



Memoria del 45º Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

## Rol neurotóxico de la proteína prión y de las cinasas Src en males priónicos y de Alzheimer

Neurotoxic role of the prion protein and Src family kinases in prion and Alzheimer's diseases

Málaga-Trillo Edward<sup>1\*</sup>

1. Laboratorio de Neurobiología del Desarrollo, Departamento de Biología, Universidad Peruana Cayetano Heredia.

\*Correspondencia. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Av. Honorio Delgado 430, San Martín de Porres, Lima, Perú, CP Lima 31 Tel. +51(1)319-0000, Ext. 233246, edward.malaga@upch.pe

### Resumen

Los trastornos neurodegenerativos asociados al envejecimiento son, por el momento, mortales e incurables. Si bien todos ellos se caracterizan por la agregación de proteínas mal plegadas en el tejido nervioso, la búsqueda de mecanismos patológicos comunes se dificulta debido a que no existe relación estructural o funcional aparente entre las proteínas involucradas en cada enfermedad. Notablemente, estudios recientes indican que el amiloide beta -causante del mal de Alzheimer- ejerce su actividad neurotóxica a través de la proteína prión, responsable a su vez del mal de Creutzfeldt-Jakob. Este sorprendente hallazgo reveló que dolencias clínicamente tan disímiles comparten mecanismos de neurotoxicidad, y resalta la necesidad de comprender cómo la proteína prión activa las vías celulares y moleculares que desencadenan la muerte neuronal. Usando el modelo del pez cebra, nuestro laboratorio ha demostrado que la proteína prión regula el complejo mecanismo por el cual las cinasas de la familia Src controlan la actividad de importantes proteínas de comunicación celular, y que esta cascada celular se ve alterada en presencia del amiloide beta. Con la base en estas observaciones, el presente artículo examina el rol de la proteína prión y las cinasas Src en la neurodegeneración priónica y de Alzheimer.

### Abstract

Age-related neurodegenerative illnesses are lethal and incurable so far. Although all of them involve the aggregation of misfolded proteins in nervous tissues, the search for common pathological mechanisms is hampered by the absence of structural or functional relationships between the proteins involved in each disease. Notably, recent studies indicate that beta amyloid -the culprit of Alzheimer's Disease- exerts its neurotoxic activity via the prion protein, the causing agent of Creutzfeldt-Jakob Disease. This surprising finding revealed that diseases so clinically dissimilar share mechanisms of neurotoxicity and highlights the need to comprehend how the prion protein activates the cellular and molecular pathways that trigger neuronal death. Using zebrafish as a model organism, our laboratory demonstrated that the prion protein regulates the complex mechanism by which Src family kinases control the activity of important proteins involved in cell-cell communication, and that this cellular cascade becomes altered in the presence of beta amyloid. Taking these observations as a starting point, the present article examines the role of the prion protein and Src kinases in prion and Alzheimer's neurodegeneration.

**Palabras clave:** Neurodegeneración, proteína prión, cinasas de la familia Src, mal de Alzheimer, pez cebra.

**Key words:** Neurodegeneration, prion protein, Src family kinases, Alzheimer's disease, zebrafish.

## Introducción

La creciente incidencia de males neurodegenerativos asociados al envejecimiento es el reflejo de un complejo fenómeno demográfico con dramáticas consecuencias socioeconómicas. A nivel mundial, la notoria reducción en las tasas de fecundidad y morbilidad ha ocasionado el envejecimiento de la población en solo unas cuantas décadas. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), hacia el año 2050 el mundo albergará 400 y 2,000 millones de personas con más de 80 y 60 años, respectivamente [1]. Este grupo humano, distribuido principalmente en países de ingresos bajos y medianos, representará cerca del 22% de la población mundial. Para entonces se habrá cuadruplicado el número de adultos mayores discapacitados debido a la demencia y otras enfermedades neurológicas que requieren cuidados prolongados.

Si bien la degeneración neuronal es considerada una de las consecuencias típicas del envejecimiento, sus causas pueden ser muy variadas e incluyen factores genéticos y ambientales, al punto de que existe una asombrosa diversidad de trastornos neurodegenerativos con distintas etiologías y manifestaciones clínicas, incluso en edades tempranas. Entre los más conocidos se cuentan las enfermedades de Alzheimer (AD, por sus siglas en inglés), Parkinson (PD), Huntington (HD), Creutzfeldt-Jakob (CJD), la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS) y la Demencia Frontotemporal (FTD), males que afectan diversos tipos de neuronas y regiones del sistema nervioso [2]. No obstante, estas claras diferencias, es notorio el hecho de que, con muy pocas excepciones, la neurodegeneración está asociada a la deposición anormal de proteínas mal plegadas en el tejido nervioso, fenómeno que se evidencia con la aparición de “cuerpos de inclusión” extracelulares, citoplasmáticos o nucleares. Esta observación llevó a la conclusión de que la agregación de proteínas mal plegadas es intrínsecamente patogénica, acuñándose el término de “proteínopatías” para describir al conjunto de enfermedades causadas por la acumulación de agregados proteicos. Sin embargo, muchos estudios indican que la formación de cuerpos de inclusión puede ser disociada de la toxicidad y sugieren que este proceso representa más bien una respuesta de protección de la célula y la fase final de un largo proceso de agregación cuya toxicidad se genera en

sus estadios iniciales [3]. Por ello es necesario estudiar al detalle la biología de las proteínas agregadas para comprender cómo sus cambios estructurales y funcionales pueden desencadenar los eventos bioquímicos que conllevan a la muerte neuronal. En particular, se hace imperiosa la necesidad de identificar mecanismos comunes a la mayor cantidad de dolencias neurodegenerativas posible, con el fin de desarrollar estrategias terapéuticas de amplio espectro.

Cada enfermedad neurodegenerativa se caracteriza por la agregación de un polipéptido distinto. Así, en la AD el amiloide beta ( $A\beta$ ) es la proteína agregada, mientras que en PD es la  $\alpha$ -sinucleína, en CJD la proteína prión (PrP), en HD la Huntingtina y en ALS la TDP-43. Una revisión de estas y otras proteínas involucradas en neurodegeneración revela que, aparte de su propensión al mal plegamiento y la agregación, todas ellas carecen de similitud estructural o funcional, presentando incluso diferentes patrones de localización subcelular. Por ejemplo, el péptido  $A\beta$  es producido principalmente en el medio extracelular, la PrP está anclada a la membrana celular, la Huntingtina asociada a vesículas y microtúbulos, la  $\alpha$ -sinucleína es citosólica y la TDP-43 es nuclear. Esta diversidad sugiere que diferentes dolencias neurodegenerativas involucran vías de neurotoxicidad distintas y que estas deben ser abordadas por separado. Sorprendentemente, estudios recientes hallaron que la PrP desempeña un papel esencial en la neurotoxicidad causada por oligómeros de  $A\beta$  [4-6], lo cual demuestra que la patogénesis de la AD y el CJD comparten mecanismos moleculares. Una asociación similar ha sido reportada para la PrP y la  $\alpha$ -sinucleína en PD [7], sugiriendo que este tipo de mecanismos podría ser relevante para otras enfermedades neurodegenerativas. Estos hallazgos revelan la importancia de la PrP como un socio molecular clave de diferentes moléculas neurotóxicas. En este artículo revisaremos los aportes de nuestro laboratorio a la comprensión de la función fisiológica de la PrP y su papel común en la patogénesis molecular de los males priónicos y AD.

