subcel·lular de les presenilines en diferents tipus cel·lulars i teixits. En la taula 2, s'esquematitzen alguns dels treballs que han tractat aquests problemes.

En general, es considera una localització de la presenilina en tota la via secretora — encara que en l'aparell de Golgi la presenilina és molt minoritària— fins a la membrana plasmàtica. La localització de les presenilines en relació amb la seva funció es discuteix més endavant (vegeu l'apartat 4.3.).

Taula 2. Localització subcel·lular de les presenilines

LOCALITZACIÓ	MÈTODE	TIPUS CEL·LULAR TEIXIT	EXPRESSIÓ	REFERÈNCIES
reticle endoplasmàtic Golgi	immunocitoquímica	fibroblasts COS-1	endògena transitòria	(De Strooper <i>et al.</i> , 1997)
reticle endoplasmàtic (holoproteïna) Golgi (NTF/CTF)	fraccionament subcel·lular	CHO HEK293	induïble	(Zhang, 1998)
membrana plasmàtica via secretora reticle endoplasmàtic vesícules embolcall nuclear	GFP (microscòpia confocal i TIRM*)	HEK293	estable	(Kaether <i>et al.</i> , 2002)
reticle endoplasmàtic Golgi	fraccionament subcel·lular	HEK293 cervell humà	endògena	(Yu, 1998)
membrana plasmàtica	GFP	<i>C.elegans</i>	transgènic	(Levitan, 1998)
membrana plasmàtica regió perinuclear citoplasma	immunocitoquímica	<i>Nurse cells</i> discs imaginals d'ala <i>Drosophila</i>	endògena	(Ye and Fortini, 1998)
membrana plasmàtica	biotinilació, precipitació	cèl·lules SL2 (<i>D.mel</i>)		
membrana plasmàtica vesícules citoplasmàtiques	immunocitoquímica	cèl·lules retina nurse cells cèl·lules fol·liculars	endògena	(Nowotny <i>et al.</i> , 2000)
membrana plasmàtica (laterals)	immunocitoquímica	epiteli pròstata	endògena	(Singh <i>et al.</i> , 2001)
endosomes primerencs (reticle endoplasmàtic Golgi, minoritària)	fraccionament subcel·lular immunofluorescència	PC12	endògena	(Lah and Levey, 2000)
reticle endoplasmàtic (holoproteïna) subcompartiment del reticle vesiculat desconegut	immunofluorescència fraccionament subcel·lular immunocitoquímica electrònica	N2a HEK293 N2a	endògena estable	(Kim <i>et al.</i> , 2000)
reticle endoplasmàtic compartiment intermedi vesícules COPII (transport anterògrad)	fraccionament subcel·lular immunofluorescència	neurones de l'hipocamp de ratolí	endògena estable (transgènic)	(Annaert <i>et al.</i> , 1999)

2.2.2. Biologia cel·lular

Els primers experiments de caracterització de les presenilines ja van aportar algunes dades sobre la peculiar biologia cel·lular d'aquestes proteïnes: en ratolins transgènics que expressen hPS1 o hPS2 es produeix el fenomen del desplaçament (*displacement phenomenon*), que consisteix en la substitució, a nivell posttraduccional, dels fragments NTF i CTF endògens (tant de PS1 com de PS2) pels fragments de la presenilina que s'està sobreexpressant (Ratovitski *et al.*, 1997; Thinakaran *et al.*, 1996; Thinakaran *et al.*, 1997). La presenilinas actua sobre l'holoproteïna, de vida mitja curta, poc després de la seva síntesi i genera els dos fragments NTF i CTF, la forma de presenilina majoritària i estable (Podlisny *et al.*, 1997; Ratovitski *et al.*, 1997; Thinakaran *et al.*, 1996). Aquest fenomen i el fet que la producció dels NTF i CTF sigui saturable (vegeu punt 2.1.1.2.), revela la presència d'algun factor limitant necessari per a la producció i/o estabilització dels fragments endoproteolítics (Thinakaran *et al.*, 1997). La mutació $\Delta 9$, que suprimeix la seqüència diana de la presenilinas i la manté com a holoproteïna, té una vida mitja llarga, com els fragments endoproteolítics (Ratovitski *et al.*, 1997; Zhang, 1998). Aquesta observació suggereix que, en primer lloc, es produeix l'estabilització de l'holoproteïna per unió a un factor limitant i, a continuació, es produeix l'endoproteòlisi (Zhang, 1998). L'excés d'holoproteïna (PS1 i PS2), així com de NTF i CTF expressats individualment, es degrada ràpidament via ubiquitina-proteasoma, segurament en el reticle endoplasmàtic, abans d'arribar a l'aparell de Golgi (Fraser, 1998; Kim *et al.*, 1997a; Steiner *et al.*, 1998). De fet, s'ha detectat la interacció de les presenilines amb algunes subunitats del proteasoma (Van Gassen *et al.*, 1999).

La regulació de la producció i abundància dels fragments endoproteolítics de la presenilina va obrir la possibilitat que les mutacions de presenilina associades a EOAD produeixin una alteració en l'acumulació dels fragments. Aquesta possibilitat ha estat tractada en diversos estudis, tant *in vivo* com en cèl·lules transfectades, i han donat resultats contradictoris (Lee *et al.*, 1997; Murayama *et al.*, 1997; Murayama *et al.*, 1999). Avui dia, es considera que, en cas que existeixi aquest efecte en la producció dels fragments, aquest no és el responsable de la patogenicitat de les mutacions de la presenilina, ja que s'ha observat que l'holoproteïna, com per exemple la $\Delta 9$ i altres variants de laboratori, manté la capacitat de produir el pèptid A β (Steiner *et al.*, 1999c).

En els primers experiments d'extracció dels fragments NTF i CTF en condicions suaus i de cromatografia de filtració es van detectar els fragments NTF i CTF en les mateixes fraccions, d'un pes molecular de 100 kD. Aquestes dades indicaven que els fragments es troben associats i que formen heterodímers NTF:CTF, hipòtesi que es va confirmar mitjançant experiments de coimmunoprecipitació, que detectaven els heterodímers en fraccions de diferents pesos moleculars, incloses les de pes més baix (Capell *et al.*, 1998; Seeger *et al.*, 1997; Thinakaran *et al.*, 1998; Yu, 1998). En experiments posteriors, es va determinar que els heterodímers NTF:CTF també es troben en complexos d'un pes molecular molt més elevat, d'entre 200-250 kD i, en alguns treballs, de fins a 2000 kD (Li *et al.*, 2000a; Yu, 1998). D'altra banda, l'holoproteïna no madura fins a formar aquests complexos i es detecta a pesos moleculars intermedis o molt inferiors (Capell *et al.*, 1998; Seeger *et al.*, 1997; Yu, 1998). La presenilina amb la mutació natural $\Delta 9$, incapaç de ser tallada per la presenilinas, s'incorpora als complexos

d'alt pes molecular (Capell *et al.*, 1998). Els fragments NTF i CTF de les presenilines 1 i 2 mai es troben associats formant heterodímers PS1/PS2, fet que indica que la interacció dels dos fragments endoproteolítics es produeix abans que el tall presenilinas. De fet, sha demostrat que en presenilines quimèriques PS1NTF-PS2CTF, els dos fragments es mantenen associats (Saura *et al.*, 1999). La figura 7 és una representació de la biologia cel·lular de les presenilines.

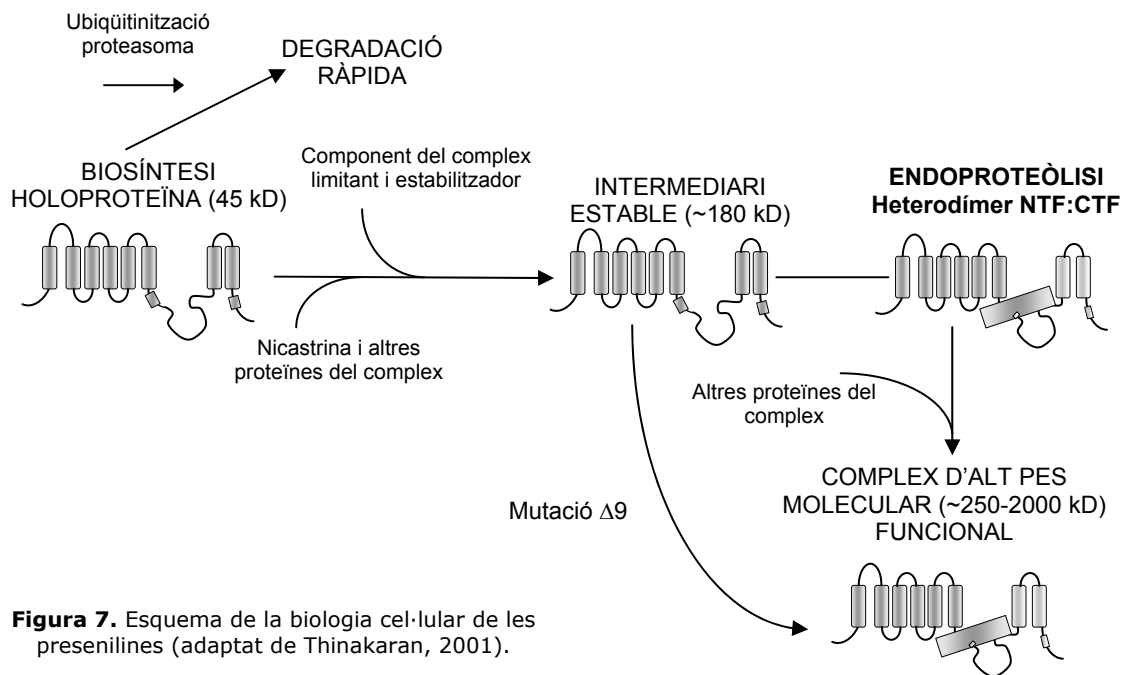


Figura 7. Esquema de la biologia cel·lular de les presenilines (adaptat de Thinakaran, 2001).

La identificació dels altres components del complex d'alt pes molecular ha estat un procés molt difícil, ja que, com que es tracta d'un conjunt de proteïnes transmembrana altament insolubles, l'extracció, la purificació i la cerca d'interaccions proteïna-proteïna pels mètodes bioquímics convencionals és un procés molt ineficient. El primer pas en la caracterització del complex va ser la identificació de la β -catenina com a coeluent en les fraccions d'alt pes molecular. La β -catenina, però, es troba àmpliament distribuïda en altres pesos moleculars, atès que existeix una fracció de β -catenina soluble, una fracció associada a la presenilina, així com a altres proteïnes, com ara cadherines, altres catenines, la proteïna APC i la GSK-3 β (Yu, 1998) (vegeu l'apartat 3.2.). Altres treballs consideren que la β -catenina no és un component fix del complex d'alt pes molecular, ja que no sempre hi és detectada. Ja més recentment, es va identificar la nicastrina com a component del complex: és una proteïna transmembrana que s'associa a la presenilina i és necessària per a la seva funció i maduració (Edbauer *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2000c). En cultius cel·lulars mutants en presenilina, la maduració, així com la localització subcel·lular de la nicastrina —es glicosila en el Golgi—, és defectuosa, i viceversa. La presenilina i la nicastrina es necessiten mútuament per formar el complex que transita per la via secretora fins a localitzar-se, segons alguns resultats molt recents, a la membrana plasmàtica (Edbauer *et al.*, 2002; Kaether *et al.*, 2002; Leem *et al.*, 2002a; Yang *et al.*, 2002). El complex d'alt pes molecular funcional ha estat parcialment caracteritzat mitjançant mètodes genètics en *C.elegans*. Els estudis d'expressió conjunta o individual dels diferents membres del complex que són la presenilina, la nicastrina (aph-2 en

C.elegans), l'aph-1 i la pen-2, demostren que són imprescindibles per a la maduració i la formació del complex i que es necessiten mútuament per tal de formar el complex funcional d'alt pes molecular (Francis *et al.*, 2002). En la figura 8 es dibuixen els membres del complex d'alt pes molecular amb activitat γ -secretasa.

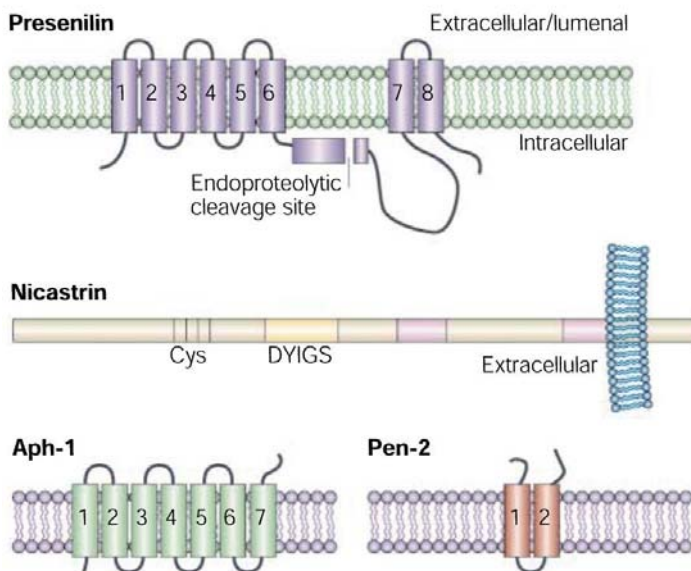


Figura 8. Els components del complex presenilina- γ -secretasa i la seva topologia (extret de Fortini, 2002).

2.2.3. Conservació dels gens de les presenilines en l'escala evolutiva

Els gens de les presenilines mantenen una elevada conservació al llarg de l'escala evolutiva, sobretot de les regions transmembrana. En la taula 2 es resumeixen les identitats aminoacídiques dels gens de les presenilines dels organismes més representatius.

Taula 3. Identitats aminoacídiques entre les presenilines més representatives

	<i>PS-1</i>	<i>PS-2</i>	<i>PSN</i>	<i>Sel-12</i>	<i>Spe-4</i>	<i>Hop-1</i>
<i>PS-1</i>		61,7%	46%	46%	17,8%	24,6%
<i>PS-2</i>	61,7%		45,1%	45,5%	15,8%	25,2%
<i>PSN</i>	46%	45,1%		41,5%	16,6%	21,1%
<i>Sel-12</i>	46%	45,5%	41,5%		17,8%	26,6%
<i>Spe-4</i>	17,8%	15,8%	16,6%	17,8%		18,6%
<i>Hop-1</i>	24,6%	25,2%	21,1%	26,6%	18,6%	

PS-1 i PS-2, presenilines humanes; psn, presenilina de *Drosophila*; sel-12, spe-4 i hop-1, presenilines de *C.elegans*

Pel que fa a les regions conservades, les 10 regions hidrofòbiques són les que presenten un grau de conservació més elevat. Les regions hidrofíliques, en canvi, l'extrem aminoterminal i el gran *loop* hidrofílic entre els transmembranes VI i VII, són molt divergents. El *loop* entre els transmembranes I i II, que està encarat cap al lumen del reticle endoplasmàtic, és el més

conservat. Quant a possibles motius funcionals conservats, cal destacar un petit motiu situat a la darrera regió hidrofòbica, a l'extrem C-terminal, el motiu PALP. Els tres darrers aminoàcids d'aquest motiu presenten mutacions associades a l'Alzheimer, mentre que la mutació de la segona prolina (P510S) produeix uns efectes dràstics en la biologia cel·lular de la presenilina, ja que n'impedeix l'endoproteòlisi i l'estabilització en el complex d'alt pes molecular (Tomita *et al.*, 2001). La integritat de l'extrem carboxiterminal de la presenilina és clau per l'estabilització i l'endoproteòlisi, ja que no permet la formació d'epítops o altres tipus de modificacions a l'extrem C-terminal (Shirovani *et al.*, 2000; Tomita *et al.*, 1999). En la figura 9 es presenta un alineament de les presenilines més estudiades on es ressalten els dominis més conservats.

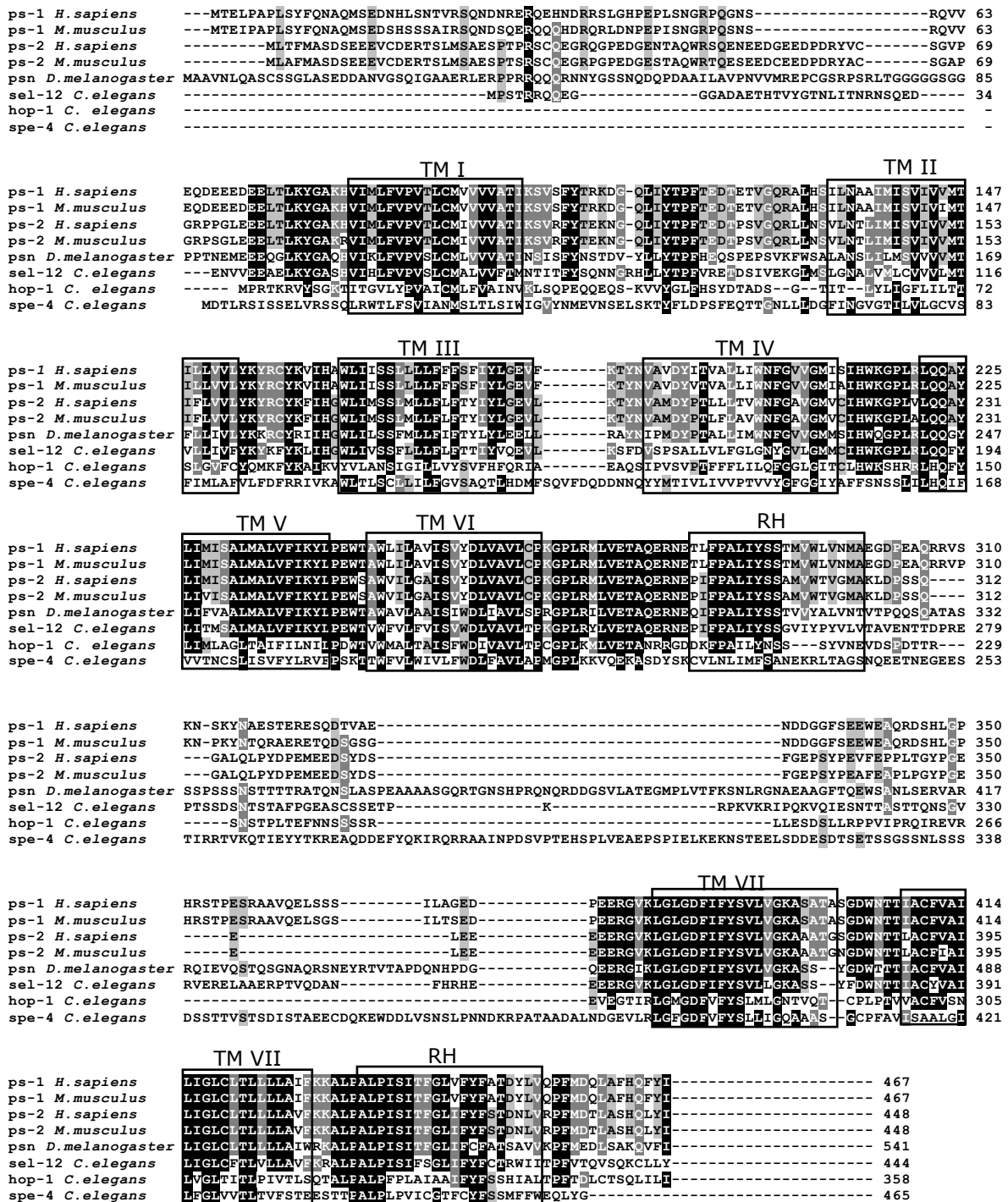


Figura 9. Alineament de les presenilines més estudiades on s'han ressaltat les regions transmembranes (TM) i hidrofòbiques (RH).

2.2.4. Mutacions de les presenilines

Les mutacions de les presenilines 1 i 2 causants d'Alzheimer han estat àmpliament discutides en l'apartat 1.5. A continuació, es presenta la localització de les mutacions (*PS1*) en el context de la topologia i dels dominis de les presenilines (figura 10).

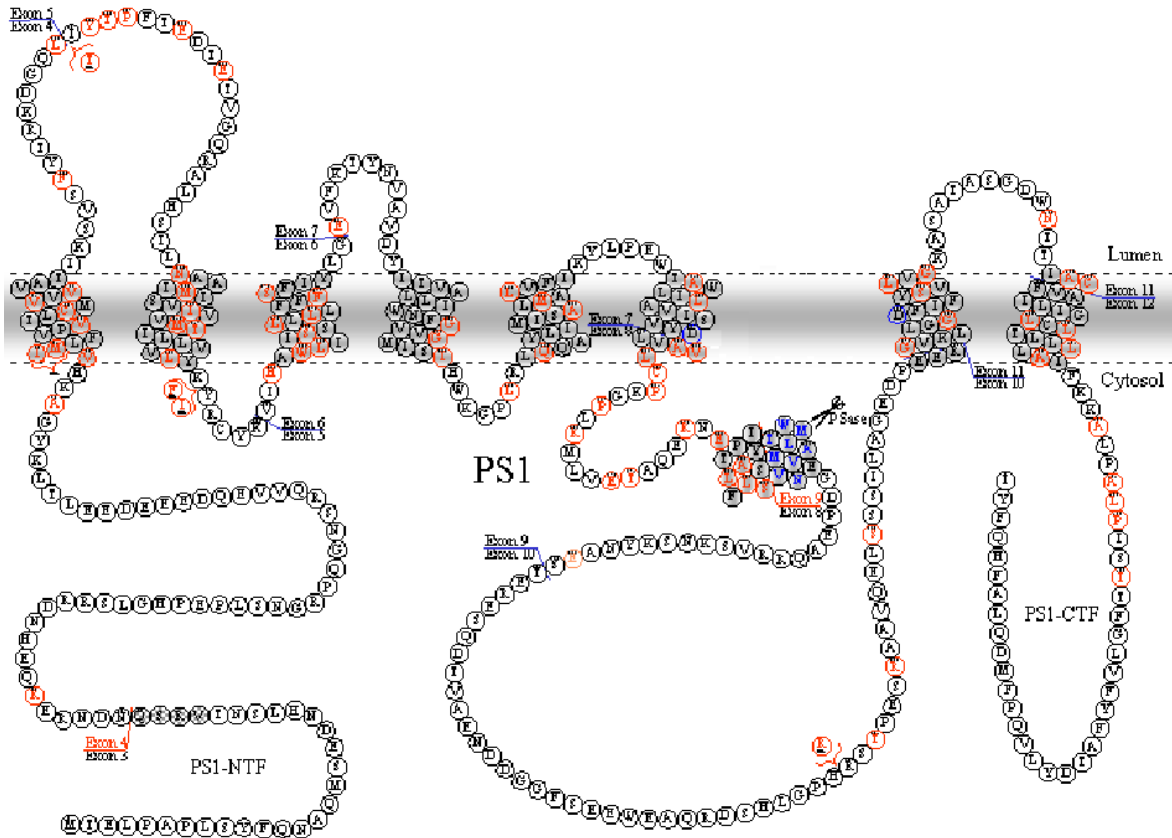


Figura 10. Esquema de la localització de les mutacions a *PS1* (vermell). En blau, mutacions creades al laboratori (modificat a partir de Hardy, 1996b).

2.3. Les presenilines i el pèptid A β

2.3.1. Les mutacions d'Alzheimer i el pèptid A β

La conseqüència de les mutacions EOAD en els gens de les presenilines 1 i 2, és a dir, l'augment en la producció d'A β 42 detectat en el plasma dels pacients i l'increment en la deposició d'A β 42, indica que s'estableix una relació directa o indirecta entre la funció de les presenilines i la formació d'A β per la γ -secretasa (Lemere *et al.*, 1996; Scheuner *et al.*, 1996). Els estudis realitzats en cultius cel·lulars per analitzar en detall la relació entre la presenilina i l'A β es basen a determinar els nivells d'A β 42 respecte d'A β 40 en el medi condicionat de cèl·lules que expressen de forma estable diferents variants de PS1 i la β APP. L'aplicació d'aquest mètode en línies cel·lulars que expressen diferents mutacions FAD de la presenilina ha permès observar que totes les mutacions FAD produeixen un increment de la proporció A β 42/40, tal com té lloc

en el plasma dels pacients (Borchelt *et al.*, 1996; Citron *et al.*, 1997). La producció intracel·lular d'A β també resulta alterada en el mateix sentit (Sudoh *et al.*, 1998; Xia *et al.*, 1998).

En el cas d'experiments en ratolins transgènics, s'han desenvolupat línies transgèniques simples per *PS1* o *PS2* i també dobles transgènics que coexpressen les diferents variants de presenilina i la β APP. El pèptid A β que es produeix es mesura a partir d'homogenats de cervell dels ratolins i, com en el cas dels cultius cel·lulars, la forma llarga d'A β es troba incrementada per les mutacions causants de l'Alzheimer. Es tracta, doncs, de mutacions de guany de funció ja que l'expressió del transgen amb la mutació anul·la la funció del gen endogen i produeix un augment selectiu d'A β 42 (Borchelt *et al.*, 1996; Citron *et al.*, 1997; Duff *et al.*, 1996; Oyama *et al.*, 1998).

2.3.2. La manca de funció de la presenilina

Els ratolins *knock-out* de presenilina 1 presenten un fenotip letal associat a múltiples defectes en el desenvolupament, en el qual s'aprofundeix en l'apartat següent. En referència amb la producció d'A β , la mort del ratolí *ps1^{-/-}* en l'estadi embrionari impedeix l'anàlisi dels efectes sobre el metabolisme de la β APP en l'organisme viu (De Strooper *et al.*, 1998). Els efectes *in vivo* de la manca parcial de *ps1* es poden estudiar en el ratolí *ps1^{+/-}*, que és viable, i presenta uns nivells d'A β totals significativament inferiors als del ratolí silvestre (Qian *et al.*, 1998). Per poder estudiar les conseqüències de la manca total de *ps1*, s'han desenvolupat línies neuronals a partir d'aquests ratolins en les quals s'observa una disminució en la producció d'A β (40 i 42) i una acumulació dels fragments C83 i C99, que són el substrat de la γ -secretasa (De Strooper *et al.*, 1998). La producció residual d'A β en aquestes cèl·lules es podria deure a l'acció de *ps2*. La redundància funcional entre els gens de les presenilines 1 i 2 només és parcial, tal com es va posar de manifest en l'estudi del *knock-out* de *ps2* que presenta un fenotip molt més lleu que el ratolí *ps1^{-/-}*. A més a més, les línies neuronals *ps2^{-/-}* transfectades amb la *h β APP* (β APP humana) no tenen alterat el metabolisme de l'A β . A partir dels dobles *knock-out* *ps1^{-/-}/ps2^{-/-}* també s'han obtingut línies cel·lulars embrionàries (blastocists) i fibroblasts que no produeixen A β (Herreman *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000). Malgrat algunes discrepàncies, s'accepta, a partir d'aquests experiments, que el *knock-out* de presenilines és també *knock-out* de γ -secretasa, la qual cosa indica que la presenilina està directament implicada en el tall γ -secretasa de la β APP.

La relació directa entre les presenilines i la β APP ha quedat demostrada per aproximacions bioquímiques que han detectat interacció entre ambdues proteïnes. Els dominis d'interacció entre la PS1/2 i la β APP s'han acotat al *loop* aminoterminal de les presenilines i al fragment C-terminal de la β APP que conté l'A β (Pradier *et al.*, 1999; Shizuka-Ikeda *et al.*, 2002; Verdile *et al.*, 2000; Weidemann *et al.*, 1997).

2.4. Les presenilines i la senyalització a partir del receptor Notch

Notch és una proteïna transmembrana de tipus I que actua com a receptor en un gran nombre de processos cel·lulars, com ara l'especificació de destí, la diferenciació, la proliferació i la supervivència. Se sintetitza com a precursor de 300 kD (figura 11 a) que, en l'aparell Golgi,

és processat per una convertasa de tipus furina en el lloc S1 (figura 11 b), i genera dos fragments que es mantenen associats no covalentment i formen un receptor heterodimèric a la superfície cel·lular (figura 11 c). Els lligands de Notch són proteïnes ancorades a la membrana i, així, la senyalització es realitza per contacte cèl·lula-cèl·lula. S'han anat descobrint diversos lligands de Notch, que, globalment, s'han anomenat lligands DSL (Delta, Serrate/Jagged i Lag-2). Després de la unió amb el lligand, es produeix l'alliberament del domini extracel·lular de Notch per l'acció de metal·loproteases, TACE (ADAM17) —es creu que en *Drosophila* actua kuzbanian—, que actuen en el lloc S2, a 12-13 aminoàcids de la membrana plasmàtica (figura 11 d). El pèptid restant sense domini extracel·lular és processat en el lloc S3, situat dins del domini transmembrana. Aquest darrer tall s'ha caracteritzat recentment i allibera el domini intracel·lular de Notch (NICD) (figura 11 e), que, directament, sense cascades de senyalització, pot interaccionar amb factors de transcripció de la família CSL (C promoter binding factor 1/Supressor of Hairless/LAG-1), que activen una sèrie de gens diana (figura 11 f). Aquests talls proteolítics seqüencials recorden els talls de les secretases que actuen sobre la β APP (revisat per Hartmann *et al.*, 2001; Kopan, 2002; Weinmaster, 2000) (figura 12).

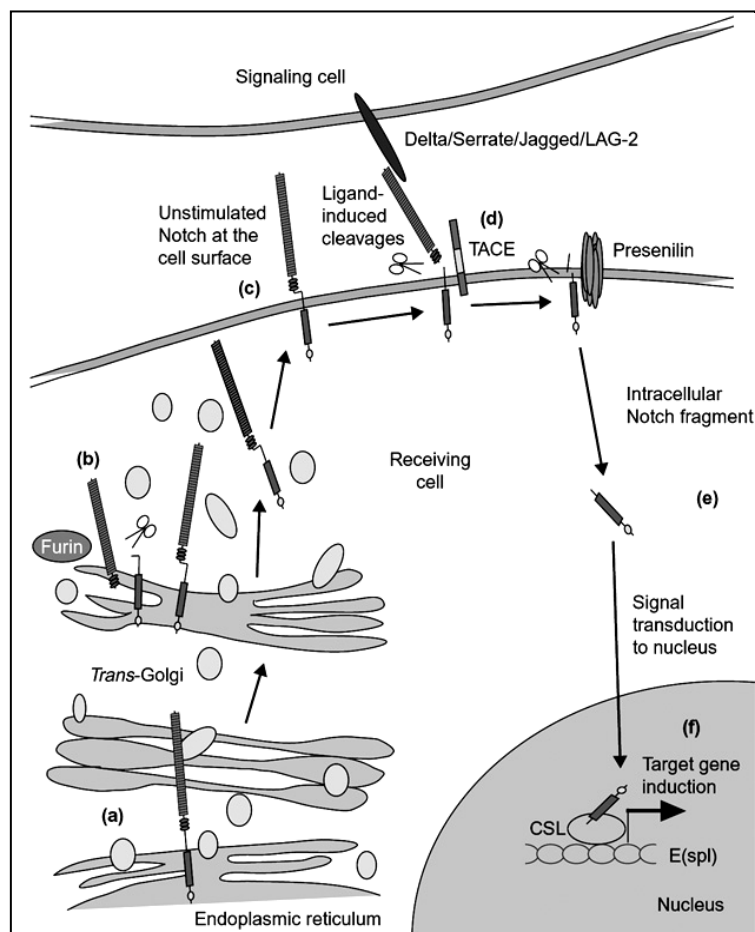


Figura 11. Esquema de la maduració i talls proteolítics del receptor Notch (extret de Fortini, 2001).

Notch actua en multitud de processos del desenvolupament que han estat estudiats amb profunditat en invertebrats com *C.elegans* i *Drosophila*. Alguns d'aquests processos, essencials per a l'estudi de la funció de Notch, i que apareixen en aquest apartat, són la formació de la

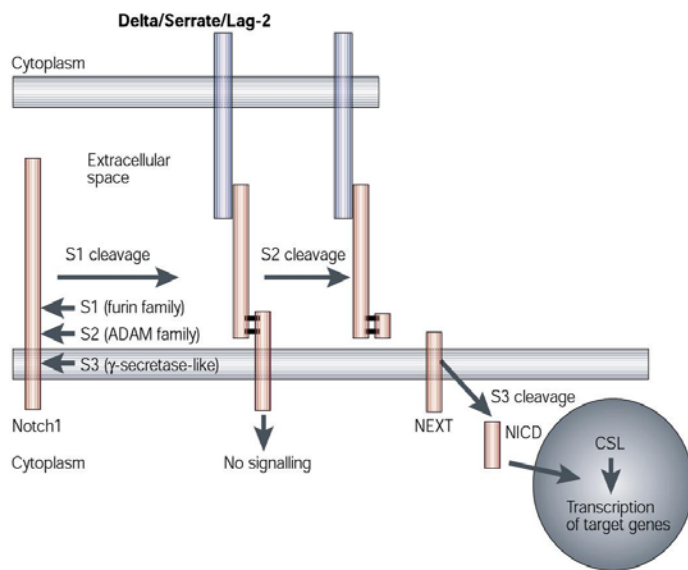


Figura 12. Esquema dels tallaments proeolítics del receptor Notch (extret de Steiner and Haass, 2000).

vulva i dels gàmetes de *C. elegans*, i la inhibició lateral en molts teixits de *Drosophila*, com per exemple: el neuroectoderm, la retina, els pèls sensorials, així com la inducció del marge de l'ala. Pel que fa als mamífers, Notch, que té 4 homòlegs, ha estat implicat en la formació de bona part del sistema nerviós, en la formació cíclica dels somites a partir del mesoderm presomític, en l'especificació de diferents tipus cel·lulars immunitaris, en la diferenciació muscular i en altres funcions de l'organisme adult (Goodbourn, 1995; Kimble and Simpson, 1997; Lewis, 1998).

A continuació, es presenten evidències obtingudes en *C.elegans*, *Drosophila melanogaster* i mamífers que pretenen mostrar com s'ha anat aclarint la connexió entre Notch i la presenilina. Les primeres dades relacionaven la presenilina amb la via de Notch per un mecanisme desconegut que, en els últims anys, s'ha anat escatint.

2.4.1. *C. elegans*

La relació entre els gens de les presenilines i el receptor Notch va quedar patent quan es va identificar la presenilina de *C.elegans* o *sel-12* (de *supressor/enhancer* de *lin-12*) en un *screening* sistemàtic de mutacions que afecten el fenotip de mutants de guany de funció de *lin-12* —nom de Notch a *C.elegans*—. Mutacions en *sel-12* de pèrdua de funció —mutacions puntuals i proteïnes truncades a N-terminal— reverteixen el fenotip de *lin-12*. En un fons silvestre, els mutants de *sel-12* presenten un fenotip que recorda la pèrdua de funció de *lin-12* (Notch) pel que fa a l'especificació de les cèl·lules de la vulva. Si no s'especificuen correctament els diferents tipus cel·lulars per manca de funció de *lin-12*, els organismes hermafrodites són incapaços de pondre ous (*egg-laying defective*) (Levitan and Greenwald, 1995).

Els estudis de l'homologia funcional entre ambdós ortòlegs, *sel-12* i *PS1*, es van realitzar mitjançant experiments de rescat fenotípic sobre mutants de *sel-12*, observant la recuperació de la capacitat de pondre ous. El mutant de *sel-12* C60S es comporta com a hipomorf i és rescatat tant per *hPS1* com per *hPS2*, però no per mutacions puntuals en *PS1* causants d'Alzheimer que es comporten com a al·lels de pèrdua de funció (Levitan *et al.*, 1996). Aquestes dades indiquen que la funció de les presenilines s'ha conservat al llarg de l'evolució. Respecte als altres gens paràlegs homòlegs a la presenilina, *hop-1* i *spe-4*, sembla que el primer presentaria una redundància parcial de funció, ja que els mutants de *hop-1* presenten fenotips similars als mutants de *lin-12* però amb una penetració molt menor, però no seria així pel

segon. Els dobles mutants *sel-12*, *hop-1* mostren un fenotip agreujat (Wittenburg *et al.*, 2000). En suport d'aquesta redundància parcial de funció entre *hop-1* i *sel-12*, el primer rescata la manca de funció de *sel-12* quan s'expressa sota el control de les seqüències promotores corresponents (Li and Greenwald, 1997). Les primeres dades sobre el rol concret, a un nivell més molecular, de *sel-12* en la via de *lin-12* provenen dels estudis de (Levitan, 1998), que van observar una reducció de *lin-12* a la membrana plasmàtica en mutants *sel-12* i van proposar una funció de *sel-12* en el transport o el processament de *lin-12*. Recentment, gràcies als estudis en *C.elegans*, s'han identificat els membres del complex de pes molecular de la presenilina amb activitat γ -secretasa (vegeu l'apartat 2.2.3.).

2.4.2. *Drosophila melanogaster*

Notch i presenilina es coexpressen en una sèrie de teixits com ara les cambres ovàriques, on les dues proteïnes colocalitzen a la membrana de les *nurse cells*, els embrions i els primordis de l'ull a larva i pupa. Presenten una elevada expressió i colocalització subcel·lular en la retina i en l'ectoderm ventral, on Notch actua especificant els neuroblasts. Pel que fa al desenvolupament del disc imaginal d'ull, les dues proteïnes s'expressen a totes les cèl·lules de l'epiteli. A més a més, modifiquen de la mateixa manera el seu patró d'expressió durant el desenvolupament de la retina (Ye and Fortini, 1998).

La interacció genètica entre Notch i presenilina es detecta en els diferents estudis realitzats. Els mutants hipomorfs de la presenilina amb genotip *psn* P507L/- (hemizigots amb un al·lel *missense*) són letals a pupa i presenten subdesenvolupament dels discs imaginals d'ull i ala i defectes en la diferenciació neuronal (Guo *et al.*, 1999). La pèrdua de funció total de presenilina zigòtica —per deficiències o per producció de proteïnes truncades—, produeix el col·lapse de les pupes dins la càpsula que no formen cap estructura adulta. Si, a més a més, s'elimina l'activitat presenilina materna, els embrions presenten una hiperplàsia del sistema nerviós característica dels mutants de Notch (Struhl and Greenwald, 1999; Ye *et al.*, 1999). Els clons *psn*^{-/-} d'ala adulta, també presenten un fenotip característic dels mutants Notch. L'anàlisi de marcadors de teixit revela una manca d'estructuració del marge de l'ala i l'aparició de precursors d'òrgans sensorials supernumeraris, fet que indica una disfunció de la inhibició lateral mediatitzada per Notch (Struhl and Greenwald, 1999; Ye *et al.*, 1999). A l'ala, en un fons mutant per Notch de pèrdua o de guany de funció, la pèrdua parcial de funció de la presenilina (heterozigots) incrementa i suprimeix el fenotip, respectivament (Guo *et al.*, 1999).

Els resultats sobre els efectes de manca de funció o sobreexpressió de presenilina en la localització subcel·lular de Notch s'han interpretat de diferents maneres. Pel que fa als mutants de presenilina o a la seva deficiència, Notch canvia i, en lloc de localitzar-se en el citoplasma i en la membrana plasmàtica, s'acumula exclusivament en la membrana plasmàtica. En l'experiment recíproc de sobreexpressió de presenilina, Notch es localitza principalment al citoplasma. Aquestes dades atribueixen a la presenilina un rol en la correcta localització en la membrana de Notch (Guo *et al.*, 1999). A més a més, la translocació al nucli del domini intracel·lular de Notch depèn de la presenilina (Struhl and Greenwald, 1999). De fet, hi ha una correlació entre l'activitat de Notch i l'alliberació del NICD, de manera que la senyalització de

Notch induïda per la unió del lligand passa pel tall S3, que depèn de la presenilina (Struhl and Greenwald, 2001).

Després de la caracterització dels altres membres del complex γ -secretasa, s'han fet diversos estudis en *Drosophila*. Concretament, s'ha estudiat en els mutants de la nicastrina la modulació de l'activitat γ -secretasa i l'alliberació del domini intracel·lular de Notch. La manca de nicastrina produeix el mateix efecte que els mutants de presenilina sobre Notch, atès que els fenotips de pèrdua de funció són molt semblats: en cultius cel·lulars, s'observa que el tall S3 de Notch no es produeix, i a més, l'estabilitat de la presenilina és menor i no es troba correctament localitzada (Chung and Struhl, 2001; Hu *et al.*, 2002; Lopez-Schier and St Johnston, 2002).

2.4.3. Models animals i cel·lulars de mamífer

2.4.3.1. Els ratolins *knock-out* i transgènics

La primera evidència d'una implicació de la presenilina en la via de Notch a mamífers es va obtenir del fenotip dels ratolins *knock-out* de la presenilina. El *knock-out* de la *PS1* mor pocs minuts després de néixer i presenta un conjunt de malformacions esquelètiques i neuronals greus. Bàsicament, té alteracions severes de les costelles, que es troben en un nombre menor, desossificades i fusionades, i no té esquelet caudal a partir de la regió pèlvica. És per això que presenta una cua molt més curta (Shen *et al.*, 1997). Els somites es troben ben formats, amb els compartiments característics, però presenten formes irregulars i estan mal alineats, recordant el fenotip d'alguns al·lels de *Notch1* i de *Delta1*. Aquests dos gens presenten uns nivells d'expressió molt inferiors en els ratolins *ps1^{-/-}*, indicant que la *ps1* podria estar regulant l'expressió d'aquests gens en el mesoderm presomític (Wong *et al.*, 1997). D'altra banda, tenen hemorràgies intracranials de grau variable i els pulmons i el cervell són anòmals. A nivell dels ventricles cerebrals així com de la regió subcortical del lòbul temporal, presenten una pèrdua total de progenitors neurals que són substituïts per una cavitat. Durant el desenvolupament del cervell, ja s'observa una manca de regions proliferatives. La causa de mort en aquest ratolins és, segurament, la malformació de la caixa toràcica que produeix dificultats respiratòries severes (Shen *et al.*, 1997).

Pel que fa al *knock-out* de *ps2*, presenta un fenotip molt lleu, és viable i no presenta diferència ni de creixement ni de pes amb els ratolins silvestres i heterozigots. Cap als 3 mesos d'edat, però, els ratolins *ps2^{-/-}* presenten un engruïment de les parets alveolars i, amb l'edat, pateixen hemorràgies pulmonars (Herreman *et al.*, 1999).

El doble *knock-out* *ps1^{-/-};ps2^{-/-}* és letal embrionari (E9.5) i presenta moltes més alteracions que el mutant de *ps1^{-/-}*: no presenta segmentació dels somites, exhibeix retard en el tancament del neuropor anterior, una pèrdua de cèl·lules en el mesènquima del cervell mig, un subdesenvolupament dels arcs branquials i del cor i un tub neural ventral molt desorganitzat. Aquests defectes pleiotròpics són presents en ratolins *ps1^{-/-};ps2^{+/-}*, fet que demostra, un cop més, que *PS1* i *PS2* tenen funcions encavalcades, però no idèntiques. Pel que fa a l'expressió dels gens controlats per la via de Notch com ara *Delta*, s'observa una desregulació de la seva expressió (Donoviel *et al.*, 1999).

En aquest fons *ps1^{-/-}* es van realitzar experiments de rescat expressant la presenilina humana silvestre o amb la mutació causant d'AD A246E, sota el control de diferents promotors, amb l'objectiu de determinar si els al·lels FAD són de pèrdua o de guany de funció. El transgen *hPS1* rescata la letalitat embrionària del *knock-out* i les deformacions esquelètiques si l'expressió del transgen va dirigida pel promotor Prp, d'expressió ubíqua. Si l'expressió del transgen està sota control del promotor Thy1, específic de neurones, els transgènics presenten fenotips molt variables, amb diferents graus de rescat, correlacionats amb els nivells d'expressió del transgen. Els transgènics Prp-*hPS1* A246E presenten un rescat total, igual que el Prp-*hPS1*, demostrant que aquesta mutació és de guany de funció (Davis *et al.*, 1998; Qian *et al.*, 1998).

2.4.3.2. Els cultius cel·lulars

Les línies cel·lulars deficientes en presenilina són deficientes també en l'activitat que allibera el domini intracel·lular de Notch en resposta al lligand. Aquestes dades s'han obtingut per diferents grups en tipus cel·lulars diferents, com ara cultius primaris de neurones, fibroblasts (De Strooper *et al.*, 1999), cèl·lules embrionàries, (Herreman *et al.*, 2000) i blastocists (Zhang *et al.*, 2000), que es comporten de la mateixa manera pel que fa a l'activitat γ -secretasa (punt 2.3.). Per tant, l'activitat γ -secretasa productora de l'A β depèn de la presenilina, igual que l'alliberament del domini intracel·lular de Notch i la seva translocació al nucli.

La interacció funcional entre la presenilina i Notch ha estat explorada a nivell bioquímic amb èxit, ja que s'ha trobat mitjançant coimmunoprecipitació, una interacció entre ambdues proteïnes (Ray *et al.*, 1999b). A més a més, gràcies als esforços de caracterització dels components del complex γ -secretasa, s'han detectat les interaccions amb els diferents candidats del complex. Així doncs, s'ha vist que la nicastrina i Notch estan interaccionant en la membrana plasmàtica (Chen *et al.*, 2001).

2.5. Diferències entre l'APP i Notch

Malgrat l'homologia entre la γ -secretasa i l'activitat que allibera el NICD, ambdues depenents de presenilina, les mutacions de presenilina que alteren la preferència del tall γ -secretasa no sempre es comporten de la mateixa manera respecte de Notch. Per exemple, les cèl·lules PS1^{-/-} que expressen al·lels FAD de presenilina, són ineficients a l'hora de processar el domini intracel·lular de Notch. El grau de processament del NICD varia entre les diferents mutacions expressades (Nakajima *et al.*, 2000; Song *et al.*, 1999). En altres treballs, es demostra que l'efecte de mutacions puntuals de presenilina sobre el processament de l'A β i la producció del NICD depèn del tipus de canvi aminoacídic que s'introdueixi (Kulic *et al.*, 2000). A més a més, els dos processos són mútuament excloents, ja que s'estableix una competència entre els dos substrats: en sobreexpressar un d'ells disminueix la proteòlisi de l'altre (Berezovska *et al.*, 2001). Altres treballs, però, no troben competència entre els dos talls proteolítics, que serien independents (Chen *et al.*, 2001; Petit *et al.*, 2002a).

3. ALTRES FUNCIONS DE LES PRESENILINES

3.1. Aproximacions funcionals mitjançant la cerca de *partners* de la presenilina

Una de les estratègies més emprades per situar una proteïna de funció desconeguda en el context d'un mecanisme cel·lular o d'una vida de transducció de senyals, és la cerca d'altres proteïnes que hi interaccionen. Aquest abordatge funcional ha estat molt utilitzat amb la presenilina, atès que s'han realitzat molts treballs —gairebé tots emprant la tècnica del doble híbrid— orientats a trobar proteïnes que permetin relacionar la presenilina amb algun procés cel·lular que pugui tenir un rol dins de la patogenicitat de la malaltia d'Alzheimer, a banda de la producció de l'A β . En la majoria dels casos, es pot posar en dubte la rellevància funcional i/o fisiològica dels companys de presenilina que s'han caracteritzat, ja que els nexes d'unió amb les funcions ja conegudes de la presenilina són difícils d'establir. Malgrat tot, alguns treballs han estat fructífers i han obert noves línies experimentals, com és el cas de la nicastrina. En la taula 4, es resumeixen els treballs realitzats en aquest sentit.

Taula 4. Proteïnes que interaccionen amb la presenilina

PROTEÏNA	DOMINI PS	REFERÈNCIES
Família de metiltransferases	loop hidrofílic	(Zhang <i>et al.</i> , 2001)
Filamines	loop hidrofílic	(Guo <i>et al.</i> , 2000; Zhang <i>et al.</i> , 1998a)
PBP (presenilin binding protein)	loop hidrofílic	(Kashiwa <i>et al.</i> , 2000)
Telencephalin	8 aminoàcids a C-terminal i TMI	(Annaert <i>et al.</i> , 2001)
Família armadillo-catenines	loop hidrofílic	(Levesque <i>et al.</i> , 1999; Murayama <i>et al.</i> , 1998; Stahl <i>et al.</i> , 1999; Tanahashi and Tabira, 1999; Zhou <i>et al.</i> , 1997)
Bcl-X_L	CTF caspasa	(Passer <i>et al.</i> , 1999)
Rab11	loop hidrofílic	(Dumanchin <i>et al.</i> , 1999)
Calmyrin	loop hidrofílic	(Stabler <i>et al.</i> , 1999)
TPIP (TPR-containing PS1 interacting protein)	loop N-terminal	(Prihar <i>et al.</i> , 1999)
μ-calpain	loop hidrofílic	(Shinozaki <i>et al.</i> , 1998)
G₀	39 aminoàcids C-terminal	(Smine, 1998)
Ubiquilin	loops hidrofílic i C-terminal	(Mah <i>et al.</i> , 2000)
Syntaxin 1A	loop hidrofílic	(Smith <i>et al.</i> , 2000)
PBP (presenilin binding protein)	loop hidrofílic	(Kashiwa <i>et al.</i> , 2000)
DRAL	loop hidrofílic	(Tanahashi and Tabira, 2000)
PSD-95/Dlg/ZO-1 (PDZ)-like protein	loop C-terminal	(Xu <i>et al.</i> , 1999)
QM/Jif-1	diversos dominis	(Imafuku <i>et al.</i> , 1999)
GSK-3β	aminoàcids 250-298	(Takashima <i>et al.</i> , 1998)
Tau	aminoàcids 250-298	(Takashima <i>et al.</i> , 1998)
Nicastrina	No determinat	(Yu <i>et al.</i> , 2000c)
CLIP170/restin	loop hidrofílic	(Johnsingh <i>et al.</i> , 2000)
RabGDI	loop N-terminal	(Scheper <i>et al.</i> , 2000)
Subunitats HC5 i ZETA del proteasoma 20S	loop hidrofílic	(Van Gassen <i>et al.</i> , 1999)
Cadherines	loop hidrofílic (340-375)	(Baki <i>et al.</i> , 2001)
Calsenilin	CTF darrers 103 aminoàcids	(Buxbaum <i>et al.</i> , 1998)
IRE1	no determinat	(Katayama <i>et al.</i> , 1999)
Sorcina	holoproteïna	(Pack-Chung <i>et al.</i> , 2000)
Receptors de ryanodina	PS2 CTF	(Pack-Chung <i>et al.</i> , 2000)
	PS1 (no determinat)	(Chan <i>et al.</i> , 2000)

De tots aquests treballs, cal destacar, per la seva transcendència, les interaccions de presenilina amb la β APP, Notch i la nicastrina com a components del complex d'alt pes molecular amb activitat γ -secretasa, a les quals ja s'ha dedicat un apartat. També són d'especial rellevància les interaccions amb la GSK-3 β , la β -catenina i la Tau, que són comentades en l'apartat següent.

3.2. La presenilina i la GSK-3 β , la Tau i la β -catenina. L'adhesió cèl·lula-cèl·lula

La interacció entre presenilina i la GSK-3 β i també amb la Tau, és d'especial transcendència, ja que situa la presenilina en una de les rutes implicades en la patogenicitat de la malaltia d'Alzheimer. El treball de Takashima *et al.*, (1998) atribueix a la presenilina una funció reguladora de la GSK-3 β , la qual fosforila la Tau, la β -catenina i l'APP, connectant la quinasa amb els seus substrats. En aquest model, les mutacions causants d'Alzheimer de PS1 incrementen la unió a GSK-3 β i, com a conseqüència d'això, la fosforilació de la Tau. En un altre treball, però, s'observa un efecte oposat de les mutacions causants d'Alzheimer (Kang *et al.*, 1999). Les conseqüències d'aquestes fosforilacions són diverses: ja s'ha comentat prèviament el paper de la Tau hiperfosforilada en la patogenicitat de la malaltia d'Alzheimer i, pel que fa a la β -catenina, l'activitat quinasa de la GSK-3 β en regula els nivells, ja que la β -catenina fosforilada és ubiquïtinitzada i degradada via proteosoma. Kirschenbaum *et al.*, (2001) caracteritzen tres llocs de fosforilació per la GSK-3 β al *loop* hidrofílic de la presenilina, que, per tant, pot ser també substrat de la GSK-3 β .

En referència amb el tipus de modulació que exerceix la presenilina en el metabolisme de la β -catenina en concret, es disposa de moltes més dades, a part de les que ja s'han presentat, disperses i difícils de situar en el conext d'una sola via, ja que la β -catenina, la GSK-3 β , la via del receptor Wingless (Wnt) i la via de Notch es troben íntimament relacionades. A més a més, les β -catenines són proteïnes multifuncionals que poden transduir senyals de la via de Wnt, així com formar complexos amb altres proteïnes com ara l'APC (figura 13).

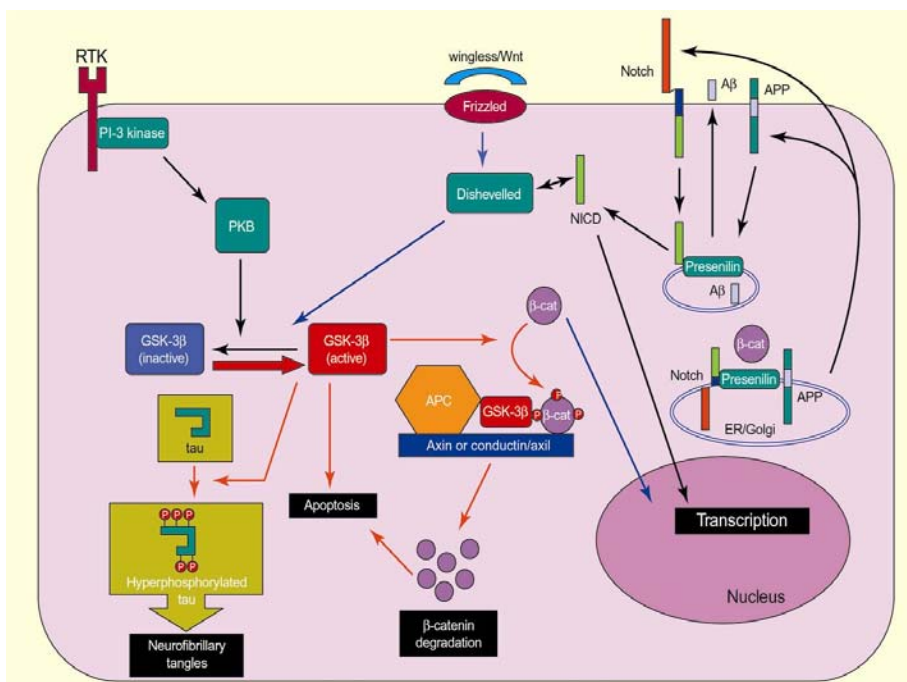


Figura 13. Esquema general de les vies on la β -catenina està implicada (extret d'Anderton *et al.*, 2000)

Així doncs, és difícil establir una relació directa i unívoca entre la presenilina i la β -catenina. Segons les dades de diversos autors, la presenilina regularia positivament l'estabilitat i el tràfic intracel·lular de la β -catenina ja que la manca de presenilina o l'expressió d'al·lels FAD de *PS1* disminueix els nivells de β -catenina, que es degrada (Nishimura *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1998b). Aquesta disminució de la senyalització per la via de la β -catenina produeix una sensibilització de les cèl·lules a estímuls proapoptòtics (Kang *et al.*, 1999; Wehl *et al.*, 1999). Un altre grup demostra el contrari: una regulació negativa de la presenilina sobre la β -catenina, ja que observen una acceleració en el recanvi de la β -catenina per la PS1 silvestre i per les mutacions FAD (Murayama *et al.*, 1998).

L'acumulació de la β -catenina en fibroblasts deficientes en presenilina, i en el teixit cutani de ratolins transgènics (*hPS1;ps1^{-/-}*) és la prova definitiva que la presenilina regula negativament la β -catenina, i posa fi a la controvèrsia. Aquests ratolins *hPS1;ps1^{-/-}* no tenen presenilina a la pell ja que l'expressió del transgen humà (*hPS1*) va dirigida pel promotor Thy, específic de sistema nerviós. L'estabilització de la β -catenina en aquests teixits produeix l'aparició de tumors cutanis, ja que manté l'activació transcripcional sobre la ciclina D1 que regula l'entrada a les fases G1 i S. A més a més, aquest grup demostra que la transfecció de presenilina sense la regió d'unió a la β -catenina rescata l'activitat γ -secretasa, però és incapaç de regular els nivells de la β -catenina. Els ratolins que expressen mutacions d'Alzheimer també són incapaços de regular el recanvi de la β -catenina. Així doncs, la interacció entre la presenilina i la β -catenina regula negativament els nivells de la segona (Soriano *et al.*, 2001; Xia *et al.*, 2001).

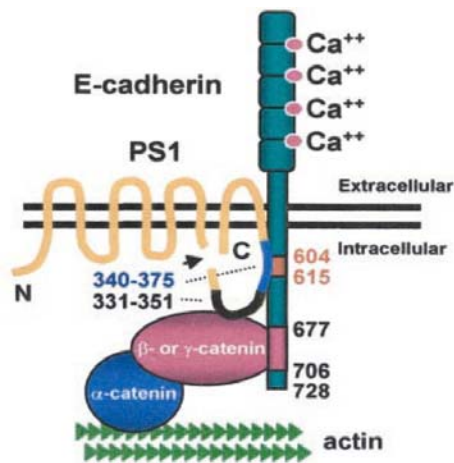


Figura 14. Complexos de cadherina, catenina i presenilina a la membrana plasmàtica (extret de Baki *et al.*, 2001).

A banda de la β -catenina citoplasmàtica, també es troba β -catenina associada a la membrana. La presenilina, l'E- o la N-cadherina —epitelial i neural, respectivament—, i les catenines α , β i γ , colocalitzen a les unions intercel·lulars (*adherens junctions*) situades a les parets laterals de les cèl·lules epitelials i formen els complexos macromoleculars basats en cadherines que connecten les unions intercel·lulars amb el citoesquelet (figura 14). S'ha observat, en diverses línies cel·lulars que sobreexpressen la presenilina silvestre, —però no les variants sense les seqüències d'unió a la β -catenina—, un increment dels contactes intercel·lulars (Georgakopoulos *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2001).

Aquests contactes cèl·lula-cèl·lula es regulen mitjançant la interacció que depèn del calci dels dominis extracel·lulars de les cadherines, que formen homodímers. El *loop* hidrofílic citoplasmàtic de la presenilina interacciona tant amb la β - o la γ -catenina com amb l'E-cadherina, mentre que la connexió del complex amb el citoesquelet d'actina es produeix a través de l' α -catenina, que interacciona amb les catenines i l'actina (Baki *et al.*, 2001) (figura 14). Se sap que el processament posttraduccional de les cadherines en condicions d'apoptosi o d'entrada de calci, produeix la dissociació d'aquests complexos macromoleculars i, consegüentment, es produeixen canvis en l'adhesió cel·lular.

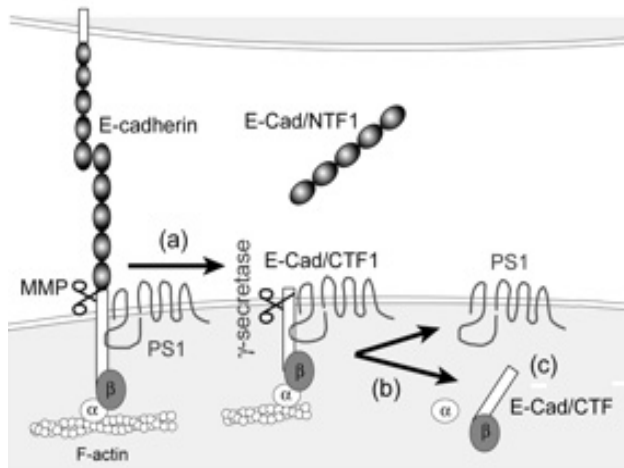


Figura 15. Talls de l'E-cadherina (extret de Marambaud *et al.*, 2002).

En aquestes condicions, l'E-cadherina experimenta un tall proteolític per una metal·loproteasa (MMP) (figura 15 a) que allibera el seu domini extracel·lular i un tall proteolític en el domini intracel·lular per la caspasa-3. El tercer tall de la E-cadherina al límit entre el citosol i el domini transmembrana depèn de la presenilina i dissocia el complex macromolecular de les *adherens junctions* (Marambaud *et al.*, 2002) (figura 15 b i c).

Els experiments en *Drosophila* demostren que la deficiència de presenilina materna produeix increments en la fracció de β-catenina citoplasmàtica que es troba associada a la ubiquitina. La sobreexpressió de presenilina d'efecte matern també produeix una localització citoplasmàtica de la β-catenina, que condueix a una disfunció en l'adhesió cel·lular que recorda els mutants *shotgun*, deficients en l'E-cadherina (Noll *et al.*, 2000). Aquests resultats indiquen que, *in vivo*, també es produeixen disfuncions en els contactes cèl·lula-cèl·lula causats per alteracions en els nivells de presenilina.

3.3. La presenilina en els processos d'apoptosi i el metabolisme del calci

La mort neuronal és un dels trets característics de la malaltia d'Alzheimer i part de les neurones que moren ho fa mitjançant mecanismes d'apoptosi. Es creu que el pèptid Aβ produeix peroxidació lipídica, estrès oxidatiu i alteracions del metabolisme del calci que acaben induint a l'entrada en apoptosi. Les presenilines també estan relacionades amb aquests processos que, en última instància, produeixen la neurodegeneració (revisat per Cotman, 1998; Mattson *et al.*, 1998).

La primera evidència de relació entre presenilines i processos apoptòtics sorgeix de l'homologia de seqüència entre ALG-3 i l'extrem C-terminal de PS2. Alg-3 va ser identificat com a pèptid supressor de l'apoptosi induïda pel TCR (receptor de cèl·lules T) en ratolí i codifica pels 103 aminoàcids de l'extrem C-terminal de PS2. L'expressió de PS2 produeix l'efecte contrari o, el que és el mateix, incrementa la sensibilitat de les cèl·lules a diferents estímuls apoptòtics. L'ALG-3 seria una PS2 truncada que actuaria com a dominant negatiu (Vito *et al.*, 1996). Estudis d'expressió de diferents mutacions causants de la malaltia d'Alzheimer de la PS2 indiquen que aquestes actuen incrementant la sensibilitat cap a diferents estímuls apoptòtics (Janicki and Monteiro, 1997; Wolozin *et al.*, 1996).

La PS1 també té una acció apoptòtica, mediatitzada, però, per una via que implica el metabolisme del calci que, quan es desregula, pot desencadenar estrès oxidatiu i apoptosi. L'expressió de mutacions FAD de PS1 —però no de PS1 silvestre— produeix una sensibilització a estímuls apoptòtics causat per alteracions en el metabolisme del calci i un increment en l'estrès

oxidatiu (Guo *et al.*, 1998; Guo *et al.*, 1997). Però el rol de la presenilina i de les mutacions FAD en el metabolisme del calci encara no està resolt. Segons alguns treballs, les mutacions FAD de la presenilina produeixen una sobrecàrrega de calci en el reticle endoplasmàtic, que, en resposta a diferents estímuls, es mobilitza en excés (revisat per Mattson *et al.*, 2001). Aquests resultats, però, són controvertits, ja que altres estudis demostren els efectes contraris (Guo *et al.*, 1996; Wolozin, 1998). Els magatzems de calci del reticle modulen de forma inversament proporcional l'entrada de calci extracel·lular: és per això que les mutacions FAD, com que incrementen el magatzem de calci, disminueixen l'entrada de calci extracel·lular, mentre que les cèl·lules deficientes en presenilina la tenen hiperactivada (Leissring *et al.*, 2000; Yoo *et al.*, 2000). La calsenilina, putatiu membre de la família de sensors de calci neuronals, que interacciona amb la regió alg-3 de PS1 i PS2 i té quatre motius d'unió al calci, podria ser la mitjancera d'aquestes funcions proapoptòtiques (Buxbaum *et al.*, 1998). De fet, la calsenilina incrementa el magatzem de calci del reticle endoplasmàtic i l'activitat dels enzims proapoptòtics (caspases i calpaïna) (Lilliehook *et al.*, 2002). A banda de la interacció amb la calsenilina, la presenilina interacciona amb altres proteïnes relacionades amb el calci, com per exemple el receptor de ryanodina (RYR) del reticle endoplasmàtic, la sorcina, associada al RYR, i la calmyrina. Al punt 4.5.1. es reprèn la relació de la presenilina amb el metabolisme del calci.

3.4. El transport intracel·lular

En cèl·lules PS1^{-/-}, la producció del pèptid A β es troba molt disminuïda alhora que s'acumulen els fragments CTF, substrats de la γ -secretasa (De Strooper *et al.*, 1998). Naruse *et al.*, (1998) determinen, treballant amb cultius primaris de neurones PS1^{-/-}, que també es produeix un increment en l'aparició dels pèptids solubles derivats de la β APP. Amb aquestes dades, consideren que la manca de PS1 accelera el transport de la β APP cap a la membrana plasmàtica alhora que impedeix que els substrats de la γ -secretasa arribin al compartiment on s'ha de produir el tall proteolític γ . També troben alterada la maduració del receptor TrkB que, tot i arribar a la membrana plasmàtica, no és funcional.

Amb la caracterització dels components del complex γ -secretasa, la visió sobre el paper de la presenilina en el transport intracel·lular de proteïnes ha canviat radicalment. L'acoblament i la presència de tots els components del complex és necessària per a la seva maduració i el seu transport a la membrana plasmàtica. La major part dels estudis sobre la formació, la maduració i la localització del complex s'han realitzat amb la nicastrina, segon component identificat del complex, i l'elevat nombre d'estudis recents sobre aquest procés, coincideixen que la presenilina i la nicastrina es necessiten mútuament per arribar a la membrana plasmàtica. Anteriorment, ja s'havia explicat l'acumulació dels fragments CTFs de la β APP observat en mutants de pèrdua de funció de presenilina, per un retard en la seva endocitosis (Capell *et al.*, 2000). Recentment, s'ha observat que l'expressió de mutants de pèrdua de funció de presenilina altera la reinternalització de la β APP des de la membrana plasmàtica que, aleshores, s'acumula en aquest compartiment (Kaether *et al.*, 2002). Altres mutants (Δ TM1-2), en canvi, acceleren el transport de la β APP a la membrana plasmàtica (Leem *et al.*, 2002b).

3.5. La UPR

L'acumulació de proteïnes mal replegades en el reticle endoplasmàtic a causa de disfuncions en la N-glicosilació, la formació dels ponts disulfur o la concentració de calci en el lumen del reticle, dispara un conjunt de fenòmens de senyalització que acaben amb la inhibició de la traducció, d'una banda, i l'estimulació a nivell transcripcional de la síntesi de xaperones, de l'altra. Aquest fenomen es coneix com a *unfolded protein response* (UPR). Algunes de les proteïnes iniciadores i transductores de l'estrès del reticle endoplasmàtic són les IRE1 (α i β), PERK i ATF6 (revisat per Imaizumi *et al.*, 2001) (figura 16).

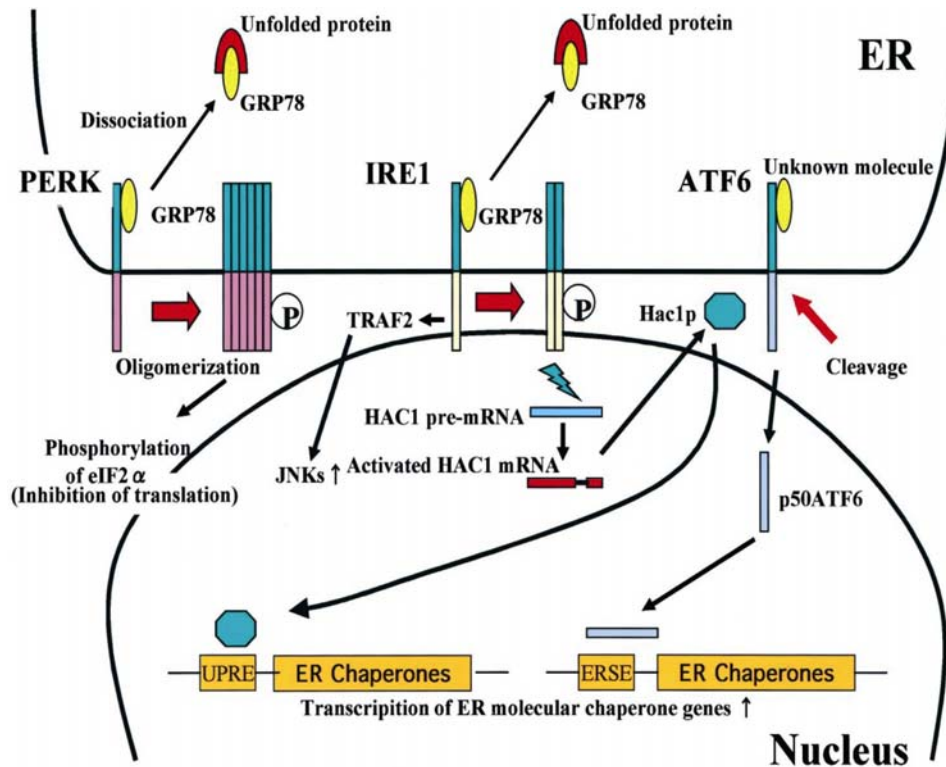


Figura 16. Mecanismes que desencadenen la UPR. En aquesta figura falta assenyalar els tall d'IRE1 (extret de Imaizumi *et al.*, 2001).

Les Ire1 són proteïnes transmembrana de tipus I residents al reticle endoplasmàtic. En condicions de mal plegament de proteïnes, l'Ire1 s'autofosforila i oligomeritza. L'Ire1 exerceix la seva funció al nucli, participant en l'*splicing* inusual del RNA missatger d'un dels factors de transcripció efectors de la UPR (figura 16). Perquè els dominis citoplasmàtics d'Ire1 arribin al nucli, cal un tall proteolític que podria estar alterat en les cèl·lules deficientes en PS1 (Niwa *et al.*, 1999). En el reticle endoplasmàtic, la presenilina (holoproteïna) interacciona amb l'IRE1. A més a més, les mutacions FAD de PS1 disminueixen l'autofosforilació d'IRE1 induïda per l'estrès del reticle (Katayama *et al.*, 1999). Sembla que la presenilina regularia el conjunt de la UPR ja que, en cèl·lules que expressen mutants FAD de PS1, però no en les cèl·lules que no tenen presenilina funcional, es produeix un retard en l'activació de PERK, d'IRE1 α i d'ATF6 (Katayama *et al.*, 2001) (figura 16). Tot i això, el paper de les presenilines a la UPR, encara no està del tot

dilucidat ja que no s'ha demostrat inequívocament que el tall d'Ire1 α , dins de la regió transmembrana o a C-terminal d'aquesta, depengui de la presenilina.

4. LA γ -SECRETASA

Els efectes dels al·lels mutants de presenilina així com de la seva delecció en la proteòlisi de la β APP i de Notch indiquen que els dos processos tenen com a mínim un element comú: la presenilina. El paper de la presenilina en l'activitat γ -secretasa, sigui modulador o la γ -secretasa *per se*, ha estat objecte de debat i controvèrsia: les dades experimentals a favor de que la presenilina conté l'activitat catalítica γ -secretasa que actua sobre els dos substrats, la β APP i Notch, són *a priori* incompatibles amb els resultats experimentals en contra de la hipòtesi "la presenilina és la γ -secretasa". En els darrers anys, les dades a favor d'aquesta primera hipòtesi són cada cop més abundants i les incògnites que queden per resoldre sobre la γ -secretasa s'estan dilucidant. En aquest apartat es posa de manifest aquesta controvèrsia i s'aprofundeix sobre l'activitat γ -secretasa en el context de les proteases que tallen dins de les membranes cel·lulars, les iCLiPs (*intramembrane cleaving proteases*) i els procés de la proteòlisi regulada de regions transmembrana o RIP (*regulated intramembrane proteolysis*).

4.1. La presenilina com a γ -secretasa

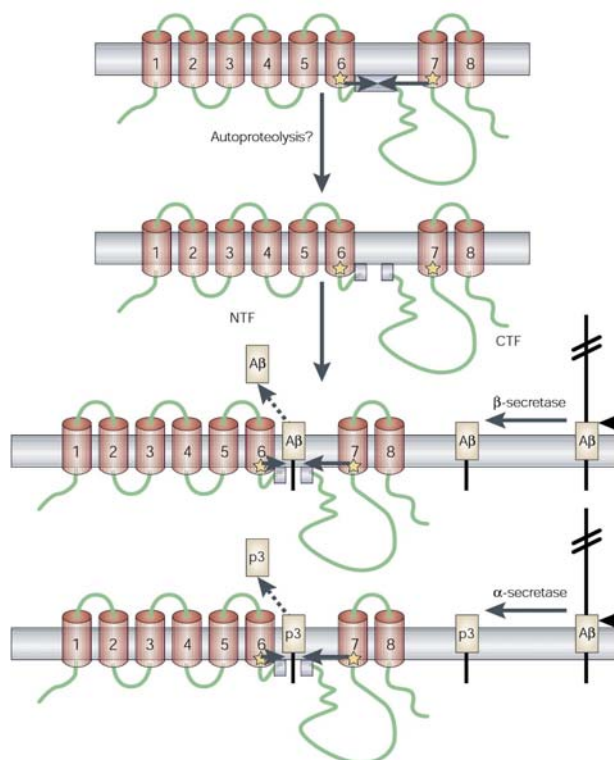


Figura 17. La presenilina com a di-aspartil proteasa autoactivable i el tall γ -secretasa (extret de Steiner and Haass, 2000).

El fet que la presenilina fós la γ -secretasa era difícil d'acceptar ja que no s'assemblava a cap proteasa coneguda i no presentava cap seqüència conservada candidata a lloc catalític. Es creia que algun altre membre del complex γ -secretasa que encara no s'havia caracteritzat contindria el centre catalític de l'enzim que, d'altra banda, havia de ser molt peculiar per poder catalitzar la hidròlisi d'un enllaç peptídic en el medi altament hidrofòbic d'una bicapa lipídica. L'any 1999 va sorgir la idea que la presenilina podria ser la mateixa γ -secretasa, arrel d'un treball on s'observava que dos residus aspàrtics molt conservats en l'evolució, l'aspàrtic 257 i el 385, situats en dominis transmembrana consecutius, el VI i el VII, eren crítics per a

l'endoproteòlisi de la PS1 i l'activitat γ -secretasa (Wolfe *et al.*, 1999) (representats en la figura 17). Paral·lelament, es va observar que la interacció funcional Notch-presenilina es produïa a nivell de l'alliberació del NICD, de la mateixa manera que la presenilina és necessària per a la producció del pèptid A β (De Strooper *et al.*, 1999; Struhl and Greenwald, 1999; Ye *et al.*, 1999). La substitució dels residus aspàrtics per alanina (D257A i D385A) aboleix tant la producció de l'A β , amb la consegüent acumulació dels fragments α -CTF i β -CTF, com la producció del NICD (Berezovska *et al.*, 2000a; Berezovska *et al.*, 2000b). Els estudis sobre la PS1 es van fer extensius a la PS2 (Kimberly *et al.*, 2000; Steiner *et al.*, 1999a) i, recentment, s'han confirmat en ratolins transgènics (Xia *et al.*, 2002). Així doncs, aquestes mutacions actuarien amb un efecte de dominància negativa, comportant-se com les pèrdues de funció de les cèl·lules PS1^{-/-}/PS2^{-/-}.

