

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

***El tándem Glucógeno/Glucógeno
fosforilasa isoforma M es clave en
la respuesta de los astrocitos al
péptido 1-42 β -Amiloide.***

Miriam Luque Montoro

2021

Agradecimientos a la Fundación Jesús de Gangoiti Barrera por la financiación otorgada bajo las convocatorias de becas reservadas a titulados universitarios superiores del 2017 y del 2018, con las cuales se ha podido desarrollar este proyecto.

A mis padres y a mi hermano

A Javi

ÍNDICE

Agradecimientos	11
Abreviaciones	13
Resumen	19
Introducción	20
1. GTPasas de la superfamilia Ras.	20
1.1. GTPasas de la familia Rho.....	23
1.1.1. Funciones de las GTPasas de la familia Rho.....	23
1.1.1. Regulación de las GTPasas de la familia Rho.	25
1.1.1.1. GDIs	26
1.1.1.2. GEFs.....	27
1.1.1.3. GAPs.....	29
1.1.2. Moléculas efectoras.	30
1.1.2.1. PAK.....	30
1.1.2.2. WASP.....	33
1.1.2.3. Rhotekin	34
1.1.2.4. La glucógeno fosforilasa.	35
1.1.2.4.1 Activación de la glucógeno fosforilasa.	36
2. Glucógeno.....	40
2.1. Metabolismo del glucógeno.....	41
2.2. Glicolisis y generación de lactato.	42
2.3. Ruta de las pentosas fosfato.....	44
2.4. Ruta biosintética de las hexosaminas.	46
2.4.1. La O-GlcNAcilación de proteínas.	47

3. Enfermedad de Alzheimer.	50
3.1. Tipos de Enfermedad de Alzheimer.	51
3.1.1. Enfermedad de Alzheimer de inicio temprano o familiar.	51
3.1.2. Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío o esporádico.	52
3.2. El péptido β amiloide: hipótesis de la cascada amiloide.	52
3.3. Implicación de la glía en la Enfermedad de Alzheimer.	54
4. Astrocitos.	55
4.1. Función de los astrocitos.	56
4.2. Astrogliosis reactiva.	57
4.2.1. Clasificación astrogliosis.	58
4.2.2. Astrogliosis y Enfermedad de Alzheimer.	58
4.2.3. Lípidos en la fisiología astrocitaria-neuronal.	60
5. La señalización mediada por el receptor del ácido lisofosfatídico.	62
5.1. El ácido lisofosfatídico.	62
5.2. El receptor del ácido lisofosfatídico tipo 1.	65
Hipótesis	68
Material y métodos	70
1. Materiales	70
1.1. Reactivos.	70
1.2. Anticuerpos.	70
1.3. $A\beta_{1-42}$ oligómeros.	71
2. Métodos	72
2.1. Cultivos celulares	72
2.1.1. Mantenimiento de la línea celular de astrocitos humanos inmortalizados.	72
2.1.2. Obtención de astrocitos primarios de rata.	72

2.1.2. Transfección transitoria.....	73
2.1.2.2. Transfección por electroporación.....	73
2.1.2.3. Transfección con lipofectamina.....	74
2.2. Tecnología del DNA recombinante.....	75
2.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa.....	75
2.2.2. Purificación de ADN a partir de un gel de agarosa.....	75
2.2.3. Digestión de ADN con enzimas de restricción.....	76
2.2.4. Construcciones pGEX-LPAR1 y mutantes en pEGFP-LPAR1.....	76
2.2.3. Clonaje de productos de PCR.....	77
2.2.3.4. Construcciones pTAT-RBD-PYGM, pTAT-CRIB-PAK1, pTAT-OBD-LPAR1 y pTAT-OBD-LPAR1 ^{T43A+T47A}	77
2.2.4. Transformación en bacterias.....	78
2.2.5. Purificación de ADN plasmídico.....	78
2.2.6. Mutagenesis dirigida.....	79
2.3. Inducción de la expresión de proteínas recombinantes en bacterias.....	81
2.3.1. Proteínas expresadas en el vector pGEX.....	81
2.3.2. Péptido A β ₁₋₄₂	81
2.4. Purificación de proteínas.....	81
2.4.1. Proteínas de fusión con cola de Histidinas: los péptidos TAT-RBD-PYGM, TAT-CRIB-PAK1 y TAT-OBD-LPAR1, TAT-OBD-LPAR1 ^{T43A,T47A}	81
2.4.2. Proteínas expresadas en el vector pGEX (GST-PAK1, Sonda GYSC, GST-R _s , GST-LPAR1, GST-LPAR1 ^{T43A} , GST-LPAR1 ^{T47A} y GST-LPAR1 ^{T43A+T47A}).....	82
2.4.3. Péptido A β ₁₋₄₂	83
2.4.3.1. Extracción del péptido A β ₁₋₄₂	83
2.4.3.2. Cromatografía de intercambio iónico.....	84

2.4.3.3. Concentración, diálisis y liofilización.	87
2.4.3.4. Generación de oligómeros.	87
2.4.4. Precipitación de afinidad o <i>pull down</i>	88
2.4.5. Inmunoprecipitación.	89
2.4.6. Cromatografía de afinidad con lectinas.	90
2.5. Análisis de la expresión génica por RT-PCR.	90
2.6. Electroforesis en geles de acrilamida.	91
2.7. Western blot.	92
2.8. Inmunodetección.	92
2.9. Análisis proteómico. Identificación de proteínas.	92
2.10. Ensayo de actividad de la glucógeno fosforilasa.	93
2.11. Ensayo de O-GlcNAcilación <i>in vitro</i>	94
2.12. Medición de especies reactivas de oxígeno.	95
2.12. Técnicas de inmunofluorescencia.	96
2.12.1. Expresión de GFAP en astrocitos.	96
2.12.2. Marcaje de los depósitos de glucógeno intracelular.	96
2.12.3. Marcaje de los depósitos de glucógeno intracelular en tejido de ratón.	97
2.12.4. Localización de Rac1, PYGM y glucógeno.	98
2.14. Medición glicolisis por Seahorse.	99
2.15. Medición de los niveles de lactato.	99
2.16. Determinación del glucógeno celular por espectrometría.	100
Resultados	101
1. Los oligómeros de A β ₁₋₄₂ activan el eje Rac1/PYGM en astrocitos humanos inmortalizados.	101
1.1. Los oligómeros de A β ₁₋₄₂ activan a la glucógeno fosforilasa.	101

1.2. Los oligómeros de A β ₁₋₄₂ activan la GTPasa Rac 1	104
1.3. Niveles de expresión de las isoformas de la PYG en la línea humana de astrocitos.....	105
1.4. La activación de la glucógeno fosforilasa mediada por oligómeros de A β ₁₋₄₂ depende de la GTPasa Rac1.	107
1.5. El eje transductor constituido por los oligómeros de A β ₁₋₄₂ y Rac1 conduce a la activación de la isoforma muscular de la PYG.....	110
1.6. Los oligómeros de A β ₁₋₄₂ se unen a la integrina β 1 (ITG β 1) y controlan la activación de Rac1/PYGM.....	112
2. Los oligómeros de A β ₁₋₄₂ requieren del eje de señalización Rac1/PYGM para degradar los gránulos de glucógeno de los astrocitos en el núcleo. ..	115
2.1. Los oligómeros de A β ₁₋₄₂ promueven la degradación y síntesis del glucógeno.....	115
2.1. Los oligómeros de A β ₁₋₄₂ implican a la PYGM para degradar el glucógeno intranuclear de los astrocitos.	116
2.2. Los oligómeros de A β ₁₋₄₂ degradan el glucógeno nuclear mediante la activación del eje Rac1/PYGM.....	119
2.3. Los oligómeros de A β ₁₋₄₂ promueven la movilización transitoria de los gránulos nucleares de glucógeno: localización de Rac1 y PYGM.	122
3. El metabolismo glicolítico de los astrocitos no se modifica por la acción de los oligómeros de A β ₁₋₄₂	130
3.1. Los oligómeros de A β ₁₋₄₂ no intervienen en el metabolismo glicolítico de los astrocitos.	130
4. Papel de las O-GlcNAcilaciones en las respuestas de los astrocitos mediadas por A β ₁₋₄₂	137
4.1. Los oligómeros de A β ₁₋₄₂ favorecen la O-GlcNAcilación de proteínas.	137

4.2. Los oligómeros de A β ₁₋₄₂ median la O-GlcNAcilación del LPAR1 en las treoninas 43 y 47 mientras que el LPA no induce la O-GlcNAcilación del LPAR1.....	141
5. Papel de la PYGM y de la O-GlcNAcilación de LPAR1 en la respuesta de los astrocitos a los oligómeros de A β ₁₋₄₂	151
5.1. La generación de especies reactivas de oxígeno mediadas por los oligómeros de A β ₁₋₄₂ implican al tandem Rac1/PYGM.....	151
5.2. Las O-GlcNAcilaciones de proteínas intervienen en la generación de ROS.	154
5.3. La sobreexpresión de GFAP está regulada por el eje Rac1/PYGM.	156
5.4. Las O-GlcNAcilaciones de proteínas inducen a la sobreexpresión de GFAP.	164
5.5. La sobreexpresión de GFAP mediada por oligómeros de A β ₁₋₄₂ depende de la O-GlcNAcilación del LPAR1.	169
6. Papel del LPA en el control de señalización emanada de los oligómeros de A β ₁₋₄₂ en astrocitos.	179
6.1. Papel del LPA en la degradación de los gránulos nucleares de los astrocitos.....	179
6.2. Cinética de degradación y recuperación del glucógeno nuclear mediada por A β ₁₋₄₂ oligomérico y LPA.	181
6.3. El LPA compensa el efecto de los oligómeros de A β ₁₋₄₂ sobre la degradación de los gránulos de glucógeno intranucleares.	184
6.4. La administración combinada de LPA y A β ₁₋₄₂ oligomérico no genera especies reactivas de oxígeno.	188
6.5. La administración combinada de LPA y A β ₁₋₄₂ oligomérico no produce sobreexpresión de GFAP.	189
6.6 El tratamiento combinado de LPA con A β ₁₋₄₂ oligomérico no activa la migración de los astrocitos.....	193

7. La ruta de señalización Rac1/PYGM que conduce a las O-GlcNAcilaciones de proteínas gobernada por los oligómeros de A β ₁₋₄₂ está conservada en astrocitos primarios de rata.....	196
7.1. La degradación de gránulos nucleares de glucógeno por el tratamiento de oligómeros de A β ₁₋₄₂ está controlada por el tándem Rac1/PYGM en astrocitos primarios de rata.	196
7.2. La generación de ROS mediada por oligómeros de A β ₁₋₄₂ está controlada por el eje Rac1/PYGM y las O-GlcNAcilaciones de proteínas en astrocitos primarios de rata.	199
7.3. Los oligómeros de A β ₁₋₄₂ implican al tándem Rac1/PYGM para mediar la sobreexpresión de GFAP en cultivos primarios de rata.....	202
7.4. El tratamiento con LPA en astrocitos primarios de rata bloquea la respuesta a los oligómeros de A β ₁₋₄₂	205
7.4.1. La cinética de degradación del glucógeno nuclear promovida por los oligómeros de A β ₁₋₄₂ y por LPA es distinta en astrocitos primarios de rata.	205
7.4.2. La administración combinada de LPA y de A β ₁₋₄₂ no genera especies reactivas de oxígeno en astrocitos primarios de rata.	208
7.4.3. La administración combinada de LPA y de A β ₁₋₄₂ oligomérico no promueve la migración de los astrocitos primarios de rata.	210
8. Análisis de la acumulación de gránulos de glucógeno en tejido de ratón control y triple transgénico de 18 meses de edad.	212
Discusión	214
Conclusiones.....	241
Bibliografía.....	243

Agradecimientos

Esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la ayuda y el apoyo tanto profesional como personal por parte de varias personas.

Primero, me gustaría agradecer a mis directores de tesis, José Luis Zugaza y Elena Alberdi, por la oportunidad que me dieron hace cuatro años de realizar esta tesis doctoral y por depositar su confianza en mí. En especial, gracias José Luis por la formación y el apoyo que me has dado durante todo este tiempo y por guiarme de la forma tan profesional que lo has hecho.

A los siguientes que debo de agradecerles es a los que fueron mis compañeros durante la mayoría de tiempo que estuve en el grupo de GTPasas y Neuroseñalización. Llaveró y Alazne me habéis acompañado en este camino de sorpresas y alegrías, pero también de dificultades, formando un equipo de trabajo inolvidable. Llaveró gracias por todas tus enseñanzas, por tu empeño en que nos exprimiéramos al máximo, y por enseñarnos a visualizar los experimentos como si estuviéramos dentro del eppendorf y supiéramos qué iba a ocurrir. Alazne has sido la compañera perfecta para esta maratón: he aprendido mucho a tu lado y espero que cumplas todo lo que te propongas en el futuro.

También debo de agradecer la ayuda que me han prestado Uxue y Adhara con los cultivos primarios y los tejidos, y especialmente, a Laura Escobar por el apoyo técnico en el tratamiento de las imágenes del confocal.

La tesis doctoral ha sido algo que, irremediablemente, me ha afectado a mi vida personal. Por eso, debo de agradecer a las personas que forman parte de ella la paciencia y los ánimos que me han dado durante este tiempo. A mis amigos: gracias a la cuadrilla de Ametzola por esas tardes/noches tan amenas y a Judit, Greta y a Anthony. A mi familia: a mis padres por todo lo que me han enseñado pues sino no hubiese llegado a donde estoy hoy, a mi hermano y a Ester por su apoyo incondicional y a Charo y a Catalina por acogerme como si fuera una más de la familia.

Finalmente, agradecer a la persona que más ha tenido que sufrir este proceso. A ti, Javi, porque nunca has parado de apoyarme y de animarme a lo largo de estos años.

Abreviaciones

3xTg-AD: modelo murino triple transgénico de la Enfermedad de Alzheimer

AA: Ácido araquidónico

ACTA1: Actina isoforma muscular esquelética $\alpha 1$

ACTA2: Actina isoforma muscular esquelética $\alpha 2$

ACTC1: Isoforma muscular cardiaca $\alpha 1$

ACTG2: isoforma muscular lisa $\alpha 2$

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AG: Ácidos grasos

AGM: N-acetilglucosamina fosfoglucomutasa

AGPTA: Aciltransferasa acilglicerolfosfato

AGX: N-acetilglucosamina-1-fosfato

ApoE: apolipoproteína E

APP: Proteína precursora amiloide

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ATX: Autotaxina

A β : β -amiloide

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

bFGF: Factor de crecimiento de fibroblastos básico

cAMP: Adenosín monofosfato cíclico

CCL4: ligando de quimocina 4

COX-2: Ciclooxygenasa 2

CRIB: Dominio de unión p21 de Rac1/Cdc42

CSF: Fluido cerebroespinal

CXCL10: C-X-C Motif Chemokine Ligand 10

CXCL8: C-X-C Motif Chemokine Ligand 8

dATP: Dideoxiadenosina

DbI: RhoGEF of the diffuse B-cell lymphoma

dCTP: Dideoxycytosina

dGTP: Dideoxiguanosina

DMSO: Dimetil sulfóxido

DTT: Ditionitrotol

dTTP: Dideoximitina

EA: Enfermedad de Alzheimer

EGFP: Proteína verde fluorescente

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

FBS: Suero de vaca fetal

FT: Transferasa farnesil

G3P: Glicerol-3-fosfato

G6PD: Glucógeno-6-fosfato deshidrogenasa

G6PD: glucosa 6-dehidrogenasa

GAP: GTPase Activating Protein

GBE: Enzima ramificadora de glucógeno

GDE: Enzima desramificadora de glucógeno

GDI: GDP-Dissociation Inhibitor

GDP: Guanosín difosfato

GEF: Guanine nucleotide Exchange Factor

GFAP: Proteína glial fibrilar ácida

GFAT: glutamina-6-fosfato

GGT: Transferasa geranil-geranil

GlcN-1-P: N-acetilglucosamina-1-fosfato

GlcN-6-P: glucosamina-6-fosfato

Glucosa 1-P: Glucosa 1-fosfato

Glucosa 6-P: Glucosa 6-fosfato

GNAT: glucosamina-6-fosfato-acetil transferasa

GPAT: Glicerofosfato aciltransferasa

GPCR: Receptor acoplado a proteína G heterotrimérica

GS: Glutación sefarosa

GSK-3 β : Glucógeno síntasa quinasa-3 β

GTP: Guanosín trifosfato

HBP: Ruta biosintética de las hexosaminas

HRP: Horseradish Peroxidase

IFN γ : Interferón γ

IgG: Inmunoglobulina G

IL-1 β : Interleucina-1 β

IL-2: Interleucina-2

IPTG: Isopropil β -D-1-thiogalactopyranoside

ITG β 1: Integrina β 1

JNK: c-Jun N-terminal

LC-MS/M/S: Cromatografía líquida con espectrometría de masas

LC-PUFA: Ácidos grasos de cadena larga poliinsaturados

LCAT: Aciltransferasa lecitina colesterol

LDH: Lactato dehidrogenasa

LDL: Lipoproteína de baja densidad

LP: Lisofosfolípido

LPA: Ácido lisofosfatídico

LPAR: Receptor del ácido lisofosfatídico

LPAR1: Receptor del ácido lisofosfatídico isoforma 1

LPAR2: Receptor del ácido lisofosfatídico isoforma 2

LPAR3: Receptor del ácido lisofosfatídico isoforma 3

LPAR4: Receptor del ácido lisofosfatídico isoforma 4

LPAR5: Receptor del ácido lisofosfatídico isoforma 5

LPAR6: Receptor del ácido lisofosfatídico isoforma 6

LPC: Lisofosfatidilcolina

LPE: Lisofosfatidiletalamina

LPP: Fosfatasas lípido fosfato

LPS: Lisofosfatidilserina

MAG: Monoacilglicerol

MAGK: MAG quinasa

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MCT: Transportador monocarboxilato

MS: Espectrometría de masas

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido

NADP⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido

NOX: NADPH oxidasa

NSCL: Célula pequeña de cáncer de pulmón

NSPC: Células neurales progenitoras/células madre

OBD: Dominio de unión a OGT

OGA: O-GlcNAcasa.

OGT: uridina difosfato-N-acetil-D-glucosamina:polipeptidil transferasa o O-GlcNAc transferasa

PA: Ácido fosfatídico

PAK: p21-Activated kinase

PBS: Phosphate buffered saline

PC: Fosfatidilcolina

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PE: Fosfatidiletanolamina

PGM: Fosfoglucomutasa de músculo

Pi: Fosfato inorgánico

PIC: Protease inhibitor cocktail

PLA: Fosfolipasa

PLD: Fosfolipasa D

PP1: Proteína fosfatasa 1

PS: Fosfatidilserina

PSN1: presenilina-1

PSN2: presenilina-2

PTM: Modificación postrasduccional

PYG: Glucógeno fosforilasa

PYGB: Glucógeno fosforilasa isoforma de cerebro

PYGL: Glucógeno fosforilasa isoforma de hígado

PYGM: Glucógeno fosforilasa isoforma de músculo

RBD: Dominio de unión a Rac.

RIPA: Radioimmunoprecipitation buffer

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RT-PCR: PCR a tiempo real

S: Serina

SNC: Sistema nervioso central

SRF: Serum response factor

SRSF2: Factor de splicing 2 rico en serina y arginina

T: Treonina

TBST: Tris Buffer Saline Tween

TGF- β 1: Factor de crecimiento tumoral β 1

TNF α : Factor de necrosis tumoral α

UDP-GlcNAc: uridina difosfato N-acetil glicosamina

VEGF: Factor de crecimiento vascular-endotelial

Vzg-1: gen 1 de la zona ventricular

WASP: Wiskott-Aldrich síndrome protein

Resumen

La Enfermedad de Alzheimer (EA) cursa, entre otras cosas, con un hipometabolismo de la glucosa en el cerebro. Esta anomalía del metabolismo de la glucosa se manifiesta décadas antes de la aparición de síntomas y marcas histopatológicas características de la enfermedad. Llegar a descifrar el nexo entre el metabolismo de la glucosa en el cerebro con la muerte neuronal podría ser clave para entender la progresión de la neurodegeneración y especialmente la EA.

A este respecto, cabe destacar la relación funcional entre los diferentes linajes celulares presentes en el cerebro y particularmente la relación entre astrocitos y neuronas. Los astrocitos son las células que abastecen de energía a las neuronas, además de transferir derivados de la glucosa proveniente del torrente circulatorio poseen el mayor almacén de glucógeno en el cerebro y cuya movilización también se traduce en transferencia de derivados de glucosa a la neurona. Los astrocitos en presencia de $A\beta_{1-42}$ oligomérico cambian su funcionalidad, traduciéndose en una afectación negativa para la biología de las neuronas del sistema nervioso central.

Considerando el papel clave del péptido $A\beta_{1-42}$ en la fisiopatología de la EA, en general, y en el metabolismo de la glucosa en particular, nosotros hemos investigado el papel del péptido $A\beta_{1-42}$ en el eje de señalización intracelular Rac1/PYGM/glucógeno en astrocitos. Hemos observado que este eje de señalización gobierna la ruta de la biosintética de hexosaminas con objeto de mediar modificaciones postraduccionales por O-GlcNAcilaciones de determinadas proteínas y estas O-GlcNAcilaciones alteran la función de estas como es el caso del receptor de LPA isoforma1 (LPAR1).

Introducción

Las respuestas biológicas de una célula son el resultado del procesamiento de los mensajes que reciben de forma constante. Entre algunas de ellas, se encuentran la activación de la maquinaria de síntesis y de transporte de moléculas, la supervivencia, la muerte, la proliferación o la motilidad celular. Los mensajes o señales químicas llegan a las células por medio de moléculas mensajeras (factores de crecimiento, hormonas, péptidos e iones) y, para que éstas los transmitan, primero se tienen que unir a receptores específicos. El resultado de esta unión permite la transducción de la señal recibida a través de moléculas efectoras, generalmente intracelulares. El conjunto de todas estas moléculas constituyen las redes de señalización celular (Berridge 2012), cuyo fin último es transformar el mensaje recibido en una respuesta biológica.

Unas de las moléculas clave en la señalización intracelular son las pequeñas GTPasas de la superfamilia Ras. Estas proteínas controlan procesos tan importantes para la biología celular como la supervivencia, la proliferación, la diferenciación o la apoptosis (Goitre et al. 2014; Song et al. 2019). Su desregulación ocasiona cambios importantes en las redes de señalización celular, alterando las respuestas biológicas y derivando en patologías como el cáncer (Aspenstrom 2018), enfermedades vasculares (Strassheim et al 2019) y/o neurodegenerativas (Arrazola Sastre et al. 2020; Arrazola Sastre et al. 2021)

Entre las enfermedades neurodegenerativas donde las redes de señalización controladas por las GTPasas de la superfamilia Ras están claramente desreguladas, se encuentra la Enfermedad de Alzheimer (EA) (Arrazola Sastre et al. 2020; Arrazola Sastre et al. 2021). Descifrar cómo participan las GTPasas de la superfamilia Ras y sus moléculas efectoras en las redes de señalización tanto de las neuronas como de las células de la glía es clave para entender el mecanismo biológico que promueve los procesos neurodegenerativos, incluida la EA.

1. GTPasas de la superfamilia Ras.

Las GTPasas de la superfamilia Ras se clasifican en cinco grandes familias: Ras, Rho, Rab, Arf y Ran, las cuáles se caracterizan por tener funciones

específicas aunque también se coordinan entre ellas. Así, las GTPasas de la familia Ras, la cuál da el nombre a la superfamilia, está implicada en la expresión génica, el metabolismo, el crecimiento, y la proliferación celular; las GTPasas de la familia Rho están especializadas en el control del citoesqueleto de actina y regulan, en cooperación con Ras, el ciclo celular, la expresión génica y procesos de transformación; las GTPasas de la familia Rab regulan el tráfico vesicular y de membrana; las GTPasas de la familia Arf participan en la biogénesis vesicular, transporte intracelular y remodelación de la actina; y las GTPasas de la familia Ran regulan el transporte nucleocitoplasmático durante las fases G1, S y G2 del ciclo celular y también la organización de los microtúbulos durante la fase de mitosis (Wennerberg, Rossman, and Der 2005; Goitre et al. 2014; Song et al. 2019).

Todas ellas son monoméricas y de pequeño tamaño (20-30kDa) presentando a su vez una alta homología de secuencia. Funcionan como interruptores moleculares que conectan las señales extracelulares con las intracelulares, regulando así las respuestas celulares (Goitre et al. 2014; Song et al. 2019). Por ejemplo, la GTPasa Ras promueve la activación de sus principales moléculas efectoras: las quinasas Raf, las cuales a su vez, activan a las MAPKs quienes tienen más de 70 moléculas efectoras, incluyendo factores de transcripción, proteínas del citoesqueleto, proteínas señalizadoras y receptores (Roux and Blenis 2004; Kolch 2005). Además, Ras puede coordinar las respuestas dependientes de MAPK con el control de otras respuestas biológicas como, por ejemplo, el metabolismo del glucógeno en linfocitos T (Llaveró et al. 2019).

El proceso por el cuál las GTPasas de la superfamilia Ras pasan de un estado inactivo (cargadas con GDP) a otro activo (cargadas con GTP), y viceversa, se le conoce como el ciclo de las GTPasas (**Figura 1**). Es un proceso dinámico controlado por tres tipos de proteínas reguladoras: factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs: *Guanine nucleotide Exchange factors*), proteínas activadoras de las GTPasas (GAPs: *GTPases Activating Proteins*) e inhibidores de la disociación de GDP (GDI: *GDP-Dissociation Inhibitors*). Los GEFs catalizan el intercambio de GDP por GTP, interviniendo en la activación de las GTPasas. Los GAPs intervienen en la inactivación de las GTPasas ya

que estimulan la actividad GTPasa intrínseca de las GTPasas, generando fosfato inorgánico (Pi) y GDP. Por último, los GDI impiden la disociación del GDP de la GTPasa, manteniéndola secuestrada e inactiva en el citosol (Bustelo, Sauzeau, and Berenjano 2007; Johnson and Chen 2012; Song et al. 2019; Arrazola Sastre et al. 2020; Arrazola Sastre et al. 2021).

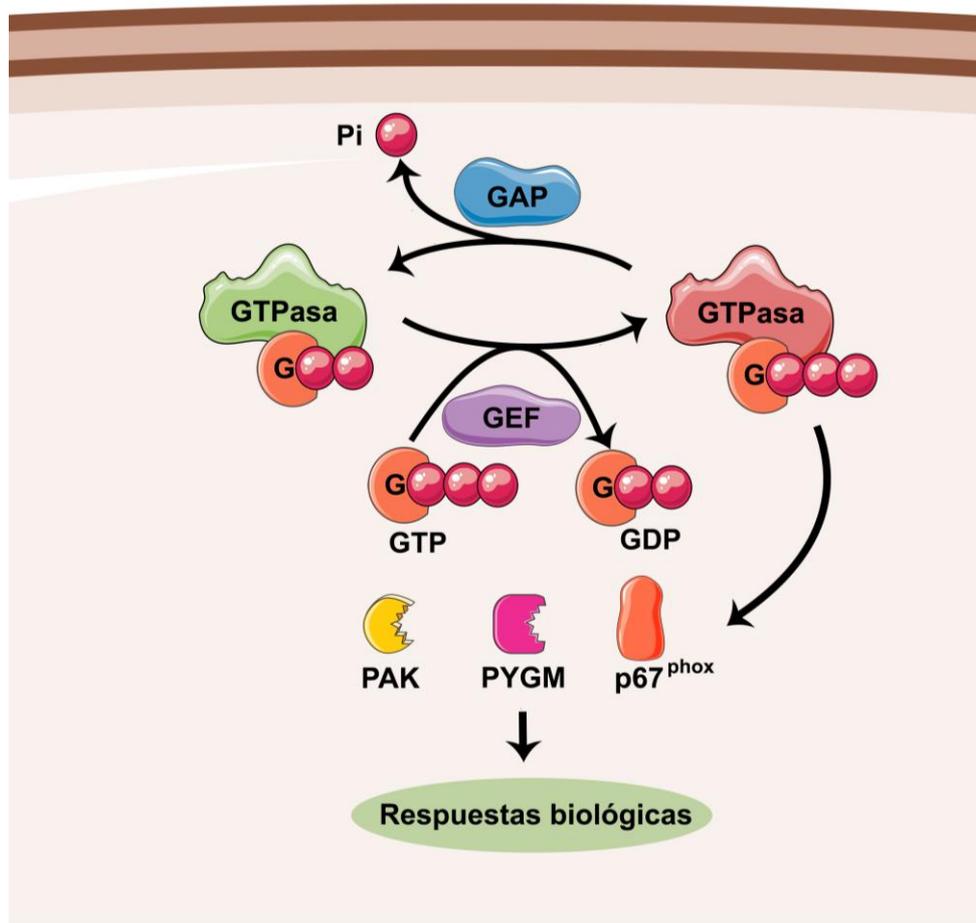


Figura 1. Ciclo de activación y desactivación de las GTPasas de la superfamilia Ras. La activación de los GEF cataliza el intercambio de GDP por GTP de las GTPasas. Las GTPasas activas (GTPasa-GTP) interactúan con moléculas efectoras, como por ejemplo PAK, PYGM y p67^{phox}, y median las respuestas biológicas a la señal recibida. A su vez, los GAP estimulan la actividad intrínseca de las GTPasas promoviendo la conversión de GTP hacia GDP, volviendo a quedar en un estado inactivo (Arrazola et al 2020).

Además, la actividad de las GTPasas de la superfamilia Ras también se regula por modificaciones postraduccionales (PTM). Estas PTMs anclan a las GTPasas a las membranas celulares y, en algunos casos, incluso pueden modular el intercambio entre GTP y GDP. Las PTMs que pueden sufrir las

GTPasas son: la farnesilación/geranilgeranilación irreversible en el motivo CAAX C-terminal, proteólisis y metilación, la palmitoilación reversible y modificaciones condicionales que incluyen la fosforilación, la isomerización peptidil-prolil, la ubiquitinación, la nitrosilación, la ribosilación ADP y la O-GlcNAcilación (Goitre et al. 2014; Wu et al. 2018; Osaka et al. 2021).

1.1. GTPasas de la familia Rho.

Centrándonos en las GTPasas de la familia Rho, éstas forman un grupo numeroso de proteínas, siendo 23 *loci* diferentes los que pueden generar al menos 26 proteínas debido a los eventos de procesamiento o de *splicing* alternativo. Su estructura primaria se encuentra conservada, siendo un 50-50% homólogas entre sí (van Dam, Bos, and Snel 2011; Rojas et al. 2012; Murali and Rajalingam 2014; Xie et al. 2017) y se dividen en 8 subfamilias en función de la identidad de secuencia aminoacídica, de motivos estructurales y de función biológica (Rho, Rac, Cdc42, Rnd, RhoBTB, RhoH, RhoUV y RhoDF) (Murali and Rajalingam 2014). Las GTPasas de la familia Rho mejor caracterizadas tanto desde un punto de vista estructural como funcional son RhoA, Rac y Cdc42 (Song et al. 2019).

1.1.1. Funciones de las GTPasas de la familia Rho.

Las GTPasas de esta familia están especializadas en la regulación del citoesqueleto de actina, implicando una variedad de procesos biológicos como la migración, la fagocitosis, la endocitosis, la morfogénesis y la citoquinesis (Bishop and Hall 2000; Warner, Wilson, and Caswell 2019).

En todos estos procesos, es esencial la cooperación entre GTPasas de esta misma familia. Así, con el fin de que una célula migre hacia una dirección en respuesta a un estímulo, la célula debe primero posicionarse para seguidamente moverse hacia la dirección determinada, para ello desarrolla nuevas protuberancias mediante la modulación del citoesqueleto de actina con el fin de formar nuevas uniones al substrato donde están ancladas y contraer así el citoesqueleto de actina-miosina en el cuerpo celular. Estos procesos se controlan de forma coordinada por las GTPasas RhoA, Rac y Cdc42, respectivamente (Raftopoulou and Hall 2004), detectándose *pools* de RhoA y Rac en diferentes localizaciones celulares y encontrándose el pico de actividad

de ambas GTPasas en distintos puntos temporales durante la migración celular (Nguyen, Kholodenko, and von Kriegsheim 2018).

Otro ejemplo de la modulación del citoesqueleto de actina vía las GTPasas de la familia Rho, se encuentra en la morfología celular. En el caso concreto de los astrocitos, la actividad de las GTPasas Rho es determinante para su morfología. En cultivo, los astrocitos, bajo ciertos estímulos, como por ejemplo el péptido A β ₂₅₋₃₅ o el segundo mensajero, cAMP (Salinero et al. 1997; Ramakers and Moolenaar 1998), pueden adoptar una forma estrellada y ramificada la cuál se denomina *stellation* (Schiweck, Eickholt, and Murk 2018). Este fenómeno está altamente regulado por RhoA y Rac1 (Zeug et al. 2018).

A pesar de estar especializadas en la regulación del citoesqueleto de la célula, las GTPasas de la familia Rho también están implicadas en la regulación de otros procesos. De hecho, Abo y col describieron que Rac1 actuaba como un regulador alostérico del complejo enzimático NOX (NADPH oxidasa), y posteriormente, Diekmann y col desvelaron que Rac1 interactuaba con p67^{phox}, un componente citosólico del complejo NOX que se recluta a la membrana durante el proceso de activación de NOX (Abo et al. 1991; Diekmann et al. 1994). En el contexto de la Enfermedad de Alzheimer, Rac1 controla la señalización de NOX y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), promoviendo las siguientes respuestas a largo plazo: aumento de la expresión de NOX2, maduración de la ITG β 1 y sobreexpresión de GFAP (Wyssenbach et al. 2016).

Las GTPasas de la familia Rho también controlan rutas de transducción de señales que regulan la transcripción de genes. Por ejemplo, RhoA activa al factor de transcripción SRF (*Serum response factor*), mientras que Rac y Cdc42 activan rutas de señalización celular que controlan a JNK (quinasa c-Jun N-terminal) y a p38MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) (Hall 2012).

Finalmente, las GTPasas de la familia Rho también controlan el metabolismo del glucógeno, aparentemente sin necesidad de reorganizar el citoesqueleto de actina. Una de las moléculas efectoras de la GTPasa Rac1 es la isoforma muscular de la glucógeno fosforilasa (PYGM o miofosforilasa). La activación de Rac1 permite su interacción con ella, provocándole un cambio conformacional y

su consecuente activación, que sirve para conectar el metabolismo del glucógeno con la migración y la proliferación de los linfocitos T (Arrizabalaga et al. 2012).

1.1.1. Regulación de las GTPasas de la familia Rho.

De la misma forma que la mayoría de las GTPasas de la superfamilia Ras, la transición de las GTPasas de la familia Rho entre el estado inactivo y el activo está regulada por GEFs, GAPs y GDIs (Figura 1).

Estas moléculas reguladoras se unen a una región del dominio G de las GTPasas. Este dominio está formado por 5 motivos conservados (G1-G5) y es en esta región donde por un lado se unen los nucleótidos de guanina GDP/GTP y por otro se lleva a cabo la hidrólisis de GTP. Concretamente, las regiones G2 (switch I) y G3 (switch II) son los sitios de unión de los GEFs, los GAPs y los GDIs, los cuales al unirse producen una reorganización estructural favoreciendo el tránsito entre los estados inactivo y activo y viceversa. Además, las GTPasas de la familia Rho poseen el motivo CAAX, región que sufre determinadas PTMs que determinan la localización celular de las GTPasas (Wennerberg, Rossman, and Der 2005; Mosaddeghzadeh and Ahmadian 2021).

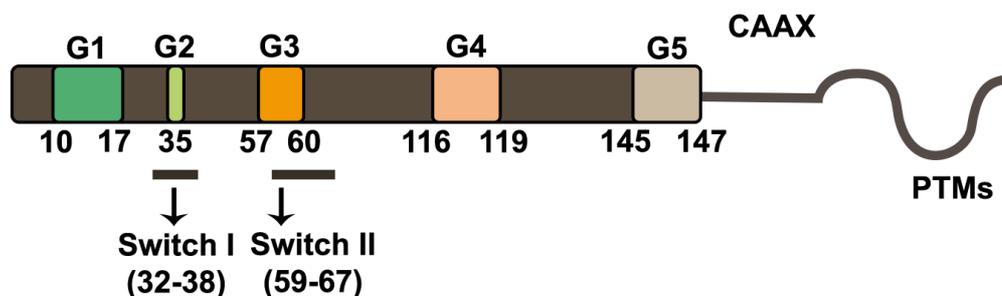


Figura 2. Dominios conservados de las GTPasas de la familia de Rho. Dentro de la región o dominio G, la secuencia de las GTPasas Rho está formada por los dominios G1-G5. En los dominios G2 y G3 se encuentran las regiones switch I y switch, siendo ambas la región de unión de las moléculas reguladoras de las GTPasas Rho: GEFs, GAPs y GDIs. Al final de la secuencia de las GTPasas Rho se encuentra el motivo CAAX, el cuál sufre diferentes PTMs (Wennerberg, Rossman, and Der 2005; Mosaddeghzadeh and Ahmadian 2021).

El motivo CAAX es una secuencia formada por cisteína (C), dos aminoácidos alifáticos (A) y por metionina, serina, alanina o glutamina (X). Este motivo

recibe PTMs de forma secuencial: primero, se incorpora un grupo geranilo-geranilo o bien un grupo farnesilo al residuo cisteína. Esta reacción está catalizada por las transferasas geranilo-geranilo tipo I o farnesilo, respectivamente. Después, se añade un grupo isoprenoide con el fin de promover la traslocación de la GTPasa al retículo endoplásmico, y en este orgánulo, la proteasa Rce1 realiza una escisión proteolítica a la cola tripeptídica “AAX”. El grupo α -carboxilo de la cisteína C-terminal queda expuesto y se metilesterifica por la acción de la enzima carboxil metiltransferasa Icmt. En algunos casos, las GTPasas son posteriormente modificadas con grupos palmitato en residuos de cisteína adicionales cercanas al motivo CAAX (Figura 3) (Bustelo, Sauzeau, and Berenjeno 2007; Mosaddeghzadeh and Ahmadian 2021). Finalmente, dependiendo de la PTM que reciba, la GTPasa tendrá una localización celular u otra. Por ejemplo, RhoB está localizada en endomembranas cuando está geranil-geranilada y en la membrana plasmática cuando está farnesilada (Lebowitz, Davide, and Prendergast 1995).

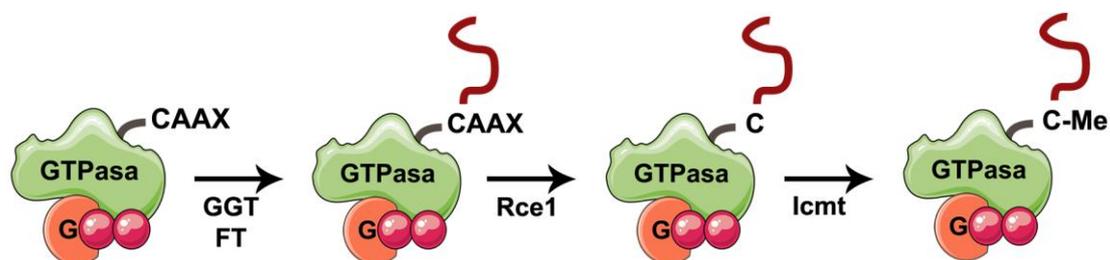


Figura 3. PTMs de las GTPasas de la familia Rho. Las transferasas geranil-geranil (GGT) o bien la transferasa farnesil (FT) añade las PTMs geranil-geranil o bien farnesil en el residuo cisteína del dominio CAAX. La enzima Rce1 elimina el grupo AAX y posteriormente, la enzima Icmt añade un grupo metilo en el mismo residuo cisteína.

1.1.1.1. GDIs

Los inhibidores de disociación de guanosina (GDIs), además de protegerlos de los efectos de GEF, actúan impidiendo la disociación del GDP de la GTPasa, por lo que la mantienen en el estado inactivo. En el caso de las GTPasas de la familia Rho, existen tres GDIs (RhoGDIs): GDI1 (RhoGDI α), GDI2 (GDI β , LY-GDI o D4-GDI) y GDI3 (GDI γ) (Mosaddeghzadeh and Ahmadian 2021). GDI1 o RhoGDI α es el miembro más estudiado de los tres (Griner and Theodorescu

2012), aunque la alteración de la expresión de los tres GDIs han sido relacionados con distintos tipos de cáncer (Xie et al. 2017; Griner and Theodorescu 2012; de Leon-Bautista et al. 2016).

RhoGDI α está formada por dos dominios: un dominio flexible N-terminal y un dominio C-terminal. El dominio N-terminal interacciona con los dominios switch I y II de las GTPasas de la familia Rho, bloqueando la disociación y el intercambio de los nucleótidos. De esta forma, RhoGDI α impide la unión de las GTPasas Rho con la membrana. El dominio C-terminal contiene un bolsillo hidrofóbico de unión a la fracción isoprenilo que es esencial para la interacción entre RhoGDI α y la GTPasa Rho. Además, RhoGDI α protege a las GTPasas Rho de la degradación en el citoplasma o de una activación inespecífica por los GEFs (Hoffman, Nassar, and Cerione 2000; Dovas and Couchman 2005; Tnimov et al. 2012; Xie et al. 2017; Mosaddeghzadeh and Ahmadian 2021).