## PrP y males priónicos

Las enfermedades causadas por priones o encefalopatías espongiformes transmisibles (TSEs, por sus siglas en inglés) son un grupo de dolencias

neurológicas raras y fatales que afectan a los seres humanos y otros mamíferos. Si bien su etiología puede ser esporádica, hereditaria o adquirida, frecuentemente están asociadas a la acumulación cerebral de PrP mal plegada y a la aparición de extensas lesiones neurodegenerativas al cabo de largos períodos de incubación que pueden durar hasta décadas [8]. Los rasgos histopatológicos clásicos de las TSEs son la vacuolación espongiiforme, pérdida neuronal y gliosis astrocítica, en tanto que las principales manifestaciones en humanos incluyen demencia progresiva, ataxia cerebelar y mioclonus [9]. La historia de estas enfermedades se remonta a los años 1700s cuando se describió en Inglaterra el *scrapie*, una condición neurológica propia de cabras y ovejas [10]. Las TSEs más comunes en humanos, la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob y el síndrome de Gerstmann Sträussler Scheinker (CJD y GSS, respectivamente por sus siglas en inglés), fueron descubiertas doscientos años más tarde (1920s y 1930s, respectivamente) [11]. Desde entonces, los males priónicos han hecho fascinantes apariciones en la literatura médica. En los 1950s se reportó el *kuru*, una extraña enfermedad neurológica que afectaba a las mujeres y niños de una tribu en Papúa-Nueva Guinea, y que era transmitida por medio de rituales canibalísticos [9]. En 1982, Stanley Prusiner sorprendió al mundo con el extraordinario descubrimiento de que el *scrapie* era transmitido por *priones*, novedosos agentes infecciosos carentes de ácidos nucleicos y conformados exclusivamente por la forma anormal de una proteína propia del huésped, PrP<sup>Sc</sup> [12-14]. En los 1990s, las TSEs estuvieron una vez más en el foco de la atención pública cuando millones de cabezas de ganado europeas fueron sacrificadas para erradicar un brote masivo del mal de las vacas locas, una epizootia provocada por los humanos que se extendió a estos bajo el nombre de enfermedad variante de CJD (vCJD) [9].

Lejos de ser un agente patógeno externo, la PrP es un constituyente usual de la superficie celular, una molécula que se produce normalmente en el cerebro y muchos otros tejidos. Lo que la diferencia de otras proteínas es su singular capacidad de asumir una conformación estructural con fuerte tendencia a auto-propagarse y agregarse para formar priones infecciosos [15]. Así, la PrP co-existe en dos isoformas estructurales codificadas por el mismo gen: la PrP celular o PrP<sup>C</sup>, y la anómala PrP *scrapie* o PrP<sup>Sc</sup> [16]. Curiosamente, a pesar de que los priones pueden acumularse en diferentes tipos celulares, es solamente en las neuronas donde provocan la muerte celular. Quizás las preguntas más esquivas de la biología de priones se refieren al rol fisiológico de la PrP<sup>C</sup> y a los mecanismos celulares por los cuales los

priones infligen daño cerebral. La tarea de desentrañar el rol natural de la PrP<sup>C</sup> fracasó por mucho tiempo debido a la escasez de fenotipos en ratones *knockout* carentes de PrP [17]. Si bien este fenómeno puede ser explicado por mecanismos de compensación genética [18], no está claro hasta qué punto otras proteínas pueden reemplazar funcionalmente a la PrP<sup>C</sup> [19]. Nuevos y más recientes análisis en ratones *knockout* para PrP han revelado defectos muy sutiles en la mielinización de axones y la función olfatoria, así como en la proliferación de precursores neurales y la autorenovación de células madre hematopoyéticas [20-23]. Desafortunadamente, la base molecular de estos fenotipos no ha podido ser esclarecida. Añadiendo complejidad al asunto, muchas de las diferentes funciones y socios de interacción que han sido propuestos para la PrP<sup>C</sup> carecen de relevancia para la fisiología neuronal y/o la neurodegeneración.

Entre los diversos roles moleculares atribuidos a la PrP<sup>C</sup>, su capacidad de iniciar señales intracelulares es congruente con su localización en la superficie celular y con su participación en roles tan variados como adhesión celular, activación de linfocitos, neuroprotección y función sináptica [24]. La importancia de las señales celulares impartidas por PrP fue elegantemente demostrada por Bruce Chesebro y colegas, quienes utilizando ratones transgénicos descubrieron que, sin el anclaje a la membrana celular, la PrP<sup>C</sup> puede convertirse en PrP<sup>Sc</sup> y agregarse, pero sin inducir daño neuronal [25]. Un gran número de proteínas de transmembrana e intracelulares cooperan con PrP<sup>C</sup> en la transducción de señales al interior de la célula [26]. De ellas, las proteínas tirosina cinasas de la familia Src (SFK, por sus siglas en inglés) son de gran interés en la neurobiología debido a su expresión en neuronas y su conexión con procesos neurodegenerativos. Por ejemplo, en células en cultivo y ratones, las infecciones priónicas elevan los niveles de la cinasa Src y proteínas fosforiladas en residuos de tirosina [27,28]. Más aun, la cinasa Fyn -otro miembro del familia SFK- es selectivamente sobreexpresada en cerebros de pacientes con mal de Alzheimer [29] y cataliza la hiperfosforilación de la proteína Tau [30], cuya agregación y asociación a microtúbulos también contribuyen a la neurodegeneración. Coincidentemente, la sobreexpresión de Fyn desencadena daño sináptico en modelos de Alzheimer murinos [31], mientras que su *knockdown* reduce la fosforilación de Tau, eleva de los niveles de a $\beta$  y provoca déficits de aprendizaje espacial [32]. Estos hallazgos evidencian la participación de las SFKs en vías neurotóxicas que son comunes a múltiples condiciones neurodegenerativas.

## PrP, SFKs y el control de complejos de adhesión celular

La capacidad de la PrP<sup>C</sup> de inducir la activación de la cinasa Fyn fue demostrada por primera vez por Sophie Mouillet-Richard y colegas utilizando técnicas de reticulación con anticuerpos en células del linaje neuronal 1C11 [33]. Si bien este hallazgo implicaba un rol de la PrP en la transducción de señales celulares, la falta de fenotipos correspondientes en ratones knockout para PrP sugería que estas señales carecían de relevancia fisiológica [34]. La evidencia en contra de esta conclusión llegó inesperadamente de un modelo animal no mamífero, el pez cebra. Por medio de estudios de pérdida de función en embriones tempranos, nuestro grupo halló que la PrP<sup>C</sup> puede reclutar Fyn hacia puntos de contacto celular para indirectamente promover la estabilidad de la molécula de adhesión E-cadherina en la membrana celular [35]. En un estudio más reciente, elucidamos el mecanismo molecular detrás de esta vía de regulación [36].