D'altra banda, s'estaven desenvolupant inhibidors de la γ -secretasa que tenien especificitat per diferents proteases del tipus serina-proteasa, cisteïna-proteasa i aspartil-proteasa, que no aporten dades sobre el mecanisme proteolític, però que inhibeixen la producció de l'A β i del NICD alhora, de manera que confirmen que el NICD és produït per la γ -secretasa. El disseny d'altres compostos basats en l'estat transitori de la catàlisi per una aspartil-proteasa van aportar la prova mecànica definitiva de que la γ -secretasa és una di-aspartil proteasa (revisat per Wolfe, 2001), ja que aquest nou tipus d'inhibidor era el primer específic de γ -secretasa i molt més potent que els anteriors (IC₅₀=17nM contra IC₅₀>10 μ M) (Shearman *et al.*, 2000). Es va presentar aleshores un model segons el qual la presenilina seria la γ -secretasa, que s'autoactivaria per endoproteòlisi mediada pels dos aspàrtics i que, aleshores, podria formar l'heterodímer NTF:CTF, que actuaria sobre la β APP i Notch.

La purificació d'un complex multiproteic de molt alt pes molecular (2x10⁶ D) amb activitat γ -secretasa va permetre la identificació de l'heterodímer NTF:CTF com a forma activa de la presenilina, tal com es proposava en el model (Li *et al.*, 2000a). Es van desenvolupar inhibidors específics de la γ -secretasa, modificats per formar unions covalents amb el substrat, els quals marcaven l'heterodímer de presenilina, i confirmaven, una vegada més, que l'activitat catalítica es troba en la interfase dels dos components de l'heterodímer (Esler *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000b). Anteriorment, estudis en *C.elegans* ja havien demostrat que la coexpressió del NTF i del CTF de PS1, expressats separatament, reconstitueix la presenilina activa, recuperant-ne la deficiència (Levitan *et al.*, 2001).

Aquest conjunt de dades biològiques i bioquímiques indicaven que els dos residus aspàrtics dels dominis transmembrana VI i VII de la presenilina formen el centre actiu d'una di-aspartil proteasa: la γ -secretasa, productora del pèptid A β i del NICD.

4.2. La γ -secretasa: característiques i substrats de la presenilina- γ -secretasa

La caracterització de l'activitat γ -secretasa va aportar noves dades sobre el mecanisme proteolític. La similitud entre el processament dels dos substrats, β APP i Notch, primer en el domini extracel·lular i, a continuació, en el domini transmembrana, feien sospitar que la reducció del domini extracel·lular és un prerrequisit per a l'acció de la γ -secretasa. Els

experimentes *in vivo* en *Drosophila* mitjançant l'expressió de proteïnes quimèriques i de *reporters* indiquen que, en efecte, l'eficiència del tall γ -secretasa depèn de la longitud del domini extracel·lular, de forma inversament proporcional. La proteòlisi que depèn de la presenilina s'activaria pel tall proteolític previ que allibera el domini extracel·lular dels seus substrats, en un procés que s'ha anomenat *ectodomain shedding*. El fet que dominis transmembrana d'altres proteïnes de tipus I siguin tallats *in vivo* en *Drosophila*, condueix a hipotetitzar que els substrats de la γ -secretasa poden ser molts, sempre que siguin proteïnes transmembrana de tipus I i tinguin un domini extracel·lular curt, de manera que el tall transmembrana que depèn de la presenilina podria ser un mecanisme general per a moltes proteïnes (Struhl and Adachi, 2000).

Una de les característiques més sorprenents del tall γ -secretasa sobre la β APP és que no requereix una especificitat de seqüència primària i no té especificitat de tall. Si s'analitzen amb detall els pèptids $A\beta$ produïts en condicions normals, s'observen els majoritaris— $A\beta$ 1-40, $A\beta$ 1-42— i d'altres minoritaris, com ara $A\beta$ 1-43, $A\beta$ 1-39, i altres pèptids $A\beta$ truncats als extrems aminoterminal o carboxiterminal (Wang *et al.*, 1996), fet que indica una especificitat de tall molt laxa. Les mutacions dins del domini transmembrana de la β APP, com per exemple les mutacions

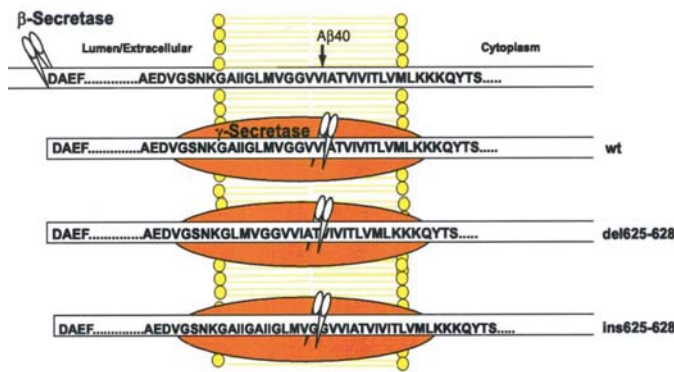


Figura 18. Les insercions o deleccions no modifiquen el lloc de tall γ -secretasa respecte de la posició dins la membrana (extret de Lichtenthaler *et al.*, 2002).

d'Alzheimer, no inhibeixen el tall sinó que en modifiquen la posició, alterant els nivells relatius d' $A\beta$ 40/42. Aquestes dades demostren la manca d'especificitat de seqüència primària del tall γ . La majoria de mutacions que s'han introduït, substitucions, insercions i deleccions per desplaçar el lloc de tall dins de la membrana plasmàtica no inhibeixen el tall γ -secretasa. En la figura 18 s'exemplifiquen els efectes d'una inserció i d'una delecció: el tall es produeix a la mateixa posició dins

de la membrana però a una posició diferent respecte de la seqüència de l' $A\beta$ (Murphy *et al.*, 1999).

Pel que fa a la posició dins de la membrana plasmàtica, el tall γ -secretasa de la β APP es produeix al mig, mentre que l'alliberació del NICD pel tall S3 es produeix en un costat del transmembrana, molt a prop del citoplasma. A més a més, mutacions en la valina 1744 del domini transmembrana de Notch redueixen enormement el tall S3, fet que indica que l'especificitat per la seqüència primària és més estricta en aquest cas (Huppert *et al.*, 2000) (figura 19). D'altra banda, els experiments realitzats amb construccions quimèriques, indiquen que la γ -secretasa és capaç de tallar dominis transmembrana molt diferents, tal com s'havia observat en *Drosophila* monitoritzant la traslocació al nucli de la cua citoplasmàtica (Struhl and Adachi, 2000). Si es col·loca el domini transmembrana de Notch en el context de la β APP, es continuen secretant pèptids del tipus $A\beta$ de diferents longituds en proporcions similars a les de β APP, sobretot pel que fa a l' $A\beta$ majoritari, el de 40 aminoàcids, encara que globalment es produeixen en menor quantitat. Qualsevol domini transmembrana, però, no és substrat de la presenilina- γ

secretasa. Sembla que el determinant principal del tall seria la conformació i la longitud del domini transmembrana, mentre que la regió extracel·lular situada a l'aminoterminal respecte de la transmembrana intervindria en la regulació del tall (Zhang *et al.*, 2002).

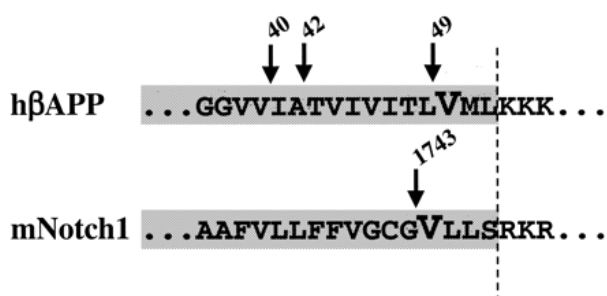


Figura 19. Els dominis transmembrana de Notch i APP i el tall ϵ (extret de Sastre *et al.*, 2001).

La seqüenciació de l'extrem aminoterminal del fragment CTF γ ha revelat l'existència d'un segon lloc proteolític dins del domini transmembrana de la β APP. Sorprenentment, el fragment CTF γ no s'inicia a l'aminoàcid 43 o 44, com seria esperable, sinó que s'inicia a l'aminoàcid 50. Aquest nou lloc de tall dependent de la γ -secretasa s'ha anomenat tal ϵ i es correspon amb el lloc S3 de Notch, que genera el NICD (figura 19).

Mutacions en la valina 50 de la β APP, corresponents a la valina 1744 de Notch, no alteren el tall ϵ . Però aquest tall és sensible, igual que el γ , a mutacions en els residus aspàrtics de la presenilina i als inhibidors de la γ -secretasa (Gu *et al.*, 2001; Sastre *et al.*, 2001; Weidemann *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2001). Recentment, s'ha identificat un tall proteolític al mig del domini transmembrana de Notch, a la mateixa posició que el tall γ de la β APP i que seria el tall S4 (Okochi *et al.*, 2002). Així doncs, tant la β APP com Notch presenten tall γ i ϵ dependents de la γ -secretasa (figura 20).

Els avenços en el coneixement de les característiques de la γ -secretasa han facilitat el descobriment de nous substrats, en base a les característiques compartides amb Notch i APP. Entre aquests, a banda de l'E-cadherina, es troba la LRP (*LDL-receptor related protein*), que forma part de la família de receptors LDL. Malgrat la similitud dels seus dominis extracel·lulars, els diferents membres tenen funcions biològiques molt diverses, que inclouen, per exemple, l'endocitosi del lligand i la transmissió de senyals extracel·lulars amb un efecte en el desenvolupament cerebral, la modulació de la neurotransmissió i altres funcions. És una

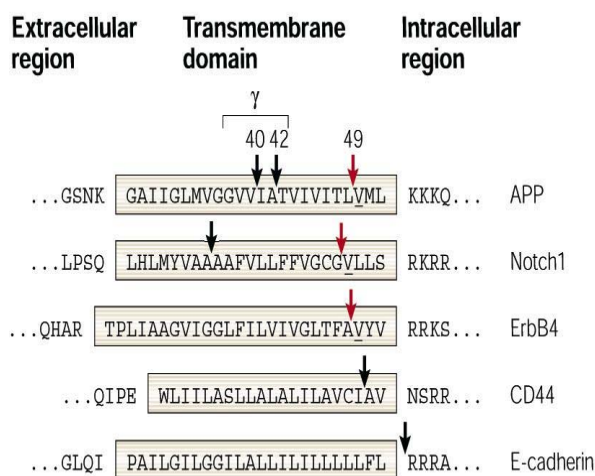


Figura 20. Regions transmembrana i punt de tall ϵ i γ d'alguns dels substrats de la γ -secretasa (modificat a partir de Fortini, 2002).

proteïna transmembrana de tipus I, que, durant la seva maduració, experimenta un tall catalític per una furina, de manera que es presenta com a receptor heterodimèric en la superfície cel·lular. A més a més, és substrat de metal·loproteases que alliberen el seu domini extracel·lular —presenta, per tant, *ectodomain shedding*— i en el seu domini transmembrana exhibeix dues valines, com en els llocs de tall S3 de Notch i ϵ d'APP. Aquestes característiques fan que sigui un bon candidat per ser substrat de la γ -secretasa; de fet, s'ha demostrat que el seu domini intracel·lular s'allibera de

forma γ -secretasa dependent (May *et al.*, 2002).

Un altre substrat és l'ErbB-4, un clàssic receptor del tipus tirosina quinasa de la família de l'EGF, implicat en processos de proliferació i diferenciació cel·lular. Experimenta *ectodomain shedding* com a resposta a l'estimulació de la PKC o del seu propi lligand, l'HRG (neuregulina), produït per TACE. A nivells molt baixos, però, es detecta un altre fragment proteolític soluble que es localitza en el nucli, com a resposta a aquests mateixos estímuls. La producció d'aquest segon fragment proteolític és abolida per inhibidors de la γ -secretasa, o per la sobreexpressió dels mutants dominant negatiu de presenilina que tenen substitucions en els residus aspàrtics. La sobreexpressió de presenilina silvestre incrementa aquest tall (Lee *et al.*, 2002; Ni *et al.*, 2001).

La molècula CD44 també sembla que és un substrat de la γ -secretasa. És la proteïna d'adhesió majoritària, present en gairebé tots els tipus cel·lulars, i té funcions d'activació i reclutament de limfòcits, cicatrització de ferides, migració cel·lular i regulació del creixement de tumors i de les metàstasis. La interacció de CD44 amb la matriu extracel·lular és modulada per la metal·loproteasa MT1-MMP, que allibera el domini extracel·lular de CD44 (*ectodomain shedding*) i, així, estimula la migració cel·lular. El tall subseqüent que allibera el domini intracel·lular requereix l'activitat γ -secretasa i depèn del *shedding* previ del domini extracel·lular. S'ha demostrat que aquest domini intracel·lular es localitza en el nucli i que té una funció activadora de la transcripció (Okamoto *et al.*, 2001).

Uns altres substrats de la γ -secretasa identificats recentment són els lligands de Notch, jagged i delta, i una glicoproteïna d'adhesió cel·lular, anomenada syndecan. Com tots els anteriors substrats de la γ -secretasa, són proteïnes transmembrana de tipus I que presenten *shedding* del seu domini extracel·lular i valines a la regió transmembrana. Els dominis intracel·lulars respectius sembla que tenen una funció activadora de la transcripció. Aquests són, doncs, els trets característics dels substrats de la γ -secretasa.

4.3. Els resultats inexplicats

Tot i que ja s'han acumulat un elevat nombre d'evidències a favor de la hipòtesi que "la presenilina és la γ -secretasa", algunes dades experimentals anirien més a favor que la presenilina és un cofactor de dues activitats γ -secretasa diferents, ja que alguns resultats són difícils d'explicar si es considera una sola activitat catalítica per la β APP i Notch.

Els inhibidors d'aspartils proteases van ajudar a caracteritzar el mecanisme catalític de la γ -secretasa, però, al mateix temps, han posat en dubte que la presenilina tingui aquesta activitat di-aspartil proteasa. Recentment, s'han dissenyat inhibidors no peptídics derivats de la isocumarina que no afecten la producció del NICD, però que sí que inhibeixen la producció d'A β (Petit *et al.*, 2001). Aquests resultats només es poden explicar si es consideren dos enzims amb dues activitats catalítiques diferents regulades per la presenilina. El mecanisme d'acció dels derivats de la isocumarina sobre la presenilina no és directe, ja que s'ha observat en diferents assajos *in vitro* que no s'uneixen directament a la presenilina, de manera que no es poden utilitzar aquests agents per determinar la naturalesa de la γ -secretasa (Esler *et al.*, 2002).

El mecanisme d'acció de les proteases àcídiques clàssiques implica que es comportin com una parella àcid/base, de manera que es requereix un aspàrtic protonat ($-\text{COOH}$) i un desprotonat ($-\text{COO}^-$). Perquè això sigui possible, cal un PH similar al PK de l'àcid aspàrtic, que és de 4, i implica la presència de dos àcids aspàrtics, és a dir, d'un grup di-aspartil perquè es produeixi la catàlisi (revisat per Checler, 2001). De fet, en l'article on es presenten els dos residus aspàrtics com a centre catalític de la γ -secretasa, la substitució per alanina de qualsevol dels dos aspàrtics redueix la secreció de l'A β a nivells similars als de les cèl·lules *knock-out* (Wolfe *et al.*, 1999). Però, en alguns treballs, es proposa una contribució diferent dels dos aspàrtics: la variant de *splicing* $\Delta 8$, que té una substitució de l'aspàrtic 257 per una alanina (vegeu l'apartat 2.1.1.), atribueix un pes molt menor a l'aspàrtic 257 en la producció de l'A β , ja que, mentre que les mutacions en l'aspàrtic 385 afecten l'endoproteòlisi de l'holoproteïna, la producció de l'A β i del NICD i l'acumulació dels productes de l' α - i la β - secretases, la mutació de l'aspàrtic 257 manté inalterada la producció d'A β (Capell *et al.*, 2000; Morihara *et al.*, 2000). Aquests resultats són incompatibles amb el mecanisme catalític mitjançat per un grup di-aspartil que s'havia proposat. Els estudis *in vivo* resolen aquesta controvèrsia, atès que la producció d'A β en ratolins transgènics *hPS1D257A*; *ps1*^{-/-} és igual que la del *knock-out* de *ps1*, indicant que l'aspàrtic 257 és necessari perquè es produeixi el pèptid A β (Xia *et al.*, 2002). Els resultats obtinguts en cultius cel·lulars, però, encara no tenen una explicació pel que fa a la producció de l'A β , però sí que expliquen l'acumulació dels fragments β -i α -CTF en els mutants dels aspàrtics per un retard en la seva degradació i endocitosi (Capell *et al.*, 2000).

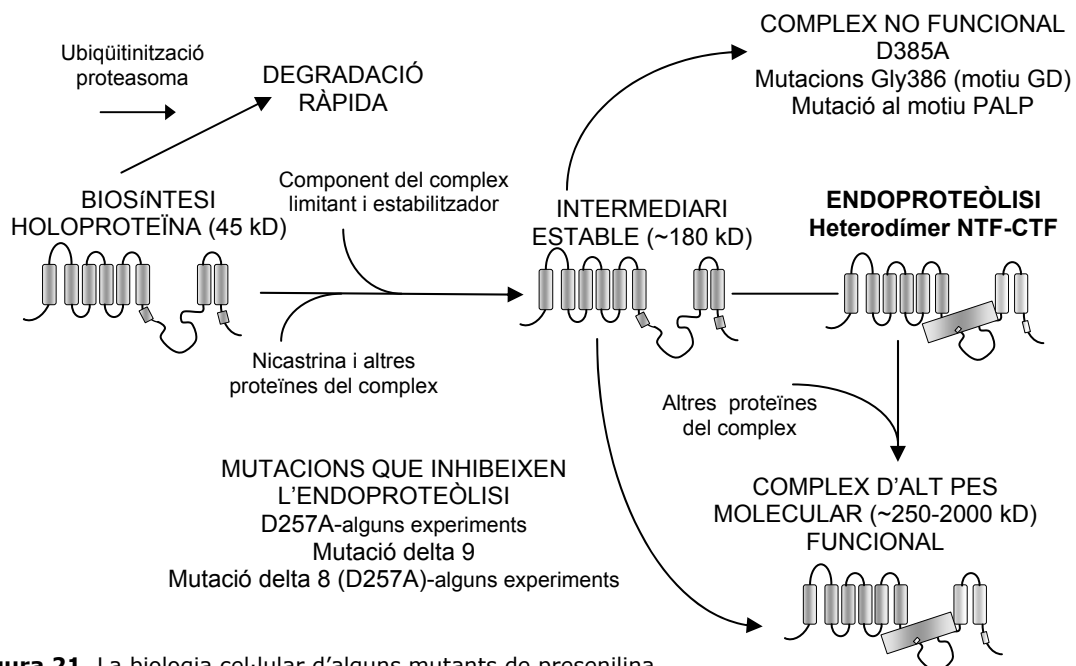


Figura 21. La biologia cel·lular d'alguns mutants de presenilina

En altres treballs, es proposa una funció dels residus aspàrtics en la formació del complex d'alt pes molecular. La incorporació de les holoproteïnes amb les mutacions en els aspàrtics en el complex d'alt pes molecular és defectuosa, ja que només s'incorporen en un complex de pes molecular intermediari, alhora que actuen com a dominants negatius, a causa d'un efecte de desplaçament de les presenilines silvestres, tot implicant que els fragments endògens

NTF i CTF s'hi incorporin. Les presenilines D257A i D385A es comporten com l'holoproteïna silvestre. La presenilina amb la mutació $\Delta 9$, en canvi, s'incorpora al complex d'alt pes molecular —fet esperable, si es té en compte la seva capacitat amiloïdogènica—, però no desplaça la presenilina endògena del complex. Així doncs, els efectes dels aspàrtics no recauen sobre l'activitat γ -secretasa *per se*, sinó que impedirien la maduració del complex d'alt pes molecular γ -secretasa (Yu *et al.*, 2000a; Yu *et al.*, 2000b) (figura 21).

D'altra banda, alguns autors atribueixen a les mutacions en els residus aspàrtic un efecte en el transport de la β APP, ja que en cèl·lules que expressen variants de presenilina amb mutacions en els aspàrtics, s'incrementa la vida mitjana de la β APP i es produeix una acumulació dels fragments C-terminal de la β APP en la membrana plasmàtica. En aquest estudi, a diferència de tota la resta, també s'observa que la doble mutació D257A/D385A no altera la producció d'A β en cultius cel·lulars (Kim *et al.*, 2001). El conjunt d'aquestes dades atribueix als residus aspàrtics de la presenilina un rol en la formació, la maduració i el transport del complex γ -secretasa.

De fet, encara hi ha força discrepàncies sobre la producció d'A β en cèl·lules PS1^{-/-}/PS2^{-/-} ja que, en alguns treballs, es detecta A β en fibroblasts *knock-out* (Armogida *et al.*, 2001), a diferència del que ocorre en cèl·lules embrionàries (Herreman *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000). Aquests resultats actualment són motiu de controvèrsia entre aquests grups (Grimm *et al.*, 2002; Nyabi *et al.*, 2002; Petit *et al.*, 2002b).

Una altra font de discrepàncies pel que fa al rol de les presenilines en la producció del pèptid β -amiloide i del NICD, sorgeix de la localització subcel·lular de la presenilina. Aquest problema ha estat anomenat "la paradoxa espacial" (*the spatial paradox*). La manca d'encavalcament entre la distribució subcel·lular de presenilina, majoritàriament localitzada en el reticle endoplasmàtic i en l'aparell de Golgi, i els compartiments on actua la γ -secretasa és un dels grans arguments en contra de la hipòtesi que "la presenilina és la γ -secretasa". Si bé és clar que el tall de Notch es produeix en la membrana plasmàtica com a resposta a la unió d'un lligand, el compartiment on es genera A β no està ben establert. De fet, el pèptid A β es pot produir en diversos compartiments i, a més a més, cal distingir entre el pèptid A β soluble i secretat, i el pèptid A β que no s'incorpora a la via secretora i roman insoluble en un compartiment intracel·lular. El pèptid A β 42 generat en el reticle endoplasmàtic no se secreta, és insoluble i, recentment, s'ha observat en cèl·lules *knock-out* per les presenilines, que podria ser produït per una activitat γ -secretasa independent de la presenilina (Cook *et al.*, 1997; Greenfield *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 2002). En les vesícules del Golgi es produeixen A β 40 i A β 42, que s'empaqueten en vesícules secretores i també s'han trobat en un compartiment endocític. Així doncs, s'accepta que el pèptid A β produït per l'activitat γ -secretasa que depèn de la presenilina es genera en un compartiment que engloba vesícules del Golgi, vesícules d'endocitosi i, fins i tot, la membrana plasmàtica (Greenfield *et al.*, 1999; Hartmann *et al.*, 1997; Petanceska *et al.*, 2000). En qualsevol cas, la retenció del substrat de la γ -secretasa C99 en el reticle endoplasmàtic impedeix la secreció d'A β , i això demostra que el pèptid A β secretat no es produeix en aquest compartiment, on es localitza majoritàriament la presenilina (Cupers *et al.*, 2001a; Maltese *et al.*, 2001).

En bona part de treballs, les presenilines es localitzen en el reticle endoplasmàtic i una mica en el Golgi (veure apartat 2.2.2.), però sembla que hi ha una petita quantitat de presenilina en la membrana plasmàtica. S'ha trobat presenilina associada a Notch en la membrana plasmàtica, així com associada a les cadherines en els contactes cèl·lula-cèl·lula (Baki *et al.*, 2001; Georgakopoulos *et al.*, 1999; Ray *et al.*, 1999a). Altres evidències indirectes donen suport a una localització en la membrana plasmàtica, com el fet que presenilina coimmunoprecipita amb la nicastrina biotinilada, així com amb la nicastrina glicosilada, fet que indica una localització en un compartiment post-Golgi. Mitjançant tècniques molt acurades de localització utilitzant microscòpia confocal, s'ha observat de forma directa presenilina en la membrana plasmàtica. En aquest treball es reconcilien les dues funcions proposades per la presenilina, doncs s'hipotetitzava que la substitució dels aspàrtics per alanina endarrerix o inhibeix l'endocitosi de la β APP a la membrana plasmàtica. En el model cel·lular utilitzat, només troben 1/30 del total de presenilina en la superfície cel·lular i la gran majoria en el reticle endoplasmàtic, la qual cosa podria emascarar el marcatge de membrana si s'utilitzen les tècniques clàssiques d'immunofluorescència (Kaether *et al.*, 2002). L'activitat γ -secretasa de membrana plasmàtica no concorda amb el requisit d'un pH àcid d'una aspartil proteasa, però potser a partir de la membrana la presenilina i els seus substrats s'endociten cap a un compartiment endosomal, de pH àcidic (Maltese *et al.*, 2001).

Algunes de les propietats de la γ -secretasa, com ara la baixa especificitat de substrat, pel que fa a la seqüència primària i al lloc de tall, són difícils d'explicar si es considera un sol enzim i es contraposen a la hipòtesi "la presenilina és la γ -secretasa" (vegeu l'apartat 4.2.). La disparitat inicial de les seqüències primàries dels dominis transmembrana de Notch i de la β APP és difícil d'explicar amb l'existència d'un sol enzim i la multitud de pèptids A β truncats als extrems aminoterminal i/o carboxiterminal productes de la γ -secretasa, és indicatiu que pot tallar entre diferents residus. Estudis específics dedicats a l'especificitat del tall γ conclouen que la mida del domini transmembrana és el factor més determinant (Lichtenthaler *et al.*, 2002; Lichtenthaler *et al.*, 1999).

4.4. Altres proteases transmembrana: TFPPs i SPPs

L'argument de que les presenilines no són la γ -secretasa perquè no s'assemblen a cap proteasa coneguda ha quedat obsolet amb la caracterització de diverses famílies d'aspartil proteases emparentades amb les presenilines. Actualment, l'únic component del complex γ -secretasa similar a alguna proteasa coneguda és la presenilina.

La primera família de proteases descrita similar a la presenilina són les peptidases de prepilina de tipus 4 bacterianes o TFPP (*type 4 prepilin peptidases*). S'han identificat 27 homòlegs bacterians que tenen putatius residus catalítics conservats, dels quals, dos aspàrtics completament conservats dins la família són absolutament imprescindibles per a l'activitat proteasa i l'alliberament del pèptid senyal dels substrats (LaPointe and Taylor, 2000). El tall proteolític de les TFPPs, però, no es produeix en un domini transmembrana sinó que tallen entre dominis hidrofòbics i hidrofílics a la part citoplasmàtica, a prop de la membrana. Els llocs actius

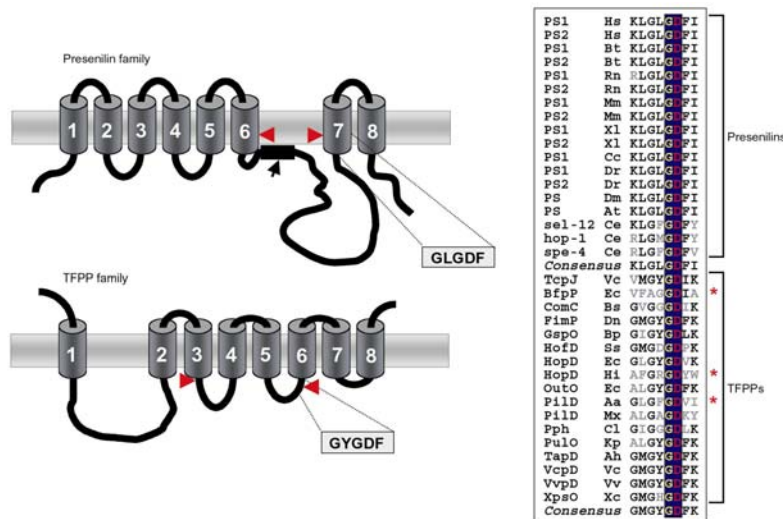


Figura 22. Conservació de motius i de topologia entre presenilines i les TFPPs (extret de Steiner *et al.*, 2000).

adjacent a l'aspàtic 385, tot demostrant que, malgrat que afecta un residu altament conservat, no s'inhibeix l'activitat γ -secretasa. Altres substitucions d'aquesta glicina són de pèrdua de funció ja que poden inhibir l'endoproteòlisi i algunes també la producció d'A β i del NICD (Steiner *et al.*, 2000) (figura 22).

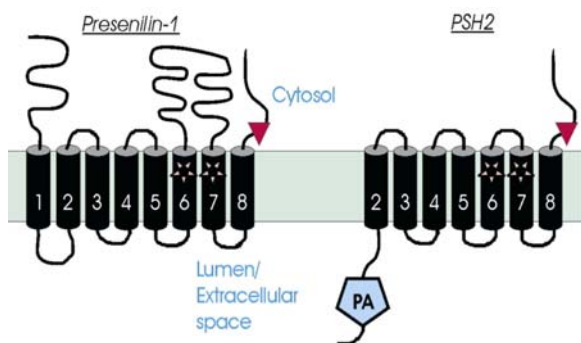


Figura 23. Topologia proposada per les PSH. PA, domini associat a proteasa; triangle, motiu PALP, també s'indica la localització dels aspàtics (extret de Ponting *et al.*, 2002).

(corresponent a l'aspàtic 385) i el motiu PALP, que és imprescindible per a l'estabilitat, l'endoproteòlisi i les funcions de la presenilina (Tomita *et al.*, 2001) (figura 23); 3) els motius dels aspàtics dels PSHs també es localitzen en putatius dominis transmembrana. Els homòlegs de presenilina tenen, aparentment, 7 dominis transmembrana i alguns d'ells presenten, en l'extrem aminoterminal, un domini associat a proteasa (PA), típic de famílies de proteases (figura 23). Mitjançant experiments de retrotranscripció, s'ha corroborat l'expressió del RNA missatger dels 5 homòlegs de presenilina del genoma humà. Pel que fa a la proteïna, hIMP1 no experimenta l'endoproteòlisi, ja que es presenta com un sol pèptid de 45 kD en el cervell (Grigorenko *et al.*, 2002; Ponting *et al.*, 2002).

de les presenilines, les regions on es localitzen els residus aspàtics, es troben conservats a les TFPPs.

Les TFPPs tenen 7 dominis transmembrana, i la localització dels aspàtics és diferent que la de les presenilines, tot i que comparteixen un motiu al voltant de l'aspàtic situat a C-terminal (figura 22). Una de les mutacions FAD de presenilina (G384A) afecta la glicina conservada a les presenilines i les TFPPs,

Més recentment s'ha identificat *in silico* una família de proteïnes molt semblant a les presenilines que s'han anomenat homòlegs de presenilina o PSH (*PS homologues*), i que un altre grup d'investigadors ha anomenat IMPAS (*intramembrane protease associated activity*) (vegeu l'apartat 2.1.). Són homòlegs molt divergents però comparteixen tres característiques amb les presenilines: 1) són proteïnes transmembrana i es poden alinear, 2) mantenen conservats els motius YD (la D correspon a l'aspàtic 257 de PS1), GhGD

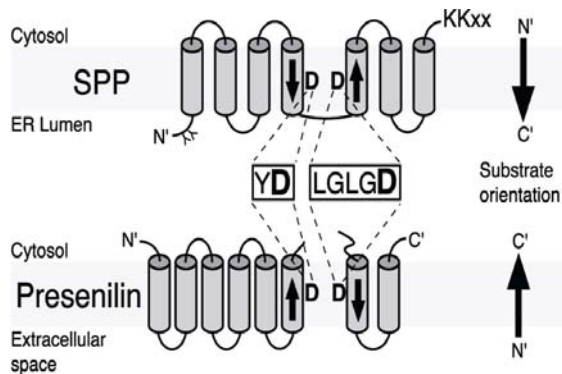


Figura 24. Topologia de les SPPs. S'indica el grup di-aspartil conservat. Extret de (Weihofen et al., 2002).

glicosilen a la regió hidrofílica aminoterminal i no experimenten l'endoproteòlisi (Weihofen et al., 2002).

La identitat de seqüència aminoacídica entre aquestes 3 famílies de proteases es limita al grup catalític di-aspartil i a alguns dels residus que l'envolten, tot i que la topologia de proteïnes amb diversos passos transmembrana es manté. Segurament, una regió de la proteïna està especialitzada en el procés catalític mentre que l'altra s'ocupa de la unió i el reconeixement del substrat (revisat per Wolfe and Selkoe, 2002).

4.5. La RIP i la senyalització al nucli

Aquestes 3 famílies de proteases presentades fins ara, les presenilines i els seus homòlegs, les SPP i les TFPPs, són aspartil proteases. D'aquestes, les dues primeres són el que s'han anomenat iCLiPs (*intramembrane cleaving proteases*), un nou terme que fa referència al

tall proteolític que té lloc dins de la membrana plasmàtica. Les iCLiPs no són només aspartil proteases, sinó que hi ha altres proteases que tallen dins de la membrana mitjançant altres residus catalítics com les S2P (*site 2 protease*), que són metal·loproteases, i la proteïna rhomboid, fins ara només analitzada en *Drosophila*, que és una serina-proteasa que talla els lligands de l'EGF (revisat per Wolfe and Selkoe, 2002) (figura 25).

POLYTOPIC MEMBRANE PROTEASES			
Mechanistic class	Name	Substrates	I-CLiP
Metallo	S2P family	SREBP, ATF6	Yes
	Ste24p, Rce1p	CAAX prenylated proteins	No
Serine	Rhomboid family	TGF- α	Yes
Aspartic	Presenilins	APP, Notch, Erb-B4, E-cadherin	Yes
	SPP family	Signal peptide remnants	Yes
	TFPP family	Leader peptides of type 4 prepilins	No
Cysteine	?	?	?

Figura 25. Les iCLiPs (extret de Wolfe and Selkoe, 2002)

Els substrats de la S2P (SREBP) i de presenilina- γ -secretasa (NICD) es localitzen en el nucli de les cèl·lules després de la proteòlisi, on actuen com a factors de transcripció. L'activació d'aquestes vies

directes de transducció de senyals és dependent d'uns estímuls que inicien un procés que s'ha anomenat proteòlisi de membrana regulada o RIP (*regulated intramembrane proteolysis*) el qual és mediat per les iCLiPs. Aquest procés activa factors de transcripció que es troben inactius a les membranes cel·lulars, ja que els allibera de la seva localització inactiva i permet que vagin al nucli a exercir les seves funcions. Un dels mecanismes que té la cèl·lula per regular la funció dels factors de transcripció al mateix temps que respon ràpidament a un estímulo, és controlar el transport nuclear d'aquests factors de transcripció mantenint-los, bé al citoplasma de la cèl·lula, units a proteïnes inhibidores, o bé a les membranes cel·lulars. Altres exemples de RIP, esmentats en altres apartats, són responsables de l'activació de la UPR: l'IRE1 i l'ATF6 són alliberats de la seva localització al reticle endoplasmàtic per estimular la transcripció de xaperones. Les proteases efectores de la RIP identificades fins ara en animals són la S2P, que actua sobre SREBP per estimular la transcripció dels enzims de la síntesi d'esterols i sobre ATF6 per estimular la síntesi de xaperones, i el complex presenilina- γ -secretasa que, fins ara, s'ha observat que actua sobre Notch per determinar moltes decisions del desenvolupament, i sobre la β APP, aquesta darrera amb un domini intracel·lular de funció parcialment desconeguda. Un mateix procés afecta processos tan diferents com el metabolisme lipídic, la diferenciació cel·lular i la resposta al mal plegament de proteïnes (revisat per Brown *et al.*, 2000; Ebinu and Yankner, 2002; Hoppe *et al.*, 2001). En la figura 26 es presenta un resum de les proteïnes que presenten RIP i dels processos en els quals estan implicades. Aquesta llista, però, encara no està tancada sinó que va creixent a mesura que es van descobrint nous substrats de la presenilina- γ -secretasa.

Membrane Protein	Orientation in Bilayer	Protein Required for Rip	Cleavage Organelle	Regulator of Cleavage	Sites of Cleavage		Nuclear Gene Targets
					Primary	Secondary	
SREBP	Helical Hairpin → Type 2	S2P	cis-Golgi	Sterols	20aa		Lipid Metabolism
APP	Type 1	Presenilin-1	Golgi/Endosomes	?	28aa		?
Notch	Type 1	Presenilin-1	Golgi/Plasma Membrane	Delta	12aa		Differentiation
Ire1	Type 1	Presenilin-1	? ER	Unfolded Proteins	?	?	ER Chaperones
ATF6	Type 2	?	? ER	Unfolded Proteins	?	?	ER Chaperones

Figura 26. Algunes proteïnes que senyalitzen per RIP (extret de Brown *et al.*, 2000).

4.5.1. La senyalització dels substrats de la presenilina- γ -secretasa

Si la RIP, procés observat tant en animals com en bacteris, és un mecanisme per alliberar els factors de transcripció de la seva localització inactiva, és esperable que els substrats de les iCLiPs, i, entre aquests, els de la presenilina- γ -secretasa, tinguin dominis intracel·lulars amb capacitat de situar-se en el nucli i iniciar un conjunt de processos transcripcionals. En el cas de Notch, la relació és ben clara, ja que, de fet, es van identificar els gens diana de Notch i els intermediaris abans que es dilucidés el seu mecanisme d'acció per

RIP. A més a més, els dominis intracel·lulars senyalitzadors són molt inestables i, per això, s'ha trigat molt a detectar el domini intracel·lular de Notch. La via de senyalització de Notch ja ha estat comentada en l'apartat corresponent. En el cas de la β APP, la patogenicitat del pèptid A β havia eclipsat la possibilitat que el fragment restant pogués tenir alguna funció. És per això que una possible funció del domini intracel·lular de la β APP que, per analogia amb Notch, és anomenat AICD (*amyloid intracellular domain*), ha estat ignorada fins ara.

Alhora que s'aïllava i se seqüenciava el fragment C-terminal de la β APP resultant del tall γ -secretasa, es va observar que aquest fragment que correspon al domini intracel·lular, forma complexos amb Fe65, una proteïna adaptora que actua com a cofactor transcripcional, i Tip60, una proteïna que forma part d'un complex nuclear multiproteic amb activitat d'histona acetiltransferasa, dominis d'unió al DNA, ATPasa i helicasa. La cotransfecció de les tres proteïnes activa els gens *reporters* en cultius cel·lulars, però inicialment no es va demostrar que el fragment carboxiterminal de la β APP o AICD es localitzés en el nucli (Cao and Sudhof, 2001). En altres treballs, sí que es demostra la localització en el nucli de la β APP, tot i que no s'estableix cap relació amb cap procés de senyalització fisiològic (Cupers *et al.*, 2001b; Kimberly *et al.*, 2001). Recentment, però, s'ha establert un paper per l'AICD en el metabolisme del calci que lligaria les dades obtingudes anteriorment en relació amb la presenilina i el magatzem de calci intracel·lular. Les alteracions en el metabolisme del calci de cèl·lules PS1^{-/-} i β APP^{-/-} són les mateixes. El fet que l'AICD sigui capaç de rescatar els defectes en el metabolisme del calci a causa de la manca de γ -secretasa és la confirmació definitiva que la β APP actua en els processos de senyalització per calci, i ho fa modulant el magatzem de calci del reticle (Leissring *et al.*, 2002).

Finalment, dues de les vies activades mitjançant RIP per presenilina- γ -secretasa convergeixen: el domini citoplasmàtic de la β APP (AICD) s'uneix a Numb i a Numb-like (Nbl), proteïnes inhibidores del NICD. D'aquesta manera, l'efecte inhibidor de l'AICD sobre el NICD és dependent de l'activitat γ -secretasa, de forma que el tall γ -secretasa pot exercir dos efectes oposats sobre la via de Notch, a través del NICD i de l'AICD (Roncarati *et al.*, 2002).

OBJECTIUS

En el moment d'iniciar aquest treball, feia només dos anys que s'havien descrit i caracteritzat els gens de les presenilines 1 i 2 com a responsables d'un elevat percentatge de casos d'Alzheimer presenil i es tenien molt poques dades sobre els aspectes funcionals de les presenilines. En el nostre grup s'havia clonat el gen de la presenilina de *Drosophila* i se n'havia fet una caracterització de l'expressió durant el desenvolupament. Es va creure interessant doncs, iniciar un treball d'anàlisi funcional de la presenilina de *Drosophila*. L'abordatge inicial es va dirigir cap a l'estudi de les interaccions proteïna-proteïna de la presenilina en un sistema heteròleg, que després va derivar cap a altres estudis en altres sistemes.

1. Cerca de proteïnes que interaccionin amb la presenilina, mitjançant el triatge d'una genoteca de cDNA d'adult de *Drosophila*
2. Cerca d'interaccions intramoleculares de la presenilina mitjançant la dissecció d'aquesta en diversos dominis i l'anàlisi de les interaccions entre aquests, mitjançant la tècnica del doble híbrid
3. Posta a punt de la metodologia de la *split-ubiquitin* per a la detecció i anàlisi d'interaccions *in situ* (reticle endoplasmàtic) entre diversos dominis de la presenilina que contenen regions transmembrana
4. Anàlisi dels efectes de diferents variants portadores de mutacions de la presenilina, tant causants d'Alzheimer com mutacions de laboratori, en les interaccions caracteritzades
5. Expressió de presenilina en un sistema homòleg, les cèl·lules SL2 de *Drosophila*, per a l'estudi d'algunes mutacions sobre el metabolisme de la presenilina i la seva localització subcel·lular
6. Anàlisi del fenotip cuticular d'embrions de *Drosophila* que sobreexpressen diferents variants de presenilina, per detectar un possible efecte matern

MATERIALS

1. Les cèl·lules

1.1. *Escherichia coli*

Soques utilitzades per amplificar el DNA plasmídic:

JM105: F' traD36 lacI^qΔ(lacZ)M15 proA⁺B⁺/thi rpsL (Str^r) endA sbcB15 sbcC?
hsdR4 (r_k⁻m_k⁺) Δ(lac-proAB)

DH5α: endA1 hsdR17(r_k⁻m_k⁺) thi-1 recA1 gyrA96 relA1 supE44 Δ(lacIZYA-
argFV169) deoR (φ80dlacΔ(lacZ)M15)

XL-1 blue MRF': D(mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1
recA1 gyrA96 relA1 lac [F'proAB lacI^qZDM15 Tn10 (Tet^r)]

Soques utilitzades per l'expressió de proteïnes:

BL21: F' ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm lon⁻

1.2. *Saccharomyces cerevisiae*

Les soques del llevat *Saccharomyces cerevisiae* utilitzades en els experiments de doble híbrid van ser obtingudes de la casa comercial Clontech Laboratories, Inc. Les seves característiques es presenten a la Taula 1.

Taula 1. Soques de llevat per doble híbrid. Extret del catàleg K1604-1

Soca	Genotip	Reporters	Marcadors de transformació
CG-1945	MATa, ura3-52, his3-200, lys2-801, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4-542, gal80-538, cyh ^r 2, LYS2::GAL1 _{UAS} -GAL1 _{TATA} -HIS3 URA3::GAL4 _{17-mers(x3)} -CyC1 _{TATA} -lacZ	HIS3, lacZ	trp1, leu2, cyh ^r 2
Y190	MATa, ura3-52, his3-200, lys2-801, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, gal80Δ, cyh ^r 2, LYS2::GAL1 _{UAS} -HIS3 _{TATA} -HIS3 URA3::GAL1 _{UAS} -GAL1 _{TATA} -lacZ	HIS3, lacZ	trp1, leu2, cyh ^r 2

Per les característiques dels promotors que dirigeixen l'expressió del gen selector *HIS3* i del gen *reporter lacZ*, l'expressió és diferent en les dues soques. Així doncs, la soca Y190 presenta una expressió basal elevada (*leaky*) del gen *HIS3* que genera soroll de fons, mentre que l'expressió basal d'aquest gen seleccionable en la soca CG-1945 és inferior. Pel que fa al gen *reporter lacZ*, la soca Y190 presenta uns bons nivells d'expressió, mentre que la soca CG-1945 presenta nivells d'expressió baixos que poden generar falsos negatius. És per això que, per determinar el creixement en absència d'histidina, es va utilitzar la soca CG-1945, i, per determinar l'activació del gen *reporter lacZ*, es va utilitzar la soca Y190.

Soques del llevat *Saccharomyces cerevisiae* utilitzades en els experiments d'*split-ubiquitin*:

L40: MATa, trp1, leu2, his3 LYS2::lexA-HIS3 URA3::lexA-lacZ

Es va utilitzar aquesta soca perquè presenta les auxotrofies adients pels gens selectors que es volen utilitzar (leu, trp i his) i perquè té el gen *reporter* i el gen selector sota control de les caixes lexA.

1.3. Cèl·lules Schneider S2 o SL2

És una de les línies Schneider's establerta a partir de discs imaginals de *Drosophila*. Tenen un cicle d'unes 24 hores mantingudes a 25°C, i creixen en forma de monocapa semi-adherent, la qual cosa permet mantenir-les a una elevada densitat cel·lular, ja que, a mida que es van dividint, augmenta el nombre de cèl·lules en suspensió. Per desenganxar-les de la superfície de creixement no cal tripsina, n'hi ha prou amb una pipeta o un raspador; i tampoc necessiten un equilibri de CO₂, per això els flascons que les contenen han d'estar ben tancats.

En relació a la presenilina, s'ha demostrat que l'expressen a nivells baixos i que tenen activitat γ -secretasa (Nowotny *et al.*, 2000; Mark Fortini, comunicació personal).

2. Les línies de *Drosophila melanogaster*

Les línies de *Drosophila melanogaster* transgèniques pels diferents al·lells de presenilina van ser amablement cedides pel Dr. Mark Fortini (Ye and Fortini, 1999). Porten integrat un element P (un tipus de transposó de *Drosophila*) amb diferents variants de presenilina sota el control de les seqüències UAS del factor de transcripció Gal4 de llevat. Aquest element P es localitza en diferents cromosomes, en homozigosi o en heterozigosi. Per tal de mantenir el cromosoma amb la inserció, cal que el cromosoma homòleg sigui un cromosoma balancejador. Aquests cromosomes tenen una sèrie de característiques que permeten mantenir la soca transgènica i seguir els genotips: 1) presenten moltes inversions, de manera que no poden recombinar amb el cromosoma portador de l'element P, 2) porten un marcador d'expressió dominant que permet distingir les mosques portadores del balancejador de la resta, 3) són letals en homozigosi.

Les soques i el seu genotip es presenten a continuació (en els mètodes, en l'apartat 7, es presenta amb detall el genotip de cadascuna de les línies):

- UAS-psn+14.1A:**
TM3 presenta el gen de la presenilina silvestre amb l'exó 7 en el cromosoma III, balancejat amb un TM3 amb un marcador *Stubble* (quetes més curtes i gruixudes)
- UAS-psn+14.1B:**
CyO presenta el gen de la presenilina silvestre amb l'exó 7 en el cromosoma II, balancejat amb un cromosoma portador del marcador *CurlyO* (CyO, ales corbades)
- UAS-psn-14.1:**
homozII presenta el gen de la presenilina silvestre sense l'exó 7 en el cromosoma II en homozigosi
- UAS-psn-14.2:**
TM3 presenta el gen de la presenilina silvestre sense l'exó 7 en el cromosoma III, balancejat amb un TM3 amb un marcador *Stubble* (quetes més curtes i gruixudes)
- UAS-psnN141I.1:**
Cyo presenta el gen de la presenilina amb la mutació N141I en el cromosoma II, balancejat amb un balancejador amb un marcador *CurlyO* (CyO, ales corbades)
- UAS-psn-L235P.2A:**
TM3 presenta el gen de la presenilina amb la mutació L235P en el cromosoma III, balancejat amb un TM3 amb un marcador *Stubble* (quetes més curtes i gruixudes)
- UAS-psn E280A:**
X presenta el gen de la presenilina amb la mutació E280A en el cromosoma X

Per dirigir l'expressió del transgen, es van creuar aquestes soques amb una línia que expressa Gal4-VP16 en la línia germinal. Aquesta soca va ser amablement cedida pel Dr Marc Furriols:

- ± ; mat α 4tub>Gal4-VP16#67 ; UAS-tsl**
+ homozII TM3 porta el transgen Gal4-VP16 sota control del promotor de la *tubulina α 4*, que s'expressa en la línia germinal, i un al·lel del gen *torso-like* (tsl), balancejat amb un TM3 que porta un marcador *stubble*. Aquest al·lel mutant de torso-like, només presenta fenotip en homozigosi i no afectarà la nostra anàlisi

3. Els anticossos

Els anticossos utilitzats en aquest treball són tots ells comercials. Els anticossos primaris són els següents:

-anti-hemaglutinina:

anti-HA monoclonal antibody, HA.11, BabCO; referència MMS-101P. Dilucions: western blot 1:1000, immunocitoquímica 1:200

anti-HA high affinity, rat monoclonal antibody clone 3F10, Roche Molecular Biochemicals, referència 1867423 (amablement cedit per Pablo Leivar). Dilució per immunocitoquímica 1:200

-anti-proteïna A:

monoclonal anti-proteinA, clone SPA-27, mouse ascites fluid, Sigma; referència P2921. Dilució 1:1000 per western blot

-anti-c-myc:

monoclonal anti-c-myc, clone 9E10, Santa Cruz biotechnology; referència sc-40. Dilució 1:400 per western blot i per immunocitoquímica 1:100

-anti-Gal4BD:

rabbit polyclonal anti GAL4 BD, Santa Cruz biotechnology; referència sc-577 (amablement cedit per la doctora Marian Martínez Balbás). Dilució 1: 2500 per western blot

-anti-BIP/GRP78:

mouse monoclonal, Transduction (BD Biosciences). Dilució per immunocitoquímica 1:125

-anti-Drosophila Golgi:

mouse anti drosophila golgi, Calbiochem. Dilució per immunocitoquímica 1:250

Els anticossos secundaris utilitzats són els següents:

- anti-mouse peroxidase:

sheep anti-mouse IgG whole molecule, PO conjugate, Sigma. Dilució 1:3000 per western blot

- anti-rabbit peroxidase:

Goat anti-rabbit peroxidase. Sigma. Dilució 1:2000 per western blot

- anti-mouse AlexaF:

Alexa Fluor 488 Goat anti-mouse IgG, Molecular probes. Dilució 1:300 per immunocitoquímica

- anti-rat Texas-Red:

anti-rat Texas Red, Jackson ImmunoResearch laboratories. Cedit gentilmente per la Dra. Marta Camps. Dilució per immunocitoquímica 1:50

4. EI DNA

4.1. Els plasmidis de clonatge

-pBluescript SK

-pBS

Es tracta de plasmidis d'elevat nombre de còpies que presenten un lloc múltiple de clonatge enmig de la seqüència de lacZ. Així doncs, es poden seleccionar els clons recombinants segons el seu color blau/blanc en presència de X-gal i d'IPTG.

4.2. El sistema del doble híbrid

4.2.1. Construccions dels dominis de la presenilina

Els diferents subdominis de la presenilina van ser subclonats en els següents plasmidis comercials (Clontech), per l'expressió en llevat de les proteïnes de fusió amb el domini d'unió al DNA i el domini d'activació del factor de transcripció GAL4 (figura 1).

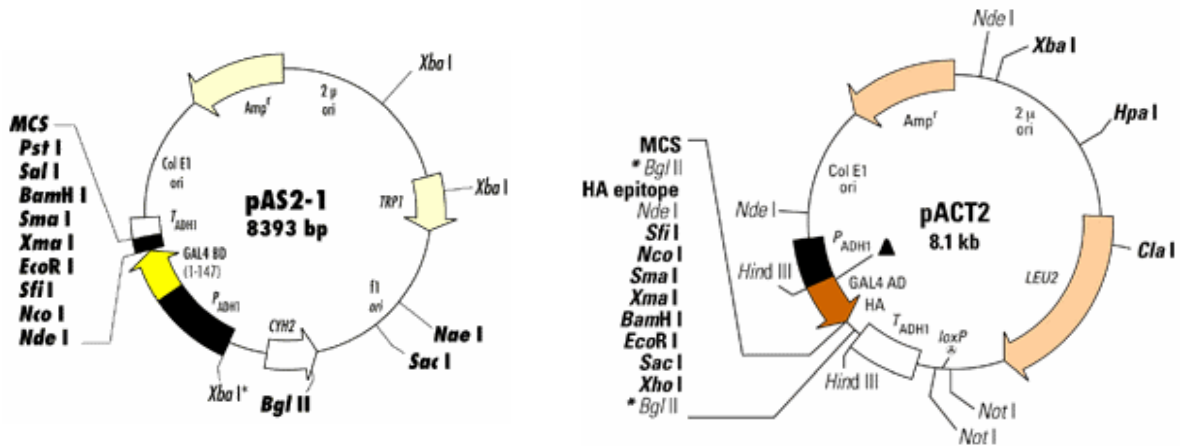


Figura 1. Plasmidis pAS2-1 i pACT2 del MATCHMAKER two-hybrid system II de Clontech (extret de la web de Clontech).

Les construccions en el pAS2-1 van ser totes elles realitzades per les dianes *EcoRI/BamHI* (figura 1). Els clonatges en el pACT-2 es van realitzar en les dianes *SmaI/BamHI* (figura 1). Els inserts es van obtenir per PCR utilitzant oligonucleòtids que contenen les dianes de restricció *EcoRI* (*forward*) i *BamHI* (*reverse*) per realitzar un clonatge dirigit. Els inserts es van digerir amb els enzims corresponents pel clonatge en el pAS2-1 i es van preparar roms a l'extrem 5' i *BamHI* al 3' pel clonatge en el pACT2. Com a DNA motllo es va utilitzar un clon de presenilina aïllat en el nostre laboratori del triatge d'una genoteca de cDNA de *Drosophila* (Marfany *et al.*, 1998), el clon ps5.2. Per tal d'amplificar el cDNA amb el splicing de l'exó 7, es va utilitzar com a motllo el clon ps1.4, també prèviament aïllat al nostre laboratori, generant així els fragments psn-14, CTF-14 i *loop6-14*.

A continuació, es resumeixen les construccions realitzades per dur a terme els experiments de doble híbrid. S'hi inclou els noms dels fragments amplificats, la longitud i els oligonucleòtids *forward* i *reverse* que es van utilitzar com a encebadors (vegeu taula 3).

Taula 2. Resum de les construccions dels subdominis de la presenilina analitzats per doble híbrid.

construccions	fragment	forward	reverse	longitud
psn-pAS psn-pACT	psn	CompF	CompR	~1.6kb
psn-14-pAS psn-14-pACT	psn-14	CompF	CompR	~1.6kb
NTF-pAS NTF-pACT	NTF	CompF	N-ter	966pb
CTF-pAS CTF-pACT	CTF	C-terF	CompR	~600pb
CTF-14-pAS CTF-14-pACT	CTF-14	C-terF	CompR	~600pb
N-loop-pAS N-loop-pACT	N-loop	CompF	N-loopR	~300pb
HL1-pAS HL1-pACT	HL1	HLIF	HLIR	~100pb
C-loop-pAS C-loop-pACT	C-loop	CterHLF	CompR	~120pb
Mas-pAS Mas-pACT	Mas	HLVIF	NterR	~115pb
exó-pAS exó-pACT	exó	exonF	exonR	~135pb
loop6-pAS loop6-pACT	loop6	CterF	loop6R	~400pb
loop6-14-pAS loop6-14-pACT	loop6-14	CterF	loop6R	~400pb

4.2.2. Construccions de l'HL1 amb mutacions FAD (i les mutacions greus)

Construccions en el plasmidi pAS2-1

HL1YH-pAS, HL1YC-pAS, HL1YP-pAS, HL1TN-pAS, HL1PL-pAS, HL1EK-pAS, HL1ED-pAS, HL1EW-pAS

Els fragments de PCR de l'HL1 amb les mutacions Y137H, Y137C, Y137P, T138N, P139L, E142K, E142D i E142W, obtinguts per mutgènesi dirigida (vegeu mètodes), contenen les dianes *EcoRI* i *BamHI* (a 5' i 3' respectivament) per la seva inserció a les dianes *EcoRI* i *BamHI* del plasmidi pAS2-1. Així doncs, tant els inserts com els plasmidis van ser digerits amb els enzims corresponents pel seu clonatge directe. Els

oligonucleòtids utilitzats per generar les diferents mutacions són els següents: HL1F, HL1R, Y137H, Y137C, Y137P, T138N, P139L, E142K, E142D i E142W (vegeu les taules 2 i 3).

Construccions en el plasmidi pACT-2

HL1YH-pACT, HL1YC-pACT, HL1YP-pACT, HL1TN-pACT, HL1PL-pACT, HL1EK-pACT, HL1ED-pACT, HL1EW-pACT

Aquestes construccions van ser generades a partir de les corresponents en el plasmidi pAS2-1. Els inserts van ser alliberats per digestió amb els enzims *NcoI/BamHI* i clonats en el plasmidi pACT-2 digerit per les mateixes dianes.

4.2.3. Genoteca de cDNA d'adult de *Drosophila* en el plasmidi pACT-2

Aquesta genoteca va ser obtinguda de Clontech: *Drosophila melanogaster*, adult MATCHMAKER cDNA library, referència IL4002AH. Venia transformada en la soca d'*E.coli* BNN32, de la qual es van fer varies maxipreparacions pel protocol de CsCl (vegeu mètodes) o amb un *kit* de preparació de DNA plasmídic (escala midi). El cDNA es va sintetitzar utilitzant com a encebador de la transcriptasa reversa un oligodT portador de la diana *XhoI*, i es va insertar a les dianes *XhoI* i *EcoRI* del pACT-2, per digestió dels cDNAs amb *XhoI*, ja que a l'altre extrem s'havia lligat, prèviament, un adaptador amb un extrem *EcoRI* ja preparat per lligar-lo directament.

4.3. L'split-ubiquitin

4.3.1. Els plasmidis de partida

pRS305: Δ Wbp1Cub-protA-LexA-Vp16

Plasmidi amablement cedit pel doctor Igor Stagljjar, dissenyat per a la seva integració en el locus del gen *WBP1p* de *Saccharomyces cerevisiae*. Codifica per una proteïna amb diverses fusions tal i com s'esquematitza a continuació (figura 2a) (Stagljjar *et al.*, 1998).

pNubG-Alg5

pNubA-Alg5

pNubI-Alg5:

De fet, aquests plasmidis d'expressió, amb un origen de replicació 2μ , són derivats de les construccions corresponents en el pRS314. Són vectors d'expressió amb el promotor CUP1, induïble per Cu^{2+} , que contenen els aminoàcids 1-37 de la ubiquitina de llevat (*Ubi4p* és el gen de la ubiquitina de llevat) fusionats a Alg5; i van ser amablement cedits pel doctor Igor Stagljjar (figura 2b). La variant NubI, representa la ubiquitina silvestre, amb capacitat de reconsituir-se si es troba amb el Cub, mentre

que les altres dues variants, NubA i NubG, no tenen la capacitat de reconstituir la ubiquitina.

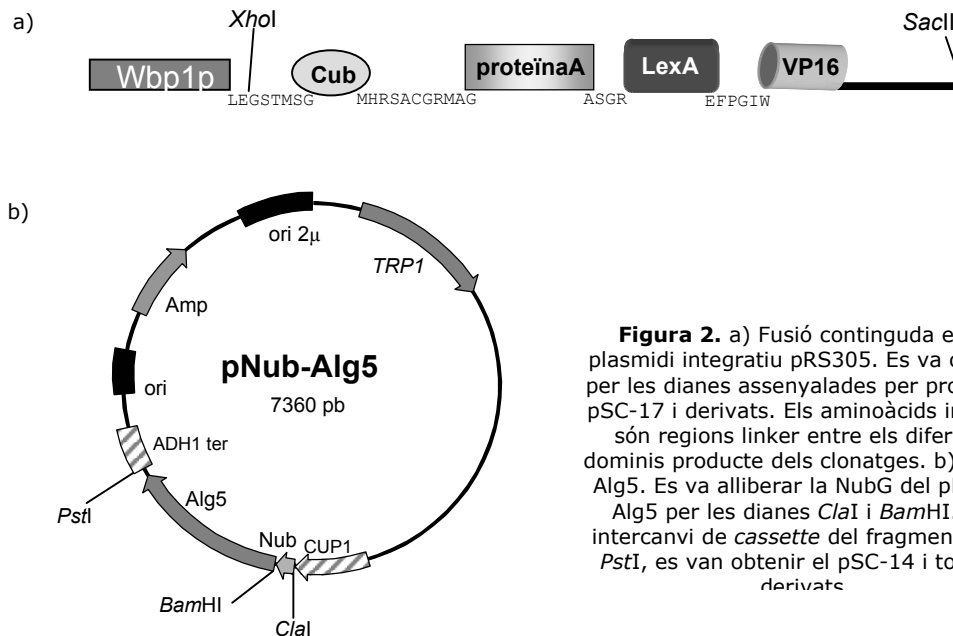


Figura 2. a) Fusió continguda en el plasmidi integratiu pRS305. Es va obtenir per les dianes assenyalades per produir el pSC-17 i derivats. Els aminoàcids indicats són regions linker entre els diferents dominis producte dels clonatges. b) pNub-Alg5. Es va alliberar la NubG del pNubG-Alg5 per les dianes *ClaI* i *BamHI*. Per intercanvi de *cassette* del fragment *ClaI-PstI*, es van obtenir el pSC-14 i tots els derivats

pRS415: plasmidi centromèric amb el gen de selecció *LEU2*. Aquest plasmidi va ser amablement cedit pel Dr Benjamí Pinya.

pVP16: vector d'expressió en llevat amb un origen de replicació 2μ , el *cassette* d'expressió de l'ADH1 i el marcador de selecció *LEU2*. Codifica per l'activador de la transcripció VP16.

pVT-U: vector d'expressió en llevat amb un origen de replicació 2μ , el *cassette* d'expressió de l'ADH1 i el marcador de selecció *URA 3*.

4.3.2. Fusió del fragment Nub –N-terminal de la ubiquitina–, i de la fusió Cub-PLV –C-terminal de la ubiquitina, proteïnaA-LexA-Vp16– amb el fragment NTF de la presenilina

pSC-3: SK-NTF

El fragment NTF de la presenilina va ser alliberat del NTF-pAS per digestió amb *EcoRI* i *BamHI*, i es va clonar en el plasmidi pBluescriptSK digerit amb els mateixos enzims.

pSC-4: pBS-Cub-PLV

El pRS305 va ser digerit amb *SacII* l'extrem 3' protuberant del qual es va fer rom en una reacció de *cut-back* (vegeu mètodes) i *XhoI*, alliberant així el fragment Cub-PLV que va ser clonat en el pBS digerit per *SphI* fet rom per *cut-back* i *Sal I*.

pSC-5: SK-NTF-Cub-PLV

Aquest plasmidi va ser generat a partir del pSC-3 per digestió amb *NotI*, l'extrem 5' protuberant del qual va ser omplert en una reacció de *filling* per fer extrems roms, i *XbaI*. L'ínter es va alliberar del pSC-4 per digestió amb *HindIII*, omplert en una reacció de *filling*, i *XbaI*.

pSC-12: SK-NubG

Es va extreure el fragment N-terminal de la ubiquïtina a partir del pRS314 pNubG-Alg5 per digestió amb *BamHI*, que es va fer rom per *filling*, i *ClaI*. Aquest fragment es va insertar a les dianes *ClaI/EcoRV* d'un pBluescript SK.

pSC-13: SK-NubG-NTF

El fragment NTF de la presenilina va ser obtingut per *EcoRI/BamHI* del NTF-pAS i clonat al pSC-12 per les mateixes dianes.

4.3.3. Vectors d'expressió de les fusions NTF-split-ubiquitin**pSC-14:** NubG-NTF

La fusió NubG-NTF es va alliberar del pSC-13 per digestió amb *BamHI*, que es va omplir per *filling*, *ClaI*, i es va clonar en el pRS314 pNubG-Alg5, digerit per *PstI*, fet rom per *cut-back* i *ClaI*, alliberant així el fragment NubG-Alg5 (figura 3).

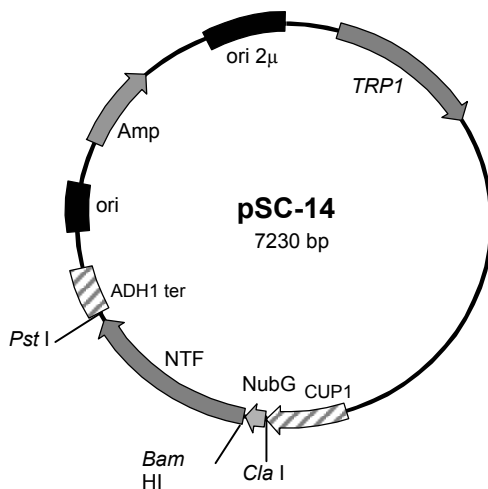


Figura 3. pSC-14, que codifica per NubG-NTF.

pSC-6: pVP16-NTF-Cub-PLV

La fusió NTF-Cub-PLV, va ser obtinguda del pSC-5 per digestió amb *NcoI*, que es va omplir per *filling*, i *HindIII*. Es va clonar en el pVP16, prèviament digerit amb *EcoRI*, omplert per *filling*, i *HindIII*.

pSC-16: pRS415ADH

Es va digerir el pRS415 per les dianes *ApaI* i *SacII*, que es van fer romes per *cut-back* i es van desfosforilar. S'hi va clonar el *cassette* d'expressió de l'ADH, amb un lloc de clonatge múltiple entre el promotor i el terminador, obtingut del pVT-U per digestió amb *SphI* i fet rom per *cut-back*.

pSC-17: pRS415 NTF-Cub-PLV

El plasmidi pSC-16 es va digerir per *XhoI*, que es va fer rom per *cut-back*, i *HindIII*, i s'hi va insertar el fragment *NcoI*, fet rom per *filling*, i *HindIII*, del pSC-5, que codifica per la fusió Cub-PLV (figura 4).

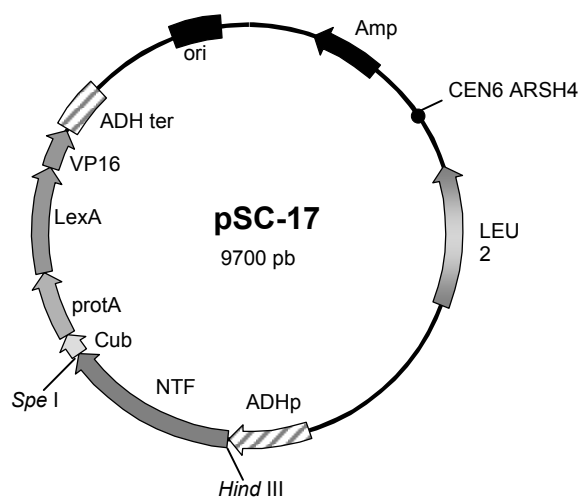


Figura 4. pSC-17 o pRS415 NTF-Cub-pLV

4.3.4. Altres vectors derivats del pSC-13**pSC-13_{EK}:** SK-Nub-NTF_{EK}

Es a obtenir un fragment de PCR amb la mutació E142K incorporada per mutagènesi dirigida (vegeu mètodes), amb els oligonucleòtids E142K, EcoVR2 i CompF. Aquest fragment va de l'ATG a la diana *EcoRV* interna de la presenilina, i es va digerir amb les dianes internes *EcoRV/SphI*, per intercanviar-lo pel mateix fragment del plasmidi pSC-13.

pSC-25: SK-NubG-CTF

El pSC-12 va ser digerit amb *EcoRI/BamHI*, on se li va insertar el fragment CTF alliberat del plasmidi CTF-pAS per digestió amb els mateixos enzims

pSC-28: SK-NubG-PSN

El pSC-12 va ser digerit amb *EcoRI/BamHI* per insertar-li la presenilina (psn) obtinguda a partir del plasmidi PSN-pAS per digestió amb els mateixos enzims

pSC-40: SK-NubG-PSN1-5

El plasmidi pSC-12 va ser digerit per *Bam*HI i desfosforilat. Se li va insertar un producte de PCR obtingut amb els oligonucleòtids BHIF i CompR sobre el pSC-31 (vegeu el punt 4.5.2.), que ja conté la substitució de l'HL1 per l'HL5, digerit per *Bam*HI.

pSC-42: SK-NubG-NTF1-5

El plàmid pSC-12 es va obrir per *Bam*HI, els extrems de la qual es van desfosforilar. S'hi va clonar un producte de PCR obtingut amb els oligonucleòtids BHIF i N-terR digerit per *Bam*HI. Es va fer servir com a motllo el pSC-31 (vegeu el punt 4.5.2.), que ja conté la substitució de l'HL1 per l'HL5.

pSC-46: SK-NubG-CTFP507L

El fragment CTFP507L es va obtenir per mutagènesi dirigida (vegeu mètodes) amb els oligonucleòtids P507L, CterF, i CompR, que incorporen la mutació i les dianes *Eco*RI a 5' i *Bam*HI a 3'. Després de digerir-lo amb els enzims corresponents, va ser clonat al pSC-28, al qual se li havia tret el fragment de PSN per *Eco*RI i *Bam*HI.

pSC-48: SK-NubG-CTFP510S

Es va sintetitzar el fragment CTFP510S mitjançant mutagènesi dirigida, utilitzant els oligonucleòtids P510S, CterF i CompR, que incorporen la mutació i les dianes *Eco*RI *Bam*HI. Després de digerir-lo amb els enzims corresponents es va clonar en el pSC-28, prèviament digerit amb *Eco*RI i *Bam*HI.

Aquestes fusions realitzades sobre un pBluescript van ser retallades i clonades en el PRS314 pNubG-Alg5, per a la seva expressió en llevat. El plasmidi d'expressió pRS314 pNubG-Alg5 es va digerir per *Pst*I, es va fer rom per *cut-back* i es va digerir amb *Cla*I. S'hi va clonar el fragment *Bam*HI, omplert amb Klenow i *Cla*I, obtingut dels plasmidis pSC-13_{EK}, pSC-25, pSC-28, pSC-40, pSC-42, pSC-46 i pSC-48, i es van obtenir, respectivament, els següents plasmidis:

pSC-15: NubG-NTF_{EK}**pSC-26:** NubG-CTF**pSC-29:** NubG-PSN**PSC-41:** NubG-PSN1-5**PSC-43:** NubG-NTF1-5**pSC-47:** NubG-CTFP507L**PSC-49:** NubG-CTFP510S

4.3.5. Altres vectors derivats del pSC-17

pSC-23: pRS415 PSN-Cub-PLV

El plasmidi pSC-17 va ser digerit amb *HindIII*, que es va fer rom per *filling*, i *SpeI*, per clonar-hi el producte de PCR obtingut amb els oligonucleòtids BHIF i XbaCompR. Aquest insert es va fer rom per *filling* i es va fosforilar a l'extrem 5', i a continuació es va digerir amb *XbaI*.

pSC-27: pRS415 CTF-Cub-PLV

Els oligos CTFHind i XbaCompR van servir per amplificar per PCR un fragment de DNA utilitzant com a motllo el clon psn 5.2. Aquest fragment es va fer rom per *filling* i es va fosforilar a l'extrem 5' mentre que a l'extrem 3' es va digerir amb *XbaI*, per clonar-lo en el pSC-17 prèviament digerit per *HindIII* que es va fer rom per *filling*, i per *SpeI*.

pSC-44: pRS415 PSN1-5-Cub-PLV

En una reacció de PCR utilitzant com a motllo el pSC-31 (vegeu punt 4.5.2.), amb els oligonucleòtids BHIF i XbaCompR, es va obtenir un insert que va ser fer rom per *filling* i es va fosforilar a l'extrem 5', i es va digerir amb *XbaI* per 3'. Es va clonar en el pSC-17 prèviament preparat per digestió amb *HindIII*, fet rom per *filling*, i *SpeI*.

pSC-45: pRS415 NTF1-5-Cub-PLV

El plasmidi pSC-17 va ser digerit amb *HindIII*, fet rom per *filling*, i per *SpeI*. S'hi va clonar un fragment obtingut per PCR sobre el pSC-31 (vegeu punt 4.5.2.) amb els oligonucleòtids BHIF i XbaNterR. Aquest fragment es va fosforilar i es va fer rom a 5' en una reacció de *filling*, i es va digerir amb *XbaI*.

pSC-50: pRS415 CTFP507L-Cub-PLV

El plàmid pSC-17 tallat per *HindIII*, l'extrem del qual es va fer rom per *filling*, i es va digerir amb *SpeI*. L'insert va ser obtingut per mutagènesi dirigida amb els oligonucleòtids P507L, CTFHindIII i XbaCompR (vegeu mètodes). Es va fosforilar i fer rom per 5' (*filling*) i es va digerir amb *XbaI*.

pSC-51: pRS415 CTFP510S-Cub-PLV

El fragment alliberat del pSC-17 tallant amb *HindIII*, que es va fer rom per *filling*, i *SpeI*, va ser intercanviat per un fragment de mutagènesi dirigida obtingut amb els oligos P510S, XbaCompR i CTFHindIII (vegeu mètodes). Aquest fragment va ser fosforilat i fet rom a 5' (*filling*), i digerit amb *XbaI* a 3'.

pSC-65: pRS415 TM1-6-Cub-PLV

El fragment *HindIII-SpeI* del pSC-17 va ser intercanviat per un fragment de PCR obtingut amb els oligonucleòtids TM1F i TM6R sobre la presenilina silvestre, digerit amb *HindIII* i *XbaI*.

pSC-66: pRS415 TM1-4-Cub-PLV

El fragment *HindIII-SpeI* del pSC-17 va ser intercanviat per un producte de PCR obtingut amb els oligonucleòtids TM1F i TM4R sobre la presenilina silvestre, prèviament digerit amb *HindIII* i *XbaI*.

pSC-67: pRS415 TM3-7-Cub-PLV

El fragment amplificat per PCR amb els oligos TM3F i MasR sobre la presenilina silvestre va ser digerit amb *HindIII* i *XbaI* pel seu clonatge en el pSC-17 digerit amb *HindIII* i *SpeI*.

pSC-68: pRS415 Δ TM3-4-Cub-PLV

El pSC-17 va ser tallat amb *HindIII* i *SpeI* per insertar-hi un fragment de PCR prèviament digerit amb *HindIII* i *XbaI*. Aquest fragment conté les regions de la presenilina corresponents a les transmembranes I-II, i V-VI i va ser generat a partir de dos productes de PCR: 1) fragment obtingut amb els oligonucleòtids TM1F i TM2/5R i 2) fragment obtingut amb els oligonucleòtids TM2/5F i MasR. Els dos productes es van anellar per la regió de solapament, es van omplir per *filling* i se'n va amplificar el producte amb els oligos TM1F i MasR (vegeu la taula d'oligonucleòtids i els mètodes per més detalls).

pSC-69: pRS415 TM7-8-Cub-PLV

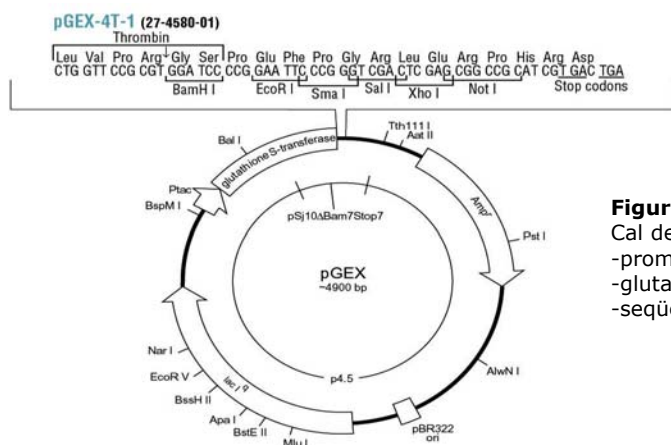
El fragment *HindIII-SpeI* del pSC-17 va ser intercaviat per un fragment *HindIII-XbaI*, obtingut per PCR sobre la presenilina silvestre amb els oligos TM7F i TM8R.

pSC-70: pRS415 CTF Δ loop6-Cub-PLV

El fragment *HindIII-SpeI* del pSC-17 va ser intercaviat per un fragment *HindIII-XbaI*, obtingut per PCR sobre la presenilina silvestre amb els oligos TM7F i CompXbaR.