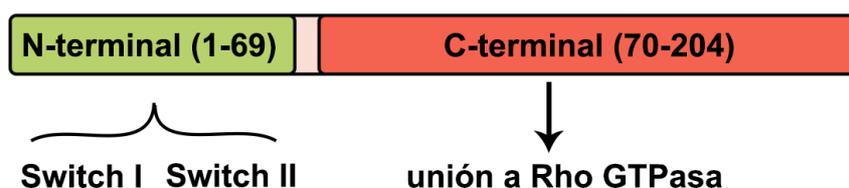


Figura 4. Estructura de RhoGDI α . Dominios de N-terminal (residuos 1-69) y C-terminal (residuos 70-204) de RhoGDI α . El dominio N-terminal bloquea la disociación y el intercambio de nucleótidos de la Rho GTPasa uniéndose en sus dominios switch I y switch II, y el dominio C-terminal contiene un bolsillo de unión a la fracción isoprenilo de la Rho GTPasa.

1.1.1.2. GEFs.

Los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs) son proteínas que se unen de forma selectiva a las GTPasas y catalizan el intercambio entre GDP y GTP. El mecanismo de reacción de los GEFs está basado en la afinidad de las GTPasas con el nucleótido, siendo mayor por GTP que por GDP. En el caso de las GTPasas de la familia Rho, existen dos familias de GEFs que controlan su activación: la familia Dbl y la familia DOCK (Schmidt and Hall 2002; Mosaddeghzadeh and Ahmadian 2021).

La familia Dbl, (de las siglas en inglés *RhoGEF of the diffuse B-cell lymphoma*), está constituida por unos 74 miembros, los cuales tienen una variedad de

dominios y funciones. Aun así, todos ellos poseen un único dominio DH o catalítico, el cuál acelera la reacción de intercambio de GDP a GTP. Seguido de este dominio, algunos GEFs de la familia Dbl poseen un dominio PH, el cual permite anclarlas a la membrana plasmática al unirse a fosfoinosítoles para dirigirlos hacia sus GTPasas diana. Como dominios adicionales, hay una gran variedad, dependiendo de los GEFs, se encuentran los que permite la interacción de los GEFs con otras proteínas (SH2, SH3, CH, RGS, PDZ o IQ) o con lípidos de membrana (BAR, PH FYVE, C1 y C2), además de dominios funcionales (serina/treonina quinasa, RasGEF, RhoGAP y RanGEF) implicados en la autorregulación, en la localización subcelular y en la conexión de las GEFs con moléculas *upstream* (Mosaddeghzadeh and Ahmadian 2021). Toda esta variabilidad de dominios confiere a las proteínas GEF especificidad para cada GTPasa y otras potenciales moléculas efectoras. Por lo que, según el GEF que se active, se dará una activación específica a unas GTPasas concretas y, por lo tanto, a una respuesta celular precisa en base a la señal recibida (Zheng and Quilliam 2003) (Figura 5).

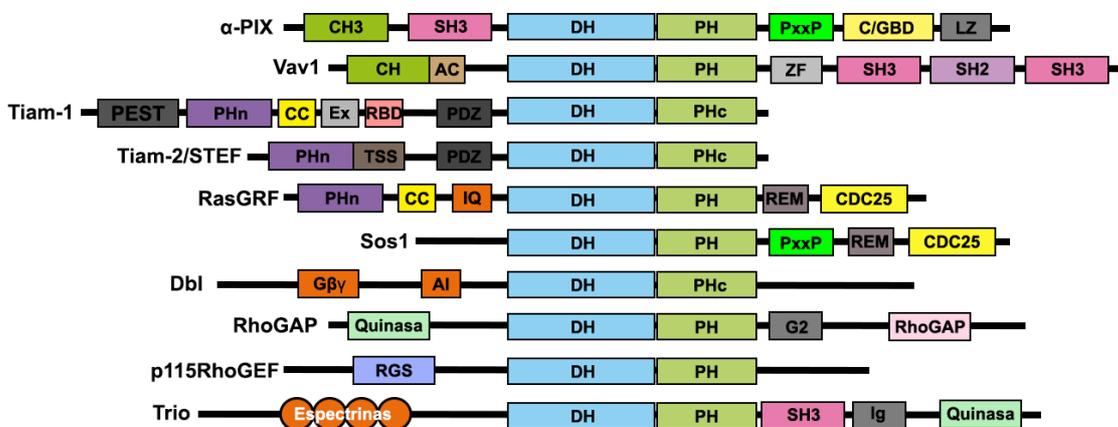


Figura 5. Estructura de los miembros más representativos de la familia Dbl. Se ha representado la estructura de los miembros más representativos de de la familia Dbl. Todos comparten los dominios DH y PH o PHc, y poseen una gran variedad de dominios adicionales en su estructura que difieren entre los miembros de la misma familia (Mosaddeghzadeh and Ahmadian 2021).

En cuanto a la familia de intercambiadores DOCK está constituida por 11 miembros, divididos en cuatro subfamilias en función de la homología de secuencia y su especificidad al sustrato: DOCK-A, DOCK-B, DOCK-C y DOCK-D, (Schmidt and Hall 2002; Nishikimi et al. 2013; Mosaddeghzadeh and

Ahmadian 2021). Presentan dos dominios conservados: DHR-1 (*lipid-binding DOCK homology region 1*), que facilita la localización de esta proteínas en los compartimentos de membrana, y un dominio DHR-2 (*catalytic DOCK homology region 2*), que cataliza la reacción de intercambio GDP a GTP. Estos factores intercambiadores activan específicamente a las GTPasas Rac y Cdc42, excluyendo al resto de GTPasas la familia Rho (Brugnera et al. 2002; Cote and Vuori 2002; Meller et al. 2002; Laurin and Cote 2014) (Figura 6).

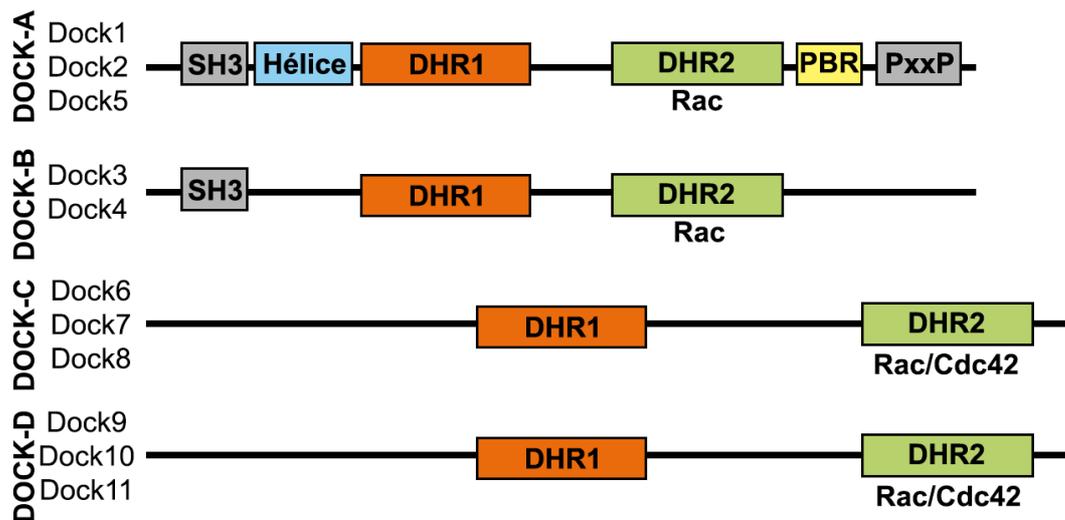


Figura 6. Estructura de las familias DOCK. Los GEFs de la familia DOCK contienen un dominio DHR1 y un dominio DHR2. Debajo del dominio DHR2 se indica la GTPasa que es activada. Los miembros de la familia DOCK-A y DOCK-B cuentan con dominios estructurales diferenciales a los miembros de las familias DOCK-C y DOCK-D (Laurin and Cote 2014).

1.1.1.3. GAPs.

Las proteínas activadoras de las GTPasas (GAPs) interaccionan con las GTPasas y aceleran la actividad hidrolítica sobre el GTP que tienen las GTPasas, cerrando el ciclo de activación/desactivación de éstas. Las GAPs que actúan sobre las GTPasas de la familia Rho (RhoGAP) son especialmente abundantes: se han identificado 66 RhoGAPs codificadas en el genoma humano. Los tamaños de estas proteínas son variables, oscilan desde 50 hasta 250 kDa. La variedad de RhoGAPs implica que deben de ser bien reguladas para prevenir que las Rho GTPasas sean inactivadas de forma accidental (Mosaddeghzadeh and Ahmadian 2021).

En general son proteínas complejas que contienen una gran variedad de dominios diferentes que les permite interactuar con proteínas o lípidos (Bernards and Settleman 2004). Todas ellas comparten el dominio GAP que se une a las GTPasas de la familia Rho y promueve su actividad hidrolítica intrínseca. El dominio GAP está formado por 190 aminoácidos con alta homología de secuencia entre los miembros de la familia. Consta de un residuo de arginina conservado, llamado dedo de arginina, que estabiliza el estado de transición de la GTPasa y cataliza la reacción de hidrólisis de GTP. Este dominio de por sí no es selectivo de GTPasa y no es suficiente para que se lleve a cabo la hidrólisis de GTP, apuntando a que otros dominios de las RhoGAPs les confiere especificidad de sustrato y una eficiencia catalítica (Mosaddeghzadeh and Ahmadian 2021).

1.1.2. Moléculas efectoras.

El control de la diversidad de respuestas celulares por parte de las GTPasas de la familia Rho se lleva a cabo mediante su interacción con una amplia batería de moléculas efectoras. Hasta la fecha, se han identificado unas 70 moléculas efectoras de RhoA, Rac1 y Cdc42 (Mosaddeghzadeh and Ahmadian 2021). Estas moléculas pueden ser proteínas quinasas (PAK), proteínas adaptadoras (WASP, Rhotekin) o hidrolasas (glucógeno fosforilasa) (Kumar et al. 2017; Alekhina, Burstein, and Billadeau 2017; Arrizabalaga et al. 2012).

1.1.2.1. PAK.

Las proteínas *p21-Activated kinases* (PAKs) son serina/treonina quinasas y moléculas efectoras de las pequeñas GTPasas Cdc42 y Rac1, entre otras. Fosforilan a una gran variedad de sustratos y afectan a un gran rango de respuestas celulares: motilidad celular, supervivencia, redox, ciclo celular, proliferación, transformación, estrés, inflamación y expresión génica (Kumar et al. 2017).

Las PAKs se dividen en dos subgrupos, grupo I y grupo II, en los cuáles se encuentran PAK1, 2 y 3 y PAK 4, 5 y 6; respectivamente. Estructuralmente, los miembros del grupo I son más homólogos entre sí, mientras que los del grupo II son más divergentes. Todos ellos tienen un dominio quinasa altamente conservado, un dominio de unión a GTPasa (GBD) en el extremo N-terminal, el

cuál se conoce como CRIB (*Cdc42-Rac1-interactive binding motif*), y un dominio autoinhibidor (AID). El sitio de autofosforilación del grupo I es un residuo en treonina mientras que en el grupo II es una serina. Además, los miembros del grupo I poseen un lugar de unión PIX, el cual permite su activación por mecanismos independientes de GTPasas (Kumar et al. 2017; Civiero and Greggio 2018).

El mecanismo de activación difiere entre los dos grupos. Las PAKs del grupo I forman dímeros autoinhibitorios debido a la interacción entre los dominios AID y quinasa. La unión de una pequeña GTPasa activa (GTPasa-GTP) al dominio GBD o bien tras la unión de fosfolípidos o el factor intercambiador β -PIX al dominio de unión de PIX promueve: la disociación de AID de la región catalítica, cambios conformacionales y la autofosforilación de ambas moléculas de PAK. Por otro lado, las PAKs del grupo II necesitan tanto de la unión de GTPasas como de proteínas que contienen motivos PS y SH para promover la liberación de su grupo catalítico y convertirse en activas (Kumar et al. 2017; Civiero and Greggio 2018) (Figura 7).

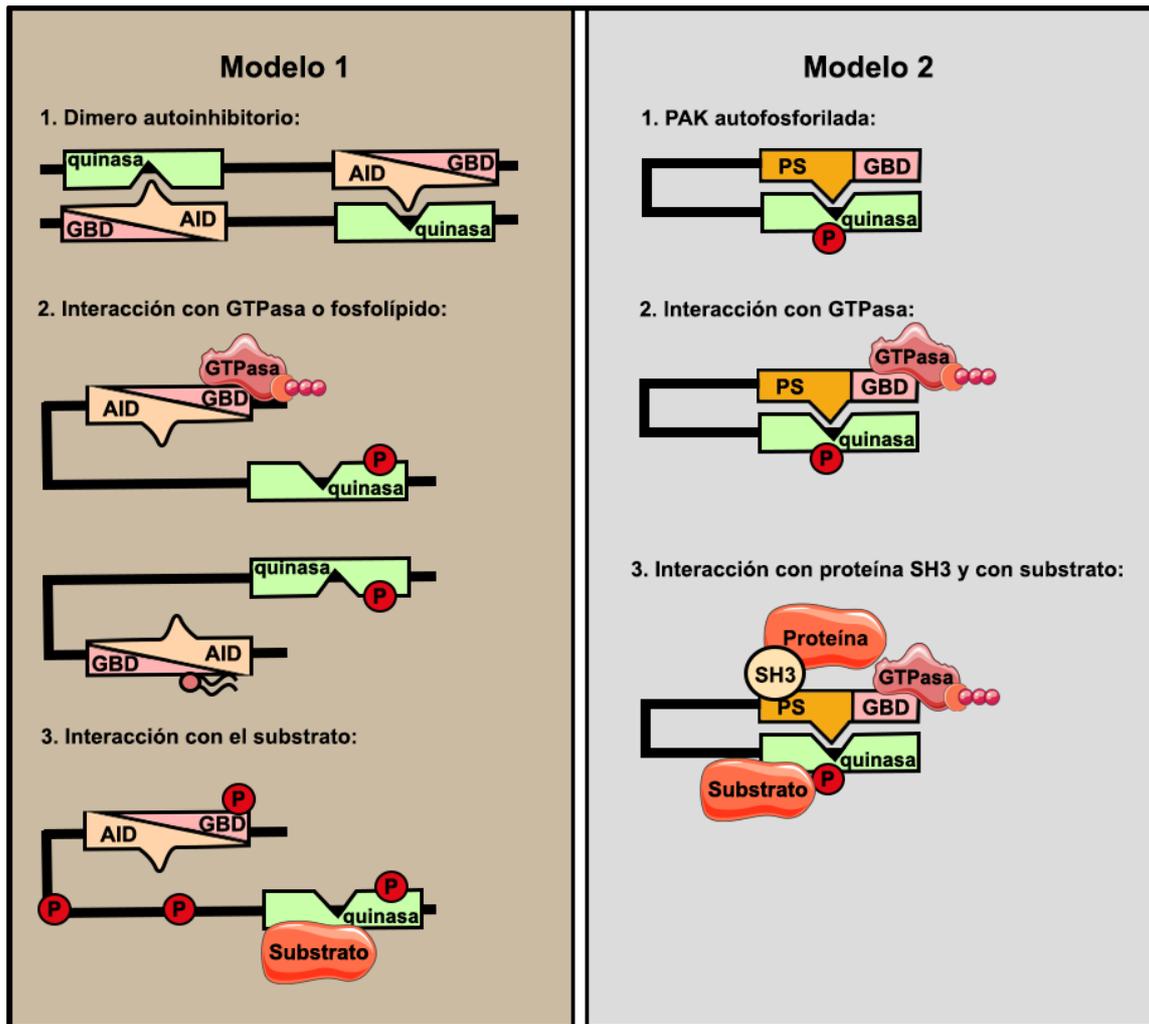


Figura 7. Mecanismo de activación de PAK. Las PAKs del grupo I siguen el modelo 1 y las PAKs del grupo II siguen el modelo 2 (Kumar et al. 2017).

La desregulación de las redes de señalización donde las PAKs participan ha sido relacionada tanto con neurodegeneración (Civiero and Greggio 2018) como con distintos tipos de cáncer, como tiroides, gastrointestinal o de páncreas (Kumar et al. 2017; Bautista, Knippler, and Ringel 2020; He and Baldwin 2013; Yeo et al. 2015).

Con respecto al cerebro, la red controlada por la ruta de señalización que implica a las GTPasas de la familia Rho con PAK, controla una batería de respuestas que incluyen la viabilidad de las neuronas (PAK1) (Johnson and D'Mello 2005), la funcionalidad y la morfología sináptica (PAK1/3) (Huang et al. 2011; Xia et al. 2016), la respuesta inmunitaria por parte de la microglia (PAK1) (Roepstorff et al. 2008) y de los astrocitos (PAK4) (He et al. 2017), y la

proliferación de los astrocitos (PAK6) (Chen, Zhao, and Shen 2011), entre otras. La alteración del estado de fosforilación de estas quinasas se ha relacionado con la degeneración de neuronas, la activación de la microglía y la astrogliosis (Civiero and Greggio 2018).

1.1.2.2. WASP.

La familia de proteínas *Wiskott-Aldrich syndrome protein* (WASP) son factores promotores de nucleación que se unen y activan el complejo Arp2/3 con el fin de formar filamentos de actina. El miembro WASP de esta familia de proteínas fue descubierto como un gen mutado en la inmunodeficiencia ligada al cromosoma X llamada Síndrome de Wiskot-Aldrich (Derry, Ochs, and Francke 1994). En general, son moléculas efectoras de Cdc42, aunque alguno de sus miembros también se asocia a Rac (Burianek and Soderling 2013).

En mamíferos, existen 5 subfamilias de WASP: WASP y su forma neural (N-WASP, también conocida como WASL), las tres isoformas WASP homólogas a verprolin (WAVE1-WAVE3, también conocidas como SCAR1-SCAR3 o WASF1-WASF3), la proteína homóloga de WASP asociada a actina, a membranas y a microtúbulos (WHAMM), la proteína homóloga de WASP y SCAR (WASH, también conocida como WASHC1) y la *Junction Mediating and regulatory protein* (JMY) (Burianek and Soderling 2013; Alekhina, Burstein, and Billadeau 2017).

Todos los miembros de la familia WASP contienen una región rica en prolina y una cola VCA en la región C-terminal. El dominio N-terminal difiere entre las distintas subfamilias de WASP, del mismo modo que la regulación de su actividad. Las más estudiadas son WASP, N-WASP y WAVE. En reposo, WASP se encuentra autoinhibida por la unión intramolecular de sus dominios VCA y GBD. La interacción entre Cdc42-GTP y GBD permite la liberación de la unión entre VCA y GBD y la fosforilación de la tirosina 291 del dominio GBD. Finalmente, WASP se une al complejo Arp2/3, activándolo y modulando el citoesqueleto de actina. En el caso de N-WASP, esta proteína presenta una alta homología con WASP, siendo activada por las siguientes moléculas: Cdc42, PIP2, Src y WISH. Además, N-WASP es susceptible de ser ubiquitinada y degradada por el proteasoma. Por último, WAVE posee una actividad basal de nucleación y, en lugar del dominio GBD, posee un dominio

N-terminal llamado *WAVE homology domain* (WHD). En reposo, WAVE está retenida por el complejo regulador WAVE (WRC), el cuál está involucrado en la activación de WAVE tras la interacción entre Rac y uno de sus componentes, la proteína Sra-1 (Burianek and Soderling 2013).

La familia de proteínas WASP está implicada en una gran variedad de funciones, entre las cuáles se encuentran: modulación del citoesqueleto de actina, regulación del tráfico de receptores, transporte vesicular, biogénesis del autofagosoma, expresión génica de c-Myc, transcripción dependiente de p53 en respuesta a daño en el DNA y organización y remodelación de la cromatina (Alekhina, Burstein, and Billadeau 2017).

Concretamente, WASP juega un papel determinante tanto en la inmunidad innata como en la adquirida. En células hematopoyéticas, la señalización dependiente de WASP modula la migración, la señalización de receptores, la citotoxicidad y la fagocitosis (Rivers and Thrasher 2017). En el cerebro, la forma neural, N-WASP, está involucrada en la formación de mielina tanto en el sistema nervioso central como en el periférico (Katanov et al. 2020; Novak et al. 2011), estando también WAVE1 implicada en la formación de mielina y en la morfogénesis de oligodendrocitos (Kim et al. 2006). En condiciones patológicas, se ha descrito una mayor expresión de N-WASP y WAVE en cerebros de pacientes con Enfermedad de Alzheimer, y ambas proteínas, se encuentran involucradas en la formación de procesos anormales “*dendrita-like*” (Kitamura et al. 2003), por lo que la desregulación de la señalización controlada por la familia WASP podría participar en la neurodegeneración.

1.1.2.3. Rhotekin

Rhotekin es una proteína efectora de Rho, con una masa molecular de 61kDa, descubierta originalmente como un elemento de unión a Rho A y cuyo nombre está formado por la palabra Rho y *teki* que significa diana en japonés (Reid et al. 1996; Ito, Morishita, and Nagata 2018).

Estructuralmente, Rhotekin posee un dominio activo de unión a Rho (RBD), un dominio *Pleckstrin-homology* (PH), dos motivos ricos en prolina en el C-terminal y la secuencia C-terminal SPV-COOH que se une a un motivo consenso X(S/T)XV-COOH que reconoce dominios de clase I PDZ. Este dominio está

presente en varias proteínas que actúan aguas abajo regulando procesos tales como la morfología celular y la migración. Además, Rhotekin interacciona a través de su dominio PH con el segundo mensajero PIP₃, sus motivos ricos en prolina le sirven para unirse a dominios SH3 de y a través de su dominio RBD se une a la forma activa de la GTPasa Rho (Ito, Morishita, and Nagata 2018).

En el sistema nervioso central, la proteína Rhotekin controla el mantenimiento y la supervivencia de las neuronas y tiene un papel clave en la diferenciación de las células madre neuronales (NCS) (Iwai et al. 2012). Además se ha apuntado a que participa en la sinapsis y la polaridad celular (Ito, Morishita, and Nagata 2018). La desregulación de Rhotekin y de Rhotekin-2 otro miembro de la familia, ha sido ampliamente estudiada en varios tipos de cáncer: gástrico (Liu et al. 2004), colón (Pang et al. 2017), vejiga (Fan et al. 2005), pulmón (Zhang, Liang, and Li 2016) y/o hepatocarcinoma (Zhou et al. 2017), quedando por resolver si su desregulación podría estar implicada en enfermedades neurodegenerativas.

1.1.2.4. La glucógeno fosforilasa.

La glucógeno fosforilasa [1,4- α -glucan:ortofosfato α -glicosiltransferasa; EC 2.4.1.1.] (PYG) es un miembro de la familia de las glicosiltransferasas, constituida por tres isoformas: cerebro (PYGB), hígado (PYGL) y músculo (PYGM). Su función es catalizar la liberación de monómeros de glucosa-1-fosfato de la molécula de glucógeno. Por cada molécula de glucógeno, éste puede contener más de 120.000 moléculas de glucosa (Mathieu, Dupret, and Rodrigues-Lima 2019; DiNuzzo and Schousboe 2019). Estructuralmente, la PYG se trata de un homodímero de 97,4kDa que está asociado a un grupo piridoxal fosfato (PLP o vitamina B₆), el cuál se conjuga a residuos de arginina y lisina en su sitio activo (Oikonomakos et al. 1987). Éstos se utilizan para diferenciar las tres isoformas a nivel de secuencia (Takagi, Fukui, and Shimomura 1982; Johnson 1992).

Las isoformas de la PYG (PYGB, PYGL y PYGM) están codificadas por tres genes distintos, localizados en los cromosomas 14q22, 20p11 y 11q13 respectivamente (Migocka-Patrzałek and Elias 2021). La homología entre las tres isoformas es alta, sobre un 80% a nivel de proteína y presentan estructuras similares, pero se ha descrito que las isoformas M y B están más

cercanas evolutivamente entre ellas, siendo la isoforma L la más distante (Sato et al. 1976).

La expresión de las tres isoformas varía según el estadio de desarrollo, encontrándose de forma mayoritaria la PYGB en etapas tempranas del desarrollo embrionario, para a partir del estadio post-natal pasar a ser las formas mayoritarias la PYGL y la PYGM (Sato et al. 1976; Richter, Bohme, and Hofmann 1983). En el cerebro, ocurre algo similar, siendo únicamente la PYGB expresada en tejido fetal y posteriormente expresándose las tres isoformas en tejido adulto (Pfeiffer-Guglielmi et al. 2000).

El nombre de las isoformas de la PYG (PYGB, PYGL y PYGM) viene dado del tejido del cuál son predominantes, cerebro, hígado y músculo, respectivamente (DiNuzzo and Schousboe 2019), pero se ha descrito que todas ellas están presentes en la mayoría de tejidos (www.proteinatlas.com). De hecho, se ha encontrado ARNm de todas ellas (PYGB, PYGL y PYGM) tanto en cultivos primarios, como en cerebro embrionario de rata y en líneas celulares (Pfeiffer-Guglielmi et al. 2000; Uno et al. 1998; Cai et al. 2020). Además, Arrizabalaga y col identificaron a la PYGM en linaje hematopoyético, concretamente en linfocitos T (Arrizabalaga et al. 2012).

Desde un punto de vista funcional, las isoformas de la PYG se distinguen entre ellas. La PYGB y la PYGM generan glucosa-1-fosfato para posteriormente y por acción de la fosfoglucomutasa transformarlo en glucosa 6-fosfato y a partir de aquí, la maquinaria metabólica se dirige hacia la producción de ATP (Chasiotis 1983). Por otra parte, la PYGL genera glucosa-1-fosfato con el fin de transformarla en glucosa y mantener los niveles fisiológicos de glucosa en sangre (Hue, Bontemps, and Hers 1975).

1.1.2.4.1 Activación de la glucógeno fosforilasa.

La PYG se puede activar por dos mecanismos: fosforilación reversible y por modificaciones alostéricas, (DiNuzzo and Schousboe 2019). Ambos mecanismos regulan la transición entre los estados T (inactivo) y R (activo) de la enzima.

- **Fosforilación reversible:**

La fosforilación reversible se produce en la serina 14 de la PYG. Se da en respuesta a hormonas como el glucagón, la insulina o la adrenalina, y tiene lugar principalmente en la isoforma L (Sutherland and Cori 1951; DiNuzzo and Schousboe 2019).

En este caso, el inicio de la ruta de señalización que conduce a la glucogenolisis se produce tras la interacción entre hormonas y receptores con siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCR) (Barford 1991). Esta unión provoca la disociación de la subunidad $G\alpha$, la cuál interacciona con la adenilato ciclasa (AC), de las subunidades $\beta\gamma$ (Rozengurt 2007). La AC promueve la generación de cAMP y, su acumulación media la activación de la proteína quinasa A (PKA), la cuál provoca la activación de la fosforilasa quinasa (PK). Finalmente, la PK fosforila la serina 14 (S14) de la PYG (Barford 1991; Barford and Johnson 1992; Buchbinder et al. 1997; Andreeva, Rice, and Carlson 2002; Waraich et al. 2008; Fischer 2013) (Figura 8).

Esta ruta de señalización se conoce como la ruta clásica o canónica de activación de la PYG. Aunque no siempre se requiere un receptor con 7 dominios transmembrana asociado a proteínas G heterotriméricas para activar a la PYG, de hecho, recientemente, Llaveró y col han revelado que el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) activa la PYG de manera independiente a proteínas G heterotriméricas (Llaveró et al. 2019).

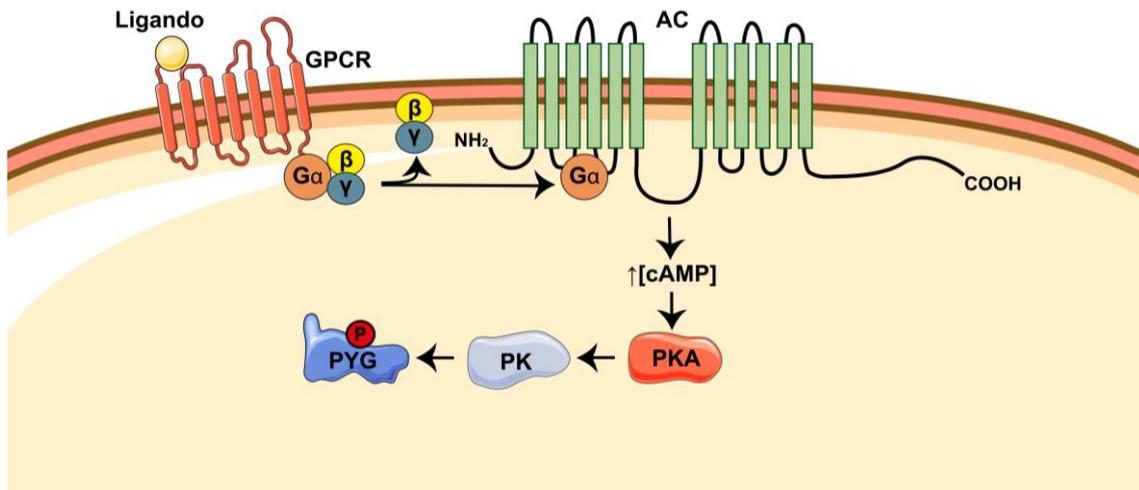


Figura 8. Ruta canónica de activación de la PYGM. Una señal en forma de ligando interactúa con un GPCR y promueve la disociación de sus subunidades. La subunidad $G\alpha$ activa la adenilato ciclasa (AC) quién sintetiza cAMP. El aumento de concentración de cAMP promueve la activación de PKA, quién activa a la proteína quinasa (PK) y PK fosforila a la glucógeno fosforilasa (PYG).

Finalmente, tras la fosforilación de la S14 de la PYG mediada por la PK, hace que la PYG pase del estado T, inactivo, al estado R, activo. La desfosforilación de la PYG, y su subsecuente inactivación, está catalizada por la proteína fosfatasa 1 (PP1) (DiNuzzo and Schousboe 2019) (Figura 9).

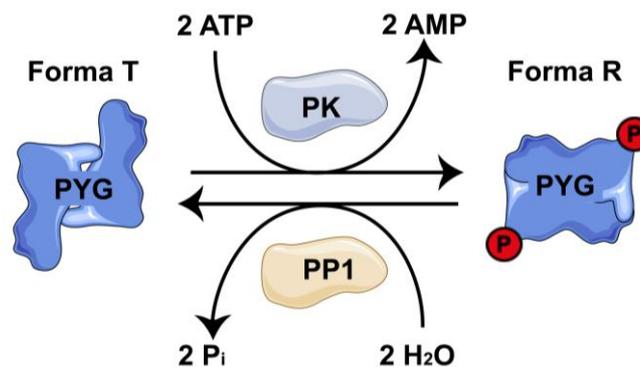


Figura 9. Ciclo de fosforilación y desfosforilación de la glucógeno fosforilasa. La glucógeno fosforilasa (PYG) en reposo (forma T) es fosforilada por la proteína quinasa (PK) en serina 14, pasando a un estado activo (forma R). La proteína fosfatasa 1 (PP1) desfosforila a la PYG devolviéndola a su estado inicial.

- **Activación alostérica.**

La actividad de la PYG puede ser regulada por cambios conformacionales en su estructura debido a la unión de ésta a moléculas reguladoras. Clásicamente, se ha descrito como moléculas reguladoras el AMP, el ATP y la glucosa. El AMP es una molécula activadora que se une a la PYG en estado T, desplazándola hacia el estado R, mientras que el ATP y la glucosa son efectores alostéricos negativos que se unen a la PYG en el estado R, desplazándola hacia el estado T (Lukacs et al. 2006) (Figura 10).

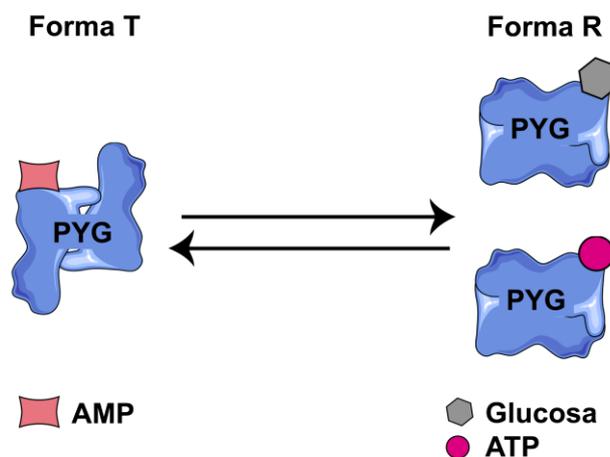


Figura 10. Regulación alostérica de la glucógeno fosforilasa. La glucógeno fosforilasa (PYG) puede pasar de su estado inactivo (forma T) a su estado activo (forma R) por la interacción directa con AMP. La interacción entre glucosa y PYG o ATP y PYG promueve el paso de la forma R hacia la forma T.

Además de estas moléculas, Arrizabalaga y col describieron que existe otra molécula capaz de activar a la PYG: la GTPasa Rac1. Concretamente, esta GTPasa interacciona con el dominio de la PYGM que comprende los aminoácidos 181 y 317, activándola de forma alostérica. Esta señalización resultó ser crítica para la proliferación y la migración linfocitaria dependiente de IL-2 (Arrizabalaga et al. 2012; Llaveró et al. 2015; Llaveró et al. 2016).

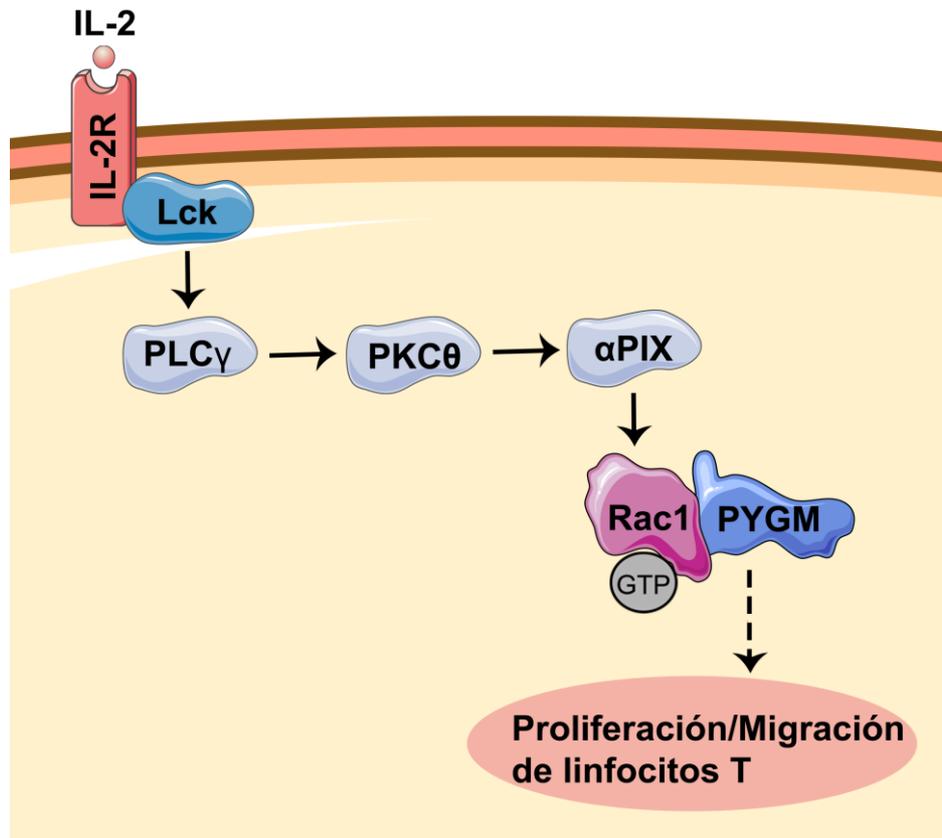


Figura 11. El eje Rac1/PYGM controla la proliferación y la migración de los linfocitos T. La interleucina-2 (IL-2) interactúa con su receptor (IL-2R), promoviendo la activación de la ruta de señalización compuesta por las moléculas siguientes: proteína quinasa tirosina linfoespecífica (Lck), fosfolipasa (PLC γ), PKC θ y α PIX. La proteína α PIX es un GEF de Rac1 y promueve su activación. Rac1 activa a PYGM por su interacción y la PYGM controla la proliferación y la migración de los linfocitos T (Llavero et al. 2016).

2. Glucógeno.

El glucógeno es un polímero globular compuesto de glucosa que fue descubierto en 1856 por Claude Bernard (Young 1957). Es el segundo almacén de energía por detrás del tejido graso y se encuentra mayoritariamente en el hígado, en el músculo y en el cerebro. En músculo, el glucógeno se utiliza como fuente de energía para la contracción muscular y en el hígado es utilizado para regular la glicemia (DiNuzzo and Schousboe 2019).

En el cerebro, el glucógeno se localiza mayoritariamente en la materia gris, en áreas ricas en sinapsis, particularmente, en el hipocampo y en el *locus coeruleus*, dos regiones implicadas en el aprendizaje y en la memoria (DiNuzzo and Schousboe 2019). Desde siempre se ha considerado al glucógeno como

un almacén de emergencia de glucosa y energía, pero existen evidencias sustantivas de que el glucógeno juega un papel importante en la formación de la memoria y en el aprendizaje (Duran, Gruart, Varea, et al. 2019; DiNuzzo and Schousboe 2019).

Existen tres estructuras de glucógeno: gránulos α y β , y partículas γ . Los gránulos α están formados mayormente en el hígado y están compuesto de varios gránulos β y los gránulos β son gránulos de glucógeno individual y están formados por varias partículas γ . Estructuralmente, un gránulo β está compuesto por una proteína central, la glucogenina, que está unida covalentemente al polímero de glucosa, el cual está formado por cadenas de aproximadamente 13 residuos de glucosa unidos a través de uniones α -1,4-glicosídicas e interconectadas por uniones α -1,6-glicosídicas en los puntos de ramificación (Prats, Graham, and Shearer 2018).

2.1. Metabolismo del glucógeno.

El metabolismo del glucógeno está regulado por la acción de múltiples enzimas. Por una parte, el glucógeno es mayormente sintetizado a partir de la glucosa que viene de la sangre. Para ello, la enzima glucogenina se autoglicosila en tirosina, utilizando como substrato UDP-glucosa, y genera una pequeña cadena de glucosa compuesta de 7-8 monómeros. Seguidamente, la glucógeno sintasa utiliza esta cadena a modo de cebador para continuar la síntesis del glucógeno utilizando también UDP-glucosa como substrato (DiNuzzo and Schousboe 2019).

La degradación del glucógeno se inicia por la acción de la PYG, cuyo producto de reacción es la glucosa-1-fosfato. Cuando llega a un punto de ramificación del glucógeno, es decir a una unión α -1,6-glicosídica, entra en juego la enzima desramificadora de glucógeno (GDE), la cual elimina dicho enlace y libera glucosa. En el caso de producirse la degradación del glucógeno o glucogenolisis en el lisosoma, la α -glicosidasa se encarga de degradar el glucógeno.

La glucosa-1-fosfato y la glucosa son convertidas en glucosa-6-fosfato por las enzimas fosfoglucomutasa y hexoquinasa, respectivamente. Finalmente, la glucosa-6-fosfato es sustrato de tres rutas metabólicas distintas: la glicolisis, la

de las pentosas fosfato y la biosintética de las hexosaminas (Prats, Graham, and Shearer 2018; Duran, Gruart, Lopez-Ramos, et al. 2019; DiNuzzo and Schousboe 2019). En tejidos gluconeogénicos, como son el hígado, el riñón o el intestino, la glucosa-6-fosfato puede ser desfosforilada a glucosa y secretada hacia el espacio intersticial (Prats, Graham, and Shearer 2018).

2.2. Glicolisis y generación de lactato.

El término glicolisis está formado por las palabras griegas *glykys* (dulce o azúcar) y *lysis* (dividir) y es la ruta metabólica en la que la molécula de glucosa se procesa en reacciones enzimáticas seriadas hasta la obtención de dos moléculas de piruvato. Es la principal ruta catabólica de la glucosa y en algunos tipos celulares y tejidos representa la única fuente de energía metabólica (Nelson and Cox 2017). En la Figura 12 se representa esta ruta metabólica la cual se detalla a continuación.

La primera fase de la glicolisis es una fase de pago debido que la célula necesita utilizar moléculas de ATP para iniciar el proceso. Éste empieza a partir de la glucosa-6-fosfato la cuál se convierte en fructosa-6-fosfato por la isomerasa fosfohexosa. La fructosa-6-fosfato se transforma en fructosa 1,6-bifosfato por la fosfofructoquinasa-1 y después se obtiene gliceraldehido-3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato mediante la enzima aldolasa. La dihidroxiacetona fosfato se isomeriza a una segunda molécula de gliceraldehido-3-fosfato, y es justo en esta reacción que se considera el fin de la primera fase de la glicolisis.

La segunda fase de la glicolisis es una fase de generación de ATP y NADH. Empieza a partir de la oxidación y la fosforilación de gliceraldehido-3-fosfato, convirtiéndose en 1,3-bifosfoglicerato, reacción catalizada por la enzima gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenasa. La 1,3-bifosfoglicerato se transforma en 3-fosfoglicerato por la quinasa fosfoglicerato. Posteriormente se desfosforila la molécula de 3-fosfoglicerato hacia 2-fosfoglicerato por la fosfoglicerato mutasa y la 2-fosfoglicerato se convierte en fosfoenolpiruvato por la enolasa. Finalmente, la fosfoenolpiruvato pasa a piruvato por acción de la piruvato quinasa (Nelson and Cox 2017).