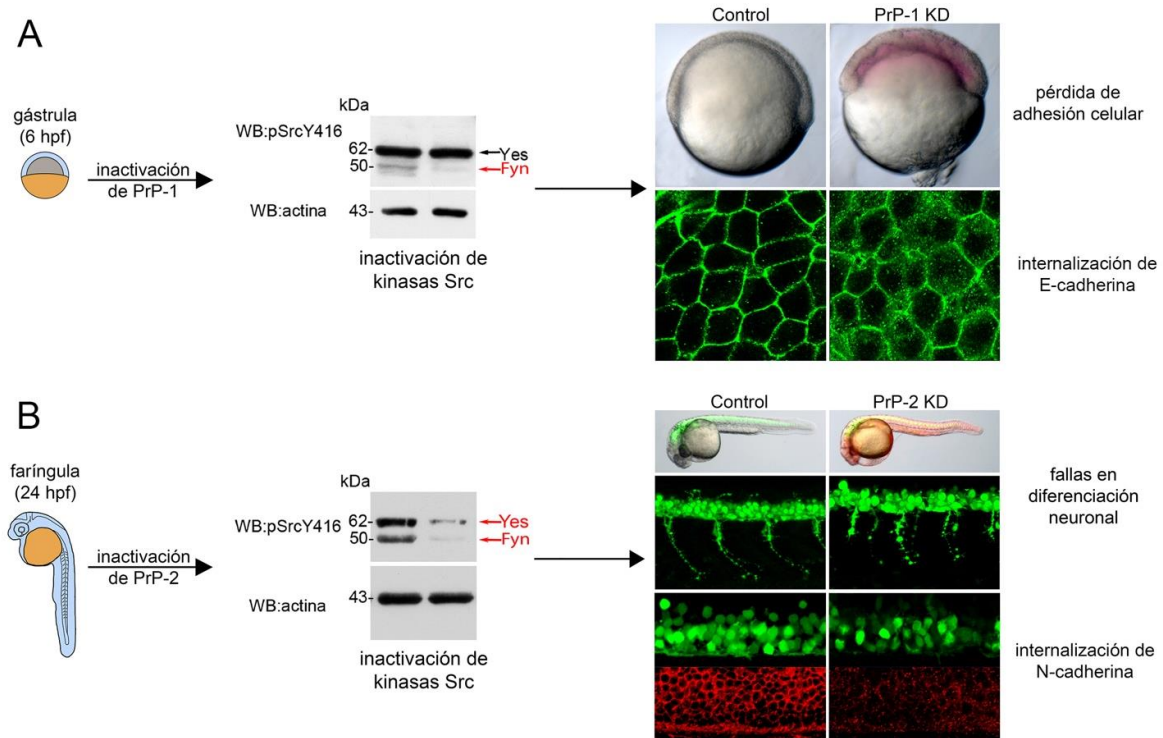
Durante la gastrulación, los contactos celulares en el embrión son remodelados constantemente vía la remoción y entrega controlada de moléculas de E-cadherina en la membrana celular, donde se asocian con cateninas y el citoesqueleto de actina para formar complejos multiprotéicos estables conocidos como *adherens junctions* (AJs) [37]. Nuestros análisis de tráfico de proteínas en experimentos de pérdida y ganancia de función revelaron que la PrP<sup>C</sup> estabiliza a la E-cadherina en la membrana celular al prevenir su endocitosis mediada por clatrina y subsecuente degradación. En concordancia con ello, embriones carentes de PrP<sup>C</sup> acumularon E-cadherina intracelularmente, perdieron cohesión tisular y sufrieron el arresto letal en su desarrollo (Figura 1a). Por el contrario, embriones que sobre-expresaban PrP<sup>C</sup> de peces o de mamífero acumularon E-cadherina en la membrana plasmática, experimentaron compactación tisular y disrupción por daño mecánico [36]. Varias de nuestras observaciones indican que estos fenotipos embrionarios de PrP son mediados por Fyn y por Yes, otro miembro de las SFKs. En primer lugar, la inactivación simultánea de Fyn y Yes produjo un fenotipo embrionario idéntico al de la pérdida de la función de PrP tanto a nivel celular como molecular, sugiriendo que estas cinasas actúan a lo largo de la misma vía genética que PrP. Segundo, la co-expresión exógena de Fyn y de Yes rescató eficientemente el fenotipo embrionario de pérdida de función de PrP, indicando que su función está *downstream* (supeditada a la) de PrP. Tercero, la

eficiencia de los rescates por Fyn y Yes se correlacionan con su actividad enzimática, ya que las cinasas mutantes constitutivamente activas son más eficientes en el rescate que las cinasas silvestres. Más aun, los niveles de Fyn y de Yes activadas se reducen en embriones carentes de PrP y aumentan por sobreexpresión de PrP. La activación directa de SFKs por interacción física con la PrP es poco probable porque esta se ancla a la cara externa de la membrana celular a través de una cola glicosilfosfatidilinositol (GPI) y por lo tanto tiene acceso muy limitado al espacio citosólico donde residen y funcionan las SFKs. Nuestros datos bioquímicos sugieren más bien que la PrP potencia la actividad de las SFKs indirectamente, al menos de dos maneras: 1) induciendo su coalescencia y activación cruzada o por medio de moléculas adaptadoras de transmembrana y 2) evitando la degradación preferencial de sus formas activas. Este último fenómeno pudimos observarlo en embriones carentes de PrP, donde las formas activas de Fyn y Yes se vieron significativamente reducidas comparadas con sus formas inactivas. Adicionalmente, diversas proteínas de transmembrana capaces de interactuar simultáneamente con la PrP y SFKs pueden servir de adaptadores [4,36].

La actividad moduladora de la PrP<sup>C</sup> sobre Fyn y Yes explica de manera plausible nuestros fenotipos PrP de adhesión embrionaria en el pez cebra ya que las SFKs son conocidos reguladores de la estabilidad de cadherinas en la membrana celular [38]. Por ejemplo, estudios clásicos en líneas celulares tumorales han establecido que la sobre-activación de SFKs elimina la adhesión celular al aumentar la fosforilación en tirosina de  $\beta$ - y p120 cateninas, interrumpiendo su interacción física con la E-cadherina y provocando la internalización de AJs [39,40]. Es importante resaltar que en nuestros experimentos, la activación de SFKs por la PrP indujo la fosforilación de cateninas pero no la disociación e internalización de AJs [36]. En cambio, la actividad de las SFKs fue requerida para mantener la estabilidad de las AJs. Estas observaciones aparentemente contradictorias concuerdan con las crecientes evidencias de que cuando las SFKs actúan a niveles fisiológicos (como en nuestros experimentos) promueven la adhesión por cadherinas mientras que cuando actúan a niveles anormalmente altos (como en células transformadas), la inhiben [38]. Notablemente, nuestros experimentos tanto de pérdida como de ganancia de función de PrP indican que Fyn y Yes bloquean la endocitosis de E-cadherinas independientemente de la fosforilación de cateninas, probablemente a través de la fosforilación directa de E-cadherina en AJs, similar a lo observado

en cultivo celular [41]. Nuestros estudios más recientes demuestran que, de manera análoga a lo observado durante la gastrulación, la pérdida de PrP<sup>C</sup> durante el desarrollo neuronal induce la inactivación

de Fyn y Yes, y la internalización de N-cadherina en complejos de adhesión neuronales (Figura 1b, Málaga-Trillo y Ochs, en preparación).



**Figura 1. Fenotipos de pérdida de función de PrP en embriones de pez cebra.** A) Durante la gastrulación, la pérdida de función de PrP-1, una de las dos proteínas príon ortólogas del pez cebra, induce la inactivación de las cinasas Fyn y Yes, con la consiguiente internalización de E-cadherina y la pérdida de adhesión en el tejido embrionario. B) De modo similar, durante el desarrollo neuronal, la pérdida de función de PrP-2, la proteína príon neuronal del pez cebra, conlleva a la reducción de la actividad de Fyn y Yes y fallas en el crecimiento y diferenciación neuronal debido a la internalización de N-cadherinas. Los Western blots (WB) de A y B (centro) muestran la detección de las cinasas Fyn y Yes activadas (pSrcY416 = fosforiladas en tirosina 416) comparadas a los niveles control de actina. Las microfotografías (derecha) muestran la correlación entre los fenotipos morfológicos de PrP-1 o -2 y la internalización de E- (verde) y N-cadherinas (rojo) detectadas por microscopía confocal e inmunofluorescencia *in situ*; el marcaje de neuronas motoras en B corresponde a la expresión de proteína fluorescente verde transgénica (GFP) en las neuronas de estos embriones (cepa transgénica HB9::GFP). KD = *knockdown*, hpf = horas post-fertilización.