4.4. Expressió en *E.coli*

L'expressió a *E.coli* es va realitzar a partir del plasmidi pGEX4T-1 (Amersham Pharmacia Biotech) (figura 5):

**Figura 5.** pGEX4T-1

Cal destacar:

- promotor induïble
- glutatíon-S-transferasa (GST)
- seqüència diana per a la proteasa trombina.

HL1-GST: El vector pGEX-4T-1 va ser digerit amb *EcoRI* i *SalI* i se li va insertar el fragment *EcoRI-SalI* obtingut de la digestió del plasmidi HL1-pAS

HA-HL1-GST: El vector pGEX-4T-1 va ser digerit amb *BamHI* i desfosforilat. Se li va insertar el fragment de PCR amplificat a partir del plasmidi HL1-PACT amb els oligonucleòtids 5HAF i pACTR que es va digerir amb *BglII*.

4.5. Expressió en cèl·lules SL2

4.5.1. Els plasmidis de partida

pActPPA: plasmidi d'expressió que conté el cassette de l'actina de *Drosophila*. Va ser cedit amablement pel Dr Alejandro Vaquero. Tots els clonats d'expressió en SL2 es van realitzar sobre aquest plasmidi (figura 6).

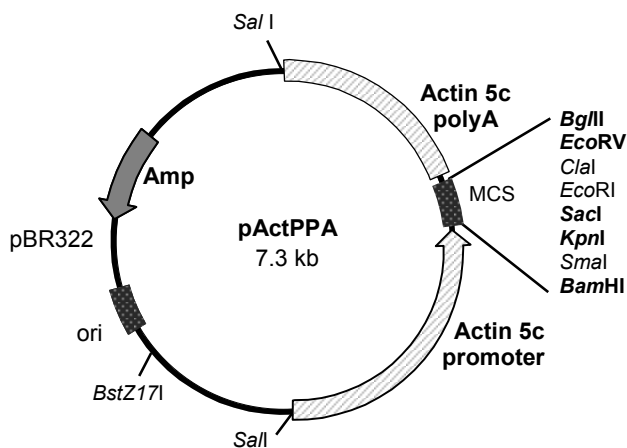


Figura 6: Esquema del vector d'expressió en *Drosophila* pActPPA. S'assenyalen les dianes del MCS (lloc de clonatge múltiple) i altres dianes utilitzades per produir els seus derivats.

PSP-1.72 BETA-GAL: vector *reporter* amb un lloc múltiple de clonatge davant de la β -galactosidasa per l'estudi de seqüències promotores.

PEGFP-N2: vector per expressar en mamífers proteïnes fusionades a l'extrem N-terminal de la EGFP (*Enhanced green fluorescent protein*) (Clontech).

4.5.2. Derivats del pActPPA amb un cassette d'expressió

pSC-37: pActPPA GFP

Al pActPPA, digerit amb *EcoRV* i *BamHI*, se li va insertar el fragment obtingut per digestió amb *NotI*, que es va fer rom per *filling*, i *BamHI* del plasmidi comercial pEGFP-N2.

pSC-24: pActPPA β -gal

El pActPPA va ser tallat amb *Bam*HI i desfosforilat per clonar-hi el fragment alliberat amb els enzims *Bam*HI i *Bgl*II del PSP-1.72 BETA-GAL, que conté la regió codificant de la β -galactosidasa.

pSC-32: pActPPA HA-NTF

El pActPPA va ser digerit amb *Bam*HI i desfosforilat. Se li va insertar el fragment alliberat amb *Bgl*II de la construcció NTF-pACT, que conté la fusió HA-NTF.

pSC-22: pActPPA PSN-HA

El pActPPA va ser digerit amb *Bam*HI i desfosforilat. L'insert es va obtenir per amplificació amb els oligonucleòtids BHIF i HABgII sobre la presenilina silvestre, i es va digerir amb *Bam*HI i *Bgl*II.

pSC-20: pActPPA PSN1-5

El pActPPA va ser digerit amb *Kpn*I i *Bam*HI per clonar-hi un producte de PCR obtingut amb els oligonucleòtids BHIF i HL5 KpnR. Aquest darrer oligonucleòtid incorpora, darrera de la regió transmembrana I, homòloga al DNA motllo, el *loop* hidrofílic 5 (HL5). El fragment resultant d'aquesta reacció de PCR va ser digerit per les dianes *Bam*HI i *Kpn*I.

pSC-21: pActPPA PSN1-5-HA

El pSC-20 va ser digerit per *Kpn*I i *Bgl*II, on es va clonar el producte de PCR generat amb els oligonucleòtids KpnF i HABgIR, prèviament digerit amb *Kpn*I/*Bgl*II.

pSC-59: pActPPA HA-PSN

Es va fer un intercanvi entre el fragment *Apa*I/*Bam*HI del pSC-32, i un producte de PCR obtingut amb els oligonucleòtids CompF/CompXpASR fent servir el pSC-34 (vegeu més avall) com a motllo, digerit amb els mateixos enzims.

En la figura 7, es mostra un exemple de les construccions amb un epítot a N-terminal, seguit de diferents variants de la presenilina.

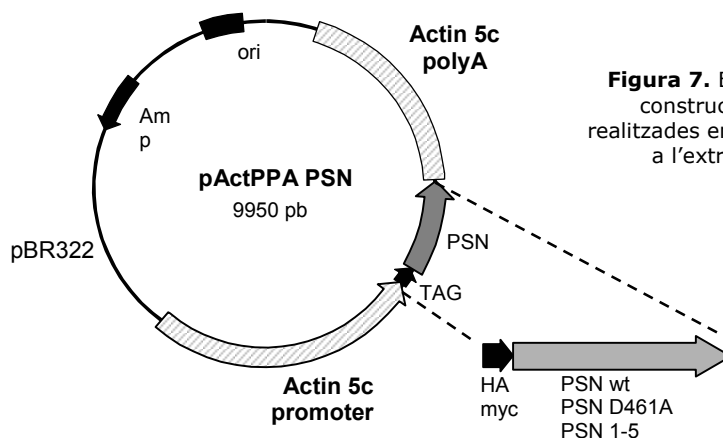


Figura 7. Esquema general de les construccions de presenilina realitzades en el pActPPA amb l'epítot a l'extrem aminoterminal.

pSC-62: pActPPA HA-PSN D461A

Es va tallar el pSC-32 per les dianes *ApaI*-*BamHI* per clonar-hi un fragment de PCR obtingut amb els oligonucleòtids CompF i *BglII*stopR sobre el plasmidi pSC-55 (vegeu més avall). L'ínter es va digerir amb els mateixos enzims.

pSC-73: pActPPA HA-PSN 1-5

El pSC-59 va ser digerit amb *ApaI* i *SpeI* (aquesta darrera és una digestió parcial, doncs el pSC-59 té dues dianes *SpeI*), i es va substituir el fragment alliberat pel mateix fragment alliberat del pSC-21.

pSC-61: pActPPA myc-PSN

Es va fer un intercanvi entre els fragments *ApaI*-*XbaI* del pSC-59 i del pSC-36, canviant així la regió corresponent a l'epítot.

4.5.3. Altres derivats del pActPPA que no apareixen als resultats**pSC-31:** pActPPA HA-PSN (sense codó stop)

Es va alliberar per digestió del PSN-pACT, un fragment *BglII* que conté la fusió HA-PSN, que es va clonar al pActPPA prèviament digerit amb *BamHI* i desfosforilat.

pSC-33: myc-PSN-pAS

El plasmidi PSN-pAS va ser digerit per *NcoI* i *EcoRI* per insertar-hi un producte amb extrems protuberants compatibles, generat per l'anellament dels oligonucleòtids mycU i mycL

pSC-34: pActPPA myc-PSN (sense codó stop)

El plasmidi pSC-33 va ser digerit per les dianes *NcoI*, que es va fer rom per *filling*, i *BamHI* per alliberar el fragment myc-PSN que es va clonar en el pActPPA digerit per *EcoRV* i *BglII*

pSC-35: myc-NTF-pAS

El plasmidi NTF-pAS va ser digerit per *NcoI* i *EcoRI* per insertar-hi un producte amb extrems protuberants compatibles, generat per l'anellament dels oligonucleòtids mycU i mycL

pSC-36: pActPPA myc-NTF

El plasmidi pSC-35 va ser digerit per les dianes *NcoI*, que es va fer rom per *filling*, i *BamHI* per alliberar el fragment myc-NTF que es va clonar en el pActPPA digerit per *EcoRV* i *BglII*

pSC-55: pActPPA myc-PSND461A (sense codó stop)

Es va generar per mutagènesi dirigida amb els oligonucleòtids D461A, 1F i CompR, un fragment amb la mutació incorporada que es va digerir per les dianes *EcoRV* i *SpeI* per clonar-lo al pSC-34 digerit amb els mateixos enzims.

4.5.4. Derivats del pActPPA amb dos cassettes d'expressió

pSC-57: pActPPA HA-NTF+ β gal

Es va obtenir per digestió amb *Sa*I del pSC-24 tot el *cassette* de l'actina amb β -gal. Aquest fragment es va fer rom per *filling* i es va insertar al pSC-32 prèviament obert per la diana *Bst*Z171 i desfosforilat (figura 8). Es van obtenir dues versions d'aquest plasmidi amb els promotors en orientació directa (pSC-57.1) i invertida (pSC-57.7).

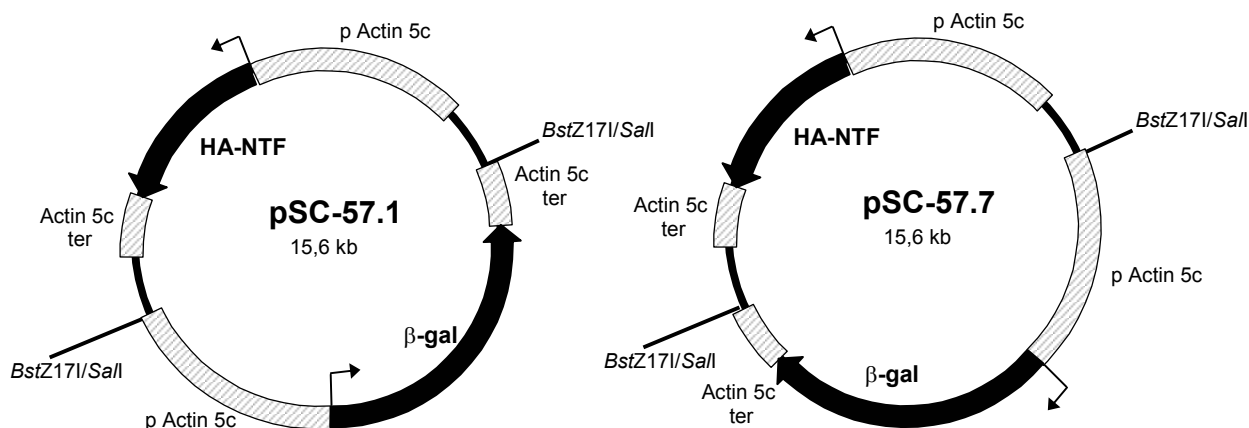


Figura 8: pSC-57.1 i pSC-57.7, utilitzats per posar a punt la co-expressió a partir d'un plasmidi amb dos promotors iguals.

Igualment, es van obtenir les dues versions dels plasmidis d'expressió de presenilina amb les dues orientacions del promotor.

pSC-74: pActPPA HA-PSN+myc-PSN

Es va obtenir per digestió amb *Sa*I del pSC-61 tot el *cassette* de l'actina amb myc-PSN. Aquest fragment es va fer rom per *filling* i es va insertar al pSC-59, prèviament obert per la diana *Bst*Z171 i desfosforilat.

pSC-75: pActPPA HA-PSN D461A+myc-PSN D461A

Es va obtenir per digestió amb *Sa*I del pSC-64 tot el *cassette* de l'actina amb myc-PSN D461A. Aquest fragment es va fer rom per *filling* i es va insertar al pSC-62, prèviament obert per la diana *Bst*Z171 i desfosforilat.

pSC-76: pActPPA HA-PSN+myc-PSND461A

Es va obtenir per digestió amb *Sa*I del pSC-64 tot el *cassette* de l'actina amb myc-PSN D461A. Aquest fragment es va fer rom per *filling* i es va insertar al pSC-59, prèviament obert per la diana *Bst*Z171 i desfosforilat.

pSC-77: pActPPA HA-PSND461A+myc-PSN

Es va obtenir per digestió amb *SaI* del pSC-61 tot el *cassette* de l'actina amb HA-PSN D461A. Aquest fragment es va fer rom per *filling* i es va insertar al pSC-62, prèviament obert per la diana *BstZ17I* i desfosforilat.

5. Els medis de creixement i els reactius de selecció**5.1. *E. Coli***

Luria broth (LB). Per 100ml: 1g triptona
0.5 g extracte de llevat
1g NaCl
Ajustar el pH a 7.2-7.3

Ampicil·lina: a una concentració final de 100µg/ml

5.2. *Saccharomyces cerevisiae*

<u>YPD</u> . Per 100ml: 2g glucosa	<u>SD</u> . Per 100ml: 2g glucosa
1g bactotripton	0.67g <i>yeast nitrogen</i>
0.5g extracte de llevat	<i>base w/o aminoacids</i>

YPAD. Per 100ml: 2g glucosa
2g bactotripton
0.5g extracte de llevat
10mg adenina

Aminoàcids: Les solucions *stock* amb les barreges dels diferents aminoàcids es van preparar a una concentració de 25x seguint les instruccions de Clontech. Les solucions d'His, Leu i Trp, es van preparar a 100x

La resta de solucions i reactius per la selecció i la transformació dels llevats, es van preparar seguint les instruccions del proveïdor, especificades en el *Yeast Protocols Handbook*

5.3. Cèl·lules SL2

El medi complet es va preparar seguint les següents proporcions:

Per 100ml: 89ml *Schneider's insect medium*, Sigma, referència S0146
10ml *Foetal Bovine Serum*, LifeTechnologies, referència 10106-169
(es va inactivar al nostre laboratori a 55°C durant 1h)
1ml penicil·lina-streptomicina, LifeTechnologies, referència 15140-148

6. Els oligonucleòtids

6.1. Construccions de doble híbrid i d'expressió en *E.coli*

Taula 3: Oligonucleòtids emprats per obtenir els inserts que es van utilitzar en els experiments de doble híbrid i d'expressió en *E.coli*.

NOM	SEQÜÈNCIA (5'- 3')	DIANA
CompF	GGAATTCATGGCTGCTGTCAATCTC	<i>EcoRI</i>
CompR	CGGGATCCTATAAACACCTGCTTGGC	<i>BamHI</i>
CterF	GGAATTCACTGTTACGCCGAGCAA	<i>EcoRI</i>
NterR	CGGGATCCAACAGTGTTTACAAGTGC	<i>BamHI</i>
NloopR	CGGGATCCCCCGTATTTTCAGGCCCTG	<i>BamHI</i>
CterHLF	GGAATTCGCAAGGCGCTACCCGCC	<i>EcoRI</i>
HL1F	GGAATTCAACTCCATCAGCTTCTAC	<i>EcoRI</i>
HL1R	CGGGATCCGGCACTCCAGAACTTAAC	<i>BamHI</i>
exonF	GGAATTCAACTCCCATCCTCGACAG	<i>EcoRI</i>
exonR	CGGGATCCAGCTGACCACTCTTGCGT	<i>BamHI</i>
HL6F	GGAATTCTCGCCAAGAGGACCCCTC	<i>EcoRI</i>
Loop6R	CGGGATCCGCCACGTTCTTCTTGCCC	<i>BamHI</i>
SHAF	GGAAGATCTGCTTACCCATACGATGTT	<i>BglII</i>

6.2. Mutagènesi dirigida

Taula 4: Oligonucleòtids emprats per introduir les mutacions puntuals

NOM	SEQÜÈNCIA (5'-3')
Y137H	CTATCTCCTC <u>C</u> ACACACCTTTC
Y137C	CTATCTCCTC <u>TGC</u> ACACCTTTC
Y137P	CTATCTCCTC <u>CCC</u> ACACCTTTC
T138N	TCTCCTCTAC <u>AAC</u> CCTTTCCAT
P139L	CCTCTACACA <u>CTT</u> TTCCATGAA
E142K	ACCTTTCCAT <u>AAA</u> CAATCGCCCCG
E142D	ACCTTTCCAT <u>GAT</u> CAATCGCCCCG
E142W	ACCTTTCCAT <u>TGG</u> CAATCGCCCCG
P507L	CAAGGCGCTA <u>CTC</u> GCCCCTGCCC
P510S	ACCCGCCCTG <u>TCC</u> ATCTCAATA
D461A	GGCTCGGC <u>GCC</u> TTTCATCTTC

6.3. Split-ubiquitin

Taula 5: Oligonucleòtids emprats per obtenir els inserts que es van clonar en els plasmidis de l'*split-ubiquitin*.

NOM	SEQÜÈNCIA (5'- 3')	DIANA	PROPIETATS
BHIF	CGGGATCCATGGCTGCTGTCAATCTCCAG	<i>Bam</i> HI	també per pActPPA
XbaCompR	GCTCTAGATATAAACACCTGCTTGGCCGA	<i>Xba</i> I	
CTFHind	CCCCCAAGCTTATGACTGTTACGCCGAGCAA	<i>Hind</i> III	introducció ATG al CTF
XbaNterR	GCTCTAGAAACAGTGTTTACAAGTGC	<i>Xba</i> I	
TM1F	GCCCAAGCTTATGGCCAGCATGTGATCAAG	<i>Hind</i> III	deleció N-loop
TM6R	GCTCTAGATGGCGAAAGGACAGCAAT	<i>Xba</i> I	deleció Mas
TM3F	GCCCAAGCTTATGATTCACGGCTGGCTGATTCTC	<i>Hind</i> III	deleció N-loop a TMII
TM4R	GCTCTAGAGGACATCATTCCGACCAC	<i>Xba</i> I	deleció TMV-VI
MasR	GCTCTAGAAGTGTTTACAAGTGCCTA	<i>Xba</i> I	
TM2/5F	TTGCTGATTGTTTTGTCCATCCATTGGCAGGGACC TC	<i>Hind</i> III	s'anella amb TMV i té porció solapament TM5
TM2/5R	TCCCTGCCAATGGATGGACAAAACAATCAGCAAAA AGGTCATC	<i>Xba</i> I	s'anella amb TMII i té porció solapament TMV
TM7F	GCCCAAGCTTATGGCCCTCGGCGACTTCAT	<i>Hind</i> III	deleció loop6
TM8R	GCTCTAGACCAAATGGCCAGAAGCAG	<i>Xba</i> I	deleció C-loop

6.4. Expressió en cèl·lules de *Drosophila*

Taula 6: Oligonucleòtids emprats per obtenir els inserts que es van clonar en el pActPPA.

NOM	SEQÜÈNCIA (5'- 3')	DIANA	PROPIETATS
HABgIR	GAAGATCTTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTA TGGGTATATAAACACCTGCTTGGCCGATAG	<i>Bg</i> /II	codifica per l'epítot HA
HL5KpnR	GGGGTACCAGTCCATTCAGGCAGGTATTTGA TGGTAGCCACCACTACCAGCATG	<i>Kpn</i> I	introdueix HL5 darrera TMI
KpnF	GGGGTACCTTGGCGAACTCCCTGATCCTG	<i>Kpn</i> I	
CompXpasR	GTCGACGGATCCTATATAAACACCTG	<i>Bam</i> HI	introdueix stop
BgIIstopR	GGTCGAGATCTATATAAACACCTG	<i>Bg</i> /II	introdueix stop

6.5. Altres

Taula 7: Altres oligonucleòtids emprats en aquest treball

NOM	SEQÜÈNCIA (5' - 3')	UTILITZACIÓ
pACTF	GATACCCCACCAAACCC	seqüenciació pACT
pACTR	GTGAACTTGCGGGGTTT	seqüenciació pACT
pASF	TCATCGGAAGAGAGTAG	seqüenciació pAS
pASR	TAAAACCTAAGAGTCAC	seqüenciació pAS
1seqF	GCACTACTGATTATGTGG	seqüenciació PSN
2seqF	CAAAGTACTCAGAGTGGA	seqüenciació PSN
EcoVR2	AAATGAGATATCCTTGCTGC	seqüenciació PSN
3seqR	GCCGAGGCCAAGCTTTAT	seqüenciació PSN
mycU	CATGGAGGAACAAAAGCTGATTTCTGAAGAAGACTTGG	epítot c-myc <i>NcoI</i>
mycL	AATTCCAAGTCTTCTTCAGAAATCAGCTTTTGTTCCTC	epítot c-myc <i>EcoRI</i>

7. Reactius

7.1. Enzims de biologia molecular

Klenow enzyme: Fragment gran de la DNApolI d'*E.coli*. Roche Molecular Biochemicals.

Shrimp alkaline phosphatase (SAP): fosfatasa alcalina de *Pandalus borealis*. USB

Expand High Fidelity PCR System: *Taq* polimerasa amb prova de lectura. Roche Molecular Biochemicals

Enzims de restricció: Es van obtenir de Takara, Promega, Roche Molecular Biochemicals, GibcoBRL, New England Biolabs.

7.2. Reactius comercials no habituals:

ECL: reactiu pel revel·lat quimiluminiscent dels westerns. Amersham Pharmacia Biotech

SuperSignal West Dura Extended duration Substrate: Reactiu pel revel·lat quimiluminiscent dels westerns. Pierce.

Digitonin: detergent no iònic per solubilitzar proteïnes unides a membrana. Calbiochem

Complete Mini. *Protease inhibitor cocktail tablets*: Barreja dinhibidors de proteases en pastilla. Roche Molecular Biochemicals.

Cellfectin: reactiu lipídic per a la transfecció de les cèl·lules SL2. Life Technologies.

Glutathione Sepharose 4B: matriu de sefarosa conjugada a glutatió. Amersham Pharmacia Biotech.

Faloidina: Substància que s'uneix a l'actina estreta de l'*Amanita phalloides*, conjugada amb el fluorocrom TRITC. Phalloidin TRITC labeled. Sigma.

7.3. Kits

Luciferase Assay system: Promega

β -gal reporter Gene Assay, chemiluminiscent: Roche Molecular Biochemicals.

Seqüenciació de DNA: *ThermosequenaseII dye terminator cycle sequencing kit*, Amersham Pharmacia Biotech, *ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit*, Perkin Elmer.

Preparació de DNA plasmídic: *QIAprep miniprep spin kit*, QIAGEN *plasmid midi kit*, QIAGEN *plasmid maxi kit*.

Purificació de bandes en gel d'agarosa: *GFX PCR DNA and Gel Band purification kit*. Amersham Pharmacia Biotech.

Purificació de productes de PCR: *QIAquick PCR purification kit*.

MÈTODES

1. Mètodes de biologia molecular

Pel que fa als clonatges, es van seguir els mètodes clàssics i les instruccions dels proveïdors dels *kits* i dels enzims.

1.1. Preparació de DNA plasmídic

1.1.1. Minipreparacions

L'extracció de DNA plasmídic pel seu anàlisi de restricció o per digestions preparatives, es va realitzar seguint el protocol de (Collet *et al.*, 1997). La preparació del DNA per seqüenciació automàtica es va preparar amb una columna comercial (*QIAprep miniprep spin kit*) seguint les instruccions del proveïdor.

1.1.2. Maxipreparacions

Es van dur a terme amb un *kit* de midi o maxipreparació o bé per lisi alcalina i purificació amb CsCl.

Protocol de maxipreparació de DNA en un gradient de CsCl

1. Creixeu 100 ml del cultiu desitjat tota la nit (20 hores mínim)
2. Centrifugueu a 8000 rpm, 10' a 4°C
3. Resuspeneu el pellet en 5 ml de TEG al qual haureu afegit 2 mg/ml de lizozima. Barregeu bé fent vortex.
4. Incubeu 5' en gel
5. Liseu les cèl·lules amb 10 ml de 0.2 M NaOH amb 1% SDS fresc. Barregeu suaument.
6. Incubeu 5' en gel
7. Neutralitzeu afegint 7.5 ml de 5 M NaAcO pH 4.8. Barregeu suaument.
8. Incubeu 30-60' en gel
9. Centrifugueu a 15000 rpm, 30' a 4°C
10. Recupereu el sobrenedant en 2 tubs Corex de 30 ml
11. Precipiteu el DNA afegint 0.6 volums d'isopropanol. Barregeu.
12. Incubeu a RT (temperatura ambient) 15' (mínim)
13. Centrifugueu a 9000 rpm, 30' a 15°C
14. Assequeu el pellet
15. Resuspeneu el pellet en 1.380 ml de STE amb vórtex primer i deixeu durant 15-20' a 65°C
16. Afegiu 1.65 g de CsCl, feu vórtex, i afegiu 120 µl de bromur d'etidi.
17. Centrifugueu a 4000 rpm 10'

18. Transferiu a tubs d'ultracentrífuga *quick-seal* de 2.2 ml.
19. Selleu-los i centrifugueu en una ultracentrífuga de sobretaula en un rotor d'angle fix a 100.000 rpm durant un mínim de 4h (pot ser tota la nit) a 20°C
20. Punxeu a través del tub de plàstic la banda corresponent al DNA plasmídic.
21. Extreieu el bromur d'etidi amb isoamilalcohol (x3-x6)
22. Precipiteu el DNA afegint 2 volums d'aigua, 2 volums d'etanol i 0.1 volums de NaAcO 3 M pH 5.2
23. Assequeu el pellet i resuspeneu-lo en el volum desitjat d'aigua destilada estèril o de TEx1

SOLUCIONS:

TEG: 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 50 mM glucosa

STE: 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH8.0, 1 mM EDTA pH 8.0

TE: 10 mM Tris-HCl (pH 7-8), 1 mM EDTA pH 8.0

Per moltes de les maxipreparacions, es va partir d'un cultiu tractat amb cloramfenicol (170 µg/ml de cultiu) que permet l'amplificació dels plasmidis de nombre moderat de còpies com el pBR322 (el pActPPA és un derivat d'aquest). El cultiu resultant no està saturat, per això es va treballar sempre amb volums de cultiu superiors a 100 ml, i es van escalar els volums dels protocols de maxipreparacions.

1.2. Modificació del DNA

1.2.1. Fosforilació de l'extrem 5'

Per cada 10 µl de reacció (volum final) afegiu al DNA:

- 1 µl d'OPA buffer x10 (*One-Phor-All*, Amersham Pharmacia)
- 0.2 µl rATP 10 mM
- 0.2 µl Polinucleòtid quinasa (T4 PNK)
- aigua destilada estèril fins al volum desitjat

Incubeu 30' a 37°C

1.2.2. Desfosforilació

Afegiu, a la solució que conté el DNA:

- 1 µl de SAP, *shrimp alkaline phosphatase* (o seguiu les instruccions del proveïdor)
- 1/10 de tampó SAPx10

Incubeu 1 hora a 37°C. Alternativament, si els tampons són compatibles, es pot realitzar la desfosforilació en el mateix tampó de restricció o, fins i tot, es poden fer les dues reaccions alhora.

1.2.3. Filling

Modificació del DNA que consisteix en omplir els extrems 5' protuberants i fer-los roms.

Afegiu, per cada 10µl finals de reacció:

- 1 µl Klenow (2 u/µl)
- 1 µl dNTPs 0.125 mM (cadascun)
- 1 µl d'OPA buffer 10x
- aigua destilada estèril fins al volum desitjat

Incubeu 30' a 37°C. En la majoria de casos, les condicions en les quals actua la *Klenow* són similars a les dels enzims de restricció, de manera que es poden fer les dues reaccions en el mateix tampó. Cal considerar especialment el pH i la concentració de magnesi.

1.2.4. Cut-back

Reacció exonucleasa per eliminar els extrems 3' protuberants d'un fragment de DNA, i obtenir-ne els extrems roms.

Afegiu, per cada 10 µl finals de reacció:

- 1 µl dNTPs 1 mM
- T4 DNA polimersa: 2 u/µg DNA
- aigua destilada estèril fins al volum desitjat

Incubeu 15' a 12°C

1.3. Mutagènesi dirigida

El mètode utilitzat per realitzar mutagènesi dirigida és conegut com a *mètode del superprimer*. Consisteix en la realització de dues reaccions de PCR consecutives. En la primera, un dels oligonucleòtids que s'utilitza per amplificar el DNA conté el canvi i s'obté un producte de mida petita (màxim 300-400pb) que conté la mutació. Aquest producte s'utilitza com a encebador en una segona PCR amb un altre oligonucleòtid per generar el fragment que es vol obtenir i clonar. Es va seguir el protocol de (Cols *et al.*, 1993) amb les següents modificacions:

- la polimerasa que es va utilitzar és *l'Expand High Fidelity PCR system*
- es va fer un tractament de *filling* del "superprimer" abans de la segona PCR per tal d'eliminar l'adenina afegida per l'activitat transferasa terminal de les polimerases.

1.4. Seqüenciació del DNA

Es va realitzar per seqüenciació automàtica. La reacció de seqüenciació es va realitzar amb diferents *kits* seguint les especificacions de reacció i purificació de cadascun dels proveïdors. El producte va ser analitzat al Servei de Seqüenciació dels Serveis Científic-Tècnics de la UB.

1.5. Obtenció del fragment Δ TM3-4

Anellament i amplificació de dos productes de PCR amb regions de solapament

1. Barregeu, en un tub eppendorf de PCR els següents reactius:
 - quantitats equimoleculares dels dos productes de PCR
 - 1/10 del volum final de tampó de la polimerasa x10
 - $MgCl_2$ fins a la concentració desitjada
 - H_2O destilada estèril fins al volum desitjat.
2. A l'aparell de PCR, incubeu a $94^\circ C$ durant 15' i $25^\circ C$ 5' (baixarà la temperatura a $25^\circ C$)
3. Afegiu:
 - 1 μl de dNTPs 10 mM
 - 0.4 μl de DNA polimerasa
 - H_2O destilada estèril fins al volum final desitjat
4. A l'aparell de PCR, incubeu a $72^\circ C$ durant 10', i refredeu a $4^\circ C$
5. Afegiu:
 - 1 μl de cadascun del oligonucleòtids (100 μM)
6. Programeu una reacció d'amplificació de PCR de 15 cicles segons la temperatura de *melting* dels oligonucleòtids i la longitud final del fragment.

2. Mètodes de proteïna

2.1. Quantificació

Es van seguir els mètodes de Bradford i Lowry, especificats pel proveïdor de les solucions (Bio-RAD). En general, es va utilitzar més el Lowry donada la interferència que presenta la solució de Bradford amb molts dels detergents utilitzats (digitonina, tritó-X-100).

2.2. Separació de proteïnes en una matriu de poliacrilamida

En la majoria dels casos, les proteïnes es van separar en un gel de tris-glicina SDS-PAGE convencional. Es alguns casos, però, es van utilitzar altres mètodes.

- Pèptids inferiors a 10kD: tris-tricina SDS-PAGE

Preparació d'un gel de tris-tricina per resoldre pèptids inferiors a 10 kD

Volums corresponents a 7.5 ml de gel separador i 3.125 ml de gel concentrador.

	<u>Separador</u>	<u>Concentrador</u>
Acrilamida/bisacrilamida 48:1.5	2.45 ml	405 μl
Tris-HCl 3 M pH 8.45	2.5 ml	775 μl
Glicerol	792.5 μl	—
10 % SDS	75 μl	30 μl
H_2O d	1.68 ml	1.915 ml
10 % APS	25 μl	30 μl
TEMED	10 μl	3.5 μl

Solucions per a l'electroforesi:

- tampó del càtode: 0.1 M Tris, 0.1 M Tricina, 0.1% SDS
- tampó de l'ànode: 0.2 M Tris HCl, pH 8.9
- tampó de càrrega de tris- tricina (*tris-tricine sample buffer*). (vegeu el punt 4).

- Lisats de presenilina de les cèl·lules SL2: l'electroforesi es va realitzar a 4°C per disminuir els agregats d'alt pes molecular, doncs sovint ni tan sols entren en el gel ni arriben al gel separador. En presència d'urea 6 M, en els gels concentrador i separador, es va observar encara més disminució dels agregats d'alt pes molecular i, per tant, una millor resolució de les presenilines. Els gels amb urea es preparen dissolent la urea en pols en les solucions corresponents del gel. Cal considerar que cada gram d'urea ocupa un volum de 0.737 ml.

2.3. Transferència western

Es va realitzar per electrotransferència semi-humida i submergida amb l'aparell proveït per Bio-Rad. El muntatge de la transferència es va fer seguint les instruccions, posant un paper Whatmann a banda i banda del gel i la membrana. Es van utilitzar membranes de PVDF (millipore).

Solució de transferència:

- 1x tampó d'electroforesi tris-glicina
- 20% metanol
- aigua destilada

3. Mètodes d' *Escherichia coli*

3.1. Transformació

3.1.1. Xoc tèrmic

Preparació de cèl·lules competents pel mètode de clorur de rubidi

1. Creixeu un minicultiu a partir d'una colònia d'*E.coli* en LB a 37°C tota la nit
2. Diluïu 1/100-1/50 en LB fresc
3. Creixeu, en un agitador a 250-350 rpm fins a una OD₆₀₀ de 0.4-0.6
A partir d'aquí, EN GEL:
4. Refredeu les cèl·lules en gel i centrifugueu-les en falcons de 50 ml a 2500 rpm 5' a 4°C
5. Descarteu el medi i resuspeneu cada pellet en 15 ml de TfBI fred fent vortex breument
6. Centrifugueu-les a 2500 rpm, 5' a 4°C
7. Descarteu la solució i resuspeneu cada pellet suaument pipetejant amb 2 ml de TfBII fred.
8. Aliquoteu-les en 50-200 µl en tubs eppendorf i congeleu-les immediatament en Nitrogen líquid. Conserveu a -70°C.

SOLUCIONS:

TfBI: 30 mM KOAc, 50 mM MnCl₂, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂, 15% glicerol. Ajusteu el pH a 5.8 amb AcOH 0.2N (Llenceu la solució si el pH és inferior).

TfBII: 10 mM Mops (pH 7.0, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 15% glicerol).

Transformació per xoc tèrmic

1. Descongeleu una alíquota de cèl·lules a temperatura ambient i claveu-la en gel
2. Barregeu amb el DNA en una proporció inferior a 50 µl o 0.1 µg de DNA per 200 µl de cèl·lules
3. Incubeu en gel 20'
4. Xoc tèrmic: 2' a 42°C
5. Incubeu en gel 1-2 minuts i afegiu 200 µl de LB (per cada 100 µl de cèl·lules), pre-escalfat a 37°C
6. Incubeu a 37°C durant 40'-60', millor si és amb agitació
7. Plaquejeu en plaques amb l'antibiòtic i el medi corresponent

3.1.2. Electroporació

Es va utilitzar aquest mètode quan no es van obtenir colònies per xoc tèrmic i en la transformació del DNA plasmídic extret de llevat (*plasmid rescue*). Es va utilitzar un Electro Cell Manipulator, model ECM600, BTX.

Els mètodes de preparació de les cèl·lules i les condicions del pols elèctric van ser les especificades pel proveïdor per cadascuna de les soques d'*E.coli* emprades (XL-1 blue i DH5α).

3.2. Producció i purificació de proteïnes fusionades a GST

Abans de realitzar l'experiment definitiu a gran escala de purificació de la proteïna fusionada a GST, cal realitzar una prova a petita escala per determinar el temps i la temperatura d'inducció, per obtenir un bon rendiment de proteïna soluble. El protocol que es presenta a continuació és a gran escala, per obtenir la proteïna de fusió HL1-GST unida a la matriu de glutatió sefarosa. Per obtenir la proteïna HA-HL1-GST, es va partir del doble de volum, doncs s'havia de fer un pas més de purificació per recuperar l'HA-HL1. S'especificuen, entre parèntesi, els volums per les proves inicials.

Producció de proteïnes de fusió amb GST i purificació per cromatografia d'afinitat

1. Creixeu 50 ml (3 ml) de cultiu tota la nit, en agitació a 37°C
2. Feu-ne una dilució 1:11 en LB fresc, 550 ml finals (3.3 ml) i incubeu 30' a 30°C en agitació.
3. Induïu els cultius amb IPTG (1 mM final) durant 1h 45' a 30°C
4. Recolliu les cèl·lules centrifugant-les a 5000 rpm 10'

5. Resuspeneu el pellet corresponent als 550 ml (3.3 ml) de cultiu en 20 ml (125 µl) de PBS suplementat amb PMSF 0.1 M, i transferiu-lo a un tub corex (eppendorf).
6. Soniqueu 5', espaiats perquè no s'escalfi la mostra, (12 polsos), fent polsos del 60% a potència 3, en gel. (Branson Sonifier 250).
7. Centrifugueu a 12500 rpm, 10' a 4°C.
8. Recupereu el sobrenedant, que és l'extracte soluble, i reserveu el pellet per carregar-lo en un gel si voleu analitzar l'expressió de la proteïna de fusió. Si ja heu fet les proves d'expressió, passeu al punt 9.
9. Passeu el sobrenedant a un tub falcon de 50 ml i afegiu 50 ml de matriu de glutatió sefarosa ressuspensa al 50% (rentada i preparada segons les instruccions del proveïdor).
10. Incubeu 30' a RT en agitació suau.
11. Centrifugueu a 500 x g 5' per sedimentar la sefarosa i reserveu una alíquota d'extracte proteic com a control.
12. Renteu la matriu amb PBS, centrifugant a 500 x g després de cada rentat per sedimentar-la: 2x15 ml de PBS i 2x1.5 ml de PBS.
13. Si no heu de procedir al següent pas de purificació per tallar amb trombina, guardeu la matriu amb la proteïna de fusió unida afegint 1 volum de glicerol per cada volum de matriu de sefarosa i congeleu a -20°C

A continuació, es va seguir el protocol protocol alternatiu 2, 16.4.9. especificat a (Ausubel and al.), per tallar la fusió GST-HA-HL1 amb trombina i obtenir el pèptid HA-HL1, amb les següents modificacions:

- les centrifugacions van ser de 500 x g 5'
- es van fer els rentats en 10 volums de solució enlloc de 20 volums
- la reacció de proteòlisi es va fer afegint a la matriu 30 µl de tampó de proteòlisi per trombina, i 30 µl de solució de trombina, i incubant tota la nit a 25°C
- es va recuperar la proteïna tallada fent rentats de 1.5 volums (referit al volum de matriu), recuperant 500 µl d'HA-HL1. Es va reservar la matriu amb GST unida com a control de proteòlisi.

En altres proves, havíem observat una contaminació de GST-HA-HL1, que es desganxa de la matriu. Per eliminar aquesta contaminació es van fer uns rentats extrems, no especificats a cap protocol:

1. afegiu 15 µl de matriu de glutatió sefarosa (50%) a l'eluit
2. incubeu 30' en agitació orbital a temperatura ambient
3. centrifugueu a 500 x g 5'
4. recupereu el sobrenedant i repetiu el procés des del punt 1

Es van recollir alíquotes en els punts 9, 11 i 13 com a control, i per determinar aproximadament la concentració de GST-HL1 en un gel, i es va reservar la matriu amb les restes de GST unida, per determinar l'eficiència del tall amb trombina (resultats, capítol II, figura 8).

4. GST-pulldown

Protocol de GST-pulldown

1. Poseu, en un tub eppendorf, 1-5 µg de la proteïna de fusió unida a la matriu de sefarosa (GST-HL1). Establiu un control negatiu que processareu de la mateixa manera i on posareu GST unida a la matriu de sefarosa
2. Afegiu 1-5 µg de la proteïna/pèptid "problema"
3. Afegiu 600 µl de *Bead binding buffer* (BBB)
4. Incubeu 2h a 4°C en agitació orbital
5. Sedimenteu la matriu centrifugant a 500 x g 5' a 4°C i descarteu el sobenedant
6. Renteu amb 1.5 ml de BBB (x3). Apureu bé a l'últim rentat
7. Afegiu 5-10 µl de BBB i 5-10 µl de 2x *tris-tricine sample buffer*
8. Escalfeu les mostres 15' a 40°C i 5' a 100°C
9. Carregueu-les en un gel 20% tris/tricina SDS-PAGE
10. Després de l'electroforesi, transferiu-les a una membrana de PVDF per la seva immunodetecció amb l'anticòs corresponent (*mouse* monoclonal anti-HA).

SOLUCIONS:

Bead Binding Buffer (BBB): 20 mM Hepes pH 7.9, 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 µM ZnCl₂, 0.5% tritó-X-100, 10% (v/v) glicerol, 1 mM PMSF, 2 mM DTT.

2x Tris-tricine sample buffer: 0.1 M Tris-HCl pH 6.8, 24% glicerol (w/v), 8% SDS (w/v), 0.2 M DTT, 0.02% blau de Coomassie G-250.

5. Mètodes de treball amb *Saccharomyces cerevisiae*

Els mètodes de doble híbrid, tant el triatge de la genoteca (capítol I), com l'anàlisi d'interaccions intramoleculares (capítol II), es van dur a terme amb el sistema MATCHMAKER de Clontech, que proporciona un llibre de protocols per treballar amb llevats anomenat *Yeast Protocols Handbook* (YPH) (PT3024-1). Pel que fa al sistema de l'*split-ubiquitin*, els protocols són els mateixos, ja que les principals diferències amb el doble híbrid rauen en els fonaments teòrics i en les proteïnes de fusió, doncs els mètodes de manipulació de llevat són pràcticament els mateixos. En el cas d'haver-hi diferències, estan especificades.

5.1. Triage de la genoteca de cDNA de *Drosophila*

El triatge de la genoteca es va realitzar per transformació seqüencial, primerament amb el protocol a gran escala, especificat al *MATCHMAKER GAL4 two-hybrid user manual* (PT3061-1) on s'expliquen les consideracions importants i els protocols necessaris pel triatge de genoteques, des de la transformació dels llevats, a la recuperació final dels clons i els controls pertinents. Es van assolir eficiències de transformació molt baixes amb aquest

protocol, i per això es va decidir fer diverses rèpliques del protocol de transformació a petita escala. Concretament, es va realitzar en dues vegades.

La primera, es va partir de 450 ml de cultiu de llevat pre-transformat amb la construcció HL6-pAS, del qual es van fer 20 transformacions a petita escala, seguint el protocol especificat al YPH, que es van plaquejar en 11 plaques quadrades de 10x10 cm de medi SD-Leu/Trp/His +5 mM 3-aminotriazole. Per cada transformació es van afegir uns 4 µg de DNA de la genoteca, procedent d'una extracció amb un *kit* de midi-preparació de DNA. Es van transformar 400.000 clons.

En la segona transformació, es van utilitzar els mateixos volums que en la primera, però en un tub estèril de 50 ml. Els llevats transformants es van plaquejar en 9 plaques de 10x10 cm, i 9 plaques rodones de 9 cm de diàmetre. Es van transformar 280.000 clons. Evidentment, va resultar més eficient el protocol a petita escala.

Els llevats es van incubar 9 dies a 30°C per a recuperar les possibles interaccions febles (normalment, 5 dies és suficient) i es van fer reestries dels clons crescuts en medi selectiu per verificar-ne el fenotip His⁺. A continuació, es va aïllar el plasmidi pACT de cadascun dels clons que, pel seu anàlisi de restricció i seqüenciació es va transformar en *E.coli* per electroporació (*plasmid rescue*).

Primerament, però, es va realitzar la contraselecció per cicloheximida (selecció negativa dels clons que porten el pAS2-1), per tal de recuperar majoritàriament plasmidis pACT-2. Aquesta selecció es pot fer gràcies a la presència, a les soques CG-1945 i Y190, de l'al·lel mutant *cyh*^{r2}, que els confereix resistència a la cicloheximida, un inhibidor de la síntesi de proteïnes. El pAS2-1, conté l'al·lel *CYH*^{S2}, dominant sobre el *cyh*^{r2}, que impedeix el creixement en presència de cicloheximida (vegeu el YPH per més detalls sobre la concentració i la preparació de la cicloheximida). Abans de realitzar el protocol especificat a la pàgina 40 del YPH, es van créixer dues generacions de minicultius de cadascun dels clons en SD-Leu, per tal de facilitar la segregació natural dels plasmidis. Aleshores es va reprendre aquest protocol. A partir dels clons resistents a cicloheximida, es va fer una preparació de DNA plasmídic seguint el següent protocol:

Plasmid rescue

1. Creixeu les cèl·lules resistents a cicloheximida en 3 ml de medi selectiu a 30°C durant 2 dies (ha d'estar saturat)
2. Recolliu-les en un tub eppendorf centrifugant al màxim 1' en una microfuga.
3. Resuspeneu-les en 200 µl de tampó de lisi (*breaking buffer*)
4. Afegiu 200 µl de boletes de vidre i 200 µl de fenol:cloroform
5. Feu vortex 2'
6. Centrifugueu 5' i recupereu 100 µl de la fase aquosa en un nou eppendorf
7. Precipiteu el DNA amb 2 volums d'etanol a RT, 10'
8. Centrifugueu 10'

9. Descarteu el sobrenedant i assequeu el pellet en 10 µl d'aigua destilada estèril, 10' a 65°C
10. Electroporeu *E.coli* amb 2 µl d'aquesta solució de DNA

SOLUCIONS:

Breaking buffer: 2% tritó-X-100, 1% SDS, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0.

Per cada clon positiu, es van analitzar 3 colònies d'*E.coli* per restricció amb *EcoRI* i *XhoI* per començar a agrupar els clons en funció de la mida del cDNA i així facilitar-ne l'anàlisi. Un mateix clon pot generar diferents tamanyos de cDNA en funció de la reacció de retrotranscripció, doncs sovint es generen cDNAs truncats a l'extrem 5', sobretot si el mRNA motllo és llarg. A més a més, cDNAs diferents poden tenir igual longitud. És per això que també es van agrupar els clons en funció del seu patró de restricció amb els enzims *RsaI* i *HaeIII*, que reconeixen dianes de 4 nucleòtids. Es va generar un producte de PCR utilitzant com a DNA motllo el DNA plasmídic d'*E.coli* obtingut de cadascun dels clons, amb els oligonucleòtids pACTF i pACTR (vegeu materials) en una reacció convencional a 50 µl de volum final. Es va digerir directament (sense purificar) 10 µl del producte de PCR.

Les anàlisis en la soca Y190 es van dur a terme seguint els protocols de transformació amb acetat de liti a petita escala. La resta de mètodes generals de doble híbrid, utilitzats també en el triatge de la genoteca, s'especifiquen a continuació.

5.2. Transformació de llevats amb acetat de liti

Es va seguir el protocol de cotransformació del YPH amb les següents modificacions:

- es van transformar uns 500 ng de cada plasmidi per assegurar un bon nombre de colònies transformants
- en el darrer pas, es va realitzar un rentat extra amb TEx1, per extreure bé les restes d'acetat de liti, molt tòxic pel llevat
- es va ressuspendre cada transformació en un volum final de 200 µl que es va repartir en plaques -Leu/Trp (com a control de co-transformació), i en plaques selectives per la interacció -Leu/Trp/His+3AT 5 mM (CG-1945) i 25 mM (Y190).

Split-ubiquitin:

- la soca L40 requereix el creixement en medi ric suplementat amb Adenina, YPAD (vegeu materials)
- per inhibir l'expressió basal del gen *HIS3*, cal una concentració de 25 mM de 3-aminotriazole
- els derivats del pNubG-Alg5 tenen el promotor CUP1 (vegeu materials), induïble amb Cu²⁺. Es va suplementar el medi, quan es requeria l'expressió de les dues proteïnes, amb 0.2 mM de CuSO₄.

5.3. Assaig X-gal en placa (*colony lift filter assay*)

Es va seguir el protocol especificat a la pàgina 23 del YPH amb les següents modificacions.

- els experiments es van realitzar en format de placa de Petri de 9 cm de diàmetre
- es van utilitzar membranes de nylon o de PVDF.

5.4. Assaig líquid amb ONPG

Es va procedir segons el protocol de la pàgina 24 del YPH amb les següents modificacions:

- es van adaptar els volums de pre-cultiu a 3ml de SD, que es va diluir en una proporció de 1:4 en YPD o YPAD segons la soca.

Split-ubiquitin:

- Tant el pre-cultiu en SD, com el cultiu en YPAD, es van suplementar amb Cu^{2+} .
- El mètode de l'*split-ubiquitin* dona activitats β -galactosidasa molt més elevades que el doble híbrid, de manera que, en les mateixes condicions, la reacció es satura en qüestió de segons. És per això que es va eliminar el punt 7 i no es van concentrar els llevats x5, processant directament 100 μl dels llevats (x1). Aquesta modificació es va tenir en compte en el càlcul de les unitats β -galactosidasa, seguint les instruccions del YPH.

5.5. Extracció de proteïna

L'extracció de proteïna de llevat es va fer seguint dos protocols diferents en funció de quina proteïna de fusió es volgués immunodetectar: les fusions amb els dominis de GAL4 del doble híbrid són solubles en el citoplasma, mentres que les fusions de l'*split-ubiquitin* es troben a les membranes cel·lulars.

Per a l'anàlisi de les proteïnes de fusió amb GAL4, es van provar els 2 protocols dels YPH per obtenir proteïna de llevat, dels quals el mètode de Urea/SDS és el que va donar els millors resultats. Es va seguir doncs, el protocol de la pàgina 13 del YPH amb les següents modificacions:

- es van escalar els volums dels cultius de llevat, de manera que es van processar 10 ml de cultiu, crescut en tub estèril de 50 ml
- les construccions de presenilina amb diversos passos transmembrana (psn, NTF i CTF), es van escalfar a 55°C enlloc de 70°C com diu el punt 4, per evitar la formació d'agregats d'alt pes molecular. I en el punt 8a, es van escalfar a 55°C enlloc de 100°C
- es van allargar els temps de vòrtex de 1' a 5' (punts 5 i 8b), que es van fer a 4°C per evitar la degradació
- abans de carregar el gel, només es van a escalfar a 100°C les proteïnes sense passos transmembrana. La resta es van escalfar a 55°C
- es van carregar 10-15 μl de cada extracció

Extracció de proteïna de llevat per l'anàlisi de les fusions amb Cub-PLV

1. Recolliu 4 ml de cultiu saturat crescut en SD unes 36 hores, en un únic tub eppendorf, centrifugant successivament 3' a 5000 rpm
2. Renteu amb 1 ml d'aigua destilada estèril
3. Resuspeneu en 150 µl de tampó de lisi i afegiu-hi 100 µl de boletes de vidre de 400 µm de diàmetre
4. Feu vórtex 8x30'' a 4°C, clavant els tubs en gel entremig
5. Centrifugueu a 4500 rpm a 4°C i recupereu el sobrenedant a un nou tub (les boletes i els llevats poc o gens lisats queden al fons del tub). Si queden llevats a les boletes, afegiu 50 µl de tampó de lisi, feu vortex 2x30'', centrifugueu i recupereu el sobrenedant, en el mateix tub que l'anterior
6. Centrifugueu el sobrenedant 20' a 4°C en una microfuga a la velocitat màxima
7. Separeu el pellet o fracció insoluble i el sobrenedant o fracció soluble que tractareu diferentment
8. Sobrenedant: Precipiteu-lo amb 5 volums d'acetona prèviament atemperada a -20°C.
Incubeu-lo 1 hora a -20°C
Pellet: reserveu-lo en gel
9. Sobrenedant: centrifugueu el precipitat 20' a 4°C al màxim en una microfuga. Descarteu el sobrenedant d'acetona i assequeu el pellet 10-15' a 37°C
10. Sobrenedant: resuspeneu-lo en 40 µl de tampó de càrrega x2
Pellet: resuspeneu-lo en 80 µl de tampó de càrrega x2
11. Incubeu 15' a 50°C i carregueu-ne 20 µl en un gel

6. Mètodes de treball amb cèl·lules SL2

6.1. Congelació

1. Desenganxeu les cèl·lules de la superfície del flascó amb una pipeta de 5 ml i passeu-les a un tub estèril de 15 ml. Les cèl·lules han d'estar a una elevada densitat però en fase exponencial de creixement (passe de 2-3 dies).
2. Centrifugueu-les a 500 x g durant 5'
3. Aspireu el medi i resuspeneu-les en 1 ml del medi de congelació. Passeu-les a un vial de congelació.
4. Ràpidament, introduïu-les en un congelador de cèl·lules atemperat a -80°C i poseu-les a un congelador de -80°C. La temperatura anirà baixant a poc a poc.
5. Deixeu-les a -80°C durant un mínim de 24h i poseu-les en un tanc de nitrogen líquid.

SOLUCIONS:

medi de congelació: 10% DMSO, 20% FBS, en medi Schneider's.

6.2. Descongelació

1. Treieu el vial del tanc de nitrogen líquid i descongeleu les cèl·lules ràpidament amb la mà o a 37°C.

2. Quan el medi estigui descongelat, passeu ràpidament 1 ml de cèl·lules a un tub estèril de 15 ml que ja conté 9 ml de medi suplementat
3. Centrifigueu a $500 \times g$ 5'
4. Aspireu el medi i resuspeneu les cèl·lules en 1 ml de medi suplementat
5. Passeu-les a un flascó de cultiu de 25 cm² que ja conté 4 ml de medi.
6. Incubeu-les durant 3 dies a 25°C i afegiu 2 ml de medi suplementat.
7. Deixeu-les a 25°C durant 2 dies més i ja en podeu fer una dilució 1.5:5, en medi fresc.

Durant el procés de congelació descongelació, les cèl·lules experimenten una elevada mortalitat, segurament deguda a la toxicitat del DMSO. Cal deixar-les un temps perquè es recuperin i les cèl·lules vives es comencin a dividir. Convé no dividir-les massa d'hora ja que les cèl·lules vives són poques i, després de la divisió, la concentració de cèl·lules vives seria massa baixa. No es poden dividir les cèl·lules a densitats inferiors a 0.5×10^6 cèl·lules/ml, doncs necessiten créixer a densitats superiors.

6.3. Transfecció

Les cèl·lules SL2 es van transfectar amb Cellfectin (invitrogen-life technologies), un vector lipídic catiònic. Es va seguir el protocol per les cèl·lules SL2 especificat a la pàgina web d'invitrogen *Transient and Stable transfection of S2 (D. mel-2) cells with cellfectin reagent*. Es va optimitzar introduint varies modificacions. A continuació es presenta el protocol que es va seguir en aquest treball.

Transfecció de cel·lules SL2 amb Cellfectin

1. Desenganxeu les cèl·lules amb una pipeta. Recolliu-ne 10 μ l (feu atenció a que estiguin ben homogènies) i barregeu-les amb 90 μ l de blau de tripà pel seu comptatge en una cambra de Neubauer
2. Sembreu $3-3.5 \times 10^6$ cèl·lules en plaques de 35 mm de diàmetre (o en plaques de 6 pous). Afegiu medi Schneider's sense suplementar fins a 2 ml. Incubeu a 25°C durant 45'-1h, o fins al pas 5.
Les cèl·lules han de tenir una viabilitat superior al >95%, i el pas no ha de ser de més de 3-4 dies, doncs les cèl·lules han d'estar en fase exponencial de creixement. Les cèl·lules SL2 poden créixer fins a densitats molt altes (20×10^6 cèl·lules/ml).
3. Prepareu les solucions A i B en tubs estèrils de 15 ml.
Solució A: Per cada transfecció, diluïu 4 μ g del DNA en 250 μ l de medi Schneider's sense suplementar
Solució B: Per cada transfecció, diluïu 8 μ l de Cellfectin en 250 μ l de medi Schneider's sense suplementar
4. Barregeu les dues solucions en un dels dos falcons, remeneu suaument i incubeu 20' a temperatura ambient
5. Mentrestant, treieu les cèl·lules de l'incubador i observeu-les sota la lupa o microscopi. S'han d'haver adherit a la superfície de la placa formant una monocapa d'un 90% de confluència. Aspireu-ne el medi i renteu-les amb 2 ml de medi Schneider's sense suplementar.

6. Afegiu al falcon que conté els complexos DNA-cellfectin 800 μ l de medi Schneider's sense suplementar. Deixeu anar el medi a poc a poc, contra la paret del tub. No barregeu ni feu turbulències perquè es podrien desfer els complexos lípid/DNA.
7. Aboqueu els 1.3 ml sobre les cèl·lules lliures de medi. Pipetegeu molt suaument i deixeu anar la barreja a poc a poc contra la paret de la placa.
8. Incubeu 4-6h a 25°C
9. Aspireu els complexos i afegiu 2 ml de medi suplementat per placa
10. Incubeu durant unes 72 hores a 25°C

6.3.1. Eficiència de transfecció

Es va mesurar l'eficiència de transfecció de cadascuna de les plaques abans de procedir al següent pas. D'aquesta manera, es poden corregir aproximadament les diferències en la transfecció en el moment de carregar el gel.

Dels 4 μ g de DNA per cada transfecció, 250 ng corresponen al plasmidi pSC-37, que expressa GFP. En el moment de recollir les cèl·lules es va procedir de la següent manera:

1. Després de les 72h d'incubació, desenganxeu bé les cèl·lules de cada plaqueta amb una pipeta i recolliu-les en un tub estèril de 15 ml. Acabeu-les de recollir rentant la placa amb 2 ml de PBS
2. Incrementeu el volum fins 6 ml amb PBS i passeu-ne 600 μ l a un eppendorf. Aquests 600 μ l de cèl·lules es van portar al Servei de Citometria de fluxe dels Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona, on es va obtenir el percentatge de cèl·lules fluorescents. Es va excitar amb una longitud d'ona de 488 nm i es va recollir l'emissió de la fluorescència a 525 nm. Els valors més baixos de cèl·lules fluorescents que es van obtenir són del 8%, suficient per immunodetectar presenilina en el lisat cel·lular (6.4.).

Aquest valor no és una mesura real de l'eficiència de la transfecció, sinó que simplement ens permet establir una correlació entre el % de cèl·lules fluorescents i la detecció de presenilina. Hem de tenir en compte que de plasmidi pSC-37 n'hi havia 1/16 del total transfectat i que, en les 72 hores d'incubació després de la transfecció les cèl·lules experimenten unes 2-3 divisions. En els casos que les cèl·lules perdin el plasmidi que s'ha transfectat per segregació pot ser que mantinguin una certa fluorescència si la proteïna EGFP és prou estable.

6.4. Extracció de proteïna

L'anàlisi dels lisats cel·lulars que sobreexpressen presenilina per immunodetecció d'una transferència western va ser altament difícil, doncs la presenilina forma agregats d'alt pes molecular. Es van provar diversos protocols d'extracció de proteïna i de preparació de les mostres però, en la majoria dels casos, es deixava de visualitzar la proteïna quan aquesta es congelava, degut a la formació d'agregats d'alt pes molecular que queden a la part superior del gel separador. Finalment, es va aplicar el següent protocol (C. Saura, comunicació personal).

Extracció de presenilina de cèl·lules SL2

Partim del punt 1 de l'apartat anterior

1. Centrifugueu els ~5.5 ml de cèl·lules a 500 x g durant 5'. Aspireu el medi i renteu el pellet 2x amb 5 ml de PBSx1 per treure les restes de medi. Congeleu el pellet sec si s'escau a -80°C, o procediu al següent pas.

EN GEL:

2. Liseu el pellet en 250 µl tampó de lisi I. Passeu-lo a un nou eppendorf.
3. Soniqueu 2x15" en gel, a potència 3-4, amb polsos del 40-50%. Eviteu que faci bromera.
4. Centrifugueu 20' a 4°C en una microfuga a velocitat màxima (12.500 rpm).
5. Separeu el sobrenedant i reserveu-lo en gel mentres en determineu la concentració de proteïna.
6. Carregueu en un gel SDS-PAGE de 5 a 15 µg, depenent de l'eficiència de transfecció. Prepareu la mostra diluint-la 1:1 en tampó de càrrega de proteïnes x2 a temperatura ambient i carregueu-la directament en un SDS-PAGE atemperat a 4°C.

SOLUCIONS:

Tampó de lisi I: 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1%NP-40, 0.5% tritó-X-100, *cocktail* d'inhibidors (Roche), 1 mM PMSF.

Es va observar que si s'evitava l'escalfament de la mostra durant l'electroforesi, disminuïa molt la formació dels agregats d'alt pes molecular. Aquests continuaven presents a la part superior del gel, però una bona part de la proteïna era visualitzable. Per evitar l'increment de temperatura durant l'electroforesi, es van preparar el tampó d'electroforesi i el gel amb antel·lació i es van deixar a 4°C fins al moment de l'electroforesi, que es va realitzar també a 4°C. Es va millorar la resolució i detecció de la presenilina encara més afegint urea a una concentració de 6 M tant al separador com al concentrador.

6.5. Immunolocalització

Les cèl·lules es van transfectar exactament igual que pels experiments d'immunodetecció en un western blot, i es van recollir a les 72 hores. Es va seguir el protocol especificat a (Hjelmqvist *et al.*, 2002), amb les següents modificacions:

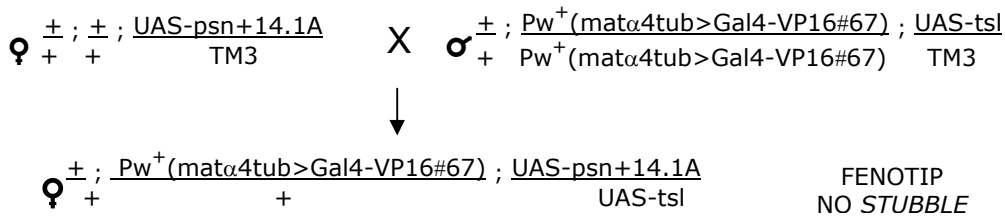
- es van permeabilitzar les cèl·lules en tots els casos

Les concentracions i els anticossos emprats, ja s'han especificat als materials.

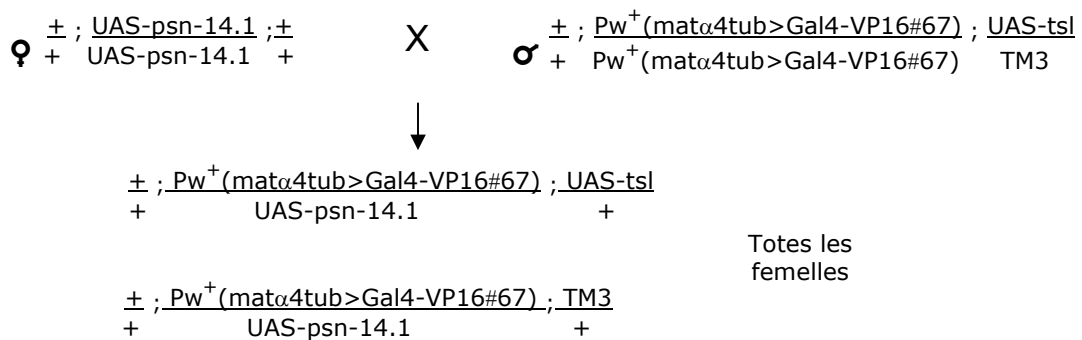
7. Mètodes de treball i creuaments en *Drosophila melanogaster*

7.1. Obtenció de femelles que expressen presenilina en la línia germinal

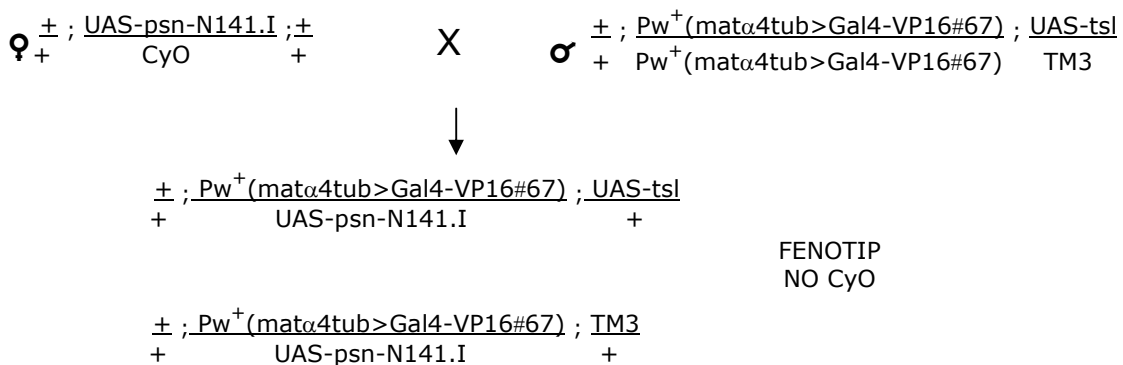
Per tal d'obtenir aquestes femelles, es va realitzar un creuament entre cadascuna de les línies UAS-psn, i la línia que expressa GAL4-VP16 a la línia germinal. Els creuaments que es van realitzar es presenten a continuació, així com els genotips i els fenotips de les femelles que es van recollir:

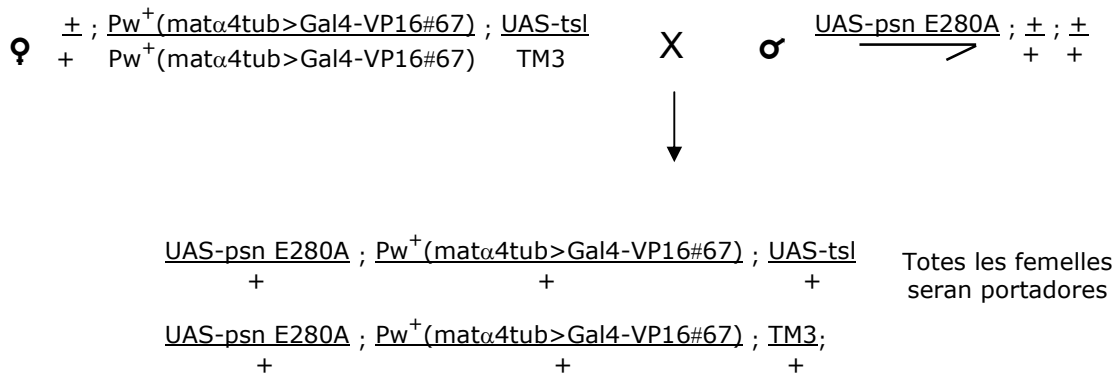


Les femelles verges portadores dels transgens UAS-psn-14.2 i UAS-psn L235P es van creuar de la mateixa manera, i es van seleccionar les no *stubble*.



La línia UAS-psn+14.1B no es va creuar perquè no era CyO i es temia que no fos correcta, ja que segons el genotip indicat hauria de contenir aquest marcador.





7.2. Recollida dels embrions

Les femelles del fenotip i, per tant, genotip adient, es van posar en elevat nombre, junt amb mascles nascuts del mateix creuament, en cambres de posta que tenen acoblada, a un costat, una plaqueta de 35 mm de diàmetre amb un medi especial per estimular la posta dels ous. Aquest medi conté suc de fruita i, a l'últim moment, se li va afegir una pasteta de llevat i se li van fer uns solcs, per evitar la posta dels ous a les vores de la placa, ja que en dificulta la recollida. Les postes es van realitzar a 29°C, ja que els efectes de la sobreexpressió són més visibles, durant 24h. Es va canviar la plaqueta de posta que es va deixar incubant 24 hores més a 25°C. Passat aquest temps, es va procedir a la preparació de les cutícules dels embrions.

7.3. Preparació de cutícules

Preparació de cutícules d'embrions de *Drosophila melanogaster*

1. Decorioneu els embrions afegint lleixiu a la placa i incubant 2'
2. Recolliu els embrions i filtreu-los
3. Renteu-los amb tritó-X-100 0.1%
4. Recolliu-los amb un pinzell i passeu-los a un vial que conté una barreja d'heptà:metanol 1:1. Remeneu suaument
5. Recolliu els embrions del fons amb una pipeta pasteur i passeu-los a un eppendorf
6. Renteu un cop amb metanol i un cop amb aigua, per treure les restes d'heptà
7. Munteu-los, assecant les restes d'aigua, en un porta amb una barreja de Hoyer:làctic 1:1
8. Incubeu a 55°C tota la nit

8. Mètodes estadístics i informàtics

Les seqüències dels clons aïllats en el triatge de la genoteca de cDNA de *Drosophila* van ser analitzades utilitzant el programa BLAST, accessible a la pàgina del NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

Pel que fa a les anàlisis d'estructura secundària de l'HL1, es van utilitzar el paquet de programes del *Network protein sequence analysis* disponible a http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-in/npsa_automat.pl?page=npsa_sspred.html. Es va utilitzar el programa que dona una estructura secundària consens. La cerca de motius en l'HL1, es va fer utilitzant els diferents programes disponibles a la pàgina <http://www.expasy.ch>.

Les rectes de regressió de les quantificacions de proteïna i l'obtenció de les concentracions de proteïna de les mostres es van realitzar utilitzant el programa Statview per Macintosh.

Per determinar la significació de les diferències en l'activitat β -galactosidasa dels llevats transformats amb diferents construccions de presenilina es va utilitzar el test estadístic U de Mann-Whitney. Es va realitzar l'anàlisi utilitzant el paquet de programes d'estadística SPSS. Aquesta prova estadística és la prova no paramètrica més poderosa i estricta per comprovar si existeixen diferències significatives entre la tendència central de les poblacions d'origen. Aquesta prova es pot aplicar encara que els valors de cadascuna de les poblacions no segueixi una distribució normal.

CAPÍTOL I. INTERACCIONS DE LA PRESENILINA AMB ALTRES PROTEÏNES

1. TRIATGE D'UNA GENOTECA D'EXPRESSIONI MITJANÇANT LA TÈCNICA DEL DOBLE HÍBRID

Les dades inicials sobre les presenilines la situen en la via de Notch i de la β APP, però no concreten quina és la seva funció bàsica. Tampoc no aporten informació sobre altres possibles funcions en altres processos cel·lulars. Com ja s'ha introduït prèviament, la cerca de proteïnes que interaccionin amb la presenilina ha estat una aproximació molt utilitzada per obtenir més dades sobre les seves funcions. En aquest treball, com en la gran majoria, es va decidir abordar aquest problema mitjançant la tècnica del doble híbrid (*yeast two hybrid*) perquè és la tècnica més potent per cercar, a nivell proteòmic, proteïnes que interaccionin amb la proteïna objecte d'estudi. Es va utilitzar la presenilina de *Drosophila* com a model perquè s'havia clonat en el grup on s'ha realitzat aquest treball (Marfany *et al.*, 1998). A més a més, el fet que només tingui un gen de presenilina simplifica la interpretació dels resultats, és un organisme on l'anàlisi genètica és accessible i les conclusions que se'n puguin treure són extrapolables *a priori* a totes les presenilines d'altres organismes (en tinguin una o dues còpies com a mamífers).

La metodologia del doble híbrid consisteix en un assaig genètic, basat en les propietats de diferents factors de transcripció, en aquest cas GAL4 de llevat, que es poden dividir en dues subunitats funcionals independents: el domini d'unió al DNA (GAL4BD, GAL4 *B*inding *D*omain) i el domini activador de la transcripció (GAL4AD, GAL4 *A*ctivating *D*omain). Aquests fragments només poden reconstituir la proteïna sencera funcional si estan fusionats a proteïnes o pèptids amb capacitat d'interaccionar. Els plasmidis que codifiquen per aquestes proteïnes de fusió es transformen en les soques de llevat adients, que porten integrat en el seu genoma un gen seleccionable, normalment el gen *HIS3*, i un gen *reporter*, *lacZ*, sota el control de les caixes d'unió de GAL4 (UAS); i que són auxotròfiques per determinats aminoàcids. Els llevats transformats es plaquejen en un medi selectiu per la presència dels dos plasmidis que codifiquen per les proteïnes de fusió —els plasmidis rescaten algunes de les auxotrofies de la soca— i per la interacció, és a dir, se seleccionen els llevats que expressen el gen *HIS3* (figura 1).

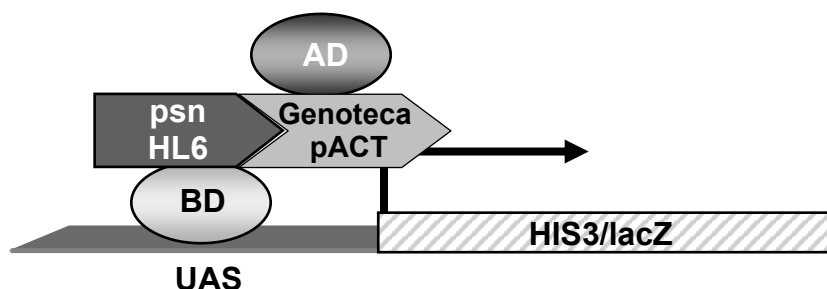


Figura 1. Esquema dels fonaments del doble híbrid i de la seva aplicació en la cerca de proteïnes que interaccionin amb la presenilina.