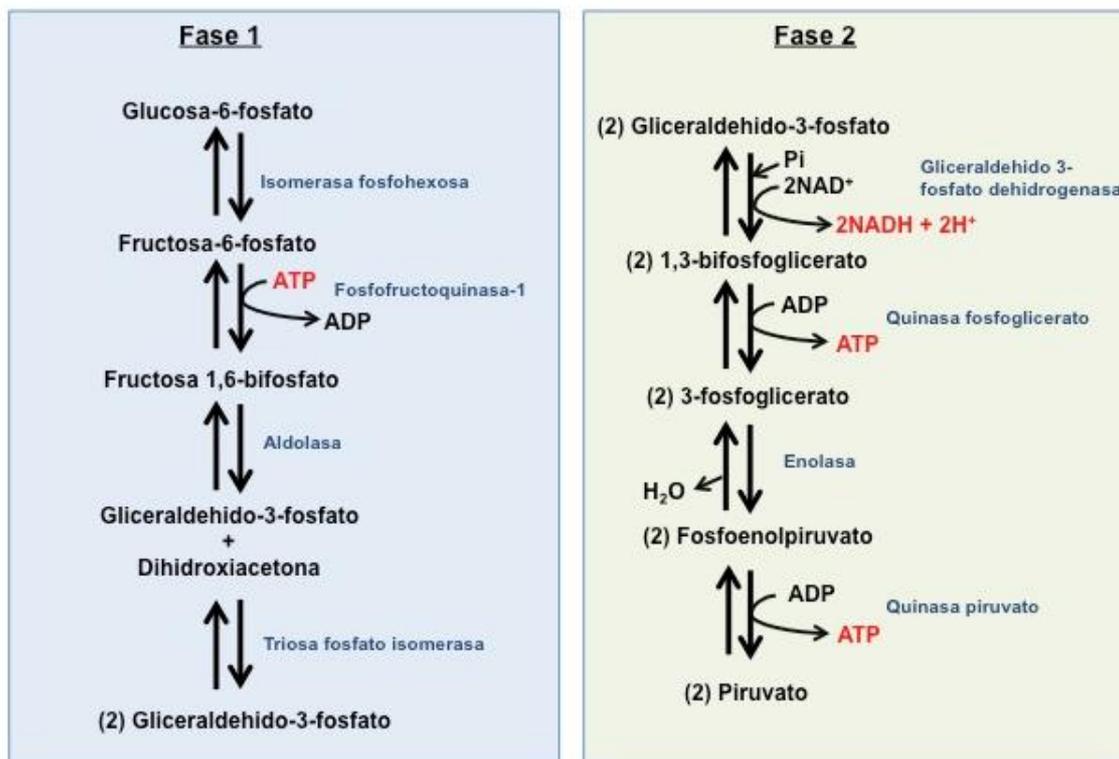


Figura 12. Fases de la glicolisis. La fase 1 de la glicolisis parte de la glucosa-6-fosfato y consiste en una serie de reacciones en las que se obtiene 2 moléculas de gliceraldehido-3-fosfato. Es una fase de pago ya que se necesita una molécula de ATP. La fase 2 de la glicolisis parte de las 2 moléculas de gliceraldehido generadas en la fase 1 y consiste en una serie de reacciones en las que se obtiene 2 moléculas de piruvato. Es una fase de ganancia ya que se generan 2 moléculas de NADH y 2 moléculas de ATP.

Las dos moléculas de piruvato que se obtienen en la glicolisis pueden ser oxidadas a acetato (acetil-CoA) y entrar al ciclo de Krebs y a la fosforilación oxidativa, generando CO_2 y H_2O , o bien pueden ser procesadas de forma anaeróbica (Nelson and Cox 2017).

La generación de lactato representa una de las formas de respiración anaeróbica, y por lo tanto, una forma de obtención de energía a partir del piruvato por parte de las células. Es mayoritaria en algunos tejidos y tipos celulares como por ejemplo el músculo esquelético, los eritrocitos y los astrocitos. Consiste en la reducción del piruvato a lactato catalizada por la lactato dehidrogenasa (LDH), gastando las moléculas de NADH previamente generadas en la fase 2 de la glicolisis (Figura 13) (Nelson and Cox 2017).

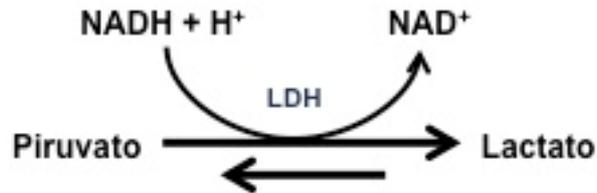


Figura 13. Generación de lactato. La lactato deshidrogenasa (LDH) cataliza la generación de lactato a partir del piruvato obtenido de la glicolisis.

La alteración de la glicolisis está relacionada con enfermedades como el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas. En el caso del cáncer, se ha descrito que las células y los tejidos tumorales tienen una mayor tasa de absorción de glucosa y de generación de lactato incluso en presencia de oxígeno. Este fenómeno es conocido como el efecto Warburg (Liberti and Locasale 2016).

Por otra parte, un efecto parecido se ha observado en distintas enfermedades neurodegenerativas (Enfermedad de Alzheimer, la Enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica o la Enfermedad de Huntington) o en lesión cerebral: en las neuronas afectadas se ha visto un cambio aparente hacia la glicolisis (Tang 2020).

En la Enfermedad de Alzheimer (EA) se han descrito defectos relacionados con el metabolismo de la glucosa: se ha detectado bajos niveles de transportadores de glucosa, GLUT1 y GLUT3, y de intermediarios del metabolismo de la glucosa en el cerebro de pacientes de EA (Simpson et al. 1994; Bergau et al. 2019). De hecho, una de las características de la aparición más temprana en la EA es el hipometabolismo de la glucosa y se ha relacionado con que en un cerebro envejecido el descenso del metabolismo de la glucosa contribuye al deterioro cognitivo (Boveris and Navarro 2008; Yan et al. 2020).

2.3. Ruta de las pentosas fosfato.

Otro destino que tiene la glucosa-6-fosfato derivada de la glucosa o de la glucosa-1-fosfato generada a partir del glucógeno, es la ruta de las pentosas fosfato. En esta ruta oxidativa, el NADP⁺ es convertido en NADPH, y se ha

estudiado en células con alta tasa de división como por ejemplo, células epiteliales, de la mucosa intestinal o bien en células tumorales.

La primera reacción de la ruta de las pentosas fosfato es la oxidación de la glucosa-6-fosfato por la glucosa 6-dehidrogenasa (G6PD) para formar la 6-fosfoglucono- δ -lactona. Esta molécula se hidroliza a 6-fosfogluconato por una lactonasa específica, y después, la 6-fosfogluconato se oxida y descarboxila por la 6-fosfogluconato deshidrogenasa para generar ribulosa-6-fosfato. A continuación, la fosfopentosa isomerasa convierte a la ribulosa-6-fosfato en ribosa-5-fosfato. Es a partir de esta molécula que se realiza la síntesis de nucleótidos, coenzimas, ADN y ARN. Por último, la ribosa-5-fosfato puede ser reciclada a glucosa-6-fosfato en una fase no oxidativa (Figura 14) (Nelson and Cox 2017).

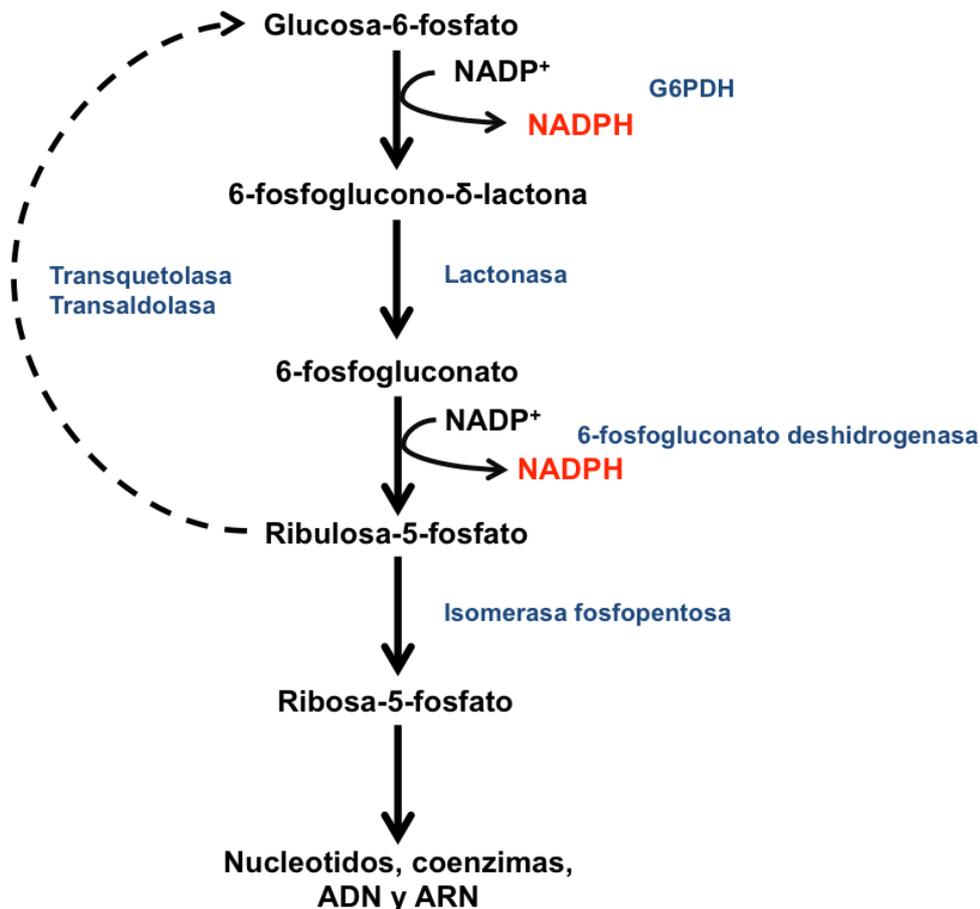


Figura 14. Ruta de las pentosas fosfato. La glucosa-6-fosfato es procesada en reacciones secuenciales hasta ribosa-5-fosfato, sustrato para la síntesis de nucleótidos, coenzimas, ADN y ARN.

El NADPH producido es destinado a la síntesis de ácidos grasos, esteroides, nucleótidos y aminoácidos no esenciales. La glutatión reductasa lo utiliza en la conversión del glutatión oxidado a glutatión reducido, reacción importante para la defensa antioxidante de las células. Y, además, es el sustrato de las NADPH oxidasas (NOXs), las cuales producen especies reactivas de oxígeno (ROS). La alteración de la ruta de las pentosas fosfato está relacionada con diversas enfermedades como por ejemplo la diabetes mellitus tipo 2 y el cáncer (Ge et al. 2020).

2.4. Ruta biosintética de las hexosaminas.

La ruta biosintética de las hexosaminas (HBP de las siglas *Hexosamine biosynthetic pathway*) es en la que la glucosa-6-fosfato se procesa por la acción seriada de distintas enzimas a hexosamina-uridina-difosfato N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc), sustrato necesario para O-GlcNAcilar proteínas. Dependiendo de la tipología celular, aproximadamente entre el 2 y el 5% de la glucosa intracelular es empleada en esta ruta (Butkinaree, Park, and Hart 2010).

El UDP-GlcNAc se obtiene a partir de la glucosa-6-fosfato, la cuál se isomeriza por la glutamina-6-fosfato transaminasa (GFAT) para convertirse en glucosamina-6-fosfato (GlcN-6-P), reacción considerada como el paso limitante de la HBP. Posteriormente, la GlcN-6-P se convierte a N-acetilglucosamina-6-fosfato (GlcNAc-6-P) por la enzima glucosamina-6-fosfato-acetil transferasa (GNAT), y la GlcNAc-6-P a su vez a N-acetilglucosamina-1-fosfato (GlcNAc-1-P) por la N-acetilglucosamina fosfoglucomutasa (AGM). Por último, la GlcNAc-1P se convierte en UDP-GlcNAc por la enzima N-acetilglucosamina-1-fosfato pirofosforilasa (AGX) (Figura 15) (Yuzwa and Vocadlo 2014).

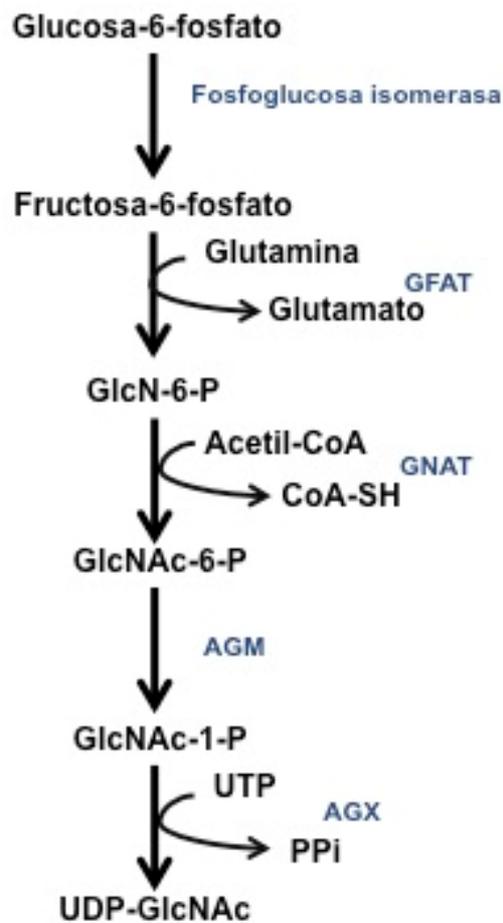


Figura 15. Ruta biosintética de las hexosaminas. La glucosa-6-fosfato es convertida en UDP-GlcNAc mediante reacciones enzimáticas consecutivas.

Debido a que el UDP-GlcNAc es un producto del procesamiento de la glucosa, la HBP ha sido propuesta como un sensor de nutrientes. De hecho, los niveles de UDP-GlcNAc varían con la disponibilidad de glucosa y puede incrementarse cuando las células son provistas de nutrientes o bien son sometidas a un estrés celular (Yuzwa and Vocadlo 2014; Wang et al. 2014).

2.4.1. La O-GlcNAcilación de proteínas.

La O-GlcNAcilación de proteínas es una forma no canónica de glicosilación de proteínas que ocurre en el núcleo y en el citoplasma de eucariotas multicelulares. Esta PTM se produce por la actividad de la enzima uridina difosfato-N-acetil-D-glucosamina:polipeptidil transferasa (OGT), la cual añade el grupo O-GlcNAc a los residuos de serina y treonina de sus proteínas diana a partir del substrato UDP-GlcNAc. Por otra parte, el grupo O-GlcNAc puede ser

eliminado de las proteínas por la acción de la enzima O-GlcNacasa (OGA) (Zachara and Hart 2004; Hart, Housley, and Slawson 2007; Yuzwa and Vocadlo 2014; Bond and Hanover 2015).

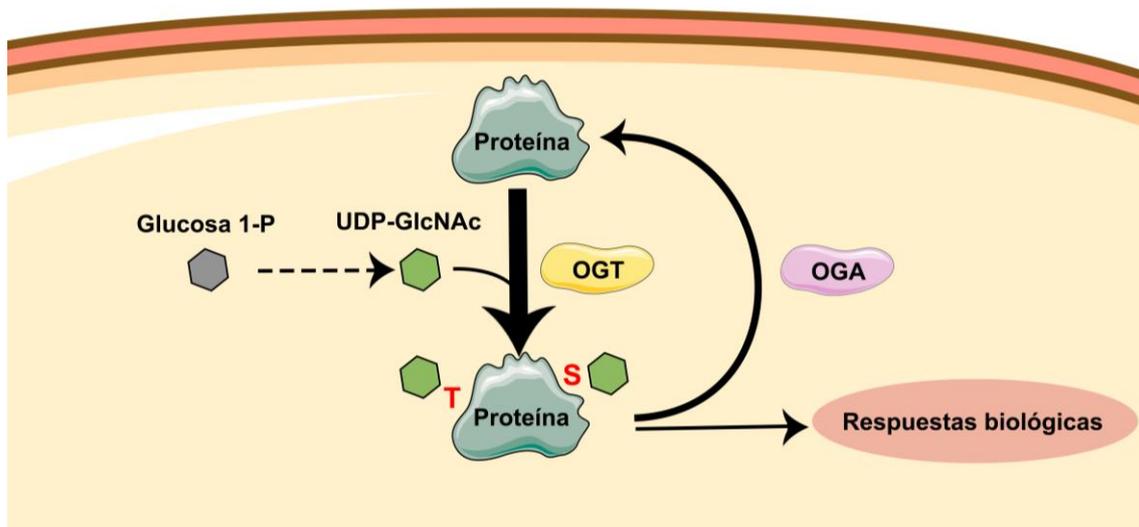


Figura 16. Reacción de O-GlcNAcilación y de-O-GlcNAcilación de proteínas. La glucosa 1-fosfato (glucosa 1-P) es procesada en HBP, en la cuál se obtiene UDP-GlcNAc. La OGT lo utiliza como sustrato para catalizar la reacción de O-GlcNAcilación en residuos serina y treonina de las proteínas diana. Como resultado, las proteínas promueven una respuesta biológica determinada. Por otra parte, la OGA retira el grupo O-GlcNAc de sus proteínas diana, siendo la O-GlcNAcilación de proteínas un proceso dinámico.

A día de hoy se conoce una gran variedad de proteínas O-GlcNAcadas. Entre ellas, pueden encontrarse factores de transcripción, proteínas de unión a RNA, quinasas y proteínas adaptadoras, proteínas relacionadas con la actina o con microtúbulos, chaperonas, enzimas metabólicas y otras proteínas. Al haber tanta variedad de proteínas diana de O-GlcNAcilación, el abanico de funciones controladas por esta PTM es amplísimo. Por ejemplo, este tipo de PTMs de proteínas regulan la transcripción génica debido a que la ARN polimerasa II y factores específicos de la transcripción son dianas de la OGT. Dependiendo del promotor involucrado y de las proteínas que se asocian a él, la O-GlcNAcilación promueve o inhibe la transcripción (Zachara and Hart 2004; Hart, Housley, and Slawson 2007; Bond and Hanover 2015).

Es importante recalcar la importancia de que los residuos que son susceptibles de O-GlcNAcilarse son las serinas y las treoninas, coincidiendo con que los

mismos son susceptibles de ser fosforilados. De hecho, un desequilibrio en cualquiera de las dos PTMs desencadena una la alteración de las otras (Bond y Hanover 2015). Un ejemplo de ello es la proteína tau, la cual se encuentra hiperfosforilada en la Enfermedad de Alzheimer (EA) (Ksiezak-Reding, Liu, and Yen 1992; Gong et al. 2006). En las neuronas, la proteína tau cuenta con un equilibrio de O-GlcNAcilaciones y de fosforilaciones, siendo las primeras quiénes regularían su función o bien su nivel de fosforilación. En la EA, la balanza está inclinada hacia las fosforilaciones y como resultado, la proteína tau no puede asociarse a microtúbulos y forma agregados intracelulares, llamados ovillos neurofibrilares, llevando a defectos en el transporte axonal de moléculas (Yuzwa and Vocadlo 2014).

La proteína tau no es la única proteína O-GlcNAcilada que tiene un papel importante en la fisiopatología de la EA. Se conoce que la proteína precursora amiloide (APP) se encuentra O-GlcNAcilada. Es a partir del procesamiento de la APP que se obtiene el péptido $A\beta_{1-42}$, que de acuerdo con la hipótesis de la cascada amiloide, es uno de los promotores de la fisiopatología de la EA. Se ha sugerido que la O-GlcNAcilación de la APP tiene un papel esencial en la ruta amiloidogénica y por lo tanto, en la síntesis del péptido $A\beta_{1-42}$ (Yuzwa and Vocadlo 2014), siendo la treonina 576 el residuo implicado en el tráfico de APP y su posterior procesamiento por dicha ruta (Chun, Kwon, and Chung 2017).

La O-GlcNAcilación de proteínas en la EA ha sido estudiada ampliamente durante la última década. Se ha observado un aumento del patrón de O-GlcNAcilaciones de proteínas en el cerebro de pacientes con la EA (Forster et al. 2014), así como que el péptido $A\beta_{1-42}$ es capaz de promover la O-GlcNAcilación de c-fos, promoviendo la muerte neuronal (Choi, Kim, Song, et al. 2019). Sin embargo, también se ha determinado que altos niveles O-GlcNAcilaciones tienen un papel neuroprotector al inhibir la necrosis programada en la EA (Park et al. 2021).

Tanto la proteína tau como el APP son dos ejemplos antagónicos de desregulación de la O-GlcNAcilación de proteínas: la proteína tau se encuentra hiperfosforilada mientras que las O-GlcNAcilaciones de APP juegan un papel clave en la generación de $A\beta$. Aun así, todos los estudios coinciden con que en la EA hay una desregulación de las O-GlcNAcilaciones de proteínas. Como se

indica en el apartado 2.1, el metabolismo de la glucosa se encuentra alterado en la EA. Esto podría estar ligado a la alteración anteriormente descrita en el patrón de O-GlcNAcilaciones de proteínas.

Las neuronas necesitan del apoyo metabólico de los astrocitos para obtener energía. Para ello, los astrocitos captan glucosa y otros nutrientes del torrente sanguíneo y almacenan grandes cantidades de glucógeno. Cuando reciben un determinado estímulo, los astrocitos degradan el glucógeno a glucosa-1-fosfato a partir de la cuál se genera lactato. El lactato es transportado a las neuronas y éstas lo utilizan como sustrato para generar energía (Magistretti and Pellerin 1999; Dienel and Hertz 2001; Broer and Brookes 2001; Pellerin and Magistretti 2004; Belanger, Allaman, and Magistretti 2011; Bouzier-Sore and Pellerin 2013).

3. Enfermedad de Alzheimer.

La demencia es un término amplio que engloba un grupo particular de síntomas: alteraciones en la memoria, el lenguaje, la resolución de problemas y en otras habilidades que afectan al individuo en el desarrollo de su vida cotidiana. Varias enfermedades, como por ejemplo, la enfermedad cerebrovascular o la Enfermedad de Parkinson, se identifican con la demencia, pero la forma más común de demencia y la enfermedad neurodegenerativa más prevalente, es la Enfermedad de Alzheimer (EA). Esta enfermedad se caracteriza por un profundo deterioro cognitivo consecuencia de una progresiva e irreversible pérdida de neuronas (Association 2021).

La EA fue descrita por primera vez por el psiquiatra Aloysius *Alois* Alzheimer (1864-1915), quién observó y describió los síntomas de una paciente de 50 años, Auguste D., los cuáles incluían alucinaciones, pérdida de memoria y problemas en el lenguaje. Los análisis *post-mortem* del cerebro de la paciente revelaron la presencia de placas seniles y ovillos neurofibrilares. Estas observaciones se publicaron en 1907 bajo el título de “Una enfermedad grave característica de la corteza cerebral” (Alzheimer 1907).

La EA es una forma de demencia que se asocia a la presencia de ovillos neurofibrilares formados por la proteína tau fosforilada y por la presencia de placas amiloides constituidas mayoritariamente por el péptido neurotóxico β_{1-42}

amiloide (Lane, Hardy, and Schott 2018; Soria López, González, and Léger 2019). La acumulación y agregación de estas moléculas en los espacios intra y extracelulares las convierten en elementos clave de la degeneración de las neuronas hipocampales y corticales, cuya consecuencia es la pérdida de memoria, desorientación espaciotemporal y cambios en el comportamiento (Soria López, González, and Léger 2019).

3.1. Tipos de Enfermedad de Alzheimer.

La EA ha sido clasificada en base a la forma de inicio: temprano o familiar y tardío o esporádico.

3.1.1. Enfermedad de Alzheimer de inicio temprano o familiar.

La Enfermedad de Alzheimer de inicio temprano o familiar es una forma rara de la enfermedad la cuál representa entre el 2-3% de todos los casos. Es una forma autosómica dominante dónde los síntomas se inician generalmente en la tercera década de vida.

Los pacientes con EA de inicio temprano o familiar presentan, al menos, mutaciones en tres genes: proteína precursora amiloide (APP) presente en el cromosoma 21 (Goate et al. 1991), presenilina-1 (PSN1) presente en el cromosoma 14 y presenilina-2 (PSN2) presente en el cromosoma 1 (Cruts, Hendriks, and Van Broeckhoven 1996).

Una de las mutaciones más estudiadas de la EA de inicio temprano o familiar es la mutación Sueca. Ésta está producida por un cambio de dos aminoácidos (K670N/M671L) en la secuencia del APP, lo que conlleva a una modificación del lugar de escisión durante su procesamiento y, como resultado, se obtiene un mayor ratio de $A\beta_{1-40}:A\beta_{1-42}$ (LeVine III and Walker 2006). Aparte de esta doble mutación, se han descrito otras 52 mutaciones adicionales en la APP asociadas a la enfermedad (Cacace, Sleegers, and Van Broeckhoven 2016).

Por último, PSN1 es la proteína que se encuentra más frecuentemente mutada, con hasta 215 mutaciones, mientras que en PSN2, se han identificado 31 mutaciones (Cacace, Sleegers, and Van Broeckhoven 2016).

3.1.2. Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío o esporádico.

La Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío o esporádico representa la variedad clínica más común de la enfermedad (90-95% de casos) y los pacientes que la presentan inician los síntomas sobre los 65 años de edad o incluso más (Association 2021).

Su etiología es compleja comparada con la variedad de inicio temprano o familiar. Factores de riesgo que predisponen al desarrollo de la EA pueden ser el envejecimiento asociado a la edad o alteraciones en la apolipoproteína E (ApoE). La ApoE es el transportador principal de colesterol en el cerebro y se ha relacionado con el transporte y la liberación del péptido A β (Bu 2009). Esta proteína puede presentarse con tres variantes alélicas: ApoE ϵ 2, ApoE ϵ 3 y ApoE ϵ 4, siendo esta última la variante capaz de triplicar la probabilidad de desarrollar la EA en los pacientes heterocigotos (Huang 2006). Por otra parte, la variante ApoE ϵ 2 es un factor protector contra la EA de inicio tardío (Serrano-Pozo, Das, and Hyman 2021).

Las mutaciones asociadas a la predisposición a desarrollar la EA puede encontrarse en la base de datos: <http://www.alzgene.org>.

3.2. El péptido β amiloide: hipótesis de la cascada amiloide.

La hipótesis más aceptada de la fisiopatología de la EA es la hipótesis de la cascada amiloide, en la cuál se genera el péptido 1-42 β amiloide (A β), que se acumula en el espacio extracelular formando las placas amiloides (Hardy and Higgins 1992; Selkoe 2004; Querfurth and LaFerla 2010). Esta hipótesis apunta a que el desequilibrio entre la producción y la eliminación del péptido A β es el factor desencadenante de la EA, un concepto que cada vez está más arraigado entre la comunidad científica (Selkoe and Hardy 2016). Por lo tanto, según esta hipótesis, los ovillos neurofibrilares aparecen tras el daño iniciado por la acumulación de las placas amiloides.

El péptido A β es un monómero de 4,5 kDa que se obtiene a partir del procesamiento de la proteína precursora amiloide (APP). La APP es una glicoproteína transmembrana tipo 1 implicada en la regulación del crecimiento de neuritas durante el desarrollo (Herms et al. 2004), teniendo en cerebro adulto un papel ligado a la adhesión, neuroprotección, formación de sinapsis y

modulación de la transcripción génica (Raychaudhuri and Mukhopadhyay 2007). Además, está bien establecido que varias proteínas interaccionan con APP, regulando su procesamiento y la señalización intracelular, por lo que la APP podría tener un papel de receptor (Zheng and Koo 2011).

El procesamiento proteolítico secuencial del APP puede seguir: 1) la ruta no amiloidogénica o 2) la ruta amiloidogénica (Figura 17). En la ruta no amiloidogénica, el APP se escinde por la acción de la proteasa α -secretasa, generando un fragmento largo y soluble de su parte N-terminal, llamado sAPP α , y un fragmento pequeño de su parte C-terminal, llamado APP α -CTF, el cuál queda anclado a la membrana plasmática. El fragmento APP α -CTF se procesa por otra proteasa, la γ -secretasa, produciendo dos péptidos solubles: p3, cuya función biológica se desconoce, y AICD (dominio intracitoplasmático de la APP), el cuál es un regulador transcripcional de distintos genes como por ejemplo la glucógeno sintasa quinasa 3 β o la fosfoproteína nuclear, p53 (Kimberly et al. 2001; von Rotz et al. 2004).

En la ruta amiloidogénica, el APP se procesa por acción de la proteasa β -secretasa, generando sAPP β y APP β -CTF. La siguiente escisión es igualmente realizada por la γ -secretasa, generando AICD y el péptido 1-42 A β , siendo liberado al medio extracelular.

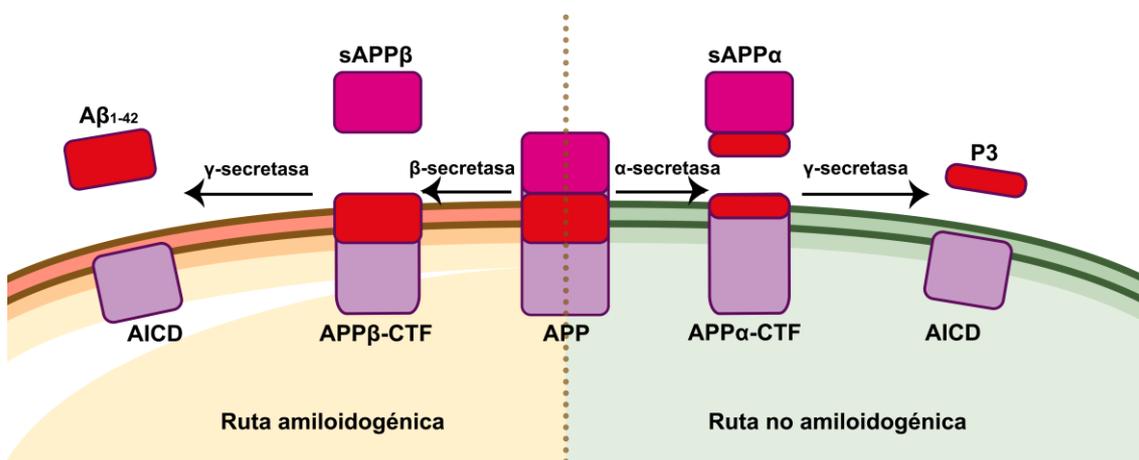


Figura 17. Procesamiento de la APP. La proteína precursora amiloide (APP) puede ser procesada por la γ -secretasa, dirigiéndose hacia la ruta no amiloidogénica, y por la β -secretasa dirigiéndose hacia la ruta amiloidogénica. En la ruta no amiloidogénica se genera AICD y P3 por el procesamiento de APP α -CTF realizado por la γ -secretasa y en la ruta amiloidogénica se genera A β amiloide (ejemplo: A β ₁₋₄₂) y AICD por el procesamiento de APP β -CTF realizado por la γ -secretasa.

El péptido A β puede tener distintos tamaños dependiendo de la escisión del fragmento APP β -CTF, encontrándose especies entre 37 y 49 aminoácidos (Weidemann et al. 2002). Tradicionalmente, se ha descrito como un péptido sin función, pero, recientemente, se ha sugerido un papel anti-microbiano en el cerebro, actuando en primera línea de defensa contra patógenos y como impermeabilizador de la barrera hematoencefálica en condiciones de lesión traumática o isquémica (Frost and Li 2017; Brothers, Gosztyla, and Robinson 2018). Existen incluso, evidencias de que el péptido A β soluble es necesario para la plasticidad sináptica y la memoria (Puzzo and Arancio 2013; Morley and Farr 2014).

En la EA, se cree que existe una saturación del péptido A β , la cual conduce a una auto-agregación del A β formando oligómeros, posteriormente fibrillas y finalmente, placas amiloides. Las especies de mayor tamaño (A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂), especialmente A β ₁₋₄₂, son las que suelen auto-agregarse y formar fibrillas (Soria López, González, and Léger 2019). Experimentos llevados a cabo tanto *in vitro* como *in vivo* han mostrado que la agregación de los monómeros de A β en especies de alto peso molecular (dímeros, trímeros, tetrámeros) los convierten en oligómeros tóxicos (Klein 2002; Glabe 2005). En este sentido, los péptidos A β han sido aislados de modelos animales de la EA (Oddo, Caccamo, Shepherd, et al. 2003; Tomiyama et al. 2010), de fluido cerebroespinal y de cerebros de pacientes con la EA (Bao et al. 2012), en dónde la presencia de éste péptido correlaciona con la progresión de la enfermedad (Santos et al. 2012). Entre los efectos que produce este péptido se encuentran: muerte neuronal (Lambert et al. 1998; Alberdi et al. 2010), inhibición de la potenciación a largo plazo (LTP) (Lambert et al. 1998; Wang et al. 2004), desregulación del flujo de Ca²⁺ y disrupción de la membrana celular (Demuro et al. 2005; Alberdi et al. 2010).

3.3. Implicación de la glía en la Enfermedad de Alzheimer.

A pesar de que la manifestación de una enfermedad neurodegenerativa es consecuencia de la degeneración de las neuronas, la desregulación de la biología de las células de la glía tiene un impacto en el desarrollo y en la progresión de este tipo de enfermedades, siendo un ejemplo la EA (Heneka et al. 2015; Jakel and Dimou 2017; Fakhoury 2018; Kim et al. 2020).

Las células de la glía más estudiadas por su implicación en la neuroinflamación característica de la EA y de otras enfermedades neurodegenerativas son la microglía y los astrocitos. Brevemente, la microglía son las células fagocíticas del sistema nervioso y los astrocitos son células que mantienen la homeostasis de determinadas moléculas, suplen de nutrientes a las neuronas, participan en la sinapsis tripartita y contribuyen al mantenimiento de la barrera hematoencefálica (Jakel and Dimou 2017).

En estadios tempranos de la EA, la glía sufre modificaciones con el fin de proteger a las neuronas de los estímulos citotóxicos. A pesar de su inicial efecto beneficioso, a medida que transcurre la enfermedad, el permanente estado activo de la microglía y de los astrocitos daña a las neuronas debido a las continuas reacciones inflamatorias que se producen. Concretamente, la activación de la microglía resulta en la fagocitosis de las distintas formas de A β , mientras que los astrocitos producen factores neuroprotectores como el BDNF, el VEGF y el bFGF. Sin embargo, el permanente estado reactivo de estas células provoca que haya un estado de neuroinflamación promovida por las citoquinas y otros factores liberados tanto por la microglía como por los astrocitos. Este ambiente resulta perjudicial para las neuronas y, por lo tanto, favorece la neurodegeneración. Además, el estado reactivo de los astrocitos o astrogliosis implica una pérdida de funcionalidad estas células perjudicando la conectividad sináptica y contribuyendo a déficits cognitivos (Heneka et al. 2015; Kim et al. 2020; Fakhoury 2018).

Para avanzar en la comprensión de la EA, es fundamental entender las rutas de señalización en las que la función biológica de la glía se ve alterada, dando a lugar a un estado permanente de reactividad.

4. Astrocitos.

Los astrocitos son células gliales que ejercen una multitud de funciones esenciales en el sistema nervioso central (SNC) como por ejemplo proporcionar energía en forma de glucosa y lactato a las neuronas o la de mantener la homeostasis de neurotransmisores (Sofroniew and Vinters 2010). Estas células fueron identificadas en 1895, y se les denominó astrogliosis debido a su forma estrellada (Lenhossék 1895) y “glía” debido a que no son células neuronales y a que forman parte del “pegamento” del cerebro (Virchow 1858).

Los astrocitos se clasifican en dos categorías según su morfología y localización anatómica: protoplasmáticos y fibrosos. Los primeros se encuentran en la materia gris y poseen extensiones que dan lugar a varios procesos en forma de árbol, con una distribución uniforme globular. Por el contrario, los astrocitos fibrosos se encuentran en la materia blanca y su morfología recuerda a fibras. Los procesos de los astrocitos protoplasmáticos envuelven las sinapsis y los de los astrocitos fibrosos los nódulos de Ranvier. Ambos tipos celulares, contactan con los vasos sanguíneos y forman uniones “*gaps*” con los procesos distales de los astrocitos vecinos (Xu, Zeng, and Wong 2009; Sofroniew and Vinters 2010).

4.1. Función de los astrocitos.

El puente que establecen los astrocitos entre los vasos sanguíneos y las neuronas permite que el flujo sanguíneo se relacione con las neuronas, formando la unidad neurovascular. De esta forma, proporcionan nutrientes a las neuronas a través de sus procesos (Magistretti and Pellerin 1999; Dienel and Hertz 2001; Broer and Brookes 2001; Pellerin and Magistretti 2004), y además, en función de la actividad sináptica, modulan el flujo sanguíneo local del SNC (Sofroniew and Vinters 2010). Concretamente, los astrocitos transfieren la glucosa captada del torrente circulatorio a las neuronas y, además, tras la degradación de sus depósitos de glucógeno por la vía glicolítica, el lactato generado también se transfiere a las neuronas como fuente de energía para ellas. Tal es la importancia de estos almacenes que la mayoría del glucógeno del cerebro está confinado en los astrocitos (Oz et al. 2015). De hecho, el glucógeno astrocitario sustenta la actividad neuronal en periodos de hipoglicemia y de alta actividad, y es modulado por transmisores y metabolitos de la glucosa como, por ejemplo, el lactato (Sofroniew and Vinters 2010).

El contacto astrocito-neurona tiene otras funciones además de las energéticas, como son el mantenimiento de la homeostasis iónica, el control del pH y de los neurotransmisores, siendo el ciclo del glutamato-glutamina un ejemplo de ello (Sofroniew and Vinters 2010). Los astrocitos recaptan del espacio inter-sináptico el glutamato excedente y lo transforman en glutamina, siendo posteriormente transportada a la neurona. La neurona utiliza la glutamina como

sustrato para la síntesis de glutamato, y este glutamato, la neurona lo utiliza como transmisor en una nueva sinapsis (Kuffler 1996). Existen evidencias sólidas que otra función de los astrocitos es la de modular la actividad sináptica, dentro de lo que se conoce como sinápsis tripartita. Los astrocitos liberan moléculas como por ejemplo glutamato y ATP en respuesta a cambios en la actividad sináptica neuronal (Parpura et al. 1994; Kang et al. 1998; Fields and Stevens-Graham 2002), provocando un aumento de la excitabilidad de los astrocitos seguida de una alteración en la excitabilidad de las neuronas. Además, los astrocitos tienen el potencial de ejercer una influencia a largo plazo en la función sináptica a través de la liberación de factores de crecimiento y moléculas relacionadas (Sofroniew and Vinters 2010).

El contacto inter-astrocitario mediante uniones *gap* constituye el sincitio astrocitario (Xu, Zeng, and Wong 2009). Estas uniones permiten el paso de segundos mensajeros a través de ellas, por ejemplo el Ca^{2+} , siendo una propagación que ocurre tanto tras la estimulación del astrocito como de forma espontánea (Parri, Gould, and Crunelli 2001; Tashiro, Goldberg, and Yuste 2002). Se ha sugerido que la onda de Ca^{2+} se expande mediante la señalización de ATP (Nedergaard, Ransom, and Goldman 2003; Fiacco and McCarthy 2006). Finalmente, todas las uniones y la arquitectura en la que están dispuestos los astrocitos también les otorga una función estructural (Sofroniew and Vinters 2010).

4.2. Astrogliosis reactiva.

La astrogliosis reactiva se define como un espectro de cambios moleculares, celulares y funcionales que ocurre en respuesta a un estímulo perjudicial en el SNC. Es un estado que influye de forma potencial en todos los estados alterados del SNC, incluyendo la lesión traumática, la inflamación autoinmune, infección, formación de tumores, exposición a toxinas ambientales, alteraciones metabólicas periféricas y enfermedades neurodegenerativas. Los cambios que llevan a la astrogliosis reactiva varían según el estímulo que reciben los astrocitos. Estas células se regulan de forma específica por diferentes moléculas señalizadoras y tienen el potencial de alterar la actividad normal de los astrocitos llevando a una ganancia o a una pérdida de sus funciones (Sofroniew 2014, 2020).

4.2.1. Clasificación astrogliosis.

A pesar de la variedad de cambios que sufren los astrocitos reactivos, su principal característica es que presentan sobreexpresión de la proteína glial fibrilar acífica (GFAP) e hipertrofia celular. No obstante, estudios del transcriptoma de astrocitos han identificado varios genes e incluso, dos categorías de astrocitos: A1 y A2 (Liddelow and Barres 2017).

Los astrocitos A1 son aquellos que *up*-regulan genes relativos a la inflamación (ejemplo: genes de la cascada del complemento) que promueven las respuestas dañinas para el cerebro y los astrocitos A2 *up*-regulan factores neurotróficos que promueven la supervivencia y el crecimiento de las neuronas (Liddelow and Barres 2017). Se ha visto que los astrocitos del tipo A2 son promovidos por lesión isquémica mientras que los astrocitos del tipo A1 son promovidos por estímulos pro-inflamatorios (Zamanian et al. 2012).

Finalmente, dependiendo de la intensidad de la astrogliosis, esta puede clasificarse en tres categorías (Sofroniew 2014):

- **Astrogliosis moderada:** el astrocito sufre cambios en la expresión de genes, aumentando la expresión de GFAP, y manifiesta distintos grados de hipertrofia tanto del soma como de los procesos. Sin embargo, no prolifera ni pierde el dominio que ocupa.
- **Astrogliosis severa difusa:** el astrocito sufre cambios en la expresión génica y aumenta de forma considerable la expresión de GFAP y manifiesta una clara hipertrofia. Además, prolifera y se solapa con astrocitos vecinos.
- **Astrogliosis severa con formación de cicatriz glial:** la cicatriz glial se genera tras la proliferación de astrocitos dando lugar a nuevos astrocitos con formas alargadas, cuyos procesos se solapan y forman un borde compacto, llamado cicatriz glial, que aísla el tejido dañado del sano pero que persiste aunque el estímulo cese.

4.2.2. Astrogliosis y Enfermedad de Alzheimer.

Es importante distinguir los cambios en los astrocitos que ocurren en el envejecimiento de los que ocurren durante el desarrollo de una enfermedad neurodegenerativa como es la EA. Esto es debido a que se ha relacionado la

reactividad astrocitaria con la edad (Lynch et al. 2010). Algunos estudios llevados a cabo en modelos animales han determinado cambios de la expresión de GFAP (Cerbai et al. 2012; Diniz et al. 2010) y cambios en el volumen y la morfología de los astrocitos (Grosche et al. 2013; Rodríguez-Arellano et al. 2015). Aun así, se ha visto un efecto beneficioso: ratones y ratas expuestos a ejercicio o a un ambiente envejecido presentan un aumento de GFAP en la región hipocampal e hipertrofia en los astrocitos, todo ello coincidiendo con una mejora cognitiva (Sampedro-Piquero et al. 2014).