### El mal de Alzheimer y la contribución de PrP y SFKs a su patogénesis

La enfermedad de Alzheimer es la más conocida de las diversas y cada vez menos raras dolencias neurodegenerativas asociadas al envejecimiento. Hacia el año 2009, el 10% de la población adulta mayor en el mundo padecía AD, dolencia que representa el 70% de todas las demencias seniles. El costo global generado por estos males el año 2010 se estimó en \$605 mil millones, monto equivalente al 1% del PBI promedio mundial [42]. Por persona, el costo estimado es de \$868, \$3,109, \$6,827 y \$32,865 dólares estadounidenses en países de renta baja, media baja, media alta y alta, respectivamente. En las próximas décadas, dichos costos aumentarán

dramáticamente debido a las proyecciones de crecimiento económico.

Descrita por primera vez en el año 1906 por el psiquiatra alemán Aloys Alzheimer, esta patología incurable es hoy la causa más común de demencia. Su principal manifestación clínica es la pérdida progresiva de la memoria de corto plazo seguida por deterioro cognitivo, alteraciones del lenguaje y trastornos de la personalidad. En estadios severos de la enfermedad los pacientes sufren discapacidad y aislamiento, pierden el control de sus funciones corporales y se vuelven muy dependientes. La duración promedio es de siete a diez años y el desenlace inevitable es la muerte. La pérdida de facultades mentales es resultado directo de la atrofia

cerebral, en particular la pérdida de neuronas en áreas del cerebro críticas para la actividad cognitiva como la corteza entorrinal, el hipocampo y la neocórtex [43].

Entre las variadas hipótesis moleculares que intentan explicar la enfermedad, las más aceptadas atribuyen la muerte neuronal a la acumulación de placas amiloides de péptido A $\beta$  y ovillos neurofibrilares de proteína Tau hiperfosforilada [44]. El péptido A $\beta$  es un polipéptido de 38-43 aminoácidos que resulta de la escisión anormal de la proteína precursora de amiloide (APP, por sus siglas en inglés). Se acumula en el espacio extracelular del cerebro, en donde tiende a formar grandes agregados insolubles que contienen oligómeros y también formas fibrilares con estructura hoja plegada  $\beta$ . Si bien la aparición de placas amiloides es el rasgo más conspicuo en cerebros con AD, hoy es ampliamente reconocido que la especie neurotóxica predominante son los oligómeros de A $\beta$ , y que estos empiezan a causar daño neuronal décadas antes de la aparición de las placas amiloides y de las primeras manifestaciones clínicas de la enfermedad [43]. Otro proceso clave en la neurodegeneración de AD es la excitotoxicidad inducida por la sobre-activación del receptor de glutamato NMDAR, el cual provoca un flujo excesivo de calcio intracelular que culmina con la muerte neuronal [45]. Hasta hace pocos años, no era claro cómo la interacción de oligómeros de A $\beta$  con la membrana neuronal podía desencadenar excitotoxicidad por glutamato [46]. Como veremos más adelante, es en este punto en donde los estudios sobre señalización por PrP<sup>C</sup> han aportado información muy valiosa. Por otro lado, Tau es una proteína neuronal cuya función normal es asociarse a microtúbulos y estabilizarlos [47]. Durante el desarrollo de AD, Tau se hiperfosforila, se disocia de los microtúbulos y da inicio a un proceso de agregación al interior de la célula, formando ovillos neurofibrilares (NFT, por sus siglas en inglés). A semejanza de las placas de A $\beta$ , los NFT poseen un alto contenido de estructura hoja plegada  $\beta$  y su acumulación se correlaciona con el daño neuronal y el avance de la enfermedad [43]. Sin embargo, los esfuerzos por detener la formación de depósitos de A $\beta$  y Tau no han tenido éxito terapéutico hasta el momento, en parte porque estos son propios de la fase tardía de la enfermedad, cuando el daño cerebral es irreversible [48].

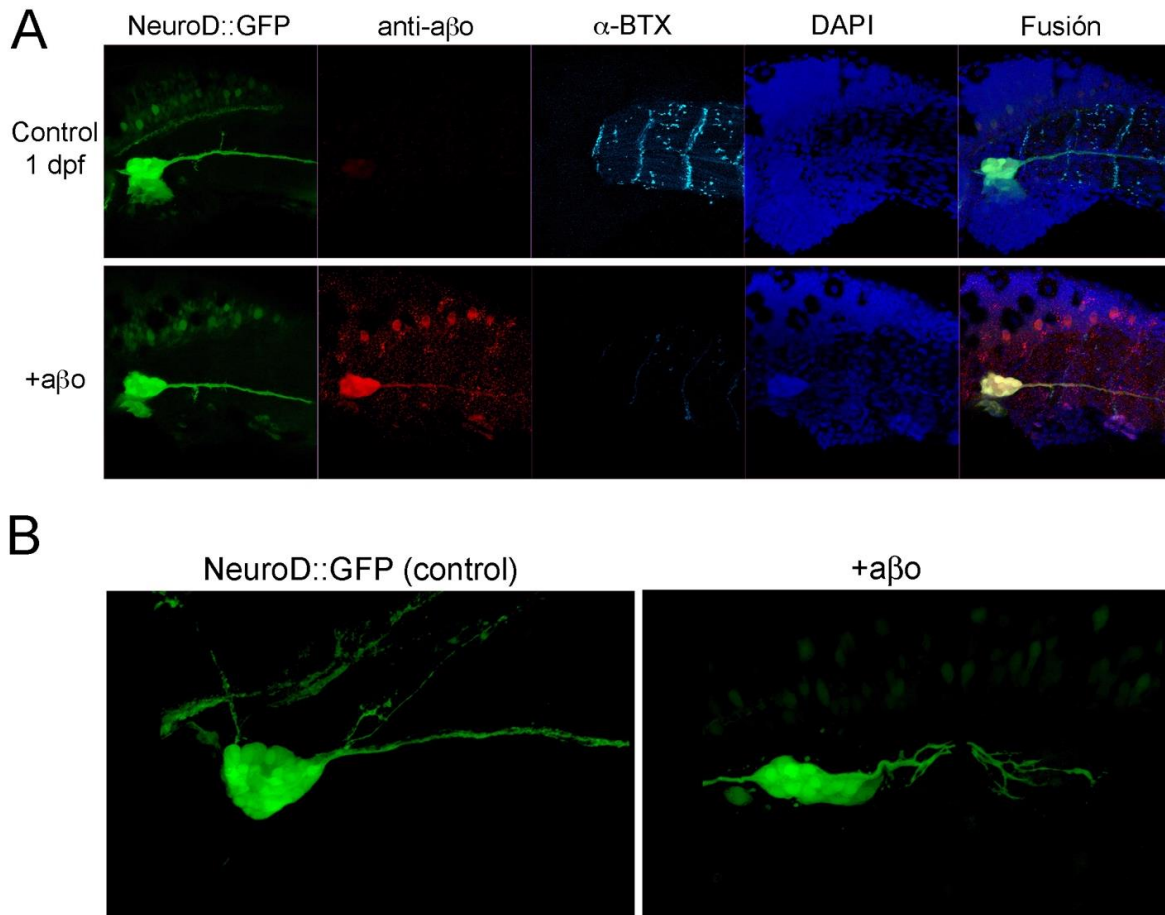
Existen similitudes evidentes entre la patogénesis de los males priónicos y AD, como por ejemplo el mal plegamiento y la agregación de proteínas neuronales, la formación de placas amiloides en el cerebro, el daño sináptico y la neurodegeneración