El fet que la presenilina presenti 8 dominis transmembrana dificulta l'aplicació d'una tècnica que requereix l'expressió de la proteïna soluble, en el citoplasma, i el seu transport al nucli, mitjançant per la proteïna de fusió corresponent, en aquest cas, els dominis d'activació i

d'unió al DNA del factor de transcripció GAL4. És per això que es va optar per treballar amb una regió hidrofílica de la presenilina. De totes les possibles, es va triar la més gran, el *loop* hidrofílic entre els transmembranes VI i VII que, a més a més, és on es troben els 14 aminoàcids que poden ser suprimits per l'*splicing* alternatiu de l'exó 7 de la presenilina de *Drosophila*. Aquest fet es va considerar interessant, ja que aquests 14 aminoàcids podrien aportar noves especificitats en les interaccions proteïna-proteïna.

Es disposa de dues soques de *Saccharomyces cerevisiae* adients per realitzar el triatge de genoteques: CG-1945 i Y190, que tenen diferents caixes UAS de resposta a GAL4 per dirigir l'expressió del *reporter* i del gen seleccionable (vegeu materials). Les caixes GAL1UAS produeixen una expressió molt més forta que, combinada amb una caixa TATA del gen *HIS3*, produeixen l'expressió basal del cDNA que controlen, en aquest cas, el gen *HIS3* en la soca Y190. Aquesta expressió basal genera un soroll de fons que es contrarresta afegint un compost inhibidor de l'enzim *HIS3*, el 3-aminotriazol (3AT) a elevades concentracions (25 mM). Les proves que es van dur a terme per posar a punt aquest sistema demostren que, tot i l'addició de 25 mM de 3AT, el soroll de fons causat per l'expressió basal del gen *HIS3* és encara molt elevat i, segurament, en el triatge d'una genoteca, creixerien molts clons a causa d'aquest efecte, fet que dificulta la selecció dels clons His⁺ reals. És per això que es va realitzar el triatge en la soca CG-1945 que, en lloc de la caixa TATA del gen *HIS3*, té la caixa TATA de GAL1 que produeix una expressió basal del gen *HIS3* inhibible amb 3AT 5 mM.

Es van crivellar 680.000 clons d'una genoteca comercial de cDNA de *Drosophila* obtinguda de teixits adults (Clontech) clonada en el vector d'expressió de doble híbrid pACT-2 (vegeu materials). La soca que es va transformar amb la genoteca és la CG-1945 que ja contenia el plasmidi HL6-pAS, i es va plaquejar en un medi selectiu que només permetia el creixement dels clons amb els dos plasmidis (medi sense leucina ni triptòfan) i positius per la interacció (medi sense histidina i amb 3-aminotriazol) (vegeu material i mètodes). Per tal de determinar el nombre de clons transformats o, el que és el mateix, de clons crivellats, i decidir si són suficients, es va plaquejar una alíquota dels llevats en medi selectiu només per la presència dels dos plasmidis. Dels 680.000 clons crivellats es van obtenir 25 clons positius pel creixement sense histidina i, per tant, prototròfics per histidina (His⁺, a més de Leu⁺ i Trp⁺).

Es va obtenir el DNA plasmídic dels 25 clons positius, i es van agrupar en funció de la mida del cDNA i del patró de restricció pels enzims *HaeIII* i *RsaI*. A continuació, es van seqüenciar aquests clons —un o dos representants de cada grup— i es va identificar el cDNA de cadascun d'ells comparant les seqüències nucleotídiques amb diferents bases de dades mitjançant el programa BLAST (vegeu la taula 1). D'aquesta manera, a banda d'obtenir la identitat dels cDNAs, es va comprovar que tots els cDNAs aïllats segueixen la pauta de lectura oberta determinada per la proteïna de fusió situada a 5'.

Tot i ser molt potent, la tècnica del doble híbrid genera molts falsos positius, que poden ser de diferents tipus. S'entén per fals positiu el clon His⁺ o lacZ⁺ que conté plasmidis que codifiquen per proteïnes que no interaccionen directament amb la proteïna problema. Generalment, són proteïnes que tenen capacitat d'unir-se al DNA, en concret a les seqüències UAS o a les seqüències flanquejants, o a altres proteïnes ja unides a aquestes seqüències. També poden ser proteïnes amb dominis d'interacció que s'uneixen inespecíficament a altres

proteïnes. Són el que s'han anomenat proteïnes "enganxifoses" (*sticky proteins*). Per detectar aquests falsos positius cal determinar l'activació d'un segon gen, el *reporter lacZ*, amb les seqüències promotores UAS en un altre nombre i context. A més a més, cal realitzar una sèrie de controls per excloure els falsos positius, que poden activar el gens *reporters* quan es cotransformen amb el plasmidi pACT-2 buit, que només codifica pel domini d'activació de GAL4, o amb el plasmidi pLam, que codifica per un fragment de la laminina humana i amb el qual, *a priori*, no ha d'interaccionar. Molts dels falsos positius fusionats al domini d'activació del DNA (AD) requereixen també les seqüències d'unió al DNA (BD), i seran detectats mitjançant aquests controls. Es va determinar l'expressió del gen *reporter lac Z*, pel qual la soca Y190 presenta una expressió més potent, mitjançant dos mètodes, l'assaig qualitatiu X-gal en placa, i la quantificació amb ONPG (vegeu els mètodes). La soca CG-1945 presenta una expressió molt dèbil del gen *lacZ*, fet que genera molts falsos negatius i la pèrdua de les interaccions dèbils, i per això no es va realitzar aquest assaig en aquesta soca. D'altra banda, també es va comprovar l'expressió del *reporter HIS3* en la soca Y190 plaquejant els transformants en medi selectiu sense histidina i amb 25 mM de 3AT per inhibir l'expressió basal del gen *HIS3*. La taula 1 és un resum global dels clons obtinguts del triatge en la soca CG-1945, i del resultat dels controls que es van fer amb un representant de cadascun dels clons en la soca Y190.

Taula1. Clons positius (His⁺) obtinguts en el triatge (CG-1945) i resultat dels controls (Y190)

<i>n</i> ^o clons	<i>cDNA</i>	<i>n</i> ^o accessió	Y190 His ⁺	Y190 Lac Z	Fals positiu*
19	ciclofilina	118099	-	-	No
2	EST no identificada LDO1941	AA816507	-	+	Sí
1	<i>loop</i> aminoterminal presenilina	AF017024	-	-	No
1	<i>Casein kinase II α subunit interactor protein-3</i>	AF090440	-	+	No
1	Nucleoporin homolog	U91980	-	-	No
1	Ribosomal protein L14	CAA71121	-	-	No

*El terme fals positiu fa referència a l'activació del gen *reporter* i/o del gen *selector* en presència del plasmidi pACT-2 buit o de la laminina humana fusionada al GAL4BD.

Quatre dels sis clons aïllats, només activaven el gen seleccionable *HIS3* en la soca CG-1945, en la qual es va fer el triatge, de manera que es van descartar directament atès que no complien els requisits d'activar el gen *reporter lacZ*. D'entre aquests cDNAs, el clon de la ciclofilina semblava prometedora, ja que es tracta d'una xaperona i, com a tal, és una proteïna que resideix en el reticle endoplasmàtic, com la presenilina. A més a més, es va aïllar aquest clon 19 vegades. Malauradament, els controls realitzats en la soca Y190 van demostrar que només activa el gen seleccionable *HIS3* en la soca CG-1945 i, per tant, no es va perseguir aquesta interacció. Pel que fa a la interacció de l'HL6, situat al fragment carboxiterminal de la presenilina (CTF), amb el *loop* aminoterminal de la presenilina que, a partir d'ara, anomenaré N-*loop*, és d'especial interès ja que acota la formació de l'heterodímer NTF:CTF (vegeu la introducció) a aquestes dues regions hidrofíliques. En altres parts d'aquest treball (vegeu el capítol II), es va observar que les interaccions de l'N-*loop* no són consistents, ja que sembla tenir la capacitat d'interaccionar amb diverses regions de la presenilina.

L'únic clon que compleix alguns dels requisits de clon positiu veritable és la *Casein kinase II α subunit interactor protein-3* (CKII α i-3). Per un costat, activa el gen *HIS3* en la soca GC-1945 i el gen *lacZ* en la soca Y190 de forma específica, ja que quan es cotransforma aquest clon amb el fragment de la laminina humana fusionat al BD, o amb el BD sol, no activa la transcripció (vegeu la columna fals positiu de la Taula1). Però aquest clon no activa l'expressió del gen *HIS3* en la soca Y190 i, per tant, no compleix els requisits de positiu real. Si es comparen els promotors de cadascun dels gens *reporters* i dels gens selectors en les dues soques emprades, es pot concloure que la interacció de l'HL6 amb la CKII α i-3 és positiva per un tipus concret de promotor (GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}) i no ho és per una altre, fet que indica una activació del gen *reporter* i del gen seleccionable que depèn de les seqüències promotores (figura 2).

CG-1945: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-**HIS3**

GAL4_{17-mers(x3)}-CyC1_{TATA}-**lacZ**

Y190: GAL1_{UAS}-HIS3_{TATA}-**HIS3**

GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-**lacZ**

Figura 2. Seqüències promotores dels gens seleccionable i *reporter* de les soques CG-1945 i Y190.

Aquest és un possible tipus de fals positiu, de difícil interpretació ja que no es tracta d'una proteïna "enganxifosa" i, segurament, no és dels més freqüents ja que depèn de la coexpressió de la proteïna de fusió GAL4AD-HL6, fet que indica una certa especificitat. Una possibilitat és que es tracti d'una interacció molt dèbil que sigui afavorida i/o estabilitzada en un context de promotor i no en un altre. Malgrat l'esforç i el temps invertit en aquest abordatge, es va creure, atès que no presenta la mateixa capacitat d'activar el gen *reporter* i el gen selector, independentment de les seqüències promotores, que no calia procedir a la confirmació de la interacció per altres mètodes independents i tampoc es va continuar l'anàlisi amb cap dels clons obtinguts. (En la primera part de la discussió, es discuteix aquest resultat en profunditat).

CAPÍTOL II. INTERACCIONS INTRAMOLECULARS ENTRE DIFERENTS DOMINIS DE LA PRESENILINA EN UN SISTEMA HETERÒLEG

1. CERCA D'INTERACCIONS INTRAMOLECULARS MITJANÇANT EL DOBLE HÍBRID

A l'inici d'aquest treball, ja es coneixien algunes dades sobre la biologia cel·lular de les presenilines, com ara la seva presència majoritària en forma dels fragments endoproteolítics NTF i CTF. Aquesta característica, juntament amb el fet que les mutacions causants d'Alzheimer actuen com a mutacions de guany de funció dominants o mutacions amb efecte de dominància negativa, ens va fer pensar que les presenilines podrien estar formant complexos multiproteics amb diverses unitats de presenilina, de manera que les presenilines actuarien com a oligòmers. Segons la nostra hipòtesi de treball, les presenilines amb mutacions d'Alzheimer segrestarien les presenilines silvestres —recordem que les mutacions FAD de presenilina es presenten en heterozigosi— en aquests oligòmers de manera que impedirien a les presenilines silvestres realitzar la seva funció normal, exercint un efecte de dominància negativa. És per això que es va abordar la cerca d'interaccions entre diferents dominis de la presenilina. Abans d'entrar en els resultats obtinguts, cal esmentar que les primeres publicacions que parlaven de l'heterodímer NTF:CTF van aparèixer quan ja s'havia iniciat aquest treball, mentre es preparaven les construccions per realitzar aquesta anàlisi exhaustiva. Es va decidir continuar amb aquesta estratègia perquè en cap dels treballs publicats s'havien determinat els dominis responsables de la interacció NTF:CTF, i perquè es creia que es podien identificar altres interaccions.

En un primera aproximació, es va realitzar una anàlisi exhaustiva de les interaccions entre diversos dominis de la presenilina mitjançant el doble híbrid. Diferents combinacions de fragments de la presenilina, així com la presenilina sencera, es van transformar en les soques de llevat CG-1945 i Y190. En la primera, es va valorar el creixement en absència d'histidina (a més d'absència de leucina i triptòfan), mentre que en la segona, es va assajar l'expressió del gen *reporter* lac Z mitjançant l'experiment X-gal en placa, per les raons ja esmentades en el Capítol I i en els materials.

Els resultats es presenten a continuació, i s'han agrupat en tres blocs en funció de les interaccions possibles entre els grans dominis NTF i CTF, que constitueixen la unitat funcional de presenilina. El creixement o la intensitat del color blau en l'experiment X-gal s'han representat amb diferent nombre de símbols +, atès que es tracta d'experiments qualitius. S'ha treballat amb molts dominis i subdominis de la presenilina, la nomenclatura dels quals ha estat molt abreujada per qüestions pràctiques. Aquests dominis i subdominis de la presenilina s'esmentaran molt sovint durant aquesta memòria i per això es presenten prèviament.

1.1. Dominis de la presenilina dels quals s'han analitzat les interaccions

Bàsicament, es va treballar amb els fragments NTF i CTF i, alhora de dissecionar-los en pèptids més petits, es va treballar amb les regions que no contenien regions transmembrana.

Pel que fa a la primera divisió de la presenilina en els fragments NTF i CTF, quan es va iniciar aquest treball encara no es coneixia el punt exacte d'endoproteòlisi de PS1 i PS2 ni tampoc s'havien seqüenciat els fragments endoproteolítics de la presenilina de *Drosophila*. Posteriorment, es van publicar els primers treballs amb la seqüència de l'extrem aminoterminal del fragment CTF, segons els quals el punt prè per dividir la presenilina en NTF i CTF en aquest treball, està desplaçat alguns aminoàcids cap a l'extrem carboxiterminal respecte de les presenilines en humans, de manera que el NTF queda lleugerament allargat a C-terminal i el CTF lleugerament escurçat a N-terminal.

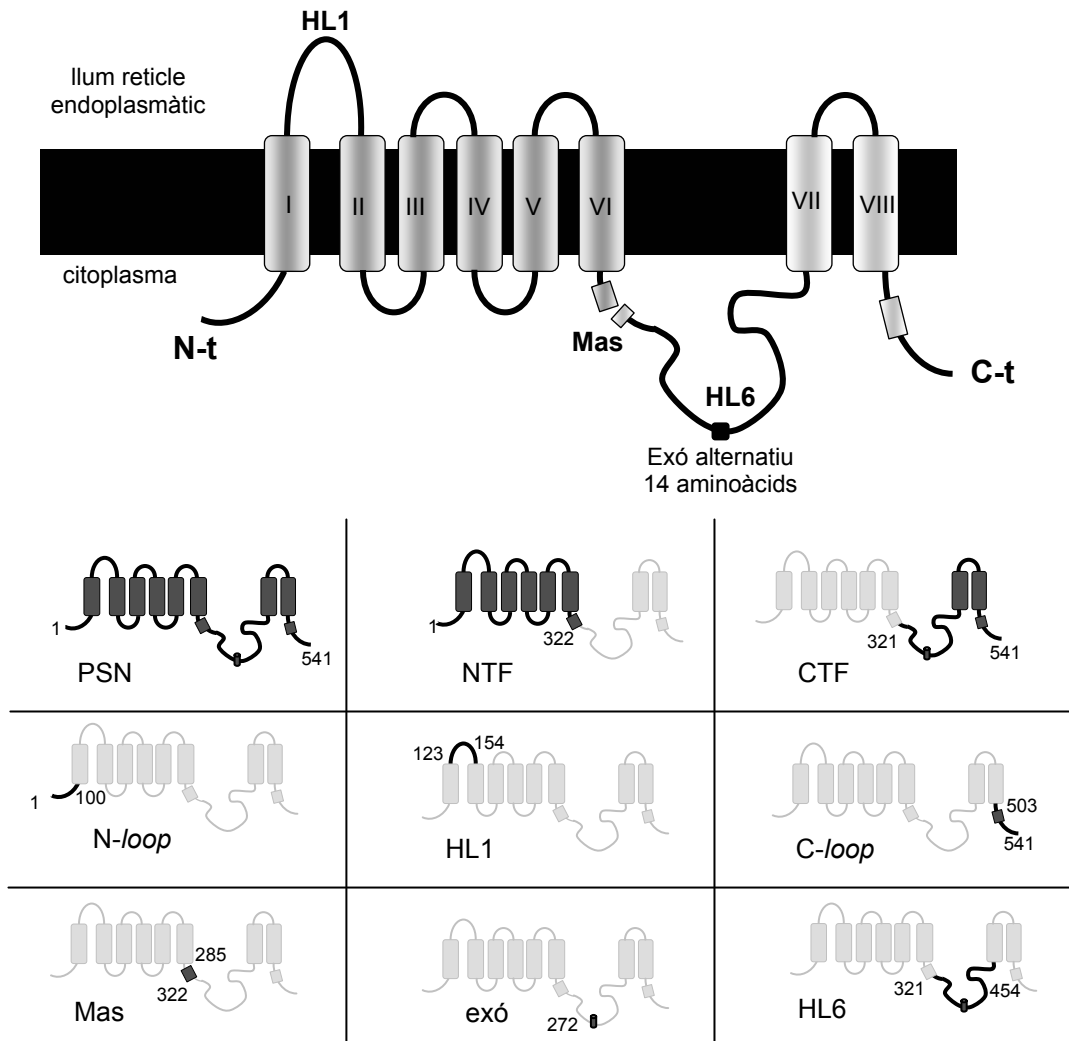


Figura 1. Esquema de la presenilina amb els dominis analitzats per doble híbrid i la seva nomenclatura

Pel que fa a la divisió dels fragments NTF i CTF en pèptids més curts, ens vam basar en les prediccions *in silico* de les diferents regions hidrofòbiques i transmembrana, seguint un model de 7 regions transmembrana proposat per Van Broeckhoven, (1995). Paral·lelament, s'estaven realitzant els experiments *in vivo* en *C. elegans* per determinar la topologia de la presenilina, que va resultar de 8 regions transmembrana (Li and Greenwald, 1996), de manera que alguns dels subdominis ja clonats en els corresponents plasmidis d'expressió, concretament la regió Mas i l'HL6 (figura 1), no corresponien amb les regions reals i es van haver de redissenyar els oligonucleòtids per refer aquestes construccions. Els pèptids amb els que es va treballar són el

loop amino-terminal (*N-loop*), el *loop* hidrofílic entre els transmembranes I i II (HL1) i una regió hidrofòbica situada just després del transmembrana VI (Mas), continguts tots tres en el fragment NTF. Pel que fa a la subdivisió del CTF, es van expressar el *loop* hidrofílic situat entre els transmembranes VI i VII (HL6), l'exó alternatiu amb les seqüències adjacents i l'extrem hidrofòbic C-terminal després del transmembrana VIII (*C-loop*) (figura 1).

Cal puntualitzar que el fet de treballar amb les regions no transmembrana implica però, que si la presenilina presenta interaccions intramoleculares a través dels dominis transmembrana, passaran desapercibudes en aquesta anàlisi i només es podran detectar quan s'analitzin els fragments grans de la presenilina (PSN, NTF i CTF). Tot i això, en aquest últim supòsit no es podria determinar si la interacció es deuria a la contribució de les regions hidrofíliques, les hidrofòbiques o de tots dos tipus de dominis.

1.2. L'heterodímer NTF:CTF

Els resultats obtinguts per doble híbrid confirmen la interacció NTF:CTF, que ja s'havia publicat quan es va acabar aquesta anàlisi, però per un nou mètode, atès que fins ara s'havien utilitzat tècniques bioquímiques. El fet que aquesta unió ja hagués estat demostrada per altres grups i per altres mètodes, valida el sistema del doble híbrid utilitzat per realitzar aquest treball, i és un molt bon control positiu (Taula 1).

Taula 1. Interaccions NTF:CTF.

	<i>pAS2.1 (Gal4BD)</i>	<i>pACT-2 (Gal4AD)</i>	His	β -gal
PSN		PSN	+	ND
PSN		CTF	-	-/+
PSN		CTF-14	-	-/+
PSN		NTF	-	-
NTF		CTF	++	++
NTF		CTF -14	++ ^a	++ ^a










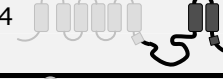





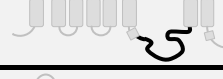


a) l'experiment recíproc dona el mateix resultat

A continuació, es van analitzar els subdominis dels fragments NTF i CTF per acotar la interacció responsable de formar l'heterodímer NTF:CTF (Taula 2).

El resultat d'aquesta dissecció apunta a que l'*N-loop* i el *C-loop*, corresponents als extrems hidrofílic aminoterminal i hidrofòbic carboxiterminal, respectivament, podrien interaccionar i contribuir a la interacció NTF:CTF. L'*N-loop* però, té capacitat d'interaccionar amb altres regions, com el *loop* hidrofílic situat entre els dominis transmembranes VI i VII. La combinació recíproca

però, detectada en el triatge de la genoteca (N-*loop*-pACT/ HL6-pAS) (vegeu el capítol I), no és positiva en l'assaig X-gal en placa (Taula 2). Aquestes primeres dades suggereixen que l'*N-loop* té tendència a interaccionar inespecíficament amb diferents pèptids i no es pot concloure doncs, que participi en l'heterodímer NTF:CTF. En aquesta primera anàlisi no s'han pogut delimitar les regions del NTF i del CTF responsables de l'heterodímer a cap dels dominis testats, fet que indica d'una banda la possible contribució de més d'una regió, hidrofílica i/o hidrofòbica, i d'altra banda, la possible contribució de les regions transmembrana, en l'heterodímer NTF:CTF.

Taula 2. Dissecció de la interacció NTF:CTF

	<i>pAS2.1 (Gal4AD)</i>	<i>pACT-2 (GalBD)</i>	His	β -gal
PSN		N- <i>loop</i> 	ND	+ ^a
N- <i>loop</i>		CTF 	+	+
N- <i>loop</i>		C- <i>loop</i> 	+ ^b	+
NTF		C- <i>loop</i> 	-	-
Mas		CTF-14 	-	-
Mas		C- <i>loop</i> 	-	-
NTF		HL6 	-	-
N- <i>loop</i>		HL6 	+	+
HL1		C- <i>loop</i> 	-	+ ^b

a) l'experiment recíproc dóna el mateix resultat; b) l'experiment recíproc dóna el resultat contrari.

1.3. L'homodímer NTF:NTF

L'anàlisi de les possibles interaccions del fragment NTF amb ell mateix revela, remarcablement, que forma homodímers en el sistema del doble híbrid. A partir d'aquest resultat es va procedir a la dissecció del NTF en diferents dominis per a detectar el pèptid —o pèptids— responsable de la interacció. Algunes de les combinacions analitzades i resumides en aquesta taula no tenen sentit biològic, perquè impliquen interaccions entre dominis que resideixen a costats oposats de la membrana. Per exemple, el *loop* hidrofílic citoplasmàtic aminoterminal (N-*loop*) no pot interaccionar realment *in vivo* amb el *loop* hidrofílic 1 (HL1), situat entre els transmembranes I i II i encarat cap a la llum del reticle endoplasmàtic. Es va realitzar l'anàlisi d'aquestes interaccions com a control, ja que permet detectar els dominis amb

tendència a interaccionar amb altres pèptids, com ara l’N-loop i, per tant, ajuda a reconèixer els falsos positius. Els resultats de la dissecció de l’homodímer NTF:NTF indiquen que l’N-loop podria interaccionar amb ell mateix, fet que confirma que es tracta d’un pèptid que dóna molts falsos positius en un doble híbrid, ja que, tal com s’ha comentat en el capítol I, es va aïllar en el crivellatge de la genoteca realitzat amb el domini HL6. Cal destacar, de tots aquests resultats, la interacció de l’HL1 amb ell mateix, que pot homodimeritzar i, fins i tot, pot interaccionar amb tot el fragment NTF que el conté (Taula 3).

Taula 3. Dissecció de la interacció NTF:NTF

	<i>pAS2.1 (Gal4-BD)</i>	<i>pACT-2 (Gal4-AD)</i>	<i>His</i>	<i>β-gal</i>
NTF		NTF	++	+
HL1		HL1	++	++
HL1		NTF	++ ^b	++
N-loop		N-loop	ND	+
<i>N-loop</i>		HL1	-	- ^b
<i>Mas</i>		HL1	ND	-
N-loop		Mas	ND	+ ^b

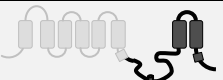
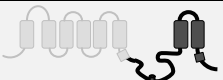




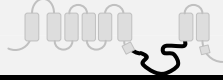

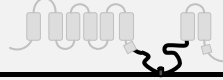
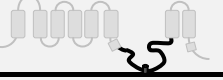






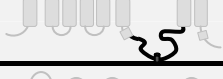
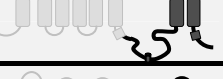

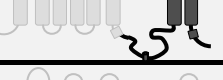
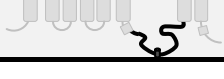

b) l’experiment recíproc dóna el resultat contrari

1.4. L’homodímer CTF:CTF

L’anàlisi d’interaccions per doble híbrid indica que el fragment CTF també forma homodímers. La dissecció d’aquest fragment en diferents dominis per tal de determinar les regions que contribueixen a la seva homodimerització no va generar, en aquest cas, cap resultat positiu conclouent i repetible. Aquestes dades suggereixen la participació conjunta de diverses regions, o bé la interacció a través dels dominis transmembrana (Taula 4).

El rol de les regions transmembrana en les diferents associacions dels fragments NTF i CTF que s’han descrit en aquest apartat serà tractat en profunditat mitjançant una altra tècnica, adient per expressar i detectar interaccions entre proteïnes que tenen dominis transmembrana, *in situ* (punt 2.4.).

Taula 4: Dissecció de les interaccions CTF:CTF

<i>pAS2.1 (Gal4-BD)</i>		<i>pACT-2 (Gal4-AD)</i>		<i>His</i>	<i>β-gal</i>
CTF		CTF		++	++
CTF-14		CTF		++	+
C-loop		HL6-14		-	ND
HL6-14		HL6-14		-	ND
HL6		HL6		-	ND
exó		exó		+/-	+
exó		C-loop		+	-
C-loop		C-loop		+	-
HL6		CTF		-	ND
C-loop		CTF		-	-
HL6		exó		-	ND

1.5. Les proteïnes de fusió s'expressen en les soques de llevat

L'expressió de proteïnes en un sistema heteròleg pot ser difícil, ja que els pèptids expressats poden generar toxicitat, o bé, si les proteïnes són reconegudes com a exògenes, poden ser degradades per les proteases cel·lulars. És per això que es va comprovar l'expressió, a partir dels plasmidis del doble híbrid, de les proteïnes de fusió que havien donat resultats més rellevants. A més a més, aquesta comprovació permetia descartar que en els casos de no interacció, el que realment hagués succeït és que una o ambdues proteïnes de fusió analitzades no s'hagués expressat i, per tant, haguessin estat falsos negatius. L'extracte total de proteïnes dels llevats transformats es va separar en una electroforesi en gel de poliàcrilamida desnaturalitzant en presència de SDS (SDS-PAGE), i es va transferir a una membrana de PVDF (transferència de tipus *western*, o *western blot*) per immunodetecció amb els anticossos corresponents (anti-HA per la fusió amb l'AD en el pACT i anti-GAL4BD per la fusió amb el BD en el pAS) (figura 2) (vegeu mètodes).

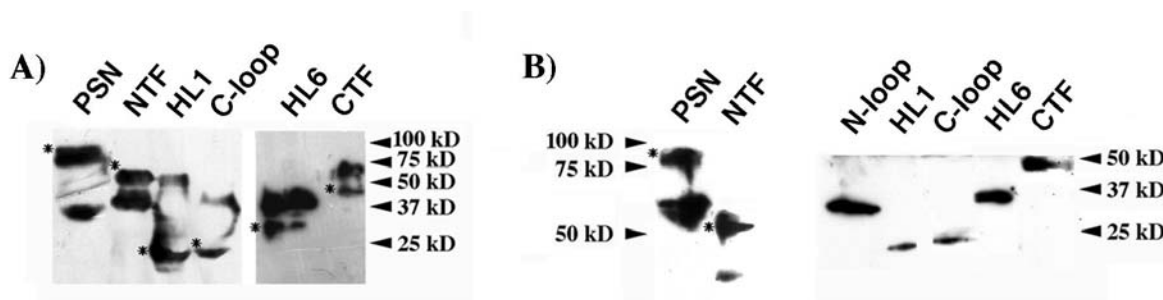


Figura 2. Immunodetecció de les proteïnes de fusió expressades en la soca Y190. A) fusions amb el Gal4-AD, detectades amb l'anti-HA; B) fusions amb el Gal4-BD, detectades amb l'anti Gal4-BD. En els carrils on apareixen altres bandes, segurament degut a la formació d'agregats, les bandes esperades i de la mida correcta s'assenyalen amb un asterisc (*).

De tot aquest conjunt de dades, la formació d'homodímers NTF:NTF i CTF:CTF resulta molt novedosa, ja que obre noves perspectives per a la formació i activitat del complex γ -secretasa. Si els NTF i CTF estan interaccionant dos a dos, i també formen heterodímers intramoleculars, la presenilina funcional no seria un heterodímer NTF:CTF, sinó que seria un tetràmer amb dos NTFs i dos CTFs. Les anàlisis per doble híbrid suggereixen doncs, una nova visió de la presenilina- γ -secretasa que va ser perseguida i analitzada en més profunditat. L'homodimerització de l'HL1 com a part de l'homodímer NTF:NTF també va ser corroborada i explorada per altres mètodes tal com es veurà més endavant.

2. INTERACCIONS INTRAMOLECULARS DETECTADES MITJANÇANT EL SISTEMA DE L'SPLIT-UBIQUITIN

El sistema del doble híbrid requereix l'expressió de les proteïnes en forma soluble, fet que comporta que proteïnes altament hidrofòbiques i amb multitud de regions transmembrana, com la presenilina, no adoptin la seva topologia fisiològica. En el cas de les interaccions analitzades per doble híbrid entre els fragments de la presenilina que contenen dominis transmembrana, existeix la possibilitat que algunes interaccions detectades siguin artefactuals, atès que les proteïnes de fusió poden adoptar una conformació que les capaci per interaccionar amb altres proteïnes. Per validar aquestes interaccions, cal aplicar una altra metodologia que permeti l'expressió de les proteïnes amb la seva topologia i localització subcel·lular originals. Aquesta nova metodologia obre la possibilitat d'estudiar diferents aspectes de les interaccions intramoleculars de la presenilina, sabent que aquesta està adoptant la conformació adient en les membranes cel·lulars. En aquest treball, es va utilitzar un sistema no comercial d'expressió en llevat anomenat *split-ubiquitin*, que es va haver d'adaptar a partir del treball original per tal de poder-lo aplicar en l'estudi de les interaccions de la presenilina.

2.1. Fonaments del sistema de l'*split-ubiquitin*

Aquest sistema de detecció d'interaccions proteïna-proteïna es basa en la capacitat dels fragments aminoterminal (aminoàcids 1-37) i carboxiterminal (aminoàcids 35-76) de la

ubiquitina de llevat (que anomenaré, a partir d'ara, Nub i Cub, respectivament) de reconstituir la molècula sencera. La ubiquitina pot ser aleshores reconeguda per les proteases d'ubiquitina citoplasmàtiques (DUBs), enzims encarregats d'alliberar ubiquitines unides a altres proteïnes mitjançant un tall a C-terminal de la ubiquitina. La substitució de la isoleucina 13 per una glicina o per una alanina inhibeix la reconstitució espontània de la ubiquitina, que necessita aleshores altres interaccions accessòries, generades per les proteïnes problema que s'hi fusionen, perquè la reconstitució de la ubiquitina i el consegüent reconeixement per les DUBs sigui possible. Cal doncs, expressar dues proteïnes fusionades, respectivament, amb els fragments Nub i Cub en una soca de llevat adient. Les interaccions accessòries, que són les que realment ens interessin, es detecten a través de l'alliberació d'un factor de transcripció que està unit a C-terminal del fragment Cub. El factor de transcripció és una proteïna quimèrica formada pel domini d'unió al DNA del factor de transcripció LexA i l'activador de la transcripció Vp16 (LexA-VP16). A més a més, conté un epítot, un fragment de la proteïna A (protA), que facilita la seva immunodetecció. Quan s'allibera aquest factor de transcripció de la proteïna de fusió problema, la qual està ancorada a la membrana, pot translocar-se al nucli i activar els gens *reporters* corresponents, *HIS3* i *lacZ*, que estan controlats per les seqüències operadores de LexA. El fragment Nub es pot fusionar a N-terminal o a C-terminal de la proteïna o pèptid problema, en funció de la topologia, i no cal que es tracti d'una proteïna amb regions transmembrana. L'únic requisit és que quedi al citoplasma, per poder ser reconegut per les DUBs. En el cas de la fusió amb Cub-protA-lexA-Vp16 (Cub-PLV), aquest també ha de quedar encarat al citoplasma i cal fer la fusió a C-terminal de la proteïna problema, perquè protA-lexA-Vp16 quedi lliure si hi ha interacció. Aquesta fusió és imprescindible que quedi ancorada a la membrana ja que, si es tracta d'una proteïna soluble, podrà difondre o translocar-se al nucli i activar els *reporters* sense necessitat de cap interacció.

En aquest sistema, la localització de les proteïnes de fusió ve determinada, en principi, per la part de la proteïna expressada a N-terminal de la fusió, de manera que les proteïnes transmembrana quedaran ancorades a les membranes cel·lulars. En el cas que no sigui així i la proteïna no es plegui correctament i quedi soluble, l'expressió de la fusió amb Cub-protA-LexA-Vp16 activarà els *reporters* per sí sola, i aquest sistema no proporcionarà la informació que es desitja.

2.2. Adaptació del sistema de l'*split-ubiquitin* per a la seva aplicació en l'anàlisi dels dímers NTF i CTF

Els DNAs plasmídics que contenen les fusions Cub-protA-LexA-Vp16 (a partir d'ara Cub-PLV), van ser amablement cedits pel doctor Igor Stagljär, que va posar a punt el sistema de l'*split-ubiquitin* per estudiar interaccions entre proteïnes integrals de membrana de llevat. Va utilitzar com a model les proteïnes Wbp1p i Ost1p del complex enzimàtic de la oligosacariltransferasa, que estan íntimament unides en aquest complex (Stagljär *et al.*, 1998) (figura 3).

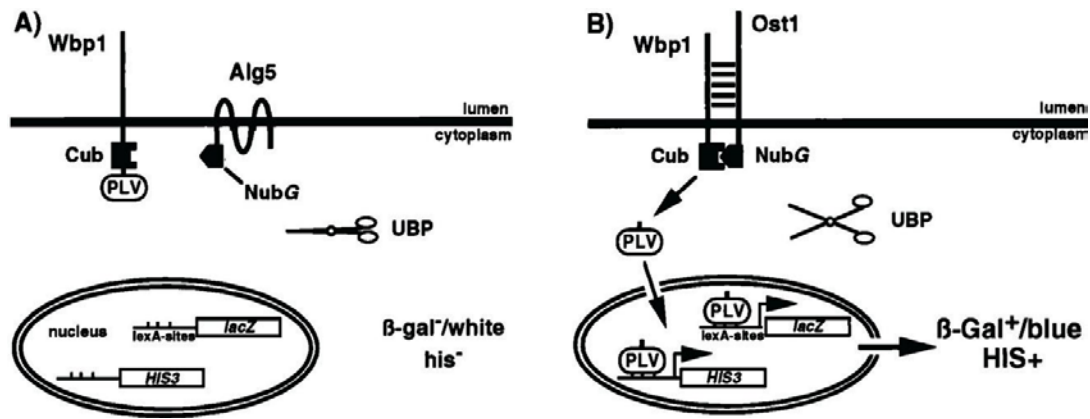


Figura 3. Esquema del sistema de *split-ubiquitin* aplicat per les proteïnes Wbp1 i Ost1. A) La proteïna Alg5, no relacionada amb el complex, no interacciona amb Wbp1 i, per tant, no activa els gens *reporters*. B) La interacció entre Wbp1 i Ost1 reconstitueix la ubiquitina; les UBPs tallen a C-terminal i s'allibera el PLV que activa els gens *reporters* (extret de Stagljär *et al.*, 1998).

El plasmidi pRS305, que conté el cDNA del gen *WBP1P* fusionat a Cub-PLV, no té seqüències promotores per expressar les fusions. En treballar amb proteïnes de llevat els cDNAs es poden integrar en el genoma per recombinació homòloga i així, l'expressió de la fusió ve dirigida pel promotor endogen de la proteïna problema i se n'assegura la producció a nivells fisiològics. Si es força la sobreexpressió de les proteïnes de fusió amb Cub-PLV, les proteïnes poden difondre al nucli, encara que tinguin dominis transmembrana (Stagljär *et al.*, 1998). El plasmidi pRS305 serveix per obtenir el fragment Cub-PLV (vegeu materials), però, en canvi, no podem utilitzar la mateixa estratègia d'integració per expressar les nostres proteïnes de fusió, perquè els llevats no tenen presentilina i, a més, estem expressant una proteïna heteròloga. Per poder aplicar el sistema de *split-ubiquitin* cal, doncs, un plasmidi amb seqüències promotores de llevat.

Per tal d'expressar les fusions de presentilina amb Cub-PLV es va recórrer a un plasmidi d'expressió en llevat convencional, amb un origen de replicació del tipus 2 μ i el promotor de l'*ADH3* (vegeu materials). L'expressió de la proteïna de fusió NTF-Cub-PLV a partir d'aquest plasmidi (pSC-6, vegeu materials) a la soca L40 és capaç d'activar tota sola el gen seleccionable (*HIS3*) i el gen *reporter*, fet que ens feia sospitar, o bé que el fragment NTF en llevat no s'incorpora a la membrana, o bé que l'expressió a partir d'un plasmidi multicòpia amb un promotor constitutiu és excessiva i la proteïna produïda en escriu difonia al nucli. Com ja s'ha dit, no es podien aconseguir nivells d'expressió fisiològics i no es disposava de promotors més febles de llevat. És per això que es va optar per minimitzar el nombre de plasmidis d'expressió utilitzant un plasmidi amb seqüències centromèriques, —dels quals se'n poden trobar dos per cèl·lula com a màxim—, el plasmidi pSC-16 (vegeu materials). L'expressió a partir d'aquest plasmidi de la fusió NTF-Cub-PLV no activa els gens *reporters*, de manera que aquesta estratègia va permetre l'aplicació del sistema de *split-ubiquitin* per analitzar les interaccions de la presentilina. L'expressió de les proteïnes de fusió amb Nub es va realitzar a partir d'un plasmidi derivat del pRS314, també cedit pel doctor Igor Stagljär (vegeu materials).

Els dominis de la presentilina que es van expressar fusionats als pèptids corresponents són els que estan esquematitzats en la figura 4.

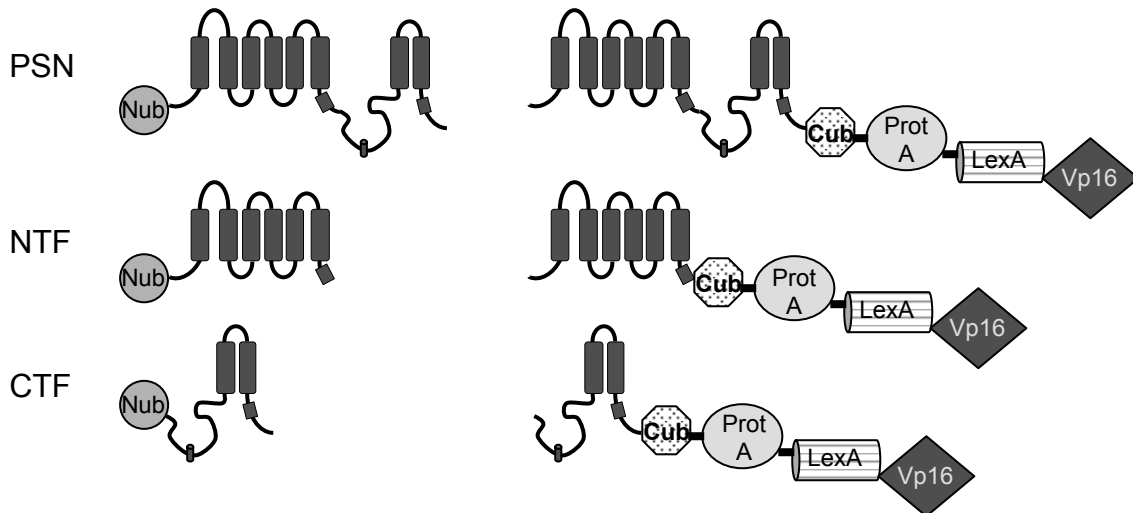


Figura 4. Esquema de les proteïnes de fusió expressades en el sistema de l'*split-ubiquitin*

També es va provar de posar a punt el sistema de l'*split-ubiquitin* en un sistema homòleg: les cèl·lules SL2 de *Drosophila*. Calia transfectar els plasmidis d'expressió amb les dues proteïnes de fusió i el gen *reporter* a la vegada, i esperar una elevada eficiència de cotransfecció. Es van realitzar les construccions pertinents utilitzant el factor de transcripció Gal4-Vp16, que es va fusionar a C-terminal del Cub. D'altra banda, es va obtenir un plasmidi *reporter* que contenia el gen *lacZ* sota el control de les seqüències UAS d'unió de Gal4. També calia transfectar alhora amb un quart plasmidi per a normalitzar les possibles diferències causades per l'eficiència de cadascuna de les transfeccions: en aquest cas, el plasmidi que expressa el gen de la luciferasa sota el control constitutiu del promotor CMV (citomegalovirus). El *cassette* d'expressió que es va utilitzar per les fusions dels fragments de presenilina és el de l'actina de *Drosophila* (promotor i terminador), un del més utilitzats per assolir elevats nivells d'expressió, contingut en el plasmidi pActPPA (vegeu materials). El plasmidi d'expressió, la fusió Gal4-Vp16 i el plasmidi CMV-luciferasa van ser amablement cedits pel doctor Alejandro Vaquero.

Els controls realitzats van indicar que es produïa el fenomen de difusió al nucli de l'excés de proteïna produïda ja observat en llevats, però aplicant temps d'expressió més curts, de 12 hores, es va aconseguir observar l'homodimerització dels NTFs com un increment en l'activitat β -galactosidasa que corresponia a x4 respecte de l'expressió de NTF-Cub-Gal4-Vp16 tot sol. En aquest cas, el resultat obtingut és directament quantitatiu, doncs només es té un gen *reporter*, la β -galactosidasa, l'activitat del qual es mesura en un assaig quimiluminiscent extremadament sensible. No es va provar la optimització d'aquest sistema en cèl·lules de *Drosophila* perquè calia realitzar noves construccions de les fusions de presenilina per posar-les sota control de promotors més febles, i perquè creïem que les eficiències de transfecció assolides eren molt baixes. Si considerem que cal l'entrada de 3 plasmidis en una mateixa cèl·lula per observar la interacció, segurament un percentatge molt petit de cèl·lules contenen els 3 plasmidis, i calia aconseguir un sistema molt més eficient per assegurar la cotransfecció dels 3 plasmidis.

2.3. Anàlisi dels dímers NTF i CTF

2.3.1. Anàlisi genètica

De la mateixa manera que en la tècnica del doble híbrid, es van transformar les proteïnes de fusió en la soca de llevat L40 i se'n va analitzar la capacitat de créixer en un medi sense histidina i la capacitat d'activar el *reporter lacZ* (figura 5).

Les combinacions NTF:Alg5 i CTF:Alg5 són controls negatius d'interacció, doncs Alg5 és una proteïna de llevat no relacionada que també s'ancora al reticle endoplasmàtic. D'altra banda, en aquestes combinacions, tant el NTF com el CTF estan fusionats a un factor de transcripció sencer (LexA-Vp16) amb capacitat d'activar els gens *reporters* si arriba al nucli. El resultat negatiu d'aquesta transformació ens està indicant, indirectament, que la fusió als fragments de la presenilina reté el factor de transcripció en algun compartiment subcel·lular, i n'impedeix la translocació al nucli. Aquest compartiment seria el reticle endoplasmàtic, on es localitza la presenilina.

Per totes les fusions amb Cub-PLV analitzades mitjançant l'*split-ubiquitin* (vegeu apartats 2.4., 3.2.3., 3.3. i 4.), es van realitzar els controls negatius d'interacció cotransformant amb NubG-Alg5, la qual no ha d'interaccionar amb la presenilina. També es van realitzar una sèrie de controls positius cotransformant amb NubI-Alg5. En tractar-se del fragment Nub silvestre, sempre que es trobi amb un Cub es podrà reconstituir la ubiquitina sense necessitat de cap interacció, fet que ens estarà indicant l'expressió de la fusió amb Cub-PLV així com la correcta localització del fragment Cub-PLV al citoplasma, senyal que la proteïna de fusió ha adoptat la topologia esperada.

L'homodimerització de la presenilina com a holoproteïna també es produeix en aquest sistema, tot i que no s'ha representat en la figura 5.

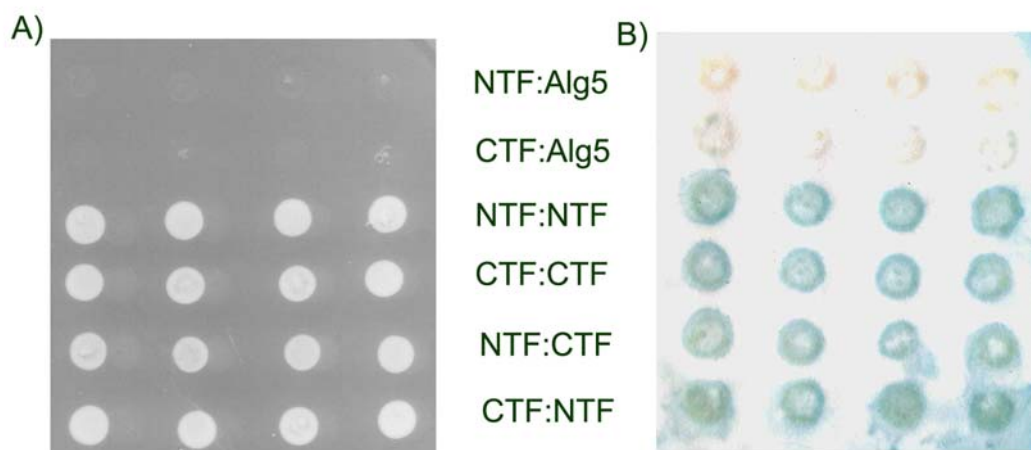


Figura 5. Anàlisi de les interaccions entre diferents dominis de la presenilina mitjançant el sistema de l'*split-ubiquitin*. A) Creixement en medi sense histidina i B) assaig X-gal en placa, dels llevats transformats amb les combinacions indicades. Les 4 rèpliques representen clons independents.

2.3.2. Anàlisi molecular

Tal com ja s'ha comentat, l'activació dels gens *reporters* és fruit del tall que allibera el factor de transcripció LexA-Vp16, fusionat a l'extrem carboxiterminal de la ubiquïtina, realitzat per les DUBs cel·lulars. Es va analitzar directament aquest tall sobre la proteïna de fusió a partir de l'extracte proteic (fraccions insoluble i soluble) dels llevats transformats que, després de ser separat en un SDS-PAGE, va ser immunodetectat amb un anticòs anti-protA (figura 6) (vegeu mètodes).

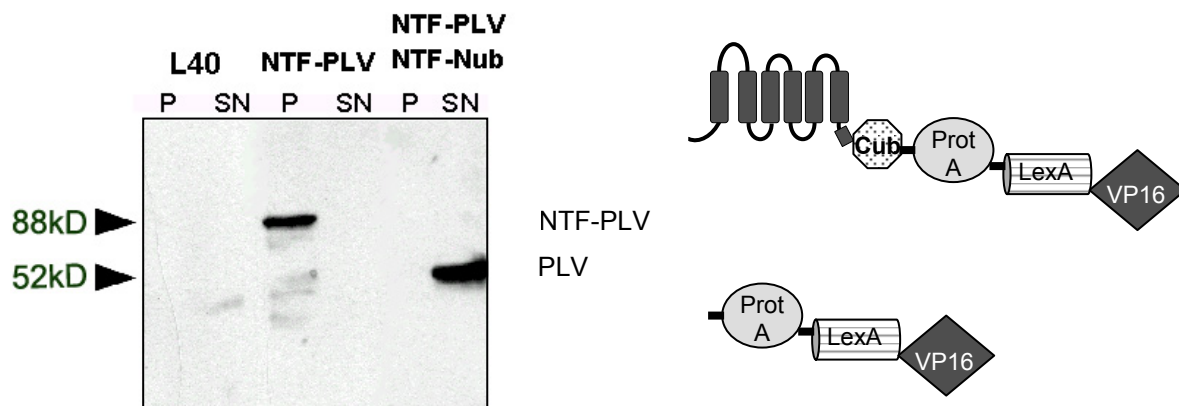


Figura 6. Immunodetecció de les fraccions insoluble (P) i soluble (SN) dels extractes proteics de llevat transformats amb les construccions indicades, amb un anticòs anti-protA. L40, control negatiu. Al costat, s'indiquen les proteïnes a les quals corresponen les bandes del *western blot*.

L'expressió de la proteïna de fusió NTF-Cub-PLV (plasmidi pSC-17, vegeu materials) produeix un senyal de la mida esperada (88 kD) per immunodetecció de la proteïna A. A més a més, aquesta proteïna, com és esperable si es localitza en la membrana del reticle endoplasmàtic, queda retenguda en la fracció insoluble de l'extracte total dels llevats. Així doncs, d'acord amb els resultats de l'anàlisi molecular i genètica, el fragment NTF de la presenilina, expressat com a proteïna de fusió, es localitza a un compartiment subcel·lular insoluble. La coexpressió de la proteïna de fusió NTF-Nub (plasmidi pSC-14, vegeu materials) i de NTF-Cub-PLV genera la desaparició del senyal de la fracció insoluble. La interacció de les dues proteïnes per l'homodimerització dels NTFs reconstitueix la ubiquïtina, que és reconeguda per les DUBs cel·lulars, que permet l'alliberació del fragment de la proteïna de fusió situat a C-terminal de la ubiquïtina i que correspon a protA-LexA-VP16. Aquest fragment, detectat amb un anticòs anti-protA, produeix un senyal de la mida corresponent al fragment protA-LexA-VP16 (PLV) (53 kD) a la fracció soluble. En conjunt, els resultats obtinguts amb el sistema de l'*split-ubiquitin* confirmen els obtinguts per doble híbrid: els fragments NTF i CTF formen homodímers.

2.4. Contribució dels dominis transmembrana en la formació dels homodímers NTF i CTF

Mitjançant el sistema del doble híbrid no s'ha identificat un domini clarament implicat en la formació de l'heterodímer NTF:CTF i de l'homodímer CTF:CTF. Pel que fa a l'homodímer NTF:NTF sembla que l'HL1 participa en la interacció. Fins ara, només s'havien assajat els dominis que no tenen regions transmembrana, de manera que manca analitzar la contribució

dels dominis transmembrana en la formació del tetràmer, ja que els dos fragments de presenilina presenten dominis transmembrana que podrien estar participant en les interaccions. L'estudi de la contribució d'aquestes regions en la formació dels homodímers i de l'heterodímer es va realitzar expressant diverses construccions de presenilina a les quals s'havia deletat les regions hidrofíliques i algunes regions transmembrana com a proteïnes de fusió per *split-ubiquitin* (taula 5).

Taula 5. Anàlisi d'interaccions proteïna-proteïna pel creixement en medi sense histidina dels llevats transformats amb les construccions d'*split-ubiquitin* indicades

<i>Nub (a N-terminal)</i>	<i>Cub-PLV (a C-terminal)</i>	Creixement -His
NTF	NTF	++
TM 1-6	NTF	++
TM 1-4	NTF	++
TM 3-6	NTF	++
Δ TM 3-4	NTF	++
CTF	CTF	++
TM 7-8	CTF	++
CTFΔ <i>loop6</i>	CTF	+

La deleció de diferents regions, tant de les hidrofíliques com de diverses regions transmembrana, no impedeix la interacció. No es pot descartar, però, que algunes interaccions estiguin alterades, doncs el creixement en medi selectiu dels llevats no és una mesura quantitativa. Així doncs, amb els resultats d'aquesta anàlisi, tampoc no es pot determinar exactament quins dominis són imprescindibles en aquestes interaccions. Malgrat tot, ens indiquen quins dominis són suficients: l'homodímer CTF:CTF es manté, tot i deletar les seqüències adjacents als dominis transmembranes VII i VIII, fet que ens indica que la interacció CTF:CTF es produeix probablement a través d'aquests dominis i que explica els resultats negatius obtinguts de la dissecció del CTF, en la qual només es va considerar la contribució dels dominis hidrofílics (taula 4). Pel que fa a les interaccions NTF:NTF, el fet que la deleció de les regions *N-loop* i *Mas* no impedeixi la interacció, ni tampoc la deleció dels transmembranes I i II, indica que la interacció no es produeix a través de les regions hidrofíliques més rellevants, o

almenys, no de forma única, ja que sabem que els HL1 interaccionen. La resta de les deleccions dels dominis transmembrana tampoc no impedeix la interacció NTF:NTF, i indica que cap dels dominis transmembrana del NTF és imprescindible per a la formació de l'homodímer. Així doncs, la conclusió que s'extreu d'aquesta anàlisi és que tots els dominis transmembrana podrien estar contribuint d'alguna manera a la formació i l'estabilitat del tetràmer de presenilina. Mitjançant l'*split-ubiquitin*, s'ha pogut determinar el rol de les regions transmembrana de la presenilina en les interaccions intramoleculares, i s'ha pogut excloure un efecte inespecífic de la seva naturalesa hidrofòbica, com es podria postular en el sistema del doble-híbrid.

De la mateixa manera que altres proteïnes politòpiques, la disposició entre les diferents regions transmembrana i, per tant, l'estructura del tetràmer de presenilina no és a l'atzar, sinó que segurament existeix una relació estructura-funció parcialment determinada per les interaccions intramoleculares de la presenilina. A tall d'exemple, en el cas dels connexons que formen les *gap junctions*, les interaccions entre els connexons de dues cèl·lules per formar un canal ve determinat per interaccions entre els *loops* hidrofílics situats entre les regions transmembrana. Aquests canals estan formats per dos anells concèntrics amb un total de 24 regions transmembrana, quatre regions per molècula de connexina (Rabionet, 2002). Aquesta disposició tan regulada podria estar determinada per interaccions proteïna-proteïna intramoleculares o intermoleculares entre les regions transmembranes.

En aquest estudi per *split-ubiquitin* no es va realitzar l'experiment X-gal en placa per observar l'expressió de lacZ perquè, en aquest cas, l'expressió de *HIS3* i de lacZ no depèn de que la interacció analitzada permeti la reconstitució d'un factor de transcripció, sinó de que aquesta interacció permeti l'alliberament del factor, i permeti la seva correcta localització subcel·lular. D'aquesta manera, si es produeix l'activació d'un *reporter*, també s'activarà l'altre.

3. ESTUDI DE LA DIMERITZACIÓ DEL LOOP HIDROFÍLIC HL1

Els resultats de la dissecció de l'homodímer NTF:NTF (taula 3) suggereixen que el *loop* hidrofílic entre els transmembranes I i II (HL1) té algun paper en aquesta interacció, encara que no és l'única interacció entre els NTFs, ja que, si es suprimeix, no impedeix l'homodimerització NTF:NTF (taula 5). L'HL1 és força més gran que la resta de *loops* que connecten dos dominis transmembrana, exceptuant l'HL6 (gran *loop* citosòlic), amb 32 aminoàcids enfront als aproximadament 9 aminoàcids que tenen la resta de *loops* i, a més a més, està encarat cap a la llum del reticle endoplasmàtic. Per tots aquests motius, es va creure interessant caracteritzar aquesta interacció i aprofundir en el seu rol en la formació de l'homodímer.

3.1. L'HL1 dimeritza *in vitro* en un experiment de GST pull-down

Abans de realitzar un estudi en profunditat de la interacció HL1:HL1, es va voler confirmar aquesta interacció mitjançant un mètode independent. Aquest cop, es va triar un mètode *in vitro* anomenat GST pull-down, que no és més que una cromatografia d'afinitat. Per

poder realitzar aquest experiment calia expressar prèviament les proteïnes de fusió adients. Un dels HL1 es va fusionar a la GST (glutatió-S-transferasa) (GST-HL1), que possibilita la unió a una matriu de glutatió sefarosa, imprescindible en un assaig de GST *pull-down*. L'altre pèptid es va obtenir a partir de la purificació i del tall amb trombina de la proteïna de fusió GST-HA-HL1, per obtenir el pèptid HA-HL1. La incorporació de l'epítot HA a l'extrem aminoterminal de l'HL1 permet la seva immunodetecció, ja que no es disposa d'anticossos contra l'HL1.

3.1.1. Expressió en *E.coli* del loop hidrofílic HL1.

Es va triar l'expressió en un sistema heteròleg, *E.coli*, per obtenir els pèptids per dur a terme l'assaig d'interacció *in vitro*. L'expressió de les proteïnes de fusió amb la GST (Glutatió-S-transferasa), GST-HL1 i GST-HA-HL1, en la soca d'*E.coli* BL21 prèviament transformada amb els plasmidis corresponents, va ser induïda amb IPTG. Es va analitzar la presència de les proteïnes a la fracció soluble, doncs sovint, les proteïnes exògenes expressades en *E.coli* formen cossos d'inclusió insolubles (figura 7).

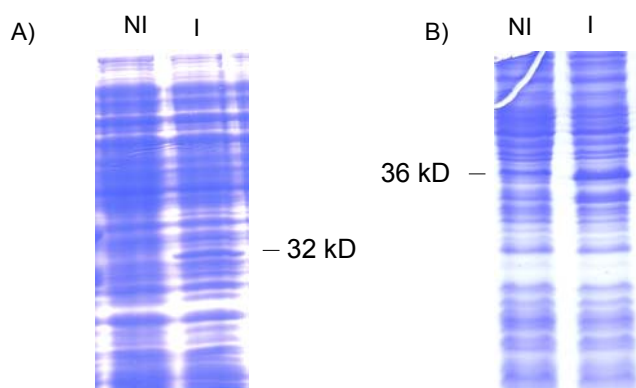


Figura 7. Fracció soluble dels extractes totals d'*E.coli* induïts (I) i no induïts (NI) per expressar A) GST-HL1 i B) GST-HA-HL1

Per tal de poder realitzar el *pull-down* calia purificar el pèptid HA-HL1, amb l'epítot de l'hemaglutinina, que permet la immunodetecció i el diferencia de GST-HL1 unit a la matriu de glutatió sefarosa. Entre la seqüència codificant per la GST i la fusió, es troba una petita seqüència d'aminoàcids que correspon a la diana de tall de la proteasa trombina (vegeu materials). La poca quantitat de proteïna de fusió present en la fracció soluble de l'extracte d'*E.coli*, va ser suficient per obtenir una petita quantitat d'HA-HL1, purificada a partir de GST-HA-HL1 mitjançant proteòlisi amb trombina (figura 8).

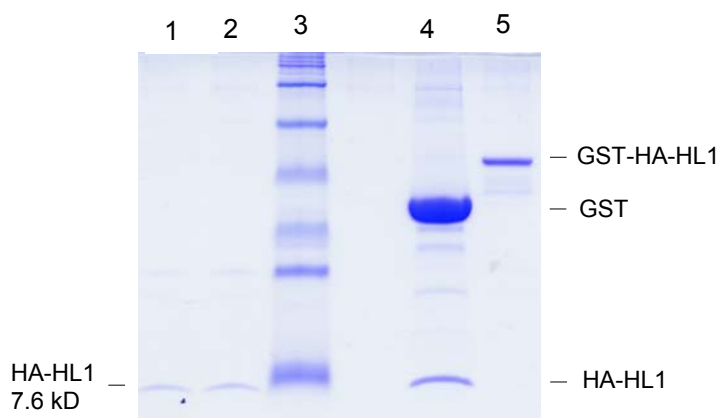


Figura 8. 20% tris-tricina SDS-PAGE tenyit amb blau de Coomassie, on es mostra el resultat dels diferents passos de la purificació d'HA-HL1. 1 i 2) sobrenedant després de la proteòlisi amb trombina amb HA-HL1, 3) marcador de pes molecular, 4) resultat total de la proteòlisi amb trombina on es veu HA-HL1 i la part restant de GST, 5) GST-HA-HL1 purificat abans de la proteòlisi amb trombina

3.1.2. GST pull-down

Aquesta tècnica de purificació per cromatografia d'afinitat ens va permetre confirmar que la proteïna GST-HL1, unida a la matriu de glutatió sefarosa, és capaç de retenir el fragment purificat HA-HL1, fet que indica la capacitat d'interacció *in vitro* de l'HL1 amb sí mateix. La proteïna GST sola, en canvi, no reté l'HA-HL1 i demostra així que és una interacció específica (figura 9).

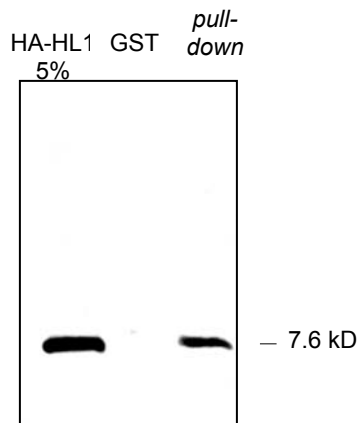


Figura 9. Immunodetecció amb un anticòs anti-HA de la proteïna HA-HL1 purificada (un 5% del que es va utilitzar pel *pull-down*, control + de mida i d'immunodetecció) i de les proteïnes retingudes en el GST *pull-down* amb GST (control -) i GST-HL1

3.2. Les mutacions d'Alzheimer de l'HL1 alteren la seva capacitat d'homodimerització

Les mutacions causants d'Alzheimer es troben distribuïdes per tota la proteïna, tal com es pot observar en la figura 10 de la introducció. Tot i així, hi ha algunes regions que tenen una densitat més elevada de mutacions, com per exemple l'HL1. Malgrat ser força curt (de 32 a 35 aminoàcids, depenent de la predicció) si el comparem amb l'*N-loop* (81 aminoàcids), el *C-loop* (40 aminoàcids) i l'HL6 més la regió Mas (115 aminoàcids), presenta 10 mutacions puntuals que afecten 7 residus i la mutació $\Delta 4$ a *PS1*; i dues mutacions a *PS2* (del total de 8 mutacions FAD de *PS2*), assenyalades en la figura 10. A més a més, és la regió hidrofílica que presenta una conservació de seqüència més elevada, indicatiu de que ha estat sotmesa a una pressió de selecció per constrenyiment funcional. Aquestes dades ens van fer preguntar si l'efecte de les mutacions en la patologia de la malaltia d'Alzheimer podria estar mitjançat per una alteració en la dimerització de l'HL1. Aquesta hipòtesi implica que la correcta homodimerització de l'HL1 és important per l'especificitat de tall del complex presenilina- γ -secretasa. 6 dels 7 residus afectats per les mutacions causants d'Alzheimer de l'HL1 corresponen a posicions conservades a *Drosophila*, fet esperable tenint en compte l'elevada conservació d'aquesta regió. En el moment que es va realitzar aquesta part del treball, només es coneixien 6 de les 10 mutacions puntuals, assenyalades en el context de l'HL1 de la figura 10 en color taronja.

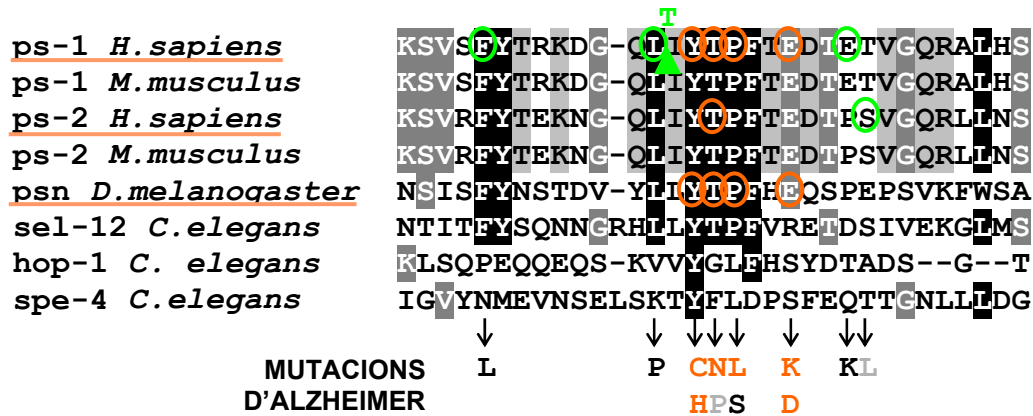


Figura 10. Alineament de la regió corresponent l'HL1 de les presenilines més representatives. En taronja, mutacions conegudes en el moment de fer el treball i la seva conservació en *Drosophila*. En verd, es presenten altres residus que contenen mutacions, descrits posteriorment a realitzar aquesta anàlisi. El triangle representa la inserció de la treonina deguda a la mutació Δ4. En gris, mutacions a PS2.

Unes mutacions que causen un efecte que es manifesta en una edat relativament avançada —tot i tractar-se d'Alzheimer presenil—, haurien de tenir un efecte molt lleu sobre les funcions de la presenilina i, consegüentment, segons els nostres resultats, sobre la interacció que provem d'observar, en funció del tipus de canvi. Per intentar assignar quin és l'efecte de les mutacions d'Alzheimer sobre la capacitat d'interacció entre HL1 i HL1 de diferents presenilines i, per tant, sobre la possible estabilitat i/o funció del complex γ-secretasa, es van introduir els mateixos residus mutats en casos de FAD, en la presenilina de *Drosophila* per mutagènesi dirigida. A més a més, per tal d'esbrinar el grau de conservació de les substitucions causants d'Alzheimer, es van consultar les matrius de semblances d'aminoàcids i es va observar que les mutacions causants d'Alzheimer de l'HL1 són força conservatives. És per això que també es van introduir, en les posicions Y138 i E143 —numeració corresponent a la presenilina de *Drosophila*—, residus que presentessin un canvi menys conservatiu. Aquests canvis són Y138P i E143W (figura 11).

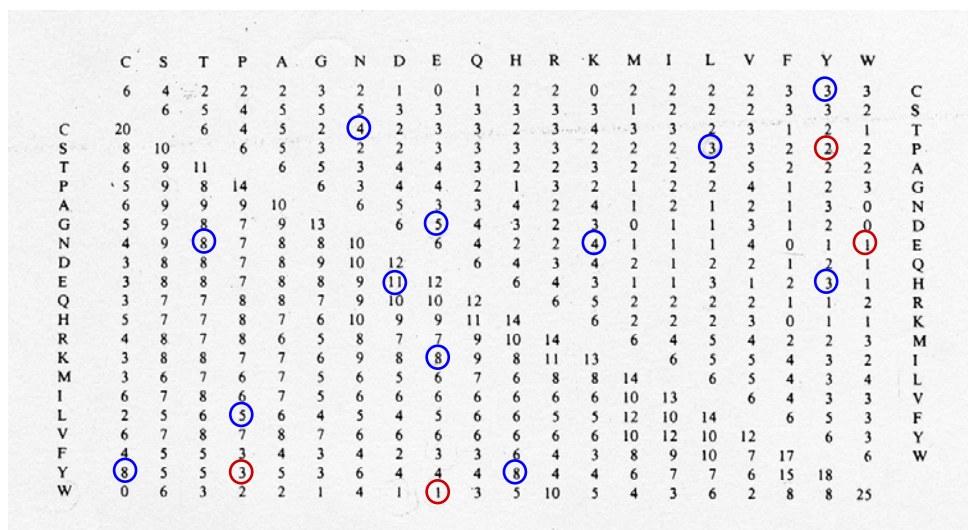


Figura 11. Matrius de semblances d'aminoàcids a partir de criteris diferents. La de dalt a la dreta, segons l'estructura i la interconvertibilitat genètica, i la de l'esquerra, segons els canvis d'aminoàcid entre espècies molt properes. La conservació i el valor assignat en la matriu són inversament proporcionals. Mutacions d'Alzheimer, blau; mutacions menys conservatives, vermell (extret de Doolittle, 1986).

Aquestes mutacions van ser introduïdes per mutagènesi dirigida en les construccions HL1-pAS i HL1-pACT, ja utilitzades en l’anàlisi de doble híbrid (vegeu materials) i transformades en llevat per quantificar-ne la interacció. D’altra banda, es va fer una predicció *in silico* del seu possible efecte modificador de l’estructura secundària de l’HL1.

3.2.1. Les mutacions d’Alzheimer de l’HL1 i el seu possible efecte en l’estructura secundària

Pel que fa a la predicció *in silico* dels canvis en l’estructura secundària del *loop*, es van utilitzar diferents programes accessibles per xarxa i es va obtenir una estructura secundària consens d’entre tots els programes utilitzats. Sembla que l’HL1 té una estructura secundària formada per regions de *random coil* (c) i d’*extended strand* (e). Les mutacions FAD i les mutacions menys conservatives alteren aquesta estructura secundària en diferent grau, des de cap alteració (ED, EK, EW, YC, YH) a alteracions que afecten diversos residus (PL) (figura 12 A). La predicció de l’estructura secundària en el context de les dues regions transmembrana adjacents, genera una estructura secundària de l’HL1 diferent, perquè la localització de les regions de *random coil* i de *extended strand* es troba desplaçada (figura 12 B). Però les alteracions causades per les mutacions FAD en l’estructura secundària són, igualment, molt lleugeres. A més a més, es va provar de detectar algun possible motiu en el *loop* implicat en interaccions proteïna-proteïna, però no se’n va trobar cap.

A)

wt	NSISFYNSTDVYLLYTPFHEQSPEPSVKFWSA
	cccccccccccccccccccccccccccccccccccc
ED	cccccccccccccccccccccccccccccccccccc
EK	cccccccccccccccccccccccccccccccccccc
EW	cccccccccccccccccccccccccccccccccccc
YC	cccccccccccccccccccccccccccccccccccc
YH	cccccccccccccccccccccccccccccccccccc
YP	cccccccccccccccccccccccccccccccccccc
TN	cccccccccccccccccccccccccccccccccccc
PL	cccccccccccccccccccccccccccccccccccc

Figura 12. Predicció *in silico* de l’estructura secundària del (A) HL1 i (B) regió TMI, HL1 i TMII; silvestre i amb les mutacions que es van analitzar per doble híbrid. La seqüència subratllada a B) correspon a l’HL1. e, *extended strand*; c, *random coil*; h, α -hèlix.

B)

wt	VIKLFVPVSLCMLLVVATINSISFYNSTDVYLLYTPFHEQSPEPSVKFWSALANSLILMSVVVMTFLLIVL
	c?eee?chhhhhh eeeehhcc ?eeeeccccccccccccccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhh?hhhhheee
ED	c?eee?chhhhhh eeeehhcc ?eeeeccccccccccccccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhh?hhhhheee
EK	c?eeee chhhhhh eee?hhcc?eeeeccccccccccccccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhh?hhhhheee
EW	c?eeee chhhhhh eee?hhcc?eeeeccccccccccccccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhh?hhhhheee
YC	c?eee?chhhhhh eeeehhcc ?eeeeccccccccccccccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhh?hhhhheee
YH	c?eee?chhhhhh eeeehhcc ?eeeeccccccccccccccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhh?hhhhheee
YP	c?eee?chhhhhh eeeehhcc eeeeccccccccccccccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhh?hhhhheee
TN	c?eee?chhhhhh eeeehhcc ?eeeeccccccccccccccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhh?hhhhheee
PL	c?eee?chhhhhh eee ?hhcc?eeeeccccccccccccccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhh?hhhhheee

Si les mutacions d’Alzheimer no estan alterant l’estructura secundària de l’HL1, i aquest no presenta motius d’interacció proteïna-proteïna coneguts, es podria pensar que els possibles efectes de les mutacions FAD en l’homodimerització de l’HL1 són específics d’aminoàcid.

3.2.2. Anàlisi per doble híbrid dels efectes de les mutacions en la interacció HL1:HL1

Com ja s'ha esmentat, es van introduir les mutacions per mutagènesi dirigida en els corresponents residus de l'HL1 de la presenilina de *Drosophila* i es va analitzar el seu efecte sobre la interacció HL1:HL1, mitjançant la quantificació de l'activitat del gen *reporter* β -galactosidasa. En el sistema del doble híbrid, es va fer l'anàlisi sobre les mutacions en combinacions que mimetitzen una situació d'heterozigosi, així com també d'homozigosi (figura 13).

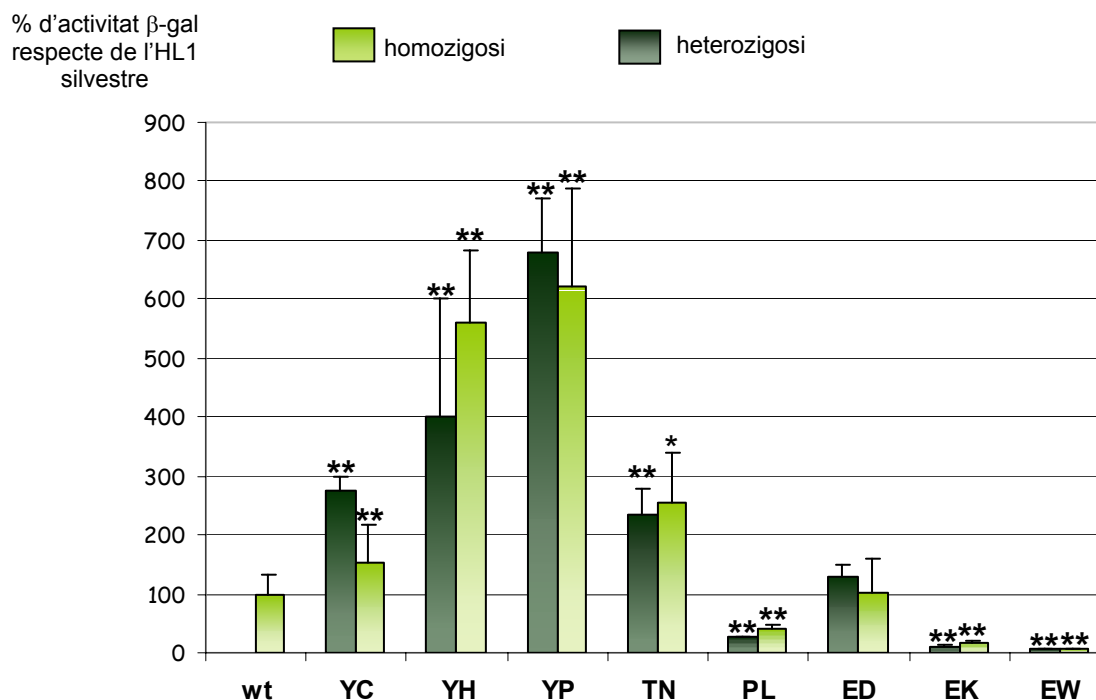


Figura 13. Quantificació de les interaccions indicades respecte de la interacció HL1wt:HL1wt. Segons el test U de Mann-Whitney, les interaccions són significatives amb ** $P < 0.01$ i * $P < 0.05$. Es van analitzar un mínim de 5 clons independents per cadascuna de les combinacions.