La relación entre astrocitos reactivos o astrogliosis y las placas amiloides es muy estrecha. Una de las características de las placas amiloides es la presencia de un clúster de astrocitos reactivos que rodean y penetran los depósitos de A β , con el objetivo de fragmentarlos y aislarlos del tejido cerebral (Perez-Nievas and Serrano-Pozo 2018). De hecho, en modelos animales de la EA se han identificado grupos de astrocitos reactivos previos a la deposición de las placas amiloideas (Oddo, Caccamo, Kitazawa, et al. 2003; Heneka et al. 2015), que producen factores pro-inflamatorios y *up*-regulan la expresión de la síntasa del óxido nítrico (iNOS) (Heneka et al. 2015). Finalmente, se ha demostrado que el número de astrocitos reactivos asociados a las placas amiloides aumenta a medida que la enfermedad avanza de forma independiente al tamaño de la placa y de la presencia de ApoE (Pike, Overman, and Cotman 1995; Vehmas et al. 2003).

En el córtex pre-frontal de pacientes con EA, se ha determinado que aproximadamente el 60% de la población total de astrocitos positivos para GFAP son del tipo A1, demostrando la presencia de astrocitos reactivos pro-inflamatorios en una región afectada por la neurodegeneración (Liddel and Barres 2017). Como se ha indicado en el apartado 3.3 de esta introducción, los astrocitos reactivos producen factores neuroprotectores, pero a medida que avanza la enfermedad, también generan factores pro-inflamatorios. Concretamente, los astrocitos producen citoquinas (TNF α , IL-1 β o IFN γ), quimoquinas (CCL4 o CXCL8), proteínas del sistema de complemento y óxido nítrico (Heneka et al. 2015). También producen especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuáles perjudican seriamente a las neuronas debido a que causan daños en el ADN, en la membrana de la mitocondria, incremento de la

producción del péptido A β (Moreira, Santos, and Oliveira 2007) y neurotoxicidad mediada por la glía en la EA (Angelova and Abramov 2014).

Todavía se desconoce si los astrocitos reactivos migran hacia las placas amiloides o sólo reorientan sus procesos. Esto es importante debido a que el solapamiento o no de los astrocitos a otros dominios estaría influyendo en su funcionalidad (Perez-Nievas and Serrano-Pozo 2018). Por ejemplo, se ha descrito que los astrocitos de ratón migran hacia las placas amiloides en respuesta al CXCL10 (Lai et al. 2013), pero otro estudio en ratones transgénicos APP^{swe}/PS1^{dE9} confirmó que los astrocitos no alteran su distribución espacial (Galea et al. 2015).

Lo mismo ocurre en el caso de la proliferación. Debido a que los estudios utilizan el marcaje de GFAP para medir la cantidad de astrocitos, muchas veces ocurre que los astrocitos en reposo están por debajo del nivel de detección y por lo tanto, se puede malinterpretar el resultado. Aun así, algunos estudios han encontrado un incremento de marcadores de división celular en los astrocitos de pacientes con EA (Nagy et al. 1997; Wharton et al. 2005). Por otro lado, otros estudios han llegado a la conclusión que sólo la microglía prolifera de forma significativa (Kamphuis et al. 2012; Luccarini et al. 2012; Marlatt et al. 2014).

4.2.3. Lípidos en la fisiología astrocitaria-neuronal.

El cerebro es un órgano rico en lípidos, compuestos principalmente por ácidos grasos de cadena larga poliinsaturados (LC-PUFA, de las siglas en inglés *long-chain polyunsaturated fatty acids*), siendo un ejemplo el ácido araquidónico. Los ácidos grasos (AG) son los bloques básicos para la generación de lípidos complejos y son eliminados por fosforilación oxidativa (Barber and Raben 2019; Kao et al. 2020).

Cuando existe escasez de nutrientes en el cerebro, los AG constituyen una fuente de energía adicional (Rambold, Cohen, and Lippincott-Schwartz 2015). Pero, las neuronas son incapaces de almacenar los AG en gotas lipídicas y si se acumulan en el citoplasma son tóxicos y perjudican la integridad de la membrana mitocondrial (Nguyen et al. 2017). Por ese motivo, necesitan asociarse a los astrocitos, los cuáles sí pueden almacenar los AG en gotas

lipídicas y oxidarlos con el fin de transportar los metabolitos resultantes a las neuronas (Rambold, Cohen, and Lippincott-Schwartz 2015).

En estado de hiperactividad, las neuronas acumulan AG, incluyendo lípidos peroxidados. Seguidamente, expulsan los AG en partículas lipídicas asociadas con la proteína ApoE, las cuales son endocitadas por los astrocitos vecinos. Éstos incorporan los AG y los oxidan, de tal forma que los metabolitos generados se transportan a las neuronas (Ioannou et al 2019). La peroxidación de lípidos es consecuencia del incremento de ROS, representando una situación dañina para las neuronas. Por lo tanto, los astrocitos protegen a las neuronas metabolizando estos lípidos (Barber and Raben 2019).

De hecho la peroxidación de lípidos es una característica de aparición temprana en la EA (Kao et al. 2020). Además, tal y como se indica en el apartado 3.1.2, la proteína ApoE está relacionada con un mayor riesgo de desarrollo de la EA y se encuentra asociado a los oligómeros de A β (Huang 2006; Bu 2009). Concretamente, la variante ApoE ϵ 4 promueve la acumulación de A β , formando oligómeros, protofibrillas y fibrillas, e inhibe su eliminación del cerebro (Serrano-Pozo, Das, and Hyman 2021). En astrocitos, se ha visto que esta variante afecta a la fagocitosis del A β y promueve acumulación de colesterol (Lin et al. 2018).

Otros elementos del metabolismo lipídico que se encuentran desregulados en la EA son la fosfolipasa 2 (PLA₂) y la fosfolipasa D (PLD). La PLA₂ está involucrada en la generación del ácido araquidónico (AA) y los niveles de lipoproteína asociada a PLA₂ se ven incrementados en la EA. La PLD es la enzima que cataliza la hidrólisis de la fosfatidilcolina (PC) en ácido fosfatídico (PA) y en colina, la cual es un precursor en la síntesis de acetilcolina, y en EA tiene un papel importante en la amiloidogénesis (Kao et al. 2020).

El PA también es un precursor del ácido lisofosfatídico (LPA), un lípido bioactivo que controla una amplia gama de respuestas celulares, como por ejemplo la proliferación, la supervivencia o la apoptosis. Tal y como se detalla en el apartado 5, la PLA₂, la PLD y el LDL, uno de los transportadores del colesterol, están involucrados en la síntesis y en la degradación del LPA (Yung et al. 2015; Geraldo et al. 2021).

Varios componentes de la ruta de síntesis del LPA están alterados en la fisiopatología de la EA. Como se describe en el apartado 4.2.3, los niveles de PLA₂ se encuentran aumentados en la EA y la PLD participa en la amiloidogénesis (Kao et al. 2020). Además, se ha demostrado una correlación positiva entre el LDL oxidado y el péptido A β en el líquido cefalorraquídeo (Kankaanpaa et al. 2009). De hecho, el LPA que forma parte del LDL oxidado *up*-regula los niveles de expresión de la β -secretasa y la producción de A β en células de neuroblastoma, aunque no lo hace para la expresión de APP o la γ -secretasa (Shi et al. 2013). Además, el LDL oxidado altera la homeostasis de la barrera hematoencefálica (Schreurs et al. 2013).

5. La señalización mediada por el receptor del ácido lisofosfatídico.

El cerebro humano está compuesto por una gran variedad de lípidos, representando aproximadamente un 60-70% de su peso. Estos lípidos pueden ser estructurales o bioactivos, y su función es la de mantener la integridad estructural y la de regular la señalización inter e intracelular. Una de las familias de lípidos bioactivos es la de los lisofosfolípidos (LPs), siendo el ácido lisofosfatídico (LPA) el miembro más representativo de esta familia. El LPA interacciona con una familia específica de receptores con 7 dominios transmembrana acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCRs), los receptores de LPA (LPARs). Estos receptores regulan importantes respuestas celulares como la supervivencia, la migración, la proliferación o la apoptosis (Figura 18) (Yung, Stoddard, and Chun 2014; Yung et al. 2015). La alteración de la señalización controlada por LPA se ha estudiado ampliamente en enfermedades neurodegenerativas, relacionándose, entre otras, con la EA (Ramesh et al. 2018).

5.1. El ácido lisofosfatídico.

El ácido lisofosfatídico (mono-acil-sn-glicerol-3-fosfato, LPA) es un fosfolípido bioactivo de pequeña masa molecular (430-480 Da) que se procesa durante la síntesis de las membranas celulares y se localiza tanto en el espacio extra- como intracelular (van Meer, Voelker, and Feigenson 2008). Se encuentra en organismos vertebrados e invertebrados y es descrito como un potente agente de señalización que regula a una gran variedad de respuestas celulares tales como la reorganización del citoesqueleto de actina, la migración y/o la

proliferación celular (Choi et al. 2010; Yung, Stoddard, and Chun 2014; Yung et al. 2015; Geraldo et al. 2021).

La forma más utilizada en investigación es la 18:1 oleoil-LPA (1-oleoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfato), aunque existen otras formas de LPA según la longitud y posición de la cadena de ácido graso, así como de su grado de saturación. Concretamente, las formas 18:2, 20:4, 16:1, 16:0 y 18:1 son particularmente abundantes en el plasma, aunque también se ha identificado LPA en otros tejidos y fluidos, incluyendo el tejido neural, el fluido cerebroespinal (CSF), el fluido seminal, la orina, la saliva y el humor acuoso (Yung, Stoddard, and Chun 2014).

La figura 18 muestra de manera esquemática las rutas de síntesis y de degradación del LPA y las respuestas biológicas moduladas por la señalización iniciada por este lípido. Brevemente, la mayor fuente de LPA extracelular proviene de la síntesis controlada por la autotaxina (ATX), enzima que es responsable del mantenimiento de LPA a concentraciones fisiológicas en el plasma tanto en el desarrollo embrionario como post-natal. Esta ruta de síntesis se inicia a partir de la síntesis de los lisofosfolípidos (LPs) precursores del LPA: lisofosfatidilcolina (LPC), lisofosfatidilserina (LPS) y lisofosfatidiletanolamina (LPE), los cuáles son movilizados por las enzimas fosfolipasa A1 o A2 (PLA₁ y PLA₂), a partir de los fosfolípidos de membrana fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS) y fosfatidiletanolamina (PE) y para finalmente, ATX sintetiza LPA a partir de los LPs anteriores (Yung et al. 2015; Geraldo et al. 2021).

De forma minoritaria, el LPA extracelular también se puede sintetizar a partir del ácido fosfatídico (PA) obtenido de los fosfolípidos de membrana PC, PS y PE mediante las enzimas fosfolipasas D1 y D2 (PDL₁ y PDL₂). El PA se modifica por la acción de las enzimas PLA₁ y PLA₂ para generar LPA. Además, el LPA también puede sintetizarse en el espacio intracelular por cuatro rutas diferentes: la ruta del monoacilglicerol (MAGK), la del ácido fosfatídico/fosfolipasa A1 o A2 (PA/PLA₁ o PA/PLA₂), la ruta de síntesis de la glicerofosfato aciltransferasa (GPAT) y la modificación oxidativa de la lipoproteína de baja densidad (LDL) (Geraldo et al. 2021).

La degradación del LPA está mediada por una gran variedad de enzimas, que incluye tres tipos de fosfatasa (LPPs), la aciltransferasa de LPA, y varias fosfolipasas, como por ejemplo PLA₁ y PLA₂. Un ejemplo de la degradación de LPA vendría dado por la LPA aciltransferasa, la cuál lo reconvierte en PA y éste PA se hidroliza por el LPP o bien, se convierte en glicerol-3-fosfato por la acción de las fosfolipasas (Yung et al. 2015).

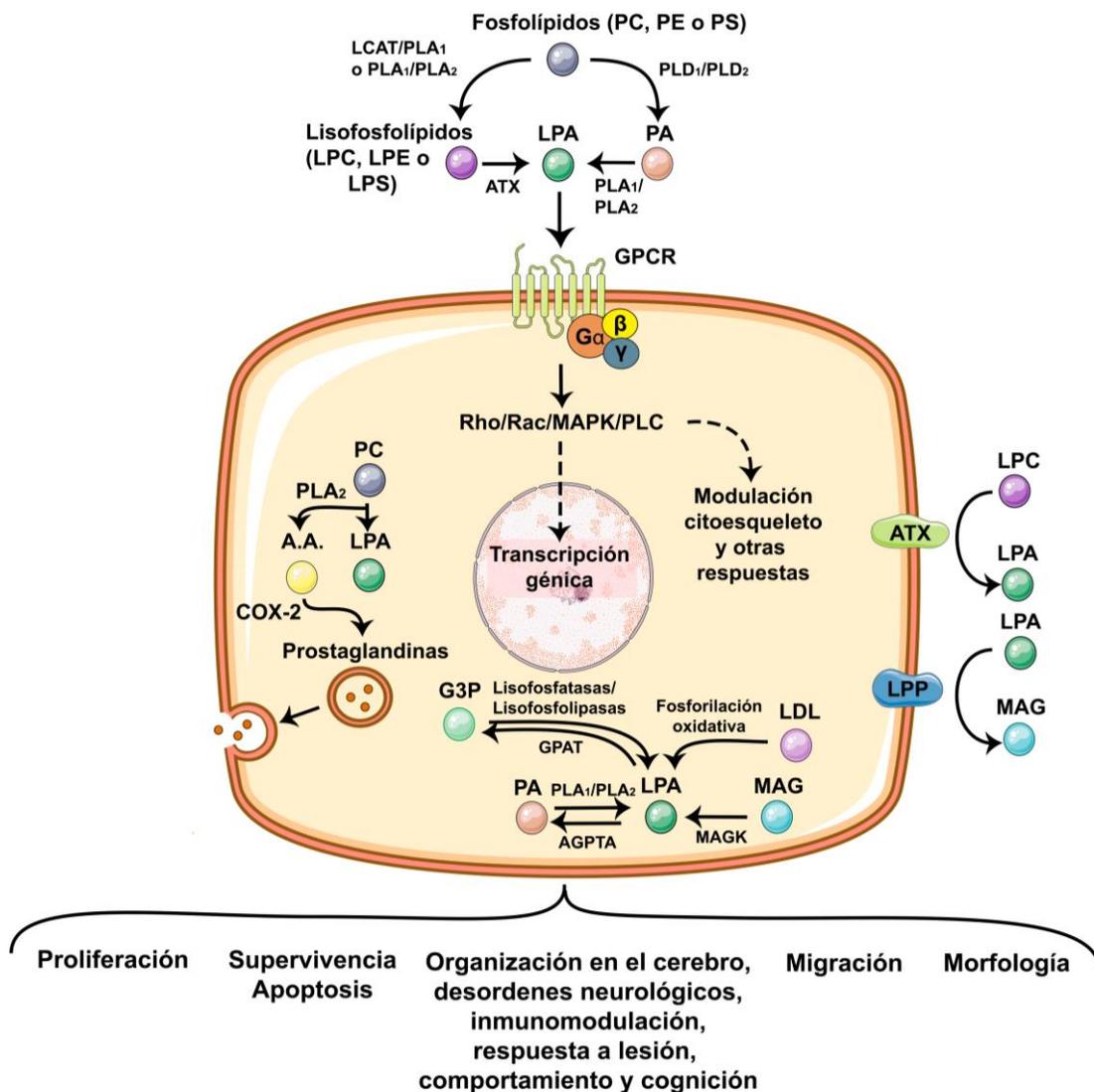


Figura 18. Rutas de síntesis y degradación del LPA y respuestas biológicas que activa a través de su interacción con GPCRs. El ácido lisofosfatídico (LPA) activa a diferentes miembros de la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) y modulan una gran batería de respuestas celulares mediante Rho, Rac, MAPK y PLC. Además, inducen a la producción de otros lípidos, como por ejemplo, las prostaglandinas, a partir del ácido araquidónico (A.A.), reacción catalizada por la ciclooxigenasa 2 (COX-2). El LPA extracelular tiene dos rutas de síntesis: la primera consiste en la síntesis de lisofosfolípidos (LPC, LPE o LPS) a partir de fosfolípidos (PC, PE o PS) catalizada por la aciltransferasa lecitina colesterol (LCAT) y la fosfolipasa tipo A1 (PLA₁) o bien por las fosfolipasas de tipo A1 y A2(PLA₁/PLA₂),

seguido de la síntesis de LPA por la enzima autotaxina (ATX); la segunda ruta consiste en la obtención de ácido fosfatídico (PA) por la fosfolipasa D1 o D2 (PDL₁/PDL₂), y después, se obtiene LPA mediante PLA₁/PLA₂. El LPA intracelular puede ser sintetizado por cuatro rutas distintas: la del MAG, que convertido en LPA vía la MAG quinasa (MAGK); la de la lipoproteína de baja densidad (LDL); la del PA y la del glicerol-3-fosfato (G3P). Por otro lado, el LPA puede ser eliminado por las fosfatasas lípido fosfato (LPPs) convirtiéndolo en monoacilglicerol (MAG), por la aciltransferasa acilglicerolfosfato (AGPTA) que lo convierte en PA y por la aciltransferasa glicerolfosfato (GPAT) que lo convierte en G3P (Yung et al. 2015; Geraldo et al. 2021).

Con respecto a la EA, el LPA no sólo está implicado en la generación de A β , sino que el LPA se ha relacionado con el aumento de la fosforilación de tau, debido a que aumenta la actividad de la glucógeno síntasa quinasa-3 β (GSK-3 β). La fosforilación de tau afecta a la retracción de las neuritas y su exceso está relacionado con la neurodegeneración (Ramesh et al. 2018). Por otra parte, la administración de gintonina, un compuesto que contiene LPA, bloquea la generación de ROS y la sobreexpresión de GFAP en ratones a los que previamente se les indujo EA por inyección de A β ₁₋₄₂ oligomérico (Ikram et al. 2021) y rescata la función cognitiva tanto en los modelos animales (Hwang et al. 2012) como en pacientes con la EA. Además, la gintonina parece que facilita la ruta no amidoilogenica en la línea celular de neuroblastoma SH-SY-5Y, aumenta la liberación de acetilcolina y la expresión de la acetilcolina transferasa en células progenitoras neurales e inhibe la activación de la microglia (Kim et al. 2018).

5.2. El receptor del ácido lisofosfatídico tipo 1.

Las respuestas controladas por el LPA se inician tras su interacción con los receptores específicos (LPAR1-6). Esta familia de receptores está compuesta por seis miembros. Todos ellos están acoplados a proteínas G heterotriméricas (G_{12/13}, G_{q/11}, G_{i/o} y G_s). La interacción entre LPA y LPAR resulta en redes de señalización *downstream* que controlan distintos efectos fisiológicos, como ya hemos mencionado anteriormente (Figura 18).

La isoforma 1 (LPAR1) es la forma más abundante en el cerebro y la más estudiado (Xiao et al. 2021). El gen del LPAR1 se identificó por primera vez en 1996 en la zona ventricular de ratones de entre E12 a E18, y fue nombrado como gen 1 de la zona ventricular (*vzg-1*, de las siglas en inglés *ventricular*

zone gene-1) (Hecht et al. 1996). Recientemente, se ha sugerido que el LPAR1 podría tratarse de un nuevo marcador de células neurales progenitoras/células madre (NSPC), mostrando un patrón característico de expresión en el giro dentado adulto (Walker et al. 2016).

Estructuralmente, la isoforma humana de LPAR1 es una proteína de 364 aminoácidos con una señal putativa de translocación nuclear, un dominio N-terminal ácido y un dominio C-terminal rico en cisteína que contiene una estructura putativa de dedos de zinc. Su secuencia está altamente conservada por lo que podría ser un importante regulador de la función nuclear (Xiao et al. 2021). De hecho, se ha detectado LPAR1 en el núcleo en zonas de alta actividad transcripcional (Waters et al. 2006) y ha sido señalado como modulador de la transcripción génica de diferentes genes en el contexto del cáncer (Valdes-Rives et al. 2021; Xu et al. 2019).

El LPAR1 puede señalizar a través de las proteínas $G_{\alpha i/o}$, $G_{\alpha q/11}$ y $G_{\alpha 12/13}$, quienes activan a su vez a diversas rutas de señalización a través de PLC, MAPK, PI3K, GTPasas Ras y Rho (Yung, Stoddard, and Chun 2014) (Figura 19). Estas rutas de señalización controlan respuestas biológicas relacionadas con: supervivencia, proliferación, adhesión, migración, cambios en el citoesqueleto, movilización del calcio, función inmune, mielinización e inhibición de la adenil ciclasa (Kihara, Mizuno, and Chun 2015; Yung et al. 2015), y junto al LPAR2, contribuye a varios aspectos del desarrollo, función y respuesta a lesión en el sistema nervioso (Geraldo et al. 2021).

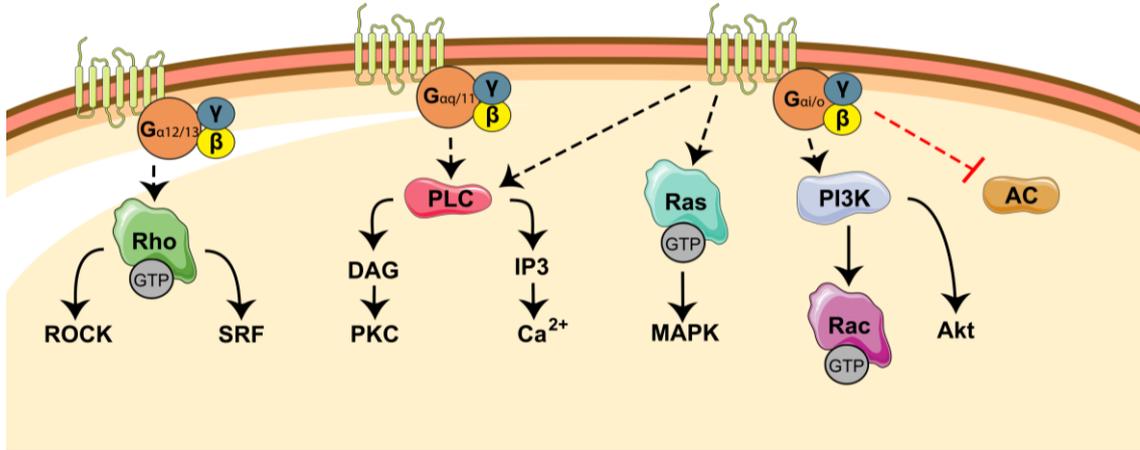


Figura 19. Cascadas de señalización celular controladas por el LPAR1. La interacción entre LPA y LPAR1 conlleva a la disociación de las subunidades G_{α} de las subunidades β y γ . Depende de la subunidad a la que esté asociado, LPAR1 activa a una u otra señalización. La subunidad $G_{\alpha 12/13}$ controla las GTPasas Rho, la subunidad $G_{\alpha q/11}$ controla la ruta de PLC y la subunidad $G_{\alpha i/o}$ controla a la ruta de PLC, de Ras y de PI3K, e inhibe la adenilato ciclasa.

En conclusión, aunque el LPA se haya relacionado con la EA, no está claro qué papel tiene en la fisiopatología de esta enfermedad y menos aún sus receptores.

Hipótesis

La Enfermedad de Alzheimer (EA) cursa, entre otras cosas, con un hipometabolismo de la glucosa en el cerebro. Esta anomalía del metabolismo de la glucosa se manifiesta décadas antes de la aparición de síntomas y marcas histopatológicas características de la enfermedad (Tarczyk et al. 2015). Llegar a descifrar el nexo entre el metabolismo de la glucosa en el cerebro con la muerte neuronal podría ser clave para entender la progresión de la neurodegeneración y especialmente la EA. A este respecto, cabe destacar la relación funcional entre los diferentes linajes celulares presentes en el cerebro y particularmente la relación entre astrocitos y neuronas. Los astrocitos son las células que abastecen de energía a las neuronas, además de transferir derivados de la glucosa proveniente del torrente circulatorio poseen el mayor almacén de glucógeno cuya movilización también se traduce en transferencia de derivados de glucosa.

Los astrocitos en presencia de $A\beta_{1-42}$ oligomérico cambian su funcionalidad, traduciéndose éste en una afectación negativa para la biología de las neuronas del sistema nervioso central (Wyssenbach et al. 2016). Considerando el papel clave del péptido $A\beta_{1-42}$ en la fisiopatología de la EA, en general y en el metabolismo de la glucosa en particular, nosotros hipotetizamos que el péptido $A\beta_{1-42}$ promueve la degradación del glucógeno astrocitario hacia la ruta biosintética de las hexosaminas con objeto de mediar modificaciones postraduccionales por O-GlcNAcificación de determinadas proteínas alterando su función.

En base a esta hipótesis, los objetivos planteados en esta tesis doctoral son:

1. Identificar y caracterizar la ruta de señalización que conecta el péptido $A\beta_{1-42}$ con el metabolismo del glucógeno en astrocitos.
2. Estudiar el significado de la degradación del glucógeno promovida por el $A\beta_{1-42}$ oligomérico.
3. Caracterizar el patrón de O-GlcNAcificaciones producto de la acción del $A\beta_{1-42}$ oligomérico sobre los astrocitos

4. Estudiar y comparar el significado de la O-GlcNAcilación del LPAR1 en astrocitos tratados con $A\beta_{1-42}$ oligomérico respecto a su ligando natural LPA.

Material y métodos

1. Materiales

1.1. Reactivos.

Los reactivos de Sigma-Aldrich que fueron utilizados en este trabajo fueron: bromuro de etidio, Igepal-360, ampicilina, kanamicina, isopropil β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), ditioneitol (DTT), marcador de peso molecular de proteínas (S8320) protease inhibitor cocktail (PIC), glucógeno de hígado de ternera, fosfoglucomutasa de músculo de conejo (PGM), glucógeno-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), β -nicotinamida adenina dinucleotídica fosfatada hidratada (NADPH), β -nicotinamida adenina dinucleotídica fosfatasa hidratada reducida (NADPH⁺), acrilamida-bis-acrilamida 30 %, Dimetil sulfóxido (DMSO), streptomina y penicilina, colágeno de cola de rata, kit de ensayo de lactato (Lactate Assay Kit), poli-L-lisina, medio LB y medio 2XYT. La sonda CM-H2DCFCA se obtuvo en Molecular Probes, Invitrogen. Las enzimas de restricción (XhoI, EcoRI y BamHI) y la Gold Taq DNA polimerasa se obtuvieron de Promega. La resina de glutatión sefarosa (glutathione sepharose 4B), la proteína G (protein G sepharose 4 fast flow) y la resina TALON Superflow fueron obtenidos de GE Healthcare. El medio de cultivo de la línea de astrocitos humana inmortalizada (RPMI, BE04-558F) se obtuvo de Lonza y el medio de cultivo de los astrocitos primarios de rata (IMDM, 12440061) se obtuvo de Gibco.

1.2. Anticuerpos.

Los anticuerpos utilizados en este trabajo se detallan en la tabla 1.

Tabla 1. Relación de anticuerpos utilizados. M: Monoclonal de ratón. R: Policlonal de conejo.

Anticuerpo	Tipo	Referencia	Casa Comercial
α-6xHis	M	SAB1305538	Sigma-Aldrich
α-Rac1	M	05-389	Millipore
α-EGFP	M	632569	Clontech
α-AU5	M	MMS-135R	Covance

α-OGlcNAc	M	05-1245	Millipore
α-GST	R	G7781	Sigma
α-6E10	M	A1474	Sigma
α-GFAP	M	ab279289	Abcam
α-GFAP	R	GA524	Dako
α-HA	M	MMS-101R	Covance
α-Mouse IgG	M	A2554	Sigma
α-Rabbit IgG	R	A6667	Sigma
α-Mouse Alexa 594	M	R37121	Invitrogen
α-Rabbit Alexa 488	R	A11008	Invitrogen
α-Rabbit Alexa 647	R	A31573	Invitrogen
α-Mouse IgG1 Alexa 647	M	A21240	Invitrogen

1.3. A β ₁₋₄₂ oligómeros.

Son péptidos recombinantes que se generaron y purificaron en el laboratorio. La metodología empleada para ello, está descrita en el apartado 2, subtítulo 2.4.

2. Métodos

2.1. Cultivos celulares

2.1.1. Mantenimiento de la línea celular de astrocitos humanos inmortalizados.

Las astrocitos humanos inmortalizados, T0280, son una línea celular de origen humano obtenidos de un cerebro fetal de 18 semanas de gestación e inmortalizada mediante una transducción de lentivirus con el antígeno SV40 Large T seguida de pases seriados y está comercializada por la empresa abm, USA.

Las células se cultivaron en medio RPMI-1640 con 25mM de HEPES, suplementado con 10% de FBS, 10 ng/mL de estreptomina y 5 unidades/mL de penicilina y se mantuvieron en un incubador a 37 °C, con una atmosfera al 5% de CO₂. Las placas dónde se sembraron las células se recubrieron previamente con 0.01% de colágeno (Sigma-Aldrich) . En el caso de realizar cultivos en *coverslips*, los vidrios se recubrieron con poli-L-lisina en una dilución 1:1000.

Los cultivos de mantenimiento presentaban una confluencia celular entre el 80% y el 90%. A la hora de proceder a los tratamientos farmacológicos, las monocapas que crecían en medio RPMI con 10% FBS, se lavaron y se redujo la concentración de FBS al 1% durante 12 horas al cabo de las cuales los cultivos se trataron con 5μM de Aβ₁₋₄₂ o 100nM de LPA a 37°C y a diferentes tiempos como se indica en el capítulo de resultados. Cuando se precisó estudiar los efectos de los inhibidores o péptidos recombinantes sobre la señalización intracelular mediada por Aβ₁₋₄₂, los cultivos se pretrataron con estos compuestos: 70ng/μl de TAT-EGFP, TAT-RBD-PYGM o TAT-CRIB-PAK1, durante 1 hora seguidos de la estimulación con el Aβ₁₋₄₂, o bien 10μM Osmi, 12μM Thiamet-G durante toda la noche seguidos de la estimulación con el Aβ₁₋₄₂.

2.1.2. Obtención de astrocitos primarios de rata.

Los cultivos primarios de astrocitos fueron obtenidos de un cultivo mixto de células precursoras de astrocitos, microglia y oligodendrocitos, que fue extraído del córtex de rata neonatal P0-P2. Primero, se extrajo el cerebro de los nervios

craneales y el tronco encefálico, el cerebelo y el ganglio basal fueron eliminados con el fin de aislar el córtex. A partir de ahí, se eliminaron las meninges y posteriormente se realizó una digestión enzimática con tripsina y DNAsa I en Hank's Balanced Salt Solution (HBSS). La digestión se incubó durante 15 minutos a 37°C y se paró añadiendo medio IMDM suplementado con 10% de FBS Hyclone™ (Fisher). Finalmente, las células y los tejidos fueron recuperados por centrifugación durante 5 minutos a 1000 rpm.

Seguidamente, se realizó una digestión mecánica utilizando una jeringa estéril con agujas de 21G y 23G con el fin de disociar la suspensión de tejido. El homogeneizado fue centrifugado a 1000 rpm durante 5 minutos y el pellet fue resuspendido con medio IMDM suplementado con 10% de FBS Hyclone™. La suspensión celular fue sembrada en frascos de 75cm² previamente tratados con poli-D-lisina (PDL), y se incubó a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂.

Tras 24 horas, el medio fue cambiado por nuevo medio IMDM suplementado con FBS Hyclone™, con el fin de eliminar el debris celular. Este cambio de medio fue realizado cada 3-4 días y las células fueron incubadas hasta alcanzar la máxima confluencia, siendo entre 9 y 11 días el tiempo requerido.

Una vez alcanzada la máxima confluencia, se aislaron los astrocitos. Para ello, el frasco se agitó durante 1h de forma constante a 37°C con el fin de eliminar la microglia. Se reemplazó el medio por medio fresco y el frasco fue incubado durante 12-16 horas en agitación constante y a 37°C con el fin de eliminar los oligodendrocitos. Al día siguiente, se lavó la monocapa de células con Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) y se tripsinizó durante 5 minutos a 37°C. Tras ello, la monocapa de células fue resuspendida con 5mL de IMDM + 10% FBS (Gibco) + 5% penicilina/estreptomicina y se centrifugó durante 5 minutos a 1000 rpm. El pellet fue resuspendido con 2,5mL y se sembraron la densidad deseada en placas pre-tratadas con PDL.

2.1.2. Transfección transitoria.

2.1.2.2. Transfección por electroporación.

Las células se lavaron 2 veces con PBS atemperado y se tripsinizaron durante 5 minutos en el incubador. Al cabo de ese tiempo, se resuspendieron en medio RPMI completo. 4x10⁶ células resuspendidas en 200µl de medio RPMI sin FBS

se añadieron a una cubeta de electroporación de 0.4 cm (Sigma-Aldrich), conteniendo 20 µg de DNA (Tabla 2). Los parámetros para la electroporación fueron 260 V, 950 µF en un electroporador (Gene Pulser Xcell™, Bio-Rad). El volumen de la cubeta se recogió y repartió en dos pocillos de una placa de 6, con 2mL de medio RPMI completo en cada pocillo. Los cultivos transfectados se incubaron a 37 °C durante 24 horas y se privaron de FBS durante 24 horas adicionales.

Tabla 2. Relación de plásmidos de expresión eucariota utilizados.

Nombre	Etiqueta	Gen resistencia	Obtención
pCEFL-HA	HA	Ampicilina	Piero Crespo
pCEFL-HA-TAP-Rac1-T17N	AU5	Ampicilina	En el laboratorio
pEGFP-Rac1-Q61L	EGFP	Ampicilina	Nieves Movilla
pEGFP-C2	EGFP	Kanamicina	Clontech
pEGFP-LPAR1	EGFP	Ampicilina	Deron Herr
pEGFP-LPAR1 ^{T43A}	EGFP	Kanamicina	En el laboratorio
pEGFP-LPAR1 ^{T47A}	EGFP	Kanamicina	En el laboratorio
pEGFP-LPAR1 ^{T43A-T47A}	EGFP	Kanamicina	En el laboratorio
pCEFL-HA-PYGM	HA	Ampicilina	En el laboratorio
pEGFP-Rac1	EGFP	Kanamicina	Nieves Movilla

2.1.2.3. Transfección con lipofectamina.

Las células se sembraron en *coverslips* previamente tratadas con poli-L-lisina como se indica en el apartado 2.1.1. Cuando llegaron al 70% de confluencia, se lavaron tres veces con PBS y se añadió medio RPMI con 1% de FBS.

La transfección se llevó a cabo con Lipofectamine 3000 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La solución de lipofectamina en medio Opti-

MEM se preparó con 1,5µl de lipofectamina en 25 µl de medio. En otro tubo aparte, se preparó una solución con 0,5µg de ADN a transfectar (Tabla 2) y 2µl de P3000 Reagent en 25µl de medio Opti-MEM. A continuación, se añadió la solución de ADN a la solución de lipofectamina y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron los 50µl de la mezcla a un pocillo de 24 con 300µl de medio 1% FBS. Las células se incubaron 24 horas antes de realizar el ensayo.

2.2. Tecnología del DNA recombinante.

2.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa.

La amplificación de fragmentos de ADN por PCR se realizó mediante un procedimiento estándar. Se preparó una mezcla que contenía 200 µM de cada uno de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Sigma), 10 pmol de cada uno de los cebadores, 2 mM MgCl₂, 0.5 u/µL Ampli Taq Gold polimerasa (Applied Biosystem) y entre 10 y 100 ng ADN molde; todo ello diluido en el tampón de reacción suministrado por el fabricante. Las reacciones se realizaron en el termociclador GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystem). Los ciclos se iniciaron a 95 °C durante 10 minutos; seguidos de 35 ciclos de amplificación. Cada ciclo de amplificación consistió en 95 °C durante 30 segundos; seguidos de 30 segundos a la temperatura de fusión menor de la pareja de cebadores menos 5 unidades y otros 30 segundos a 72 °C. Al finalizar los 35 ciclos, las muestras se incubaron 10 minutos a 72 °C y se almacenaron a 4°C.

2.2.2. Purificación de ADN a partir de un gel de agarosa.

El ADN amplificado se aisló y se separó por electroforesis de agarosa al 1% o 2%, dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar, en tampón TAE (40 mM Tris Acetato, 2 mM Na₂EDTA, Sigma-Aldrich) y en presencia de bromuro de etidio.

Las bandas de interés se escindieron del gel con un bisturí estéril, visualizando a través de un transiluminador de luz ultravioleta (CHEMIDOC XRS (Bio-Rad)). La extracción del ADN del gel se realizó con QIAquick® Gel extraction kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema se basa en la adsorción selectiva de ADN a una membrana de gel de sílice en presencia

de una alta concentración de sales (la presencia de una sal caotrópica, el tiocianato de guanidinio, facilita además la solubilización de la agarosa). Después de un lavado el ADN se eluyó en un tampón Tris pH 8.5 de baja concentración de sales.

2.2.3. Digestión de ADN con enzimas de restricción.

Se preparó una mezcla que contenía 1-2 µg de ADN, 2 unidades de enzima por microgramo de ADN y el tampón apropiado para el enzima, en un volumen final de 20 µL. La mezcla se incubó de 1 a 4 h a 37 °C y los fragmentos de ADN se purificaron mediante electroforesis en geles de agarosa como se ha descrito en el apartado 2.2.2.

2.2.4. Construcciones pGEX-LPAR1 y mutantes en pEGFP-LPAR1.

En el caso de la construcción pGEX-LPAR1, el producto de digestión con las enzimas de restricción BamHI y XhoI (Promega) del plasmido pcDNA3.1-V5-His-LPAR1 se clonó en pGEX-4T3 (GE/Healthcare). Éste se digirió con las mismas enzimas de restricción y posteriormente se defosforilaron los extremos del vector abierto con fosfatasa alcalina. Tanto el vector defosforilado como el producto de digestión se separaron en un gel de agarosa y se purificaron como se indica en la sección 2.2.2.

En el caso de las construcciones pEGFP-LPAR1^{T43A}, pEGFP-LPAR1^{T47A} y pEGFP-LPAR1^{T43A+T47A}, los productos de digestión con las enzimas de restricción BamHI y XhoI (Promega) de los plasmidos pGEX-LPAR1^{T43A}, pGEX-LPAR1^{T47A} y pGEX-LPAR1^{T43A+T47A} se clonaron en pEGFP-C2 (Clontech). Éste se digirió con las enzimas de restricción BglII y XhoI (Promega) y posteriormente se defosforilaron los extremos del vector abierto con fosfatasa alcalina. Tanto el vector defosforilado como los productos de digestión se separaron en un gel de agarosa y se purificaron como se indica en la sección 2.2.2.

2.2.3. Clonaje de productos de PCR.

2.2.3.4. Construcciones pTAT-RBD-PYGM, pTAT-CRIB-PAK1, pTAT-OBD-LPAR1 y pTAT-OBD-LPAR1^{T43A+T47A}.

Los productos de PCR se clonaron en el vector pTAT-EGFP-HA. Éste se digirió con las enzimas con las que se trataron los productos de PCR (XhoI y EcoRI), posteriormente se defosforilaron los extremos del vector abierto con fosfatasa alcalina. Esta digestión escinde el EGFP, quedando el vector sólo con las etiquetas 6xHis y HA. Tanto el vector defosforilado como los fragmentos de PCR digeridos se separaron en un gel de agarosa y se purificaron como se indica en la sección 2.2.2.

En la tabla 3 se indica la secuencia aminoacídica de ambos péptidos y el tamaño total del constructo.

Tabla 3. Péptidos TAT del laboratorio de GTPasas y Neuroseñalización. Se detalla la secuencia de aminoácidos que corresponde la región, el número de pares de bases totales que contiene la secuencia final del péptido y su tamaño.

Nombre del péptido	Secuencia aminoacídica RBD/CRIB	Número de pares de bases del constructo	Tamaño total del constructo (kDa)
TAT-CRIB-PAK	FYRSILPGDKTNKKKEKERP EISLPSDFEHTIHVGFDAVTG EFTGMPEQWARLLQT	200	7.1
TAT-RBD-PYGM	EKARPEFTLPVHFYGHVEHT SQGAKWVDTQVVLAMPYDT PVPGYRNNVVNTMRLWSAK APNDFNLKDFNVGGYIQAVL DR	404	14.81
TAT-OBD-LPAR1	RSGKHLATEWNTVSKLVMG LGIT	69	3,43
TAT-OBD-LPAR1^{T43A+T47A}	RSGKHLAAEWNNAVSKLVMG LGIT	69	3,43

2.2.4. Transformación en bacterias.

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de reacción de 10 μL que contenía: 5 μL del tampón de reacción, 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de vector desfosforilado, 1 unidad de ADN ligasa T4, 2 μL de producto de PCR de interés y 1 μL de H_2O grado biología molecular. Esta mezcla se incubó a 16°C durante toda la noche.

Se transformó el producto de la ligación en bacterias competentes *E. coli* de la cepa DH5 α (TAKARA) y/o *E. coli* XL1 Blue (Stratagene). Brevemente, se añadieron 2 μg de ADN y 50 μL de bacterias en tubos de polipropileno. La mezcla se incubó durante 30 minutos en hielo, seguido de una exposición a 42°C durante 45 segundos, posteriormente las bacterias se incubaron en hielo durante 2 minutos.