progresiva [49]. Sin embargo, la ausencia de relaciones estructurales y funcionales entre la PrP y el péptido A $\beta$  o la proteína Tau mantuvo por varios años vigente la noción de que los agregados de estas proteínas causan neurodegeneración por medio de vías moleculares diferentes. Esta interpretación fue finalmente refutada por el notable hallazgo de que PrP<sup>C</sup> intermedia la disfunción sináptica inducida por oligómeros de A $\beta$  [6]. En una serie de elegantes experimentos, Stephen Strittmatter y colegas demostraron que, en la superficie de neuronas hipocampales, PrP<sup>C</sup> funciona como receptor de oligómeros A $\beta$  y que -al igual que en nuestros embriones de pez cebra- es capaz de activar la cinasa Fyn [5,6]. En sus ensayos, esta interacción indujo la hiperfosforilación del receptor de glutamato NMDAR, bloqueando su endocitosis y sobre-activándolo transitoriamente en la membrana plasmática. La permanencia prolongada del receptor activo en la membrana post-sináptica indujo la liberación excesiva de Calcio intracelular, sobreexcitando a las neuronas y causando su muerte. Procesos de excitotoxicidad por glutamato como este, son clave no solo en AD sino también en trastornos priónicos [50] y otras neurodegeneraciones letales como PD, HD y ALS [51,52]. A nivel molecular, cabe resaltar que en la cascada A $\beta$ -PrP<sup>C</sup>, Fyn estabiliza al receptor NMDAR al fosforilar su sub-unidad NR2B, tornándola inaccesible al adaptador de clatrina AP-2 y la maquinaria endocítica [53].

Desde un punto de vista mecanístico, la desregulación del receptor NMDAR como consecuencia de la interacción entre oligómeros de A $\beta$  y PrP<sup>C</sup> neuronales guarda notable similitud con la modulación de las AJs por PrP en la gástrula del pez cebra: en ambos casos, la endocitosis de importantes proteínas de transmembrana (NR2B y E- o N-cadherinas, respectivamente) se ve bloqueada por la fosforilación en tirosina de sus colas citoplasmáticas, mediada por SFKs e inducida por PrP<sup>C</sup>. Por ello, planteamos dos hipótesis. En primer lugar, postulamos que -por extensión- la estabilidad de AJs en la gástrula del pez cebra también se vería afectada por la exposición a péptidos A $\beta$ . Notablemente, observamos que la adición exógena de oligómeros de A $\beta$  humanos provocó en tan solo una hora la activación de SFKs y la sobre-regulación de E-cadherina, de modo PrP<sup>C</sup>-dependiente [36]. Dado el rol crucial de cadherinas en el ensamblaje y funcionamiento de sinapsis [54,55], este resultado sugiere que la alteración de la cascada PrP/SFK/cadherinas por A $\beta$  contribuye a la disfunción sináptica en AD. De hecho, en neuronas corticales, la inhibición de N-cadherinas acelera el

efecto deletéreo de A $\beta$  sobre las sinapsis excitatorias [56]. En segundo lugar, postulamos que la exposición del sistema nervioso embrionario a péptidos A $\beta$  alteraría la función de SFKs, N-cadherina y el NMDAR. Para ello, micro-inyectamos oligómeros de A $\beta$  humanos en el cerebro de embriones en estadio faríngrulo y por medio de inmunofluorescencia verificamos que los oligómeros ya se habían adherido a las neuronas al cabo de tan solo dos horas, provocando degeneración de axones (Figura 2, Málaga-Trillo y Ochs, en preparación). Ensayos

combinados de inmunofluorescencia y Western blot revelaron que la exposición a A $\beta$  modificó la actividad de SFKs neuronales de modo PrP<sup>C</sup>-dependiente, alterando simultáneamente los niveles y localización de E-cadherina, N-cadherina y los receptores NMDAR y AChR (Fig. 2). Aunque los análisis detallados de fosforilación de tirosinas están aún pendientes, estos experimentos concuerdan con la noción de que el péptido A $\beta$  afecta simultáneamente la adhesión celular y la neurotransmisión a través de PrP<sup>C</sup> y SFKs.



**Figura 2. Efecto del A $\beta$  humano sobre el desarrollo de neuronas embrionarias de pez cebra.** A) En embriones de la cepa transgénica NeuroD::GFP, que expresan abundante proteína fluorescente verde en ganglios craneales y de la línea lateral, la microinyección intracerebral de oligómeros de A $\beta$  (A $\beta$ ) humano a las 24 hpf resulta en su rápida incorporación en cuerpos neuronales (marcaje en rojo por anticuerpos anti- A $\beta$ ), así como en la reducción de la expresión del receptor AChR (marcaje en cyan por bungarotoxina, BTX) al cabo de dos horas; el marcaje azul corresponde a la contraínción de núcleos celulares con DAPI. B) Al cabo de 49 hpf, embriones tratados con A $\beta$  muestran la deformación del ganglio de la línea lateral, así como la degeneración de sus axones (retracción y fragmentación). Las imágenes en A y B son microfotografías confocales de inmunotinciones in situ; hpf = horas post-fertilización.

### Efectos simultáneos de las SFKs en múltiples alteraciones de neurotransmisión inducidos por A $\beta$ y priones

Tanto nuestros estudios como los de Strittmatter y colegas concluyen que Fyn es un componente

esencial de la neurotoxicidad causada por el péptido A $\beta$  y la PrP<sup>C</sup>. Por un lado, modula la expresión en la membrana celular de cadherinas y el NMDAR, y por el otro contribuye también a la hiperfosforilación de Tau, la cual a su vez moviliza a Fyn hacia regiones dendríticas (post-sinápticas), aumentando así su

probabilidad de interacción con el receptor NMDAR [57]. Incluyendo a Fyn, Yes y Src, cinco SFKs distintas se expresan en neuronas y tienen la capacidad de fosforilar y controlar la función de numerosos blancos moleculares de manera redundante [58,59]. Por ello propusimos recientemente que las SFKs pueden amplificar los efectos neurotóxicos de A $\beta$  más allá de su demostrado efecto sobre cadherinas y el NMDAR [60]. En particular, el control de la endocitosis de proteínas por medio de señales de fosforilación es un mecanismo regulatorio muy frecuente por el cual las SFKs influyen la actividad de importantes moléculas de membrana como receptores neuronales, canales iónicos y transportadores de neurotransmisores [61]. Por lo tanto, a través de las SFKs, el péptido A $\beta$  tiene la posibilidad de secuestrar la función de una amplia red de moléculas neuronales, provocando daño sináptico y neurodegeneración [60,62]. Por ejemplo, la pérdida de neuronas colinérgicas -un evento conspicuo en la patogénesis de AD- está asociada a una reducción en los niveles del neurotransmisor acetilcolina (ACh) y a la alteración funcional de su receptor nicotínico (nAChR) [63]. Notablemente, SFKs fosforilan y modulan la actividad del nAChR [64,65], cuya endocitosis dependiente de dinamina requiere la actividad de Src [66]. A diferencia de las vías de neurotransmisión excitatorias glutamatérgicas y colinérgicas, la neurotransmisión inhibitoria vía ácido gamma-aminobutírico (GABA) se ve poco afectada en AD y las neuronas GABAérgicas parecen ser más resistentes a la neurodegeneración que sus contrapartes excitatorias [67]. Sin embargo, trabajos recientes encontraron niveles reducidos de GABA y alteraciones funcionales en los receptores GABA<sub>A</sub> de pacientes con AD [68]. Tales alteraciones incluyen la remodelación funcional de los receptores GABA<sub>A</sub> por medio de la reducción en los niveles de sus subunidades [69]. Notablemente, una de estas subunidades ( $\gamma$ 2) posee una secuencia de regulación endocítica cuya fosforilación a cargo de Fyn bloquea su acceso a AP-2 y previene la endocitosis mediada por clatrina de receptores GABA<sub>A</sub>, potenciando con ello la inhibición sináptica [70-72]. Este mecanismo es completamente análogo a aquel por el cual Fyn estabiliza la subunidad NR2B del receptor NMDAR en superficies neuronales. ¿Pueden entonces los oligómeros de A $\beta$  alterar también la neurotransmisión colinérgica y GABAérgica a través de PrP<sup>C</sup> y Fyn, tal como afectan la neurotransmisión glutamatérgica mediada por el receptor NMDAR? Esta posibilidad aún no ha sido examinada experimentalmente pero proporcionaría una explicación alternativa para el aumento concomitante de la actividad de los receptores de GABAérgicos y