La quantificació de l'activitat β -galactosidasa ens dóna una idea de la quantitat de factor de transcripció Gal4 reconstituït present a la cèl·lula i, per tant, ens indica indirectament l'estabilitat de la interacció entre les proteïnes fusionades als dos subdominis, activador i d'unió al DNA, de Gal4. Els resultats suggereixen que només la modificació d'un HL1 ja és suficient per alterar la interacció i que totes les mutacions, excepte la E143D, produeixen un efecte significatiu en la interacció. Aquest efecte, però, no és en el mateix sentit en tots els casos sinó que en funció de la mutació, es produeix un increment o una disminució en l'activació de lac Z, és a dir, un increment o una disminució en la interacció, respectivament. El fet que les alteracions en l'estructura secundària produïdes per aquestes mutacions siguin molt minses en la majoria dels casos (figura 12), però que, en canvi, produeixen modificacions en les interaccions, suggereix que, tal com ja s'ha apuntat anteriorment, la interacció podria venir mitjançada per l'especificitat d'aminoàcid i no per l'estructura secundària i, consegüentment, tampoc per la conformació de tot l'HL1.

3.2.3. La mutació E143K en l'homodímer NTF:NTF

El fet d'expressar l'HL1 sol, en forma soluble, podria estar alterant els efectes de les mutacions en la interacció, ja que l'expressió de l'HL1 fusionat només als dominis corresponents de Gal4 de forma lliure sense seqüències hidrofòbiques adjacents, permetria que pogués adoptar diferents conformacions no necessàriament fisiològiques, amb diferents capacitats d'interacció. L'expressió de l'HL1 en el seu context, entre dos dominis transmembrana, en canvi, restringeix el nombre de conformacions possibles. D'altra banda, ja s'ha vist que la interacció de l'HL1 no és imprescindible per a la interacció NTF:NTF, però no s'ha analitzat si alteracions en la interacció HL1:HL1 afecten l'homodimerització NTF:NTF. Per saber del cert l'efecte de les mutacions d'Alzheimer en la interacció del NTF:NTF, es va analitzar l'efecte de la mutació E143K en heterozigosi (Nub-NTF_{EK}:NTF-Cub-PLV) en el sistema de l'*split-ubiquitin*. Pel que fa a la quantificació de l'activitat β -galactosidasa, es va observar una alteració més lleu que en el sistema del doble híbrid, ja que només disminueix un 80% d'activitat respecte de la combinació silvestre (figura 14).

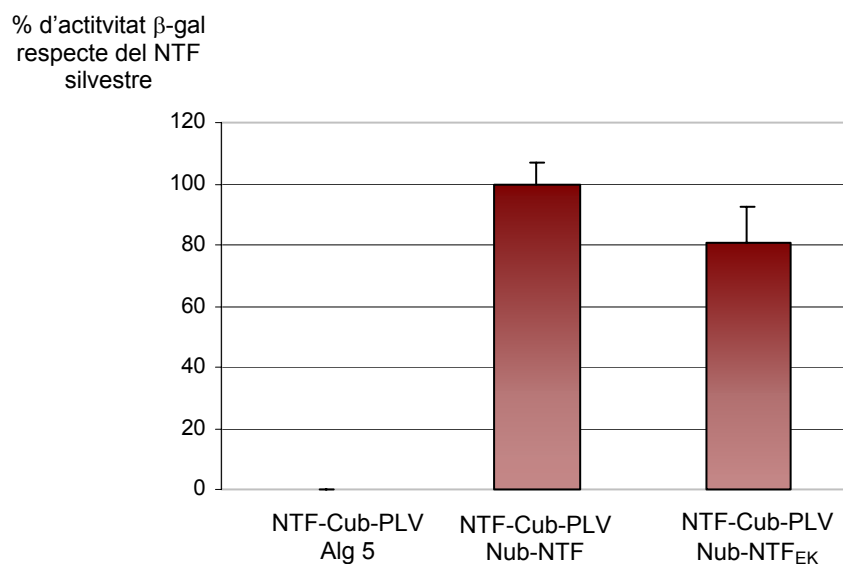


Figura 14. Quantificació de l'activitat β -gal de les combinacions indicades emprant el sistema de l'*split-ubiquitin*. Es van analitzar 5 clons per cadascuna de les combinacions indicades.

En aquesta figura no s'ha indicat que la diferència del 20% entre la interacció NTF:NTF i NTF:NTF_{EK} sigui significativa, perquè un dels cinc clons analitzats dona un valor que fa canviar el valor de la P del test de Mann-whitney de 0.005 a 0.073, i fa perdre la significació a aquesta diferència. S'observa una tendència clara a disminuir la interacció, però caldria incrementar el nombre de rèpliques per assegurar-ne la significació.

Tal com s'havia realitzat en la posta a punt del sistema de l'*split-ubiquitin*, es va realitzar una anàlisi molecular a partir de l'extracte proteic dels llevats transformats amb les construccions anteriors, mitjançant la immunodetecció amb un anticòs anti-protA (figura 15).

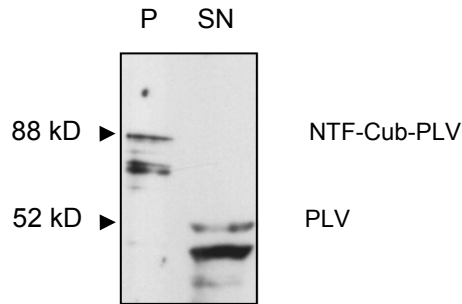


Figura 15. Immunodetecció, amb un anticòs anti-protA de les fraccions insoluble (P) i soluble (SN) dels llevats transformats amb les construccions NTF-Cub-PLV (pSC-17) i Nub-NTF_{EK} (pSC-15). Les bandes inferiors són productes de degradació.

Tot i que les condicions en les quals es van realitzar els extractes proteics i el *western blot* no són quantitatives, s'observa una proporció de la proteïna de fusió NTF-Cub-PLV que no ha estat tallada per les DUBs cel·lulars, i que no s'observava si es coexpressava la proteïna de fusió NTF-Cub-PLV (pSC-17), amb Nub-NTF silvestres (pSC-14) (vegeu figura 6). Aquest romanent d'holoproteïna NTF-Cub-PLV indicaria una disminució en la reconstitució de la ubiquïtina i, per tant, en la interacció. L'anàlisi molecular corroboraria aquesta tendència a disminuir la interacció causada per la mutació E143K en el context de l'homodímer NTF:NTF (figura 14).

3.3. Anàlisi de la deleció de l'HL1 mitjançant el sistema de l'*split-ubiquitin*

La formació de l'homodímer HL1, caracteritzat per doble híbrid, no és el responsable únic de la interacció NTF:NTF, ja que la deleció de la regió compresa entre les regions *N-loop* i TMII, que conté l'HL1, no impedeix la formació de l'homodímer (Taula 5, construcció TM 3-6). Malgrat tot, l'anàlisi de deleccions realitzat mitjançant l'*split-ubiquitin* és qualitatiu, de manera que no es pot descartar l'existència d'una alteració quantitativa significativa en l'homodímer NTF:NTF en aquest assaig. De fet, experiments d'altres grups donen suport a una alteració en l'estabilitat de la presenilina causada per la deleció d'aquesta mateixa regió (Δ TM1-2), que impedeix l'endoproteòlisi en cultius cel·lulars (Thinakaran 2002, comunicació personal). Es van dur a terme una sèrie de substitucions de l'HL1 en el sistema de l'*split-ubiquitin* per determinar si l'alteració de l'HL1 en el context de l'homodímer NTF:NTF i PSN:PSN produeix algun efecte significatiu.

3.3.1. Substitució de l'HL1 per l'HL5 en el fragment NTF

Una primera aproximació per esbrinar de quina manera l'HL1 participa en l'homodímer NTF:NTF és la deleció única i exclusivament de l'HL1. Per unir els dominis transmembrana I i II, es va substituir l'HL1 delecionat pel loop hidrofílic 5 (HL5), situat entre els transmembranes V i VI, i encarat també cap al reticle endoplasmàtic, però de només 9 aminoàcids. Així, es va estudiar l'efecte de la substitució en el context del fragment NTF. Es va quantificar l'activitat β -galactosidasa de les combinacions tant en homozigosi com en heterozigosi (figura 16).

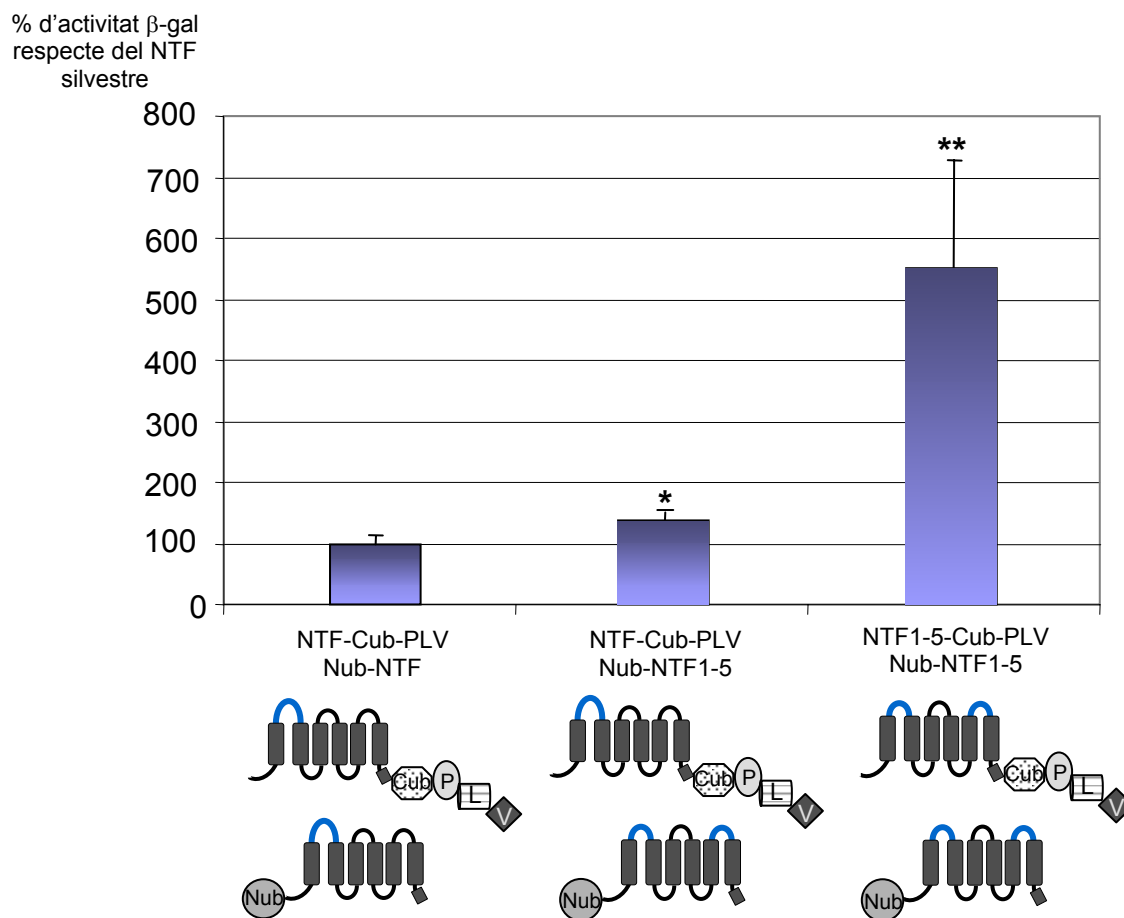


Figura 16. Quantificació de l'activitat β -galactosidasa en un experiment d'*split-ubiquitin* de les combinacions indicades. Segons el test U de Mann-Whitney les diferències són significatives amb ** $P < 0.01$ i * $P < 0.05$. Es van analitzar un mínim de 4 clons de cadascuna de les combinacions.

L'activitat β -galactosidasa de la interacció NTF1-5:NTF1-5 és 5 vegades l'activitat obtinguda en la interacció NTF:NTF, fet que suggereix una funció reguladora de l'HL1 en l'homodímer NTF:NTF. Si interpretem els resultats de l'inrevés, la presència de l'HL1 en el context de l'homodímer NTF:NTF disminuiria l'afinitat o la força de la interacció entre els dominis transmembrana o altres dominis responsables de l'homodimerització NTF:NTF. Així doncs, el rol de l'HL1 en l'homodímer seria, més que el de responsable de la interacció NTF:NTF, el de regular les interaccions entre els dominis transmembrana i, consegüentment, el correcte posicionament del dominis transmembrana, entre ells, dins de la membrana. Aquest resultat estaria d'acord amb què dos NTFs podrien interaccionar bàsicament per les regions transmembranes (taula 5). El fet que en la combinació en heterozigosi (NTFwt:NTF1-5) l'activitat β -galactosidasa no incrementi tant com la combinació en homozigosi (NTF1-5:NTF1-5) suggereix que la presència d'un sol HL1 en el context de l'homodímer NTF:NTF és suficient per mantenir la interacció entre els transmembranes dels dos NTFs.

3.3.2. Substitució de l'HL1 per l'HL5 en la presenilina

La substitució de l'HL1 per l'HL5 es va analitzar també en el context de la presenilina sencera que interacciona en el sistema de l'*split-ubiquitin* (vegeu l'apartat 2.3.1.).

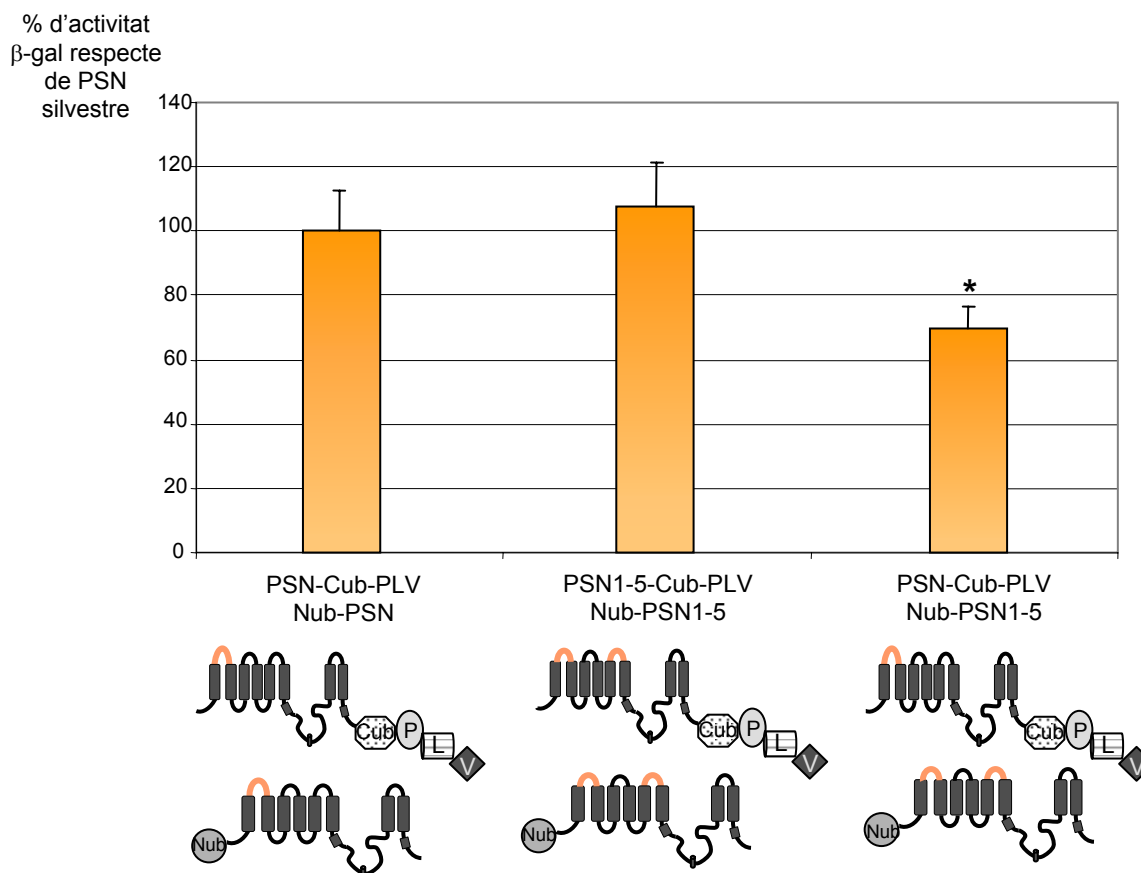


Figura 17. Quantificació de l'activitat β -gal en un experiment d'*split-ubiquitin* de les combinacions indicades. Segons el test U de Mann-Whitney, les interaccions són significatives amb $*P < 0.05$. Es van analitzar un mínim de 4 rèpliques per cadascuna de les combinacions.

La substitució de l'HL1 per l'HL5 en el context de la presenilina sencera i en homozigosi no té cap efecte sobre la interacció, que es manté igual (figura 17). Aquest resultat és diferent a l'observat en el context del NTF (figura 16), ja que no es detecta l'efecte d'increment de la interacció. Es podria esperar *a priori* per a la combinació PSN1-5/PSN1-5, el mateix efecte d'increment de la interacció tot i que el context en el qual s'està analitzant és diferent. S'ha de considerar que en aquest experiment s'està quantificant l'activitat β -galactosidasa produïda per un factor de transcripció fusionat a C-terminal de la presenilina, al fragment CTF, lluny d'on s'ha introduït la mutació. Atès que el fragment CTF també està formant homodímers, pot ser que les interaccions entre les regions transmembranes del CTF estiguin emmascarant l'efecte sobre la regió NTF en la combinació PSN1-5/PSN1-5. Cal considerar també que, dins de la presenilina, les regions NTF i CTF també interaccionen i formen heterodímers, i que, fisiològicament, les interaccions del NTF:NTF i del CTF:CTF podrien ser independents, doncs la presenilina activa no es troba com a holoproteïna.

Pel que fa a la disminució de la interacció de la combinació en heterozigosi, no es pot descartar que la manca d'un sol HL1 en la formació del tetràmer de presenilina (homodímers NTF:NTF i CTF:CTF i heterodímer NTF:CTF) sí que es tradueixi en la desestabilització global de la interacció entre dues presenilines i, per això, es detecti menys activitat β -galactosidasa. Si tenim en compte aquestes consideracions, queda clar que els efectes d'aquesta substitució en les interaccions NTF:NTF i PSN:PSN no són extrapolables ni comparables, ja que es tracta de dos contextos molt diferents en els quals intervenen diverses interaccions.

En l'*split-ubiquitin*, un increment en l'activitat β -galactosidasa indicaria més reconstitució de la ubiquitina i, per tant, un nombre d'interaccions més elevat. Cal considerar també que el fet que hi hagi més reconstitució de la ubiquitina no depèn només de l'afinitat entre les dues proteïnes que han d'interaccionar, sinó que també depèn de l'expressió i de l'estabilitat de les proteïnes de fusió que han d'interaccionar.

Per poder interpretar els resultats d'aquests experiments quantitius en un context tan complex com el de la presenilina, en la qual intervenen multitud d'interaccions, cal tenir en compte altres consideracions, a banda de les ja esmentades. Els efectes observats en els experiments de doble híbrid i en els experiments de substitució de l'HL1 obren moltes preguntes sobre el mecanisme mitjançant el qual la deleció de l'HL1 sembla alterar l'homodímer NTF:NTF. D'una banda, els resultats de la mutació EK per *split-ubiquitin* (figura 14) i de la resta de mutacions per doble híbrid (figura 13) indiquen que es tracta d'un efecte específic de seqüència d'aminoàcids, que depèn de la interacció HL1:HL1. D'altra banda, la presència d'una regió hidrofílica relativament gran entre els NTFs (l'HL1 o l'homodímer HL1:HL1) podria suposar, independentment de la seqüència primària, un impediment en la interacció o aproximació entre els dominis transmembrana, de forma que permetés col·locar els dos NTFs correctament, tal com suggereix la quantificació de la interacció NTFwt:NTF1-5 (figura 16). Les característiques de l'HL1, com ara la conservació d'aquesta regió al llarg de l'evolució, així com l'elevada concentració de mutacions causants d'Alzheimer que presenta, indicarien que la funció de l'HL1 depèn de la seqüència d'aminoàcids més que d'un efecte de restricció espacial, únicament. Però les darreres dades esmentades (figura 16) indiquen que un sol HL1 podria exercir un efecte de restricció espacial suficient per, si més no, mantenir la interacció entre les regions transmembranes. Així doncs, l'HL1 podria tenir dues funcions, compatibles entre elles i molt relacionades. Una d'elles suposaria la regulació, per un efecte estructural, de les interaccions entre les regions transmembranes potser per mantenir l'estabilitat del tetràmer (vegeu el capítol III), i l'altra funció, seria exercida per l'homodímer HL1:HL1 que podria regular i/o fixar finament la col·locació del tetràmer de presenilina perquè pugui realitzar les seves funcions amb precisió —talls presenilinas i γ -secretasa—. El rol del HL1 en el context del complex presenilina- γ -secretasa és àmpliament discutit en la discussió general.

4. EL MOTIU PALP EN LA FORMACIÓ DELS DÍMERS CTF:CTF I NTF:CTF

A l'extrem C-terminal, després del transmembrana VIII, en el que s'ha anomenat *C-loop*, es troba una altra regió hidrofòbica dins de la qual es localitza un motiu de quatre aminoàcids molt conservat, el motiu PALP (figura 18). Aquest motiu es manté fins i tot en les presenilines més divergents, *hop-1* i *spe-4* de *C.elegans*, i també en la família d'homòlegs de presenilina (PSH).

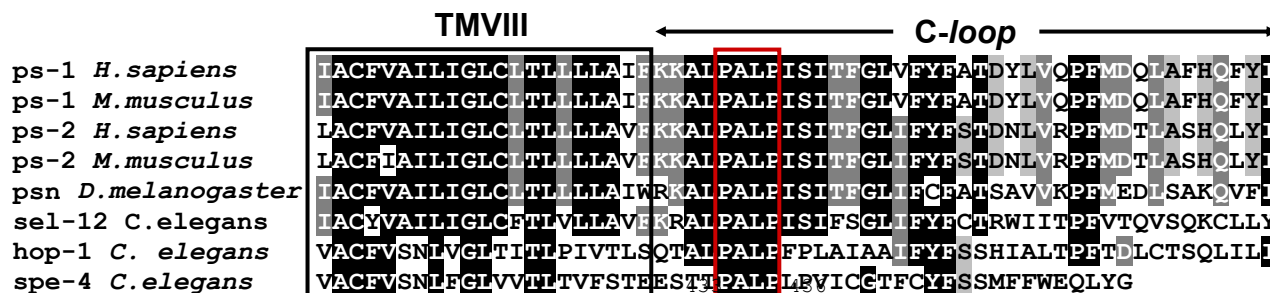


Figura 18. Localització del motiu conservat PALP en el context de la presenilina.

S'han generat diverses mutacions dirigides en el motiu PALP. La substitució de la primera de les prolines per una leucina (P433L) desestabilitza completament la presenilina, que no s'endoproteolitza i té una vida mitja molt curta. Com a conseqüència, no es produeix el tall γ -secretasa de la β APP ni de Notch. Es tracta doncs, d'una mutació de pèrdua de funció (Tomita *et al.*, 2001) que, en *Drosophila*, correspon a la mutació P507L i és letal en l'estadi de pupa (Guo *et al.*, 1999). Altres mutacions que afecten aquest motiu com la A434D i la L435R tenen el mateix efecte (Wang *et al.*, 2002). En aquest motiu, es troben també mutacions naturals causants d'Alzheimer i que, per tant, són mutacions de guany de funció, ja que es manté l'activitat γ -secretasa. El motiu PALP podria ser un tipus de motiu anomenat motiu de poliprolina que, en aquest cas, adoptaria una estructura de tipus II, i que, com altres motius d'aquest tipus, podria estar implicat en les interaccions proteïna-proteïna (Tomita *et al.*, 2001). D'aquesta manera, aquest motiu podria mediar les interaccions del *C-loop* amb altres proteïnes necessàries per a la seva estabilització.

Aquestes dades, en el context d'aquest treball, ens van fer pensar que potser aquest motiu seria important per alguna de les interaccions del CTF que havíem analitzat prèviament, com l'homodímer CTF:CTF o l'heterodímer NTF:CTF. El motiu PALP resideix al *C-loop* que, en l'anàlisi de les interaccions realitzat per doble híbrid, no sembla interaccionar amb cap altra regió de la presenilina (taula 4). Pel que fa al sistema de *l'split-ubiquitin* s'ha demostrat, en aquest treball, que la regió compresa entre els transmembranes VII i VIII i, per tant, que no inclou el *C-loop* és suficient perquè es produeixi l'homodímer CTF:CTF (Taula 5). L'expressió del *C-loop*, que conté una regió hidrofòbica, com a proteïna de fusió soluble al citoplasma i al nucli podria alterar la seva conformació —en el doble híbrid— i, per tant, impedir que adopti la seva conformació fisiològica. No es pot descartar doncs, que el *C-loop* pugui estar implicat en la interacció amb algun altre domini de la presenilina, de l'NTF o del CTF, i que exerceixi alguna modulació de les interaccions intramoleculares que s'han descrit en aquest capítol.

Les mutacions del motiu PALP descrites en el moment d'iniciar aquest treball i que havien estat estudiades per Tomita *et al.*, (2001) van ser introduïdes en els residus corresponents en el CTF de la presenilina de *Drosophila*. Es tracta de les mutacions P507L, que afecta la primera prolina del motiu i produeix la pèrdua de funció, i la mutació P510S, en la segona prolina, que produeix la malaltia d'Alzheimer. L'efecte d'aquestes mutacions es va analitzar en l'heterodímer NTF:CTF i en homozigosi per l'homodímer CTF:CTF (figures 19 i 20).

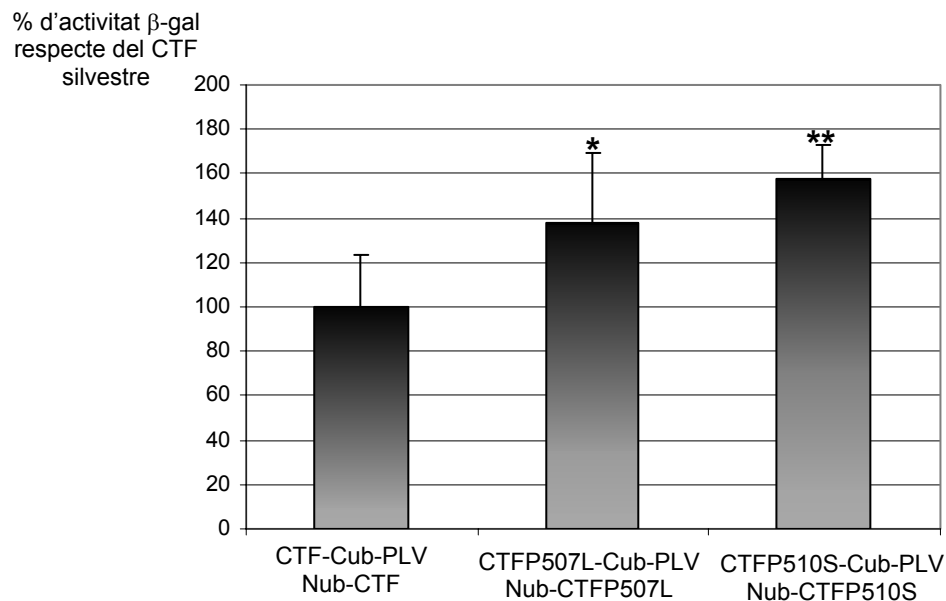


Figura 19. Quantificació de l'activitat β -galactosidasa en un experiment d'*split-ubiquitin* de les combinacions indicades. Segons el test U de Mann-Whitney les interaccions són significatives amb ** $P < 0.01$ i * $P < 0.05$. Es van analitzar 10 clons de cadascuna de les combinacions.

La mutació P510S, causant d'Alzheimer, té un efecte d'increment de la interacció (154% respecte del silvestre) de l'homodímer CTF:CTF (figura 19). Aquestes dades suggereixen que la mutació P510S, causant d'Alzheimer, podria exercir el seu efecte patogènic alterant lleugerament la formació de l'homodímer CTF:CTF. La mutació P507L sembla incrementar també la interacció, però en menor grau. Aquest efecte indicaria que, efectivament, el motiu PALP del *C-loop* té un efecte modulador de l'homodímer CTF:CTF. És sorprenent i difícil d'explicar que dues mutacions amb conseqüències tant diferents —pèrdua i guany de funció—, tinguin igualment la capacitat d'incrementar la formació o l'estabilitat de l'homodímer CTF:CTF. D'altra banda, ens podríem trobar davant del cas anterior (vegeu l'apartat 3.3), és a dir, que aquestes mutacions podrien exercir un efecte modificador sobre la col·locació de les regions transmembranes que no produeixi una alteració proporcional i/o detectable en les interaccions.

Pel que fa a la participació del motiu PALP en l'heterodímer NTF:CTF, l'efecte significatiu d'algunes combinacions no és consistent si considerem els experiments recíprocs, fet que ens impedeix treure'n cap conclusió clara, tot i que existeix una tendència a incrementar la interacció (figura 20).

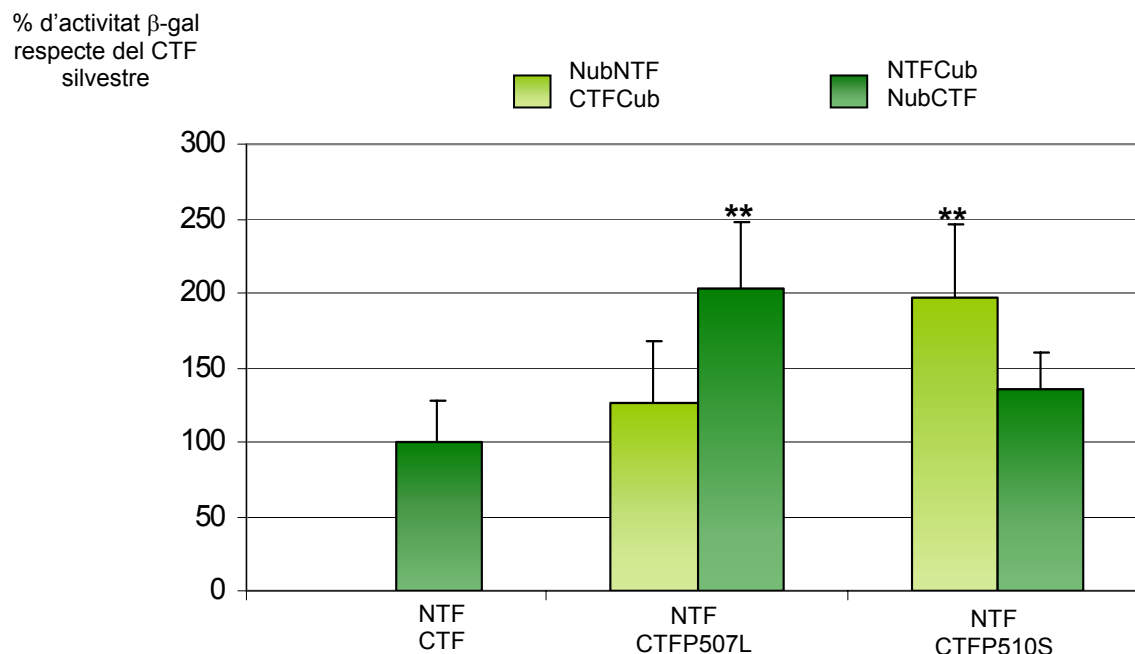


Figura 20. Quantificació de l'activitat β -galactosidasa en un experiment d'*split-ubiquitin* de les combinacions indicades. Segons el test U de Mann-Whitney les interaccions són significatives amb $**P < 0.01$. Es van analitzar 5 clons de cadascuna de les combinacions.

Tenint en compte el fet que els experiments recíprocs generen resultats tan diferents, es va considerar també la possibilitat que hi haguessin diferències significatives entre les dues combinacions silvestres (NubNTF:CTFwtCub i NubCTFwt:NTFCub), però no se'n van detectar. Aquests resultats inconsistents poden ser fruit d'un efecte desestabilitzador específic de mutació quan el CTF es troba en un context determinat, de manera que hi hauria menys proteïna disponible. Per contra, la presència d'alguna de les mutacions podria estar incrementant la vida mitja de les proteïnes de fusió dins de les cèl·lules de llevat. No es pot descartar tampoc una expressió diferencial de les proteïnes de fusió portadores de diferents substitucions que, en última instància, condueixi a que alguna de les proteïnes es trobi en quantitats limitants que no arribin a incrementar l'activitat β -galactosidasa fins als mateixos nivells que l'altra mutació. Segons el nostre disseny experimental, les fusions amb Cub-PLV s'expressen menys i, per tant, si alguna de les dues proteïnes que s'estan expressant es troba en quantitats limitants, segurament és aquesta.

Molts dels experiments quantitius realitzats en aquest capítol mitjançant el sistema de l'*split-ubiquitin* generen resultats difícils d'interpretar. Al marge de possibles explicacions que impliquen diferències d'estabilitat de les proteïnes de fusió expressades en llevat, és difícil trobar un raonament per explicar alguns dels resultats obtinguts. Un raonament que explica la dificultat d'interpretació és el fet que, tal com s'ha observat durant aquest capítol mitjançant

L'aplicació de l'*split-ubiquitin*, els fragments de presenilina NTF i CTF poden interaccionar a través de múltiples regions. En un marc com aquest, en el qual diverses regions contribueixen en la formació d'un complex tetramèric, és molt més difícil determinar el rol de cadascuna de les regions, a diferència del que ocorre si una regió determinada és la responsable de la interacció. Si es vol aprofundir en altres aspectes més subtils de les interaccions dins d'un complex proteic, l'*split-ubiquitin* no permet discernir, en el cas d'una proteïna tan complexa com la presenilina, els efectes que són causats per alteracions en les pròpies interaccions de les modificacions en l'estructura i la conformació que, secundàriament, poden modificar les interaccions. Així doncs, no sembla que la quantificació de les interaccions, tant per l'*split-ubiquitin* com per altres sistemes, sigui el mètode més adient per estudiar en gran detall el tetràmer de la presenilina, ja que *a priori*, no sabem si les mutacions produeixen un altre tipus d'alteració, més enllà del que és detectable amb el sistema que hem aplicat. Malgrat tot, l'*split-ubiquitin* permet estudiar, a grans trets, les interaccions entre els diferents dominis de la presenilina insertats en les membranes, i ens ha permès determinar les regions que contribueixen en les interaccions.

Actualment, se sap que la presència de tots els components dels complex presenilina- γ -secretasa és imprescindible per a la seva formació. En aquest sentit, l'absència de la nicastrina, per exemple, impedeix l'estabilització de la presenilina. En el llevat no es troben cap de les proteïnes del complex presenilina- γ -secretasa, on segurament es produeixen un gran nombre d'associacions entre els seus components. Si considerem aquestes dades més recents, es pot pensar que les alteracions en les associacions intramoleculares entre els dominis NTF i CTF que s'han observat al llarg d'aquest apartat possiblement difereixen de les alteracions que es produeixen en condicions fisiològiques. Malgrat tot, no existeixen mètodes per quantificar les interaccions *in vivo* en el seu context fisiològic, doncs les aproximacions bioquímiques utilitzades no són ni molt menys quantitatives, ja que només poden detectar grans variacions en les interaccions. En aquest sentit, l'*split-ubiquitin* permet l'expressió de les proteïnes en un sistema heteròleg i la quantificació de les interaccions.

Per tal d'estudiar el rol del HL1 en la conformació de la presenilina i observar-ne els efectes sobre la biologia cel·lular de la presenilina, cal treballar amb un sistema on estiguin presents els altres components del complex presenilina- γ -secretasa. És per això que, per continuar aquest treball, es va posar a punt l'expressió de presenilina en cèl·lules de *Drosophila*, les cèl·lules SL2.

Cal destacar que els resultats presentats en aquest capítol, és a dir, les interaccions NTF:NTF i CTF:CTF, representen una aportació totalment novedosa en el concepte actual del complex presenilina- γ -secretasa. L'homodimerització de l'HL1 i l'efecte de les mutacions d'Alzheimer són de gran interès, doncs representen la primera vegada que s'explica el tipus de defecte a nivell molecular produït per les mutacions FAD. Aquestes consideracions i la seva implicació en el context presenilina- γ -secretasa seran àmpliament discutides en l'apartat de discussió general.

CAPÍTOL III. EXPRESSIÓ DE LA PRESENILINA EN UN SISTEMA HOMÒLEG: LES CÈL·LULES SL2 DE *DROSOPHILA*.

Les dades presentades dels experiments d'interacció proteïna-proteïna presenten un model on les presenilines actuarien en forma de tetràmer, amb dos NTFs i dos CTFs dins del complex d'alt pes molecular, en el qual l'HL1 podria tenir una funció moduladora de l'heterodímer NTF:NTF. El rol de l'HL1 en la biologia cel·lular de les presenilines no es pot estudiar en un sistema heteròleg que no té presenilina i, presumiblement, tampoc presenta els altres elements del complex. És per això que es va decidir treballar en un sistema homòleg: les cèl·lules Schneider's 2 (SL2 o S2) de *Drosophila*, que expressen la presenilina endògena a nivells baixos. Les dades que es presenten en aquest capítol inclouen la posta a punt de l'expressió transitòria de la presenilina fusionada a un epítop, per facilitar la seva immunodetecció, així com els estudis iniciats amb l'objectiu de determinar el rol de l'HL1 en la biologia cel·lular i funcions de la presenilina. En la part final d'aquest capítol, es presenta la posta a punt d'un mètode de coexpressió de presenilines en una mateixa cèl·lula, amb la finalitat de determinar el rol del tetràmer en l'endoproteòlisi de la presenilina.

Totes les construccions de la presenilina es van realitzar en el plasmidi pActPPA, gentilment cedit pel Dr Alejandro Vaquero. Es tracta d'un plasmidi *shuttle* no seleccionable en SL2, en el qual l'expressió del gen exogen es dirigeix a partir de les seqüències promotores i terminadores del gen de l'actina de *Drosophila*. Els nivells d'expressió del RNA missatger són elevats, ja que es tracta d'un promotor constituït fort.

1. EXPRESSIÓ DE LA PRESENILINA EN CÈL·LULES SL2

En aquest primer apartat, es presenten els experiments realitzats per posar a punt l'expressió i la detecció de la presenilina en aquest tipus cel·lular. Amb l'objectiu d'immunodetectar les diferents variants de presenilina expressada, es va marcar la presenilina amb epítops àmpliament utilitzats i pels quals es pot obtenir un anticòs comercial. S'han utilitzat els epítops HA (hemaglutinina, YPYDVPDYA) i c-myc (EQKLISEEDL) per immunodetectar la presenilina expressada transitòriament. La utilització d'epítops suposa un avantatge, ja que s'assegura la detecció específica de les variants de presenilina exògenes i permet diferenciar, si s'utilitzen diferents epítops, dues variants de presenilina cotransfectades. Abans de realitzar els experiments en sí, calia assegurar que la presència de l'epítop no interfereix en la biologia cel·lular de les proteïnes que s'estan expressant, i que s'immunodetecten eficientment. D'altra banda, variacions en l'eficiència de transfecció poden representar un inconvenient a l'hora de comparar transfeccions independents. És per aquest motiu que es va posar a punt un sistema per estimar l'eficiència de cadascuna de les transfeccions i normalitzar, d'aquesta manera, la quantitat de proteïna expressada en cadascuna de les transfeccions per a la seva immunodetecció.

1.1. L'epítop a C-terminal

La primera estratègia que es va aplicar per expressar la presenilina va ser la fusió de l'epítop a l'extrem C-terminal, ja que es va creure que la presència de seqüències extres a l'extrem aminoterminal podria dificultar la correcta inserció en el reticle endoplasmàtic, atès que la presenilina no té cap pèptid senyal reconeixible. També es disposava d'una construcció del fragment NTF fusionat per l'extrem aminoterminal a l'epítop HA. Les construccions corresponents a la presenilina sencera amb HA (PSN-HA, corresponent al plasmidi pSC-22), la substitució de l'HL1 per l'HL5 (PSN1-5-HA, corresponent al plasmidi pSC-21) i el fragment NTF (HA-NTF, corresponent al plasmidi pSC-32) van ser transfectades en cèl·lules SL2, es van recollir unes 48 hores més tard, i es va immunodetectar l'extracte proteic amb l'anticòs corresponent (figura 21). Amb aquesta aproximació, es pretenia determinar la correcta expressió de la presenilina fusionada a un epítop a C-terminal i si la substitució del HL1 per l'HL5, àmpliament treballada mitjançant l'*split-ubiquitin* (vegeu el capítol II), tenia algun efecte en l'endoproteòlisi de la presenilina.

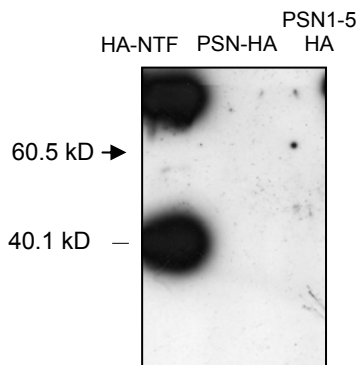


Figura 21. Western blot immunodetectat amb un anticòs anti-HA i revelat per quimiluminiscència amb Supersignal.

La construcció HA-NTF es detectava eficientment com a una banda de 40.1 kD, tot i que s'observava un senyal de molt alt pes molecular que, segurament, correspon a agregats de presenilina. La formació d'agregats de presenilina havia estat descrita en treballs previs i, segons aquests treballs, disminueix si no s'escalfa la mostra a elevades temperatures abans de realitzar l'electroforesi. Les construccions marcades a C-terminal, que s'esperaven a un alçada corresponent als 60.5 kD de l'holoproteïna o de 26 kD corresponent al fragment CTF-HA, no presenten expressió. Aquestes dades ens va fer sospitar que hi havia alguna interferència, causada per l'epítop situat a C-terminal, en la correcta expressió de la

presenilina. Tot i que hi ha exemples a la literatura d'expressió de presenilina amb l'epítop a C-terminal, en algun treball es demostra que la modificació de la presenilina a C-terminal per l'addició d'epítops, o d'algun aminoàcid extra, impedeix la seva estabilització i endoproteòlisi (Tomita *et al.*, 1999). L'efecte en el cas de l'expressió transitòria en cèl·lules de *Drosophila* sembla més dràstic, ja que ni tan sols es va poder immunodetectar l'holoproteïna (figura 21). Els treballs que observen aquest efecte, hipotetitzen que el *loop* de la regió C-terminal, (*C-loop*), és important per a l'estabilització de la presenilina a través de la seva interacció amb altres proteïnes, tal com succeïria amb el motiu PALP. Així doncs, es va canviar d'estratègia i es va expressar la presenilina amb l'epítop a N-terminal.

La primeres construccions analitzades de forma molt preliminar amb l'epítop HA fusionat a l'extrem N-terminal de la presenilina allargaven la proteïna uns aminoàcids per l'extrem C-terminal, a causa de l'absència d'un codó *stop* just darrera del darrer aminoàcid de la presenilina. En les primeres anàlisis realitzades, s'observa l'expressió de l'holoproteïna, però no

es detecten els fragments endoproteolítics. Aquest resultat corrobora les dades de la literatura sobre les modificacions a C-terminal, a les quals la presenilina és extremadament sensible.

1.2. L'epítot a N-terminal

Es van utilitzar dos epítots diferents, HA i c-myc, per expressar i diferenciar dues presenilines, ja que un dels objectius d'aquest treball era coexpressar i identificar específicament cadascuna de les dues variants de presenilina expressades en una mateixa cèl·lula (vegeu l'apartat 4). És per això que es van realitzar els experiments previs amb els dos epítots fusionats a l'extrem aminoterminal, un cop es va haver observat la manca d'expressió si els epítots es fusionaven a C-terminal. L'objectiu d'aquests experiments previs és observar si es produeix el tall endoproteolític de la presenilina en aquest sistema malgrat la fusió d'un epítot i la utilització d'un promotor constitutiu fort, el de l'actina de *Drosophila*, ja que temíem la possibilitat que es produís una saturació del sistema. Es coneix, arrel dels darrers treballs publicats sobre els altres components del complex presenilina- γ -secretasa, que aquests es troben en quantitats limitants dins la cèl·lula i, ja s'havia hipotetitzat des de l'inici, que existeix un factor limitant en el procés de transformació de la presenilina en la forma activa NTF i CTF, i la seva incorporació en el complex de pes molecular intermedi on es produeix l'endoproteòlisi. A més a més, pràcticament no hi ha dades a la literatura d'experiments d'expressió transitòria de presenilina, i menys, en *Drosophila*. Pel que fa al temps d'expressió, aquest ha de ser suficient per permetre l'expressió de l'holoproteïna, la seva estabilització i l'endoproteòlisi. Es va determinar un temps de 72 hores, en una sèrie d'experiments preliminars que aquí no es presenten, perquè es produeixin aquests processos.

L'expressió transitòria de la construcció de presenilina HA-PSN (corresponent al plasmidi pSC-59) permet la detecció de l'holoproteïna però també del tall endoproteolític, ja que es genera un fragment aminoterminal de la mida esperada (37 kD) (figura 22 A). Així doncs, la fusió a l'extrem aminoterminal de l'epítot HA no altera ni impedeix l'expressió ni l'endoproteòlisi de la presenilina.

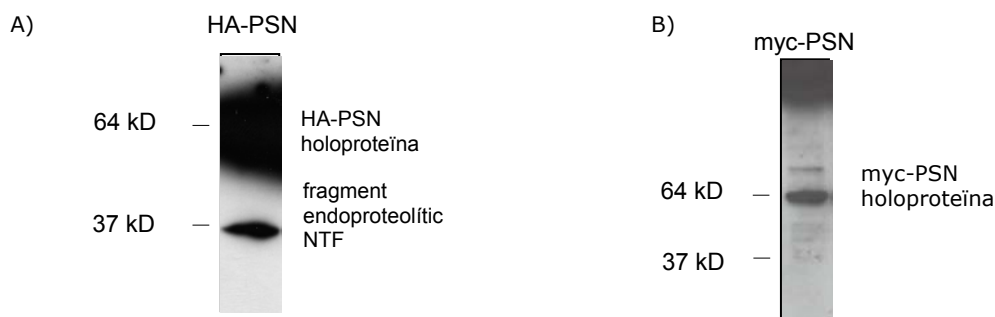


Figura 22. Western blot immunodetectat amb un anticòs contra A) HA i B) myc, revelat per quimiluminiscència amb Supersignal (Pierce). L'excés de senyal luminiscent produeix que HA-PSN es vegi com a taca i no com a banda.

Pel que fa a l'expressió de la presenilina amb l'epítot c-myc (myc-PSN, corresponent al plasmidi pSC-61), aquesta sembla tenir més tendència a agregar-se tal com es veu a dalt del

carril presentat en la figura 22 B —i en tota la resta de proves que es van fer i que aquí no es presenten—. Aquesta agregació dificulta la detecció de l'holoproteïna, que es detecta amb menys intensitat que en el cas de la proteïna de fusió HA-PSN i, potser per aquest efecte, no s'observa el fragment endoproteolític, encara que no es pot descartar que no s'estigui produint. En tot cas, aquests resultats indiquen una interferència pel tipus d'epítop utilitzat i impliquen, clarament, que aquestes proteïnes de fusió amb c-myc no són informatives.

1.3. Eficiència de transfecció

Un cop resolta la qüestió de la fusió de l'epítop i de l'expressió transitòria de la presenilina, es va provar de solventar un dels problemes causats pel fet d'estar expressant la presenilina mitjançant transfeccions transitòries independents. En algunes de les proves que es van fer es va observar que, malgrat igualar la càrrega de proteïna de cadascuna de les mostres mitjançant la quantificació amb el reactiu de Lowry, els nivells de presenilina detectada variaven molt entre diferents carrils i entre diferents transfeccions, i feia molt difícil comparar els senyals obtinguts en cadascun dels carrils. Vam creure convenient, per tal de minimitzar aquesta variabilitat, quantificar l'eficiència de cadascuna de les transfeccions i així homogenitzar la detecció de cadascuna de les variants de la presenilina que es volien estudiar. Així doncs, no es va carregar la mateixa quantitat total de proteïna de cadascuna de les mostres, sinó que es va realitzar una estimació de la quantitat de proteïna que calia carregar, en funció de l'eficiència de la transfecció.

En cada transfecció, es van afegir 250 µg d'un plasmidi, el pSC-37, que expressa EGFP (*enhanced green fluorescent protein*), proteïna que emet fluorescència verda de 510 nm de longitud d'ona d'emissió màxima—, quan és estimulada amb llum blava, de 488 nm de longitud d'ona —excitació màxima—, sota el control del *cassette* d'expressió de l'actina, promotor i terminador. Una alíquota de les cèl·lules recollides 72 hores després de la transfecció, es va passar per un citòmetre de flux, que separa les cèl·lules una per una, les compta i detecta les cèl·lules que emeten fluorescència a una longitud d'ona determinada (vegeu mètodes). Mitjançant aquest mètode, es va poder obtenir el percentatge de cèl·lules que emeten fluorescència per cada transfecció, i es va poder establir una correlació entre el % de cèl·lules que emeten fluorescència verda, i la detecció de la presenilina en l'extracte proteic obtingut d'aquestes mateixes cèl·lules. Es va determinar que, a partir de valors tant baixos com del 8% de cèl·lules que emeten fluorescència —el valor més baix de tots els obtinguts—, la presenilina era immunodetectable en un *western blot*. El citòmetre de flux pot detectar altres paràmetres, com ara el tamany de les cèl·lules, indicatiu de la viabilitat. En el nostre cas, ni la transfecció ni la manipulació de les cèl·lules no van generar una disminució significativa en el nombre de cèl·lules viables. En la figura 23, es mostra un exemple del resultat obtingut en el citòmetre de flux.

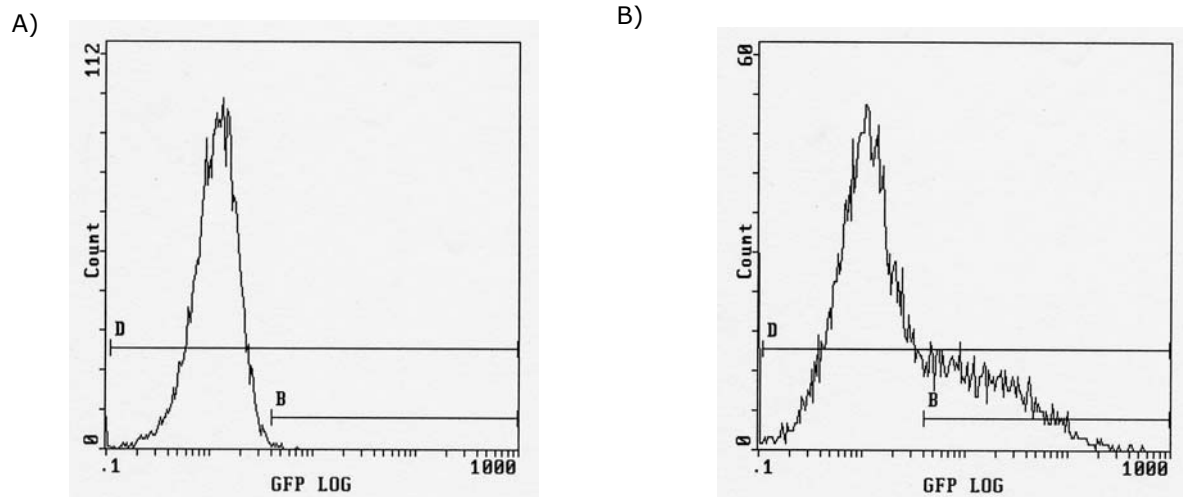


Figura 23. Representació del comptatge de 12000 cèl.lules, 72 hores després de la transfecció, en el citòmetre de flux i de la recollida de l'emissió de fluorescència a 525 nm. A) control negatiu de cèl.lules no transfectades, B) cèl.lules transfectades amb 4 µg de plasmidi, dels quals, 1/16 (250 ng) corresponen al pSC-37, que expressa GFP. A l'eix d'abcises, nombre de cèl.lules (l'escala no és la mateixa a A) i B), a l'eix d'ordenades, intensitat de la fluorescència. La població marcada amb una B a les gràfiques correspon a les cèl.lules fluorescents, que es distingeixen perfectament respecte de la població de cèl.lules no fluorescents. A B) s'observa una cua de cèl.lules que emeten fluorescència a diferents intensitats i que, en aquest exemple, correspon a un 30% del total.

2. EXPRESSIÓ DE DIFERENTS VARIANTS MUTANTS DE LA PRESENILINA

Com ja s'ha dit a l'inici d'aquest capítol, un dels objectius dels experiments d'expressió transitòria és l'estudi del comportament de la presenilina amb la substitució de l'HL1 (*loop* hidrofílic 1) per l'HL5 (*loop* hidrofílic 5). Concretament, es volia observar si aquesta substitució produeix alguna alteració en l'endoproteòlisi de la presenilina, comparant-la amb els nivells d'endoproteòlisi de la presenilina silvestre. Una bona referència d'inhibició de l'endoproteòlisi són les mutacions dels residus aspàrtic —en humans D257A i D385A— que s'han proposat com a possibles residus catalítics de la presenilina. Mitjançant mutagènesi dirigida es va introduir la mutació D385A, àmpliament estudiada, en el residu corresponent de la presenilina de *Drosophila*, i es va generar la construcció HA-PSN D461A. Es va mutagenitzar aquest aspàrtic del domini transmembrana VII en lloc del corresponent a l'aspàrtic 257, situat al transmembrana VI, perquè, segons les dades de la literatura, els seus efectes són més greus i existeix una certa controvèrsia sobre els efectes de la mutació D257A en l'activitat γ -secretasa. La manca d'endoproteòlisi de la presenilina amb la mutació D461A és un bon control per verificar que la banda d'endoproteòlisi observada amb la presenilina silvestre és de fet, produïda per l'endoproteòlisi de la presenilina, que depèn dels residus aspàrtics, i no és produïda per les caspases o algun altre artefacte com a conseqüència de la sobreexpressió. Així doncs, la construcció HA-PSN D461A (corresponent al plasmidi pSC-62) és un control negatiu. Considerant els resultats obtinguts prèviament, es van realitzar totes les fusions amb l'epítoc a l'extrem N-terminal.

Cal esmentar, abans d'introduir els resultats obtinguts, una sèrie de consideracions metodològiques que són de gran importància per treballs posteriors —en l'apartat de material i mètodes s'hi aprofundeix—. La visualització de la presenilina en aquests experiments d'expressió transitòria va ser especialment difícil d'aconseguir. Malgrat seguir les condicions d'extracció de presenilina i de preparació de la mostra de la majoria de treballs publicats, no es va aconseguir una eliminació total ni repetible dels agregats d'alt pes molecular, ja esmentats a la figura 21. A més a més, aquests semblaven formar-se especialment si es congelava la mostra, i la presenilina esdevenia aleshores impossible de detectar en les mateixes condicions i en mostres on ja s'havia detectat. Finalment, es va aconseguir visualitzar la presenilina de forma repetible i es va minimitzar la formació dels agregats d'alt pes molecular en les condicions que s'expliquen en detall en els mètodes.

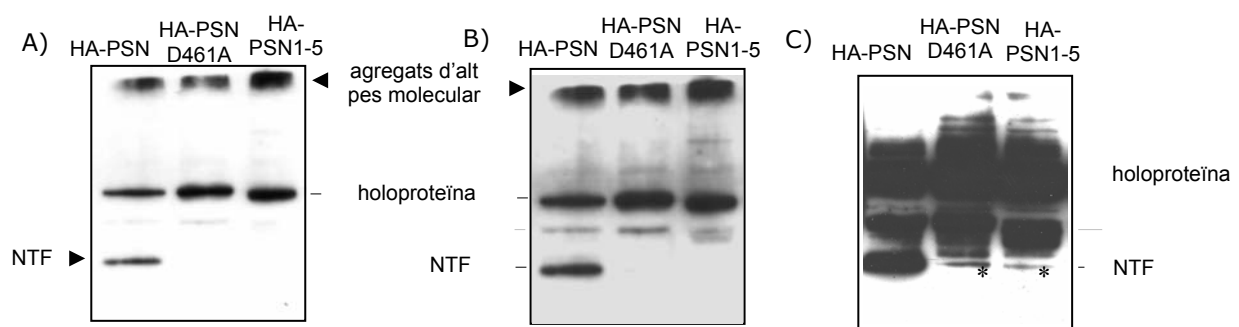


Figura 24. Western blot immunodetectat amb anti-HA i revelat amb ECL (Amersham Pharmacia), A) i B) o Supersignal (Pierce), C). El film B) representa una sobreexposició de l'A) on s'observen les bandes artefactuals, indicades amb una fletxa gris, que també apareixen a C). Els * a C) indiquen les bandes endoproteolítiques no esperades en el control negatiu (HA-PSN D461A) i que apareixen també en la variant que s'està testant (HA-PSN 1-5) en revelar amb Supersignal.

Efectivament, la presenilina silvestre (HA-PSN, corresponent al plasmidi pSC-59), genera un fragment NTF, absent en la versió D461A així com en la presenilina amb la substitució de l'HL1 per l'HL5 (HA-PSN 1-5, corresponent al plasmidi pSC-73) (figura 24 A). S'observen els agregats d'alt pes molecular de presenilina, la formació dels quals no es va eliminar totalment. L'holoproteïna HA-PSN 1-5 migra lleugerament més ràpid, ja que és uns 2.5 kD més petita. En exposicions més llargues, s'observa, en tots els carrils, una banda intermèdia entre l'holoproteïna i el fragment NTF, que podria ser un artefacte de la sobreexpressió transitòria o produït per la degradació de la presenilina (C. Saura, comunicació personal) (figura 24 A i B). En les sobreexposicions dels films (figura 24 B), així com en els revelats amb productes quimiluminiscents més sensibles (figura 24 C), s'observa que les presenilines amb les mutacions experimenten un cert tall endoproteolític que genera una banda de la mateixa mida que el fragment endoproteolític HA-NTF de la presenilina silvestre, no descrit per altres autors, i que es comentarà en el punt 4 i en la discussió en més profunditat.

Així doncs, la substitució de l'HL1 per l'HL5 que sembla incrementar la interacció dels NTFs segons s'ha detectat per *split-ubiquitin*, inhibeix l'endoproteòlisi de la presenilina. No es coneix per quin mecanisme es produeix, però en la discussió es presentaran diferents hipòtesis sobre aquest efecte i les seves possibles conseqüències en l'activitat γ -secretasa.

3. EXPRESSIÓ DE DUES PRESENILINES EN UNA MATEIXA CÈL·LULA

Les dades obtingudes dels experiments en llevat suggereixen que la presenilina estaria formant un tetràmer amb dos NTFs i dos CTFs, de forma que hi hauria quatre residus aspàrtics disponibles per a formar el grups di-aspartil responsables de l'endoproteòlisi de la presenilina i els talls γ -secretasa de Notch i de la β -APP. Si anem una mica més enllà, es pot hipotetitzar que l'endoproteòlisi de la presenilina pot produir-se en cis però també en trans, és a dir, que no sigui un tall intramolecular sinó intermolecular, amb la intervenció d'un o dos dels aspàrtics de l'altra presenilina del tetràmer. Per provar aquesta hipòtesi es va dissenyar una estratègia experimental que implica la coexpressió de dues variants de presenilina diferents en una mateixa cèl·lula (els detalls s'expliquen en el punt 3.2.). Aquesta coexpressió es pot aconseguir per la cotransfecció transitòria de dues presenilines, i esperar que es produeixi el fenomen del desplaçament —ja s'ha descrit que la sobreexpressió de presenilina desplaça l'endògena—. Però pot ser que, en un elevat nombre de cèl·lules, només entri un dels dos plasmidis, fet que podria interferir amb l'observació que es pretén, ja que només s'estaria expressant una de les dues presenilines i es volen observar els efectes de la coexpressió de les dues presenilines exògenes en una mateixa cèl·lula. A més a més, no podem assegurar que s'estigui produint el fenomen del desplaçament, ja que no disposem d'anticossos contra la presenilina de *Drosophila* per demostrar-ho, i ens arrisquem a que, si l'eficiència de cotransfecció no és prou alta, la presenilina endògena no desplaçada interfereixi amb la biologia cel·lular de l'exògena. Una altra manera d'assegurar la coexpressió seria realitzar una línia estable amb una de les presenilines que es vol expressar i, sobre aquesta, expressar de forma transitòria o també estable l'altra presenilina. En aquestes condicions, però, es produirà també el fenomen del desplaçament, ja que la presenilina que es transfecta de nou desplaçaria la que s'ha introduït prèviament i, molt probablement, no s'aconseguiria la coexpressió de totes dues presenilines.

És per això que es va construir un nou plasmidi on les dues presenilines es col·loquen sota el control del mateix *cassette* d'expressió, el de l'actina, i així s'expressen a partir d'un sol plasmidi. Això suposa un avantatge comparat amb l'expressió de cDNAs bicistrònics separats per seqüències IRES (*Internal Ribosomal Entry Site*) a partir d'un promotor, ja que la traducció del segon cDNA a partir de l'IRES és molt més ineficient i es generen quantitats de proteïna molt diferents que produïrien un esbiaix en el fenomen del tall endoproteolític que volíem analitzar. És per això que es va haver de considerar l'alternativa d'expressar les presenilines a partir de dos promotors independents, en un mateix plasmidi. En el cas que no hi hagi interferència entre dos promotors iguals i no hi hagi diferències en els nivells de traducció, s'obtinran nivells similars de les dues proteïnes, de manera que no correm el risc que la presenilina que més s'expressa estigui desplaçant l'altra. En aquest apartat es presenta la posta a punt del sistema i alguns dels experiments realitzats amb les presenilines fusionades amb els epítops HA i c-myc.

3.1. Posta a punt de la coexpressió mitjançant el *reporter lacZ*

Per tal de comprovar el correcte funcionament dels dos promotors en un mateix plasmidi es van dur a terme una sèrie de controls previs que permeten quantificar l'expressió i

comparar-la amb l'expressió a partir d'un plasmidi convencional, utilitzant el *reporter* β -galactosidasa. A més a més, es va comprovar que els nivells d'expressió siguin detectables amb l'anticòs anti-HA en un *western blot*, ja que la quantificació de l'activitat β -galactosidasa es va realitzar mitjançant un assaig molt sensible, no equiparable a un experiment de *western blot*. D'altra banda, es temia que en cas d'existir interferència entre els dos promotors, aquesta fos dependent de les seves orientacions respectives. És per això que es va posar a punt aquest sistema amb els *cassettes* d'expressió clonats en orientació directa, és a dir, de manera que els dos gens es transcrivuin en el mateix sentit, i en orientació invertida, de manera que la transcripció dels gens sigui en sentit oposat.

Les proteïnes de les quals es va testar l'expressió són el fragment NTF de la presenilina amb HA a N-terminal (HA-NTF), el qual s'immunodetecta eficientment, i la β -galactosidasa, de la qual es va mesurar l'activitat en un assaig luminiscent (vegeu materials). El temps d'incubació de la β -galactosidasa amb el seu substrat és variable en aquest assaig, i produeix diferents valors de l'activitat. Per tal d'evitar el possible esgotament del substrat, es van aplicar dos temps d'incubació diferents. En la figura 25, es presenta el promig dels valors de l'activitat β -galactosidasa obtinguts en aquestes dues condicions. Petites diferències en l'eficiència de transfecció podrien suposar grans diferències en els valors d'un assaig quantitatiu extremadament sensible. Per normalitzar els valors, es va cotransfectar amb una petita quantitat d'un plasmidi comercial que expressa luciferasa, l'activitat de la qual també es mesura per corregir l'activitat obtinguda de l'assaig β -galactosidasa. Es van transfectar les cèl·lules de *Drosophila* SL2 amb els plasmidis corresponents, pSC-57.1, amb els promotors en orientació directa, i pSC-57.7, amb els promotors en orientació invertida (vegeu materials).

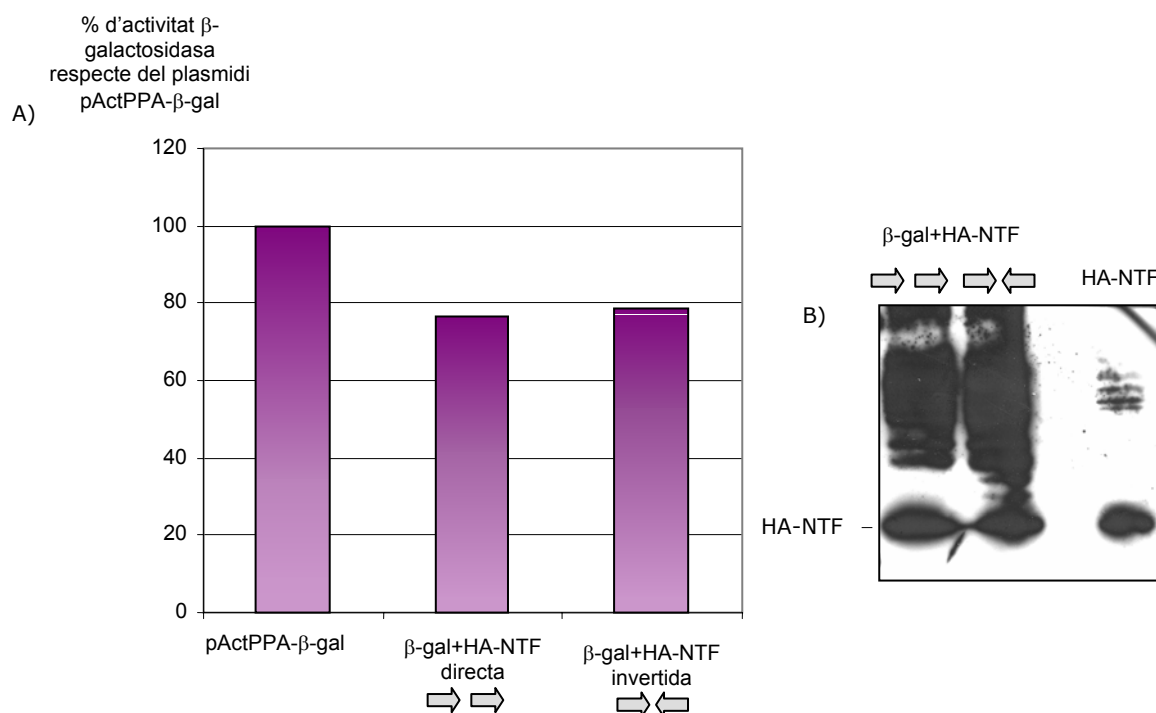


Figura 25. Expressió de β -gal i d'HA-NTF a partir d'un mateix plasmidi. A) nivells d'activitat β -galactosidasa produïts per les construccions indicades relatius a un plasmidi que només expressa la β -galactosidasa a partir del promotor de l'actina. Tots els valors han estat normalitzats per l'activitat luciferasa. B) *western blot* immunodetectat amb un anticòs anti-HA de les cèl·lules transfectades amb els plasmidis indicats.

Els resultats presentats a la figura 25 indiquen que, tot i la disminució de l'activitat β -galactosidasa en els plasmidis pSC-57, que suggereix una lleugera interferència dels promotors, aquesta varia molt poc en funció de l'orientació dels promotors i la producció de la presenilina és immunodetectable en un *western blot*. Així doncs, es va decidir utilitzar aquest sistema per expressar dues presenilines en una mateixa cèl·lula.

3.2. Coexpressió de dues presenilines amb dos epítops diferents

Tal com s'ha comentat en l'inici d'aquest apartat, l'expressió conjunta de dues presenilines té com a objectiu testar la hipòtesi que es planteja en aquest treball sobre si l'endoproteòlisi de la presenilina és en cis o en trans. El raonament que es va seguir per provar de respondre aquesta pregunta és el següent: Se sap que les presenilines amb substitucions per alanina dels residus aspàrtic 257 i 385 no presenten endoproteòlisi, i s'ha comprovat, per la mutació D461A de la presenilina de *Drosophila*, que en el sistema d'expressió en cèl·lules SL2 posat a punt en aquest capítol també és així, tot i que a la figura 24 C s'observa una banda tènue d'endoproteòlisi. De fet, aquesta petita proporció de presenilina D461A que s'endoproteolitza suggereix que el tall presenilinas pugui ser en trans (vegeu la discussió). Si els aspàrtics no dificulten la incorporació de la presenilina en els complexos de pes molecular intermedi on es produeix l'endoproteòlisi, la coexpressió d'una presenilina silvestre permetrà que es formin complexos híbrids entre PSNwt i PSN D461A. Si el tall endoproteolític es produeix en trans, la presenilina silvestre podrà tallar la presenilina amb la mutació i observarem la banda d'endoproteòlisi. En cas contrari, és a dir, si el tall es produeix en cis, només es podrà endoproteolitzar la PSN wt però no la mutant. Per tal de diferenciar-les, les dues presenilines s'han fusionat a dos epítops diferents, HA i c-myc, que permeten el reconeixement diferencial de les dues presenilines, silvestre i mutant.

No s'ha obtingut cap resultat conclouent al respecte, doncs un dels epítops utilitzats és c-myc que, com ja s'ha presentat a l'apartat 1.2. d'aquest capítol, sembla afavorir la formació dels agregats d'alt pes molecular i impedir la producció o la detecció, del fragment d'endoproteòlisi de la presenilina. Així doncs, si c-myc influeix negativament en el plegament o l'estabilitat de la presenilina produint-ne una disfunció, és possible que no pugui formar els complexos amb l'altra presenilina, o que no tingui activitat presenilinas.

Pel que fa a les construccions fusionades a l'epítop HA, la coexpressió amb altres variants de presenilina no sembla afectar l'endoproteòlisi. La coexpressió de les construccions HA-PSN D461A i myc-PSN (corresponent al plasmidi pSC-77), ens ha d'informar sobre si el tall es produeix en cis o en trans, ja que esperem que fomin un complex. Però si c-myc afecta la correcta expressió o plegament de la presenilina, no es pot concloure que no hi hagi tall en trans (figura 26 A, carril 4). La coexpressió d'HA-PSN i myc-PSN (corresponent al plasmidi pSC-74) és un control positiu de coexpressió i endoproteòlisi, així com la coexpressió d'HA-PSN i myc-PSN D461A (corresponent al plasmidi pSC-76), que ens permet determinar si la coexpressió d'una presenilina amb una altra que presenta la mutació D461A s'endoproteolitza (carrils 1 i 3, observeu la banda d'endoproteòlisi). La coexpressió de les dues presenilines amb la mutació, HA-PSN D461A i myc-PSN D461A, corresponent al plasmidi pSC-75, és un control negatiu d'endoproteòlisi (carril 2).

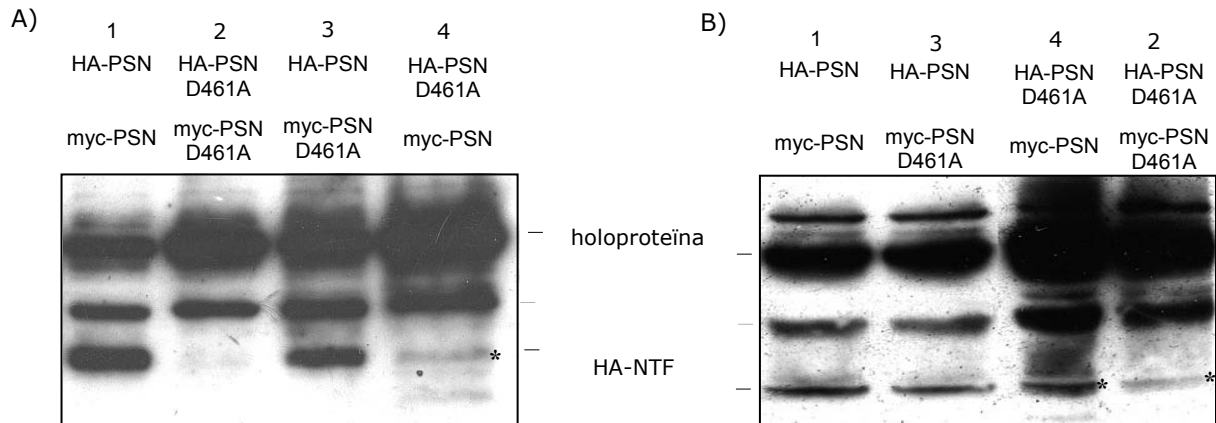


Figura 26. Immunodetecció amb anti-HA d'un *western blot* on s'han transferit els lisats de les cèl·lules transfectades amb les construccions indicades. A) i B) són dos experiments independents, en els quals les mostres s'han carregat en diferent ordre. La correspondència de carrils s'indica amb un número. La banda artefactual s'assenyala amb una fletxa grisa. Cal destacar la presència de bandes d'endoproteòlisi en els controls negatius, que s'observen en els carrils sobrecarregats o sobreexposats (*).

Un cop més, s'han pogut observar bandes corresponents al fragment HA-NTF en construccions que contenen les mutacions en els aspàrtics inhibidores de la γ -secretasa que es van obtenir com a controls negatius d'endoproteòlisi, en condicions de sobrecàrrega del carril o de sobreexposició (figura 26 B, assenyalades amb un asterisc). Aquestes bandes es poden interpretar com l'activitat presenilinas de la presenilina endògena, que deu quedar en poca quantitat pel fenomen del desplaçament, sobre la presenilina exògena. Aquesta interpretació implica que les presenilines endògena i exògena formen els tetràmers i que, per tant, es produeix el tall en trans de la presenilina endògena sobre les presenilines expressades que contenen les mutacions de pèrdua de funció (vegeu la discussió).

Encara que no s'hagi pogut treure cap conclusió, a partir del disseny experimental inicial, pel que fa al tall en cis o en trans de la presenilinas, ja que l'epítip c-myc sembla interferir amb l'endoproteòlisi, s'ha aconseguit observar l'expressió simultània de dues presenilines a partir dels plasmidis que contenen dos *cassettes* d'expressió (figures 26 i 27). Cal esmentar que també es va intentar comprovar l'absència d'endoproteòlisi en els mutants D257A, corresponent a la mutació D279A a la presenilina de *Drosophila*, i en el doble mutant. Aquestes mutacions es van introduir en la presenilina amb l'epítip c-myc a l'extrem aminoterminal que, en el nostre sistema, sembla alterar la correcta expressió i/o plegament de la presenilina. En no poder comparar el comportament d'aquestes mutacions respecte de la construcció silvestre, no es van poder treure conclusions sobre si afecten l'endoproteòlisi igual que en els altres sistemes de mamífer.