A continuación se añadieron 300 μL de medio S.O.C. (Sigma) y las bacterias se incubaron en agitación 220 r.p.m. durante una hora a 37°C . Finalmente, se sembraron 60 μL de cultivo líquido bacteriano en placas LB agar que contenían el antibiótico de resistencia del plásmido sembrado (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina o 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamicina) y se incubaron en la estufa a 37°C durante 16-18 horas.

2.2.5. Purificación de ADN plasmídico.

El procedimiento para purificar el ADN plasmídico se basa en la metodología de lisis alcalina seguida de una precipitación y purificación del ADN en una columna de intercambio iónico (sílice-dietilaminoetanol). El ADN se une a la columna en condiciones apropiadas de pH y concentración de sales, los contaminantes se eliminan en un lavado con tampón de fuerza iónica intermedia. El ADN se eluye en un tampón de alta concentración de sales. Por último, y si el caso lo requiere; el ADN se precipita con 0.1 volúmenes de 3M Acetato de sodio (Sigma) y 0.7 volúmenes de isopropanol (Sigma), para concentrarlo y precipitarlo.

En función de las necesidades experimentales se utilizó el kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel) o el kit GenElute™HP Endotoxin-Free Plasmid Maxiprep Kit (Sigma).

2.2.6. Mutagenesis dirigida.

La mutagénesis dirigida es una técnica de biología molecular que se utiliza para cambiar pares de bases puntuales de la cadena de ADN. Y cuya proteína generada puede presentar una pérdida o ganancia de función.

Para realizar la mutagénesis dirigida se utilizó el kit QuickChange II Site-Directed Mutagenesis (Agilent). Los cebadores se diseñaron cumpliendo las siguientes características:

- La temperatura de fusión del cebador (*melting temperature*, T_m) debe de ser igual o mayor de 78°C.
- Deben de contener entre 25 y 45 pares de bases. Aunque se pueden utilizar cebadores con más de 45 pares de bases, las posibilidades de formación de estructuras secundarias que afectan a la eficiencia de la reacción de mutagenesis son mayores.

Para estimar la T_m, se utilizó la siguiente formula:

$$T_m = 81.5 + 0.41(\% \text{ G-C}) - 675/N - \% \text{ bases no complementarias}$$

Donde N es el número total de bases del oligonucleótido y %G-C es el porcentaje de guaninas y citosinas que contiene el cebador. Los cebadores diseñados se recogen en la tabla 5.

Tabla 5. Encebadores utilizados para generar las mutaciones del LPAR1.

Mutación generar	Encebador	Melting temperatura (T _m)
T43A	Fw: GGAAAGCATCTTGCCGCAGAATGGAACACAG Rv: GACTGTGTTCCATTCTGCGGCAAGATGCTTTCCA C	80°C

T47A	Fw: GCCACAGAATGGAACGCAGTCAGCAAGCTGG	80,29°C
	Rv: CCAGCTTGCTGACTGCGTTCCATTCTGTGGC	
T43A	Fw:	82°C
T47A	GCCGCAGAATGGAACGCAGTCAGCAAGCTGG	
	Rv: CCAGCTTGCTGACTGCGTTCCATTCTGCGG	

La reacción y el programa de mutagenesis (tabla 6) se diseñó siguiendo el protocolo proporcionado en el kit.

Tabla 6. Programa de mutagenesis dirigida utilizado para la generación de pGEX-LPAR1^{T43A}, pGEX-LPAR1^{T47A} y pGEX-LPAR1^{T43A+T47A}.

Temperatura	Tiempo (min:seg)	Ciclos
95°C	0:30	1
95°C	0:30	16
55°C	1:00	
68°C	11:00	
4°C	∞	1

Una vez terminada la reacción de mutagenesis, se añadió 1µl de la enzima *DpnI*, se incubó 1 hora a 37°C y se transformó en bacterias supercompetentes XL1-Blue proporcionadas en el mismo kit.

A partir de las colonias de bacterias transformadas, se purificó el plasmido y se envió a secuenciar por el método Sanger a Eurofins Genomics.

2.3. Inducción de la expresión de proteínas recombinantes en bacterias.

El protocolo de inducción de la expresión de proteínas en bacterias varía en función de la proteína a purificar y se detalla en los siguientes subapartados.

2.3.1. Proteínas expresadas en el vector pGEX.

Una colonia de bacterias se puso a crecer en 50 mL de medio de cultivo 2XYT (Sigma) en presencia de 100 µg/mL de ampicilina durante toda la noche en un agitador a 220 r.p.m. a 37 °C. A la mañana siguiente se diluyó el cultivo diez veces en medio 2XYT en presencia de ampicilina y se dejó crecer en agitación a 220 r.p.m. a 37 °C durante una hora. Al cabo de este tiempo se añadió 1 mM IPTG (Sigma), durante 4 horas en agitación. Finalmente, las bacterias se concentraron por centrifugación a 4000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C, descartándose el sobrenadante.

2.3.2. Péptido Aβ₁₋₄₂.

El vector que expresa el péptido Aβ₁₋₄₂ (pET-Sac-Aβ(M1-42)) se transformó en bacterias *E. coli* de la cepa ArcticExpress (DE3) (Agilent Technologies).

Para inducir y producir el péptido Aβ₁₋₄₂, se partió de un cultivo crecido a 37°C y 220 r.p.m durante la noche en medio 2XYT (Sigma) y suplementado con 100 µg/ml de ampicilina. Al día siguiente, se diluyó en una proporción 1:50 con medio 2XYT sin antibiótico y se incubó a 30°C y 235 r.p.m. durante 3h. Una vez transcurrido ese tiempo, se puso el cultivo a 13°C y se añadió 1mM de IPTG (Sigma) para inducir la expresión de la proteína. La inducción se llevó a cabo durante 24 horas adicionales y las bacterias se recogieron por centrifugación a 4000 r.p.m. durante 15 minutos a 4 °C, descartándose el sobrenadante.

2.4. Purificación de proteínas.

2.4.1. Proteínas de fusión con cola de Histidinas: los péptidos TAT-RBD-PYGM, TAT-CRIB-PAK1 y TAT-OBD-LPAR1, TAT-OBD-LPAR1^{T43A,T47A}.

Los cultivos bacterianos se lisaron con 6 mL de solución de lisis (8M urea, 1mM PMSF en 1xPBS) y se incubaron a 4°C durante 20 minutos, seguido de un paso de centrifugación a 13500 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C.

La resina TALON Superflow (GE Healthcare) se equilibró tres veces con solución de equilibrado (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, pH 7,4) y

posteriormente, se incubó el sobrenadante del lisado obtenido previamente con la resina equilibrada durante 1 hora a 4°C en un agitador orbital. Los complejos se lavaron tres veces con solución de lavado (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 5mM imidazol, pH 7,4). Los péptidos se eluyeron con 400µl de solución de eluido (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 150mM imidazol, pH 7,4), incubando los complejos durante 15 minutos a 4°C en un agitador orbital. Posteriormente, se centrifugaron a 4000r.p.m. durante 1 minuto a 4°C y se recogió el eluido. Este último paso lo repetimos 4 veces, obteniendo un total de 1600µl de solución de péptido total. Finalmente, el eluido se dializó contra una solución de 50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 2,5 mM imidazol, pH 7,4 durante la noche y después, contra una solución de 50mM NaH₂PO₄ y 300mM NaCl durante dos horas.

Una vez terminada la diálisis, se recogió la proteína y se cuantificó mediante el método Bradford antes de ser congelada en distintas alícuotas a -80°C hasta su uso o hasta aproximadamente 6 meses.

Al final de cada paso de purificación, se separaron las proteínas por electroforesis en SDS-PAGE al 15%. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se tiñó con Azul Coomassie (0,1 % Brilliant blue G (Merck), 45% Metanol (Merck), 45% H₂O, 10% Ácido Acético Glacial (Panreac). Posteriormente para visualizar las proteínas se destiñó con una mezcla de 10% Metanol (Merck), 10% Ácido Acético Glacial (Panreac) y 80% H₂O.

2.4.2. Proteínas expresadas en el vector pGEX (GST-PAK1, Sonda GYSC, GST-Rs, GST-LPAR1, GST-LPAR1^{T43A}, GST-LPAR1^{T47A} y GST-LPAR1^{T43A+T47A}).

El pellet bacteriano se resuspendió en 6 mL de tampón de lisis (20% Sacarosa, 10% glicerol, 50 mM Tris-HCl pH 8, 200 mM Na₂O₅S₂, 2 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mg/mL Aprotina, 1 mg/mL Leupeptina). A continuación, se sonicó la suspensión durante 4 rondas de sonicación (Misonix Inc. Microson™ Ultrasonic Cell Disruptor XL Model DU-2000) a 5000 µm de amplitud de onda durante 10 segundos cada uno, con un turno de reposo de 10 segundos entre ellos, manteniéndose la muestra en todo momento en hielo. En el caso de las proteínas GST-LPAR1, se aumentaron las rondas de sonicación hasta 6, de 20 segundos cada una, y el descanso entre cada una fue de 40 segundos.

El producto de la sonicación se centrifugó a 14.000 r.p.m. y se recogió el sobrenadante. En el caso de GST-PAK1 se dividió en alícuotas para guardarlo congelado a - 80 °C, mientras que en el caso del resto de proteínas de fusión se continuó su purificación utilizando la resina de Glutación Sefarosa (GE Healthcare). Para ello, se equilibró 50µL de resina tres veces con 1mL de tampón de lisis y centrifugando 1 minuto la mezcla a 4000 r.p.m. y 4°C. Una vez equilibrada, se juntó la resina junto al sobrenadante obtenido tras el paso de sonicación y se incubó durante 1 hora a 4°C en rotación constante. Tras ello, se lavó dos veces los complejos con 1mL de tampón de lisis.

En el caso de la sonda GST-GYSC y de GST-R_s, la resina fue equilibrada con tampón de equilibrado (50mM Tris-HCl pH 7.5, 50mM NaCl, 5mM MgCl₂, 1mM PMSF, 1mM DTT). Las proteínas se eluyeron con el tampón de elución (50mM Tris-HCl pH 8, 150mM NaCl, 5mM MgCl₂, 1mM PMSF, 1mM DTT, 10mM L-glutación reducido) y se dializaron con el tampón de diálisis (50mM Tris-HCl pH 8, 150mM NaCl, 5mM MgCl₂, 2.5 CaCl₂, 1mM DTT). En el caso de las proteínas GST-LPAR1, los complejos se disociaron con 50 µL de tampón de carga 2x y se hirvieron las muestras 10 minutos a 95°C.

En los casos que lo requerían, para comprobar que la proteína de interés se había expresado, se cogieron 50 µL de lisado bacteriano y se añadieron 50 µL de tampón de carga. Las proteínas se separaron por electroforesis en SDS-PAGE al 10%. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se tiñó con Azul Coomassie (0,1 % Brilliant blue G (Merck), 45% Metanol (Merck), 45% H₂O, 10% Ácido Acético Glacial (Panreac). Posteriormente para visualizar las proteínas se destiñó con una mezcla de 10% Metanol (Merck), 10% Ácido Acético Glacial (Panreac) y 80% H₂O.

2.4.3. Péptido Aβ₁₋₄₂.

2.4.3.1. Extracción del péptido Aβ₁₋₄₂.

El protocolo de purificación se basó en la metodología descrita por Walsh y colaboradores (Walsh et al. 2009). Brevemente, el pellet bacteriano se resuspendió con 10mL de tampón A (10mM TrisHCl, 1mM EDTA; pH=8) y se sonicó durante 2 minutos al 50% de potencia y 0,5 ciclos. Se centrifugó la muestra a 13500 r.p.m. durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. El

pellet resultante se volvió a resuspender con tampón A y el paso anterior se repitió dos veces más con las mismas condiciones de sonicación y centrifugación, descartando el segundo y el tercer sobrenadante que se obtuvo. El tercer pellet se resuspendió con 5mL de 8M de urea en tampón A y se incubó 15 minutos en hielo para posteriormente volver a realizar un último paso de centrifugación y sonicación en las mismas condiciones. El último sobrenadante se recogió y se diluyó hasta 20mL con tampón A.

2.4.3.2. Cromatografía de intercambio iónico.

A continuación, se realizó una cromatografía de intercambio iónico. Para ello se utilizaron dos columnas de 1mL UNOsphere Q (BioRad) conectadas secuencialmente al cromatógrafo NGC Chromatography System (BioRad). Estas columnas poseen una resina con fuerte afinidad por aniones debido a que está constituida por el grupo $N^+(CH_3)_3$. El $A\beta_{1-42}$ es afín a esta resina debido a que está cargada negativamente y queda retenido en ella, mientras que la mayoría de las proteínas de la muestra no lo hacen.

Primero, el sistema se limpió con agua destilada y se conectaron las dos columnas. Seguidamente, se equilibraron las columnas con 20mL de tampón A (10mM TrisHCl, 1mM EDTA; pH=8), 20mL de tampón B (10mM TrisHCl, 1mM EDTA, 300mM NaCl; pH=8) y 40mL de tampón A utilizando un flujo de 1min/mL. A continuación se cargaron 5mL de muestra de $A\beta_{1-42}$ y se lavaron las columnas con 15mL de tampón A. Una vez lavadas, se inició el programa de elución: 5mL de tampón A, un gradiente de 10mL totales de 0% al 100% de tampón B (0-300mM de NaCl) y 5mL de tampón B. En la Figura 1 se indica un cromatograma representativo del programa de elución. El pico marcado en azul corresponde a la fracción de proteína eluida que más concentrado se encuentra el $A\beta_{1-42}$.

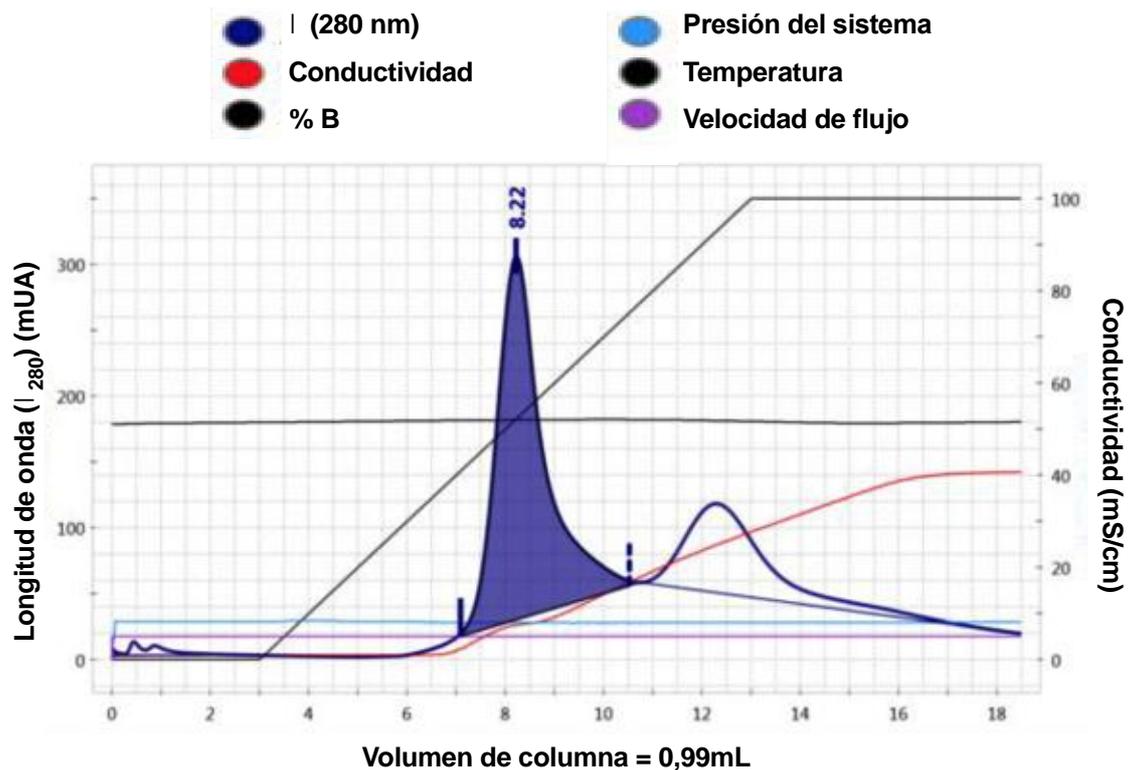


Figura 1. Cromatograma representativo del paso de elución del A β 1-42 recombinante. Se señala en azul el pico correspondiente al A β 1-42, el cual se genera entre 142mM y 211mM de NaCl.

Una vez se terminó la cromatografía, se recogieron todas las muestras y se almacenaron a -80°C hasta que se comprobó si contenían o no A β ₁₋₄₂ mediante western blot. Los eluidos que se seleccionaron para el paso de concentración, diálisis y liofilización, comprendieron del eluido 4 (Figura 2A, Calle 10) hasta el eluido 13 (Figura 2B, Calle 7).

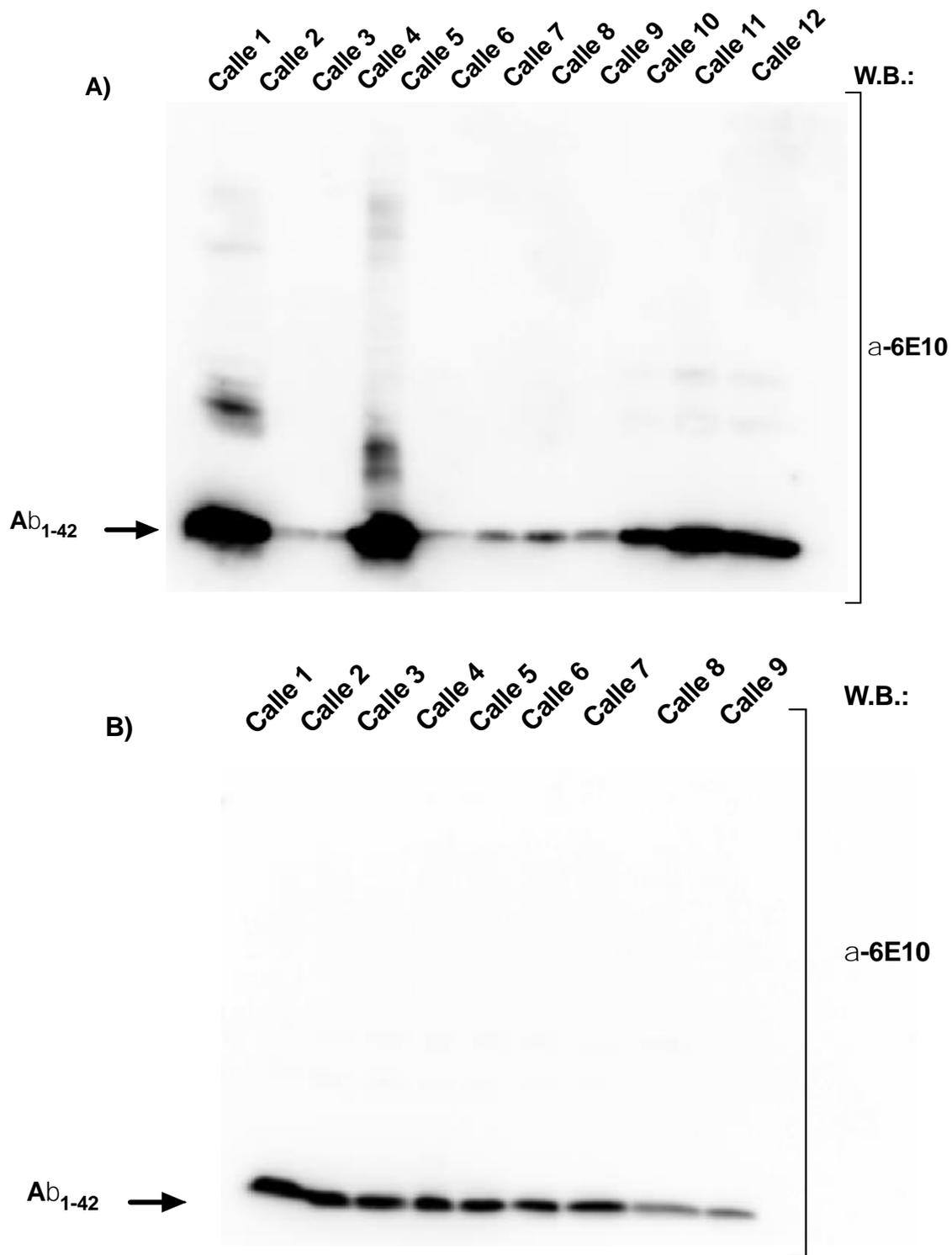


Figura 2. Caracterización de los pasos de purificación del $A\beta_{1-42}$. Figura representativa de las fracciones obtenidas a lo largo del proceso de purificación. **A)** Calle 1: Pellet de bacterias. Calle 2, 3 y 4: sobrenedantes durante los pasos de sonicación y centrifugación, correspondiendo la calle 2 al sobrenedante 1, la calle 3 al sobrenedante 2 y la calle 4 al sobrenedante 3. Calle 5: sobrenedante 4 antes de cargar a la cromatografía. Calle 6: paso de lavado previo a la elución. Calle 7: eluido 1. Calle 8: eluido 2. Calle 9: eluido 3. Calle 10: eluido 4. Calle 11: eluido 5. Calle 12: eluido 6. **B)** Calle 1: eluido 7. Calle 2: eluido 8. Calle 3: eluido 9. Calle 4: eluido 10.

Calle 5: eluido 11. Calle 6: eluido 12. Calle 7: eluido 13. Calle 8: eluido 14. Calle 9: eluido 15.

2.4.3.3. Concentración, diálisis y liofilización.

Para descartar las proteínas de alto peso molecular (>30kDa) se utilizaron los concentradores AMICON Ultra-30K (Sigma). Primero, se lavó el filtro con H₂O destilada estéril centrifugando 20min a 4000 r.p.m. Posteriormente, se concentraron las proteínas mayores de 30kDa en 200μL, centrifugando 30min a 4000 r.p.m. Éstas fueron descartadas y el volumen eluido se concentró en tubos AMICON Ultracel-3K (Sigma) centrifugando 1 hora a 4000 r.p.m. El tubo fue previamente lavado con H₂O destilada estéril de la misma forma que el tubo AMICON Ultra-30K. La muestra concentrada se dializó añadiendo H₂O de grado biología molecular y centrifugando 1 hora adicional a 4000 r.p.m. Finalmente, la muestra de Aβ₁₋₄₂ se liofilizó durante la noche en un liofilizador (modelo). El liofilizado obtenido se pesó y se congeló a -20°C.

2.4.3.4. Generación de oligómeros.

Para realizar los experimentos con oligómeros de péptido Aβ₁₋₄₂, los liofilizados obtenidos en la purificación del Aβ₁₋₄₂ se procesaron siguiendo el protocolo descrito por Klein (Klein 2002). Brevemente, se pesaron los liofilizados en una báscula de precisión y se añadieron 735 μl de hexafluoroisopropanol (HFP) (Sigma) por cada 3,1 mg de Aβ₁₋₄₂ liofilizado. Posteriormente, se disolvió el liofilizado e presencia de HFP en un sonicador de baño y se repartió la suspensión en alícuotas de 10 y 15 μL, dejándolas secar en la cámara de extracción. Una vez secos, se terminó de secar los restos de HFP en un concentrador de vacío durante 10 minutos (modelo) y se almacenó el pellet a -80°C.

La tarde anterior a realizar el experimento, se resuspendió este pellet con 5mM de DMSO en medio Ham's F12 llevándolo a una concentración final de trabajo de 100 μM de Aβ₁₋₄₂. El volumen necesario de 5mM DMSO en medio Ham's F12 se calculó a partir del peso que se disolvió de Aβ₁₋₄₂, conociendo que su masa molecular teórica es de 4514,10 g/mol y teniendo en cuenta el volumen total de HFP repartido en los tubos. La alícuota resuspendida se guardó a 4°C durante toda la noche. En la Figura 3 se observa las distintas formas de Aβ₁₋₄₂

que se obtiene a partir de los liofilizados de A β ₁₋₄₂ recombinante comparado al A β ₁₋₄₂ comercial (Bachem).

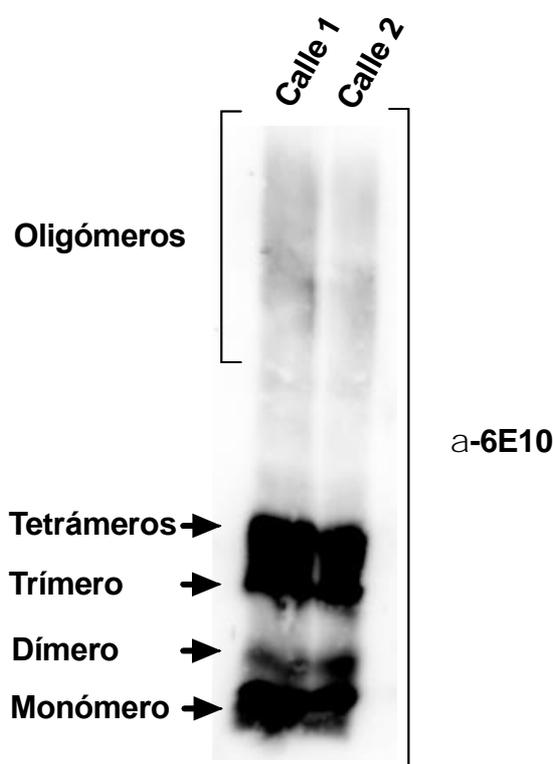


Figura 3. Análisis de las formas de A β ₁₋₄₂. En la calle 1 se observan las formas de A β ₁₋₄₂ obtenidas de la generación de oligómeros del A β ₁₋₄₂ comercial y en la calle 2 se observan las del A β ₁₋₄₂ recombinante. En ambas muestras aparecen las formas siguientes: monómeros, dímeros, trímeros, tetrámeros y oligómeros.

2.4.4. Precipitación de afinidad o *pull down*.

Para los ensayos de precipitación por afinidad, el primer paso fue el de unir la proteína de fusión GST-X a la resina de glutathione sepharose (GE Healthcare). Primeramente la columna se equilibró con el tampón de lisis (10 mM Tris pH 7.6; 150 mM NaCl; 1% Igepal-360; 10 mM MgCl₂; 1mM PMSF; 10 μ g/mL Aprotinina; 10 μ g/mL Leupeptina), centrifugando tres veces durante un minuto a 4000 r.p.m.

El acoplamiento se hizo pre-incubando 50uL de suspensión de resina de Glutathione sepharose (GS) con 50 μ g de proteína de fusión GST-X durante una hora a 4°C. Con esto se consiguió que el domino GST de las proteínas de fusión se uniese a la GS.

Preparación de la muestra a analizar: se partieron de 1,8 millones de astrocitos por punto de análisis; a los que se trataron con inhibidores o con el correspondiente vehículo durante una hora a 37 °C y se estimularon durante 30 minutos con A β ₁₋₄₂ a 37 °C. La monocapa de células se lisaron en 500 μ L de tampón de lisis tras lavarlas tres veces con 1xPBS. Después de incubar el lisado durante 20 minutos a 4 °C en un agitador orbital, se centrifugó a 13.500 r.p.m. durante 10 minutos. Se recogieron 80 μ L de sobrenadante como muestra de lisado total. El resto del sobrenadante se incubó 1 hora a 4 °C en presencia de la proteína de fusión acoplada a GS. Los complejos formados se lavaron 3 veces con el tampón de lisis anteriormente descrito. Los complejos fueron finalmente disociados resuspendiendo en 40 μ L de tampón de carga 2X (125 mM Tris-HCl pH7.6; 10% glicerol; 0.001% azul de bromofenol; 2% de SDS; 5% β -Mercaptoetanol).

2.4.5. Inmunoprecipitación.

A diferencia de la precipitación por afinidad, en este caso para enriquecer o concentrar nuestra proteína utilizamos un anticuerpo específico unido a proteína A (GE Healthcare), el procedimiento es muy parecido. Brevemente, una vez sometidos a los cultivos celulares a los diferentes tratamientos. Las células se lisaron en tampón de lisis (20 mM Tris-HCl pH 7.4; 150 mM NaCl; 2 mM MgCl₂; 1 mM EDTA, 0.25% Deoxicolato sódico, 1 mM NaF; 1 mM Na₂VO₃; 1% IGEPAL-360; protease inhibitor cocktail 1X; 1ug/mL Aprotinina, 100 mM PMSF). Se recogieron 80 μ L de esos lisados y se añadieron 80 μ L de tampón de carga 2X. El resto del lisado celular, se centrifugó durante 10 minutos a 4 °C y 13.500 r.p.m. y se recuperó el sobrenadante. Este sobrenadante se puso en contacto con 5 μ L (concentración de anticuerpo en lugar de volumen) de anticuerpo, durante 2 horas a 4 °C. Los inmunocomplejos se acoplan a 50 μ L de sepharosa unida a la proteína A (GE Healthcare) pre-lavada con el tampón de lisis y se incubaron durante una hora a 4 °C. La resina se recogió centrifugando los lisados durante un minuto a 4.000 r.p.m.; y se lavó con el tampón de lisis tres veces.

2.4.6. Cromatografía de afinidad con lectinas.

Se partieron de 2 millones de astrocitos por punto de análisis; a los que se estimularon durante 30 minutos con el agonista ($A\beta_{1-42}$ o LPA) a 37 °C. La monocapa de células se lisó en 500 μ L de tampón RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.4; 150 mM NaCl; 2 mM $MgCl_2$; 1 mM EDTA, 0.25% Deoxicolato sódico, 1 mM NaF; 1 mM Na_2VO_3 ; 1% IGEPAL-360; protease inhibitor cocktail 1X; 1 μ g/mL Aprotinina, 100 mM PMSF, 10 μ M Thiamet-G) tras lavarlas tres veces con 1xPBS. Después de incubar el lisado durante 20 minutos a 4 °C en rotación, se centrifugó a 13.500 r.p.m. durante 10 minutos. Se recogieron 80 μ L de sobrenadante como muestra de lisado total. El resto del sobrenadante se incubó durante toda la noche a 4 °C con la resina WGA previamente equilibrada con 3mL totales de tampón RIPA, centrifugando la resina entre paso y paso durante 1 minuto a 4000 r.p.m. Los complejos se lavaron 3 veces con 1mL de tampón RIPA. Los complejos son finalmente disociados resuspendiendo en 40 μ L de tampón de carga 2X (125 mM Tris-HCl pH7.6; 10% glicerol; 0.001% azul de bromofenol; 2% de SDS; 5% β -Mercaptoetanol). Cuando se realizó la cromatografía por afinidad para obtener las proteínas O-GlcNAcizadas a partir de un lisado celular con el fin de enviarlo a ser analizado por espectrometría de masas, los complejos se incubaron con 200 μ L de 20 μ M de GlcNAc durante 10 minutos a 4°C. Las muestras se centrifugaron durante 10 minutos y se envió el sobrenadante al servicio de proteómica de la UPV/EHU.

2.5. Análisis de la expresión génica por RT-PCR.

Se partieron de 5×10^6 células y se extrajo el RNA mediante el método triZOL (Invitrogen). La preparación se trató con DNasa I (Sigma-Aldrich) para la eliminación de DNA en la muestra de RNA. Posteriormente, el RNA se retrotranscribió en cDNA utilizando el High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante, en una Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Con el cDNA resultante, se realizó la amplificación de los genes con el colorante fluorescente SYBR Green (Power SYBR® Green PCR Master Mix, ThermoFisher), utilizando las sondas TaqMan (ThermoFisher) siguientes: Hs00958093_m1 (PYGL), Hs00989942_m1 (PYGM) y Hs00765686_m1

(PYGB). Para el gen control (GAPDH) se utilizan los siguientes oligonucleótidos: GAAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC como forward y TGGCAACAATATCCACTTTAC como reverse. Para evaluar la expresión de las isoformas de LPAR1 se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

- **LPAR1:** ATCTATGTCAACCGCCGCTTCC (forward) y CCGTCAGGCTGGTGTCAATGAG (reverse).
- **LPAR2:** ACGCTCAGCCTGGTCAAGACT (forward) y GCATCTCAGCATCTCGGCAAGA (reverse).
- **LPAR3:** GCTGCTCAACTCCGTCGTGAAC (forward) y TGCCTGTGTCACCTCCTGCTGAG (reverse).
- **LPAR4:** TCCTAGTCCTCAGTGGCGGTAT (forward) y CAGGCTTGCGAAGAGTTCTCAG (reverse).
- **LPAR5:** CTAGCCCTCTGGGTCTTCCT (forward) y CAGTGGTGCAGTGCGTAGTA (reverse).
- **LPAR6:** TCAGTAGTGGCAGCAGTAAGGA (forward) y TCAGGCAGCAGATTCATTGTCA (reverse).

La amplificación se realizó en una C1000 Touch Thermal Cycler (BioRad) y los resultados se analizaron con el software proporcionado por el mismo equipo.

2.6. Electroforesis en geles de acrilamida.

Las muestras que contenían el tampón de carga se hirvieron durante 5 minutos. En un gel desnaturizante de poliacrilamida o fase resolutive, se cargaron 30 µL de cada muestra, junto con marcadores de peso molecular conocido (Sigma-Aldrich) Los geles contenían 375 mM Tris (pH 8.8) (Sigma-Aldrich), 0.1% SDS (Sigma-Aldrich), 0.1% persulfato amónico (Sigma-Aldrich), 0.05% TEMED (Sigma-Aldrich), y el porcentaje indicado de acrilamida-Bis-acrilamida 30% (Sigma-Aldrich). La fase de concentración en la parte superior del gel de separación contenía la misma mezcla que la de separación pero con 125 mM Tris pH 6,8 (Sigma-Aldrich) y 5% de poliacrilamida.

El gel de acrilamida cargado con las muestras se dispuso en un sistema de electroforesis de Bio-Rad Mini Protean 3 en presencia de tampón de Tris-Glicina-SDS (25 mM Tris pH 8.3; 192 mM Glicina; 0,1% SDS) (Sigma-Aldrich) y se aplicó una corriente constante de 100V durante 2 horas.

2.7. Western blot.

Una vez resueltas las proteínas en función de su tamaño (apartado 2.6) , se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad). Para ello, se preparó el cassette de transferencias (Bio-Rad Mini Trans-Blot electrophoretic transfer cell), y se añadió a la cubeta el tampón de transferencia (20% Metanol en 25 mM Tris, 192 mM Glicina) (Sigma-Aldrich) realizándose el proceso de transferencia en 2 horas a 100V constantes.

2.8. Inmunodetección.

Las membranas de nitrocelulosa se bloquearon con 5% de leche libre de grasa (Nestlé Sveltesse) o 4% de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma-Aldrich) en TBST (Tris Buffer Saline Tween: 25 mM Tris-HCl pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.05% Tween-20 (Sigma-Aldrich)) durante una hora a temperatura ambiente. Se lavaron las membranas dos veces con TBST, se les añadió el anticuerpo primario, como se indica en el apartado de resultados, y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Se lavaron las membranas tres veces. Finalmente se volvieron a incubar con un anticuerpo secundario conjugado a HRP (Horseradish Peroxidase) anti-Ratón IgG-HRP o anti-Conejo IgG HRP (GE Healthcare). Las bandas inmunorreactivas se visualizaron mediante ECL Plus (GE Healthcare).

Para re-incubar las membranas con otros anticuerpos, éstas fueron tratadas con Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific) como indica el fabricante durante 15 minutos a temperatura ambiente en agitación. Las membranas se lavaron con abundante TBST durante 10 minutos, y se bloquearon e incubaron con otros anticuerpos, tal y como se ha detallado en el párrafo anterior.

Los anticuerpos utilizados en este trabajo están detallados en el apartado 1.2 de la sección Material y Métodos.

2.9. Análisis proteómico. Identificación de proteínas.

El análisis LC-MS/MS se realizó en el Servicio General de Proteómica-SGIKER de la UPV/EHU. Se utilizó un espectrómetro de masas Q Exactive (Thermo Scientific) acoplado a un sistema cromatográfico Easy-nLC 1000 nanoUPLC System (Thermo Scientific).

Los péptidos digeridos se cargaron en una precolumna Acclaim PepMap100 (75 μm x 2 cm, Thermo Scientific) conectada a una columna analítica Acclaim PepMap RSLC (50 μm x 15 cm, Thermo Scientific). Los péptidos se eluyeron directamente al nanoES Emitter (Thermo Scientific) mediante un gradiente lineal de 5% a 30% de acetonitrilo en 0.1% de ácido fórmico durante 60 min y a un flujo de 300 nl/min.

El espectrómetro de masas Q Exactive se operó en modo “data dependent acquisition (DDA)”. Los espectros MS se adquirieron a una resolución de 70000 (m/z 200) y los espectros de fragmentación a 17500 (m/z 200). Para la selección de los péptidos se utilizó una ventana de 2.0 th y para la fragmentación de los péptidos se aplicó una energía de colisión normalizada de 28. El tiempo máximo de inyección fue de 120 ms para las adquisiciones MS y MS/MS y se utilizaron valores de AGC de 3×10^6 para las adquisiciones MS y de 5×10^5 para las MS/MS.

Los espectros fueron procesados con Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Scientific). Se seleccionó 10 ppm y 0.05 Da como tolerancia para los precursores y fragmentos respectivamente y se permitió un máximo de 1 omisión de corte para la tripsina. Se seleccionó la carbamidometilación de Cys como modificación fija y la oxidación de Met y la adición de N-Acetihexosamina en Ser, Asn y Thr como modificaciones variables. Se utilizó una base de datos SwissProt humana (versión 2013_09). Los resultados obtenidos se exportaron a Microsoft Office Excel (Microsoft) para posteriores análisis.

2.10. Ensayo de actividad de la glucógeno fosforilasa.

El protocolo para medir la actividad de la glucógeno fosforilasa se adaptó de los trabajos publicados por (McInerney et al., 2002; Andersen and Westergaard, 2002). Los cultivos sembrados en monocapas se lavaron tres veces con 1x PBS frío y se resuspendieron en 500 μl de tampón TES (20 mM Tris pH7,4, 1 mM EDTA, 225 mM Sucrosa, 2,5 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 1 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptina, 1 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinina). La suspensión de células se sometió a dos turnos de sonicación en un sonicador (Misonix Inc. Microson™ Ultrasonic Cell Disruptor XL Model DU-2000) a 5000 μm de amplitud de onda durante 10 segundos cada uno, con un turno de reposo de 10 segundos entre ellos, manteniéndose la muestra en todo momento en hielo. Las muestras al finalizar

la sonicación se centrifugaron a 14.000 r.p.m. durante 10 minutos a 4 °C. La fracción soluble se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo y la concentración de proteína se determinó por el método Bradford (Bio-Rad).

Para medir la actividad enzimática, se utilizaron 100 µg de proteína total en tampón de ensayo GP (83.33 mM KH₂PO₄ pH 7.5 (Sigma-Aldrich), 8.3 mM MgCl₂, 7.5 mM EDTA pH 8, 0.83 mM NADP⁺ (Sigma-Aldrich), 1.5 U/mL glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH, Sigma-Aldrich), 1 U/mL fosfoglucomutasa (PGM, Sigma-Aldrich), 1.66 mg/mL glucógeno (Sigma-Aldrich).

Como blanco se utilizaron 100 µg de proteína total en el tampón de ensayo sin las enzimas G6PDH y PGM, ni los sustratos NADP⁺ y . El ensayo de actividad se llevó a cabo incubando la mezcla de la reacción a 37 °C durante 20 minutos y la reacción se paró colocando la placa a sobre hielo 4 °C durante un minuto.

La absorbancia de las muestras fue detectada a 340 nm en un espectrofotómetro (Synergy™HT Multidetecction Microplate Reader, BIOTEK). La cantidad de NADPH formado se determinó utilizando una curva estándar de concentración conocida de NADPH (Sigma-Aldrich).

2.11. Ensayo de O-GlcNAcilación *in vitro*.

Para verificar la O-Glicosilación del LPAR1 se siguió la estrategia planteada por Yuzwa S y Vocadlo D (2017). Para ello, nosotros generamos el plásmido pGEX-LPAR1, el cual codifica para la proteína de fusión GST-LPAR1 (ver apartado 2.2.4). A partir de esta construcción, llevamos a cabo mediante mutagenesis dirigida las siguientes variantes del LPAR1: pGEX-LPAR1^{T43A}, pGEX-LPAR1^{T47A} y pGEX-LPAR1^{T43A+T47A}, como se describe en el apartado 2.2.6. Estos plásmidos se co-transformaron en *E.coli*, cepa BL21 junto con el plásmido pMAL-OGT o su mutante inactivo pMAL-OGT^{H567A}, los cuales codifican para la proteína de fusión MBP-OGT_{w.t.} o MBP-OGT^{H567A} (ver apartado 2.2.4). Se indujo su expresión (ver apartado 2.3.1), añadiendo una incubación adicional de 12-16 horas a 22°C y en agitación constante a 220 r.p.m.. Una vez se concentraron las bacterias por centrifugación a 4000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C, se seleccionaron los clones doblemente positivos como se muestra en la Figura 4.