glutamatérgicos observado en pacientes con AD, y a menudo interpretada como un mecanismo compensatorio de comunicación cruzada para prevenir y mitigar la excitotoxicidad por glutamato [68].

A partir de estos datos podría inferirse que, si PrP<sup>C</sup> activa a las SFKs y éstas a su vez alteran la función de los receptores NMDAR, GABA<sub>A</sub> y AChR, entonces estos neuroreceptores podrían verse afectados por la inactivación de la PrP y/o las infecciones priónicas. Existe evidencia experimental al respecto, aunque por el momento indirecta y carente de enfoques mecanísticos que la conecten con la regulación del tráfico endocítico mediado por SFKs. Por ejemplo, registros electrofisiológicos en ratones knockout carentes de PrP revelan anomalías en la transmisión glutamatérgica y GABAérgica del hipocampo y el bulbo olfatorio [21,73,74]. Por otro lado, análisis inmunohistoquímicos de muestras de cerebro, cerebelo, y corteza entorrina de pacientes con CJD muestran alteraciones en los niveles de expresión de sub-unidades de receptores NMDA y GABA y AMPA, en correlación parcial con la acumulación de priones, pérdida neuronal y degeneración espongiiforme [75]. De manera similar, ratones inoculados con scrapie y priones de pacientes con CJD experimentaron la pérdida selectiva y severa de neuronas corticales GABAérgicas [76]. A diferencia de AD, no se ha reportado daños a neuronas colinérgicas en pacientes con CJD o en animales infectados con priones. Sin embargo, es probable que la PrP cumpla un papel en la modulación de la actividad colinérgica, ya que co-localiza con el nAChR en placas neuromusculares (NMJs, por sus siglas en inglés) de humanos y ratones y potencia la liberación de AChR [77,78]. De hecho, datos bioquímicos de tejidos humanos y células en cultivo indican que PrP<sup>C</sup> interactúa con las subunidades  $\alpha$ 7 y  $\beta$ 4 del nAChR en complejos macromoleculares [79,80]. Nuestros análisis en embriones de pez cebra son congruentes con estos experimentos. Por ejemplo, en neuronas motoras de la espina dorsal observamos una fuerte co-localización de SFKs activadas, AChR y NR2B fosforilada en NMJs positivas para PrP (Málaga-Trillo y Ochs, en preparación). Al inactivar la PrP, se redujeron los niveles de SFK activadas y neuroreceptores en estos sitios post-sinápticos y se desorganizaron sus patrones de distribución, al mismo tiempo que los axones mostraban defectos en elongación y ramificación. Estos resultados son congruentes con la noción de que la PrP promueve la actividad de nAChRs en las NMJs a través de fosforilaciones mediadas por SFKs. En suma, la evidencia



experimental disponible sugiere que la estabilización de neuroreceptores en la membrana celular, mediada por PrP y SFKs, es un mecanismo fisiológicamente relevante y con profundas implicancias para la patogénesis de males y priónicos y AD.

La existencia de mecanismos de fosforilación para regular la endocitosis de neuroreceptores y proteínas de adhesión nos ofrece una posibilidad interesante de desarrollar o encontrar nuevos

fármacos anti-neurodegenerativos que ataquen específicamente la interacción entre estas moléculas y las SFKs en el contexto de la señalización por PrP<sup>C</sup>. La investigación paralela en diversos organismos modelo será crucial para extender nuestros conocimientos mecánicos sobre la neurodegeneración e integrarlos a la búsqueda de criterios fisiológicos para la evaluación de nuevas estrategias terapéuticas.