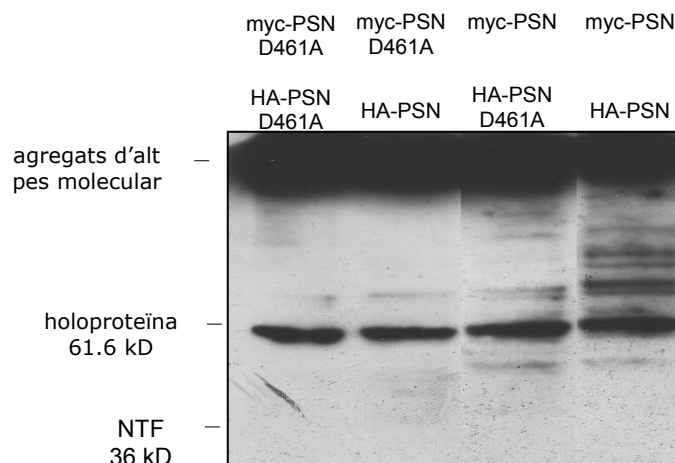


Figura 27. Immunodetecció amb anti-c-myc d'un *western blot* on s'han transferit els lisats de les cèl·lules transfectades amb les construccions indicades. El revelat s'ha realitzat amb Supersignal. Destaca la presència dels agregats d'alt pes molecular i l'absència de tall presenilinas en els dos últims carrils, on c-myc està fusionat a PSN wt, tot i que no es pot descartar que es produeixi i no sigui detectable.

4. LOCALITZACIÓ SUBCEL·LULAR DE LES VARIANTS DE PRESENILINA EXPRESADES EN CÈL·LULES SL2

En alguns dels estudis de localització subcel·lular de les presenilines (resumits a la introducció), s'observen diferències entre la localització de l'holoproteïna i la dels fragments NTF i CTF, que seria de reticle endoplasmàtic i Golgi, respectivament. Els últims experiments realitzats per diversos grups, proposen una localització molt minoritària en l'aparell de Golgi i en la membrana plasmàtica. En aquest treball, també es va voler determinar la localització subcel·lular de les presenilines sobreexpressades transitòriament per tal d'observar les possibles diferències entre les diferents variants, i si la falta de tall endoproteolític presenilinas en les construccions amb c-myc era causada per una deficient o incorrecta localització subcel·lular. Les cèl·lules transfectades van ser adherides a cobreobjectes recoberts de polilisina, permeabilitzades i immunodetectades amb els anticossos contra els epítops HA i c-myc i contra proteïnes residents en el reticle o en el Golgi, per tenir una visió més acurada de la colocalització en determinats compartiments subcel·lulars (vegeu material i mètodes). El marcatge de la membrana plasmàtica es va realitzar amb fal·loidina conjugada a FITC que marca el citoesquelet d'actina, el qual es localitza just per sota de la membrana plasmàtica en les cèl·lules de *Drosophila*. L'anticòs secundari conjugat a un fluorocrom va ser visualitzat per microscopia confocal.

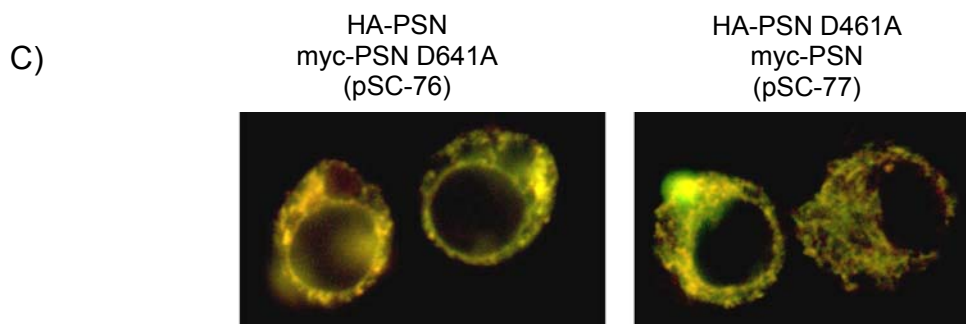
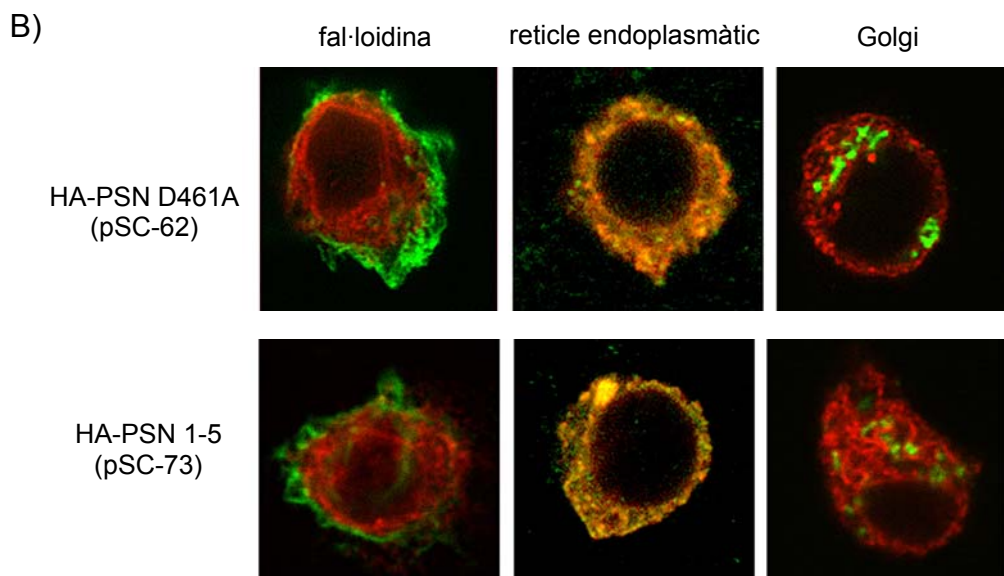
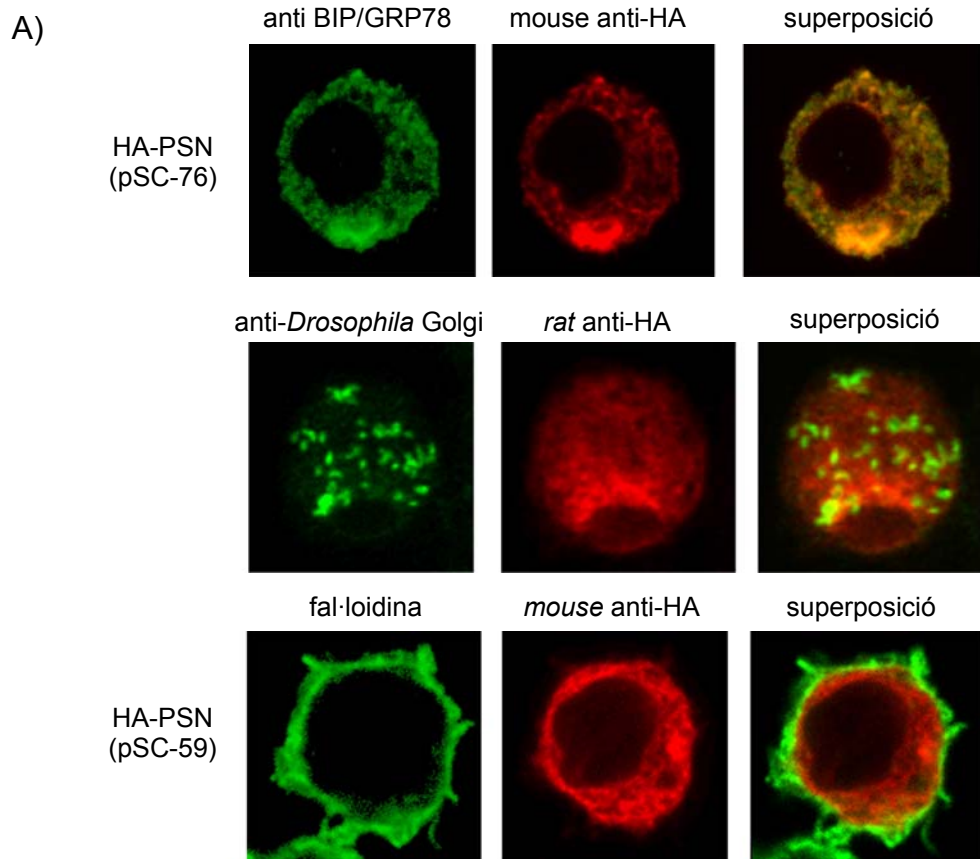
En general, s'observa una colocalització inequívoca amb el marcador de reticle endoplasmàtic, tot i que en aquestes cèl·lules no s'observen prou bé aquests compartiments, ja que tenen una forma arrodonida. L'adhesió als cobreobjectes de polilisina ajuda a que adquireixin un aspecte més aplanat per poder observar el contingut citoplasmàtic. No s'observa ni la localització en el Golgi ni en la membrana plasmàtica de la presenilina silvestre, tal com s'ha publicat en alguns treballs (figura 28 A). No es pot descartar que una petita fracció de presenilina es localitzi en aquests compartiments però que no sigui visualitzada en el nostre

sistema, perquè l'excés de producció provoqui saturació i retenció en el reticle endoplasmàtic i, consegüentment, un fort marcatge en aquest compartiment. En aquest sentit, el nostre resultat està d'acord amb la majoria de treballs. Les variants de presenilina amb les mutacions D461A i 1-5 presenten el mateix patró de localització que la presenilina silvestre (figura 28 B).

Seria molt interessant determinar si la presenilina, tant la silvestre com les variants mutades, es localitza a la membrana plasmàtica, ja que és aquí on es postula que exerceix la seva funció. Un bon mètode per eliminar el fort marcatge en el reticle endoplasmàtic seria repetir les immunolocalitzacions però sense permeabilitzar les cèl·lules. En les nostres construccions, això representa un problema ja que l'epítóp té una localització intracel·lular i mai podria unir l'anticòs. Caldria doncs recórrer a mètodes bioquímics com la biotinització de les proteïnes de la superfície extracel·lular i la seva immunodetecció amb un anticòs contra l'epítóp utilitzat per marcar la presenilina i així observar si està present en aquesta fracció.

Pel que fa a la colocalització de diferents variants de presenilina coexpressades en una mateixa cèl·lula, els resultats semblen indicar que ambdues proteïnes colocalitzen en un compartiment reticulat, que segurament correspon al reticle endoplasmàtic (figura 28 C). No es pot arribar a precisar, en aquest nivell de resolució, si existeixen diferències menors de localització entre ambdues proteïnes, tot i que seria interessant afinar la tècnica per observar si la mutació D461A produeix algun efecte en el transport de la presenilina. En altres experiments d'immunolocalització per microscòpia electrònica, s'ha observat una localització de la presenilina en dos compartiments: els compartiments anteriors al Golgi (membrana nuclear, reticle endoplasmàtic i vesícules tubulars entre el reticle i el Golgi) i la membrana plasmàtica. A més a més, observen la localització de presenilina en les vesícules encarregades del transport retrògrad de presenilina des de l'aparell de Golgi cap al reticle endoplasmàtic, fet que indica que es produeix un reciclatge de la presenilina des de les vesícules de trànsit cap al reticle endoplasmàtic. Aquest transport retrògrad és inhibit per la mutació D257A i, com a conseqüència, produeix un increment de la presenilina a la membrana plasmàtica en detriment de la presenilina present en els compartiments intracel·lulars (Reichards *et al.*, 2002). Aquestes dades indiquen, igual que les dades obtingudes per (Kaether *et al.*, 2002), que l'holoproteïna arriba a la membrana plasmàtica —encara que aquestes no siguin les condicions fisiològiques—, en contra de resultats anteriors que proposaven una localització en el reticle endoplasmàtic de l'holoproteïna i en el Golgi dels fragments endoproteolítics. Els nostres resultats, encara que poc resolutius, indiquen, si més no, que la presenilina amb capacitat de produir els fragments endoproteolítics i que, de fet, els produeix (figura 26 A, tercer carril) colocalitza amb l'holoproteïna (figura 27 segon carril). A més a més, la presenilina fusionada a c-myc, tot i agregar-se i, probablement, no ser funcional, sí arriba a localitzar-se en el reticle endoplasmàtic (figura 28 C, HA-PSN, myc-PSN D 461A).

Figura 28. Immunolocalització de presenilina expressada transitòriament en cèl·lules SL2. A) Coimmunolocalització de la presenilina silvestre, expressada a partir del plasmidi pSC-76 (vermell) amb BiP/GRP78, que resideix en el reticle endoplasmàtic, un marcador del Golgi i la fal·loidina (verd). Es mostren els dos canals per separat i superposats. B) Coimmunolocalització de les presenilines HA-PSN D461A i HA-PSN 1-5 amb els mateixos marcadors que a A). Es mostra la superposició dels dos canals. C) Coimmunolocalització de les presenilines silvestre i amb la mutació D461A. Es mostra la superposició de la immunodetecció amb HA (vermell) i c-myc (verd).



CAPÍTOL IV. SOBREEXPRESSIÓ DE DIFERENTS VARIANTS DE PRESENILINA EN LA LÍNIA GERMINAL DE FEMELLES DE *DROSOPHILA* PER A L'ESTUDI DEL FENOTIP CUTICULAR DE LES LARVES DIPOSITADES.

Drosophila és un organisme àmpliament utilitzat com a model per a l'estudi de diferents processos cel·lulars i del desenvolupament. En aquest treball, donat que tots els experiments s'han realitzat amb la presenilina de *Drosophila*, ens vam plantejar aprofitar la versatilitat d'aquest sistema per estudiar alguns dels aspectes funcionals de la presenilina *in vivo*. Fins ara, només s'han realitzat experiments de sobreexpressió de presenilina a l'ull (Ye and Fortini, 1999), i la sobreexpressió de presenilina d'efecte matern a l'embrió genera defectes causats per alteracions de la funció d'armadillo —la β -catenina de *Drosophila*—, que genera defectes en el tancament dorsal per alteracions en l'adhesió cel·lular mitjançades per les E-cadherines (Noll *et al.*, 2000). En la majoria dels estudis realitzats en *Drosophila* de pèrdua de funció de presenilina, s'observa el fenotip neurogènic, a causa de la inactivació de la via de Notch, i no s'han analitzat altres efectes fenotípics (Struhl and Greenwald, 1999; Ye *et al.*, 1999). Es va creure interessant realitzar experiments de sobreexpressió de presenilina en línia germinal i observar si la descendència presentava algun fenotip d'efecte matern. En el moment d'iniciar aquest treball en *Drosophila*, s'havia presentat el model segons el qual la presenilina podria estar implicada en el tall γ -secretasa de qualsevol proteïna transmembrana de tipus I amb el domini extracel·lular curt (Struhl and Adachi, 2000), i just s'acabava de publicar el tall γ -secretasa i la translocació al nucli del receptor tirosina-quinasa ErbB-4 (Ni *et al.*, 2001). Totes aquestes dades ens van encoratjar a iniciar un treball *in vivo* en *Drosophila*.

Els experiments en embrions de *Drosophila* de Struhl and Adachi, (2000) suggereixen que l'activitat presenilina- γ -secretasa pot actuar potencialment sobre diferents proteïnes transmembrana de tipus I, com ara el receptor Torso. En aquest treball, aquest receptor experimenta un tall de forma dependent de presenilina en la regió transmembrana, si s'expressa de forma adient, és a dir, amb un domini extracel·lular curt. Aquest receptor del tipus tirosina-quinasa, dipositat com a RNA missatger a l'embrió per la mare, és activat pel seu lligand en una finestra de temps molt determinada i regulada durant els primeres hores del desenvolupament embrionari de *Drosophila*, només en els pols anterior i posterior de l'embrió. La desregulació de la senyalització a partir de Torso genera malformacions de les estructures terminals de l'embrió que són fàcilment visibles en les preparacions de les cutícules dels embrions. Els mutants de pèrdua de funció de Torso no presenten les estructures terminals ni anteriors ni posteriors, tot i que els defectes són més visibles al pol posterior. A més a més, aquests embrions no arriben a l'estadi de larva i col·lapsen dins de l'ou. Pel que fa als fenotips de guany de funció s'observa una pèrdua gradual dels segments abdominals i toràcics, directament proporcional a la magnitud d'aquest guany de funció. Així doncs, el guany de funció total genera embrions que només presenten les estructures terminals (Casali, 1999).

Per la seva simplicitat i per obtenir fàcilment algunes dades sobre el mecanisme que podria estar afectat, es van realitzar experiments de sobreexpressió, ja que l'obtenció de clons mutants de presenilina de línia germinal, encara que molt més informativa, és molt més laboriosa. Si hagués estat pertinent, s'hauria encetat una nova línia de recerca.

Es va utilitzar el sistema Gal4-UAS per dirigir la sobreexpressió en un teixit concret. Així doncs, es van obtenir femelles que sobreexpressen presenilina en la línia germinal a partir de mosques que tenen insertat en el seu genoma diferents variants de presenilina sota el control de les seqüències UAS, on s'uneix el factor de transcripció Gal4. Aquestes mosques van ser amablement cedides pel Dr. Mark Fortini i van ser creuades amb mosques que contenen el factor de transcripció Gal4 sota el control d'un promotor específic de línia germinal, el promotor de la $\text{mat}\alpha$ tubulina 4. Aquestes mosques van ser amablement cedides pel Dr. Marc Furriols. Les línies de *Drosophila* analitzades contenen els següents al·lels de presenilina:

- psn+14 (presenilina silvestre, isoforma llarga amb l'exó 7)
- psn-14 (presenilina silvestre, isoforma curta amb l'*splicing* alternatiu de l'exó 7)
- psn N141I (mutació FAD)
- psn L235P (mutació FAD)
- psn E280A (mutació FAD)

El genotip de les diferents línies utilitzades es presenta en l'apartat de materials, i els creuaments realitzats per obtenir les femelles que sobreexpressen presenilina en la línia germinal es presenten en l'apartat de mètodes. Les femelles que es van recollir per analitzar-ne la descendència presentaven els genotips següents:

$$\frac{\pm ; Pw^+(\text{mat}\alpha 4\text{tub} > \text{Gal4-VP16\#67})}{+} ; \frac{UAS\text{-psn+14.1A}}{UAS\text{-tsl}}$$

$$\frac{\pm ; Pw^+(\text{mat}\alpha 4\text{tub} > \text{Gal4-VP16\#67})}{+} ; \frac{UAS\text{-psn-L235P}}{UAS\text{-tsl}}$$

$$\frac{\pm ; Pw^+(\text{mat}\alpha 4\text{tub} > \text{Gal4-VP16\#67})}{+} ; \frac{UAS\text{-tsl}}{UAS\text{-psn-14.1}} \quad ; \quad \frac{\pm ; Pw^+(\text{mat}\alpha 4\text{tub} > \text{Gal4-VP16\#67})}{+} ; \frac{TM3}{UAS\text{-psn-14.1}}$$

$$\frac{\pm ; Pw^+(\text{mat}\alpha 4\text{tub} > \text{Gal4-VP16\#67})}{+} ; \frac{UAS\text{-tsl}}{UAS\text{-psn-N141.I}} \quad ; \quad \frac{\pm ; Pw^+(\text{mat}\alpha 4\text{tub} > \text{Gal4-VP16\#67})}{+} ; \frac{TM3}{UAS\text{-psn-N141.I}}$$

$$\frac{UAS\text{-psn E280A}}{+} ; \frac{Pw^+(\text{mat}\alpha 4\text{tub} > \text{Gal4-VP16\#67})}{+} ; \frac{UAS\text{-tsl}}{+} \quad ;$$

$$\frac{UAS\text{-psn E280A}}{+} ; \frac{Pw^+(\text{mat}\alpha 4\text{tub} > \text{Gal4-VP16\#67})}{+} ; \frac{TM3}{+}$$

Aquestes femelles es van creuar amb mascles nascuts del mateix creuament, de manera que la presenilina sobreexpressada durant l'ovogènesi es diposita a l'embrió i poguem observar els efectes. El genotip dels mascles és, *a priori*, indiferent ja que la sobreexpressió es produeix a la línia germinal de les femelles. En tot cas, el genotip dels mascles és important si es vol observar l'efecte de la sobreexpressió en el zigot. Es va recollir la descendència de les femelles que sobreexpressen la presenilina en la línia germinal, així com de femelles control de l'efecte

de la construcció $\text{mat}\alpha 4\text{tub}>\text{Gal4-VP16}\#67$, que només presenten l'element P portador de GAL4-VP16 ($\text{Pw}^+(\text{mat}\alpha 4\text{tub}>\text{Gal4-VP16}\#67)$). Es van preparar les cutícules dels embrions i es van observar en el microscopi. Cal dir que, abans de la preparació de les cutícules ja s'havia observat el naixement de gran quantitat de larves, fet indicatiu que si hi ha efectes sobre la via de torso o sobre qualsevol altra via d'efecte matern, aquests no són letals en aquest estadi i són, per tant, lleus. En les cutícules dels embrions es poden observar els 8 segments abdominals i els 3 segments toràcics, així com els denticles ventrals, especialment en els segments abdominals. També es poden observar les estructures del pol posterior així com les del pol anterior.

La sobreexpressió de presenilina va produir, en general, embrions silvestres (figura 29 I). En alguns casos, es va observar la pèrdua del segment abdominal 4, amb diferents manifestacions, però es tracta de soroll de fons a causa del propi $\text{Pw}^+(\text{mat}\alpha 4\text{tub}>\text{Gal4-VP16}\#67)$, ja que les larves dipositades per les femelles control també presenten aquests defectes (figura 29 II). Un percentatge molt baix d'embrions (1-5%), presenten una forma corbada que, segons s'ha descrit, es pot produir per defectes en la retracció de la banda germinal. A més a més, presenten el cap notablement separat del tòrax, fet indicatiu que no s'ha donat la involució del cap (figura 29 III). Aquests defectes es van trobar en els embrions dipositats per les femelles portadores del transgen *psn-14.1* en el cromosoma III mentre que entre els embrions dipositats per les femelles que sobreexpressen la presenilina sense l'*splicing* alternatiu no se'n va trobar cap amb aquests fenotips. Els resultats que aquí es presenten són d'un sol experiment i molt preliminars, de manera que no es pot concloure inequívocament que aquest fenotip sigui específic d'isoforma. Les línies que sobreexpressen mutacions FAD també presenten aquests fenotips en molt baixa freqüència.

En general, els defectes que presenten els embrions afectats són la manca de retracció

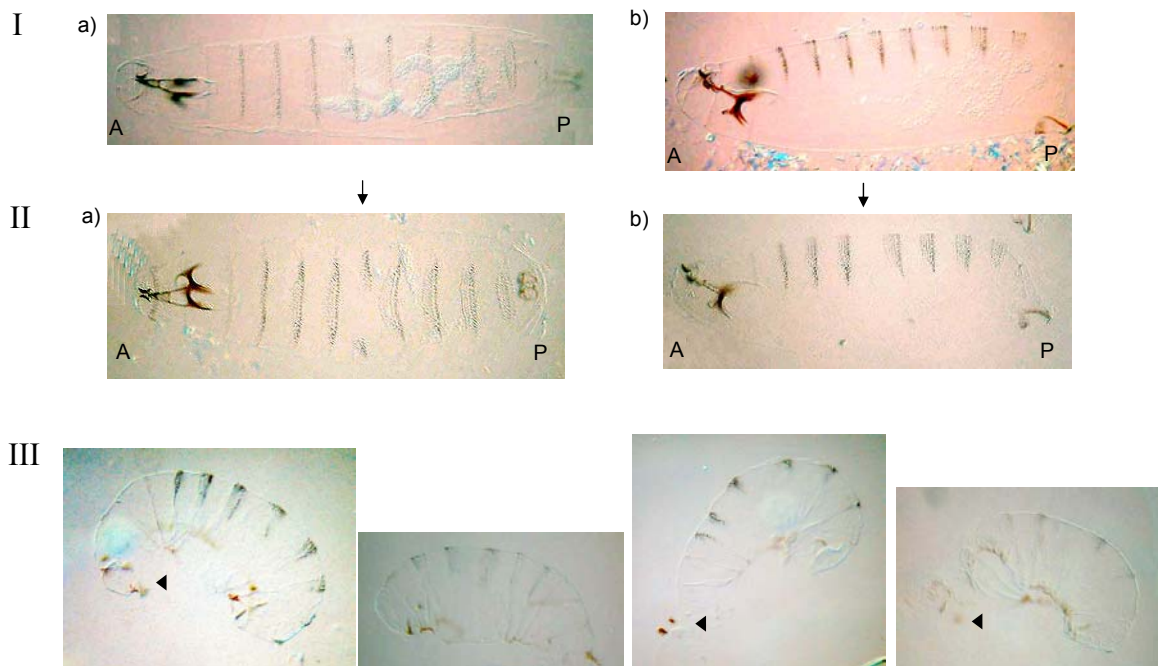


Figura 29. Cutícules d'embrions I) silvestres II) pèrdua total o parcial del segment abdominal 4 (fletxa) i III) fenotip observat (vista lateral) en els casos de mares que sobreexpressen les diferents versions de la presenilina. A) anterior P) posterior. a) vista ventral i b) vista lateral. El cap de fletxa assenyalat el cap que ha quedat separat del tòrax.

de la banda germinal i la manca d'involució del cap. La retracció de la banda germinal, GBR (de *germ band retraction*), és un procés morfogenètic que implica el moviment de cèl·lules epitelials a gran escala. Durant aquest procés, es formen els límits entre els segments toràcics i abdominals, en sentit antero-posterior, i el pol posterior de l'embrió es situa en la seva posició definitiva dins de l'ou. Recentment, s'ha implicat en aquest procés la formació d'*adherens junctions* entre la regió més caudal de l'embrió i la membrana dorsal de l'embrió anomenada amnioserosa. A més a més, intervindrien processos de canvi de la morfologia cel·lular així com moviments cel·lulars. No es coneixen en detall ni els elements cel·lulars ni les xarxes gèniques que intervien durant aquest procés (Schock and Perrimon, 2002). Pel que fa a la involució del cap, se sap que intervien processos d'apoptosi. D'altra banda, existeixen multitud d'interaccions genètiques i moleculars entre diferents processos que fan molt difícil establir, a partir d'un fenotip estudiat superficialment, les funcions que estan alterades.

La baixa freqüència a la qual es dona aquest fenotip ens va fer pensar que podria ser, en realitat, un efecte zigòtic. Per tal d'analitzar la descendència de les femelles que sobreexpressen les diferents variants de presenilina en la línia germinal, aquestes es van creuar amb mascles nascuts del mateix creuament, de manera que una part d'aquests mascles i, en alguns casos, tots ells si els pares o mares eren homozigots per la construcció UAS, eren portadors de la construcció UAS. Si el factor de transcripció GAL4-VP16 que s'ha sobreexpressat en la línia germinal és prou estable, pot activar el transgen dirigit per la caixa UAS en el zigot, de manera que es sobreexpressaria la presenilina en el zigot només en alguns embrions, i es generaria el fenotip observat en molt baixa freqüència (Dr. Enrique Martín Blanco, comunicació personal). Cal dir que, de vegades, els fenotips observats en experiments de sobreexpressió són causats per efectes secundaris, de manera que pot resultar molt difícil establir quin és el defecte primari i s'ha de ser molt cautelós a l'hora d'interpretar els resultats (Dr Marc Furriols, comunicació personal).

Aquests efectes a tan baixa freqüència podrien ser deguts també al fet que la sobreexpressió es produeix a partir d'una sola còpia del transgen. En els experiments de Ye and Fortini, (1999), on s'observa el fenotip de la sobreexpressió de presenilina a l'ull, les mosques portadores d'una sola còpia del transgen presenten un fenotip indistingible de les mosques silvestres. Les línies portadores dels transgens utilitzats en el nostre treball van ser cedides pels autors del treball anterior que, per obtenir un fenotip, van haver de treballar amb mosques portadores de dues còpies del transgen. Podria ser que la presència d'un sol transgen, conjuntament amb el fet que el promotor utilitzat, el de la α -tubulina, no és especialment fort comparat amb altres promotors de línia germinal com el de *nanos* utilitzat en el treball de la β -catenina (Noll *et al.*, 2000), generés una sobreexpressió insuficient per la manifestació d'un fenotip.

És interessant remarcar que en tots aquests experiments es produeix una sobreexpressió de la presenilina. Segons les dades de la literatura, la sobreexpressió de la presenilina exògena produeix un increment d'holoproteïna però no produeix un increment proporcional dels fragments endoproteolítics funcionals, degut a la presència d'un factor limitant que, actualment, se sap que podrien ser les proteïnes aph-1, pen-2 i nicastrina. Tot i que mai s'ha realitzat aquest tipus d'anàlisi en *Drosophila in vivo* és raonable pensar que, si els altres

components del complex presenilina- γ -secretasa són limitants, la sobreexpressió de presenilina holoproteïna no impliqui la sobreexpressió de presenilina funcional —com a mínim no de forma linial—, i no s'observi un fenotip relacionat amb un excés d'activitat presenilina- γ -secretasa. Podria ser per aquest motiu que Ye and Fortini, (1999) han de treballar amb mosques portadores de dues còpies del transgen. D'altra banda, s'ha observat, en alguns experiments, que un percentatge dels embrions que *a priori* haurien de presentar un fenotip letal produït per la manca de funció de presenilina materna i, consegüentment, de senyalització per la via de Notch, arriben a mosques adultes. Aquest fet es podria interpretar si es considera que la presenilina expressada en el zigot té la capacitat de rescatar la deficiència de presenilina materna, o bé si es considera que està intervenint algun altre factor desconegut (Ye and Fortini, 1999 i Fortini, 2002, comunicació personal).

Amb aquest tipus d'anàlisi es pretenien cercar noves dades sobre els efectes de la presenilina, a nivell sobretot de l'activitat γ -secretasa. Així doncs, en base a un nou candidat a substrat de la γ -secretasa es podrien dissenyar un nou conjunt d'experiments, tant *in vivo* en *Drosophila* com en les cèl·lules SL2. Els resultats obtinguts han estat molt poc informatius i no han obert una línia clara que fes possible acotar les funcions que estan alterades. Potser caldria, per determinar alguna afectació, realitzar alguna anàlisi a nivell més molecular o cel·lular d'aquests embrions.

1. LES APROXIMACIONS PER A L'ESTUDI D'INTERACCIONS PROTEÏNA-PROTEÏNA

La peculiar biologia cel·lular de les presenilines, amb la participació d'un factor desconegut limitant per a la seva estabilització i endoproteòlisi, així com la formació d'un complex d'alt pes molecular, ja apuntaven a que la presenilina no actua sola sinó que necessita altres acompanyants si més no, per ser estable dins la cèl·lula, i que la identificació d'aquestes proteïnes podia aportar nous indicis sobre la seva funció.

El coneixement de les xarxes d'interaccions proteïna-proteïna ha demostrat que molts processos cel·lulars *a priori* independents estan íntimament relacionats a través d'aquestes xarxes i que diferents vies de transducció de senyals comparteixen alguns dels seus elements. Aquests elements estan incorporats en complexos al voltant d'una proteïna reclutadora, *scaffolding protein*, que serveix de bastida per a la unió de diferents proteïnes a través de dominis d'interacció proteïna-proteïna. En són exemples la via de senyalització de les MAP quinases (*mitogen activated protein*) on les *scaffolding proteins* permeten reclutar, de forma específica, una sèrie de proteïnes senyalitzadores per formar determinats mòduls i generar respostes cel·lulars molt concretes. Una mateixa proteïna senyalitzadora pot estar implicada en diferents respostes cel·lulars, de manera que la resposta que es genera a partir d'un estímul depèn del reclutament d'uns elements o uns altres al voltant d'una *scaffolding protein* per generar un mòdul específic (van Drogen and Peter, 2002). A la via de les JNK (*jun* *kinases*) també actuarien proteïnes similars, així com en la formació de les vesícules de clatrina, on actuen multitud de proteïnes que s'unixen a la clatrina (*clatrin-binding proteins*). Aquestes dades indiquen, en definitiva, que l'estudi i el coneixement de les xarxes d'interacció proteïna-proteïna és imprescindible per entendre en profunditat moltes funcions cel·lulars, com és el cas de l'activitat γ -secretasa i les funcions de la presenilina.

1.1 El doble híbrid

La cerca de proteïnes que interaccionen amb la presenilina mitjançant el triatge de genoteques d'expressió pel sistema del doble híbrid, ha estat un abordatge molt utilitzat per determinar-ne la funció. De fet, és l'únic mètode àmpliament utilitzat i posat a punt per a la cerca de *partners* de proteïnes a nivell proteòmic, sense cap coneixement previ ni cap candidat conegut, però és de difícil aplicació en el cas de la presenilina. La dissecció de la presenilina en dominis hidrofílics per minimitzar la interferència de les regions hidrofòbiques en el transport de la proteïna de fusió cap al nucli cel·lular soluciona, en bona part, el problema de treballar amb una proteïna politòpica. Ha possibilitat, per exemple, la detecció de la interacció de la β -catenina, i tots es altres membres de la família, amb el gran *loop* citoplasmàtic.

A mida que s'ha ampliat el coneixement sobre la biologia cel·lular de les presenilines i sobre la seva participació en l'activitat γ -secretasa, ja sigui com a cofactor o com a activitat catalítica *per se*, la identificació dels membres del complex presenilina- γ -secretasa ha adquirit cada cop més rellevància. La caracterització dels seus components podria aportar la resposta definitiva sobre la naturalesa de la γ -secretasa. El mètode considerat més potent per a la

detecció d'interaccions proteïna-proteïna, el doble híbrid, no ha aportat cap dada sobre el complex γ -secretasa, demostrant així algunes de les seves limitacions. Els altres elements del complex γ -secretasa han estat caracteritzats mitjançant mètodes genètics (aph-1 i pen-2) i bioquímics-moleculars (aph-2 o nicastrina). En les nostres mans, però, la implementació del doble híbrid per a la cerca d'interaccions intramoleculars entre diferents dominis de la presenilina, determina una nova visió del complex γ -secretasa amb la presència de dues unitats de presenilina (dos NTFs i dos CTFs).

Així doncs, les limitacions de la tècnica del doble híbrid han quedat paleses en l'estudi d'interaccions entre proteïnes transmembrana. D'altra banda, sí que s'han identificat un elevat nombre d'interaccions utilitzant les diferents regions hidrofíliques citoplasmàtiques de la presenilina, generant un volum de dades difícils de situar en un context fisiològic. En aquest treball, el gran *loop* entre les transmembranes VI i VII (HL6) es va creure bon candidat, per la seva longitud i localització, a interaccionar amb altres proteïnes. Del triatge de 680.000 clons d'una genoteca d'expressió de cDNA d'adult de *Drosophila* no s'ha pogut caracteritzar cap clon que interaccioni de forma consistent amb aquesta regió hidrofílica (HL6) de la presenilina.

El clon de la proteïna 3 d'interacció amb la subunitat α de la caseïna quinasa II, *casein kinase II α -subunit-interactor protein 3* (CKII α i-3), és l'únic clon, de tots els aïllats en el triatge de la genoteca, mínimament prometedor. No és un típic fals positiu, capaç d'activar els gens *reporters* en presència de qualsevol proteïna fusionada al GAL4BD, ja que només els activa en presència de la fusió GAL4BD-HL6, i no d'altres, com la laminina humana. No es tracta tampoc d'un positiu real, doncs no activa la transcripció dels gens *reporters* independentment del promotor, sinó que requereix que les seqüències UAS es trobin en un context determinat. L'activació dels gens *reporters* només en presència de l'HL6 és indicatiu d'una certa especificitat. Les cerques en bases de dades, però, no van resultar encoratjadores per aprofundir en aquesta interacció. La CKII α i-3 va ser aïllada en una cerca també per doble híbrid de proteïnes que interaccionaven amb la caseïna quinasa II, per a la qual la CKII α i-3 té motius de fosforilació. El fet que s'hagi identificat prèviament per interacció amb altres proteïnes podria estar indicant que es tracta d'un fals positiu, és a dir, d'una proteïna amb gran capacitat d'interaccionar amb altres proteïnes quan s'expressen alhora, a causa de la presència de dominis d'interacció proteïna-proteïna. Aquest no semblava ser el cas d'aquest clon, doncs les cerques de motius coneguts no identificaven cap domini d'interacció proteïna-proteïna, però sí que identificaven una putativa senyal de localització al nucli del tipus bipartita. Aquest tipus de motiu pot ser fals també, doncs apareix sovint en les cerques *in silico*, encara que la proteïna no es localitzi al nucli. Si realment la seva localització és nuclear, es tracta d'una localització subcel·lular *a priori* incompatible amb una interacció amb la presenilina. Una altra estratègia per tractar de relacionar aquest clon amb la presenilina, és la cerca en les bases de dades d'alguna línia de *Drosophila* mutant per aquest gen, amb algun al·lel de guany o de pèrdua de funció, per determinar si el fenotip del mutant indica una possible interacció genètica amb la presenilina. Malauradament, no se'n va trobar cap. Així doncs, vam concloure que o bé es tractava d'una interacció artefactual, o bé la interacció era molt dèbil o làbil perquè només era detectable per un dels gens *reporters* i no per l'altre.

La manca de resultats positius consistents en el triatge de la genoteca de doble híbrid pot tenir diferents explicacions. D'una banda, es pot considerar que la genoteca, obtinguda d'individus adults de *Drosophila*, no sigui la més adient per cercar interaccions amb la presenilina. Els triatges exitosos amb les presenilines humanes s'han realitzat, la major part, utilitzant cDNAs de teixits cerebrals, tant fetals com adults i, en *Drosophila*, les genoteques utilitzades s'han construït a partir de teixits embrionaris. Pel que fa a l'expressió de presenilina, el seu RNA missatger es detecta en totes les etapes del desenvolupament excepte a pupa, i majoritàriament en els estadis embrionaris, on s'han realitzat la majoria d'estudis per hibridació *in situ whole mount*. És potser en aquests estadis que la presenilina i per tant, les seves interaccions, són més rellevants i on seria més probable trobar noves interaccions. N'és un exemple la β -catenina, que s'expressa en multitud de teixits durant el desenvolupament però que, en l'adult, només s'expressa en el cap i durant l'ovogènesi (*flybase*). D'altra banda, el nombre de 680.000 clons en el triatge pot resultar en certa manera escàs, sobretot si es considera que només una tercera part segueixen la pauta de lectura del GAL4BD, que no tots els clons estan igualment representats, i que pot ser que els cDNAs que codifiquen per les proteïnes interaccionants estiguin poc representats. Aquest conjunt de circumstàncies podrien haver contribuït a la manca de resultats d'aquest abordatge. Cal remarcar que l'ús d'una regió hidrofílica fora del seu context —entre dues regions transmembrana— podria dificultar la identificació de veritables positius perquè aquesta regió no adquireixi l'estructura secundària o terciària adient. En aquest sentit, s'ha de recordar que el *loop* hidrofílic HL6 és una de les seqüències evolutivament menys conservades de la presenilina, la qual cosa suggereix que la seqüència primària no és la responsable de la funció, sinó que pot ser el seu plegament, o una funció derivada, com ara la interacció amb una altra proteïna. La manca de conservació d'aquesta regió hidrofílica indica que no ha estat sotmesa a una forta pressió de selecció per constrenyiment funcional i que, per tant, la funció principal de la presenilina no rau en aquesta regió, que tindria un rol més aviat secundari.

Els resultats positius de la detecció d'interaccions entre regions de la presenilina que tenen dominis transmembrana indica que, si les proteïnes no queden retingudes en les membranes citoplasmàtiques, segurament no adopten la seva conformació fisiològica. Les proteïnes s'han de plegar de manera que les regions hidrofòbiques quedin encarades cap a l'interior de l'estructura i envoltades per fora per les regions hidrofíliques, que són les que entren en contacte amb les matrius citoplasmàtica i nuclear, de naturalesa hidrofílica. La sobreexpressió en el llevat de molècules de naturalesa hidrofòbica podria inhibir les interaccions que es produeixen en el medi hidrofòbic de la bicapa lipídica, en el cas que aquestes es produeixin, i afavorir la seva agregació en un medi hidrofílic, i generar interaccions artefactuals. Aquest inconvenient es solventa amb l'ús del sistema de la *split-ubiquitin* (vegeu més endavant).

La presenilina no es pot tractar com un tot en el sistema convencional del doble híbrid a causa de la presència de 10 regions hidrofòbiques, de les quals 8 són dominis transmembrana, ja que en cas de trobar interaccions, com ja hem esmentat abans, aquestes poden ser artefactuals. És, doncs, necessari disseccionar-la i treballar amb les regions hidrofíliques (*loops*) encara que això implica una pèrdua d'informació. En aquest treball, la

dissecció en dominis de la presenilina ha permès identificar l'homodimerització del *loop* hidrofílic HL1, entre els transmembranes I i II, dins del fragment NTF.

1.2 L'*split-ubiquitin*

La posta a punt de l'*split-ubiquitin* per a la seva aplicació en l'estudi de les interaccions intramoleculares de la presenilina ha representat un gran esforç, compensat, però, pel fet que és una alternativa molt informativa, complementària als estudis de doble híbrid. D'una banda, permet l'estudi de les interaccions entre proteïnes de membrana *in situ*, eliminant definitivament les limitacions causades per l'expressió ectòpica, a nivell subcel·lular, d'aquestes proteïnes. D'altra banda, sempre que es mantinguin els requisits topològics pel que fa a la localització del fragment aminoterminal de la ubiquitina (Nub) i del fragment carboxiterminal fusionat al factor de transcripció (Cub-PLV), tots dos encarats cap al citoplasma, permet realitzar, de la mateixa manera que el doble híbrid, deleccions seriades tant de les regions transmembrana com de les regions hidrofíliques (*loops*) per determinar-ne la contribució a les interaccions. A més a més, modificacions subtils en aquestes interaccions es poden quantificar en assajos d'activitat β -galactosidasa.

L'aplicació d'aquest sistema, posat a punt per l'estudi de proteïnes de llevat, va ser absolutament novedosa en el cas de la presenilina, ja que era el primer estudi realitzat amb proteïnes heteròlogues. Els nostres resultats, sobretot si considerem la interacció NTF:CTF, detectada mitjançant altres mètodes, validen l'*split-ubiquitin* per a l'estudi de proteïnes heteròlogues en el llevat.

Les proves i els controls duts a terme per posar a punt aquest sistema, indiquen que, quan s'expressa la fusió Cub-PLV a partir d'un plasmidi de còpia única, el soroll de fons és pràcticament nul. És a dir, la proteïna es localitza correctament dins de la membrana o orgànel·la corresponent, sense difusió directa i de forma artefactual al nucli de la proteïna mal plegada o no integrada a la membrana. L'homodimerització dels fragments NTF i CTF, així com de tota la presenilina, es va poder detectar inequívocament, fet que soluciona una de les crítiques intrínseques de la tècnica del doble híbrid: l'expressió d'aquests fragments en el seu medi natural ja no afavoreix la interacció ni l'agregació artefactual entre els dominis transmembrana hidrofòbics. Dins d'aquest tetràmer de presenilina, es produeixen diferents interaccions entre els dominis transmembrana, amb una contribució aparentment igual de cadascun d'ells, tal com demostra l'anàlisi de deleccions de dominis transmembrana del fragment NTF. En el cas de l'homodímer CTF:CTF, els dominis transmembrana són suficients perquè es produeixi la interacció. Segurament, les unions entre les regions transmembrana determinen l'estructura quaternària d'aquest complex dins la bicapa lipídica, de la mateixa manera que altres proteïnes transportadores amb diferents dominis transmembrana es localitzen formant un canal, fruit d'una determinada posició de cadascuna de les transmembranes que el delimiten.

En el capítol II d'aquest treball, s'ha provat d'aprofundir en el tetràmer de presenilina per l'anàlisi independent de cadascuna de les parts que el formen. En un primer nivell, s'han dividit i analitzat per separat cadascun dels homodímers (NTF:NTF i CTF:CTF) i l'heterodímer (NTF:CTF) i, ja en un segon nivell, s'ha estudiat la contribució de les diferents regions ja siguin

les hidrofíliques o les transmembranes, en aquestes interaccions. De tota aquesta anàlisi s'han extret una sèrie de conclusions que orienten treballs posteriors i aporten dades molt novadores sobre la presenilina en el complex presenilina- γ -secretasa, que poden tenir conseqüències importants en el seu coneixement global (vegeu l'apartat 2.2. d'aquesta discussió). L'estudi en més detall dels efectes de petites deleccions (substitució de l'HL1 per l'HL5) i de diferents mutacions puntuals ja és més difícil, o fins i tot impossible, d'interpretar en el sistema de l'*split-ubiquitin* en un organisme heteròleg com és el llevat, doncs la manca dels altres elements del complex γ -secretasa, del qual actualment ja se'n coneixen les característiques en més profunditat, implica una gran reducció d'una estructura molt complexa. En el moment d'iniciar aquest abordatge, no es coneixia la importància del complex com a unitat, de manera que *a priori* la interpretació dels resultats en un context on només es tenia en compte la presenilina no havia de ser especialment difícil. A més a més, cal considerar que, mitjançant aquest enfoc reduccionista, es pretenia determinar l'aportació de les diferents regions de la presenilina a les interaccions i els efectes causats per diferents mutacions en aquestes interaccions. Algunes d'aquestes mutacions, més que alterar les interaccions, podrien modificar la conformació de la presenilina, de manera que l'aplicació d'una metodologia per detectar i quantificar interaccions proteïna-proteïna ens dóna una informació que no es correspon amb les alteracions que s'estan produint (vegeu el capítol II).

Si les anàlisis en un sistema heteròleg com el llevat ja impliquen treure del seu context les interaccions —tot i que l'*split-ubiquitin* manté la localització subcel·lular—, en els estudis de la presenilina aquest problema és agreujat pel fet que la formació d'aquest complex d'alt pes molecular, amb la presència de, com a mínim, 4 proteïnes transmembrana diferents, té un rol crucial en la biologia cel·lular d'aquesta proteïna. Segurament, els altres elements d'aquest complex exerceixen un efecte modulador sobre les interaccions intramoleculares de la presenilina que determinen la formació d'un tetràmer. Tal com s'ha comentat anteriorment, la posta apunt d'un sistema homòleg per a detectar i quantificar aquestes interaccions podria ser molt informatiu, ja que, amb la presència dels altres components del complex d'alt pes molecular dins la cèl·lula, es podria formar l'estructura quaternària adient.

2. EL TETRÀMER DE PRESENILINA

2.1. Els resultats d'aquest treball

Els resultats d'aquest treball impliquen que els fragments endoproteolítics de la presenilina no només es troben com a heterodímers NTF:CTF, sinó que cada fragment NTF i CTF per separat forma homodímers NTF:NTF i CTF:CTF. La presenilina es troba doncs, en una conformació quaternària tetramèrica, considerant cada fragment com una unitat, o dimèrica, si considerem cada NTF:CTF com una unitat (figura 1).

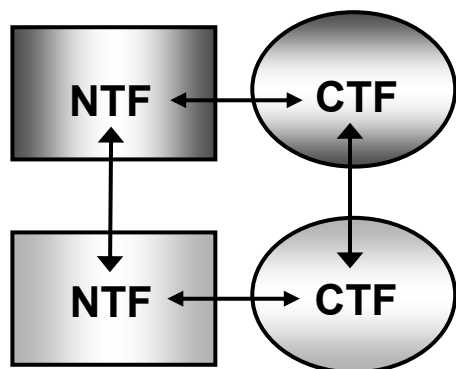


Figura 1. Representació del tetràmer de presenilina amb les interaccions intramoleculares: NTF:CTF, NTF:NTF i CTF:CTF.

En aquest tetràmer, els fragments CTF formen homodímers interaccionant a través dels seus dominis transmembrana i, en l'homodímer NTF:NTF, cap de les transmembranes no és imprescindible. D'aquesta manera, el pes de la interacció queda repartit entre totes elles, fet que suggereix que estan intervenint diverses interaccions entre les regions transmembrana per mantenir l'estructura del tetràmer. Dins d'aquest fragment NTF, el *loop* hidrofílic encarat cap al reticle endoplasmàtic i que connecta les transmembranes I i II forma també homodímers HL1:HL1, que no són estrictament imprescindibles per a la unió dels NTFs, però que podrien tenir un efecte molt important modulador o estèric en la conformació global de l'homodímer NTF:NTF. En aquest sentit, la substitució d'aquest *loop* de 32 aminoàcids, per un *loop* molt més petit, de 9 aminoàcids, determina un increment en la interacció dels NTFs. Malgrat això, aquest *loop* hidrofílic està extremadament conservat i s'hi concentren un elevat nombre de mutacions causants d'Alzheimer, si el comparem amb les altres regions hidrofíliques molt més grans (l'*N-loop*, a l'extrem aminoterminal i l'HL6, gran *loop* citoplasmàtic). Aquestes mutacions alteren la interacció de l'homodímer HL1:HL1 en un assaig de doble híbrid, fet indicatiu que les alteracions en aquesta interacció causades per les mutacions d'Alzheimer modifiquen, en última instància, l'especificitat del tall γ -secretasa. Aquest conjunt de dades derivades de la conservació de seqüència primària i de les mutacions FAD indiquen que l'HL1 exerceix alguna funció crítica en la conformació global del tetràmer, i que, a més a més, és imprescindible per l'endoproteòlisi de la presenilina en un sistema homòleg, les cèl·lules SL2.

2.2. Implicacions del tetràmer de presenilina en l'activitat γ -secretasa

De les nostres dades es dedueix que un complex de presenilina, format per dos fragments NTF i dos fragments CTF conté quatre residus aspàrtics, iguals dos a dos, en lloc dels dos residus descrits, l'aspàrtic 257 del transmembrana VI i l'aspàrtic 385 del transmembrana VII (numeració de la hPS1), de l'heterodímer. Si acceptem que la presenilina conté l'activitat catalítica γ -secretasa formada per un grup di-aspartil —les evidències a favor són ja molt consistents—, les dades d'aquest treball suggereixen un nou model d'activitat γ -secretasa, on la presenilina forma un tetràmer amb 4 residus catalítics que poden actuar de dos en dos per tallar dins dels dominis transmembrana de la β APP i del receptor Notch. Potencialment, els 4 residus catalítics poden generar 6 centres catalítics diferents, en funció de com es combinin dos a dos per formar els grups di-aspartil (figura 2). Clarament, aquesta hipòtesi soluciona molts dels dubtes sobre el mecanisme catalític de la γ -secretasa i reconcilia els defensors de la teoria "la

presenilina és la γ -secretasa productora de l'A β i del NICD" amb els defensors de la teoria "l'activitat productora de l'A β i la productora del NICD són diferents".

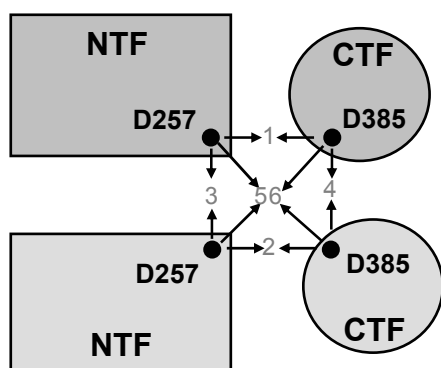


Figura 2. Esquema del model del tetràmer de presenilina on es representen els 6 possibles grups di-aspartil.

Quines implicacions té aquesta varietat de grups catalítics? A part de reconciliar les dues hipòtesis esmentades anteriorment, si s'examinen altres resultats inexplicats que posen en dubte la teoria "la presenilina és la γ -secretasa", es troba una interpretació compatible amb aquesta teoria. Abans que el tall ϵ de la β APP fos descrit, era difícil d'explicar com algunes mutacions causants d'Alzheimer inhibeixen la producció del NICD (Song *et al.*, 1999), i com determinats canvis d'aminoàcid en residus concrets (L286) produeixen efectes contraris sobre la producció de l'A β i del NICD, d'increment i d'inhibició gairebé total, respectivament (Kulic *et al.*, 2000). Amb la caracterització del tall ϵ de la β APP i, molt més recentment, l'S4 de Notch, aquesta controvèrsia queda parcialment resolta doncs el que és comparable, per la seva posició dins de la membrana plasmàtica, són les activitats productores del NICD i l'AICD, és a dir, el tall S3 i l' ϵ , i, per analogia l'S4 i el γ , respectivament. Efectivament, l'estudi exhaustiu de mutacions al residu L166 (hPS1), indica que les alteracions en la producció dels dominis intracel·lulars de Notch i de la β APP —tall S3 i ϵ , respectivament—, són en el mateix sentit, independentment de les alteracions en la producció de l'A β , produïda pel tall γ (Moehlmann *et al.*, 2002). És d'esperar doncs, que el nou tall S4 de Notch recentment caracteritzat, estigui alterat per les mutacions FAD, tal com s'ha demostrat en el treball de (Okochi *et al.*, 2002). Si es consideren els dos mecanismes per separat cal considerar dues activitats catalítiques diferents en una mateixa proteïna, fet possible i compatible amb el nostre model.

D'altra banda, l'activitat γ -secretasa pot tallar en diferents posicions dins de la regió transmembrana i les dades obtingudes fins ara semblen indicar que els substrats de la γ -secretasa són tallats en les dues posicions, γ i ϵ . Si es considera un sol grup di-aspartil, és difícil pensar que pugui actuar successivament sobre dues dianes diferents, però és molt més fàcil d'imaginar si considerem sis combinacions diferents de grups di-aspartil. De les dades obtingudes en aquest treball, es pot deduir un model en el qual unes parelles de residus aspàrtic concretes s'encarreguin de tallar en la posició γ (o S4), i unes altres parelles tallin en la posició ϵ (o S3). Un model similar a aquest que proposem i es dedueix del nostre treball ha estat proposat pel Dr. Kopan (R. Kopan 2002, comunicació personal). En cultius cel·lulars, s'afegeixen inhibidors específics de γ -secretasa que s'uneixen covalentment al centre actiu

diana. Recuperant després la molècula inhibidora, es pot trobar el centre catalític que ha estat inhibit. D'acord amb el nostre model, no recuperen només un heterodímer NTF:CTF, sinó que troben també dos fragments NTFs. A més a més, demostren per coimmunoprecipitació la formació de l'heterodímer NTF de hPS1 en cèl·lules de mamífer. Segons les seves dades, però, els dos residus aspàrtic 385 no formen un centre catalític, doncs no es recuperen junts aplicant aquesta estratègia experimental, i proposen l'existència d'una tríada de residus aspàrtics, que actuen de dos en dos i seqüencialment en la proteòlisi al lloc γ i ϵ , mentre que la funció del fragment CTF restant, que no forma part del lloc catalític, seria la de presentar el substrat. Segons els nostres resultats, els dos fragments CTF del tetràmer formen homodímers que podrien contribuir per igual en el centre catalític, i la presentació del substrats podria ser mediada per altres regions del NTF i del CTF tals com el *loop* hidrofílic aminoterminal (*N-loop*), o la regió C-terminal (*C-loop*). Aquestes dades, presentades molt recentment i no publicades encara, corroboren els resultats obtinguts en aquest treball.

Tal com s'apunta als resultats (vegeu apartat 3 del capítol III), a partir del model del tetràmer de presenilina amb 6 grups di-aspartil es poden hipotetitzar dos mecanismes diferents de tall presenilinas si aquesta activitat, tal com s'ha hipotetitzat, és autocatalítica. Suposant que els homodímers NTF:NTF i CTF:CTF es formin abans del tall endoproteolític —per l'heterodímer NTF:CTF ja ha estat demostrat (Saura *et al.*, 1999)— el tall presenilinas, produït per un dels grups di-aspartil, es podria donar en *cis*, és a dir, intramolecularment amb la intervenció d'un aspàrtic del NTF (D257, transmembrana VI) i de l'altre aspàrtic del CTF (D385, transmembrana VII); o en *trans*, amb la intervenció dels dos aspàrtics D257 i D385 de l'altra molècula de presenilina del tetràmer. Fins i tot es podria produir un tall mixt amb la intervenció d'un residu aspàrtic de cada presenilina tal com serien els grups di-aspartil 5 i 6 de la figura 2. Una possible activitat presenilinas dels di-aspartil 3 i 4 es pot descartar directament, doncs, si fos possible, les presenilines amb mutacions als residus D257 o D385 serien tallades pels residus aspàrtic funcionals restants, quan formessin el corresponent tetràmer, la qual cosa se sap que no succeeix.

De fet, aquesta hipòtesi del tall presenilinas en *trans* es va testar per coexpressió de diferents variants de la presenilina fusionades als epítops HA i c-myc. Malauradament, no va ser possible expressar adientment la presenilina fusionada a N-terminal amb c-myc, doncs forma agregats que impedeixen detectar l'holoproteïna i els fragments endoproteolítics, fet que ens fa sospitar que la presenilina amb aquest epítop no és funcional, a diferència de la presenilina fusionada a l'epítop HA. Malgrat tot, s'han obtingut indicis que la presenilina interna podria estar tallant la presenilina sobreexpressada a partir de l'expressió del plasmidi pSC-62, que correspon a la construcció pActPPA HA-PSN D461A. En condicions de sobrecàrrega o sobreexposició s'observa que aquesta mutació, utilitzada com a control negatiu d'endoproteòlisi, genera, inesperadament, una banda de la mateixa mida que el fragment HA-NTF generat a partir de la presenilina silvestre, i que podria ser una banda d'endoproteòlisi molt dèbil (vegeu resultats, capítol III, figures 24C i 26B). Atès que només s'immunodetecta la presenilina exògena, l'origen d'aquesta banda d'endoproteòlisi podria ser l'acció de la presenilina endògena residual, suposant que el desplaçament no sigui total, que hauria produït el tall presenilinas de la presenilina exògena mitjançant el seu grup di-aspartil, o en combinació amb els residus

aspàrtic 279 de la presenilina exògena. Evidentment, cal realitzar altres experiments per acabar de determinar si la nostra hipòtesi és certa (vegeu l'apartat 6 d'aquesta discussió).

2.3. El *loop* hidrofílic HL1 en el context del complex γ -secretasa

El *loop* hidrofílic HL1, situat en el fragment NTF, forma homodímers que no són imprescindibles per a la formació de l'homodímer NTF però, en canvi, la presència d'aquest HL1 és crítica per a la funció de la presenilina. A causa de l'acumulació en aquesta petita regió de multitud de mutacions causants d'Alzheimer que alteren aquest homodímer en un sistema heteròleg, creiem que la unió de dos HL1 dins del NTF:NTF és important per mantenir una conformació determinada. Els resultats de la substitució de l'HL1 per l'HL5 en l'homodímer NTF:NTF, ens fan pensar que la disposició a la bicapa lipídica del complex NTF:NTF està regulada en bona part per la interacció dels petits *loops* encarats cap a la llum del reticle endoplasmàtic dels dos NTFs. D'altra banda, no es pot descartar que aquesta regulació estigui mediada per altres proteïnes que interaccionen amb l'homodímer HL1.

Dins del model anterior, la disposició de les regions transmembranes entre elles ha d'estar ben regulada per mantenir unes distàncies i generar els espais que permeten l'arribada del substrat al lloc catalític. A més a més, pot ser que, si el substrat no es col·loca correctament respecte dels residus catalítics perquè la conformació de la presenilina ho impedeix, el tall es desplaci alguns residus. Alguns dels dominis de la presenilina podrien tenir alguna funció en el manteniment d'aquesta col·locació, fonamental per al correcte funcionament de la γ -secretasa, com seria el cas de l'HL1. En suport a aquesta hipòtesi, cal esmentar que la mutació E143K, causant d'Alzheimer, altera l'homodímer NTF:NTF, la interacció del qual té una tendència a disminuir, de forma molt subtil (vegeu la figura 14). En el sistema homòleg de cèl·lules SL2, la deleció de l'HL1 i la seva substitució per una regió hidrofílica de longitud molt inferior, inhibeixen el tall γ -secretasa. No es tenen més dades sobre si aquesta mutació produeix una alteració global en la formació del complex γ -secretasa (vegeu l'apartat 6 d'aquesta discussió), de manera que cal hipotetitzar sobre les diferents possibilitats. Aquesta regió podria actuar de manera anàloga al motiu PALP o a l'extrem més a C-terminal de la presenilina, i produir una desestabilització global del complex i una inhibició de l'endoproteòlisi de la presenilina (vegeu punt 2.5.), per un mecanisme desconegut fins ara. D'altra banda, si ens centrem en el tetràmer de presenilina, la deleció del *loop* HL1 podria alterar la formació de l'homodímer NTF:NTF i la consegüent interacció amb l'homodímer CTF:CTF, de manera que incapacitaria la presenilina per autoactivar-se mitjançant l'endoproteòlisi. Des d'una perspectiva més integradora, cal considerar que tots aquests fenòmens que aquí s'especulen segurament tenen conseqüències en la globalitat del complex presenilina- γ -secretasa, al qual hem de veure com un trencaclosques, les peces del qual estan íntimament relacionades i han d'encaixar d'una forma molt determinada per obtenir un conjunt totalment funcional.

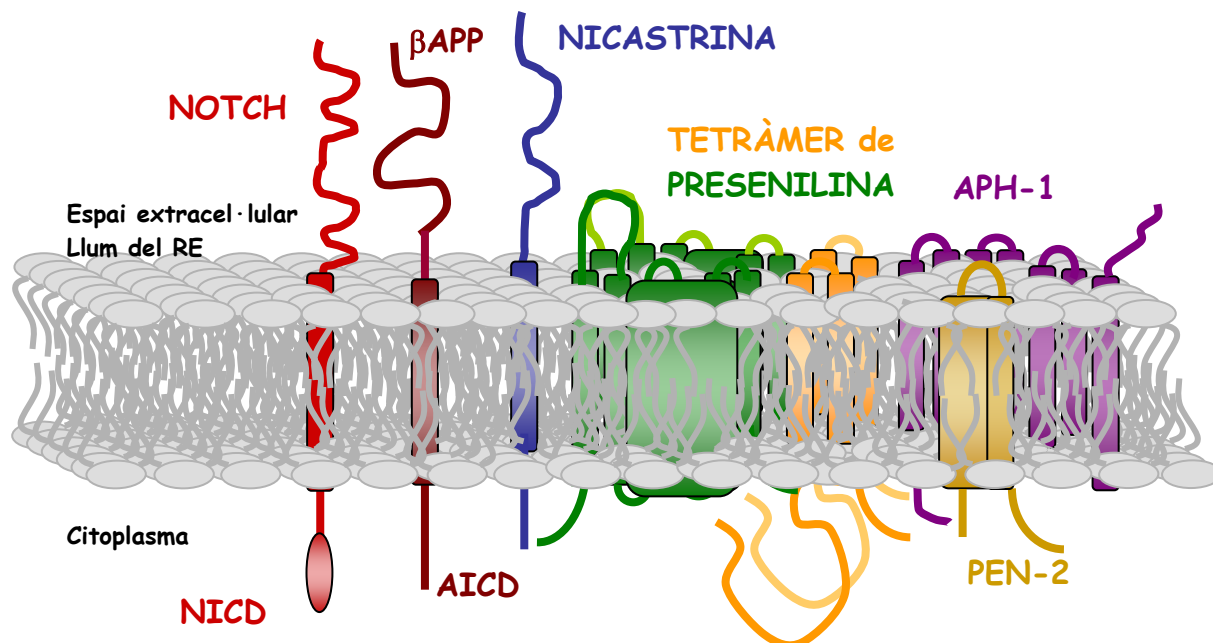


Figura 3. Esquema idealitzat dels components descrits fins ara del complex presenilina- γ -secretasa amb dos dels seus substrats. Les interaccions proteïna-proteïna, imprescindibles pel seu correcte acoblament, poden ser moltes, encara que aquí només és representa la interacció entre els HL1 de dues presenilines, caracteritzada en aquest treball.

2.4. El model del tetràmer i l'activitat presenilinasas

L'endoproteòlisi de la presenilina és un procés encara no ben caracteritzat, doncs no es coneix el motiu pel qual només es troben fragments NTF:CTF en el complex d'alt pes molecular amb activitat γ -secretasa. És evident que l'holoproteïna salvatge no és estable i no és funcional, però no es coneix en profunditat quin tipus de canvi conformacional, produït per l'endoproteòlisi, permet que la presenilina esdevingui estable. D'altra banda, se sap que la formació dels fragments endoproteolítics de la presenilina no és imprescindible per a la seva incorporació en el complex d'alt pes molecular i la seva funció, doncs la mutació $\Delta 9$, que només es presenta com a holoproteïna perquè la mutació implica la deleció de la seqüència de tall endoproteolític, és altament amiloïdògena i, per tant, funcional com a γ -secretasa.

El significat del tall endoproteolític és de gran importància pel nostre treball per dos motius: 1) les primeres dades que hem obtingut sobre el rol de l'HL1, apunten cap a un rol en la formació i potser també l'estabilització dels fragments endoproteolítics, 2) del model de la presenilina com a tetràmer s'extreu que el tall endoproteolític de la presenilinasas es pugui produir tant en cis (intramolecular, NTF:CTF de la mateixa presenilina) com en trans (intermolecular) (vegeu l'apartat 2.2.). La hipòtesi més plausible sobre el rol de l'endoproteòlisi, és un canvi de conformació que permet la interacció amb altres proteïnes del complex γ -secretasa, que, al seu torn, l'estabilitzen impedit la ràpida degradació via proteasoma. Aquest model està d'acord amb l'observació dels fragments endoproteolítics en un complex de pes molecular intermedi. L'endoproteòlisi de la presenilina, en la qual el gran *loop* citosòlic HL6 queda lliure respecte del NTF, seria un dels passos necessaris per a l'estabilització de la presenilina. En canvi, segons les dades de la literatura, no queda tan clar si les variants de

presenilina de laboratori que no s'endoproteolitzen, —però que mantenen l'HL6 ja que presenten mutacions en el lloc de tall presenilinas— mantenen la funció amiloïdògena i productora del NICD, ja que hi ha disparitat en les dades obtingudes en experiments realitzats *in vivo* en *C.elegans* (Jacobsen *et al.*, 1999) i les dades obtingudes respecte de PS1 i PS2, contràries també entre elles (Jacobsen *et al.*, 1999; Steiner *et al.*, 1999). Així doncs, no queda clar si la formació del complex- γ -secretasa funcional i l'endoproteòlisi de la presenilina són processos concomitants i mútuament necessaris, tot i que està completament acceptat que l'endoproteòlisi de la presenilina és un pas imprescindible en la seva estabilització (Ratovitski *et al.*, 1997).

Seria interessant comprovar si la substitució de l'HL1 per l'HL5, que inhibeix l'endoproteòlisi per un mecanisme diferent a les variants esmentades anteriorment —mutacions en el lloc de tall presenilinas— manté la funció amiloïdògena i productora del NICD o, al contrari, és inestable com altres variants de presenilina que tampoc no s'endoproteolitzen, com les mutacions en el motiu PALP (vegeu l'apartat 6 d'aquesta discussió).

3. MECANISME PATOGENIC DE LES MUTACIONS CAUSANTS D'ALZHEIMER

Especulant una mica més sobre aquest model, es pot hipotetitzar el mecanisme pel qual mutacions escampades per tota la proteïna acaben produint aquest fenotip. Si la presenilina actua com a tetràmer, amb la contribució dels residus aspàrtics de diferents molècules en l'activitat γ -secretasa, modificacions en l'estructura de l' α -hèlix transmembrana o altres conformacions que alterin la disposició global d'aquest complex, causades per mutacions puntuals de canvi d'aminoàcid, podrien modificar la preferència de tall γ -secretasa. Si una mutació puntual altera l'equilibri global en la col·locació del tetràmer de presenilina, per alteració de les interaccions i relacions intramoleculares entre tots els components, es pot modificar la preferència de tall si hi ha una major accessibilitat d'un nou lloc catalític, ara molt més disponible. D'aquesta manera, les mutacions causants de la malaltia d'Alzheimer, incrementarien l'accessibilitat de l'enllaç peptídic entre els residus 42 i 43 de l'A β . S'ha trobat una correlació entre la preferència de tall γ 42 de l'A β i la inhibició del tall S3 de Notch (Moehlmann *et al.*, 2002; Song *et al.*, 1999). Aquest fet és explicable si pensem que les mutacions FAD, alhora que varien la col·locació del complex enzimàtic i afavoreixen l'accessibilitat a l'enllaç peptídic entre els residus 42 i 43, impedeixen l'accessibilitat del grup di-aspartil encarregat de produir el tall ϵ , en l'enllaç peptídic entre els residus 49-50.

Aquest mecanisme de patogenicitat de les mutacions FAD, que en el paràgraf anterior es presenta des del punt de vista de les interaccions intramoleculares de la presenilina, es pot fer extensiu als altres components del complex. El treball de Francis *et al.*, (2002), indica que existeix un equilibri altament regulat amb al intervenció de 4 proteïnes, aph-1, pen-2, nicastrina i presenilina, imprescindibles per a la formació i maduració del complex γ -secretasa funcional. Les relacions entre els diferents components del complex segurament en determinen també l'acoblament global, la presentació del substrat al centre catalític de l'enzim, i l'accessibilitat del grup di-aspartil catalític al punt de tall. No es pot descartar doncs, que qualsevol alteració en la correcta formació d'aquest complex, es tradueixi en una preferència del tall γ entre els residus

42 i 43. Les mutacions causants d'Alzheimer podrien alterar subtilment aquesta estructura macromolecular a diferents nivells, com les interaccions intramoleculares de la presenilina, o les interaccions de la presenilina amb els altres components del complex, els quals ja s'ha demostrat que interaccionen directament.

Francis i col·laboradors dedueixen del seu treball que el complex funcional amb els quatre components es forma en dues fases. D'una banda, es produeix la interacció de la presenilina amb la nicastrina i, de l'altra, d'aph-1 i pen-2 que, en una segona fase, s'acoblaríen amb el complex presenilina-nicastrina, i afavoririen la seva maduració, acumulació i, probablement, localització funcional. La manca de colocalització d'aph-1 i pen-2 amb la presenilina i la nicastrina en la membrana plasmàtica indica que, un cop s'ha produït aquest complex i la seva maduració —recordem que la nicastrina es glicosila a l'aparell de Golgi—, aph-1 i pen-2 no són requerides pel seu transport (Francis *et al.*, 2002). Aquesta hipòtesi seria compatible amb la proposada anteriorment i implicaria una visió molt més dinàmica d'aquest complex presenilina- γ -secretasa, amb la participació transitòria de diferents components com aph-1 i pen-2 i potser d'altres encara no caracteritzats en les diferents etapes del seu metabolisme i transport. En aquest model, aph-1 i pen-2 serien xaperones encarregades del correcte acoblament del complex presenilina- γ -secretasa. Segons aquest model, el factor limitant per a l'endoproteòlisi de la presenilina, descrit en els primers treballs d'expressió exògena de la presenilina, podria ser la formació dels diferents complexos. L'excés de producció de la presenilina sobreexpressada no podria entrar al complex si els altres components, com ara la nicastrina, no s'expressen als mateixos nivells. Aquesta visió més dinàmica podria explicar per què s'han caracteritzat, en diferents treballs, complexos que contenen els fragments NTF i CTF de pesos moleculars molt diferents (150-180 kD, 250 kD, 1000 kD).

Els estudis enfocats a resoldre aquest problema de correlació mutació-disfunció, que mai ha estat abordat en profunditat, s'hauran d'enfrontar al problema de treballar amb canvis molt subtils. Tal com s'ha esmentat en l'apartat de resultats, no és difícil preveure que les mutacions causants d'Alzheimer, d'expressió fenotípica lleu, perquè no són deletèries, produeixen alteracions molt minses en la presenilina i, per extensió, en el complex enzimàtic presenilina- γ -secretasa. És per això que les aproximacions basades en l'estudi de cadascun dels elements per separat, com és el cas d'aquest treball, són sovint útils per determinar on s'estan produint les alteracions, i aleshores situar aquestes alteracions en el seu context global, i introduir canvis més deleteris per observar un efecte. Existeixen alguns exemples a la literatura de la dificultat que suposa l'estudi d'aquest tipus d'alteracions en complexos multiproteics com, per exemple, el de la proteïna ROM-1, que, conjuntament amb la periferina/rds, formen un complex oligomèric essencial per mantenir els discs membranosos de l'interior dels cons de la retina. La mutació R172W de ROM-1 associada a distròfia macular produeix, a nivell molecular, un canvi en la conformació de l'oligòmer tan subtil, que no és detectable ni per coimmunoprecipitació ni per immunodetecció dels complexos en condicions no reductores. Només s'ha visualitzat aquest canvi conformacional mitjançant digestió amb tripsina, a la qual són més sensibles els complexos que contenen la variant deletèria, fet que indica una compactació i estructuració defectuosa d'aquests (Naash 2002, comunicació personal). Aquest exemple il·lustra com, una mutació deletèria que actua amb dominància negativa, produeix un

efecte tan subtil en la conformació d'un complex multiproteic que no es detecta pels mètodes bioquímics convencionals.

4. ALTRES ASPECTES DEL COMPLEX PRESENILINA- γ -SECRETASA

Es coneixen una sèrie de modificacions en diferents regions de la presenilina que produeixen una desestabilització de la proteïna en tots els seus aspectes: no s'endoproteolitza, no forma el complex d'alt pes molecular i no té activitat γ -secretasa. Aquestes modificacions afecten bàsicament la regió C-terminal, concretament els darrers residus de la presenilina, i la regió del motiu PALP. Recentment, s'ha caracteritzat una nova regió en el fragment NTF de cinc aminoàcids, el motiu PALIY també altament conservat i molt proper a la regió de tall presenilinas, implicat com a mínim en l'endoproteòlisi de la presenilina (Laudon *et al.*, 2002). Amb el descobriment dels nous components del complex- γ -secretasa i de la seva importància en la seva correcta formació, es pot proposar que aquests residus estan implicats en les interaccions dins del complex necessàries per a la seva correcta formació.

Aquestes modificacions en la presenilina causen, probablement, efectes més deleteris que les mutacions FAD en el complex presenilina- γ -secretasa, ja que produeixen una pèrdua de funció total per desestabilització de la presenilina. Encara no s'ha determinat quins efectes produeixen aquestes mutacions sobre la maduració i el transport de la nicastrina, o si les interaccions amb els altres components, aph-1 i pen-2, estan alterades en el cas de les mutacions en el motiu PALP. La importància d'aquesta regió C-terminal en l'estabilitat de la presenilina i el fet que només s'hi hagi trobat una mutació causant d'Alzheimer suggereixen que aquesta regió és crucial perquè tingui lloc un dels passos essencials en la maduració de la presenilina, i que aquest pas en la maduració de la presenilina és especialment sensible a modificacions en aquesta regió C-terminal. En conjunt, aquesta regió podria estar implicada en la formació del complex amb aph-1 i pen-2, encara que no es pot descartar definitivament que, simultàniament, aquesta regió estigui interaccionant i modulant l'homodímer CTF:CTF. Aquestes alteracions, molt més greus que les produïdes per les mutacions FAD, representen una eina molt útil per dissecar el complex i determinar les regions importants en les interaccions amb aph-1 i pen-2 i, en definitiva, en la biologia cel·lular de la presenilina. Esperem que els estudis que molts investigadors deuen estar ja realitzant aportin noves dades sobre la mecànica de la formació del complex γ -secretasa i de la funció de cadascun dels seus components.