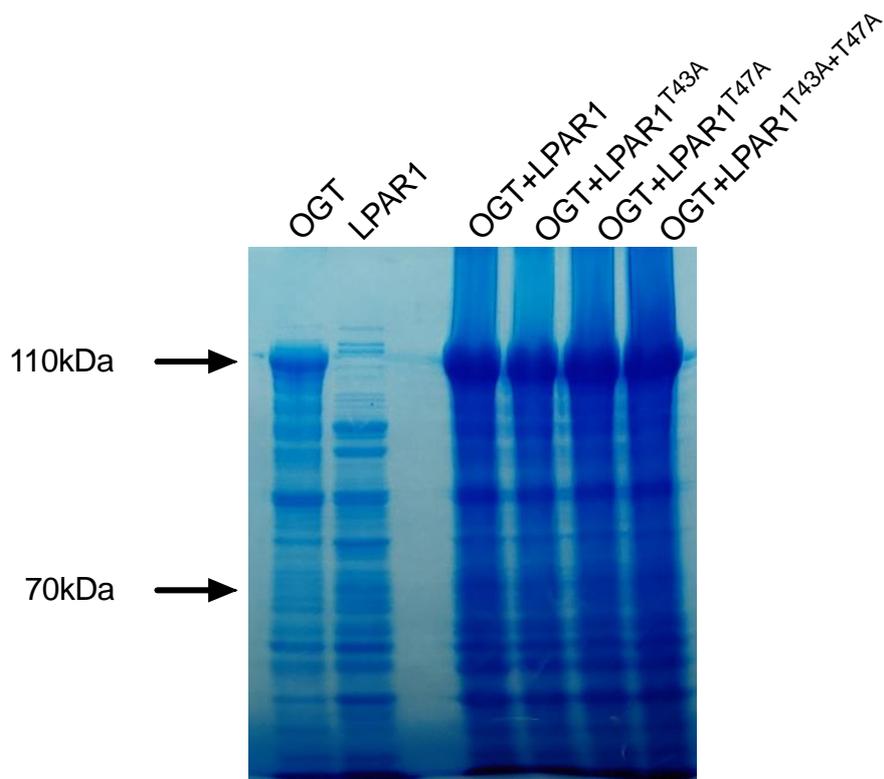


Figura 4. Proteínas de fusión MBP-OGT, GST-LPAR1, GST-LPAR1^{T43A}, GST-LPAR1^{T47A} y GST-LPAR1^{T43+T47A}. Colonias positivas para MBP-OGT (calle1) y GST-LPAR1 (calle 2) y doble positivas pMAL-OGT y los plásmidos GST-LPAR1 con sus variantes (calles 4-7). Las proteínas se separaron por SDS-PAGE y los geles se visualizaron con tinción de Coomassie.

La purificación de GST-LPAR1 se realizó siguiendo los pasos del apartado 2.4.3.3. y se cargaron los lisados totales de bacterias antes de ser purificados con la resina de glutathione sepharose y los purificados en un gel de acrilamida SDS-PAGE al 8%.

2.12. Medición de especies reactivas de oxígeno.

Se partieron de 150.000 células por condición, tratadas o no con inhibidores y posteriormente, con el agonista deseado ($A\beta_{1-42}$ o LPA). Se lavaron las monocapas con 1xPBS dos veces, con cuidado de no levantar las células. Posteriormente, se trataron con 5 μ M de sonda CM-H2DCFDA (Invitrogen) durante 20 minutos a 37°C y se lavaron dos veces con 1xPBS para retirar el exceso de sonda. La fluorescencia se midió en el fluorímetro Synergy™ HT Multidetecction Microplate Reader, BIOTEK con una longitud de onda de excitación de 485nm y una longitud de onda de emisión de 530nm. Los datos obtenidos se relativizan respecto al control negativo.

2.12. Técnicas de inmunofluorescencia.

2.12.1. Expresión de GFAP en astrocitos.

Tras 72 horas de tratamiento o no con A β ₁₋₄₂, los astrocitos se lavaron 3 veces con 1xPBS y se fijaron durante 10 minutos en una solución de 4% PFA en 1xPBS. Tras lavar tres veces con 1xPBS, se bloqueó y permeabilizaron las células incubándolas 1 hora con una solución de 0.3% de Triton-X, 5% de BSA en 1xPBS. Al terminar, se incubaron las células con α -GFAP (Dako) a 1:500 en 1xPBS durante toda la noche a 4°C. Después, se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad con Alexa 488 goat α -Rabbit o con Alexa 647 donkey α -Rabbit (Invitrogen) (1:2000). Finalmente, se tiñeron los núcleos con DAPI a 1:6000 durante 10 minutos y se montaron las muestras con fluoromont en un portaobjetos. Entre cada paso las preparaciones se lavaron 3 veces con 1xPBS.

Las fotografías se tomaron en el microscopio confocal Leica TCS SP8 mediante detección secuencial y cuidando los niveles de exposición a fin de evitar la saturación de píxeles en la imagen. Los parámetros fueron los mismos para todas las muestras de un mismo experimento con el fin de poder analizar la fluorescencia de las células. Finalmente, las fotografías fueron procesadas mediante el software ImageJ.

2.12.2. Marcaje de los depósitos de glucógeno intracelular.

Para visualizar el glucógeno celular por inmunofluorescencia, se utilizó la proteína recombinante GST-GYSC y se adaptó el protocolo de Skurat y colaboradores (Skurat et al. 2017).

Los astrocitos se lavaron tres veces con 1xPBS tras añadirles los tratamientos correspondientes e incubándolos el tiempo deseado a 37°C. Se fijaron con metanol frío durante 6 minutos a -20°C y se permeabilizaron y bloquearon con una solución de 0.1% Triton-X, 5%BSA en 1xPBS durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se incubaron las células con 0.3 μ g/ml de sonda GYSC diluida en solución de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente. Una vez terminada la incubación, se incubaron 2 horas adicionales con el anticuerpo primario α -GST diluido a 1:200 en la solución de bloqueo. A continuación, se incubaron las células con Alexa 488 goat α -rabbit o Alexa 647 donkey α -Rabbit,

diluido a 1:2000 en solución de bloqueo, durante 1 hora a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad. Finalmente, se tiñeron los núcleos con DAPI en una proporción 1:6000 y se montaron los *coverslips* en portaobjetos utilizando fluoromont. Entre cada paso las preparaciones se lavaron 3 veces con 0.1% Triton-X en 1xPBS.

Las fotografías se toman en el microscopio confocal Leica TCS SP8 mediante detección secuencial y cuidando los niveles de exposición a fin de evitar la saturación de píxeles en la imagen. Los parámetros fueron los mismos para todas las muestras de un mismo experimento y se realizó un zoom en células aleatorias de la muestra con el fin de visualizar mejor los depósitos de glucógeno. Finalmente, las fotografías fueron procesadas mediante el software ImageJ.

2.12.3. Marcaje de los depósitos de glucógeno intracelular en tejido de ratón.

Para los análisis del glucógeno por inmunohistoquímica, se utilizaron rodajas de 40µm de cerebros de 6 animales de 18 meses: 3 ratones control y 3 ratones 3xTg-AD.

Primeramente, se realizó un antígeno retrieval a las rodajas (H-3300, Vector Laboratories) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los tejidos fueron permeabilizados con etanol 100% frío durante 10 minutos a -20°C y se bloqueó a 4°C durante toda la noche en agitación constante con tampón de bloqueo (0.1% Triton-X, 5%BSA en 1xPBS). Al día siguiente, se incubaron los tejidos durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación constante con 0,5 µg/mL de sonda GYSC diluida en tampón de bloqueo. Se lavaron 4 veces con 0.1% Triton-X en PBS realizando un primer paso de 10 minutos de lavado en agitación constante y 3 pasos de 5 minutos cada uno. Los tejidos se incubaron con 1:500 de α-GST y con 1:500 de α-GFAP diluidos en tampón de bloqueo durante toda la noche en agitación constante y a 4°C. Al día siguiente, los tejidos se lavaron 4 veces con 0.1% Triton-X en 1xPBS durante 5 minutos, siendo de 10 minutos el primer paso de lavado. Seguidamente, los tejidos se incubaron durante 1 hora en agitación constante a temperatura ambiente con 1:500 de Goat α-Rabbit Alexa 594 y con 1:500 de Goat α-Mouse IgG1 Alexa 647 en 0.1% Triton-X en 1xPBS. Se lavaron 3 veces durante 5 minutos con

1xPBS y se trataron con autofluorescence eliminator (Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los tejidos fueron incubados durante 8 minutos en agitación constante y a temperatura ambiente con DAPI y tras lavarlos 3 veces con 1xPBS, se montaron con fluoromont.

Las fotografías se toman en el microscopio confocal Leica TCS SP8 mediante detección secuencial y cuidando los niveles de exposición a fin de evitar la saturación de píxeles en la imagen. Los parámetros fueron los mismos para todas las muestras de un mismo experimento y se realizó un zoom en células aleatorias de la muestra con el fin de visualizar mejor los depósitos de glucógeno. Finalmente, las fotografías fueron procesadas mediante los softwares Hyugens e ImageJ.

2.12.4. Localización de Rac1, PYGM y glucógeno.

Para hacer el triple marcaje en las células a Rac1, PYGM y glucógeno se siguió la siguiente estrategia. Rac1 se marcó en verde transfectando a los astrocitos un plásmido que codifica para Rac1 wt etiquetado con la proteína fluorescente EGFP. PYGM se transfectó con la etiqueta HA y el glucógeno se marcó utilizando la sonda GYSC.

Los astrocitos se lavaron tres veces con 1xPBS tras añadirles los tratamientos correspondientes e incubándolos el tiempo deseado a 37°C. Se fijaron con una solución de 4% de PFA durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras otros tres lavados con 1xPBS, se bloquearon y permeabilizaron incubándolos con 0.3% de Triton-X, 5% de BSA en 1xPBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, se incubaron con α -HA (Covance) diluido a 1:1000 en 1xPBS durante toda la noche a 4°C y con Alexa 597 goat α -Mouse (1:500) durante 1 hora a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad. Una vez termina la incubación con el anticuerpo secundario, se inició la incubación con la sonda GYSC tal y como se indica en el apartado 2.12.2. Finalmente, los núcleos se tiñeron con DAPI a 1:6000 y las muestras se montaron con fluoromont en un portaobjetos.

Las fotografías se toman en el microscopio confocal Leica TCS SP8 mediante detección secuencial y cuidando los niveles de exposición a fin de evitar la saturación de píxeles en la imagen. Los parámetros fueron los mismos para

todas las muestras de un mismo experimento y se realizó un zoom en células aleatorias de la muestra con el fin de visualizar mejor los depósitos de glucógeno. Finalmente, las fotografías fueron procesadas mediante el software ImageJ.

2.14. Medición glicolisis por Seahorse.

La medición de la glicolisis de los astrocitos se realizó con el kit de Seahorse Glycolitic Rate Assay (Agilent Technologies).

El día del ensayo, se partió de 40.000 células por pocillo sembradas en medio suplementado con 1% de FBS, tratadas o no con inhibidores, y posteriormente con $A\beta_{1-42}$. Se lavó la monocapa de células 1xPBS dos veces y se incubó con medio de ensayo (medio XF pH 7.4, Agilent Technologies) a 37°C en un incubador de hipoxia durante 45 minutos. Durante este tiempo, se preparó 5 μ M de Rotenona/antimicina (Rot/AA) y 500 μ M de 2-Deoxiglucosa (2-DG) en el cartucho de ensayo previamente hidratado con H₂O de biología molecular durante la noche anterior y después, durante 1 hora con solución de calibrado (Agilent Technologies) en la cámara de hipoxia. Una vez transcurrida la incubación de las células, se cargó el cartucho junto a la placa de células al analizador de Seahorse (XFe96 Analyzer). Se configuró el puerto A para cargar 22 μ L de 25mM Rotenona/Antimicina y el puerto B para cargar 25 μ L de 500mM de 2-deoxiglucosa, con 4 inyecciones en cada condición, añadiendo 4 mediciones previas a la primera inyección de Rotenona/Antimicina. Cuando el ensayo finalizó, se lisaron las células y se determinó la proteína total de los lisados con el fin de normalizar los datos. Éstos se analizaron con el software Wave (Agilent) y se exportaron a Microsoft Excel.

2.15. Medición de los niveles de lactato.

Las medición de los niveles de lactato se realizó con Lactate Assay Kit (Sigma). Se partieron de 2·10⁶ astrocitos por punto de análisis y se trataron con $A\beta_{1-42}$. Las células se lisaron con 200 μ L de tampón de ensayo y se centrifugaron a 13500 r.p.m. durante 10 minutos. La solución de reacción se preparó con 2 μ L de sonda de lactato, 2 μ L de mix de enzimas, 26 μ L de muestra y 20 μ L de tampón de ensayo. Se realizó una recta patrón de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 nmol de solución estándar. Las reacciones se incubaron durante 30 minutos en

oscuridad y se midió la absorbancia a A_{570} . La concentración de lactato en ng/ μ L se calculó a partir de la recta patrón y de la masa molecular del lactato (89,07 ng/nmol).

2.16. Determinación del glucógeno celular por espectrometría.

Para determinar el glucógeno por espectrometría, se basó la metodología descrita por Schnier y colaboradores (Schnier et al. 2003). Para ello, 3.2 millones de astrocitos fueron estimulados o no con 1 μ M de $A\beta_{1-42}$ oligomérico o 100nM de LPA. Las células fueron lavadas con 1xPBS frío y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos. El pellet celular fue resuspendido en 400 μ L de 30% de KOH y se hirvió durante 15 minutos. A continuación, se añadió 200 μ L de Na_2SO_4 y el glucógeno se precipitó añadiendo 1mL de etanol 100% y centrifugando a 13500 rpm durante 10 minutos a 4°C. El pellet fue resuspendido en 1mL de H_2O/H_2SO_4 (ratio 3:7.6) con 0.15% de antrona y se hirvió de nuevo a 95°C durante 15 minutos. La absorbancia fue medida en una longitud de onda a 620nm en un espectrómetro (Synergy™HT Multidetecction Microplate Reader, BIOTEK) y el contenido de glucógeno se calculó a partir de una curva estándar de concentraciones de glucógeno conocidas.

Resultados

1. Los oligómeros de A β ₁₋₄₂ activan el eje Rac1/PYGM en astrocitos humanos inmortalizados

1.1. Los oligómeros de A β ₁₋₄₂ activan a la glucógeno fosforilasa.

Nuestro grupo ha descrito que la ruta de señalización de Rac1/glucógeno fosforilasa (PYG) está íntimamente ligada a la respuesta inmune de los linfocitos T (Arrizabalaga et al. 2012; Llaveró et al. 2015; Llaveró et al. 2016). Y por otro lado, ha demostrado que, en el contexto de la enfermedad de Alzheimer, los oligómeros de A β ₁₋₄₂ inducen la activación de Rac1, controlando tanto el programa de muerte neuronal (Manterola et al. 2013), como la generación de especies reactivas de oxígeno y la astrogliosis (Wyssenbach et al. 2016).

En base a todo ello, nosotros planteamos examinar si la activación de la GTPasa Rac1 mediada por los oligómeros de A β ₁₋₄₂ implicaba también la activación de la PYG. Para ello, cultivos de astrocitos humanos inmortalizados, previamente deprivados de FBS durante 12-16 horas, se estimularon o no con 5 μ M de oligómeros de A β ₁₋₄₂ a 37°C durante los tiempos indicados (Figura 1A), las monocapas celulares se resuspendieron en tampón TES y se lisaron por sonicación. Las proteínas solubles de los lisados se cuantificaron por el método de Bradford. Para llevar a cabo el ensayo enzimático de actividad de la PYG, se utilizaron 100 μ g de proteína total por condición y se siguió el protocolo descrito en el apartado 2.11.1 de Materiales y Métodos.

Como muestra la Figura 1A, los oligómeros de A β ₁₋₄₂ producían un aumento de la actividad de la PYG, pasando de una actividad basal de $2,78 \pm 0,16$ nmol/mg·min, a una actividad de $3,85 \pm 0,07$ nmol/mg·min a los 15 minutos de tratamiento y llegando a la actividad máxima ($4,76 \pm 0,26$ nmol/mg·min) en 30 minutos para al cabo de 1 hora decaer a casi valores basales ($3,19 \pm 0,27$ nmol/mg·min). Estos resultados sugerían que los oligómeros de A β ₁₋₄₂ inducían una activación transitoria de la PYG, dándose su máxima actividad a los 30 minutos de exposición a los oligómeros de A β ₁₋₄₂.

Una vez averiguado el tiempo mínimo de exposición a los oligómeros de A β ₁₋₄₂ al que se alcanza la máxima actividad de la PYG, quisimos determinar qué

concentración mínima de A β ₁₋₄₂ oligomérico era necesaria para inducirla. Por lo que, cultivos de astrocitos humanos inmortalizados, previamente privados de FBS durante 12-16 horas, se estimularon o no durante treinta minutos con las concentraciones de oligómeros de A β ₁₋₄₂ indicadas (Figura 1B). Las monocapas celulares se resuspendieron en tampón TES y se lisaron por sonicación. Las proteínas solubles de los lisados se cuantificaron por el método de Bradford. Para llevar a cabo el ensayo enzimático de actividad de la PYG, se utilizaron 100 μ g de proteína total por condición y se siguió el protocolo descrito en el apartado 2.11.1. de Materiales y Métodos.

Como muestra la Figura 1B, a partir de 1 μ M de oligómeros de A β ₁₋₄₂ se alcanzaba el valor máximo de actividad de la PYG, pasando de 2,91 \pm 0,168 nmol/mg·min (Figura 1B, barra 1) hasta 5,07 \pm 0,169 nmol/mg·min (barra 3). A concentraciones mayores de 1 μ M de oligómeros de A β ₁₋₄₂ los valores de actividad de la PYG fueron similares a los de 1 μ M, siendo de 5,10 \pm 0,196 nmol/mg·min (Figura 1B, barra 4) y de 4,99 \pm 0,20 nmol/mg·min (Figura 1B, barra 5). Utilizando 0,5 μ M de A β ₁₋₄₂ oligomérico los valores de actividad de la PYG alcanzaron un valor medio de 3,68 \pm 0,233 nmol/mg·min.

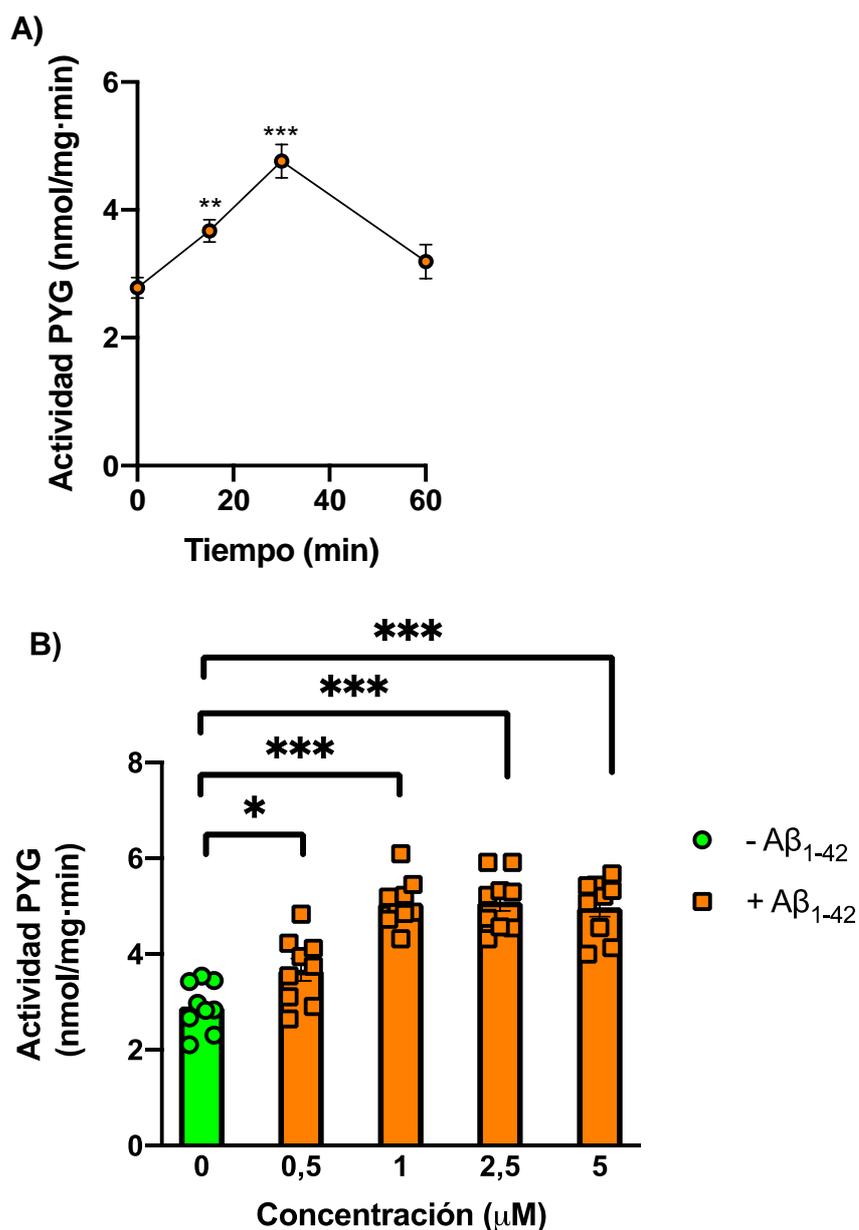


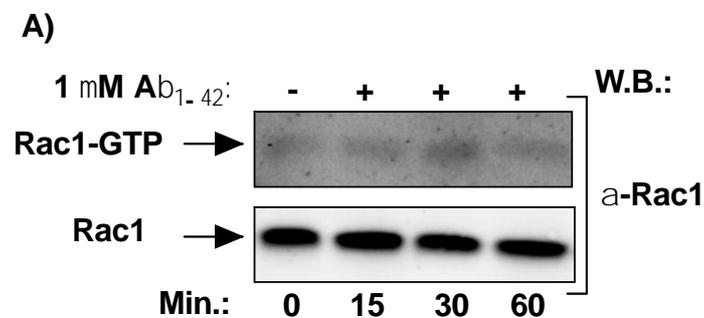
Figura 1. Los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ inducen la activación transitoria de la PYG en astrocitos humanos immortalizados. **A)** 1 millón de astrocitos por condición se estimularon con $5\mu\text{M}$ de $A\beta_{1-42}$ a diferentes tiempos como se indica. **B)** 1 millón de astrocitos por condición se estimularon durante 30 minutos con las concentraciones de $A\beta_{1-42}$ indicadas. La actividad de la PYG se determinó midiendo la cantidad de NADPH generado y se expresó como $\text{nmol/mg}\cdot\text{min}$. La gráfica representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado, y el análisis estadístico t-Student resultó ser significativo (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Estos resultados nos permitieron establecer por un lado el tiempo de exposición de los cultivos celulares a los oligómeros de $A\beta_{1-42}$, así como su concentración mínima eficaz para activar la PYG.

1.2. Los oligómeros de A β ₁₋₄₂ activan la GTPasa Rac 1

En base al resultado anterior, examinamos la cinética de activación de la GTPasa Rac1 en presencia de los oligómeros de A β ₁₋₄₂. Para ello, los cultivos de astrocitos deprivados de FBS durante 12-16 horas, se trataron o no con 1 μ M de A β ₁₋₄₂ a 37°C y a diferentes tiempos como se indica en la Figura 2. Al finalizar la incubación, las células se lisaron con tampón RIPA. Los lisados se incubaron con la proteína de fusión GST-RBD de PAK1 previamente conjugada a la resina de glutatión sefarosa y los complejos de afinidad se disociaron con tampón de carga, se separaron las proteínas por SDS-PAGE seguidas de Western blot y las membranas se incubaron con anticuerpos específicos, las bandas inmuno-reactivas se visualizaron con ECL.

Como se esperaba, los oligómeros de A β ₁₋₄₂ inducían la activación de Rac1 (Rac1-GTP), alcanzando su máxima activación a los treinta minutos, para posteriormente decaer a valores basales al cabo de una hora de tratamiento con el A β ₁₋₄₂ oligomérico (Figura 2A, primer panel y Figura 2B). Los niveles de expresión de Rac1 total se verificaron también por Western blot (Figura 2A, segundo panel).



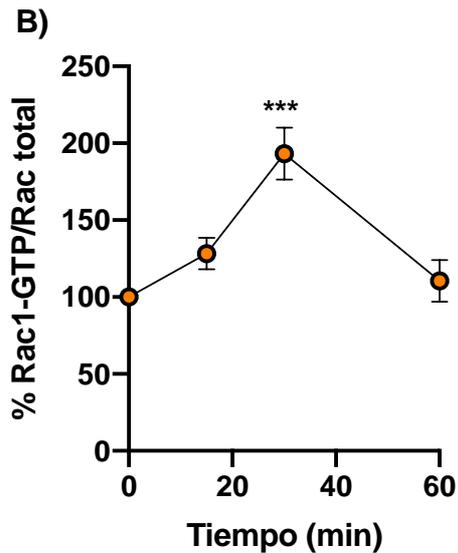


Figura 2. Los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ inducen la activación transitoria de Rac1 en astrocitos humanos immortalizados. 2 millones de células por condición se trataron o no con $1\mu\text{M}$ de $A\beta_{1-42}$ como se indica. Los extractos celulares se usaron para **A)** medir la activación de Rac1 mediante precipitación por afinidad o ensayo de *pulldown* utilizando la proteína de fusión GST-RBD-PAK (primer panel), y para determinar el Rac1 total presente en la muestra (segundo panel). Es representativa de un experimento independiente llevada a cabo por quintuplicado. **B)** La cinética de activación de Rac1 representa la Media \pm SEM de las densitometrías de los 5 experimentos independientes. El análisis estadístico de la t-Student resultó ser significativo en treinta minutos de estimulación (** $p < 0,001$).

La activación de Rac1 mediada por los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ en astrocitos seguía el mismo patrón que la activación de la PYG, con un estado máximo de activación a los 30 minutos de exposición a los oligómeros de $A\beta_{1-42}$.

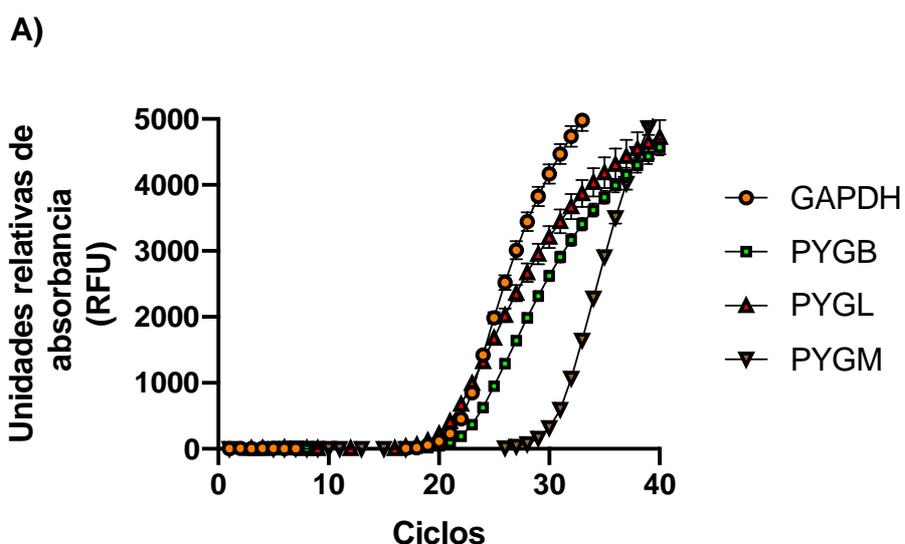
1.3. Niveles de expresión de las isoformas de la PYG en la línea humana de astrocitos.

La PYG es una familia de proteínas constituida por tres isoformas: la de hígado (PYGL), la de músculo (PYGM) y la fetal o de cerebro (PYGB). Se ha considerado que las tres son específicas de tejido u órgano, de ahí su nombre. Contrariamente a este dogma, de la especificidad isoforma/tejido, nuestro grupo desveló que la isoforma muscular (PYGM) se expresaba en linfocitos T y era importante en el control de la migración y proliferación de este linaje hematopoyético (Arrizabalaga et al. 2012). Esto nos hizo pensar que la PYGM, al igual que las otras isoformas, podía expresarse en otros tejidos además de a

los que originalmente se hace referencia. Entre estos tejidos o linajes celulares se encuentran los astrocitos.

Para determinar la expresión de las isoformas de la glucógeno fosforilasa en la línea de astrocitos humanos, se partió de 5 millones de células y se realizó la extracción de RNA mediante el método TRYzol. Seguidamente, se retrotranscribieron los RNA a cDNAs y se analizó la expresión de las distintas isoformas de la PYG (B, L y M) por RT-PCR, (ver apartado 2.5 de Material y Métodos). La proporción de ARNm se obtuvo comparando los valores medios del umbral del ciclo (Ct) de cada gen con los valores medios de Ct del gen control *gapdh*, siguiendo la formula $2^{-\Delta Ct}$.

Como muestra la Figura 3, los astrocitos humanos expresaban las tres isoformas de la PYG. La comparación de la expresión de cada una de ellas se hizo con respecto a un gen *house-keeping* (control) como es *gapdh*. La Figura 3A muestra las curvas obtenidas de unidades de relativas de absorbancia (RFU) respecto los ciclos de la RT-PCR de cada condición. Como puede observarse en ella, la PYGL es la isoforma más abundante en los astrocitos humanos inmortalizados, seguida de la isoforma B, y por último, la isoforma M. Se encontró que el nivel de mRNA respecto al gen control de las isoformas fue de: $0,007 \pm 0,003$ (*pygb*), $0,041 \pm 0,005$ (*pygl*) y $0,002 \pm 0,001$ (*pygm*) (Figura 3B).



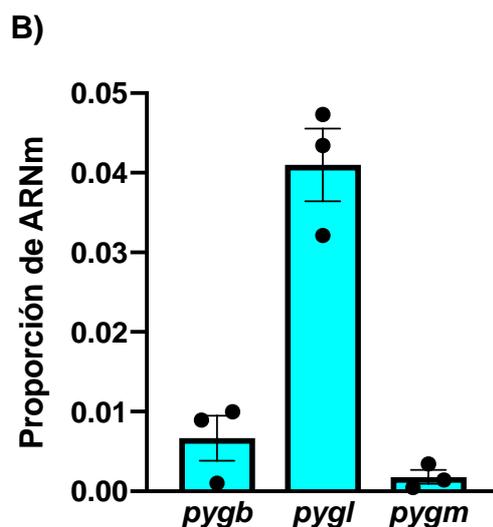


Figura 3. Expresión de las tres isoformas de la glucógeno fosforilasa (B, L y M) en astrocitos humanos inmortalizados. A) Unidades relativas de absorbancia (RFU) \pm SEM de los cuatro genes analizados (*gapdh*, *pygb*, *pygl* y *pygm*). B) Proporción de mRNA respecto al gen control *gapdh*, la cual se calculó a partir de la fórmula $2^{-\Delta Ct}$. El histograma representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado, y el análisis estadístico t-Student resultó ser significativo (###<0,001).

En resumen, los astrocitos humanos inmortalizados expresan las tres isoformas de la glucógeno fosforilasa, siendo la predominante la isoforma de cerebro, seguida de la de músculo y la minoritaria la de hígado.

1.4. La activación de la glucógeno fosforilasa mediada por oligómeros de A β ₁₋₄₂ depende de la GTPasa Rac1.

En base a los resultados precedentes, nosotros examinamos si la actividad de la PYG dependía o no de la GTPasa Rac1. Para abordar este objetivo, se partió de 4 millones de células por condición y las transfectamos con un vector vacío o con la forma constitutivamente activa de Rac1 (pEGFP-Rac^{Q61L}) (ver apartado 2.1.2.1.). 24 horas post-transfección, las células se privaron durante 12-16 horas de FBS y se estimularon o no con 1 μ M de A β ₁₋₄₂ durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, las células se despegaron de la placa con el tampón TES y se lisaron por sonicación. Las proteínas solubles de los lisados se cuantificaron por el método de Bradford (Bio-Rad). Para llevar a cabo el ensayo enzimático se utilizaron 100 μ g de proteína total por condición y se siguió el protocolo descrito en el apartado 2.11.1 de Materiales y Métodos.

Como se esperaba, los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ inducían la activación de la PYG (Figura 4, barra 2 ($5,49 \pm 0,172$ nmol/mg·min) comparada con el control (barra 1, ($2,97 \pm 0,126$ nmol/mg·min)). Ahora bien, la sobreexpresión *per se* de la forma constitutivamente activa de Rac1 mediaba una fuerte activación de la PYG comparable a la producida por los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ (Figura 4, barra 3 ($4,58 \pm 0,146$ nmol/mg·min)).

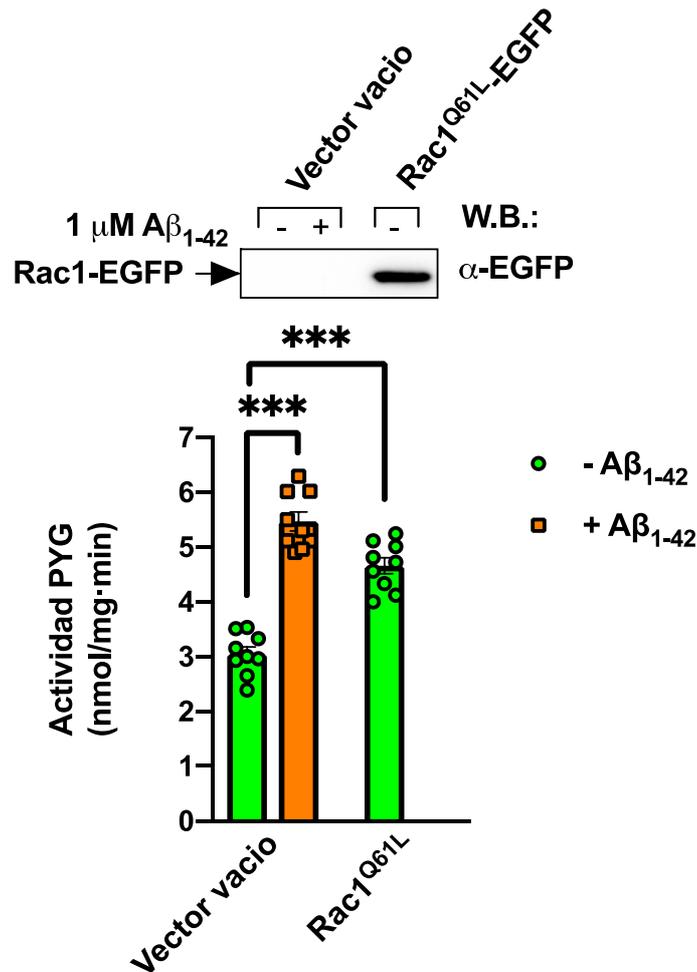


Figura 4. Rac1 activa a la PYG en astrocitos humanos inmortalizados. 4 millones de astrocitos fueron transfectados con Rac1^{Q61L} o con pEGFP (vector vacío), se determinó la actividad de la PYG midiendo la cantidad de NADPH generado y se expresó como nmol/mg·min. El histograma representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado, y el análisis estadístico t-Student resultó ser significativo ($***p < 0,001$). El panel superior muestra la expresión de Rac1^{Q61L} y es representativo de tres experimentos independientes.

Este resultado sugería que la GTPasa Rac1, al igual que ocurría en linfocitos T, podría mediar la activación de la PYG en astrocitos. Con objeto de consolidar este resultado, investigamos la posible implicación de Rac1 en la activación de la PYG desde otra perspectiva: transfectando esta vez, los astrocitos con una forma inactiva de Rac1 (Rac1^{T17N}). Se siguió el protocolo de cultivo de los astrocitos y privación de FBS descrito previamente, y se trataron o no las células con 1 μM de Aβ₁₋₄₂ oligomérico durante 30 minutos. Una vez terminada la incubación, se lisaron las células y se procedió a llevar a cabo el ensayo de actividad de la PYG.

Como era de esperar, los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ inducían la activación de la PYG (Figura 5, barra 2 (5,30 ± 0,24 nmol/mg·min)) comparada con el control (barra 1, 3,21 ± 0,21 nmol/mg·min). Sin embargo, las células transfectadas con la forma inactiva de Rac1 (Rac1^{T17N}), no mostraban actividad de la PYG incluso en presencia de los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ (Figura 5, barras 3 (2,74 ± 0,22 nmol/mg·min) y 4 (3,32 ± 0,16 nmol/mg·min).

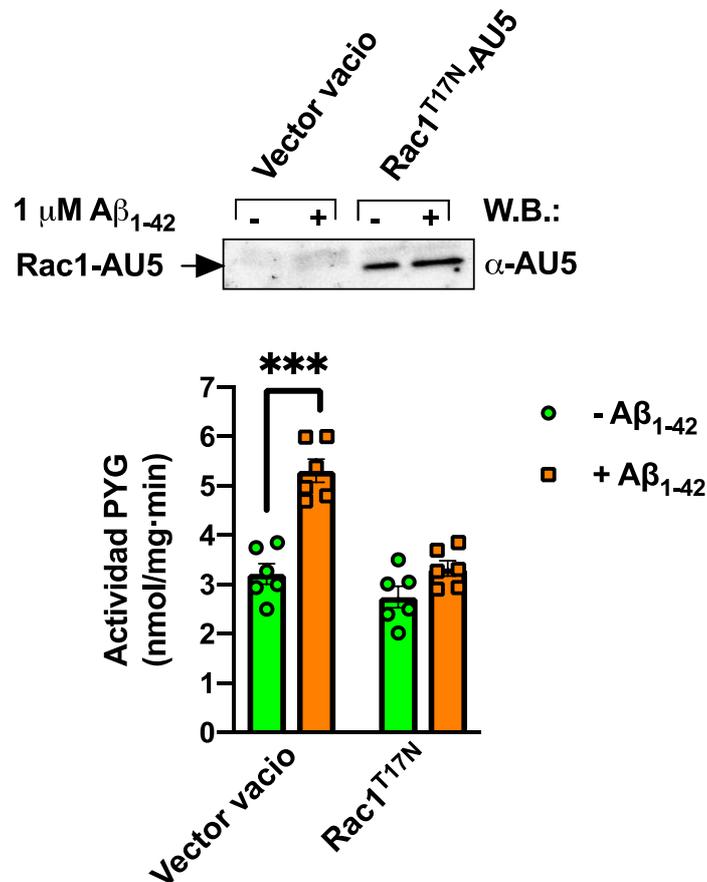


Figura 5. Rac1 activa a la PYG en astrocitos humanos inmortalizados. 4 millones de astrocitos transfectados con Rac1^{T17N} o con pCEFL-AU5 (vector vacío). La actividad de la PYG se determinó midiendo la cantidad de NADPH generado y se expresó como nmol/mg-min. El histograma representa la media \pm SEM de dos experimentos independientes llevados a cabo por triplicado, y el análisis estadístico t-Student resultó ser significativo (**p<0,001). El panel superior representa la expresión de Rac1^{T17N} y es representativo de tres experimentos independientes.

El conjunto de estos resultados sugiere por un lado que Rac1 media la activación de la PYG en astrocitos humanos inmortalizados y por otra que los oligómeros de A β ₁₋₄₂ controlan la activación de la PYG por medio de la GTPasa Rac1.

1.5. El eje transductor constituido por los oligómeros de A β ₁₋₄₂ y Rac1 conduce a la activación de la isoforma muscular de la PYG.

Dado que los astrocitos humanos inmortalizados expresan las tres isoformas de la PYG (Figura 3), el siguiente objetivo fue examinar si la isoforma muscular de la PYG estaba involucrada en este eje de señalización gobernado por los oligómeros de A β ₁₋₄₂ y Rac1. Para ello, y teniendo en cuenta que nuestro grupo de investigación había identificado la región de la PYGM que se unía a la forma activa de Rac1 y a la que denominó RBD-PYGM (Arrizabalaga et al. 2012), nosotros desarrollamos un péptido basado en esta región de unión de la PYGM a la GTPasa Rac1 forma activa (Rac1-GTP), a la que nombramos TAT-RBD-PYGM, descrito en el apartado 2.2.3.4. El TAT-RBD-PYGM es un péptido permeable que interfiere en la interacción endógena de Rac1-GTP con PYGM.

Los cultivos de astrocitos, previamente deprivados durante 12-16 horas de FBS, se incubaron durante 1 hora a 37°C con 70 ng/ μ l de TAT-RBD-PYGM o TAT-EGFP (péptido control), y posteriormente se estimularon o no con 1 μ M de A β ₁₋₄₂ oligomérico durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, las células se lisaron por sonicación. Las proteínas de los lisados se cuantificaron por el método de Bradford. Para llevar a cabo el ensayo enzimático se utilizaron 100 μ g de proteína total por condición y se siguió el protocolo descrito en el apartado 2.11.1 de Materiales y Métodos.

Como se esperaba, los oligómeros de A β ₁₋₄₂ incrementaban significativamente la actividad de la PYG desde 2,99 \pm 0,30 nmol/mg-min hasta 5,07 \pm 0,39

nmol/mg·min. El péptido control (TAT-EGFP) no afectó a esta activación (Figura 6). Por el contrario, el péptido TAT-RBD-PYGM bloqueaba de manera eficaz la actividad de la PYG inducida por los oligómeros de $A\beta_{1-42}$, manteniéndose en un valor de $2,51 \pm 0,21$ nmol/mg·min (Figura 6, barra 4 comparada con barra 2), siendo similar a su control ($2,44 \pm 0,19$ nmol/mg·min; Figura 6, barra 3).

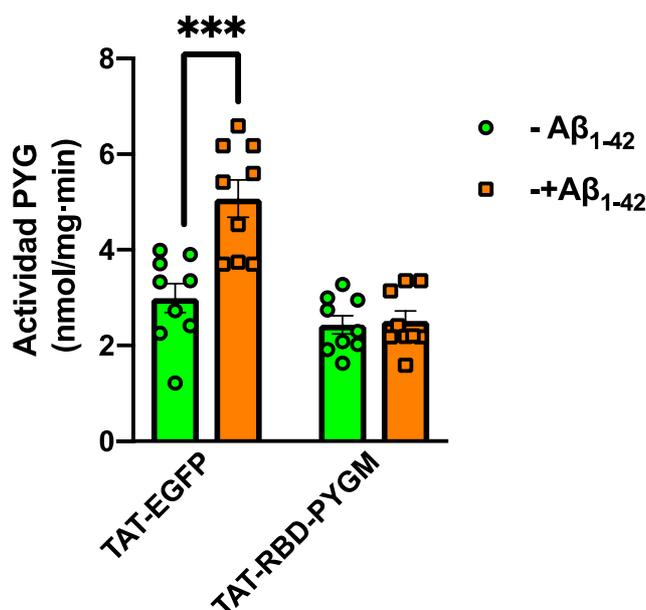


Figura 6. Los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ activan la isoforma muscular de la PYG por medio de Rac1. 1 millón de astrocitos por condición se pretrataron con 70ng/ μ l de péptido TAT-EGFP o TAT-RBD-PYGM, fueron o no estimulados con 1 μ M de $A\beta_{1-42}$ durante 30 minutos a 37°C. La actividad de la PYG se determinó midiendo la cantidad de NADPH generado y se expresó como nmol/mg·min. El histograma representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado, y el análisis estadístico t-Student resultó ser significativo (***) $p < 0,001$.