## Referencias

- Prince, M., Bryce, R., Albanese, E., Wimo, A., Ribeiro, W., and Ferri, C. P. (2013) The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. *9*, 63-75.
- Ross, C. A., and Poirier, M. A. (2004) Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med* **10 Suppl**, S10-17
- Ross, C. A., and Poirier, M. A. (2005) Opinion: What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 891-898
- Um, J. W., Kaufman, A. C., Kostylev, M., Heiss, J. K., Stagi, M., Takahashi, H., Kerrisk, M. E., Vortmeyer, A., Wisniewski, T., Koleske, A. J., Gunther, E. C., Nygaard, H. B., and Strittmatter, S. M. (2013) Metabotropic glutamate receptor 5 is a coreceptor for Alzheimer abeta oligomer bound to cellular prion protein. *Neuron* **79**, 887-902
- Um, J. W., Nygaard, H. B., Heiss, J. K., Kostylev, M. A., Stagi, M., Vortmeyer, A., Wisniewski, T., Gunther, E. C., and Strittmatter, S. M. (2012) Alzheimer amyloid-beta oligomer bound to postsynaptic prion protein activates Fyn to impair neurons. *Nat Neurosci* **15**, 1227-1235
- Lauren, J., Gimbel, D. A., Nygaard, H. B., Gilbert, J. W., and Strittmatter, S. M. (2009) Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* **457**, 1128-1132
- Ferreira, D. G., Temido-Ferreira, M., Miranda, H. V., Batalha, V. L., Coelho, J. E., Szego, E. M., Marques-Morgado, I., Vaz, S. H., Rhee, J. S., Schmitz, M., Zerr, I., Lopes, L. V., and Outeiro, T. F. (2017) alpha-synuclein interacts with PrP(C) to induce cognitive impairment through mGluR5 and NMDAR2B. *Nat Neurosci* **20**, 1569-1579
- Prusiner, S. B. (1998) The prion diseases. *Brain Pathol* **8**, 499-513
- Collinge, J. (2001) Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci* **24**, 519-550
- Poser, C. M. (2002) Notes on the history of the prion diseases. Part I. *Clin Neurol Neurosurg* **104**, 1-9
- Poser, C. M. (2002) Notes on the history of the prion diseases. Part II. *Clin Neurol Neurosurg* **104**, 77-86
- Prusiner, S. B. (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**, 136-144
- Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M. P., Kent, S. B., Aebersold, R., Barry, R. A., Tempst, P., Teplow, D. B., Hood, L. E., and et al. (1985) A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* **40**, 735-746
- Chesebro, B., Race, R., Wehrly, K., Nishio, J., Bloom, M., Lechner, D., Bergstrom, S., Robbins, K., Mayer, L., Keith, J. M., and et al. (1985) Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* **315**, 331-333
- Weissmann, C. (2004) The state of the prion. *Nat Rev Microbiol* **2**, 861-871
- Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Walchli, M., Groth, D. F., McKinley, M. P., Prusiner, S. B., and Weissmann, C. (1986) Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* **46**, 417-428
- Steele, A. D., Lindquist, S., and Aguzzi, A. (2007) The prion protein knockout mouse: a phenotype under challenge. *Prion* **1**, 83-93
- Málaga-Trillo, E., and Sempou, E. (2009) PrPs: Proteins with a purpose: Lessons from the zebrafish. *Prion* **3**, 129-133
- Passet, B., Halliez, S., Beringue, V., Laude, H., and Vilotte, J. L. (2013) The prion protein family: looking outside the central nervous system. *Prion* **7**, 127-130
- Bremer, J., Baumann, F., Tiberi, C., Wessig, C., Fischer, H., Schwarz, P., Steele, A. D., Toyka, K. V., Nave, K. A., Weis, J., and Aguzzi, A. (2010) Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance. *Nat Neurosci* **13**, 310-318
- Le Pichon, C. E., Valley, M. T., Polymenidou, M., Chesler, A. T., Sagdullaev, B. T., Aguzzi, A., and Firestein, S. (2009) Olfactory behavior and physiology are disrupted in prion protein knockout mice. *Nat Neurosci* **12**, 60-69
- Steele, A. D., Emsley, J. G., Ozdinler, P. H., Lindquist, S., and Macklis, J. D. (2006) Prion protein (PrP<sup>C</sup>) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 3416-3421
- Zhang, C. C., Steele, A. D., Lindquist, S., and Lodish, H. F. (2006) Prion protein is expressed on long-term repopulating hematopoietic stem cells and is important for their self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2184-2189
- Aguzzi, A., Baumann, F., and Bremer, J. (2008) The prion's elusive reason for being. *Annu Rev Neurosci* **31**, 439-477
- Chesebro, B., Trifilo, M., Race, R., Meade-White, K., Teng, C., LaCasse, R., Raymond, L., Favara, C., Baron, G., Priola, S., Caughey, B., Masliah, E., and Oldstone, M. (2005) Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science* **308**, 1435-1439
- Linden, R., Martins, V. R., Prado, M. A., Cammarota, M., Izquierdo, I., and Brentani, R. R. (2008) Physiology of the prion protein. *Physiol Rev* **88**, 673-728
- Gyllberg, H., Löfgren, K., Lindegren, H., and Bedecs, K. (2006) Increased Src kinase level results in increased protein tyrosine phosphorylation in scrapie-infected neuronal cell lines. *FEBS LETTERS* **580**, 2603-2608
- Nixon, R. (2005) Prion-associated increases in Src-family kinases. *J Biol Chem* **280**, 2455
- Shirazi, S. K., and Wood, J. G. (1993) The protein tyrosine kinase, fyn, in Alzheimer's disease pathology. *Neuroreport* **4**, 435-437
- Lee, G., Thangavel, R., Sharma, V. M., Litsky, J. M., Bhaskar, K., Fang, S. M., Do, L. H., Andreadis, A., Van Hoesen, G., and Ksiezak-Reding, H. (2004) Phosphorylation of tau by fyn: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci* **24**, 2304-2312
- Chin, J., Palop, J. J., Puolivali, J., Massaro, C., Bien-Ly, N., Gerstein, H., Scearce-Levie, K., Masliah, E., and Mucke, L. (2005) Fyn kinase induces synaptic and cognitive impairments in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* **25**, 9694-9703

32. Minami, S. S., Clifford, T. G., Hoe, H. S., Matsuoka, Y., and Rebeck, G. W. (2012) Fyn knock-down increases Abeta, decreases phospho-tau, and worsens spatial learning in 3xTg-AD mice. *Neurobiology of aging* **33**, 825 e815-824
33. Mouillet-Richard, S., Ermonval, M., Chebassier, C., Laplanche, J. L., Lehmann, S., Launay, J. M., and Kellermann, O. (2000) Signal transduction through prion protein. *Science* **289**, 1925-1928
34. Ochs, K., and Malaga-Trillo, E. (2014) Common themes in PrP signaling: the Src remains the same. *Frontiers in cell and developmental biology* **2**, 63
35. Málaga-Trillo, E., Solis, G. P., Schrock, Y., Geiss, C., Luncz, L., Thomanetz, V., and Stuermer, C. A. (2009) Regulation of embryonic cell adhesion by the prion protein. *PLoS Biol* **7**, e55
36. Sempou, E., Biasini, E., Pinzón-Olejua, A., Harris, D. A., and Málaga-Trillo, E. (2016) Activation of zebrafish Src family kinases by the prion protein is an amyloid- $\beta$ -sensitive signal that prevents the endocytosis and degradation of E-cadherin/ $\beta$ -catenin complexes in vivo. in *Mol Neurodegener*
37. Montero, J. A., and Heisenberg, C. P. (2004) Gastrulation dynamics: cells move into focus. *Trends Cell Biol* **14**, 620-627
38. McLachlan, R. W., and Yap, A. S. (2007) Not so simple: the complexity of phosphotyrosine signaling at cadherin adhesive contacts. *J Mol Med* **85**, 545-554
39. Daniel, J. M., and Reynolds, A. B. (1997) Tyrosine phosphorylation and cadherin/catenin function. *Bioessays* **19**, 883-891
40. Nelson, W. J., and Nusse, R. (2004) Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* **303**, 1483-1487
41. Fujita, Y., Krause, G., Scheffner, M., Zechner, D., Leddy, H. E. M., Behrens, J., Sommer, T., and Birchmeier, W. (2002) Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nat Cell Biol* **4**, 222-231
42. Wimo, A., Jonsson, L., Bond, J., Prince, M., Winblad, B., and Alzheimer Disease, I. (2013) The worldwide economic impact of dementia 2010. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* **9**, 1-11 e13
43. Holtzman, D. M., Morris, J. C., and Goate, A. M. (2011) Alzheimer's disease: the challenge of the second century. **3**, 77sr71
44. Kumar, A., Singh, A., and Ekavali. (2015) A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. **67**, 195-203
45. Harkany, T., Abraham, I., Timmerman, W., Laskay, G., Toth, B., Sasvari, M., Konya, C., Sebens, J. B., Korf, J., Nyakas, C., Zarandi, M., Soos, K., Penke, B., and Luiten, P. G. (2000) beta-amyloid neurotoxicity is mediated by a glutamate-triggered excitotoxic cascade in rat nucleus basalis. *Eur J Neurosci* **12**, 2735-2745
46. Haass, C., and Selkoe, D. J. (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 101-112
47. Mandelkow, E. M., and Mandelkow, E. (2012) Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **2**, a006247
48. Musiek, E. S., and Holtzman, D. M. (2015) Three dimensions of the amyloid hypothesis: time, space and &wingmen&apos;. **18**, 800-806
49. Aguzzi, A., and Haass, C. (2003) Games played by rogue proteins in prion disorders and Alzheimer's disease. *Science* **302**, 814-818
50. Chiesa, R. (2015) The elusive role of the prion protein and the mechanism of toxicity in prion disease. *PLoS Pathog* **11**, e1004745
51. Dong, X.-x., Wang, Y., and Qin, Z.-h. (2009) Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. in *Acta Pharmacol Sin*
52. Paul, P., and de Belleruche, J. (2014) The role of D-serine and glycine as co-agonists of NMDA receptors in motor neuron degeneration and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). **6**, 10
53. Salter, M. W., and Kalia, L. V. (2004) Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation. *Nat Rev Neurosci* **5**, 317-328
54. Yamada, S., and Nelson, W. J. (2007) Synapses: sites of cell recognition, adhesion, and functional specification. *Annual review of biochemistry* **76**, 267-294
55. Fiedlerling, A., Ewert, R., Andreyeva, A., Jüngling, K., and Gottmann, K. (2011) E-cadherin is required at GABAergic synapses in cultured cortical neurons. in *Neurosci. Lett.*
56. Andreyeva, A., Nieweg, K., Horstmann, K., Klapper, S., van Eersel, J., Wolfing, H., Chue, B. C., Christie, M. J., Napier, I. A., Eckert, A., Staufenbiel, M., Hardeman, E., and Gotz, J. (2010) Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* **142**, 387-397
58. Thomas, S. M., and Brugge, J. S. (1997) Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 513-609
59. Lau, L., and Haganir, R. L. (1999) Role of Tyrosine Phosphorylation in the Nervous System. in *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects* (Siegel, G. J., Agranoff, B. W., Albers, R. W., Fischer, S. K., and Uhler, M. D. eds.), Lippincott-Raven, Philadelphia. pp
60. Malaga-Trillo, E., and Ochs, K. (2016) Uncontrolled SFK-mediated protein trafficking in prion and Alzheimer's disease. *Prion* **10**, 352-361
61. Buckley, K. M., Melikian, H. E., Provoda, C. J., and Waring, M. T. (2000) Regulation of neuronal function by protein trafficking: a role for the endosomal pathway. *J Physiol* **525 Pt 1**, 11-19
62. Crews, L., and Masliah, E. (2010) Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics* **19**, R12-20
63. Lombardo, S., and Maskos, U. (2015) Role of the nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease pathology and treatment. in *Neuropharmacology*, Elsevier Ltd
64. Wang, K., Hackett, J. T., Cox, M. E., Van Hoek, M., Lindstrom, J. M., and Parsons, S. J. (2004) Regulation of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor by SRC family tyrosine kinases. in *J Biol Chem*
65. Mohamed, A. S., and Swope, S. L. (1999) Phosphorylation and cytoskeletal anchoring of the acetylcholine receptor by Src class protein-tyrosine kinases. Activation by rapsyn. in *J Biol Chem*
66. Kumari, S., Borroni, V., Chaudhry, A., Chanda, B., Massol, R., Mayor, S., and Barrantes, F. J. (2008) Nicotinic acetylcholine receptor is internalized via a Rac-dependent, dynamin-independent endocytic pathway. in *J Cell Biol*
67. Rissman, R. A., De Blas, A. L., and Armstrong, D. M. (2007) GABA A receptors in aging and Alzheimer's disease. in *J Neurochem*
68. Li, Y., Sun, H., Chen, Z., Xu, H., Bu, G., and Zheng, H. (2016) Implications of GABAergic Neurotransmission in Alzheimer's Disease. in *Front. Aging Neurosci.*
69. Limon, A., Reyes-Ruiz, J. M., and Miledi, R. (2012) Loss of functional GABA(A) receptors in the Alzheimer diseased brain. in *Proc Natl Acad Sci USA*
70. Tretter, V., Revilla-Sanchez, R., Houston, C., Terunuma, M., Havekes, R., Florian, C., Jurd, R., Vithlani, M., Michels, G., Couve, A., Sieghart, W., Brandon, N., Abel, T., Smart, T. G., and Moss, S. J. (2009) Deficits in spatial memory correlate