5. CONSIDERACIONS GENERALS

5.1. Les funcions de la presenilina

Sembla que la comunitat científica, en general, ha acceptat que la presenilina és la proteïna que té l'activitat γ -secretasa. Com a tal, forma part de la família que es coneix com a iCLPs (*intramembrane cleaving proteases*), responsables d'un mecanisme de senyalització anomenat RIP (*regulated intramembrane proteolysis*). La RIP, ara un mecanisme de

senyalització emergent, és un procés caracteritzat en tota l'escala evolutiva, des dels bacteris als humans, i és, per tant, un dels primers mecanismes d'activació de senyals per a la comunicació intercel·lular. A tall d'exemple, el bacteri gram negatiu *Providencia stuartii*, presenta la *quorum sensing*, un mecanisme de comunicació intercel·lular per determinar la mida de la població, mitjançat per RIP. Existeixen una sèrie de paral·lelismes sorprenents entre aquest mecanisme de senyalització bacterians i el mecanisme de senyalització dels lligands de l'EGF a *Drosophila*: la proteasa encarregada de dur a terme aquest tall proteolític dins de les membranes cel·lulars és, en tots dos casos, una serina proteasa de la família rhomboid.

Les quatre famílies de iCLIPs, presenilines, família S2P, rhomboids i SPP, comparteixen diverses característiques: 1) són proteïnes transmembrana politòpiques amb els residus catalítics localitzats a diferents regions transmembrana, amb el centre actiu situat dins la bicapa lipídica, 2) malgrat la divergència de seqüències tenen, totes elles, alguns residus conservats al voltant del centre catalític similars als altres proteases que presenten la mateixa classe mecànica i 3) són grans famílies de proteases presents des de procarïotes fins a humans. Aquestes dades suggereixen que la RIP és un mecanisme de senyalització molt ancestral que va evolucionar des de l'inici i s'ha adaptat en diferents organismes per regular una gran diversitat de processos biològics. Els mecanismes de RIP, que es van caracteritzar inicialment com a mecanismes de senyalització intracel·lular (S2P), s'ha vist que estan implicats tant en l'emissió de senyals com en la seva recepció (Urban and Freeman, 2002).

Dins d'aquest marc, la presenilina actua en diferents processos de senyalització intracel·lular. El nombre de substrats de la γ -secretasa està incrementant a gran velocitat, implicant a la presenilina en més processos de senyalització, la majoria dels quals encara no estan ben resolts. El que, en un principi, semblava un mecanisme restringit a la β APP i a Notch, s'ha convertit en una activitat enzimàtica senyalitzadora general, que podria modular diferents vies de transducció de senyals reguladores de diversos processos cel·lulars.

Quant a la funció de la presenilina en el metabolisme de la β -catenina, s'ha proposat que la presenilina actuaria com a *scaffolding protein*, de manera que seria el nexa d'unió entre dues fases de fosforilació seqüencials de la β -catenina. La β -catenina fosforilada és ràpidament ubiquïtinitzada i degradada via proteasoma, de manera que, en última instància, la presenilina actua regulant negativament la β -catenina (Kang *et al.*, 2002). Cal destacar que les funcions de la presenilina com a γ -secretasa i en el metabolisme de la β -catenina són separables, doncs la deleció del gran *loop* hidrofílic de la presenilina (HL6), domini d'unió de la β -catenina, no és imprescindible per a la seva funció com a γ -secretasa ni *in vivo* ni en cultius cel·lulars (Saura *et al.*, 2000; Xia *et al.*, 2001).

Les dades inicials sobre el rol de la presenilina en el transport intracel·lular d'altres proteïnes, com ara la β APP, han recuperat protagonisme a partir d'una sèrie d'observacions. D'una banda, la localització en la membrana plasmàtica de la nicastrina madura depèn de la presenilina, i viceversa. De l'altra banda, sembla que algunes variants mutants de presenilina, com per exemple la Δ TM1-2, acceleren el transport de la β APP cap a la superfície cel·lular (Leem *et al.*, 2002). A més a més, l'extrem amino-terminal de la β -APP interacciona amb la cadena lleugera de la quinesina, mecanisme pel qual es transporten unes vesícules que contenen

presenilina, BACE, β -APP i altres proteïnes que es localitzen a les terminals dels axons (Kamal *et al.*, 2001).

5.2. Qüestions per resoldre

La caracterització de noves iCLiPs (SPP) i altres proteases (TFPPs) amb un grup di-aspartil com a lloc catalític, sumat a les dades experimentals, deixen molts pocs dubtes sobre la hipòtesi "la presenilina és la γ -secretasa". En qualsevol cas, és important establir el mecanisme catalític de la presenilina- γ -secretasa per entendre el mecanisme patogènic de les mutacions FAD. La comprensió d'aquest mecanisme podria explicar els dubtes sobre el reconeixement de substrat, per determinar-ne l'especificitat, així com l'especificitat de tall, aspectes dels quals encara es té molt poca informació, ja que no es coneix el domini o potser la proteïna del complex que confereix l'especificitat de substrat a la γ -secretasa. S'ha hipotetitzat que qualsevol proteïna transmembrana de tipus I amb un domini extracel·lular curt és un putatiu substrat de la presenilina- γ -secretasa (Struhl and Adachi, 2000), fet que suggereix que el domini extracel·lular regula negativament l'activitat γ -secretasa per algun mecanisme totalment desconegut. A més a més, tots els substrats descrits fins ara experimenten *ectodomain shedding*, fet que indica que el tall γ -secretasa podria estar regulat per aquest tall proteolític previ. Així doncs, una de les qüestions que queden per resoldre és el mecanisme regulador de la γ -secretasa, així com el rol de l'*ectodomain shedding* en aquesta regulació.

El gran nombre de substrats de la γ -secretasa genera moltes preguntes sobre els senyals transduïts mitjançant la RIP d'aquestes proteïnes transmembrana de tipus I. Totes les dades presentades sobre els substrats de la γ -secretasa —CD44, ErbB-4, jagged, delta, syndecan i LRP— són molt recents, algunes ni tan sols han estat publicades. Segurament, un dels objectius de la recerca en aquest camp anirà dirigit cap a la cerca de les respostes cel·lulars mediades pels dominis intracel·lulars d'aquestes proteïnes, entre les quals figura la β APP.

El mecanisme patogènic de les mutacions causants d'Alzheimer encara no es comprèn perquè manca explicar com les mutacions escampades per tota la proteïna produeixen, totes elles, una subtil modificació en la preferència de tall dins del domini transmembrana de l' $A\beta$. En la figura 4, s'esquematitza aquesta problemàtica, representant la presenilina i la β APP amb les mutacions causants d'Alzheimer i la localització dels residus aspàrtic respecte dels talls γ i ϵ —s'ha de considerar que, segons el nostre model, no actuaria solament el grup di-aspartil representat a la figura sinó que, en conjunt, es poden formar sis grups di-aspartil—. D'altra banda, el complex γ -secretasa s'acaba de caracteritzar i, quan s'estudiï en més profunditat, es podrà entendre la biologia cel·lular tan peculiar d'aquestes proteïnes.

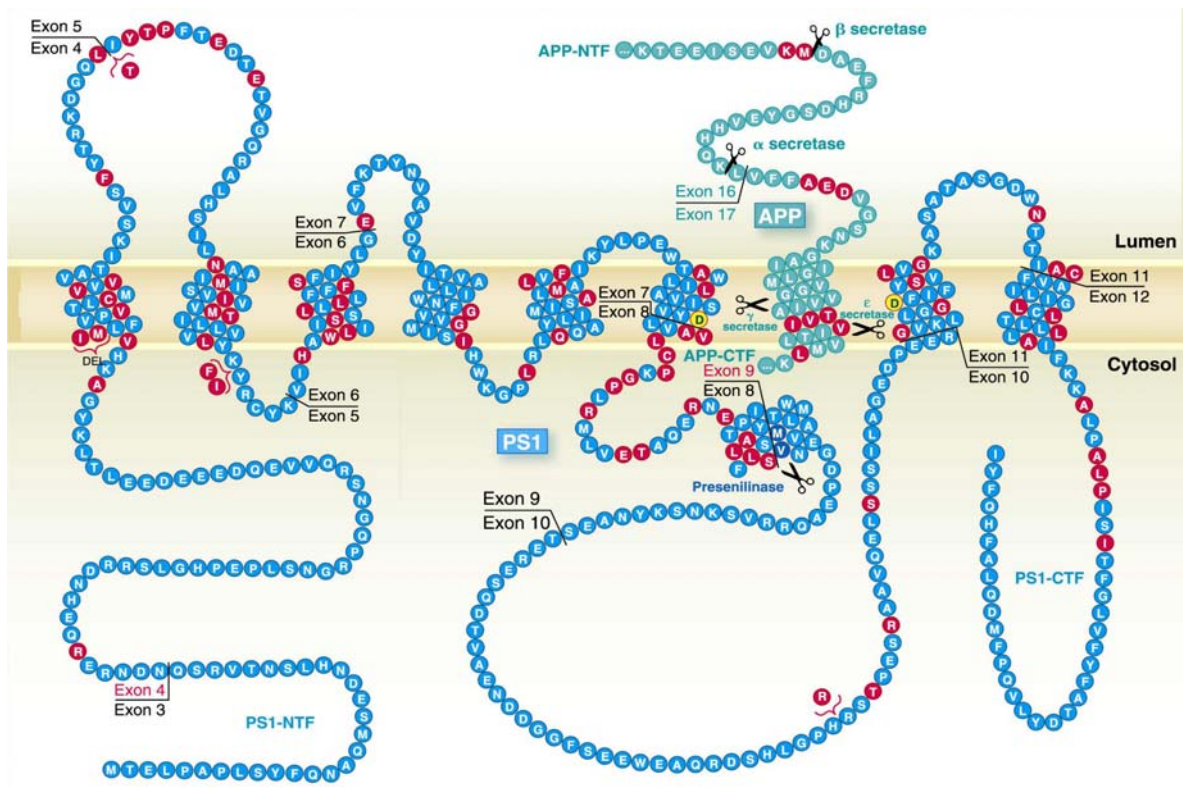


Figura 4. Producció d'Ab i de l'AICD pels talls γ i ϵ dins de la membrana pel grup di-aspartil de la presenilina- γ -secretasa. En vermell, mutacions FAD, les tisores indiquen els talls α -, β -, γ -, i ϵ - i el tall endoproteolític de la presenilina. En blau fosc, residus entre els quals es produeix l'endoproteòlisi i en groc, els residus aspàrtic que formen el grup di-aspartil (extret de Hardy and Selkoe, 2002).

La redundància funcional dels gens de les presenilines 1 i 2 en els mamífers no és un tema resolt. Se sap que existeix una redundància parcial de funció entre ambdues proteïnes, i que la PS1 és més essencial que la PS2 en les funcions de la γ -secretasa, però no es coneix si existeix una especificitat de substrat per cadascuna d'elles. Sembla que la PS1 actua de forma més imprescindible que la PS2 sobre els substrats de la γ -secretasa més ben estudiats: la β APP i Notch. Es pot hipotetitzar que, dins de l'elevat nombre de substrats de la γ -secretasa, alguns siguin tallats preferencialment per la PS2. Pel que fa a *C.elegans*, presenta tres presenilines, de les quals s'ha estudiat sobretot el seu rol en la via de Notch, molt ben coneguda a nivell fenotípic en aquest organisme. D'altra banda, la redundància funcional en aquest organisme no és extrapolable a la d'altres ja que presenten menys identitat aminoacídica entre elles, que sel-12 respecte de les presenilines dels altres organismes (Taula 3 de la introducció). Les evidències experimentals sobre les redundàncies funcionals de les presenilines de *C.elegans*, sobretot sel-12 i hop-1 —spe-4 és encara més divergent i sembla estar molt especialitzada—, no s'han d'aplicar automàticament en el cas d'altres organismes.

5.3. La presenilina com a diana terapèutica

La presenilina com a γ -secretasa és una de les possibles dianes terapèutiques per frenar l'acúmul del pèptid A β que es produeix en la malaltia d'Alzheimer. El fet de considerar la presenilina com a diana terapèutica porta implícit que l'A β és el desencadenant de tots els processos implicats en el desenvolupament de la malaltia d'Alzheimer. Tot i que la majoria de dades de la literatura apunta en aquest sentit, encara no està del tot resolta la controvèrsia entre els "taoistes" i els "baptistes", ja que la Tau continua tenint molt de pes en el desenvolupament de la malaltia d'Alzheimer. La hipòtesi de la cascada amiloide, *amyloid cascade hypothesis*, s'ha reforçat amb el descobriment de les presenilines i el seu rol en el metabolisme de l'A β . Tot i així, hi ha diversos arguments en contra d'aquesta hipòtesi que fan referència bàsicament a la manca de correlació entre l'aparició de les plaques amiloides, el seu nombre, i el tipus de manifestació de la malaltia (síntomes, edat d'aparició...). A més a més, no s'han demostrat *in vivo* els efectes neurotòxics de l'A β , i quina forma de l'A β de les que apareixen *in vivo* (monòmers, oligòmers i fibres insolubles) és exactament la neurotòxica, tot i que les darreres dades apunten cap als oligòmers d'A β com la principal forma neurotòxica. Els "baptistes" defensen que la malaltia d'Alzheimer es produeix per alteracions en el balanç entre la producció de l'A β i la seva eliminació (Hardy and Selkoe, 2002).

S'han desenvolupat inhibidors de la γ -secretasa amb finalitats terapèutiques però, donat que la γ -secretasa participa en la RIP de diverses proteïnes de la superfície cel·lular, no s'han arribat a realitzar assajos clínics en humans (Hardy and Selkoe, 2002). A més a més, els estudis en ratolins *knock-out* condicionals de *PS1*, als quals manca PS1 a l'escorça cerebral postnatal, demostren que la manca de la presenilina produeix un dèficit lleu en les funcions d'aprenentatge i de memòria, fet indicatiu que la presenilina mediatitza alguna funció sinàptica directa o indirectament. Aquestes dades indiquen que la inhibició de la presenilina per combatre la malaltia d'Alzheimer podria tenir altres efectes secundaris indesitjats (Yu *et al.*, 2001).

6. FEINA DE FUTUR A CURT-MIG PLAÇ

A partir dels resultats obtinguts en aquest treball es proposen una sèrie d'hipòtesis i de models, alguns dels quals es podrien provar aprofitant els sistemes d'expressió (amb un i dos cassettes) que s'han posat a punt en les cèl·lules SL2.

6.1. El tall presenilinas

Els resultats de l'expressió de variants de presenilina que no s'endoproteolisen amb cap dels sistemes de mamífer amb els quals s'ha treballat fins ara (mutació D461A), en el sistema de cèl·lules SL2, suggereixen que el tall endoproteolític de la presenilina, tal com proposem, es produeix per un grup di-aspartil format per dos residus aspàrtics dels quals, com a mínim un, no prové de la presenilina exògena que només té un residu aspàrtic funcional. En aquestes condicions, una certa quantitat de presenilina endògena no desplaçada per la sobreexpressió de l'exògena, seria la responsable de produir aquest tall.

Aquesta hipòtesi assumeix, entre altres coses, que la sobreexpressió de la presenilina no desplaça totalment l'endògena. Per tal de testar aquesta hipòtesi caldria realitzar una immunodetecció específica de la presenilina endògena, impossible en el nostre cas, ja que treballem amb un sistema homòleg. Caldria doncs, realitzar aquest mateix experiment en cèl·lules deficientes en presenilina. No s'ha establert cap línia de cèl·lules SL2 *psn*^{-/-} però, en canvi, s'ha observat que es poden obtenir cèl·lules SL2 *knock-out* transitòries mitjançant la tècnica d'interferència del RNA, coneguda com a RNAi. Ja s'ha demostrat que, en aquestes cèl·lules, es poden inhibir els gens endògens molt eficientment (Hu *et al.*, 2002). Per tal d'inhibir la producció endògena de presenilina específicament s'haurien de dissenyar els RNA de doble cadena contra els extrems 5' i 3' no traduïts del gen endogen, absents en la presenilina exògena. Per tal d'assegurar-nos que l'estem inhibint i que els RNAi sintetitzats funcionen correctament, caldria realitzar un *western blot* de les cèl·lules no transfectades amb un anticòs contra la presenilina de *Drosophila*.

Una manera *a priori* més eficient de testar aquesta hipòtesi és utilitzar el sistema de coexpressió a partir d'un sol plasmidi que hem posat a punt en aquest treball. Prèviament, caldria expressar la presenilina fusionada a altres epítops a l'extrem aminoterminal i mirar, per cadascun d'ells, si es produeix l'expressió de la presenilina i el tall endoproteolític. En cas de trobar algun epítop que no inhibeixi l'endoproteòlisi de la presenilina, es podria repetir, amb aquest nou epítop, l'estratègia de coexpressió ja provada amb l'epítop c-myc. A més a més, aquesta estratègia de coexpressió es podria combinar amb la inhibició mitjançant RNAi de la presenilina endògena.

6.2. El tetràmer en la proteòlisi de substrats de la γ -secretasa

Tal com s'ha dit a l'apartat 2.2, seria molt interessant observar si la formació d'un tetràmer de presenilina és imprescindible per l'endoproteòlisi dels substrats de la γ -secretasa, tant pel tall γ com pel tall ϵ . Aprofitant el sistema de coexpressió, es podrien cotransfectar diferents construccions de Notch i de la β APP i observar si es produeix el tall γ i ϵ per diferents presenilines amb mutacions als residus aspàrtic 279 i/o 461. En alguns dels treballs publicats, s'utilitzen sistemes d'expressió dels fragments de Notch i de la β APP de la longitud adient, sense el domini extracel·lular, i fusionats a C-terminal a diferents factors de transcripció quimèrics, com ara Gal4-VP16, que activen gens *reporters* del tipus luciferasa o β -galactosidasa sota el control de les seqüències UAS (Karlstrom *et al.*, 2002). Així doncs, caldria cotransfectar amb 3 plasmidis (dues presenilines, substrat i *reporter*), de manera que el nombre de cèl·lules no transfectades amb els tres plasmidis podria ser molt elevat i emascarar el resultat, ja que les cèl·lules tenen presenilina endògena que pot actuar sobre Notch i sobre la β APP. Per tal de minimitzar aquests efectes, es podria realitzar alhora la inhibició de la presenilina endògena mitjançant RNAi, o bé es podria obtenir una línia estable per algun dels plasmidis, com per exemple el plasmidi *reporter*, en la qual es transfectarien els altres plasmidis.

6.3. L'HL1

L'únic assaig realitzat en cèl·lules SL2 sobre la funció de l'HL1 en la biologia cel·lular de la presenilina, suggereix que està implicat en algun fenomen imprescindible perquè es produeixi l'endoproteòlisi. Es pot dir doncs, que la deleció d'aquest *loop* inhibeix l'activitat

presenilinas, però caldria determinar quin aspecte de la biologia cel·lular de les presenilines s'està alterant mitjançant una sèrie d'experiments.

Inicialment, es podria determinar la vida mitja de la presenilina amb l'HL1 substituït per un de més curt (HL1 per HL5), i comparar-la amb la de la presenilina silvestre. Es podria realitzar una extracció de presenilina en condicions natives i realitzar-ne una electroforesi del tipus *blue native* ja aplicada en altres treballs (Edbauer *et al.*, 2002), i una immunodetecció amb l'anticòs anti-HA per tal de determinar el pes molecular del complex en el qual s'incorpora i observar si experimenta alguna variació respecte de la presenilina silvestre. Existeix la possibilitat que, en el sistema de sobreexpressió transitòria que s'ha utilitzat fins ara, es produeixi una saturació del sistema i la presenilina silvestre exògena no s'incorpori en els complexos i no sigui funcional. Per estar-ne segurs, caldria comprovar que la presenilina, en el nostre sistema, presenta activitat γ -secretasa sobre els seus substrats fusionats a factors de transcripció que puguin activar gens *reporters*, tal com s'explica a l'apartat anterior. A més a més, caldria comprovar que s'incorpora en complexos d'alt pes molecular. En el cas que la presenilina exògena no sigui funcional, caldria realitzar transfeccions estables, doncs s'ha demostrat que mimetitzen molt millor les condicions fisiològiques, almenys pel que fa a la presenilina.

Tant si els resultats apunten que es tracta d'una variant de presenilina funcional o no, s'hauria de determinar acuradament el rol de l'HL1 en la funció presenilina γ -secretasa separant aquesta funció de l'endoproteòlisi. Per aconseguir-ho, s'hauria d'expressar la variant amb l'HL1 substituït per l'HL5 en un context d'holoproteïna funcional com seria la mutació $\Delta E9$. L'expressió d'una variant de presenilina $\Delta E9/HL1-5$, permetria determinar quines característiques moleculars i funcionals confereix aquesta substitució a una variant de presenilina funcional i estable, independentment de l'endoproteòlisi.

Seria interessant també realitzar la mateixa bateria d'experiments amb una presenilina que presenti l'HL1 substituït per un *loop* hidrofílic no relacionat d'una longitud similar, del qual ja s'hagi determinat que no forma homodímers, amb l'objectiu de determinar els efectes sobre la biologia cel·lular de la presenilina.

6.4. Localització subcel·lular

Pel que fa als experiments d'immunolocalització de la presenilina en les cèl·lules SL2, aquests són molt preliminars, i cal corroborar els resultats obtinguts. Existeixen altres molècules, a part de l'actina, detectada amb fal·loidina que s'uneixen a la membrana plasmàtica i potser ens permetria visualitzar la colocalització en aquest compartiment. D'altra banda, l'anticòs anti BiP/GRP78, una xaperona de reticle de mamífers, genera un senyal molt feble en les cèl·lules SL2. Seria més adient potser, utilitzar un epítot més universal, com ara el senyal de retenció KDEL, pel qual es disposa de diferents anticossos comercials.

Si mitjançant aquestes modificacions no s'observa presenilina a la superfície cel·lular, es podrien aplicar altres metodologies. Donat que la presenilina no presenta epítots extracel·lulars pels quals disposem d'anticossos, es podria aplicar l'estratègia, explicada a l'apartat corresponent (apartat 5, capítol III dels resultats), de marcatge de les proteïnes de la superfície cel·lular amb biotina.

Una immunolocalització més sensible ens permetria potser diferenciar entre la localització de diferents variants mutants de la presenilina, com ara el mutant que presenta l'HL1 substituït per l'HL5, que poguessin explicar el seu comportament diferencial respecte de l'endoproteòlisi.

CONCLUSIONS

1. Els dominis funcionals NTF i CTF de la presenilina interaccionen i formen un homodímer NTF:NTF i un homodímer CTF:CTF, alhora que un heterodímer o dos NTF:CTF. Aquestes unions impliquen que la presenilina funcional ha de formar un tetràmer amb dos fragments NTF i dos fragments CTF
2. La metodologia de la *split-ubiquitin* per detectar interaccions entre proteïnes transmembrana és aplicable a la presenilina i informativa per a disseccionar i analitzar diversos dominis de la presenilina
3. Les regions hidrofíliques situades entre els dominis transmembrana I i II de dues presenilines (HL1) interaccionen i contribueixen en la formació del tetràmer. La interacció entre dos HL1 és alterada per mutacions causants de la malaltia d'Alzheimer, fet que suggereix que l'HL1 té una funció rellevant per a l'activitat de la presenilina en el tall γ -secretasa
4. La substitució de l'HL1 dins de la presenilina per una altra regió hidrofílica de connexió entre regions transmembranes inhibeix l'endoproteòlisi d'aquesta en cèl.lules SL2, reforçant la importància d'aquesta regió per a la correcta funció/conformació de la presenilina
5. Modificacions en els extrems amino- i carboxi-terminal de la presenilina de *Drosophila* impedeixen la seva correcta expressió i detecció en cèl.lules SL2
6. L'expressió simultània de dues proteïnes a partir d'un plasmidi que conté dos *cassettes* d'expressió idèntics és possible en cèl.lules SL2 i permet la coexpressió i anàlisi funcional de dues presenilines diferents, de manera que s'evita el problema del desplaçament d'una presenilina per una altra en la formació del complex presenilina- γ -secretasa.

BIBLIOGRAFIA**A**

Anderton, B. H., Dayanandan, R., Killick, R. and Lovestone, S. (2000). Does dysregulation of the Notch and wingless/Wnt pathways underlie the pathogenesis of Alzheimer's disease? *Mol Med Today* 6,(2): 54-9.

Annaert, W. G., Esselens, C., Baert, V., Boeve, C., Snellings, G., Cupers, P., Craessaerts, K. and De Strooper, B. (2001). Interaction with telencephalin and the amyloid precursor protein predicts a ring structure for presenilins. *Neuron* 32,(4): 579-89.

Annaert, W. G., Levesque, L., Craessaerts, K., Dierinck, I., Snellings, G., Westaway, D., George, H. P., Cordell, B., Fraser, P. and De, S. B. (1999). Presenilin 1 controls gamma-secretase processing of amyloid precursor protein in pre-Golgi compartments of hippocampal neurons. *J Cell Biol* 147,(2): 277-94.

Armogida, M., Petit, A., Vincent, B., Scarzello, S., da Costa, C. A. and Checler, F. (2001). Endogenous beta-amyloid production in presenilin-deficient embryonic mouse fibroblasts. *Nat Cell Biol* 3,(11): 1030-3.

Ausubel, F. M. et al. Enzymatic cleavage of matrix-bound gst fusion proteins. Alternate protocol 2, *Current Protocols in Molecular Biology*, pp. 16.4.9.

B

Baki, L., Marambaud, P., Efthimiopoulos, S., Georgakopoulos, A., Wen, P., Cui, W., Shioi, J., Koo, E., Ozawa, M., Friedrich, V. L., Jr. and Robakis, N. K. (2001). Presenilin-1 binds cytoplasmic epithelial cadherin, inhibits cadherin/p120 association, and regulates stability and function of the cadherin/catenin adhesion complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98,(5): 2381-6.

Baumeister, R., Leimer, U., Zweckbronner, I., Jakubek, C., Grunberg, J. and Haass, C. (1997). Human presenilin-1, but not familial Alzheimer's disease (FAD) mutants, facilitate *Caenorhabditis elegans* Notch signalling independently of proteolytic processing. *Genes Funct* 1,(2): 149-59.

Berezovska, O., Jack, C., Deng, A., Gastineau, N., Rebeck, G. W. and Hyman, B. T. (2001). Notch1 and amyloid precursor protein are competitive substrates for presenilin1-dependent gamma-secretase cleavage. *J Biol Chem* 276,(32): 30018-23.

Berezovska, O., Jack, C., McLean, P., Aster, J. C., Hicks, C., Xia, W., Wolfe, M. S., Weinmaster, G., Selkoe, D. J. and Hyman, B. T. (2000a). Rapid Notch1 nuclear translocation after ligand binding depends on presenilin-associated gamma-secretase activity. *Ann N Y Acad Sci* 920: 223-6.

Berezovska, O., Jack, C., McLean, P., Aster, J. C., Hicks, C., Xia, W. M., Wolfe, M. S., Kimberly, W. T., Weinmaster, G., Selkoe, D. J. and Hyman, B. T. (2000b). Aspartate mutations in presenilin and gamma-secretase inhibitors both impair Notch1 proteolysis and nuclear translocation with relative preservation of Notch1 signaling. *J Neurochem* 75,(2): 583-93.

Blacker, D. and Tanzi, R. E. (1998). The genetics of Alzheimer disease: current status and future prospects. *Arch Neurol* 55,(3): 294-6.

Borchelt, D. R., Thinakaran, G., Eckman, C. B., Lee, M. K., Davenport, F., Ratovitsky, T., Prada, C. M., Kim, G., Seekins, S., Yager, D., Slunt, H. H., Wang, R., Seeger, M., Levey, A. I., Gandy, S. E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Price, D. L., Younkin, S. G. and Sisodia, S. S. (1996). Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* 17,(5): 1005-13.

Boulianne, G. L., Livne-Bar, I., Humphreys, J. M., Liang, Y., Lin, C., Rogaev, E. and St. George-Hyslop, P. (1997). Cloning and characterization of the *Drosophila* presenilin homologue. *NeuroReport* 810: 25-29.

Brown, M. S., Ye, J., Rawson, R. B. and Goldstein, J. L. (2000). Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 100,(4): 391-8.

Buxbaum, J. D., Choi, E. K., Luo, Y. X., Lilliehook, C., Crowley, A. C., Merriam, D. E. and Wasco, W. (1998). Calsenilin: A calcium-binding protein that interacts with the presenilins and regulates the levels of a presenilin fragment. *Nat Med* 4,(10): 1177-81.

C

Campion, D., Dumanchin, C., Hannequin, D., Dubois, B., Belliard, S., Puel, M., Thomas, A. C., Michon, A., Martin, C., Charbonnier, F., Raux, G., Camuzat, A., Penet, C., Mesnage, V., Martinez, M., Clerget, D. F., Brice, A. and Frebourg, T. (1999). Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: Prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am J Hum Genet* 65,(3): 664-70.

Cao, X. and Sudhof, T. C. (2001). A transcriptionally active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293,(5527): 115-20.

Capell, A., Grunberg, J., Pesold, B., Diehlmann, A., Citron, M., Nixon, R., Beyreuther, K., Selkoe, D. J. and Haass, C. (1998). The proteolytic fragments of the Alzheimer's disease-associated presenilin-1 form heterodimers and occur as a 100-150-kDa molecular mass complex. *J. Biol. Chem.* 273,(6): 3205-11.

Capell, A., Steiner, H., Romig, H., Keck, S., Baader, M., Grim, M. G., Baumeister, R. and Haass, C. (2000). Presenilin-1 differentially facilitates endoproteolysis of the beta-amyloid precursor protein and Notch. *Nat Cell Biol* 2,(4): 205-11.

Casali, A. (1999), Caracterització del producte del gen trunk i el seu paper en l'activitat del gen torso a *Drosophila*. *Departament de Genètica*, Universitat de Barcelona.

Chan, S. L., Mayne, M., Holden, C. P., Geiger, J. D. and Mattson, M. P. (2000). Presenilin-1 mutations increase levels of ryanodine receptors and calcium release in PC12 cells and cortical neurons. *J Biol Chem* 275,(24): 18195-200.

Checler, F. (2001). The multiple paradoxes of presenilins. *J Neurochem* 76,(6): 1621-7.

Chen, F., Yu, G., Arawaka, S., Nishimura, M., Kawarai, T., Yu, H., Tandon, A., Supala, A., Song, Y. Q., Rogaeva, E., Milman, P., Sato, C., Yu, C., Janus, C., Lee, J., Song, L., Zhang, L., Fraser, P. E. and St George-Hyslop, P. H. (2001). Nicastrin binds to membrane-tethered Notch. *Nat Cell Biol* 3,(8): 751-4.

Chung, H. M. and Struhl, G. (2001). Nicastrin is required for Presenilin-mediated transmembrane cleavage in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* 3,(12): 1129-32.

- Citron, M., Diehl, T. S., Gordon, G., Biere, A. L., Seubert, P. and Selkoe, D. J. (1996). Evidence that the 42- and 40-amino acid forms of amyloid beta protein are generated from the beta-amyloid precursor protein by different protease activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93,(23): 13170-5.
- Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson, W. K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., Kholodenko, D., Motter, R., Sherrington, R., Perry, B., Yao, H., Strome, R., Lieberburg, I., Rommens, J., Kim, S., Schenk, D., Fraser, P., St, G. H. P. and Selkoe, D. J. (1997). Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med* 3,(1): 67-72.
- Cols, N., Marfany, G., Atrian, S. and González-Duarte, R. (1993). Effect of site-directed mutagenesis on conserved positions of *Drosophila* alcohol dehydrogenase. *FEBS letters* 319,(1): 90-94.
- Collet, J., Garcia-Fernández, J. and Marfany, G. (1997). Plasmid DNA small-scale preparation based on nuclease inactivation by diethylpyrocarbonate. *TTO* 1,(24): T01207.
- Cook, D. G., Forman, M. S., Sung, J. C., Leight, S., Kolson, D. L., Iwatsubo, T., Lee, V. M. and Doms, R. W. (1997). Alzheimer's A beta(1-42) is generated in the endoplasmic reticulum/intermediate compartment of NT2N cells. *Nat Med* 3,(9): 1021-3.
- Cotman, C. W. (1998). Apoptosis Decision Cascade and Neuronal Degeneration in Alzheimer's Disease. *Neurobiol Aging* 19,(1S): S29-S32.
- Crook, R., Verkoniemi, A., Perez-Tur, J., Mehta, N., Baker, M., Houlden, H., Farrer, M., Hutton, M., Lincoln, S., Hardy, J., Gwinn, K., Somer, M., Paetau, A., Kalimo, H., Ylikoski, R., Poyhonen, M., Kucera, S. and Haltia, M. (1998). A variant of Alzheimer's disease with spastic paraparesis and unusual plaques due to deletion of exon 9 of presenilin 1. *Nat Med* 4,(4): 452-5.
- Cruts, M. (1998). Presenilin Mutations In Alzheimer's Disease. *Hum Mut* 11: 183-90.
- Cruts, M. (1999). Alzheimer disease mutation database. <http://molgen-www.uia.ac.be/ADMutations/>
- Cruts, M., Hendriks, L. and Van, B. C. (1996). The presenilin genes: a new gene family involved in Alzheimer disease pathology. *Hum Mol Genet* 5: 1449-55.
- Cruts, M., van, D. C., Backhovens, H., Van, d. B. M., Wehnert, A., Serneels, S., Sherrington, R., Hutton, M., Hardy, J., St, G. H. P., Hofman, A. and Van, B. C. (1998). Estimation of the genetic contribution of presenilin-1 and -2 mutations in a population-based study of presenile Alzheimer disease. *Hum Mol Genet* 7,(1): 43-51.
- Cummings, J. L. and Cole, G. (2002). Alzheimer Disease. *JAMA* 287,(18): 2335-38.
- Cupers, P., Bentahir, M., Craessaerts, K., Orlans, I., Vanderstichele, H., Saftig, P., De Strooper, B. and Annaert, W. (2001a). The discrepancy between presenilin subcellular localization and {gamma}-secretase processing of amyloid precursor protein. *J Cell Biol* 154,(4): 731-40.
- Cupers, P., Orlans, I., Craessaerts, K., Annaert, W. and De Strooper, B. (2001b). The amyloid precursor protein (APP)-cytoplasmic fragment generated by gamma-secretase is rapidly degraded but distributes partially in a nuclear fraction of neurones in culture. *J Neurochem* 78,(5): 1168-78.

D

Davis, J. A., Naruse, S., Chen, H., Eckman, C., Younkin, S., Price, D. L., Borchelt, D. R., Sisodia, S. S. and Wong, P. C. (1998). An Alzheimer's disease-linked PS1 variant rescues the developmental abnormalities of PS1-deficient embryos. *Neuron* 20,(3): 603-9.

De Jonghe, C., Cruts, M., Rogaeva, E. A., Tysoe, C., Singleton, A., Vanderstichele, H., Meschino, W., Dermaut, D., Vanderhoeven, I., Backhovens, H., Vanmechelen, E., Morris, C. M., Hardy, J., Rubinsztein, D. C., St George-Hyslop, P. H. and Van Broeckhoven, C. (1999). Aberrant splicing in the presenilin-1 intron 4 mutation causes presenile Alzheimer's disease by increased A beta 42 secretion. *Hum Mol Genet* 8,(8): 1529-40.

De Strooper, B. and Annaert, W. (2000). Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci* 113,(11): 1857-70.

De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Schrijvers, V., Wolfe, M. S., Ray, W. J., Goate, A. and Kopan, R. (1999). A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398,(6727): 518-22.

De Strooper, B., Beullens, M., Contreras, B., Levesque, L., Craessaerts, K., Cordell, B., Moechars, D., Bollen, M., Fraser, P., George-Hyslop, P. S. and Van Leuven, F. (1997). Phosphorylation, subcellular localization, and membrane orientation of the Alzheimer's disease-associated presenilins. *J Biol Chem* 272,(6): 3590-8.

De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., Von, F. K. and Van, L. F. (1998). Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 391,(6665): 387-90.

Dermaut, B., Theuns, J., Sleegers, K., Hasegawa, H., Van den Broeck, M., Vennekens, K., Corsmit, E., St George-Hyslop, P., Cruts, M., van Duijn, C. M. and Van Broeckhoven, C. (2002). The gene encoding nicastrin, a major gamma-secretase component, modifies risk for familial early-onset Alzheimer disease in a Dutch population-based sample. *Am J Hum Genet* 70,(6): 1568-74.

Dewji, N. N. and Singer, S. J. (1997). The seven-transmembrane spanning topography of the Alzheimer disease-related presenilin proteins in the plasma membranes of cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94,(25): 14025-30.

Doan, A., Thinakaran, G., Borchelt, D. R., Slunt, H. H., Ratovitsky, T., Podlisny, M., Selkoe, D. J., Seeger, M., Gandy, S. E., Price, D. L. and Sisodia, S. S. (1996). Protein topology of presenilin 1. *Neuron* 17,(5): 1023-30.

Donoviel, D. B., Hadjantonakis, A. K., Ikeda, M., Zheng, H., Hyslop, P. S. and Bernstein, A. (1999). Mice lacking both presenilin genes exhibit early embryonic patterning defects. *Genes Dev* 13,(21): 2801-10.

Doolittle, R. F. (1986). Of URFS AND ORFS. A primer on how to analyze derived amino acid sequences. University Science Books.

Drouet, B., Pincon, R. M., Chambaz, J. and Pillot, T. (2000). Molecular basis of Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci* 57,(5): 705-15.

Duff, K., Eckman, C., Zehr, C., Yu, X., Prada, C. M., Perez-tur, J., Hutton, M., Buee, L., Harigaya, Y., Yager, D., Morgan, D., Gordon, M. N., Holcomb, L., Refolo, L., Zenk, B., Hardy, J.

and Younkin, S. (1996). Increased amyloid-beta₄₂(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* 383,(6602): 710-3.

Dumanchin, C., Czech, C., Campion, D., Cuif, M. H., Poyot, T., Martin, C., Charbonnier, F., Goud, B., Pradier, L. and Frebourg, T. (1999). Presenilins interact with Rab11, a small GTPase involved in the regulation of vesicular transport. *Hum Mol Genet* 8,(7): 1263-69.

E

Ebinu, J. O. and Yankner, B. A. (2002). A RIP tide in neuronal signal transduction. *Neuron* 34,(4): 499-502.

Edbauer, D., Winkler, E., Haass, C. and Steiner, H. (2002). Presenilin and nicastrin regulate each other and determine amyloid beta-peptide production via complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99,(13): 8666-71.

Esler, W. P., Das, C., Campbell, W. A., Kimberly, W. T., Kornilova, A. Y., Diehl, T. S., Ye, W., Ostaszewski, B. L., Xia, W., Selkoe, D. J. and Wolfe, M. S. (2002). Amyloid-lowering isocoumarins are not direct inhibitors of gamma-secretase. *Nat Cell Biol* 4,(5): E110-1.

Esler, W. P., Kimberly, W. T., Ostaszewski, B. L., Diehl, T. S., Moore, C. L., Tsai, J. Y., Rahmati, T., Xia, W. M., Selkoe, D. J. and Wolfe, M. S. (2000). Transition-state analogue inhibitors of gamma-secretase bind directly to presenilin-1. *Nat Cell Biol* 2,(7): 428-434.

Esler, W. P. and Wolfe, M. S. (2001). A portrait of Alzheimer secretases--new features and familiar faces. *Science* 293,(5534): 1449-54.

Ezquerro, M. (2000). Factores genéticos asociados a la enfermedad de Alzheimer en la población española, *Servei de Genètica, IDIBAPS, Universitat de Barcelona*.

F

Fortini, M. E. (2001). Notch and Presenilin: a proteolytic mechanism emerges. *Curr Opin Cell Biol* 13,(5): 627-34.

Fortini, M. E. (2002). Signalling: gamma-Secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3,(9): 673-84.

Francis, R., McGrath, G., Zhang, J., Ruddy, D. A., Sym, M., Apfeld, J., Nicoll, M., Maxwell, M., Hai, B., Ellis, M. C., Parks, A. L., Xu, W., Li, J., Gurney, M., Myers, R. L., Himes, C. S., Hiesch, R., Ruble, C., Nye, J. S. and Curtis, D. (2002). aph-1 and pen-2 Are Required for Notch Pathway Signaling, gamma-Secretase Cleavage of betaAPP, and Presenilin Protein Accumulation. *Dev Cell* 3,(1): 85-97.

Fraser, P. E. (1998). Presenilin 1 is Actively Degraded by the 26S Proteasome. *Neurobiol Aging* 19,(1S): S19-S20.

Fraser, P. E. and St George-Hyslop, P. H. (1998). Mutations in three genes are associated with early onset Alzheimer's disease in Haass, C. (Ed), *Molecular Biology of Alzheimer's Disease. Genes and Mechanisms Involved in Amyloid Generation*, Harwood Academic Publishers.

G

Georgakopoulos, A., Marambaud, P., Efthimiopoulos, S., Shioi, J., Cui, W., Li, H. C., Schutte, M., Gordon, R., Holstein, G. R., Martinelli, G., Mehta, P., Friedrich, V. L., Jr. and Robakis, N. K. (1999). Presenilin-1 forms complexes with the cadherin/catenin cell-cell adhesion system and is recruited to intercellular and synaptic contacts. *Mol Cell* 4,(6): 893-902.

Goate, A. M. (1998). Monogenetic determinants of Alzheimer's disease: APP mutations. *Cell Mol Life Sci* 54,(9): 897-901.

Goodbourn, S. (1995). Notch takes a short cut. *Nature* 377,(6547): 288-9.

Greenfield, J. P., Tsai, J., Gouras, G. K., Hai, B., Thinakaran, G., Checler, F., Sisodia, S. S., Greengard, P. and Xu, H. X. (1999). Endoplasmic reticulum and trans-Golgi network generate distinct populations of Alzheimer beta-amyloid peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 96,(2): 742-7.

Grigorenko, A. P., Moliaka, Y. K., Korovaitseva, G. I. and Rogaev, E. I. (2002). Novel class of polytopic proteins with domains associated with putative protease activity. *Biochemistry (Mosc)* 67,(7): 826-35.

Grimm, M. O., Tomic, I. and Hartmann, T. (2002). Potential external source of A β in biological samples. *Nat Cell Biol* 4,(7): E164-5.

Grunberg, J., Walter, J., Loetscher, H., Deuschle, U., Jacobsen, H. and Haass, C. (1998). Alzheimer's disease associated presenilin-1 holoprotein and its 18-20 kDa C-terminal fragment are death substrates for proteases of the caspase family. *Biochemistry* 37,(8): 2263-70.

Gu, Y., Misonou, H., Sato, T., Dohmae, N., Takio, K. and Ihara, Y. (2001). Distinct intramembrane cleavage of the {beta}-amyloid precursor protein family resembling {gamma}-secretase-like cleavage of Notch. *J Biol Chem* 276,(38): 35235-8.

Guo, Q., Christakos, S., Robinson, N. and Mattson, M. P. (1998). Calbindin D28k blocks the proapoptotic actions of mutant presenilin 1: reduced oxidative stress and preserved mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95,(6): 3227-32.

Guo, Q., Furukawa, K., Sopher, B. L., Pham, D. G., Xie, J., Robinson, N., Martin, G. M. and Mattson, M. P. (1996). Alzheimer's PS-1 mutation perturbs calcium homeostasis and sensitizes PC12 cells to death induced by amyloid beta-peptide. *Neuroreport* 8,(1): 379-83.

Guo, Q., Sopher, B. L., Furukawa, K., Pham, D. G., Robinson, N., Martin, G. M. and Mattson, M. P. (1997). Alzheimer's presenilin mutation sensitizes neural cells to apoptosis induced by trophic factor withdrawal and amyloid beta-peptide: involvement of calcium and oxyradicals. *J Neurosci* 17,(11): 4212-22.

Guo, Y. Q., Livne, B. I., Zhou, L. L. and Boulianne, G. L. (1999). Drosophila presenilin is required for neuronal differentiation and affects notch subcellular localization and signaling. *J Neurosci* 19,(19): 8435-42.

Guo, Y. Q., Zhang, S. X., Sokol, N., Cooley, L. and Boulianne, G. L. (2000). Physical and genetic interaction of filamin with presenilin in Drosophila. *J Cell Sci* 113,(19): 3499-508.

H

Haass, C. (1998). Introduction in Haass, C. (Ed), *Molecular biology of Alzheimer's disease. Genes and mechanisms involved in amyloid generation*, Harwood Academic Publishers.

- Haass, C., Schlossmacher, M. G., Hung, A. Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B. L., Lieberburg, I., Koo, E. H., Schenk, D., Teplow, D. B. and et al. (1992). Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359,(6393): 322-5.
- Hardy, J. (1996a). APPmutations directory. http://www.alzforum.org/members/resources/app_mutations/index.html
- Hardy, J. (1996b). PS1 mutations directory. <http://www.alzforum.org/res/com/mut/pre/diagram1.asp>
- Hardy, J. (1997). Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 20,(4): 154-9.
- Hardy, J. and Gwinn-Hardy, K. (1998). Genetic classification of primary neurodegenerative disease. *Science* 282: 1075-79.
- Hardy, J. A. and Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256,(5054): 184-5.
- Hardy, J. and Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297,(5580): 353-6.
- Hartmann, D., Tournoy, J., Saftig, P., Annaert, W. and De Strooper, B. (2001). Implication of APP secretases in notch signaling. *J Mol Neurosci* 17,(2): 171-81.
- Hartmann, T., Bieger, S. C., Bruhl, B., Tienari, P. J., Ida, N., Allsop, D., Roberts, G. W., Masters, C. L., Dotti, C. G., Unsicker, K. and Beyreuther, K. (1997). Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides. *Nat Med* 3,(9): 1016-20.
- Herreman, A., Hartmann, D., Annaert, W., Saftig, P., Craessaerts, K., Serneels, L., Umans, L., Schrijvers, V., Checler, F., Vanderstichele, H., Baekelandt, V., Dressel, R., Cupers, P., Huylebroeck, D., Zwijsen, A., Van, L. F. and De Strooper, B. (1999). Presenilin 2 deficiency causes a mild pulmonary phenotype and no changes in amyloid precursor protein processing but enhances the embryonic lethal phenotype of presenilin 1 deficiency. *Proc Nat Acad Sci Usa* 96,(21): 11872-7.
- Herreman, A., Serneels, L., Annaert, W., Collen, D., Schoonjans, L. and De Strooper, B. (2000). Total inactivation of gamma-secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 2,(7): 461-2.
- Hiltunen, M., Helisalmi, S., Mannerma, A., Alafuzoff, I., Koivisto, A. M., Lehtovirta, M., Pirskanen, M., Sulkava, R., Verkkoniemi, A. and Soininen, H. (2000). Identification of a novel 4.6-kb genomic deletion in presenilin-1 gene which results in exclusion of exon 9 in a Finnish early onset Alzheimer's disease family: an Alu core sequence-stimulated recombination? *Eur J Human Genet* 8,(4): 259-66.
- Hjelmqvist, L., Tuson, M., Marfany, G., Herrero, E., Balcells, S. and Gonzalez-Duarte, R. (2002). ORMDL proteins are a conserved new family of endoplasmic reticulum membrane proteins. *Genome Biol* 3,(6): RESEARCH0027.
- Holtzman, D. M. (2001). Role of apoE/Abeta interactions in the pathogenesis of Alzheimer's Disease and Cerebral Amyloid Angiopathy. *J Mol Neurosci* 17: 147-55.
- Hong, C.-S. and Koo, E. H. (1997). Isolation and characterization of *Drosophila* presenilin homolog. *NeuroReport* 8: 665-8.
- Hoppe, T., Rape, M. and Jentsch, S. (2001). Membrane-bound transcription factors: regulated release by RIP or RUP. *Curr Opin Cell Biol* 13,(3): 344-8.

Houlden, H., Baker, M., McGowan, E., Lewis, P., Hutton, M., Crook, R., Wood, N. W., Kumar-Singh, S., Geddes, J., Swash, M., Scaravilli, F., Holton, J. L., Lashley, T., Tomita, T., Hashimoto, T., Verkkoniemi, A., Kalimo, H., Somer, M., Paetau, A., Martin, J. J., Van Broeckhoven, C., Golde, T., Hardy, J., Haltia, M. and Revesz, T. (2000). Variant Alzheimer's disease with spastic paraparesis and cotton wool plaques is caused by PS-1 mutations that lead to exceptionally high amyloid-beta concentrations. *Ann Neurol* 48,(5): 806-8.

Hu, Y., Ye, Y. and Fortini, M. E. (2002). Nicastrin is required for gamma-secretase cleavage of the Drosophila Notch receptor. *Dev Cell* 2,(1): 69-78.

Huppert, S. S., Le, A., Schroeter, E. H., Mumm, J. S., Saxena, M. T., Milner, L. A. and Kopan, R. (2000). Embryonic lethality in mice homozygous for a processing-deficient allele of Notch1. *Nature* 405,(6789): 966-70.

I

Imafuku, I., Masaki, T., Waragai, M., Takeuchi, S., Kawabata, M., Hirai, S. I., Ohno, S., Nee, L. E., Lippa, C. F., Kanazawa, I., Imagawa, M. and Okazawa, H. (1999). Presenilin 1 suppresses the function of c-jun homodimers via interaction with QM/Jif-1. *J Cell Biol* 147,(1): 121-33.

Imaizumi, K., Miyoshi, K., Katayama, T., Yoneda, T., Taniguchi, M., Kudo, T. and Tohyama, M. (2001). The unfolded protein response and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1536,(2-3): 85-96.

J

Jacobsen, H., Reinhardt, D., Brockhaus, M., Bur, D., Kocyba, C., Kurt, H., Grim, M. G., Baumeister, R. and Loetscher, H. (1999). The influence of endoproteolytic processing of familial Alzheimer's disease presenilin 2 on A beta 42 amyloid peptide formation. *J Biol Chem* 274,(49): 35233-9.

Janicki, S. and Monteiro, M. J. (1997). Increased apoptosis arising from increased expression of the Alzheimer's disease-associated presenilin-2 mutation (N141I). *J Cell Biol* 139,(2): 485-95.

Jarrett, J., Berger, E. P. and Lansbury, P. T. J. (1993). The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 32,(18): 4693-7.

Johnsingh, A. A., Johnston, J. M., Merz, G., Xu, J. L., Kotula, L., Jacobsen, J. S. and Tezapsidis, N. (2000). Altered binding of mutated presenilin with cytoskeleton-interacting proteins. *FEBS Lett* 465,(1): 53-8.

K

Kaether, C., Lammich, S., Edbauer, D., Ertl, M., Rietdorf, J., Capell, A., Steiner, H. and Haass, C. (2002). Presenilin-1 affects trafficking and processing of {beta}APP and is targeted in a complex with nicastrin to the plasma membrane. *J Cell Biol* 158,(3): 551-61.

Kamal, A., Almenar-Queralt, A., LeBlanc, J. F., Roberts, E. A. and Goldstein, L. S. (2001). Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP. *Nature* 414,(6864): 643-648.

- Kang, D. E., Soriano, S., Frosch, M. P., Collins, T., Naruse, S., Sisodia, S. S., Leibowitz, G., Levine, F. and Koo, E. H. (1999). Presenilin 1 facilitates the constitutive turnover of beta-catenin: differential activity of Alzheimer's disease-linked PS1 mutants in the beta-catenin-signaling pathway. *J Neurosci* 19,(11): 4229-37.
- Kang, D., Soriano, S., Xia, X., Eberhart, C., De Strooper, B., Zheng, H. and Koo, E. (2002). Presenilin Couples the Paired Phosphorylation of beta-Catenin Independent of Axin. Implications for beta-Catenin Activation in Tumorigenesis. *Cell* 110,(6): 751-62.
- Karlstrom, H., Bergman, A., Lendahl, U., Naslund, J. and Lundkvist, J. (2002). A sensitive and quantitative assay for measuring cleavage of presenilin substrates. *J Biol Chem* 277,(9): 6763-6.
- Kashiwa, A., Yoshida, H., Lee, S., Paladino, T., Liu, Y. B., Chen, Q., Dargusch, R., Schubert, D. and Kimura, H. (2000). Isolation and characterization of a novel presenilin binding protein. *J Neurochem* 75,(1): 109-16.
- Katayama, T., Imaizumi, K., Honda, A., Yoneda, T., Kudo, T., Takeda, M., Mori, K., Rozmahel, R., Fraser, P., St George-Hyslop, P. and Tohyama, M. (2001). Disturbed activation of endoplasmic reticulum stress transducers by familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 mutations. *J Biol Chem* 276,(46): 43446-54.
- Katayama, T., Imaizumi, K., Sato, N., Miyoshi, K., Kudo, T., Hitomi, J., Morihara, T., Yoneda, T., Gomi, F., Mori, Y., Nakano, Y., Takeda, J., Tsuda, T., Itoyama, Y., Murayama, O., Takashima, A., St. G. H. P., Takeda, M. and Tohyama, M. (1999). Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 1,(8): 479-85.
- Kim, S. H., Lah, J. J., Thinakaran, G., Levey, A. and Sisodia, S. S. (2000). Subcellular localization of presenilins: Association with a unique membrane pool in cultured cells. *Neurobiol Disease* 7,(2): 99-117.
- Kim, S. H., Leem, J. Y., Lah, J. J., Slunt, H. H., Levey, A. I., Thinakaran, G. and Sisodia, S. S. (2001). Multiple effects of aspartate mutant presenilin 1 on the processing and trafficking of amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 276,(46): 43343-50.
- Kim, T. W., Pettingell, W. H., Hallmark, O. G., Moir, R. D., Wasco, W. and Tanzi, R. E. (1997a). Endoproteolytic cleavage and proteasomal degradation of presenilin 2 in transfected cells. *J Biol Chem* 272,(17): 11006-10.
- Kim, T. W., Pettingell, W. H., Jung, Y. K., Kovacs, D. M. and Tanzi, R. E. (1997b). Alternative cleavage of Alzheimer-associated presenilins during apoptosis by a caspase-3 family protease. *Science* 277,(5324): 373-6.
- Kimberly, W. T., Xia, W. M., Rahmati, T., Wolfe, M. S. and Selkoe, D. J. (2000). The transmembrane aspartates in presenilin 1 and 2 are obligatory for gamma-secretase activity and amyloid beta-protein generation. *J Biol Chem* 275,(5): 3173-8.
- Kimberly, W. T., Zheng, J. B., Guenette, S. Y. and Selkoe, D. J. (2001). The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner. *J Biol Chem* 276,(43): 40288-92.
- Kimble, J. and Simpson, P. (1997). The LIN-12/Notch signaling pathway and its regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 333-61.
- Kirschenbaum, F., Hsu, S. C., Cordell, B. and McCarthy, J. V. (2001a). Glycogen synthase kinase-3beta regulates presenilin 1 C-terminal fragment levels. *J Biol Chem* 276,(33): 30701-7.

Klafki, H., Abramowski, D., Swoboda, R., Paganetti, P. A. and Staufenbiel, M. (1996). The carboxyl termini of beta-amyloid peptides 1-40 and 1-42 are generated by distinct gamma-secretase activities. *J Biol Chem* 271,(45): 28655-9.

Kopan, R. (2002). Notch: a membrane-bound transcription factor. *J Cell Sci* 115,(6): 1095-7.

Kovacs, D. M. and Tanzi, R. E. (1998). Monogenic determinants of familial Alzheimer's disease: Presenilin-1 mutations. *Cell Mol Life Sci* 54,(9): 902-9.

Kulic, L., Walter, J., Multhaup, G., Teplow, D. B., Baumeister, R., Romig, H., Capell, A., Steiner, H. and Haass, C. (2000). Separation of presenilin function in amyloid beta-peptide generation and endoproteolysis of Notch. *Proc Nat Acad Sci USA* 97,(11): 5913-8.

L

Lah, J. J. and Levey, A. I. (2000). Endogenous presenilin-1 targets to endocytic rather than biosynthetic compartments. *Mol Cell Neurosci* 16,(2): 111-26.

LaPointe, C. F. and Taylor, R. K. (2000). The type 4 prepilin peptidases comprise a novel family of aspartic acid proteases. *J Biol Chem* 275,(2): 1502-10.

Laudon, H., Karlstrom, H., Bergman, A., Farmery, M. R., Mathews, P., Gandy, S. E., Winblad, B., Lundkvist, J., Lendahl, U. and Naslund, J. (2002). PS1-controlled gamma-secretase activity: definition of a minimal structural motif in the N-terminal fragment. *The 8th international conference on Alzheimer's disease and related disorders. Stockholm, Sweden.*

Lee, H. J., Jung, K. M., Huang, Y. Z., Bennett, L. B., Lee, J. S., Mei, L. and Kim, T. W. (2002). Presenilin-dependent gamma-secretase-like intramembrane cleavage of ErbB4. *J Biol Chem* 277,(8): 6318-23.

Lee, M. K., Borchelt, D. R., Kim, G., Thinakaran, G., Slunt, H. H., Ratovitski, T., Martin, L. J., Kittur, A., Gandy, S., Levey, A. I., Jenkins, N., Copeland, N., Price, D. L. and Sisodia, S. S. (1997). Hyperaccumulation of FAD-linked presenilin 1 variants *in vivo*. *Nat Med* 3: 756-60.

Lee, M. K., Slunt, H. H., Martin, L. J., Thinakaran, G., Kim, G., Gandy, S. E., Seeger, M., Koo, E., Price, D. L. and Sisodia, S. S. (1996). Expression of presenilin 1 and 2 (PS1 and PS2) in human and murine tissues. *J Neurosci* 16,(23): 7513-25.

Leem, J. Y., Vijayan, S., Han, P., Cai, D., Machura, M., Lopes, K. O., Veselits, M. L., Xu, H. and Thinakaran, G. (2002). Presenilin 1 is required for maturation and cell surface accumulation of nicastrin. *J Biol Chem* 277,(21): 19236-40.

Leem, J. Y., Vijayan, S., Saura, C. A., Machura, M., Lopes, K. O., Veselits, M. L., Thinakaran, G., Cai, D., Xu, H., Pietrzik, C. U. and Koo, E. H. (2002). Presenilin1 regulates the maturation and cell surface accumulation of amyloid precursor protein and nicastrin. *The 8th international conference on Alzheimer's disease and related disorders. Stockholm, Sweden.*

Lehmann, S., Chiesa, R. and Harris, D. A. (1997). Evidence for a six-transmembrane domain structure of presenilin 1. *J Biol Chem* 272,(18): 12047-51.

Leimer, U., Lun, K., Romig, H., Walter, J., Grunberg, J., Brand, M. and Haass, C. (1999). Zebrafish (*Danio rerio*) presenilin promotes aberrant amyloid beta-peptide production and requires a critical aspartate residue for its function in amyloidogenesis. *Biochemistry* 38,(41): 13602-9.

- Leissring, M. A., Akbari, Y., Fanger, C. M., Cahalan, M. D., Mattson, M. P. and LaFerla, F. M. (2000). Capacitative calcium entry deficits and elevated luminal calcium content in mutant presenilin-1 knockin mice. *J Cell Biol* 149,(4): 793-8.
- Leissring, M. A., Murphy, M. P., Mead, T. R., Akbari, Y., Sugarman, M. C., Jannatipour, M., Anliker, B., Muller, U., Saftig, P., De Strooper, B., Wolfe, M. S., Golde, T. E. and LaFerla, F. M. (2002). A physiologic signaling role for the gamma -secretase-derived intracellular fragment of APP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99,(7): 4697-702.
- Lemere, C. A., Lopera, F., Kosik, K. S., Lendon, C. L., Ossa, J., Saido, T. C., Yamaguchi, H., Ruiz, A., Martinez, A., Madrigal, L., Hincapie, L., Arango, J. C., Anthony, D. C., Koo, E. H., Goate, A. M. and Selkoe, D. J. (1996). The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased A beta 42 deposition and severe cerebellar pathology. *Nat Med* 2,(10): 1146-50.
- Levesque, G., Yu, G., M., N., Zhang, D. M., Levesque, L., Yu, H., Xu, D., Liang, Y., Rogaeva, E., Ikeda, M., Duthie, M., Murgolo, N., Wang, N., VanderVere, P., Bayne, M. L., Strader, C. D., Rommens, J. M., Fraser, P. E. and St. George-Hyslop, P. (1999). Presenilins interact with armadillo proteins including neural-specific plakophilin-related protein and beta-catenin. *J Neurochem* 72,(3): 999-1008.
- Levitan, D. (1998). Effects of SEL-12 presenilin on LIN-12 localization and function in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 125,(18): 3599-606.
- Levitan, D., Doyle, T. G., Brousseau, D., Lee, M. K., Thinakaran, G., Slunt, H. H., Sisodia, S. S. and Greenwald, I. (1996). Assessment of normal and mutant human presenilin function in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93,(25): 14940-4.
- Levitan, D. and Greenwald, I. (1995). Facilitation of lin-12-mediated signalling by sel-12, a *Caenorhabditis elegans* S182 Alzheimer's disease gene. *Nature* 377,(6547): 351-4.
- Levitan, D., Lee, J., Song, L., Manning, R., Wong, G., Parker, E. and Zhang, L. (2001). PS1 N- and C-terminal fragments form a complex that functions in APP processing and Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98,(21): 12186-90.
- Levy-Lahad, E., Poorkaj, P., Wang, K., Fu, Y. H., Oshima, J., Mulligan, J. and Schellenberg, G. D. (1996). Genomic structure and expression of STM2, the chromosome 1 familial Alzheimer disease gene. *Genomics* 34,(2): 198-204.
- Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D. M., Oshima, J., Pettingell, W. H., Yu, C. E., Jondro, P. D., Schmidt, S. D., Wang, K., Crowley, A. C., Fu, Y. H., Guenette, S. Y., Galas, D., Nemens, E., Wijsman, E. M., Bird, T. D., Schellenberg, G. D., Tanzi, R. E., Schellenberg, G. D. and Tanzi, R. E. (1995). Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269,(5226): 973-7.
- Lewis, J. (1998). A short cut to the nucleus. *Nature* 393: 304-5.
- L'Hernault, S. W. and Arduengo, P. M. (1992). Mutation of a putative sperm membrane protein in *Caenorhabditis elegans* prevents sperm differentiation but not its associated meiotic divisions. *J Cell Biol* 119,(1): 55-68.
- Li, X. and Greenwald, I. (1996). Membrane topology of the *C. elegans* SEL-12 presenilin. *Neuron* 17,(5): 1015-21.
- Li, X. and Greenwald, I. (1997). HOP-1, a *Caenorhabditis elegans* presenilin, appears to be functionally redundant with SEL-12 presenilin and to facilitate LIN-12 and GLP-1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94,(22): 12204-9.

Li, X. and Greenwald, I. (1998). Additional evidence for an eight-transmembrane-domain topology for *Caenorhabditis elegans* and human presenilins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95,(12): 7109-14.

Li, Y. M., Lai, M. T., Xu, M., Huang, Q., DiMuzio, M. J., Sardana, M. K., Shi, X. P., Yin, K. C., Shafer, J. A. and Gardell, S. J. (2000a). Presenilin 1 is linked with gamma-secretase activity in the detergent solubilized state. *Proc Natl Acad Sci USA* 97,(11): 6138-43.

Li, Y. M., Xu, M., Lai, M. T., Huang, Q., Castro, J. L., DiMuzio, M. J., Harrison, T., Lellis, C., Nadin, J. L., Neduveilil, J. G., Register, R. B., Sardana, M. K., Shearman, M. S., Smith, A. L., Shi, X. P., Yin, K. C., Shafer, J. A. and Gardell, S. J. (2000b). Photoactivated gamma-secretase inhibitors directed to the active site covalently label presenilin 1. *Nature* 405,(6787): 689-94.

Lichtenthaler, S. F., Behr, D., Grimm, H. S., Wang, R., Shearman, M. S., Masters, C. L. and Beyreuther, K. (2002). The intramembrane cleavage site of the amyloid precursor protein depends on the length of its transmembrane domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99,(3): 1365-70.

Lichtenthaler, S. F., Wang, R., Grimm, H., Uljon, S. N., Masters, C. L. and Beyreuther, K. (1999). Mechanism of the cleavage specificity of Alzheimer's disease gamma-secretase identified by phenylalanine-scanning mutagenesis of the transmembrane domain of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96,(6): 3053-8.

Lilliehook, C., Chan, S., Choi, E. K., Zaidi, N. F., Wasco, W., Mattson, M. P. and Buxbaum, J. D. (2002). Calsenilin enhances apoptosis by altering endoplasmic reticulum calcium signaling. *Mol Cell Neurosci* 19,(4): 552-9.

Lin, X. L., Koelsch, C., Wu, S. L., Downs, D., Dashti, A. and Tang, J. (2000). Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proc Nat Acad Sci USA* 97,(4): 1456-60.

Loetscher, H., Deuschle, U., Brockhaus, M., Reinhardt, D., Nelboeck, P., Mous, J., Grunberg, J., Haass, C. and Jacobsen, H. (1997). Presenilins are processed by caspase-type proteases. *J Biol Chem* 272,(33): 20655-9.

Lopez-Schier, H. and St Johnston, D. (2002). *Drosophila* nicastrin is essential for the intramembraneous cleavage of notch. *Dev Cell* 2,(1): 79-89.

M

Mah, A. L., Perry, G., Smith, M. A. and Monteiro, M. J. (2000). Identification of ubiquilin, a novel presenilin interactor that increases presenilin protein accumulation. *J Cell Biol* 151,(4): 847-62.

Maltese, W. A., Wilson, S., Tan, Y., Suomensaari, S., Sinha, S., Barbour, R. and McConlogue, L. (2001). Retention of the Alzheimer's amyloid precursor protein fragment C99 in the endoplasmic reticulum prevents formation of amyloid beta-peptide. *J Biol Chem* 276,(23): 20267-79.

Mandelkow, E.-M. and Mandelkow, E. (1998). Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol* 8:425-7.

Marambaud, P., Shioi, J., Serban, G., Georgakopoulos, A., Sarner, S., Nagy, V., Baki, L., Wen, P., Efthimiopoulos, S., Shao, Z., Wisniewski, T. and Robakis, N. K. (2002). A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *EMBO J* 21,(8): 1948-56.

- Marfany, G., DeFavero, J., Valero, R., DeJonghe, C., Woodrow, S., Hendriks, L., VanBroeckhoven, C. and GonzalezDuarte, R. (1998). Identification of a *Drosophila* presenilin homologue: Evidence of alternatively spliced forms. *J Neurogenet* 12,(1): 41-54.
- Mattson, M. P., Chan, S. L. and Camandola, S. (2001). Presenilin mutations and calcium signaling defects in the nervous and immune systems. *Bioessays* 23,(23): 733-44.
- Mattson, M. P., Guo, Q., Furukawa, K. and Pedersen, W. A. (1998). Presenilins, the endoplasmic reticulum, and neuronal apoptosis in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 70,(1): 1-14.
- May, P., Reddy, Y. K. and Herz, J. (2002). Proteolytic processing of low density lipoprotein receptor-related protein mediates regulated release of its intracellular domain. *J Biol Chem* 277,(21): 18736-43.
- Mercken, M., Takahashi, H., Honda, T., Sato, K., Murayama, M., Nakazato, Y., Noguchi, K., Imahori, K. and Takashima, A. (1996). Characterization of human presenilin 1 using N-terminal specific monoclonal antibodies: Evidence that Alzheimer mutations affect proteolytic processing. *FEBS Lett* 389,(3): 297-303.
- Mills, J. and Reiner, P. B. (1999). Regulation of amyloid precursor protein cleavage. *J Neurochem* 72,(2): 443-60.
- Moehlmann, T., Winkler, E., Xia, X., Edbauer, D., Murrell, J., Capell, A., Kaether, C., Zheng, H., Ghetti, B., Haass, C. and Steiner, H. (2002). Presenilin-1 mutations of leucine 166 equally affect the generation of the Notch and APP intracellular domains independent of their effect on Abeta 42 production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99,(12): 8025-30.
- Morihara, T., Katayama, T., Sato, N., Yoneda, T., Manabe, T., Hitomi, J., Abe, H., Imaizumi, K. and Tohyama, M. (2000). Absence of endoproteolysis but no effects on amyloid beta production by alternative splicing forms of presenilin-1, which lack exon 8 and replace D257A. *Brain Res Mol Brain Res* 85,(1-2): 85-90.
- Multhaup, G., Masters, C. L., Beryreuther, K. and Cappai, R. (1998). The biological activities and function of the amyloid precursor protein of Alzheimer's disease in Haass, C. (Ed), *Molecular biology of Alzheimer's disease. Genes and mechanisms involved in amyloid generation*, Harwood Academic Publishers.
- Muller, U. and Kins, S. (2002). APP on the move. *Trends Mol Med* 8,(4): 152-5.
- Murayama, M., Tanaka, S., Palacino, J., Murayama, O., Honda, T., Sun, X. Y., Yasutake, K., Nihonmatsu, N., Wolozin, B. and Takashima, A. (1998). Direct association of presenilin-1 with beta-catenin. *FEBS Lett* 433,(1-2): 73-7.
- Murayama, O., Honda, T., Mercken, M., Murayama, M., Yasutake, K., Nihonmatsu, N., Nakazato, Y., Michel, G., Song, S., Sato, K., Takahashi, H. and Takashima, A. (1997). Different effects of Alzheimer-associated mutations of presenilin 1 on its processing. *Neurosci Lett* 229,(1): 61-4.
- Murayama, O., Murayama, M., Honda, T., Sun, X. Y., Nihonmatsu, N. and Takashima, A. (1999). Twenty-nine missense mutations linked with familial Alzheimer's disease alter the processing of presenilin 1. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 23,(5): 905-13.
- Murphy, M. P., Hickman, L. J., Eckman, C. B., Uljon, S. N., Wang, R. and Golde, T. E. (1999). gamma-Secretase, evidence for multiple proteolytic activities and influence of membrane positioning of substrate on generation of amyloid beta peptides of varying length. *J Biol Chem* 274,(17): 11914-23.

Murphy, M. P., Uljon, S. N., Fraser, P. E., Fauq, A., Lookingbill, H. A., Findlay, K. A., Smith, T. E., Lewis, P. A., McLendon, D. C., Wang, R. and Golde, T. E. (2000). Presenilin 1 regulates pharmacologically distinct gamma -secretase activities. Implications for the role of presenilin in gamma -secretase cleavage. *J Biol Chem* 275,(34): 26277-84.

N

Nakajima, M., Shimizu, T. and Shirasawa, T. (2000). Notch-1 activation by familial Alzheimer's disease (FAD)-linked mutant forms of presenilin-1. *J Neurosci Res* 62,(2): 311-7.

Naruse, S., Thinakaran, G., Luo, J. J., Kusiak, J. W., Tomita, T., Iwatsubo, T., Qian, X. Z., Ginty, D. D., Price, D. L., Borchelt, D. R., Wong, P. C. and Sisodia, S. S. (1998). Effects of PS1 deficiency on membrane protein trafficking in neurons. *Neuron* 21,(5): 1213-21.

Ni, C. Y., Murphy, M. P., Golde, T. E. and Carpenter, G. (2001). {gamma}-Secretase Cleavage and Nuclear Localization of ErbB-4 Receptor Tyrosine Kinase. *Science* 294: 2179-81.

Nilsberth, C., Westlind-Danielsson, A., Eckman, C. B., Condrón, M. M., Axelman, K., Forsell, C., Stenlund, C., Luthman, J., Teplow, D. B., Younkin, S. G., Naslund, J. and Lannfelt, L. (2001). The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Abeta protofibril formation. *Nat Neurosci* 4,(9): 887-93.

Nishimura, M., Yu, G., Levesque, G., Zhang, D. M., Ruel, L., Chen, F., Milman, P., Holmes, E., Liang, Y., Kawarai, T., Jo, E., Supala, A., Rogaeva, E., Xu, D. M., Janus, C., Levesque, L., Bi, Q., Duthie, M., Rozmahel, R., Mattila, K., Lannfelt, L., Westaway, D., Mount, H., Woodgett, J., Fraser, P. E. and St, G. H. P. (1999). Presenilin mutations associated with Alzheimer disease cause defective intracellular trafficking of beta-catenin, a component of the presenilin protein complex. *Nat Med* 5,(2): 164-9.

Niwa, M., Sidrauski, C., Kaufman, R. J. and Walter, P. (1999). A role for presenilin-1 in nuclear accumulation of Ire1 fragments and induction of the mammalian unfolded protein response. *Cell* . 99,(7): 691-702.

Noll, E., Medina, M., Hartley, D., Zhou, J., Perrimon, N. and Kosik, K. S. (2000). Presenilin affects arm/beta-catenin localization and function in Drosophila. *Dev Biol* 227,(2): 450-64.

Nowotny, P., Gorski, S. M., Han, S. W., Philips, K., Ray, W. J., Nowotny, V., Jones, C. J., Clark, R. F., Cagan, R. L. and Goate, A. M. (2000). Posttranslational modification and plasma membrane localization of the Drosophila melanogaster presenilin. *Mol Cell Neurosci* 15,(1): 88-98.

Nunan, J. and Small, D. H. (2000). Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases. *FEBS Lett* 483,(1): 6-10.

Nyabi, O., Pype, S., Mercken, M., Herreman, A., Saftig, P., Craessaerts, K., Serneels, L., Annaert, W. and De Strooper, B. (2002). No endogenous Abeta production in presenilin-deficient fibroblasts. *Nat Cell Biol* 4,(7): E164.

O

Okamoto, I., Kawano, Y., Murakami, D., Sasayama, T., Araki, N., Miki, T., Wong, A. J. and Saya, H. (2001). Proteolytic release of CD44 intracellular domain and its role in the CD44 signaling pathway. *J Cell Biol* 155,(5): 755-62.

Okochi, M., Sahara, N., Kametani, F., Usami, M., Arai, T., Tanaka, K., Ishii, K., Yamamoto, A. and Mori, H. (1998). Presenilin1 Cleavage is a Universal Event in Human Organs. *Neurobiol Aging* 19,(15): S3-S10.

Okochi, M., Steiner, H., Fukumori, A., Tanii, H., Tomita, T., Tanaka, T., Iwatsubo, T., Kudo, T., Takeda, M. and Haass, C. (2002). Presenilins mediate a dual intramembranous gamma-secretase cleavage of Notch-1. *Embo J* 21,(20): 5408-16.