En su conjunto, estos resultados revelan que los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ activan al eje Rac1/PYG de forma transitoria, estableciendo su máxima actividad a los 30 minutos de tratamiento. Y además, la isoforma de la PYG que se activa en esta ruta de señalización es la muscular (PYGM), sin aparentemente, implicar ni a la isoforma de hígado (PYGL), ni a la isoforma de cerebro (PYGB).

1.6. Los oligómeros de A β ₁₋₄₂ se unen a la integrina β 1 (ITG β 1) y controlan la activación de Rac1/PYGM.

Una vez desvelado que los oligómeros de A β ₁₋₄₂ controlaban la activación de la PYGM por medio de la GTPasa Rac1 en astrocitos humanos, examinamos si este eje (Rac1/PYGM) estaba siendo controlado aguas arriba por la interacción de los oligómeros de A β ₁₋₄₂ con la integrina β 1 (ITG β 1). Nuestro grupo de investigación había descrito que la activación de la GTPasa Rac1 mediada por oligómeros de A β ₁₋₄₂ en astrocitos primarios de rata requería la participación de la ITG β 1 (Wyssenbach et al. 2016). En base a ello, nosotros diseñamos un péptido (GST-R_s) basado en los 20 aminoácidos de la secuencia N-terminal de la ITG β 1, el cual se unía a los oligómeros de A β ₁₋₄₂, interfiriendo en su interacción *in vivo* con la ITG β 1 y como consecuencia bloqueando el efecto tóxico emanado de los oligómeros de A β ₁₋₄₂ (Ortiz-Sanz et al).

Por tanto, nosotros estudiamos el efecto del péptido GST-R_s sobre la activación de la GTPasa Rac1 mediada por el A β ₁₋₄₂ en la línea de astrocitos humanos. Los cultivos de astrocitos deprivados de FBS durante 12-16 horas se incubaron durante 1 hora a 37°C con 70 ng/ μ l de GST-R_s o GST₀ (péptido control), y posteriormente se estimularon o no con 1 μ M de oligómeros de A β ₁₋₄₂ durante 30 minutos a 37°C. Al finalizar la incubación, las células se lisaron con tampón RIPA. Los lisados se incubaron con la proteína de fusión GST-RBD de PAK1 previamente conjugada a la resina de glutatión sefarosa. Finalmente, los complejos de afinidad se disociaron con tampón de carga, se separaron las proteínas por SDS-PAGE seguidas de Western blot y las membranas se incubaron con anticuerpos específicos, las bandas inmuno-reactivas se visualizaron con ECL.

El tratamiento de los astrocitos con el péptido GST-R_s bloqueaba la acción activadora de los oligómeros de A β ₁₋₄₂ sobre la GTPasa Rac1 (Figura 4A, panel superior calle 4 y Figura 7B, barra 4), mientras que la activación de Rac1 no se veía alterada en presencia del péptido control GST₀ (Figura 4A, panel superior calle 2 y Figura 7B, barra 2).

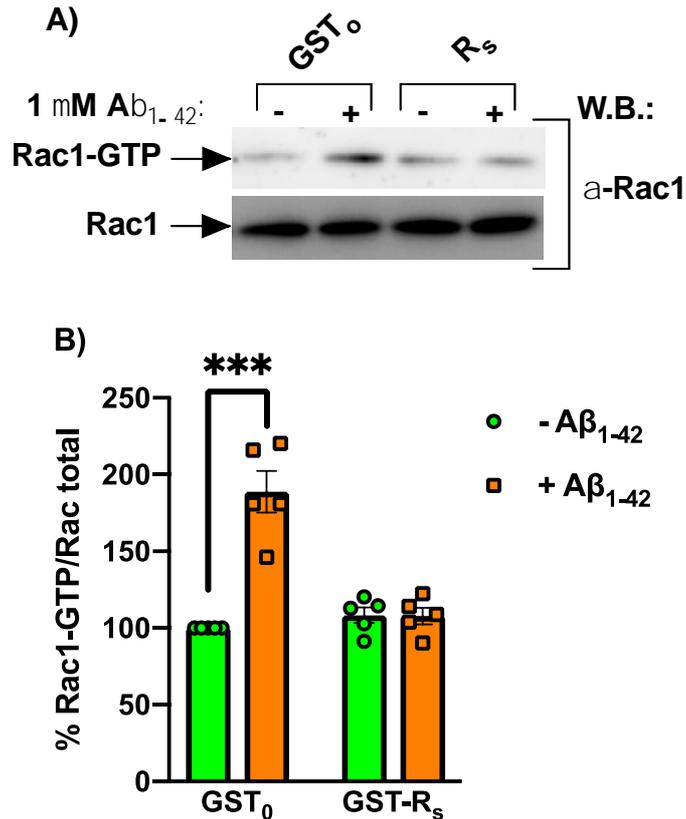


Figura 7. Los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ activan a Rac1 por medio de ITGβ1. 2 millones de células por condición se pretrataron durante 1 hora con 70ng/μl de péptido GST₀ o GST-R_s, fueron o no tratadas con 1μM de Aβ₁₋₄₂ como se indica. Los extractos celulares se usaron para **A)** medir la activación de Rac1 mediante precipitación por afinidad o ensayo de *pulldown* utilizando la proteína de fusión GST-RBD-PAK (primer panel), y para determinar el Rac1 total presente en la muestra (segundo panel). Es representativa de un experimento independiente llevada a cabo por quintuplicado. **B)** Los resultados presentados en el histograma representan la media ± SEM de las densitometrías de 5 experimentos independientes y el análisis estadístico de la t-Student resultó ser significativo (***)p<0,001).

Este resultado confirma que, tal y como ocurría en los astrocitos primarios de rata (Wyssenbach et al. 2016), los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ necesitan de la ITGβ1 para mediar en la activación de la GTPasa Rac1.

A continuación investigamos si este péptido interfería también en la actividad de la PYG mediada por los oligómeros de Aβ₁₋₄₂. Para ello, cultivos de astrocitos previamente privados durante 12-16 horas de FBS se incubaron durante 1 hora a 37°C con 70 ng/μl de GST₀ o GST-R_s, y posteriormente, se estimularon o no con 1μM de oligómeros de Aβ₁₋₄₂ durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, las células se despegaron de la placa con tampón TES y se lisaron por sonicación. Las proteínas de los lisados se cuantificaron por el método de

Bradford. Para llevar a cabo el ensayo enzimático se utilizaron 100 μg de proteína total por condición y se siguió el protocolo descrito en el apartado 2.11.1 de Materiales y Métodos.

Los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ incrementaban significativamente la actividad de la PYG desde $3,16 \pm 0,22$ nmol/mg·min hasta $4,99 \pm 0,36$ nmol/mg·min en células tratadas con el péptido control (GST_0). Por el contrario, el péptido GST-R_s bloqueaba de manera eficaz la actividad de la PYG inducida por los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ (Figura 8, barra 4 comparada con barra 2).

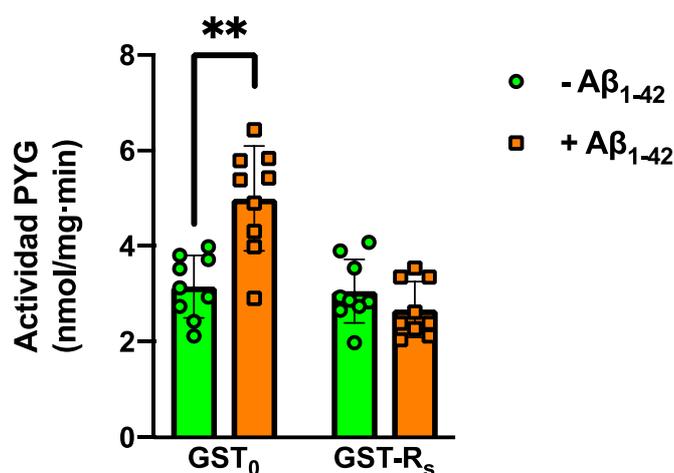


Figura 8. Los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ activan a la PYG por medio de la $\text{ITG}\beta 1$. 1 millón de astrocitos por condición se pretrataron con 70 $\text{ng}/\mu\text{l}$ de péptido GST_0 o GST-R_s , fueron o no estimulados con 1 μM de oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ durante 30 minutos a 37°C. La actividad de la PYG se determinó midiendo la cantidad de NADPH generada y se expresó como nmol/mg·min. El histograma representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado, y el análisis estadístico t-Student resultó ser significativo (** $p < 0,01$).

Este resultado junto al presentado en la Figura 7 demuestra la implicación de la $\text{ITG}\beta 1$ en la activación del eje $\text{Rac1}/\text{PYGM}$ por parte de los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$, siendo necesaria su interacción con el receptor de la integrina $\beta 1$ para que la señalización se lleve a cabo.

2. Los oligómeros de A β ₁₋₄₂ requieren del eje de señalización Rac1/PYGM para degradar los gránulos de glucógeno de los astrocitos en el núcleo.

2.1. Los oligómeros de A β ₁₋₄₂ promueven la degradación y síntesis del glucógeno.

La PYG es un enzima clave en la degradación del glucógeno debido a que rompe el glucógeno, liberando así monómeros de glucosa-1-fosfato. Con el fin de evaluar si los oligómeros de A β ₁₋₄₂ promovían la degradación del glucógeno y si ésta se comportaba de la misma forma que la activación de la PYG (Figura 1), se determinó la cantidad de glucógeno de los astrocitos tratados con oligómeros de A β ₁₋₄₂ a distintos tiempos. Para ello, se sembraron un total de 2.400.000 astrocitos por condición y se trataron durante 0, 30, 60, 180 y 360 minutos con A β ₁₋₄₂ oligomérico. Posteriormente, se extrajo el glucógeno de las células con una solución del 30% de KOH tal y como se detalla en el apartado 2.16 de Material y Métodos.

Como esperábamos, el tratamiento durante 30 minutos con oligómeros de A β ₁₋₄₂ promovió un descenso de hasta $238,05 \pm 13,36$ pg de glucógeno/ $2,4 \times 10^6$ células con respecto a las células control ($379,35 \pm 31,62$ pg de glucógeno/ $2,4 \times 10^6$ células) (Figura 9). De forma sorprendente, cuando el tratamiento con A β ₁₋₄₂ oligomérico se extendió hasta 1 hora, la cantidad de glucógeno no sólo se recuperó hasta los valores control, sino que aumentaron de forma significativa hasta $505,36 \pm 15,65$ pg de glucógeno/ $2,4 \times 10^6$ células. Fue a tiempos más prolongados de tratamiento con A β ₁₋₄₂ que los valores de glucógeno se estabilizaron hasta valores próximos a control, siendo de $405,44 \pm 34,12$ pg de glucógeno/ $2,4 \times 10^6$ células a los 180 minutos de tratamiento y de $376,83 \pm 29,64$ pg de glucógeno/ $2,4 \times 10^6$ células a los 360 minutos de tratamiento.

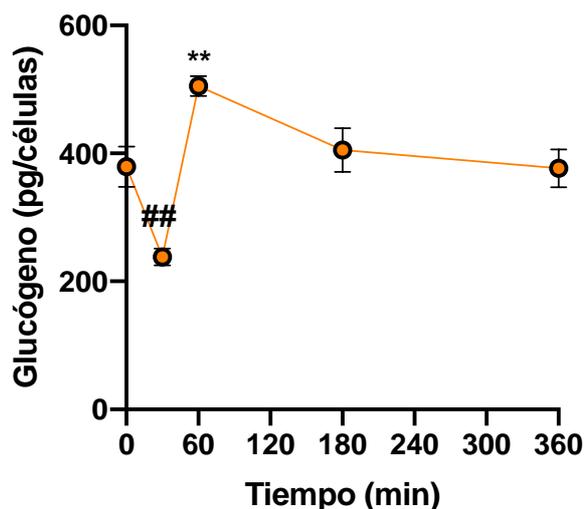


Figura 9. Cinética de degradación y recuperación del glucógeno celular en astrocitos tratados por $A\beta_{1-42}$ oligomérico. 2,4 millones de astrocitos fueron o no tratados con $A\beta_{1-42}$ oligomérico durante 30, 60, 180 y 360 minutos. Se realizó la extracción del glucógeno intranuclear con KOH y se calcularon los picogramos de glucógeno detectados por 2,4 millones de células. La gráfica representa la media \pm SEM del glucógeno detectado en tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado, y el análisis estadístico t-Student resultó ser significativo (** $p < 0,01$; ## $p < 0,01$).

Estos resultados sugieren que los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ estarían promoviendo una degradación transitoria del glucógeno intracelular. Junto al resultado de la Figura 1, sugerimos que la activación del eje de señalización Rac1/PYGM por parte del $A\beta_{1-42}$ oligomérico estaría promoviendo la degradación de glucógeno a los treinta minutos, y la posterior bajada de actividad de la enzima, podría posibilitar la recuperación del glucógeno intracelular por parte de los astrocitos.

2.1. Los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ implican a la PYGM para degradar el glucógeno intranuclear de los astrocitos.

Teniendo en cuenta que los astrocitos humanos inmortalizados expresan en mayor o menor medida las tres isoformas de la PYG (Figura 7), bien podría ocurrir que entre ellas solaparan sus actividades sobre la degradación de los gránulos de glucógeno mediados por los oligómeros de $A\beta_{1-42}$.

Para investigar esta hipótesis, nosotros planteamos una estrategia de silenciamiento para cada una de las tres isoformas y examinamos por inmunofluorescencia cómo se encontraban los gránulos de glucógeno de los astrocitos en cada condición. Los astrocitos cultivados en *coverslips* al 70% de

confluencia, se privaron de FBS y se transfectaron con 10 pg de esiRNA (esiEGFP, esiPYGB, esiPYGL o esiPYGM), siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.1.2.3 de Materiales y Métodos. 24 horas posteriores a la transfección se trataron o no con 1 μ M de oligómeros de A β ₁₋₄₂ durante 30 minutos a 37°C. Al cabo de este tiempo, se fijaron con metanol frío (-20°C) durante 6 minutos y el marcaje del glucógeno se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.12.2. de Material y Métodos.

Los resultados fueron sorprendentes, primero porque se detectó que los astrocitos además de acumular glucógeno en el citoplasma celular, contenían abundantes gránulos en el núcleo (Figura 10A) y segundo porque éstos se degradaban tras el tratamiento con los oligómeros de A β ₁₋₄₂ (Figura 10B), tanto los citoplásmicos como los nucleares. Cuantificando el número de gránulos nucleares de glucógeno se pasaban de una media de $46,89 \pm 8,23$ gránulos en los astrocitos control a $22,22 \pm 4,22$ en los tratados con A β ₁₋₄₂ oligomérico (Figura 10I, violines 1 y 2 respectivamente). Lo mismo ocurría cuando se silenciaba la PYGB, el silenciamiento de esta isoforma no afectaba ni a los gránulos de glucógeno citoplásmicos ni a los nucleares (Figura 10C) y tampoco a su degradación mediada por los oligómeros de A β ₁₋₄₂ (Figura 10D). Cuantificando el número de gránulos nucleares de glucógeno, resultó que se pasaban de $56,11 \pm 11,69$ gránulos en las células *pygb* silenciadas a $14,33 \pm 3,79$ gránulos en las células *pygb* silenciadas y tratadas con los oligómeros de A β ₁₋₄₂ (Figura 10I, violines 3 y 4). Por el contrario, la ausencia de expresión de la *pygl* potenciaba la acumulación de gránulos nucleares de glucógeno (Figura 10E y Figura 10I, violín 5; $150,00 \pm 32,02$ gránulos) comparada con las células control (Figura 10A y Figura 10I violín 1) o a las que se les había silenciado la isoforma B (Figura 10C y Figura 10I, violín 3). Sin embargo, en este escenario los oligómeros de A β ₁₋₄₂ también eran eficaces a la hora de mediar e la degradación de los gránulos de glucógeno tanto citoplásmicos como nucleares (Figuras 10F e I, violín 6 ($19,56 \pm 3,21$ gránulos)). Con respecto a la PYGM, la ausencia de expresión de esta isoforma incrementaba de manera dramática los gránulos de glucógeno incluidos los nucleares (Figura 10G y Figura 10I violín 7; $284,00 \pm 97,90$ gránulos) comparado a sus correspondientes controles (Figuras 10A,C y E; Figura 10I, violines 1,3 y 5). En

estas circunstancias, en ausencia de expresión de la *pygm*, los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ eran capaces de mediar la degradación de los gránulos citoplasmáticos pero no la degradación de este acúmulo anormal de gránulos de glucógeno nucleares (Figura 10H y Figura 10I, violín 8; $242,89 \pm 78,43$ gránulos).

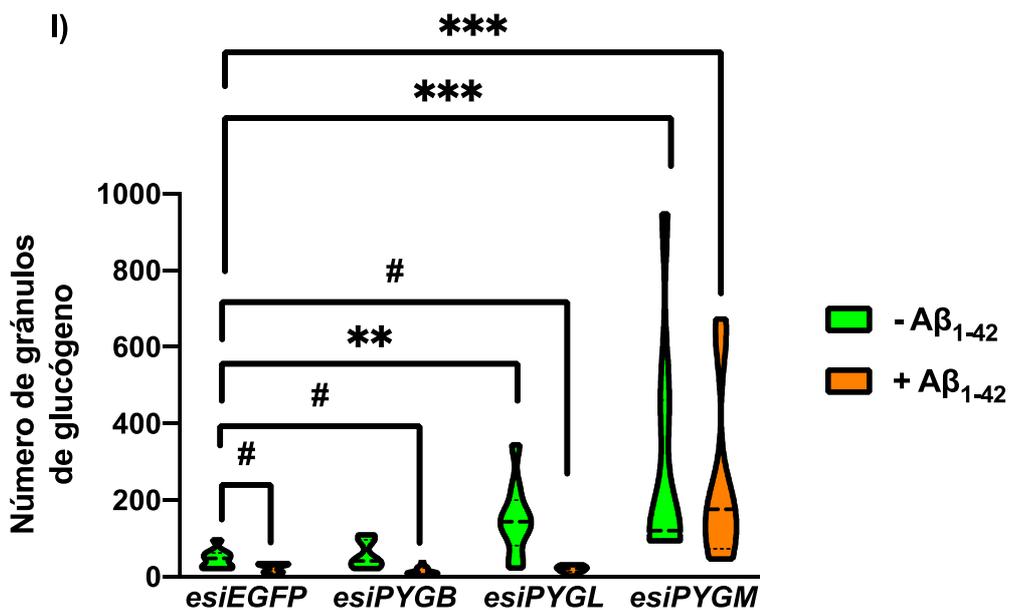
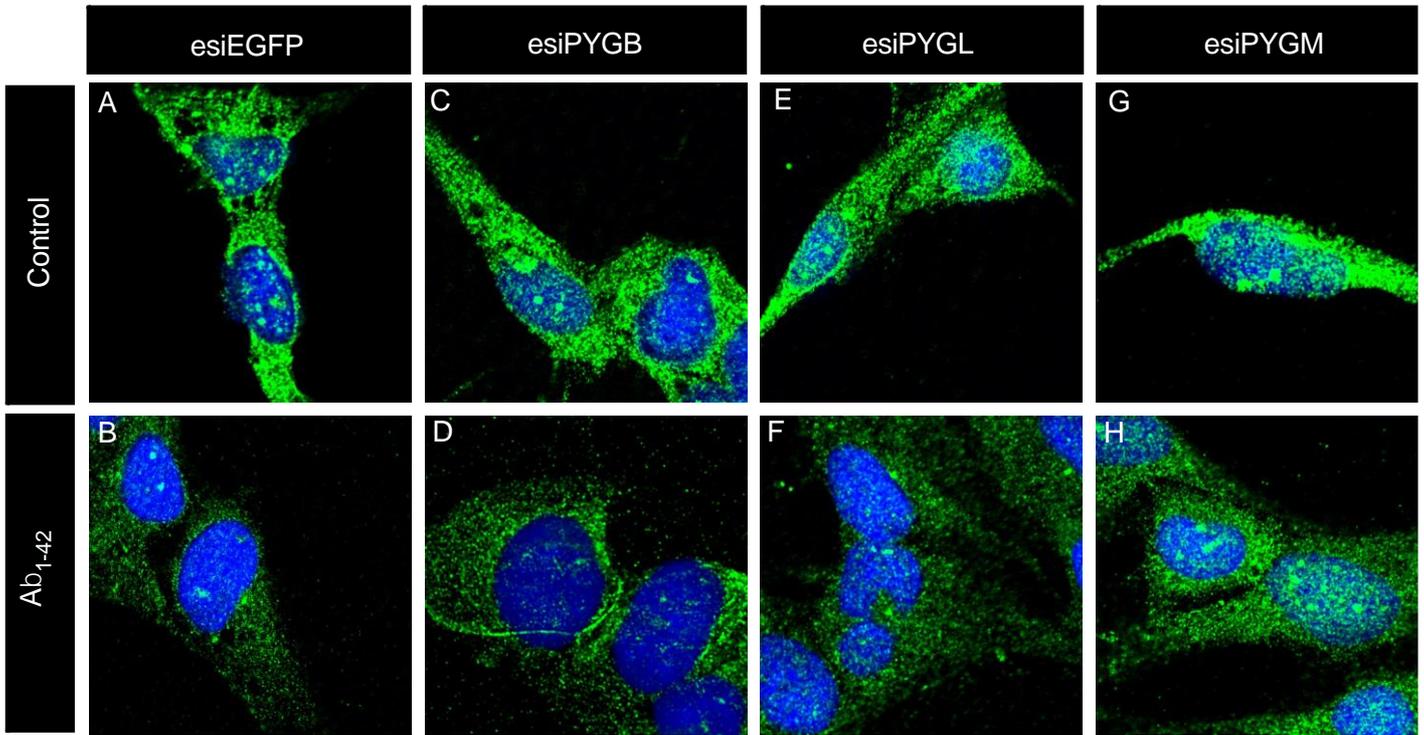


Figura 10. La degradación del glucógeno nuclear mediada por los oligómeros de A β ₁₋₄₂ está promovida por la PYGM. A-H) Marcaje del glucógeno nuclear con GST-GYSC en astrocitos transfectados con los esiRNA indicados y tratados o no con 1 μ M de A β ₁₋₄₂ durante 30 minutos. La inmunofluorescencia se llevó a cabo utilizando un primer marcaje con anticuerpo α -GST, seguido del secundario Goat α -Rabbit Alexa 488 (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las fotografías son representativas de tres experimentos independientes. **I)** Cuantificación de los gránulos de glucógeno nucleares representados como la media \pm SEM (n= 100) obtenidos en 3 experimentos independientes. El análisis estadístico t-Student resultó ser significativo (#p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Este resultado, inesperado y novedoso, muestra por primera vez que los astrocitos humanos acumulan gránulos de glucógeno en el núcleo celular. Y, además, que los oligómeros de A β ₁₋₄₂ controlan de manera inequívoca su degradación a través de la isoforma muscular de la glucógeno fosforilasa. No sólo eso, sino que la ausencia de expresión de PYGM potencia la acumulación de gránulos de glucógeno en el núcleo celular.

2.2. Los oligómeros de A β ₁₋₄₂ degradan el glucógeno nuclear mediante la activación del eje Rac1/PYGM.

Para evaluar la potencial implicación del eje de señalización Rac1/PYGM en la degradación del glucógeno gobernada por los oligómeros de A β ₁₋₄₂, utilizamos el péptido TAT-RBD-PYGM. Dado que el marcaje del glucógeno se llevó a cabo por inmunofluorescencia, no podíamos utilizar TAT-EGFP como péptido control ya que se solapaba el marcaje utilizado (Alexa 488). Para solventar esta situación, utilizamos como control una solución tamponada de 50 mM NaH₂PO₄ con 300 mM NaCl a pH 7.4 y además el péptido TAT-RBD-PAK. Éste último ha sido desarrollado por nuestro grupo de investigación (descrito en el apartado 2.2.3.4. de Materiales y Métodos) y se caracteriza porque contiene la región de PAK1 que se une a la forma activa de Rac1. La diferencia entre TAT-RBD-PYGM y TAT-RBD-PAK se encuentra en que estos dominios RBD se unen a diferentes regiones del dominio efector de Rac1-GTP controlando distintas rutas de señalización celular por lo que, el tratamiento de las células con estos péptidos resultaría en la interrupción diferenciada de estas rutas de señalización.

Por todo ello, 40.000 células por pocillo cultivadas en *coverslips*, se mantuvieron en medio de cultivo con 1% de FBS durante 12-16 horas y se

incubaron durante 1 hora a 37°C con vehículo o con 70 ng/μl de TAT-RBD-PYGM o TAT-RBD-PAK1 como se indica en la Figura 10. Posteriormente, las células se estimularon o no con 1 μM de Aβ₁₋₄₂ durante 30 minutos a 37°C y se fijaron con metanol frío (-20°C) durante 6 minutos. El marcaje del glucógeno se llevó a cabo siguiendo los pasos descritos en el apartado 2.12.2. de Material y Métodos.

Como se esperaba, en las células no tratadas había una acumulación exacerbada de gránulos de glucógeno en el núcleo celular (Figura 11A), mientras que las células tratadas con los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ presentaban un núcleo celular prácticamente limpio de gránulos de glucógeno (Figura 11B), de hecho, se pasaba de 59,73 ± 11,14 gránulos a 3,45 ± 1,45 (Figura 11G, violín 1 comparado con violín 2). En esta misma línea, el péptido TAT-RBD-PAK no bloqueaba la degradación masiva de los gránulos de glucógeno nucleares mediados por los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ (Figura 11D, comparada con Figura 10B. Cabe destacar que el péptido TAT-RBD-PAK *per se* tenía una cierta capacidad para inducir glucogenolisis, pues cuantificamos 27,18 ± 3,67 gránulos (Figura 11G violín 3) frente a los 59,73 ± 11,14 gránulos (Figura 11G violín 1) de la condición control (Figuras 11A y C). En cuanto al péptido TAT-RBD-PYGM, él sólo, ni degradaba los gránulos de glucógeno nucleares (Figura 11E) ni modificaba el número de ellos (65,18 ± 10,82 gránulos; Figura 11G, violín 5). Sin embargo, el péptido TAT-RBD-PYGM fue capaz de bloquear de forma rotunda la acción que ejercían los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ sobre la degradación masiva de los gránulos nucleares de glucógeno en astrocitos (Figura 11F), manteniéndose prácticamente el mismo número de gránulos que su control no tratado (70,45 ± 7,39 gránulos; Figura 11G, violín 6).

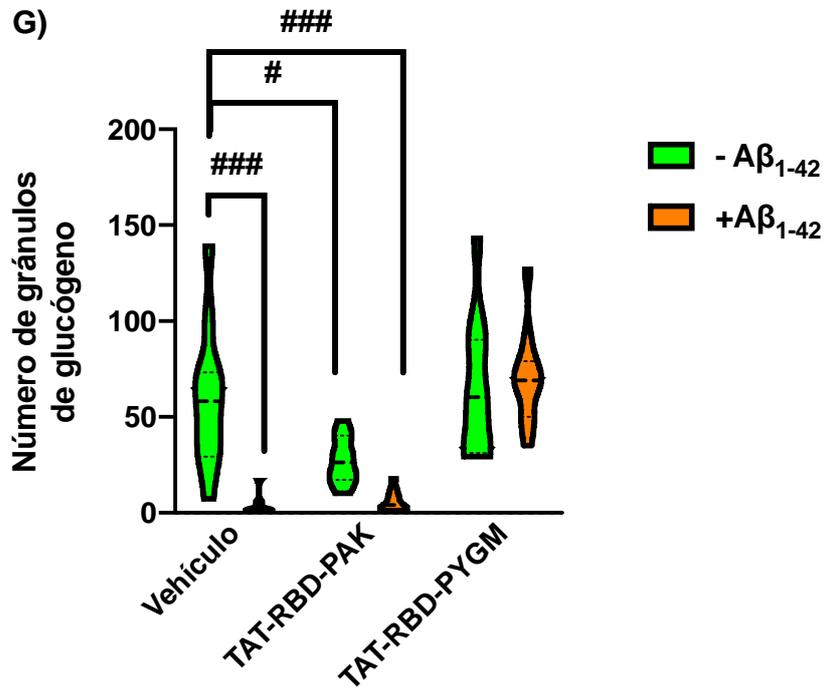
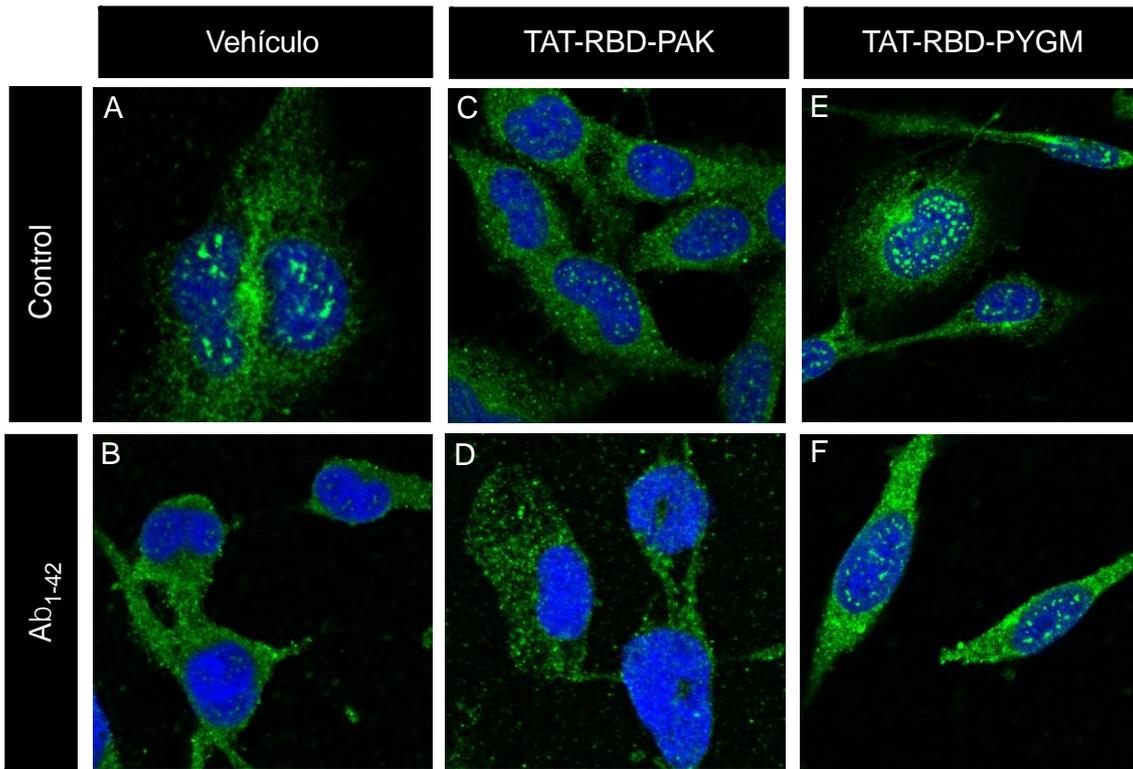


Figura 11. Los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ requieren de la ruta de señalización Rac1/PYGM para degradar los gránulos de glucógeno. A-F) Marcaje del glucógeno nuclear con GST-GYSC en astrocitos pre-tratados durante 1 hora con 70 ng/μL de TAT-RBD-PAK o TAT-RBD-PYGM y tratados o no con 5μM de Aβ₁₋₄₂ durante 30 minutos. La inmunofluorescencia se llevó a cabo utilizando un primer marcaje con anticuerpo α-GST, seguido del secundario Goat α-Rabbit Alexa 488 (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las fotografías fueron tomadas con el microscopio

Leica TCS STED CW SP8 y son representativas de tres experimentos independientes, realizadas con un zoom a partir de una fotografía con un plano general tomado con el objetivo de 40x. **G)** Cuantificación de los gránulos de glucógeno nucleares, representados como Media \pm SEM del conteo de 100 núcleos por condición (n=63) llevados a cabo en tres experimentos independientes. Se realizó la estadística de los datos con una t-student y resultaron ser significativos (#p<0,05; ###p<0,001).

Todo ello sugiere por un lado que el péptido recombinante TAT-RBD-PYGM interfiere de manera eficaz en la interacción entre Rac1 y PYGM, erigiéndose en una herramienta con mucho potencial para estudiar la señalización aguas abajo de PYGM. Y por otro lado, que Rac1, a través de su dominio efector que interacciona con la PYGM, regula la degradación de los gránulos de glucógeno nucleares controlados por los oligómeros de A β ₁₋₄₂.

2.3. Los oligómeros de A β ₁₋₄₂ promueven la movilización transitoria de los gránulos nucleares de glucógeno: localización de Rac1 y PYGM.

En base a los resultados obtenidos, nosotros postulamos que para que en los astrocitos, los gránulos de glucógeno del núcleo se degraden, se precisa que la maquinaria que ejecuta ese proceso se encuentre también en el núcleo. Recientemente se ha descrito que la GTPasa Rac1 se trasloca al núcleo celular (Abdrabou and Wang 2021), aunque el papel que desempeña está todavía por desvelarse. A diferencia de Rac1, a día de hoy, no se tiene ninguna referencia de la presencia de la isoforma muscular en el núcleo celular, no así la de brain y la de hígado que sí se han detectado en algunas líneas celulares.

Con objeto de determinar la presencia tanto de Rac1 como PYGM en el núcleo de los astrocitos y su localización con respecto a los gránulos de glucógeno, astrocitos cultivados en *coverslips* se privaron de FBS, al llegar al 70% de confluencia se transfectaron con 500 ng de plásmido que codifica para la GTPasa Rac1 (pEGFP-Rac1) y/o la isoforma muscular de la glucógeno fosforilasa (pCEFL-PYGM-HA), siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.1.2.3 de la Sección Materiales y Métodos. Las células privadas y transfectadas se incubaron durante otras 24 horas adicionales para finalmente tratarlas o no con 1 μ M de oligómeros de A β ₁₋₄₂ durante 15, 30 o 60 minutos a 37°C y se fijaron con metanol frío (-20°C) durante 6 minutos. El marcaje del glucógeno se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.12.2. de Material y Métodos. El marcaje de la PYGM se llevó a cabo una vez

terminada la inmunofluorescencia del glucógeno siguiendo el protocolo descrito en el mismo apartado de Material y Métodos.

Como muestra la Figura 12, en condiciones basales (tiempo 0), Rac1 se encontraba mayoritariamente en el citoplasma, y en menor medida, en el núcleo (Figura 12B y E). Sin embargo, tanto la PYGM como el glucógeno se detectaron tanto en el núcleo como en el citoplasma (Figuras 12C, D y E). A los 15 minutos de tratamiento con A β ₁₋₄₂ oligomérico, Rac1 se translocó al núcleo, aunque se seguía manteniendo su presencia también en el citoplasma (Figura 12G). Por el contrario, la localización de la PYGM no se perdió en el núcleo pero se detectó mayor señal en el citoplasma (Figuras 12H). En el caso del glucógeno, disminuyó de forma contundente la intensidad de señal detectada en la célula, sugiriendo su degradación tanto en el núcleo como en el citoplasma (Figuras 12I y J). A los treinta minutos de tratamiento con A β ₁₋₄₂ oligomérico, se detectaba mayor cantidad de Rac1 tanto en el núcleo como en las regiones yuxtamembranas (Figuras 12L y O) mientras que la PYGM se volvió a detectar mayormente en el núcleo de los astrocitos (Figuras 12M y O). En cuanto al glucógeno, prácticamente no variaba (Figuras 12N) comparado con el tratamiento con A β ₁₋₄₂ oligomérico de 15 minutos (Figuras 12I). Finalmente, tras 1 hora de tratamiento con A β ₁₋₄₂ oligomérico, Rac1 volvió a detectarse de forma mayoritaria en el citoplasma, aunque también seguía estando localizado en la región yuxtamembranar (Figuras 12Q y T). La intensidad de PYGM detectada también se concentró en el citoplasma aunque la señal no desapareció del núcleo (Figuras 12R y T). Por otra parte, la intensidad de señal del glucógeno aumentó tanto en el citoplasma como en el núcleo, sugiriendo la re-síntesis de este polímero (Figuras 12S y T).

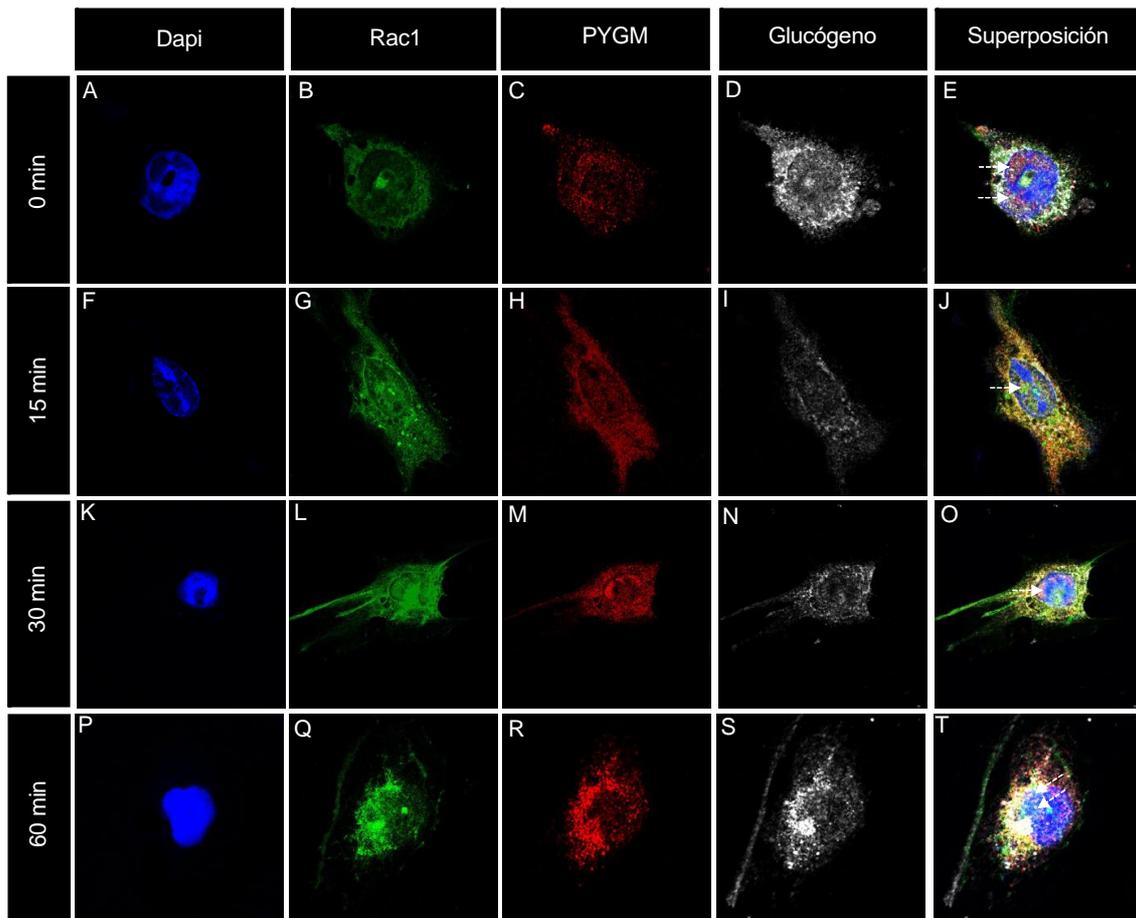


Figura 12. Los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ movilizan los gránulos intranucleares de los astrocitos humanos inmortalizados y modulan la localización de Rac1 y PYGM. A-T) Cultivos de astrocitos co-transfectados con pEGFP-Rac1 y pCEFL-PYGM-HA fueron tratados durante los tiempos indicados con $1 \mu\text{M}$ de $A\beta_{1-42}$. Se realizó un primer marcaje de la sonda del glucógeno con $\alpha\text{-GST}$, seguido del secundario Donkey $\alpha\text{-Rabbit Alexa 647}$ (rojo lejano). La segunda inmunofluorescencia fue realizada con $\alpha\text{-HA}$, seguido del secundario Goat $\alpha\text{-Mouse Alexa 594}$ (rojo). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul) y Rac1 se detectó en el canal verde por su etiqueta EGFP. Las fotografías son representativas de tres experimentos independientes.

Una vez puesta de manifiesto la dinámica de la localización de Rac1, PYGM, y degradación del glucógeno debido a la acción del $A\beta_{1-42}$ oligomérico, examinamos el grado de co-localización de las combinaciones Rac1/PYGM, Rac1/glucógeno y PYGM/glucógeno en el núcleo de los astrocitos. Para ello, las imágenes obtenidas en el microscopio confocal se deconvolucionaron con el *software* Hyugens con el fin de eliminar el fondo y mejorar la definición de los píxeles de cada canal. Para a continuación calcular el coeficiente de Pearson, seleccionando el núcleo como región de interés (ROI) y la capa “z” dónde la señal detectada se encontraba en el interior del núcleo. El coeficiente de

Pearson es un valor estadístico que comprende el intervalo que va desde -1 a +1, obtenido a partir de un gráfico de dispersión entre los píxeles detectados de cada canal analizado y la información que da se refiere al grado de correlación que guardan las moléculas objeto de exámen. Cuando los valores del coeficiente de Pearson se encuentran entre el 0 y el +1, las moléculas se correlacionan positivamente entre ellas, mientras que cuando el valor es de 0 no hay correlación y si el valor se encuentra entre 0 y -1, se trata de una correlación negativa.