- with modified  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptor tyrosine phosphorylation in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 20039-20044
71. Kittler, J. T., Chen, G., Kukhtina, V., Vahedi-Faridi, A., Gu, Z., Tretter, V., Smith, K. R., McAinsh, K., Arancibia-Carcamo, I. L., Saenger, W., Haucke, V., Yan, Z., and Moss, S. J. (2008) Regulation of synaptic inhibition by phospho-dependent binding of the AP2 complex to a YECL motif in the GABAA receptor gamma2 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 3616-3621
  72. Jurd, R., Tretter, V., Walker, J., Brandon, N. J., and Moss, S. J. (2010) Fyn kinase contributes to tyrosine phosphorylation of the GABAA receptor  $\gamma$ 2 subunit. in *Mol. Cell. Neurosci.*, Elsevier Inc.
  73. Carleton, A., Tremblay, P., Vincent, J. D., and Lledo, P. M. (2001) Dose-dependent, prion protein (PrP)-mediated facilitation of excitatory synaptic transmission in the mouse hippocampus. *Pflugers Arch* **442**, 223-229
  74. Collinge, J., Whittington, M. A., Sidle, K. C., Smith, C. J., Palmer, M. S., Clarke, A. R., and Jefferys, J. G. (1994) Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* **370**, 295-297
  75. Ferrer, I., and Puig, B. (2003) GluR2/3, NMDAepsilon1 and GABAA receptors in Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol* **106**, 311-318
  76. Guentchev, M., Groschup, M. H., Kordek, R., Liberski, P. P., and Budka, H. (1998) Severe, early and selective loss of a subpopulation of GABAergic inhibitory neurons in experimental transmissible spongiform encephalopathies. *Brain Pathol* **8**, 615-623
  77. Askanas, V., Bilak, M., Engel, W. K., Leclerc, A., and Tome, F. (1993) Prion protein is strongly immunolocalized at the postsynaptic domain of human normal neuromuscular junctions. *Neurosci Lett* **159**, 111-114
  78. Re, L., Rossini, F., Re, F., Bordicchia, M., Mercanti, A., Fernandez, O. S., and Barocci, S. (2006) Prion protein potentiates acetylcholine release at the neuromuscular junction. *Pharmacological research* **53**, 62-68
  79. Beraldo, F. H., Arantes, C. P., Santos, T. G., Queiroz, N. G., Young, K., Rylett, R. J., Markus, R. P., Prado, M. A., and Martins, V. R. (2010) Role of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in calcium signaling induced by prion protein interaction with stress-inducible protein 1. *J Biol Chem* **285**, 36542-36550
  80. Petrakis, S., Irinopoulou, T., Panagiotidis, C. H., Engelstein, R., Lindstrom, J., Orr-Urtreger, A., Gabizon, R., Grigoriadis, N., and Sklaviadis, T. (2008) Cellular prion protein co-localizes with nAChR beta4 subunit in brain and gastrointestinal tract. *Eur J Neurosci* **27**, 612-620



## DR. EDWARD MÁLAGA TRILLO

Profesor Principal en la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH) y Profesor Asociado en la Universidad de Konstanz, Alemania. Nació en 1969 en Lima, Perú, donde cursó estudios de Biología y Medicina en la UPCH para luego realizar su doctorado en Microbiología e Inmunología en la

Escuela de Medicina de la Universidad de Miami, USA y el Instituto Max Planck para Biología en Tübingen, Alemania. Realizó una estancia postdoctoral en Genómica Evolutiva y Biología del Desarrollo en la Universidad de Konstanz, en donde fue nombrado profesor asistente y después asociado del Departamento Neurobiología del Desarrollo. Llevó a cabo especializaciones en Manipulación Genética de Peces (Stirling, Escocia), Evolución Molecular (Hayama, Japón) Genómica Evolutiva (Oregon, USA), y Desarrollo y Genética del Pez Cebra (Woods Hole, USA). Entre sus diversos trabajos de investigación destacan sus aportes a la comprensión de la degeneración y regeneración neuronal. El Dr. Málaga Trillo fue el primero en utilizar el modelo del pez cebra para estudiar los mecanismos moleculares de la neurodegeneración, reportando en 2009 la primera función conocida de la proteína prión. En 2014 retornó a la UPCH, en donde dirige el laboratorio de Neurobiología del Desarrollo y Peces Cebra, abocado a la comprensión y cura de enfermedades neurodegenerativas.