Online Mendelian Inheritance in Man, O. T. (2000). McKusick-Nathans Institute for Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, MD). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>

Oyama, F., Sawamura, N., Kobayashi, K., MorishimaKawashima, M., Kuramochi, T., Ito, M., Tomita, T., Maruyama, K., Saido, T. C., Iwatsubo, T., Capell, A., Walter, J., Grunberg, L., Ueyama, Y., Haass, C. and Ihara, Y. (1998). Mutant presenilin 2 transgenic mouse: Effect on an age-dependent increase of amyloid beta-protein 42 in the brain. *J Neurochem* 71,(1): 313-22.

P

Pack-Chung, E., Meyers, M. B., Pettingell, W. P., Moir, R. D., Brownawell, A. M., Cheng, I., Tanzi, R. E. and Kim, T. W. (2000). Presenilin 2 interacts with sorcin, a modulator of the ryanodine receptor. *J Biol Chem* 275,(19): 14440-5.

Passer, B. J., Pellegrini, L., Vito, P., Ganjei, J. K. and D'Adamio, L. (1999). Interaction of Alzheimer's presenilin-1 and presenilin-2 with Bcl-X-L - A potential role in modulating the threshold of cell death. *J Biol Chem* 274,(34): 24007-13.

Pericak-Vance, M. A., Bebout, J. L., Gaskell, P. C., Jr., Yamaoka, L. H., Hung, W. Y., Alberts, M. J., Walker, A. P., Bartlett, R. J., Haynes, C. A., Welsh, K. A. and et al. (1991). Linkage studies in familial Alzheimer disease: evidence for chromosome 19 linkage. *Am J Hum Genet* 48,(6): 1034-50.

Petanceska, S. S., Seeger, M., Checler, F. and Gandy, S. (2000). Mutant presenilin 1 increases the levels of Alzheimer amyloid beta-peptide Abeta42 in late compartments of the constitutive secretory pathway. *J Neurochem* 74,(5): 1878-84.

Petit, A., Bihel, F., Alves da Costa, C., Pourquie, O., Checler, F. and Kraus, J. L. (2001). New protease inhibitors prevent gamma-secretase-mediated production of Abeta40/42 without affecting Notch cleavage. *Nat Cell Biol* 3,(5): 507-11.

Petit, A., St George-Hyslop, P., Fraser, P. and Checler, F. (2002a). Gamma-secretase-like cleavages of Notch and beta APP are mutually exclusive in human cells. *Biochem Biophys Res Commun* 290,(5): 1408-10.

Petit, A., Vincent, B., Scarzello, S., Armogida, M., Da Costa, C. A. and Checler, F. (2002b). Reply: Potential external source of Abeta in biological samples. *Nat Cell Biol* 4,(7): E165-6.

Pillot, T., Goethals, M., Najib, J., Labeur, C., Lins, L., Chambaz, J., Brasseur, R., Vandekerckhove, J. and Rosseneu, M. (1999). beta-amyloid peptide interacts specifically with the carboxy-terminal domain of human apolipoprotein E: Relevance to Alzheimer's disease. *J Neurochem* 72,(1): 230-7.

Podlisny, M. B., Citron, M., Amarante, P., Sherrington, R., Xia, W., Zhang, J., Diehl, T., Levesque, G., Fraser, P., Haass, C., Koo, E. H., Seubert, P., St George-Hyslop, P., Teplow, D. B. and Selkoe, D. J. (1997). Presenilin proteins undergo heterogeneous endoproteolysis between

Thr291 and Ala299 and occur as stable N- and C-terminal fragments in normal and Alzheimer brain tissue. *Neurobiol Dis* 3,(4): 325-37.

Ponting, C. P., Hutton, M., Nyborg, A., Baker, M., Jansen, K. and Golde, T. E. (2002). Identification of a novel family of presenilin homologues. *Hum Mol Genet* 11,(9): 1037-44.

Pradier, L., Carpentier, N., Delalonde, L., Clavel, N., Bock, M. D., Buee, L., Mercken, L., Tocque, B. and Czech, C. (1999). Mapping the APP/presenilin (PS) binding domains: The hydrophilic N-terminus of PS2 is sufficient for interaction with APP and can displace APP/PS1 interaction. *Neurobiol Dis* 6,(1): 43-55.

Prihar, G., de, C. F., Baker, M., Crook, R., McGowan, E., Grover, A., Hardy, J. and Hutton, M. (1999). A novel candidate presenilin-1 interacting protein containing tetratricopeptide repeats. *Neuroreport* 10,(7): 1409-15.

Q

Qian, S., Jiang, P., Guan, X. M., Singh, G., Trumbauer, M. E., Yu, H., Chen, H. Y., Van, d. P. L. and Zheng, H. (1998). Mutant human presenilin 1 protects presenilin 1 null mouse against embryonic lethality and elevates Abeta1-42/43 expression. *Neuron* 20,(3): 611-7.

R

Rabionet, R. (2002). Análisis molecular de la sordera debida a mutaciones en el gen GJB2, *Centre de genètica mèdica i molecular, Institut de Recerca Oncològica, Universitat de Barcelona.*

Ratovitski, T., Slunt, H. H., Thinakaran, G., Price, D. L., Sisodia, S. S. and Borchelt, D. R. (1997). Endoproteolytic processing and stabilization of wild-type and mutant presenilin. *J Biol Chem* 272,(39): 24536-41.

Ray, W. J., Ashall, F. and Goate, A. M. (1998). Molecular pathogenesis of sporadic and familial forms of Alzheimer's disease. *Mol Med Today* 4,(4): 151-7.

Ray, W. J., Yao, M., Mumm, J., Schroeter, E. H., Saftig, P., Wolfe, M., Selkoe, D. J., Kopan, R. and Goate, A. M. (1999a). Cell surface presenilin-1 participates in the gamma-secretase-like proteolysis of notch. *J Biol Chem* 274,(51): 36801-7.

Ray, W. J., Yao, M., Nowotny, P., Mumm, J., Zhang, W. J., Wu, J. Y., Kopan, R. and Goate, A. M. (1999b). Evidence for a physical interaction between presenilin and Notch. *Proc Natl Acad Sci USA* 96,(6): 3263-8.

Rechards, M., Xia, W., Oorschot, V., Selkoe, D. and Klumperman, J. (2002). Presenilin-1 localization and its effect on trafficking of APP-products in vesicular tubular clusters between ER and Golgi. *The 8th international conference on Alzheimer's disease and related disorders. Stockholm, Sweden.*

Renbaum, P. and LevyLahad, E. (1998). Monogenic determinants of familial Alzheimer's disease: presenilin-2 mutations. *Cell Mol Life Sci* 54,(9): 910-9.

Rogaev, E. I., Sherrington, R., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., Chi, H., Lin, C., Holman, K., Tsuda, T., Sorbi, L. M. S., Nacmias, B., Piacentini, S., Amaducci, L., Chumakov, I., Cohen, D., Lannfelt, L., Fraser, P. E., Rommens, J. M. and George, H. P. H. S. (1995). Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 376,(6543): 775-8.

Rogaev, E. I., Sherrington, R., Wu, C., Levesque, G., Liang, Y., Rogaeva, E. A., Ikeda, M., Holman, K., Lin, C., Lukiw, W. J., De, J. P. J., Fraser, P. E., Rommens, J. M. and St, G. H. P. (1997). Analysis of the 5' sequence, genomic structure, and alternative splicing of the presenilin-1 gene (PSEN1) associated with early onset Alzheimer disease. *Genomics* 40,(3): 415-24.

Roncarati, R., Sestan, N., Scheinfeld, M. H., Berechid, B. E., Lopez, P. A., Meucci, O., McGlade, J. C., Rakic, P. and D'Adamio, L. (2002). The gamma-secretase-generated intracellular domain of beta-amyloid precursor protein binds Numb and inhibits Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99,(10): 7102-7.

Roses, A. D. (1996). The Alzheimer diseases. *Cur Op Neurobiol* 6: 644-50.

Rossor, M. N., Fox, N. C., Beck, J., Campbell, T. C. and Collinge, J. (1996). Incomplete penetrance of familial Alzheimer's disease in a pedigree with a novel presenilin-1 gene mutation. *Lancet* 347,(9014): 1560.

S

Sastre, M., Steiner, H., Fuchs, K., Capell, A., Multhaup, G., Condrón, M. M., Teplow, D. B. and Haass, C. (2001). Presenilin-dependent {gamma}-secretase processing of {beta}-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep* 2,(9): 835-41.

Saura, C. A., Tomita, T., Davenport, F., Harris, C. L., Iwatsubo, T. and Thinakaran, G. (1999). Evidence that intramolecular associations between presenilin domains are obligatory for endoproteolytic processing. *J Biol Chem* 274,(20): 13818-23.

Saura, C. A., Tomita, T., Soriano, S., Takahashi, M., Leem, J. Y., Honda, T., Koo, E. H., Iwatsubo, T. and Thinakaran, G. (2000). The nonconserved hydrophilic loop domain of presenilin (PS) is not required for PS endoproteolysis or enhanced A beta 42 production mediated by familial early onset Alzheimer's disease-linked PS variants. *J Biol Chem* 275,(22): 17136-42.

Scheper, W., Zwart, R., van, d. S. P., Annaert, W., van, G. W. and Baas, F. (2000). Alzheimer's presenilin 1 is a putative membrane receptor for rab GDP dissociation inhibitor. *Hum Mol Genet* 9,(2): 303-10.

Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T. D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levy-Lahad, E., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkaj, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., Selkoe, D. and Younkin, S. (1996). Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* 2,(8): 864-70.

Seeger, M., Nordstedt, C., Petanceska, S., Kovacs, D. M., Gouras, G. K., Hahne, S., Fraser, P., Levesque, L., Czernik, A. J., George, H. P., Sisodia, S. S., Thinakaran, G., Tanzi, R. E., Greengard, P. and Gandy, S. (1997). Evidence for phosphorylation and oligomeric assembly of presenilin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94,(10): 5090-4.

Selkoe, D. J. (1998). The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol* 8,(11): 447-53.

Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., Sinha, S., Schlossmacher, M., Whaley, J., Swindlehurst, C. and et al. (1992). Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature* 359,(6393): 325-7.

- Shearman, M. S., Beher, D., Clarke, E. E., Lewis, H. D., Harrison, T., Hunt, P., Nadin, A., Smith, A. L., Stevenson, G. and Castro, J. L. (2000). L-685,458, an aspartyl protease transition state mimic, is a potent inhibitor of amyloid beta-protein precursor gamma-secretase activity. *Biochemistry* 39,(30): 8698-704.
- Shen, J., Bronson, R. T., Chen, D. F., Xia, W., Selkoe, D. J. and Tonegawa, S. (1997). Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice. *Cell* 89,(4): 629-39.
- Sherrington, R., Froelich, S., Sorbi, S., Campion, D., Chi, H., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Rogaev, E. I., Lin, C., Liang, Y., Ikeda, M., Mar, L., Brice, A., Agid, Y., Percy, M. E., Clerget-Darpoux, F., Piacentini, S., Marcon, G., Nacmias, B., Amaducci, L., Frebourg, T., Lannfelt, L., Rommens, J. M. and St George-Hyslop, P. H. (1996). Alzheimer's disease associated with mutations in presenilin 2 is rare and variably penetrant. *Hum Mol Genet* 5,(7): 985-8.
- Sherrington, R., Rogaev, E. I., Liang, Y., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., Tsuda, T., Mar, L., Foncin, J. F., Bruni, A. C., Montesi, M. P., Sorbi, S., Rainero, I., Pinessi, L., Nee, L., Chumakov, I., Pollen, D., Brookes, A., Sanseau, P., Polinsky, R. J., Wasco, S., Da, S. H. A. R., Haines, J. L., Pericak, V. M. A., Tanzi, R. E., Roses, A. D., Fraser, P. E., Rommens, J. M. and St, G. H. P. H. (1995). Cloning of gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375,(6534): 754-760.
- Shinozaki, K., Maruyama, K., Kume, H., Tomita, T., Saido, T. C., Iwatsubo, T. and Obata, K. (1998). The presenilin 2 loop domain interacts with the mu-calpain C-terminal region. *Int J Mol Med* 1,(5): 797-9.
- Shirotni, K., Takahashi, K., Araki, W., Maruyama, K. and Tabira, T. (2000). Mutational analysis of intrinsic regions of presenilin 2 that determine its endoproteolytic cleavage and pathological function. *J Biol Chem* 275,(5): 3681-6.
- Shizuka-Ikeda, M., Matsubara, E., Ikeda, M., Kanai, M., Tomidokoro, Y., Ikeda, Y., Watanabe, M., Kawarabayashi, T., Harigaya, Y., Okamoto, K., Maruyama, K., Castano, E. M., St George-Hyslop, P. and Shoji, M. (2002). Generation of Amyloid beta Protein from a Presenilin-1 and betaAPP Complex. *Biochem Biophys Res Commun* 292,(2): 571-8.
- Schock, F. and Perrimon, N. (2002). Cellular processes associated with germ band retraction in *Drosophila*. *Dev Biol* 248,(1): 29-39.
- Singh, N., Talalayeva, Y., Tsiper, M., Romanov, V., Dranovsky, A., Colflesh, D., Rudamen, G., Vitek, M. P., Shen, J., Yang, X., Goldgaber, D. and Schwarzman, A. L. (2001). The role of Alzheimer's disease-related presenilin 1 in intercellular adhesion. *Exp Cell Res* 263,(1): 1-13.
- Sinha, S. and Lieberburg, I. (1999). Cellular mechanisms of beta-amyloid production and secretion. *Proc Natl Acad Sci* 96,(20): 11049-53.
- Sisodia, S. S. and St George-Hyslop, P. H. (2002). gamma-secretase, Notch, Abeta and Alzheimer's Disease: where do the presenilins fit in? *Nat Rev Neurosci* 3,(4): 281-90.
- Small, D. H. (1998). The Role of the Amyloid Protein Precursor (APP) in Alzheimer's Disease: Does the Normal Function of APP Explain the Topography of Neurodegeneration? *Neurochem Res* 23,(3): 795-806.
- Smine, A. (1998). Regulation of Brain G-Protein G0 by Alzheimer's Disease Gene Presenilin. *J Biol Chem* 273,(26): 16281-8.
- Smith, S., Anderson, H. A., Yu, G., Robertson, A., Allen, S. J., Tyler, S. J., Naylor, R. L., Mason, G., Wilcock, G. W., Roche, P. A., Fraser, P. E. and Dawbarn, D. (2000). Identification of syntaxin 1A as a novel binding protein for presenilin-1. *Mol Brain Res* 78,(1-2): 100-7.

- Song, W., Nadeau, P., Yuan, M., Yang, X., Shen, J. and Yankner, B. A. (1999). Proteolytic release and nuclear translocation of Notch-1 are induced by presenilin-1 and impaired by pathogenic presenilin-1 mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96,(12): 6959-63.
- Sorbi, S., Forleo, P., Tedde, A., Cellini, E., Ciantelli, M., Bagnoli, S. and Nacmias, B. (2001). Genetic risk factors in familial Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev* 122,(16): 1951-60.
- Soriano, S., Kang, D. E., Fu, M., Pestell, R., Chevallier, N., Zheng, H. and Koo, E. H. (2001). Presenilin 1 negatively regulates beta-catenin/T cell factor/lymphoid enhancer factor-1 signaling independently of beta-amyloid precursor protein and notch processing. *J Cell Biol* 152,(4): 785-94.
- St George-Hyslop, P. H. (2000). Piecing together Alzheimer's. *Sci Am* 283,(6): 76-83.
- Stabler, S. M., Ostrowski, L. L., Janicki, S. M. and Monteiro, M. J. (1999). A myristoylated calcium-binding protein that preferentially interacts with the Alzheimer's disease presenilin 2 protein. *J Cell Biol* 145,(6): 1277-92.
- Stahl, B., Diehlmann, A. and Sudhof, T. C. (1999). Direct interaction of Alzheimer's disease-related presenilin 1 with armadillo protein p0071. *J Biol Chem* 274,(14): 9141-8.
- Stagljar, I., Korostensky, C., Johnsson, N. and teHeesen, S. (1998). A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95,(9): 5187-92.
- Steiner, H., Capell, A., Pesold, B., Citron, M., Kloetzel, P. M., Selkoe, D. J., Romig, H., Mendla, K. and Haass, C. (1998). Expression of Alzheimer's disease-associated presenilin-1 is controlled by proteolytic degradation and complex formation. *J Biol Chem* 273,(48): 32322-31.
- Steiner, H., Duff, K., Capell, A., Romig, H., Grim, M. G., Lincoln, S., Hardy, J., Yu, X., Picciano, M., Fichteler, K., Citron, M., Kopan, R., Pesold, B., Keck, S., Baader, M., Tomita, T., Iwatsubo, T., Baumeister, R. and Haass, C. (1999a). A loss of function mutation of presenilin-2 interferes with amyloid beta-peptide production and notch signaling. *J Biol Chem* 274,(40): 28669-73.
- Steiner, H. and Haass, C. (2000). Intramembrane proteolysis by presenilins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1,(3): 217-24.
- Steiner, H., Kostka, M., Romig, H., Basset, G., Pesold, B., Hardy, J., Capell, A., Meyn, L., Grim, M. L., Baumeister, R., Fichteler, K. and Haass, C. (2000). Glycine 384 is required for presenilin-1 function and is conserved in bacterial polytopic aspartyl proteases. *Nat Cell Biol* 2,(11): 848-51.
- Steiner, H., Revesz, T., Neumann, M., Romig, H., Grim, M. G., Pesold, B., Kretschmar, H. A., Hardy, J., Holton, J. L., Baumeister, R., Houlden, H. and Haass, C. (2001). A pathogenic presenilin-1 deletion causes aberrant Abeta 42 production in the absence of congophilic amyloid plaques. *J Biol Chem* 276,(10): 7233-9.
- Steiner, H., Romig, H., Grim, M. G., Philipp, U., Pesold, B., Citron, M., Baumeister, R. and Haass, C. (1999b). The biological and pathological function of the presenilin-1 Deltaexon 9 mutation is independent of its defect to undergo proteolytic processing. *J Biol Chem* 274,(12): 7615-8.
- Steiner, H., Romig, H., Pesold, B., Philipp, U., Baader, M., Citron, M., Loetscher, H., Jacobsen, H. and Haass, C. (1999c). Amyloidogenic function of the Alzheimer's disease-associated presenilin 1 in the absence of endoproteolysis. *Biochemistry* 38,(44): 14600-5.
- Struhl, G. and Adachi, A. (2000). Requirements for presenilin-dependent cleavage of notch and other transmembrane proteins. *Mol Cell* 6,(3): 625-36.

Struhl, G. and Greenwald, I. (1999). Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*. *Nature* 398,(6727): 522-5.

Struhl, G. and Greenwald, I. (2001). Presenilin-mediated transmembrane cleavage is required for Notch signal transduction in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98,(1): 229-34.

Sudoh, S., Kawamura, Y., Sato, K., Wang, R., Saido, T. C., Oyama, F., Sakaki, Y., Komano, H. and Yanagisawa, K. (1998). Presenilin 1 mutations linked to familial Alzheimer's disease increase the intracellular levels of amyloid beta-protein 1-42 and its n-terminally truncated variant(s) which are generated at distinct sites. *J Neurochem* 71,(4): 1535-43.

T

Takashima, A., Murayama, M., Murayama, O., Kohno, T., Honda, T., Yasutake, K., Nihonmatsu, N., Mercken, M., Yamaguchi, H., Sugihara, S. and Wolozin, B. (1998). Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3 beta and its substrate tau. *Proc Natl Acad Sci USA* 95,(16): 9637-41.

Tanahashi, H., Kawakatsu, S., Kaneko, M., Yamanaka, H., Takahashi, K. and Tabira, T. (1996). Sequence analysis of presenilin-1 gene mutation in Japanese Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett* 218,(2): 139-41.

Tanahashi, H. and Tabira, T. (1999). Isolation of human delta-catenin and its binding specificity with presenilin 1. *Neuroreport* 10,(3): 563-8.

Tanahashi, H. and Tabira, T. (2000). Alzheimer's disease-associated presenilin 2 interacts with DRAL, an LIM-domain protein. *Hum Mol Genet* 9,(15): 2281-9.

Thinakaran, G. (2001). Metabolism of presenilins. *J Mol Neurosci* 17,(2): 183-92.

Thinakaran, G., Borchelt, D. R., Lee, M. K., Slunt, H. H., Spitzer, L., Kim, G., Ratovitsky, T., Davenport, F., Nordstedt, C., Seeger, M., Hardy, J., Levey, A. I., Gandy, S. E., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Price, D. L. and Sisodia, S. S. (1996). Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron* 17,(1): 181-90.

Thinakaran, G., Harris, C. L., Ratovitski, T., Davenport, F., Slunt, H. H., Price, D. L., Borchelt, D. R. and Sisodia, S. S. (1997). Evidence that levels of presenilins (PS1 and PS2) are coordinately regulated by competition for limiting cellular factors. *J. Biol. Chem.* 272,(45): 28415-22.

Thinakaran, G., Regard, J. B., Bouton, C. M., Harris, C. L., Price, D. L., Borchelt, D. R. and Sisodia, S. S. (1998). Stable association of presenilin derivatives and absence of presenilin interactions with APP. *Neurobiol Dis* 4,(6): 438-53.

Tomita, T., Takikawa, R., Koyama, A., Morohashi, Y., Takasugi, N., Saido, T. C., Maruyama, K. and Iwatsubo, T. (1999). C terminus of presenilin is required for overproduction of amyloidogenic A beta 42 through stabilization and endoproteolysis of presenilin. *J Neurosci* 19,(24): 10627-34.

Tomita, T., Watabiki, T., Takikawa, R., Morohashi, Y., Takasugi, N., Kopan, R., De Strooper, B. and Iwatsubo, T. (2001). The First Proline of PALP Motif at the C Terminus of Presenilins Is Obligatory for Stabilization, Complex Formation, and gamma -Secretase Activities of Presenilins. *J Biol Chem* 276,(35): 33273-81.

Tysoe, C., Whittaker, J., Xuereb, J., Cairns, N. J., Cruts, M., Van, B. C., Wilcock, G. and Rubinsztein, D. C. (1998). A presenilin-1 truncating mutation is present in two cases with autopsy-confirmed early-onset Alzheimer disease. *Am J Hum Genet* 62,(1): 70-6.

U

Urban, S. and Freeman, M. (2002). Intramembrane proteolysis controls diverse signalling pathways throughout evolution. *Curr Opin Genet Dev* 12,(5): 512-8.

V

Van Broeckhoven, C. (1995). Presenilins and Alzheimer disease. *Nat Genet* 11,(3): 230-2.

van Drogen, F. and Peter, M. (2002). MAP kinase cascades: scaffolding signal specificity. *Curr Biol* 12,(2): R53-5.

Van Gassen, G., De, J. C., Pype, S., Van, C. W., Julliams, A., Vanderhoeven, I., Woodrow, S., Beyaert, R., Huylebroeck, D. and Van, B. C. (1999). Alzheimer's disease associated presenilin 1 interacts with HC5 and ZETA, subunits of the catalytic 20S proteasome. *Neurobiol Disease* 6,(5): 376-91.

Vassar, R. and Citron, M. (2000). A beta-generating enzymes: Recent advances in beta- and gamma-secretase research. *Neuron* 27,(3): 419-22.

Velez, P. C. a., Del, R. M. J. and Lopera, F. (1998). Familial Alzheimer's disease: Oxidative stress, beta-amyloid, presenilins, and cell death. *General Pharmacol* 31,(5): 675-81.

Verdile, G., Martins, R. N., Duthie, M., Holmes, E., St George-Hyslop, P. H. and Fraser, P. E. (2000). Inhibiting amyloid precursor protein C-terminal cleavage promotes an interaction with presenilin 1. *J Biol Chem* 275,(27): 20794-8.

Vito, P., Wolozin, B., Ganjei, J. K., Iwasaki, K., Lacana, E. and D'Adamio, L. (1996). Requirement of the familial Alzheimer's disease gene PS2 for apoptosis. Opposing effect of ALG-3. *J Biol Chem* 271,(49): 31025-8.

W

Walter, J., Capell, A., Grunberg, J., Pesold, B., Schindzielorz, A., Prior, R., Podlisny, M. B., Fraser, P., Hyslop, P. S., Selkoe, D. J. and Haass, C. (1996). The Alzheimer's disease-associated presenilins are differentially phosphorylated proteins located predominantly within the endoplasmic reticulum. *Mol Med* 2,(6): 673-91.

Walter, J., Grunberg, J., Capell, A., Pesold, B., Schindzielorz, A., Citron, M., Mendla, K., George, H. P., Multhaup, G., Selkoe, D. J. and Haass, C. (1997). Proteolytic processing of the Alzheimer disease-associated presenilin-1 generates an in vivo substrate for protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94,(10): 5349-54.

Walter, J., Grunberg, J., Schindzielorz, A. and Haass, C. (1998). Proteolytic fragments of the Alzheimer's disease associated presenilins-1 and -2 are phosphorylated in vivo by distinct cellular mechanisms. *Biochemistry* 37,(17): 5961-7.

Walter, J., Kaether, C., Steiner, H. and Haass, C. (2001). The cell biology of Alzheimer's disease: uncovering the secrets of secretases. *Curr Opin Neurobiol* 11,(5): 585-90.

Wang, R., Sweeney, D., Gandy, S. E. and Sisodia, S. S. (1996). The profile of soluble amyloid beta protein in cultured cell media. Detection and quantification of amyloid beta protein and variants by immunoprecipitation-mass spectrometry. *J Biol Chem* 271,(50): 31894-902.

Wang, J., Brunkan, A. and Goate, A. (2002). Proline 433 is part of a highly conserved domain of presenilin that is essential for function. *The 8th international conference on Alzheimer's Disease and related disorders. Stockholm, Sweden.*

Weidemann, A., Eggert, S., Reinhard, F. B., Vogel, M., Paliga, K., Baier, G., Masters, C. L., Beyreuther, K. and Evin, G. (2002). A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing. *Biochemistry* 41,(8): 2825-35.

Weidemann, A., Paliga, K., Durrwang, U., Czech, C., Evin, G., Masters, C. L. and Beyreuther, K. (1997). Formation of stable complexes between two Alzheimer's disease gene products: presenilin-2 and beta-amyloid precursor protein. *Nat Med* 3,(3): 328-32.

Weihl, C. C., Miller, R. J. and Roos, R. P. (1999). The role of beta-catenin stability in mutant PS1-associated apoptosis. *Neuroreport* 10,(12): 2527-32.

Weihofen, A., Binns, K., Lemberg, M. K., Ashman, K. and Martoglio, B. (2002). Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-type aspartic protease. *Science* 296,(5576): 2215-8.

Weinmaster, G. (2000). Notch signal transduction: a real Rip and more. *Cur Op Genet Dev* 10,(4): 363-9.

Wilson, C. A., Doms, R. W., Zheng, H. and Lee, V. M. (2002). Presenilins are not required for Abeta42 production in the early secretory pathway. *Nat Neurosci* 5,(9): 849-55.

Wittenburg, N., Eimer, S., Lakowski, B., Rohrig, S., Rudolph, C. and Baumeister, R. (2000). Presenilin is required for proper morphology and function of neurons in C-elegans. *Nature* 406,(6793): 306-9.

Wolfe, M. S. (2001). gamma-Secretase inhibitors as molecular probes of presenilin function. *J Mol Neurosci* 17,(2): 199-204.

Wolfe, M. S. and Selkoe, D. J. (2002). Biochemistry. Intramembrane proteases--mixing oil and water. *Science* 296,(5576): 2156-7.

Wolfe, M. S., Xia, W., Ostaszewski, B. L., Diehl, T. S., Kimberly, W. T. and Selkoe, D. J. (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 398,(6727): 513-7.

Wolozin, B. (1998). Regulation of Apoptosis by Presenilin 1. *Neurobiol Aging* 19,(1S): S23-S27.

Wolozin, B., Iwasaki, K., Vito, P., Ganjei, J. K., Lacana, E., Sunderland, T., Zhao, B., Kusiak, J. W., Wasco, W. and D'Adamio, L. (1996). Participation of presenilin 2 in apoptosis: enhanced basal activity conferred by an Alzheimer mutation. *Science* 274,(5293): 1710-3.

Wong, P. C., Zheng, H., Chen, H., Becher, M. W., Sirinathsinghji, D. J., Trumbauer, M. E., Chen, H. Y., Price, D. L., Van, d. P. L. and Sisodia, S. S. (1997). Presenilin 1 is required for Notch1 and DII1 expression in the paraxial mesoderm. *Nature* 387,(6630): 288-92.

X

Xia, W., Zhang, J., Ostaszewski, B. L., Kimberly, W. T., Seubert, P., Koo, E. H., Shen, J. and Selkoe, D. J. (1998). Presenilin 1 Regulates the Processing of b-Amyloid Precursor Protein C-Terminal Fragments and the Generation of Amyloid b-Protein in Endoplasmic Reticulum and Golgi. *Biochemistry* 37: 16465-71.

Xia, X., Qian, S., Soriano, S., Wu, Y., Fletcher, A. M., Wang, X. J., Koo, E. H., Wu, X. and Zheng, H. (2001). Loss of presenilin 1 is associated with enhanced beta-catenin signaling and skin tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98,(19): 10863-8.

Xia, X., Wang, P., Sun, X., Soriano, S., Shum, W. K., Yamaguchi, H., Trumbauer, M. E., Takashima, A., Koo, E. H. and Zheng, H. (2002). The aspartate-257 of presenilin 1 is indispensable for mouse development and production of beta-amyloid peptides through beta-catenin-independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99,(13): 8760-5.

Xu, X. M., Shi, Y. C., Wu, X., Gambetti, P., Sui, D. X. and Cui, M. Z. (1999). Identification of a novel PSD-95/Dlg/ZO-1 (PDZ)-like protein interacting with the C terminus of presenilin-1. *J Biol Chem* 274,(46): 32543-6.

Y

Yan, R. Q., Bienkowski, M. J., Shuck, M. E., Miao, H. Y., Tory, M. C., Pauley, A. M., Brashler, J. R., Stratman, N. C., Mathews, W. R., Buhl, A. E., Carter, D. B., Tomasselli, A. G., Parodi, L. A., Heinrichson, R. L. and Gurney, M. E. (1999). Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* 402,(6761): 533-7.

Yang, D. S., Tandon, A., Chen, F., Yu, G., Yu, H., Arawaka, S., Hasegawa, H., Duthie, M., Schmidt, S. D., Ramabhadran, T. V., Nixon, R. A., Mathews, P. M., Gandy, S. E., Mount, H. T., St George-Hyslop, P. and Fraser, P. E. (2002). Mature glycosylation and trafficking of nicastrin modulate its binding to presenilins. *J Biol Chem* 277,(31): 28135-42.

Ye, Y., Lukinova, N. and Fortini, M. E. (1999). Neurogenic phenotypes and altered Notch processing in Drosophila Presenilin mutants. *Nature* 398,(6727): 525-9.

Ye, Y. H. and Fortini, M. E. (1998). Characterization of Drosophila Presenilin and its colocalization with Notch during development. *Mech Dev* 79,(1-2): 199-211.

Ye, Y. H. and Fortini, M. E. (1999). Apoptotic activities of wild-type and Alzheimer's disease-related mutant presenilins in Drosophila melanogaster. *J Cell Biol* 146,(6): 1351-64.

Yoo, A. S., Cheng, I., Chung, S., Grenfell, T. Z., Lee, H., Pack Chung, E., Handler, M., Shen, J., Xia, W. M., Tesco, G., Saunders, A. J., Ding, K., Frosch, M. P., Tanzi, R. E. and Kim, T. W. (2000). Presenilin-mediated modulation of capacitative calcium entry. *Neuron* 27,(3): 561-72.

Yu, C., Kim, S. H., Ikeuchi, T., Xu, H., Gasparini, L., Wang, R. and Sisodia, S. S. (2001). Characterization of a presenilin-mediated APP carboxyl terminal fragment gamma CTFgamma: Evidence for distinct mechanisms involved in gamma-secretase processing of the APP and notch 1 transmembrane domains. *J Biol Chem* 276,(47): 43756-60.

Yu, G. (1998). The Presenilin 1 Protein Is a Component of a High Molecular Weight Intracellular Complex That Contains β -Catenin. *J Biol Chem* 273,(26): 16470-5.

Yu, G., Chan, F., Nishimura, M., Steiner, H., Tandon, A., Kawarai, T., Arawaka, T., Supala, A., Song, Y.-Q., Rogaeva, E., Holmes, E., Zhang, D. M., Milman, P., Fraser, P. E., Haass, C. and St. George-Hyslop, P. (2000a). Mutation of Conserved Aspartates Affects maturation of Both aspartate mutant and endogenous presenilin 1 and presenilin 2 complexes. *J Biol Chem* 275,(35): 27348-53.

Yu, G., Chen, F., Nishimura, M., Steiner, H., Tandon, A., Kawarai, T., Arawaka, S., Supar, A., Song, Y. Q., Rogaeva, E., Holmes, E., Zhang, M., Milman, P., Fraser, P., Haass, C. and St George Hyslop, P. (2000b). Mutation of conserved aspartates affect maturation of presenilin 1 and presenilin 2 complexes. *Acta Neurol Scand Suppl* 176: 6-11.

Yu, G., Nishimura, M., Arawaka, S., Levita, D., Zhang, L., Tandon, A., Song, Y.-Q., Rogaeva, E., Chen, F., Kawarai, T., Supala, A., Levesque, L., Yu, H., Yang, D.-S., Holmes, E., Milman, P., Liang, Y., Zhang, D. M., Xu, D. H., Sato, C., Rogaev, E., Smith, M., Janues, C., Zhang, Y., Aebbersold, R., Farrer, L., Sorbi, S., Bruni, A., Fraser, P. and St George-Hyslop, P. (2000c). Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and β APP processing. *Nature* 407,(7): 48-54.

Yu, H., Saura, C. A., Choi, S. Y., Sun, L. D., Yang, X., Handler, M., Kawarabayashi, T., Younkin, L., Fedeles, B., Wilson, M. A., Younkin, S., Kandel, E. R., Kirkwood, A. and Shen, J. (2001). APP processing and synaptic plasticity in presenilin-1 conditional knockout mice. *Neuron* 31,(5): 713-26.

Z

Zhang, J. (1998). Subcellular Distribution and Turnover of Presenilins in Transfected Cells. *J Biol Chem* 273,(20): 12436-42.

Zhang, J., Ye, W., Wang, R., Wolfe, M. S., Greenberg, B. D. and Selkoe, D. J. (2002). Proteolysis of Chimeric beta -Amyloid Precursor Proteins Containing the Notch Transmembrane Domain Yields Amyloid beta -like Peptides. *J Biol Chem* 277,(17): 15069-75.

Zhang, S. X., Guo, Y. and Boulianne, G. L. (2001). Identification of a novel family of putative methyltransferases that interact with human and Drosophila presenilins. *Gene* 280,(1-2): 135-44.

Zhang, W., Han, S. W., McKeel, D. W., Goate, A. and Wu, J. Y. (1998a). Interaction of Presenilins with the Filamin Family of Actin-Binding Proteins. *J Neurosci* 18,(3): 914-22.

Zhang, Z. H., Hartmann, H., Do, V. M., Abramowski, D., SturchlerPierrat, C., Staufenbiel, M., Sommer, B., vandeWetering, M., Clevers, H., Saftig, P., DeStrooper, B., He, X. and Yankner, B. A. (1998b). Destabilization of beta-catenin by mutations in presenilin-1 potentiates neuronal apoptosis. *Nature* 395,(6703): 698-702.

Zhang, Z. H., Nadeau, P., Song, W. H., Donoviel, D., Yuan, M. L., Bernstein, A. and Yankner, B. A. (2000). Presenilins are required for gamma-secretase cleavage of beta-APP and transmembrane cleavage of Notch-1. *Nat Cell Biol* 2,(7): 463-5.

Zhou, J., Liyanage, U., Medina, M., Ho, C., Simmons, A. D., Lovett, M. and Kosik, K. S. (1997). Presenilin 1 interaction in the brain with a novel member of the Armadillo family. *Neuroreport* 8,(8): 2085-90.

Homodimerization of presenilin N-terminal fragments is affected by mutations linked to Alzheimer's disease

Sara Cervantes, Roser González-Duarte, Gemma Marfany*

Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avda. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

Received 14 May 2001; revised 24 July 2001; accepted 24 July 2001

First published online 14 August 2001

Edited by Gianni Cesareni

Abstract Mutations on human presenilins 1 and 2 cause dominant early-onset familial Alzheimer's disease (FAD). Presenilins are polytopic transmembrane proteins endoproteolytically processed in vivo to N- and C-terminal fragments (NTFs and CTFs). The functional presenilin unit consists of a high molecular weight complex that contains both fragments. Here we show NTF:NTF, CTF:CTF and NTF:CTF interactions by yeast two-hybrid and in vivo endoplasmic reticulum split-ubiquitin assays. Our results also highlight the involvement of HL1 – the hydrophilic loop between TMI and TMII – in the NTF:NTF binding site. Besides, nine FAD-linked presenilin mutations substantially affected HL1:HL1 binding. From the evidence of NTF and CTF homodimerization, we propose the contribution of two NTFs and two CTFs, instead of a single NTF:CTF heterodimer, to the functional presenilin- γ -secretase complex and that FAD mutations affect the assembly or stability of this complex. © 2001 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Key words: Presenilin complex; Alzheimer's disease; Familial Alzheimer's disease mutation; γ -Secretase; Split-ubiquitin system; *Drosophila*

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the major neurodegenerative dementia syndrome in humans. Although it has a complex aetiology, a small proportion of AD cases show autosomal dominant inheritance. Mutations in three genes, the amyloid precursor protein (APP) and two members of the presenilin family, PS1 and PS2, cause early-onset AD (also called familial AD or FAD) [1,2]. Presenilins are polytopic transmembrane proteins, primarily located in the endoplasmic reticulum (ER) and early Golgi [3], which show a high degree of evolutionary conservation. Although the precise role of presenilins has not yet been established, biochemical and biological studies suggest their involvement in many crucial cellular processes such as calcium homeostasis, protein folding and trafficking, GSK-3 β and tau metabolism, neuronal apoptosis and γ -secretase cleavage of APP and Notch ([4,5] and references therein).

PS1 and PS2 are predominantly found in vivo as ~27–28 kDa N-terminal (NTF) and ~16–17 kDa C-terminal (CTF) fragments. Full-length presenilin polypeptides are short-lived molecules, rapidly degraded via proteasomes, in contrast to

NTFs and CTFs, which are much more stable [6]. The generation and accumulation of NTFs and CTFs are highly regulated. Both fragments build up to saturable levels at 1:1 stoichiometry, even when over-expressed [7,8]. In addition, full-length presenilins contribute to low molecular weight complexes (180 kDa), which develop into larger aggregates (250 kDa) in which the NTF and CTF heterodimerize [9–12]. This heterodimerization is a prerequisite for the endoproteolytic processing [13]. It has been proposed that the stable NTF:CTF heterodimer is the biologically active complex [14].

To date, the domains responsible for presenilin complex formation and other intramolecular interactions have not been reported. We previously characterized the *Drosophila* full-length presenilin (*Psn*) [15] and we now report the binding between several presenilin domains by two-hybrid analysis. Our data, also confirmed by the in situ split-ubiquitin assay support the predicted NTF:CTF heterodimerization and also reveal NTF:NTF and CTF:CTF homodimers. Furthermore, from the two-hybrid analysis and the glutathione *S*-transferase (GST) pull-down binding assay we infer that the NTF hydrophilic loop facing the ER between TMI and TMII accounts for the NTF:NTF interaction and that this binding is altered by FAD-linked presenilin mutations.

2. Materials and methods

2.1. DNA constructs

The entire sequence and six fragments of the *Drosophila* presenilin gene (*Psn*) were subcloned in-frame into the yeast two-hybrid pACT2 (prey) and pAS2-1 (bait) vectors (Matchmaker Yeast Two-hybrid system II, Clontech). The primers used for PCR amplification of each *Psn* fragment and their position with respect the protein are listed in Table 1.

For GST pull-down experiments, PSN HL1 (the 32 aa hydrophilic loop between TMI and TMII) was fused to GST (GST-HL1). The second construct containing the PSN-HL1 fused to the HA (hemagglutinin) epitope and GST (GST-HA-HL1) was obtained using a HA-HL1 fragment obtained from the HL1pACT2 construct.

Site-directed mutagenesis was performed by PCR amplification using the full-length *Psn* template as described [16]. Mutagenic oligonucleotides are listed in Table 1.

Split-ubiquitin constructs containing *Drosophila* PSN NTF (aa 1–322) and CTF (aa 321–541) were generated as follows: A yeast centromeric plasmid (derived from pRS415, kindly provided by B. Piña) containing the ADH1 promoter and termination expression cassettes was constructed to clone either PSN NTF or PSN CTF directly fused to Cub-ProtA-LexA-Vp16. The gene fusion Cub-ProtA-LexA-Vp16 was obtained from pRS375 (kindly provided by I. Stagljar). The fusions between PSN NTF and PSN CTF to Cub generated the peptide linkers GSTSSRVEGSTMSG and SSSRVEGSTMSG, respectively. The fusion constructs containing NubG fused to PSN NTF and to PSN CTF were cloned into pRS396 (kindly given by I. Stagljar).

*Corresponding author. Fax: (34)-93-4110969.

E-mail address: gemma@porthos.bio.ub.es (G. Marfany).

jar) by substituting ALG5-Nub as a cassette. The expression from these Nub-PSN-derived fusions was driven by the CUP1 promoter. The fusions NubG-PSN NTF and NubG-PSN CTF generated the short peptide linker IIEF.

The identity and reading frame of all DNA constructs was confirmed by sequencing with the Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer) and a 377 ABI PRISM sequencer.

2.2. Yeast two-hybrid assay

Yeast strains Y190 and CG-1945 were co-transformed with prey and bait plasmids derived from pACT2 and pAS2-1 using the standard lithium acetate procedure. Transformants were selected for growth on SD-His/-Trp/-Leu plates with 25 mM 3-aminotriazole for the Y190 strain and 5 mM for the CG-1945. Y190 transformants were assayed for β -galactosidase activity by filter-lift assay using X-gal as a substrate. Quantification of β -galactosidase activity was achieved by a liquid culture β -galactosidase assay using ONPG as substrate. Negative controls were performed using pLAMS5' (Clontech) and empty prey and bait vectors. All protocols were according to the manufacturer's instructions (Clontech).

2.3. Split-ubiquitin assay

Yeast strain L40 was co-transformed with the corresponding Nub- and Cub- derived constructs using the lithium acetate procedure. Transformants were selected for growth on SD-His/-Trp/-Leu with 25 mM 3-aminotriazole and 0.2 mM Cu²⁺.

2.4. Yeast protein extractions and immunoblotting

Detection of correct expression of GAL4-fusion proteins in the two-hybrid assay was performed by growing the corresponding clones bearing the two assayed constructs, until 0.4–0.6 OD. Protein extracts were obtained following the specifications of the plasmid supplier (Clontech), heated at 55°C, electrophoresed and immunodetected using the monoclonal antibody HA.11 (BAbCO) and a polyclonal antibody against GAL4-BD (Santa Cruz) for detecting GAL4-AD and GAL4-BD protein fusions, respectively. In the split-ubiquitin assays, yeast cells were grown in 25 ml of the corresponding rich or selective media up to 1 O.D., harvested by centrifugation, washed twice with 1 vol of distilled water and finally resuspended in 150 μ l of cold lysis buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.5; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 1% digitonin; 0.5% NP-40 and protease inhibitors). Cells were mechanically broken with glass beads and the protein extract was recovered after centrifugation (4500 rpm in a microfuge). After a second centrifugation (13000 rpm in a microfuge) for 20 min, pellets and supernatants were treated separately. Pellets containing insoluble and membrane associated proteins were directly resuspended in protein loading buffer solution for SDS-PAGE gels, whereas supernatants were precipitated with 5 vol of cold acetone (1 h at -20°C), centrifuged, air-dried and resuspended in protein loading buffer solution. Protein samples were loaded onto an SDS-PAGE electrophoresis gel after

heating for 15 min at 50°C, blotted onto a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane, immunodetected with Anti-ProtA (Sigma) and visualized using SuperSignal (Pierce) reagents.

2.5. In vitro binding assay

GST-HL1, GST-HA-HL1 and GST constructs (derived from pGEX4T-1) were transformed into BL21 cells. Cells were grown overnight at 37°C, diluted 1:10 and grown for 1 h at 30°C. After induction with 1 mM IPTG for 90 min, cells were sonicated and the fusion proteins were affinity-bound to glutathione Sepharose beads, following the manufacturer's instructions (Amersham Pharmacia Biotech). Purified HA-HL1 was obtained after thrombin digestion of the immobilized GST-HA-HL1 protein as described [17]. Approximately 2 μ g of the immobilized GST and GST-HL1 proteins were mixed with HA-HL1 in 600 μ l of Bead Binding Buffer (20 mM HEPES, pH 7.9, 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 μ M ZnCl₂, 0.5% Triton X-100, 10% glycerol, 2 mM dithiothreitol and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). After incubation for 2 h at 4°C under gentle mixing, beads were washed three times in 500 μ l of Bead Binding Buffer, eluted in 2 \times Tris-tricine protein sample buffer and loaded onto a 20% SDS-polyacrylamide gel. The protein gels were blotted onto a PVDF filter, immunodetected with monoclonal antibody HA.11 (BAbCO) and visualized by enhanced chemoluminescence (Amersham Pharmacia Biotech).

3. Results and discussion

Positive NTF:CTF heterodimerization is shown (Fig. 1a), in agreement with previous findings on human and mouse cells mainly by co-immunoprecipitation and protein fractionation on glycerol velocity gradients [9,10,12,18,19]. This interaction occurred either in the absence or presence of an alternatively spliced exon [15] encoding 14 aa embedded in the cytoplasmic hydrophilic loop (HL6). Besides, the hydrophobic transmembrane domains of the NTF and CTF peptides did not interfere with transport to the nucleus nor with proper interaction as shown by the positive binding in the two-hybrid analysis (Fig. 1a), even though an ER location has been reported for these peptides. To identify the binding site for the NTF:CTF interaction, constructs encoding shorter peptide domains were analyzed. A shorter NTF containing the hydrophilic loop (N-loop, aa 1–100) interacted with either the HL6 cytosolic hydrophilic loop of CTF or the C-terminal hydrophobic segment (the last 38 aa), after TMVIII (C-loop) (Fig. 1a). Both interactions might be due either to a specific require-

Table 1

List of primers used in the experiments described in this work (PCR amplification of Psn-domains and site-directed mutagenesis)

Oligonucleotide	Sequence	First aa encoded
CompF	5'-GGAATTCATGGCTGCTGTC AATCT-3'	1
CompR	5'-CGGGATCCTATAAACACCTGCTTGGC-3'	541
NloopR	5'-CGGGATCCCCGTATTTTCAGGCCCTG-3'	100
HL1F	5'-GGAATTC AACTCCATCAGCTTCTAC-3'	123
HL1R	5'-CGGGATCCGGCACTCCAGA ACTTAAC-3'	154
HL6F	5'-GGAATTC TCGCCAAGAGGACCCCTC-3'	285
Loop6R	5'-CGGGATCCGCCACGTTCTTCTTGCCC-3'	454
NterR	5'-CGGGATCCAACAGTGT TACAAGTGC-3'	322
CterF	5'-GGAATTC ACTGT TACGCCG CAGCAA-3'	321
CterHLF	5'-GGAATTC CGCAAGGCGCTACCCGCC-3'	503
Y137H	5'-CTATCTCCTC <u>C</u> ACACACCTTTC-3'	site-directed mutagenesis
Y137C	5'-CTATCTCCTCT <u>G</u> CACACCTTTC-3'	site-directed mutagenesis
Y137P	5'-CTATCTCCTC <u>C</u> CCACACCTTTC-3'	site-directed mutagenesis
E142K	5'-ACCTTTCAT <u>A</u> AACAATCGCCCG-3'	site-directed mutagenesis
E142D	5'-ACCTTTCATG <u>A</u> TCAATCGCCCG-3'	site-directed mutagenesis
E142W	5'-ACCTTTCAT <u>T</u> GGCAATCGCCCG-3'	site-directed mutagenesis
T138N	5'-TCTCCTCTACA <u>A</u> CCCTTTCAT-3'	site-directed mutagenesis
P139L	5'-CCTCTACACAC <u>T</u> TTCATGAA-3'	site-directed mutagenesis

Mutations are underlined.

F: Forward oligonucleotide; R: reverse oligonucleotide.

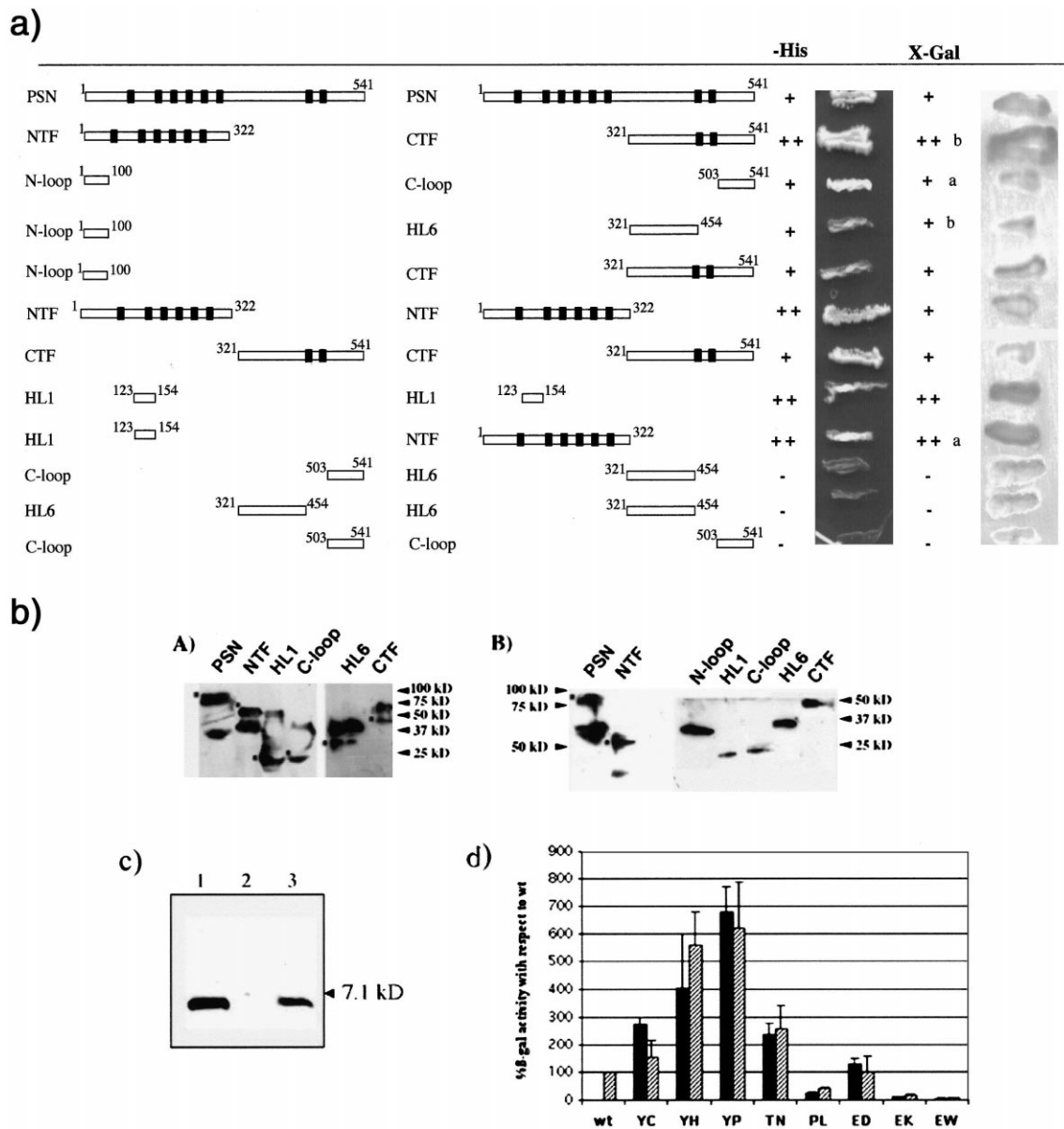


Fig. 1. a: Two-hybrid analyses of PSN fragments. The constructs encoding different domains of PSN listed were assayed in pairs (as shown). Histidine independent growth was tested in plates lacking histidine and supplemented with 5 mM 3-aminotriazole (3AT) in yeast strain CG-1945. β -Galactosidase activity was shown with the filter-lift assay and X-gal as substrate in yeast strain Y190. +, - indicate the strength of the interaction. a: reverse experiment gave inconsistent values; b: reverse confirmatory values were obtained. Black boxes depict transmembrane domains. b: Immunodetection of all the tested PSN fragments when fused to the GAL4-BD (A) and GAL4-AD (B) domains. The immunoblot of the PSN peptides fused to the GAL4 domains rendered the expected size band (indicated by an asterisk), although in some cases other bands were also detected, corresponding to protein aggregates or to protein degradation. c: In vitro binding assay. GST-HL1 and GST alone were bound to glutathione Sepharose beads and mixed with purified HL1-HA. After incubation and washes, samples were resolved on 20% Tris-tricine polyacrylamide gel, blotted onto a PVDF membrane and immunodetected with anti-HA. Lane 1: Purified HL1-HA (5% of the amount used in the binding assays; control); 2: GST alone (negative control), HL1-HA was not retained; 3: GST-HL1, retained HL1-HA. d: Quantification of β -galactosidase activity. Yeast strain Y190 co-transformed with mutant and wild-type (wt) HL1pAS or HL1pACT was grown on selective medium. β -Galactosidase activity was quantified using ONPG as substrate. Values obtained for each pair of constructs (five to 10 replicas) are represented with respect to wt HL1pAS/HL1pACT clones, which represent the 100% activity. Black bars show heterozygous combinations: pAS carried the mutant HL1 and pACT, the wt HL1. Striped bars show homozygous mutations: both HL1pAS and HL1pACT constructs bore the mutant versions of HL1.

ment for NTF:CTF binding or to a 'sticky' nature of the N-loop itself, as the interacting segments were very different in their hydropathic profile. Our data on other positive interactions of this N-loop with several PSN peptides (data not shown) would support the latter. An immunodetection showing correct expression of all the tested PSN peptides when

fused to the GAL4-BD and GAL4-AD domains validated our previous results. (Fig. 1b).

We also tested NTF and CTF ability to form complexes other than the NTF:CTF heterodimer. The two-hybrid assay allowed to analyze NTF and CTF homodimerization, very difficult to detect otherwise. The strong interactions shown

suggested the formation of NTF:NTF and CTF:CTF homodimers (Fig. 1a). Again, the latter was unaffected by the 14 aa enclosed in the alternative exon. In order to identify the peptides responsible for NTF homodimerization, several shorter constructs were tested. Interestingly, the HL1 peptide corresponding to the 32 aa ER hydrophilic turn between TMI and TMII produced a clear HL1:HL1 homodimer (Fig. 1a), whereas the N-loop (first 100 aa) yielded inconsistent results and was not further considered. Additional positive and negative controls were assayed to confirm the specificity of all the interactions (Fig. 1a and data not shown). Finally, attempts to define the domains responsible for CTF:CTF homodimerization after dissecting CTF in several domains were not successful (Fig. 1a). These negative results were not due to incorrect

expression of the fusion proteins as shown by immunodetection (Fig. 1b). As transmembrane domains had not been included in these constructs, their contribution to homodimer binding could not be discarded.

To confirm HL1:HL1 homodimerization, a GST pull-down assay was performed. Of the two GST-HL1 constructs, the prey contained an additional HA epitope fused to HL1 (GST-HA-HL1) to allow discrimination from GST-HL1 (bait). After binding to glutathione beads, the GST-HA-HL1 protein was proteolytically with thrombin and the isolated HA-HL1 peptide was incubated with matrix-bound GST-HL1 (bait). After immunodetection of HA-HL1 with an anti-HA antibody, the specificity of the HL1:HL1 interaction was shown (Fig. 1c).

Interestingly, nine FAD-linked missense mutations are clus-

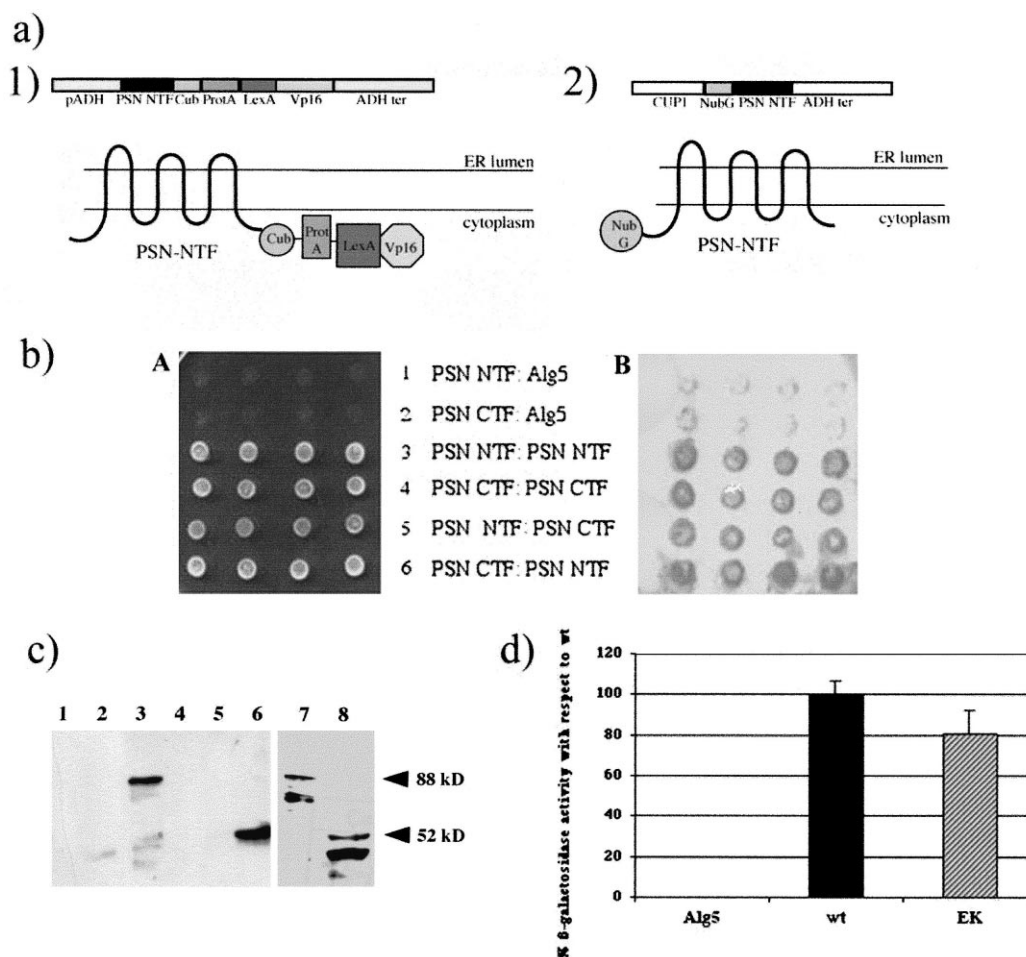


Fig. 2. a: The split-ubiquitin constructs (1) PSN NTF-Cub-ProtA-LexA-Vp16 and (2) NubG-PSN NTF were cloned in the yeast expression vectors pRS415 and pRS396, respectively. The topology of the fusion protein is also shown. Similar, PSN CTF constructs were also constructed to be tested in this assay (the figures are not depicted). The original split-ubiquitin constructs were kindly provided by I. Staglar. b: The split-ubiquitin assay was performed by co-transformation of yeast strain L40 with the following pairs of fusion proteins: (1) NubG-Alg5 and PSN NTF-Cub-ProtA-LexA-Vp16 (negative control); (2) NubG-Alg5 and PSN CTF-Cub-ProtA-LexA-Vp16 (negative control); (3) NubG-PSN NTF and PSN NTF-Cub-ProtA-LexA-Vp16; (4) NubG-PSN CTF and PSN CTF-Cub-ProtA-LexA-Vp16; (5) NubG-PSN NTF and PSN CTF-Cub-ProtA-LexA-Vp16; (6) NubG-PSN CTF and PSN NTF-Cub-ProtA-LexA-Vp16. (A) Three days growth on SD-Leu/Trp/His+3-aminotriazole (3AT) 25 mM; (B) X-Gal filter-lift assay. c: Immunodetection of the split-ubiquitin protein products using anti-ProtA on a Western blot of the protein cell extracts separated in pellet (lanes 1, 3, 5 and 7) and soluble (lanes 2, 4, 6 and 8) fractions. Lanes 1 and 2: untransformed yeast strain L40 (negative control); lanes 3 and 4: yeast expressing the PSN NTF-Cub-ProtA-LexA-Vp16 protein where only the precursor peptide is produced; lanes 5 and 6: yeast co-expressing NubG-PSN NTF and PSN NTF-Cub-ProtA-LexA-Vp16 proteins, where after the interaction of both NTF fragments and reconstitution of ubiquitin, the ProtA-LexA-Vp16 peptide is cleaved off; lanes 7 and 8: yeast co-expressing NubG-mutant (EK) PSN NTF and wt PSN NTF-Cub-ProtA-LexA-Vp16 proteins, where due to impaired NTF interaction, the ProtA-LexA-Vp16 peptide is cleaved off less efficiently (some uncleaved precursor still remained in the insoluble fraction). d: Quantification of β -galactosidase activity using ONPG as substrate. Yeast strain L40 was co-transformed with PSN NTF-Cub-ProtA-LexA-Vp16 and EK or wild-type (wt) NubG-PSN NTF and grown on selective medium. Values for each pair of constructs (6 replicas) are represented with respect to wt (100% activity).

tered in the HL1 domain, affect seven out of the 32 aa, and five of those correspond to conserved residues between human and *Drosophila*. To determine whether these mutations alter the HL1:HL1 interaction, we reproduced each mutation by site-directed mutagenesis. Wild-type and mutated HL1 constructs were quantified for β -galactosidase activity on ONPG following the yeast two-hybrid analysis. The *Drosophila* mutations analyzed were Y138H (Y115 in human PS1), Y138C (Y115 in human PS1), T139N (T116 in human PS1), P140L (P117 in human PS1), E143D (E120 in human PS1) and E143K (E120 in human PS1), reviewed in [5]. We also assayed two additional mutations, whose severity was predicted on the basis of aa similarities [20,21]: Y138P and E143W. As expected, all mutations clearly affected the interaction, either increasing or decreasing the affinity of the binding (Fig. 1d). Homodimerization was similarly affected when mutants were in homozygous or heterozygous combination, in agreement with the dominant inheritance associated to these ADs causing alleles (Fig. 1d). Extreme interaction variations were observed with the predicted two more severe mutations Y138P and E143W (six-fold increase and 20-fold decrease, respectively). Secondary structure prediction of the HL1 segment by the network protein sequence analysis (<http://pbil.ibcp.fr>) identified an extended strand (residues 11–15 of HL1) amidst a coiled-coil segment. Introduction of FAD-linked mutations in HL1 affected the extension and location of the extended strand, therefore linking variations in binding affinity to secondary structure. Although in some cases we have found positive correlation between FAD-onset age and aa substitutions (Table 2), clear cut genotype–phenotype correlations could be blurred by the different genetic background of each patient, even in a single family. In the same way, other attempts to establish a relationship between amyloid A β 42 peptide secretion and FAD age of onset have been unsuccessful [22].

Artefacts in the two-hybrid analysis could arise from incorrect protein folding or improper localization as they contain several highly hydrophobic domains and are usually anchored in the ER and Golgi. To discard this possibility, the yeast split-ubiquitin system, based on the reconstitution of a full-length ubiquitin from the N-terminal (Nub) and C-terminal (Cub) domains [23], was used to show that PSN NTFs and CTFs formed homo- and heterodimers when anchored in the ER. The Nub and Cub fragments were expressed as independent fusions with the presumptive interacting proteins (Fig. 2a). In addition, the C-terminal ubiquitin moiety (Cub) was fused to an immunodetectable peptide (ProtA) and a transcription factor (LexA-Vp16) (Fig. 2a). Upon in situ pro-

tein–protein interaction, the reconstituted ubiquitin would be cleaved by the numerous cellular UBPs (ubiquitin specific proteases), and the reporter genes (in our case, *HIS3* and *lacZ*) would be activated by the released transcription factor. To avoid diffusion of uncleaved Cub-ProtA-LexA-Vp16 precursor into the nucleus, this gene fusion was inserted into a low-expression centromeric vector. This in vivo assay allows (a) proper subcellular localization of the proteins analyzed, (b) detection of homodimers without the need to use epitopes, (c) easy co-transfection and simultaneous protein expression and finally, (d) reliable quantification of the interactions of wild-type and mutant proteins by the use of sensitive reporters.

Yeast strain L40 co-transformed with the corresponding PSN-derived fusion constructs containing Cub-ProtA-LexA-Vp16 and NubG (Fig. 2a), grew on plates lacking tryptophan, leucine and histidine and gave blue staining in X-gal assays (Fig. 2b). Our results clearly confirmed positive NTF:NTF, CTF:CTF and NTF:CTF when anchored in the ER (Fig. 2b). Further, the specificity of the interaction was confirmed by the absence of growth in yeast co-transformed with either PSN NTF-Cub-ProtA-LexA-Vp16 or PSN CTF-Cub-ProtA-LexA-Vp16 and another yeast ER transmembrane protein (Alg5-NubG) [23] (Fig. 2b, negative controls). The cleavage of the ProtA-LexA-Vp16 transcription factor by UBPs after NubG–Cub reconstitution was clearly confirmed by immunodetection (Fig. 2c). The cleaved ProtA-LexA-Vp16 product (52 kDa) was detected in the soluble protein fraction, while the uncleaved precursor PSN NTF-Cub-ProtA-LexA-Vp16 (88 kDa) was only present in the pellets containing insoluble or membrane associated proteins, thus indicating a correct localization of the presenilin fusion in the ER. This result agreed with previous reports showing that heterologous presenilins bound the ER membrane in yeast [24,25]. Only the uncleaved precursor PSN NTF-Cub-ProtA-LexA-Vp16 was detected in yeast transformed with this construct alone (Fig. 2c, compare lanes 3 and 4). In contrast, when yeast was co-transformed with the gene fusions containing NTF interacting partners, the cleaved transcription factor clearly appeared in the soluble fraction (Fig. 2c, compare lanes 6 and 8). In addition, we also assessed the effect of FAD-linked mutations in NTF:NTF in situ homodimerization, by introducing the substitution E143K (corresponding to human PS1 E120K Alzheimer's mutation) using site-directed mutagenesis. Clearly, the NTF:NTF interaction was impaired by the mutation, as the cleavage from the precursor was less efficient and some uncleaved precursor remained in the insoluble fraction (Fig. 2c, lanes 7 and 8). The effect of this mutation on NTF homodimerization was further confirmed by quantification of β -galactosidase activity. The mutant NTF clearly showed a decrease (80% of *lacZ* activity after six replicas) in binding affinity with respect to wild-type NTF (Fig. 2d). The higher decrease in the mutant HL1:HL1 interaction (detected by two-hybrid analysis, Fig. 1d) than in the mutant NTF:NTF (detected by the split-ubiquitin assay, Fig. 2d) could be explained by a more restricted conformation of the HL1 domain when flanked by the two transmembrane helices of the NTF peptide. In fact, if we consider that mutations causing AD are neither lethal nor strongly deleterious, a large effect of the mutations on presenilin function should not be expected.

According to our data, interactions between the different subdomains (NTF:CTF, NTF:NTF, CTF:CTF) would be

Table 2
Genotype–phenotype correlation between the mutation effect on the interaction and FAD-onset age

Mutation	Age at onset	β -Gal activity with respect to wild-type	
		heterozygous	homozygous
Y115C	42	$\times 2.74$	$\times 1.53$
Y115H	36	$\times 4.00$	$\times 5.60$
T116N	35–41	$\times 2.35$	$\times 2.56$
P117L	24–31	$\times 0.26$	$\times 0.40$
E120D	43–48	$\times 1.29$	$\times 1.00$
E120K	35–39	$\times 0.10$	$\times 0.16$

Interaction value between wild-type constructs is arbitrarily considered as 1.

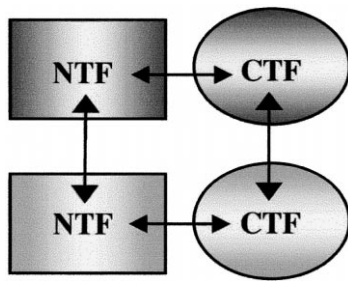


Fig. 3. Diagram showing an hypothetical presenilin functional unit with the observed interactions among NTFs and CTFs.

required for the correct assembly of a hypothetical tetramer, with two NTFs and two CTFs instead of a single NTF:CTF heterodimer (Fig. 3), strongly suggesting a new organization for the presenilin functional complex. Irrespective of whether the presenilin is the long-sought γ -secretase or a necessary partner for the γ -secretase activity, our hypothesis supports the notion that formation of the presenilin tetramer would be a crucial step for the assembly or stability of the high molecular weight presenilin- γ -secretase complex. Subtle changes in presenilin binding affinity caused by some FAD-linked mutations could result in dysfunction of the γ -secretase activity, thus triggering the cellular processes eventually leading to AD.

Acknowledgements: We thank the Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona for the use of the 377 ABI PRISM and Robin Rycroft for revising the English version. We are very grateful to B. Piña (CSIC, Barcelona) for the gift of plasmid pRS415 and to I. Stagljar (Institute of Veterinary Biochemistry, Zurich) for the gift of pRS304-, pRS305- and pRS314-derived constructs and helpful comments on the split-ubiquitin system. S.C. was a recipient of a fellowship from the CIRIT (Generalitat de Catalunya). This study was funded by BIO4-CT97-2123, PB96-0220 and PGC99-0168 (Ministerio de Ciencia y Tecnología) to R.G.-D.

References

- [1] Kovacs, D.M. and Tanzi, R.E. (1998) *Cell. Mol. Life Sci.* 54, 902–909.
- [2] Cruts, M. (1998) *Hum. Mut.* 11, 183–190.
- [3] Cruts, M., Hendriks, L. and Van Broeckhoven, C. (1996) *Hum. Mol. Genet.* 5, 1449–1455.
- [4] Drouet, B., Pincon, R.M., Chambaz, J. and Pillot, T. (2000) *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 705–715.
- [5] Fraser, P.E., Yang, D.S., Yu, G., Levesque, L., Nishimura, M., Arawaka, S., Serpell, L.C., Rogaeva, E. and St George-Hyslop, P. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1502, 1–15.
- [6] Ratovitski, T., Slunt, H.H., Thinakaran, G., Price, D.L., Sisodia, S.S. and Borchelt, D.R. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 24536–24541.
- [7] Thinakaran, G., Borchelt, D.R., Lee, M.K., Slunt, H.H., Spitzer, L., Kim, G., Ratovitsky, T., Davenport, F., Nordstedt, C., Seeger, M., Hardy, J., Levey, A.I., Gandy, S.E., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Price, D.L. and Sisodia, S.S. (1996) *Neuron* 17, 181–190.
- [8] Thinakaran, G., Harris, C.L., Ratovitski, T., Davenport, F., Slunt, H.H., Price, D.L., Borchelt, D.R. and Sisodia, S.S. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 28415–28422.
- [9] Yu, G., Chen, F., Levesque, G., Nishimura, M., Zhang, D.-M., Levesque, L., Rogaeva, E., Xu, D., Liang, Y., Duthie, M., St George-Hyslop, P.H. and Fraser, P.E. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 16470–16475.
- [10] Capell, A., Grunberg, J., Pesold, B., Diehlmann, A., Citron, M., Nixon, R., Beyreuther, K., Selkoe, D.J. and Haass, C. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 3205–3211.
- [11] Thinakaran, G., Regard, J.B., Bouton, C.M., Harris, C.L., Price, D.L., Borchelt, D.R. and Sisodia, S.S. (1998) *Neurobiol. Dis.* 4, 438–453.
- [12] Seeger, M., Nordstedt, C., Petanceska, S., Kovacs, D.M., Gouras, G.K., Hahne, S., Fraser, P., Levesque, L., Czernik, A.J., George, H.P., Sisodia, S.S., Thinakaran, G., Tanzi, R.E., Greenberg, P. and Gandy, S. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5090–5094.
- [13] Saura, C.A., Tomita, T., Davenport, F., Harris, C.L., Iwatsubo, T. and Thinakaran, G. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 13818–13823.
- [14] Yu, G., Chan, F., Nishimura, M., Steiner, H., Tandon, A., Kawarai, T., Arawaka, T., Supala, A., Song, Y.-Q., Rogaeva, E., Holmes, E., Zhang, D.M., Milman, P., Fraser, P.E., Haass, C. and St. George-Hyslop, P. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 27348–27353.
- [15] Marfany, G., DeFavero, J., Valero, R., DeJonghe, C., Woodrow, S., Hendriks, L., Van Broeckhoven, C. and González-Duarte, R. (1998) *J. Neurogenet.* 12 (1), 41–54.
- [16] Cols, N., Marfany, G., Atrian, S. and González-Duarte, R. (1993) *FEBS Lett.* 319, 90–94.
- [17] Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology* 2, John Wiley and Sons, Inc., New York
- [18] Steiner, H., Capell, A., Pesold, B., Citron, M., Kloetzel, P.M., Selkoe, D.J., Romig, H., Mendla, K. and Haass, C. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 32322–32331.
- [19] Behr, D., Elle, C., Underwood, J., Davis, J.B., Ward, R., Karan, E., Masters, C.L., Beyreuther, K. and Multhaup, G. (1999) *J. Neurochem.* 72, 1564–1573.
- [20] Schwartz, R.M. and Dayhoff, M.O. (1978) *Atlas Protein Seq. Struct.* 5, 353–358.
- [21] Feng, D.F., Johnson, M.S. and Doolittle, R.F. (1985) *J. Mol. Evol.* 21, 112–125.
- [22] Citron, M., Eckman, C.B., Diehl, T.S., Corcoran, C., Ostaszewski, B.L., Xia, W., Levesque, G., St. George-Hyslop, P., Younkin, S.G. and Selkoe, D.J. (1998) *Neurobiol. Dis.* 5, 107–116.
- [23] Stagljar, I., Korostensky, C., Johnsson, N. and teHeesen, S. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5187–5192.
- [24] Evin, G., Le, B.D., Culvenor, J.G., Galatis, D., Weidemann, A., Beyreuther, K., Masters, C.L. and Cappai, R. (2000) *NeuroReport* 11, 405–408.
- [25] Song, S.C., Ohba, M., Saito, Y., Honda, T., Takashima, A. and Takahashi, H. (2000) *Neurosci. Lett.* 282, 65–68.