La Figura 13 muestra los gráficos de dispersión representativos para cada cálculo de co-localización que se llevó a cabo. Para todos ellos, se indica en los ejes de ordenadas y de abscisas los valores de co-ocurrencia, es decir, aquellos píxeles detectados por el *software* que están por encima del fondo. En general, como se refleja en los resultados de la Figura 13, los gráficos de dispersión muestran una co-localización mayor a medida que aumenta el tiempo de exposición de A β ₁₋₄₂ oligomérico. En los tiempos intermedios de 15 y 30 minutos de tratamiento, se observa que hay predominio de píxeles de uno de los marcajes respecto al otro. Concretamente, se observa que entre Rac1 y PYGM, los píxeles de PYGM son mayoritarios respecto a los de Rac1 a 15 minutos (Figura 13B, primer gráfico de dispersión). En el cálculo de la co-localización entre Rac1 y glucógeno, esto sucede en el minuto 30 (Figura 13C, segundo gráfico de dispersión), donde la mayoría de píxeles detectados corresponden al canal de Rac1, y también en la hora de tratamiento (Figura 13C, segundo gráfico de dispersión), donde la mayoría de píxeles detectados corresponden al canal de glucógeno. Por último, en la co-localización entre PYGM y glucógeno, los píxeles mayoritarios corresponden a PYGM en el minuto 15. En el minuto 30, los píxeles de PYGM también decaen, mostrando una mejor co-localización de ambos marcajes respecto al minuto 15 (Figura 13C, tercer gráfico de dispersión). Finalmente, los píxeles de glucógeno se recuperan a la hora de tratamiento con A β ₁₋₄₂ oligomérico (Figura 13D, tercer gráfico de dispersión).

Estos resultados sugieren que el glucógeno se pierde en el núcleo durante los tratamientos de 15 y 30 minutos con A β ₁₋₄₂ oligomérico con respecto PYGM o Rac1, debido a que los píxeles detectados de su canal correspondiente

descienden. Por otra parte, a pesar de que Rac1 sea translocado al núcleo en el minuto 15 (Figura 12), la cantidad de píxeles detectados en el núcleo es mayor en PYGM que en Rac1. Los valores no se igualan hasta que llega el minuto 30 de tratamiento con A β ₁₋₄₂ oligomérico, coincidiendo con el estado de máxima actividad de ambas proteínas (Ver Figuras 1 y 2).

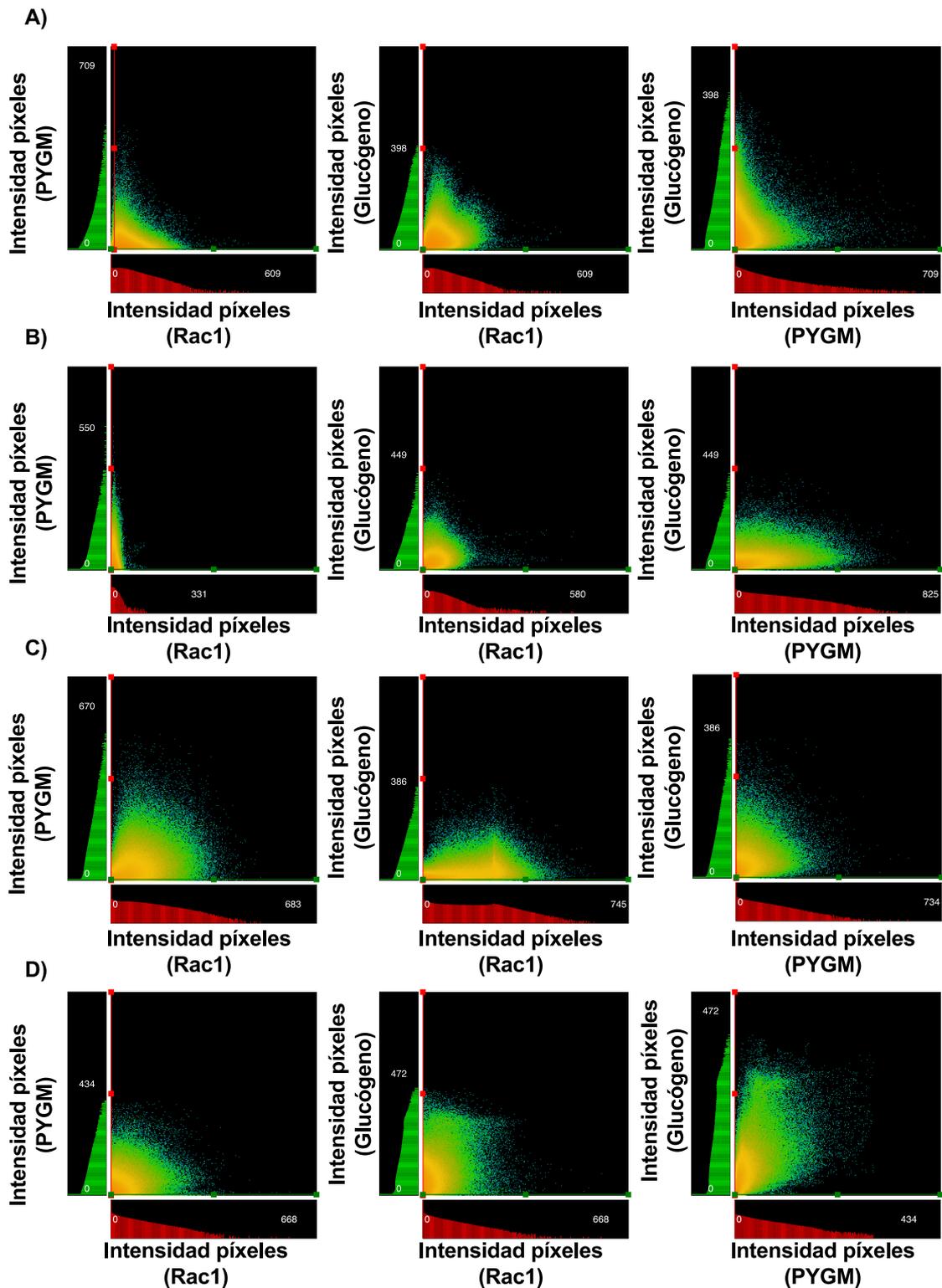


Figura 13. Co-localización de PYGM/Rac1, glucógeno/Rac1 y glucógeno/PYGM en astrocitos humanos tratados o no con $A\beta_{1-42}$ oligomérico. A-D) Gráficos de dispersión de la co-localización en el núcleo de Rac1 con PYGM, de glucógeno con Rac1 con PYGM, de astrocitos tratados con $1\mu M$ de $A\beta_{1-42}$ durante 0 minutos (B), 15 minutos (C), 30 minutos (D) y 60 minutos (E). Las gráficas fueron obtenidas mediante el cálculo del coeficiente de Pearson con el *software* Hyugens a partir de las fotografías deconvolucionadas de astrocitos donde se realizó el triple

marcaje de las moléculas Rac1, PYGM y glucógeno como se indica en la Figura 11, y son representativos de 3 experimentos independientes.

Los coeficientes de Pearson que se obtuvieron en cada caso comprendieron entre el 0 y el +1, indicando la correlación positiva entre los canales que se compararon y por lo tanto, la co-localización entre las dos moléculas (Figura 14). Es decir, Rac1/PYGM, Rac1/glucógeno y PYGM/glucógeno co-localizaron entre ellas en el núcleo. Y no sólo eso, sino que esta co-localización aumentó a medida que transcurrió el tiempo de tratamiento. Concretamente, en el caso de la co-localización entre Rac1 y PYGM, en el tiempo 0 el coeficiente de Pearson fue de $0,36 \pm 0,05$, en el tiempo 15 minutos fue de $0,39 \pm 0,07$, en el tiempo de 30 minutos fue de $0,48 \pm 0,06$ y en el tiempo de 60 minutos fue de $0,61 \pm 0,06$ (Figura 14, curva verde). En el caso de la co-localización entre Rac1 y glucógeno, en el tiempo 0 el coeficiente de Pearson fue de $0,38 \pm 0,09$, en el tiempo 15 minutos fue de $0,38 \pm 0,06$, en el tiempo de 30 minutos fue de $0,52 \pm 0,04$ y en el tiempo de 60 minutos fue de $0,58 \pm 0,04$ (Figura 14, curva naranja). Por último, en el caso de la co-localización entre PYGM y glucógeno, en el tiempo 0 el coeficiente de Pearson fue de $0,29 \pm 0,03$, en el tiempo 15 minutos fue de $0,39 \pm 0,07$, en el tiempo de 30 minutos fue de $0,48 \pm 0,06$ y en el tiempo de 60 minutos fue de $0,61 \pm 0,06$ (Figura 14, curva roja).

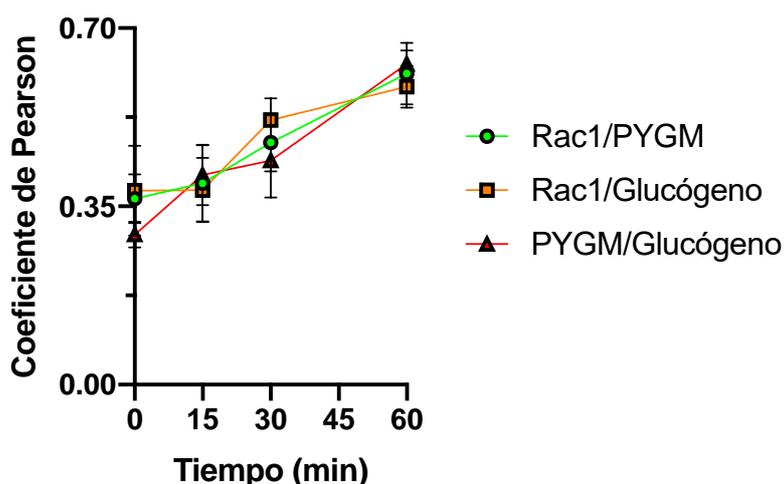


Figura 14. La co-localización de PYGM con Rac1, glucógeno con Rac1 y glucógeno con PYGM en astrocitos humanos aumenta con el tratamiento de $A\beta_{1-42}$ oligomérico. Media \pm SEM del coeficiente de Pearson calculado con el *software* Hyugens seleccionando el núcleo como región de interés (ROI) a partir de fotografías

deconvolucionadas de astrocitos donde las moléculas Rac1, PYGM y glucógeno fueron marcadas como se indica en la Figura 11.

Estos resultados confirman la presencia de Rac1 y de PYGM en el núcleo durante todos los tiempos de tratamiento con $A\beta_{1-42}$. La localización de las moléculas sugiere que la activación de Rac1 por parte del $A\beta_{1-42}$ oligomérico, conlleva a su traslocación al núcleo. Este evento está acompañado a su vez por el cambio de localización de la PYGM hacía el citoplasma, para relocalizarse en el núcleo de nuevo a los 30 minutos de tratamiento, coincidiendo con su estado de máxima actividad. Todo ello, está a su vez acompañado de la degradación del glucógeno nuclear. Las tres moléculas, Rac1, PYGM y glucógeno, co-localizan entre ellas en el núcleo durante todos los tiempos analizados, aumentando esta co-localización a medida que transcurre el tratamiento con el $A\beta_{1-42}$ oligomérico.

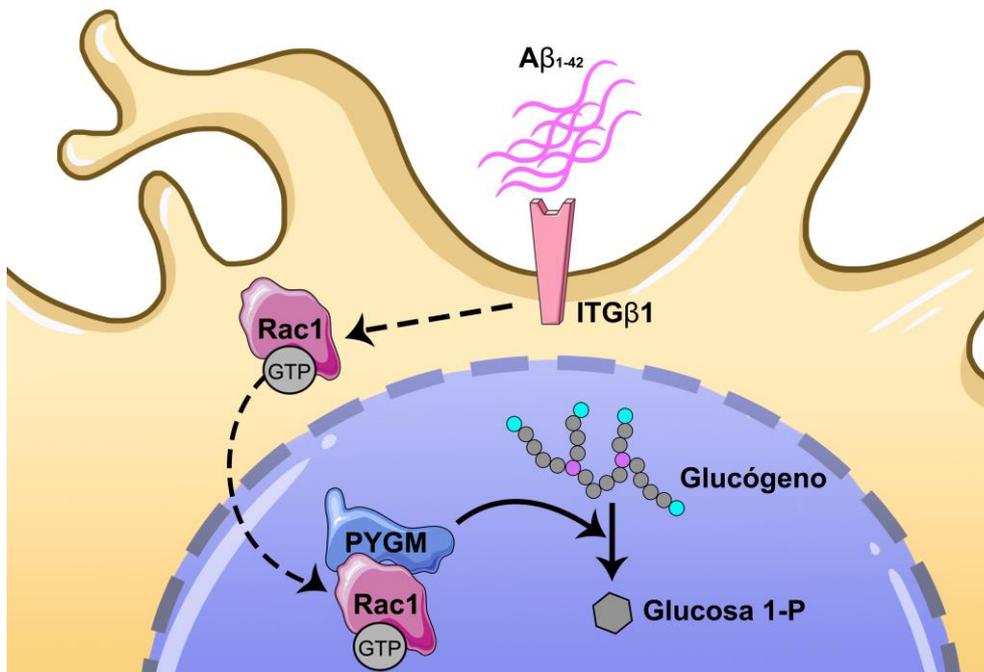


Figura 15. Los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ promueven la degradación del glucógeno nuclear a través del eje Rac1/PYGM. El tratamiento de 30 minutos de $A\beta_{1-42}$ oligomérico en astrocitos humanos immortalizados promueve la traslocación de Rac1 hacía el núcleo. Rac1 activa (Rac1-GTP) a PYGM y ésta promueve la degradación del glucógeno a moléculas de Glucosa 1-P.

En conclusión, junto a los resultados anteriores, sugerimos que el eje Rac1/PYGM activado por el tratamiento de treinta minutos con A β ₁₋₄₂ oligomérico está promoviendo la degradación de los gránulos de glucógeno nucleares (Figura 15). Concretamente, nuestros resultados apuntan a que Rac1 se transloca al núcleo y activa a la PYGM para degradar el glucógeno nuclear.

3. El metabolismo glicolítico de los astrocitos no se modifica por la acción de los oligómeros de A β ₁₋₄₂.

3.1. Los oligómeros de A β ₁₋₄₂ no intervienen en el metabolismo glicolítico de los astrocitos.

Dada la implicación del eje Rac1/PYGM en la degradación de los gránulos de glucógeno inducida por los oligómeros de A β ₁₋₄₂, nuestro siguiente objetivo fue investigar si la PYGM participaba en la glicolisis de los astrocitos.

Para ello, 4 millones de astrocitos por condición se transfectaron con 10 pg de esiRNA (*esiEGFP*, *esiPYGB*, *esiPYGL* o *esiPYGM*) (ver Materiales y Métodos apartado 2.1.2.1.). Al día siguiente de la transfección, se recogieron 40.000 células por condición y se sembró en medio suplementado con 1% de FBS ese número de células por pocillo en una placa de 96 pocillos del kit de Seahorse (Agilent Technologies). Los cultivos se incubaron durante 12-16 horas y se estimularon o no con 1 μ M de oligómeros de A β ₁₋₄₂ durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, las células se lavaron con PBS y se incubaron en medio XF pH 7,4 a 37°C durante 45 minutos. El procedimiento experimental se llevó a cabo según se indica en el apartado 2.14 de Material y Métodos.

Los oligómeros de A β ₁₋₄₂ no modificaban el índice de consumo de oxígeno (OCR) en los astrocitos control (transfectados con *esiEGFP*) (Figura 16A). Lo mismo se observó en todas las condiciones de silenciamiento para cada una de las isoformas: que los oligómeros de A β ₁₋₄₂ no alteraban el consumo de oxígeno (Figura 16B-D). Es importante destacar que la ausencia de expresión de la isoforma de hígado (PYGL) se traducía en un descenso significativo del índice de consumo de oxígeno comparado con las células control *esiEGFP* (Figura 16C). Finalmente, para comprobar que las diferencias observadas en el consumo de oxígeno (OCR) provenían del oxígeno liberado en la cadena

respiratoria se trataron las células con Rotenona y Antimicina A (Rot/AA), compuestos que inhiben respectivamente los complejos I y III de la cadena respiratoria, por lo que los valores de la OCR caen a mínimos. Al cabo de cuatro mediciones, las células fueron tratadas con 2-deoxiglucosa (2-DG), compuesto que inhibe la enzima hexoquinasa. Este tratamiento no afectó a los valores de la OCR, por lo tanto, la concentración de oxígeno detectada por el analizador Seahorse provenía de la cadena respiratoria.

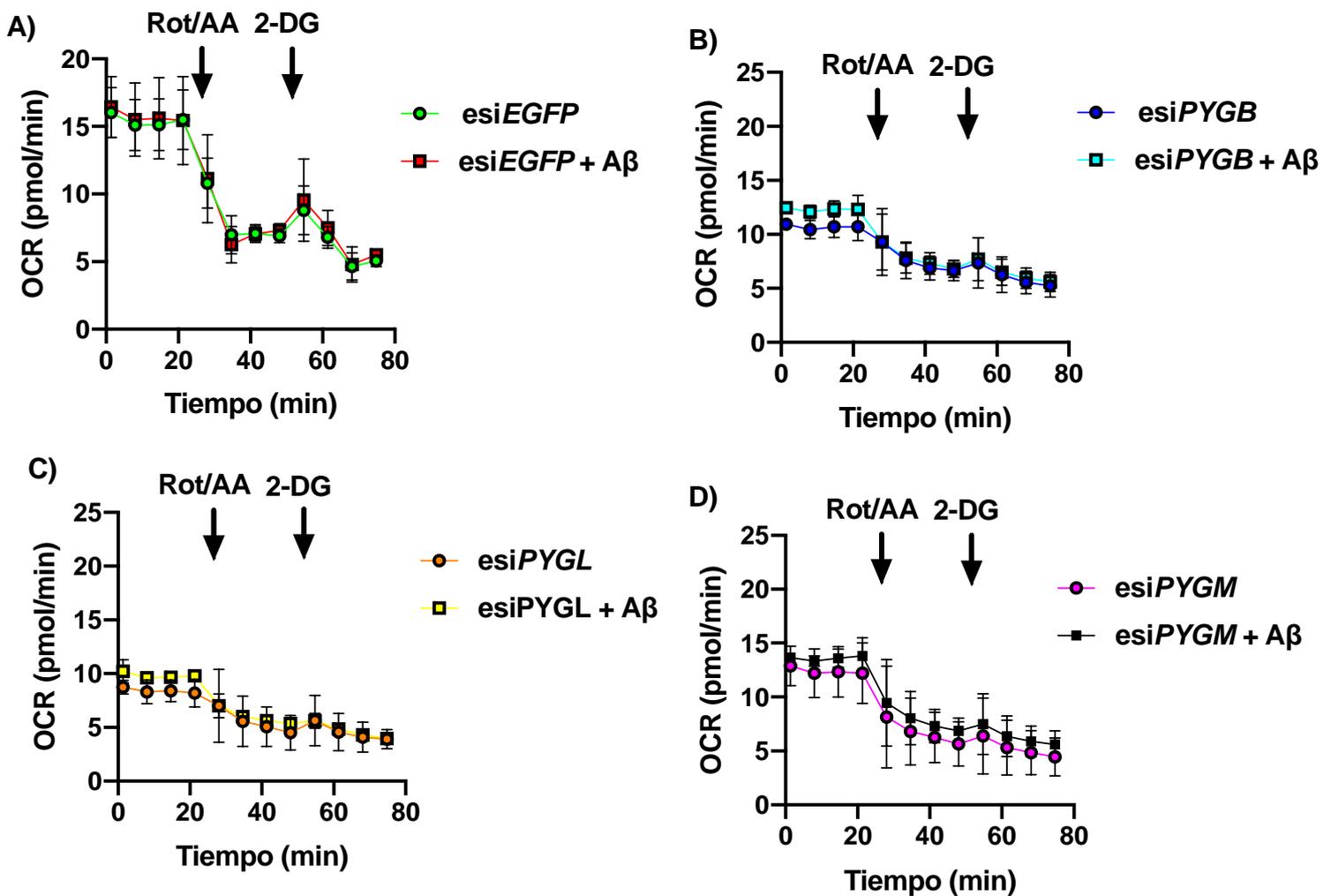
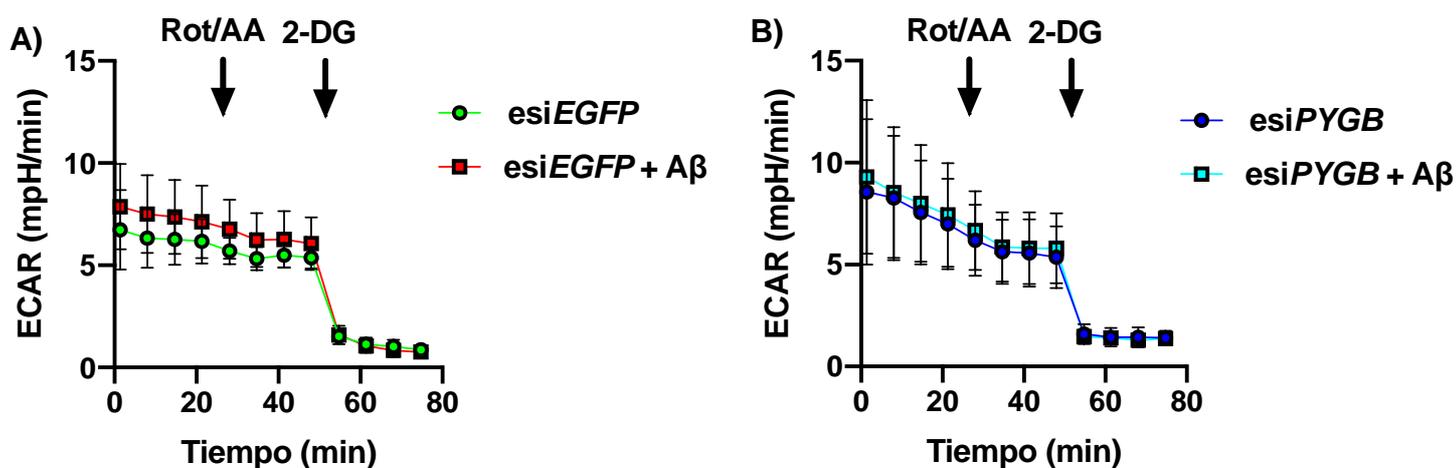


Figura 16. Metabolismo oxidativo de los astrocitos tras el tratamiento con oligómeros de Aβ₁₋₄₂. 40.000 células por condición **A)** *esiEGFP*. **B)** *esiPYGB* **C)** *esiPYGL* **D)** *esiPYGM* mantenidas en medio suplementado con 1% de FBS durante 12-16 horas, fueron o no estimuladas con 5μM de Aβ₁₋₄₂ durante 30 minutos a 37°C. Cada 7 minutos se midió el índice de consumo de oxígeno (OCR) y se indica los puntos en los que se inyectaron rotenona y antimicina (Rot/AA) y 2-deoxiglucosa (2-DG). Se representa la cinética como la media del OCR ± SEM de tres experimentos independientes realizados por sextuplicado.

Este resultado sugiere por un lado que el metabolismo oxidativo de los astrocitos no se modifica por la acción de oligómeros de $A\beta_{1-42}$. Y por otro lado, parece que la isoforma de hígado de la glucógeno fosforilasa es clave en el control del consumo de oxígeno en astrocitos.

Al examinar el índice de acidificación extracelular (ECAR), los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ tampoco ejercían ningún efecto en los astrocitos control (transfectados con *esiEGFP*) (Figura 17A). Y lo mismo se observó en todas las condiciones de silenciamiento para cada una de las isoformas, que los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ no alteraban la acidificación extracelular (Figura 17B-D). En este caso, la ausencia de expresión de PYGM disminuía de manera contundente la acidificación extracelular (Figura 17D). El tratamiento con Rot/AA no ejerció ningún efecto en el ECAR mientras que el tratamiento con 2-DG lo inhibió, demostrando así que el ECAR detectado provenía de la actividad glicolítica de las células.



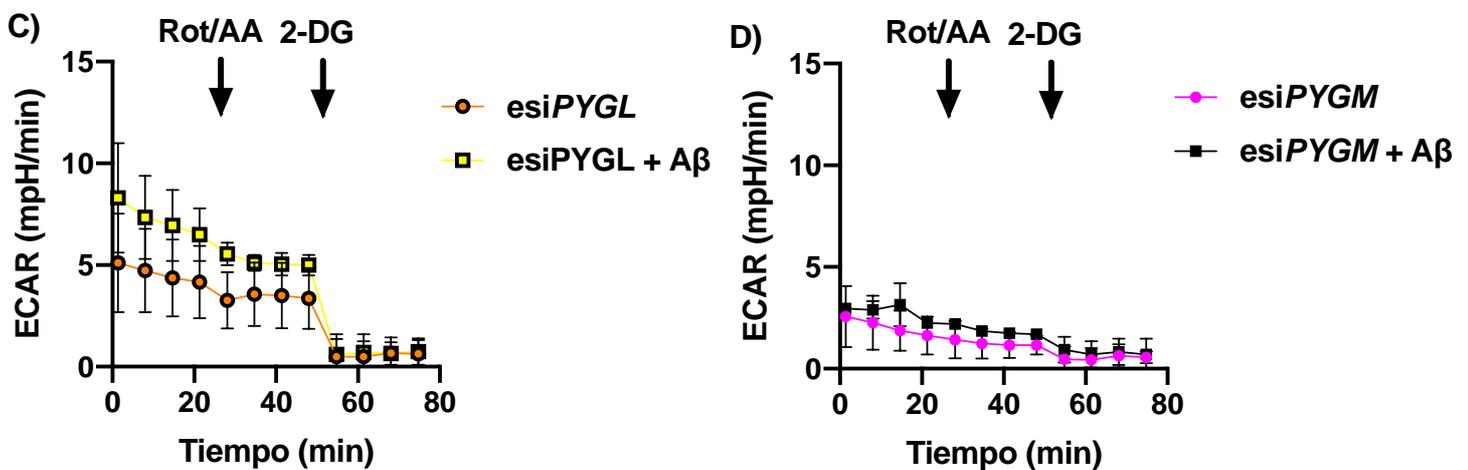


Figura 17. Efecto de los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ sobre la glicolisis en astrocitos humanos. 40.000 células por condición **A)** esiEGFP, **B)** esiPYGB, **C)** esiPYGL, **D)** esiPYGM, mantenidas en medio suplementado con 1% FBS durante 12-16 horas, fueron o no estimuladas con $5\mu\text{M}$ de $A\beta_{1-42}$ durante 30 minutos a 37°C . Cada 7 minutos se midió el índice de acidificación extracelular (ECAR) y se indica los puntos en los que se inyectaron rotenona y antimicina (Rot/AA) y 2-deoxiglucosa (2-DG). Se representa la cinética como la media del ECAR \pm SEM de tres experimentos independientes realizados por sextuplicado.

Este resultado apunta por un lado a que la glicolisis en los astrocitos, medida como acidificación extracelular, no se ve afectada por los oligómeros de $A\beta_{1-42}$, y por otra parte, parece que la isoforma muscular de la glucógeno fosforilasa es clave en esta acidificación en astrocitos.

A partir de los valores OCR y ECAR, calculamos tanto la glicolisis basal como la glicolisis compensatoria (ver apartado 2.14 de Material y Métodos). Como

cabía esperar el tratamiento con oligómeros de $A\beta_{1-42}$ no modificó la glicolisis basal de los astrocitos controles (Figura 18, violines 1 (41,98 pmol/min \pm 8,36) y 2 (50,46 pmol/min \pm 8,68)). Resultados similares se obtuvieron cuando se silenció la isoforma de cerebro (Figura 18, violines 3 (49,07 pmol/min \pm 10,02) y 4 (54,62 pmol/min \pm 14,27)). Sin embargo, los astrocitos a los que se silenció la PYGL, el valor de la glicolisis basal descendió hasta 25,20 pmol/min \pm 8,94 (Figura 18, violín 5) mientras que el tratamiento con los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ los hizo llegar a niveles de control (37,44 pmol/min \pm 10,85) (Figura 18, violín 6). La glicolisis basal de los astrocitos a los que se silenció la expresión de la PYGM descendió de forma dramática hasta un valor de 10,92 pmol/min \pm 3,71 y no se recuperó cuando se trataron las monocapas celulares con los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ (Figura 18, violines 7 y 8 respectivamente).

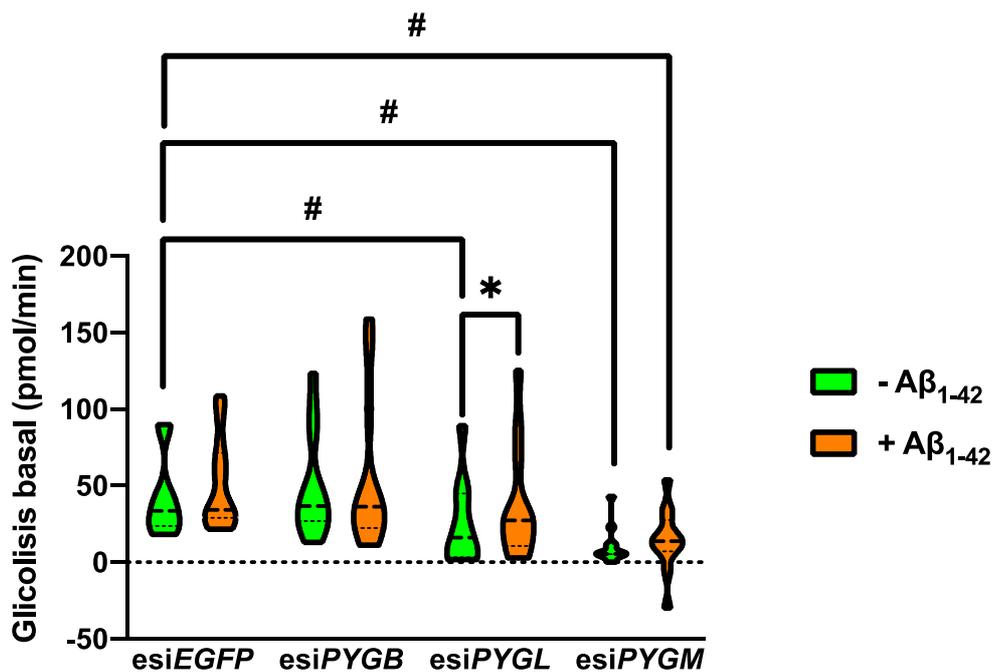


Figura 18. La glicolisis basal es dependiente de la PYGM e independiente de los oligómeros de $A\beta_{1-42}$. 40.000 células por condición mantenidas en medio suplementado con 1% FBS durante 12-16 horas, fueron o no estimuladas con 5 μ M de $A\beta_{1-42}$ durante 30 minutos a 37°C. Cada 7 minutos se midió el índice de acidificación extracelular (ECAR) y el índice de consumo de oxígeno (OCR), a partir de los cuáles se calculó la glicolisis basal de los astrocitos. Se representa la media de la glicolisis basal \pm SEM de tres experimentos independientes realizados por sextuplicado y el análisis estadístico por t de student resultó ser significativo (* $p < 0,05$; # $p < 0,05$).

Analizando la glicolisis compensatoria (Figura 19), observamos la misma dinámica que en la glicolisis basal (Figura 18), en los astrocitos control (*esiEGFP*) el tratamiento con oligómeros de $A\beta_{1-42}$ no modificaba los valores de glicolisis compensatoria respecto a los no tratados (Figura 19, violines 1 (46,67 pmol/min \pm 9,10) y 2 (52,46 pmol/min \pm 8,81)). Lo mismo ocurrió en los astrocitos a los que se les había silenciado la isoforma de cerebro (Figura 19 violines 3 (44,50 pmol/min \pm 8,23) y 4 (50,79 pmol/min \pm 12,71)). Por el contrario, los astrocitos a los que se silenció la PYGL, el valor de la glicolisis compensatoria descendió hasta 26,29 pmol/min \pm 7,14 (Figura 19, violín 5) mientras que el tratamiento con los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ hacían recuperar los niveles de control (37,12 pmol/min \pm 9,83) (Figura 19, violín 6). Sin embargo, la glicolisis compensatoria de los astrocitos a los que se silenció la expresión de la PYGM cayó hasta 12,94 pmol/min \pm 3,87 y no se recuperó cuando se trataron las monocapas con los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ (Figura 19, violines 7 y 8 respectivamente).

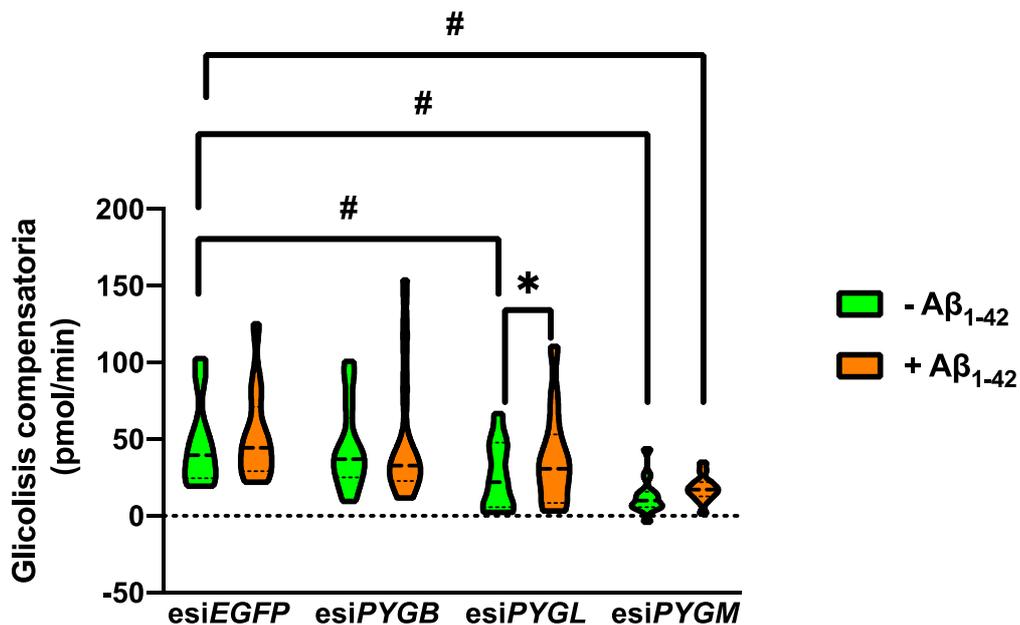


Figura 19. La glicolisis compensatoria es dependiente de la PYGM e independiente de los oligómeros de $A\beta_{1-42}$. 40.000 células por condición mantenidas en medio suplementado con 1% FBS durante 12-16 horas, fueron o no estimuladas con 5 μ M de $A\beta_{1-42}$ durante 30 minutos a 37°C. Cada 7 minutos se midió el índice de acidificación extracelular (ECAR) y el índice de consumo de oxígeno (OCR), a partir de los cuales se calculó la glicolisis compensatoria de los astrocitos. Se representa la media de la glicolisis basal \pm SEM de tres experimentos independientes realizados por sextuplicado y el análisis estadístico por t de student resultó ser significativo (* $p < 0,05$; # $p < 0,05$).

Resumiendo, estos resultados apuntan a que los oligómeros de A β ₁₋₄₂ no afectan al metabolismo glicolítico de los astrocitos. Además, sugieren que la actividad de las isoformas son específicas, por un lado el metabolismo oxidativo apunta a que estaría regulado fundamentalmente por la PYGL mientras que la glicolisis por la PYGM y parcialmente por la PYGL.

Teniendo en cuenta que las determinaciones obtenidas por el analizador Seahorse son una forma indirecta de evaluar la glicolisis, dado que los protones generados en estas valoraciones pueden provenir de otras fuentes alternativas, nosotros examinamos el papel de las isoformas de la PYG en la generación de lactato en astrocitos.

Para ello, 8 millones de células se transfectaron con 10 pg de esiRNA (*esiEGFP*, *esiPYGB*, *esiPYGL* o *esiPYGM*) (ver Materiales y Métodos, apartado 2.1.2.1.). Al día siguiente de la transfección, se sembraron 2 millones de células de cada condición en medio suplementado con 1% de FBS. Se incubaron durante 12-16 horas y se estimularon o no con 5 μ M de A β ₁₋₄₂ durante 30 minutos a 37°C. A continuación, las monocapas celulares se homogenizaron con 200 μ L de tampón de ensayo y se preparó la reacción enzimática utilizando el Lactate Assay Kit (Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante (ver Material y Métodos apartado 2.15).

Como muestra en la Figura 20 (barras 1 y 2), el tratamiento con oligómeros de A β ₁₋₄₂ no modificaba la concentración de lactato comparado con los niveles basales (astrocitos control) (4,33 \pm 0,45 ng/ μ L frente 4,54 \pm 0,50 ng/ μ L). Estas concentraciones de lactato no se cambiaron en ausencia de expresión ni de PYGB ni de PYGL, concretamente, se obtuvieron 4,86 \pm 0,44 y 4,05 \pm 0,64 ng/ μ L de lactato, respectivamente (Figura 20, barras 3 y 5). Los oligómeros de A β ₁₋₄₂ tampoco afectaban a las concentraciones de lactato en ausencia de expresión ni de la isoforma B, ni de la isoforma L (Figura 20, barras 4 y 6, 4,50 \pm 0,34 y 3,85 \pm 0,52 ng/ μ L respectivamente). Sin embargo, esta dinámica cambiaba en los astrocitos a los que se les había silenciado el gen que codifica para la PYGM, en este caso los niveles basales de lactato disminuyeron de forma rotunda hasta un valor de 1,45 \pm 0,32 ng/ μ L (Figura 20, barra 7), y esos niveles se mantuvieron (1,76 \pm 0,31 ng/ μ L) en presencia de oligómeros A β ₁₋₄₂ en los cultivos celulares (Figura 20, barra 8).

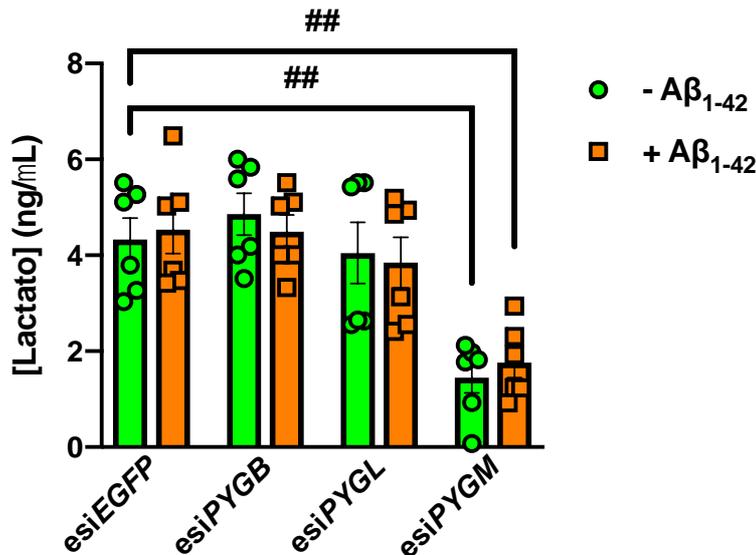


Figura 20. Los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ no modulan la generación de lactato. La concentración de lactato generada en ng/μL se determinó por colorimetría siguiendo el protocolo del Lactate Assay Kit de Sigma. El histograma representa la media ± SEM de tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado, y el análisis estadístico por t-Student resultó ser significativo (##p<0,01).

Este resultado indica que la PYGM estaría controlando la generación de lactato en la línea de astrocitos humanos y sería independiente de los oligómeros de Aβ₁₋₄₂.

4. Papel de las O-GlcNAcilaciones en las respuestas de los astrocitos mediadas por Aβ₁₋₄₂.

4.1. Los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ favorecen la O-GlcNAcilación de proteínas.

Dado que la actividad de la PYGM mediada por los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ no afecta al metabolismo glicolítico de los astrocitos, nosotros postulamos que la degradación de los gránulos de glucógeno controlada por la PYGM en estas células gliales podría activar la ruta de las hexosaminasas (HBP) como fuente de obtención de uridina difosfato N-acetil glicosamina (UDP-GlcNAc), sustrato para la O-GlcNAc transferasa (OGT) la cual controla la O-GlcNAcilación de proteínas, un tipo de modificación postraduccional de proteínas.

Para investigar este hipótesis, 2 millones de astrocitos humanos inmortalizados, previamente deprivados de FBS durante 12-16 horas, se estimularon o no con 1 μM de oligómeros de Aβ₁₋₄₂ a 37°C durante 30 minutos.

A continuación, las monocapas celulares se lavaron y se lisaron con tampón RIPA. Las proteínas de la fracción soluble de los lisados se cuantificaron por el método de Bradford (Bio-Rad) y se realizó una cromatografía de afinidad con lectinas siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.4.6 de Materiales y Métodos. Los complejos de afinidad formados se disociaron con tampón de carga y las proteínas se separaron por SDS-PAGE seguidas de Western blot. Las bandas inmuno-reactivas se visualizaron con anticuerpos anti-O-GlcNAc seguidas de ECL.

Los resultados mostraban que los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ mediaban la O-GlcNAcilación de una serie de proteínas de 40, de entre 70 y 116 y de alrededor de 200 kDa (Figura 21, calle 2). Las calles 3 y 4 representan una fracción de los lisados totales provenientes de monocapas tratadas y no tratadas con oligómeros de $A\beta_{1-42}$.

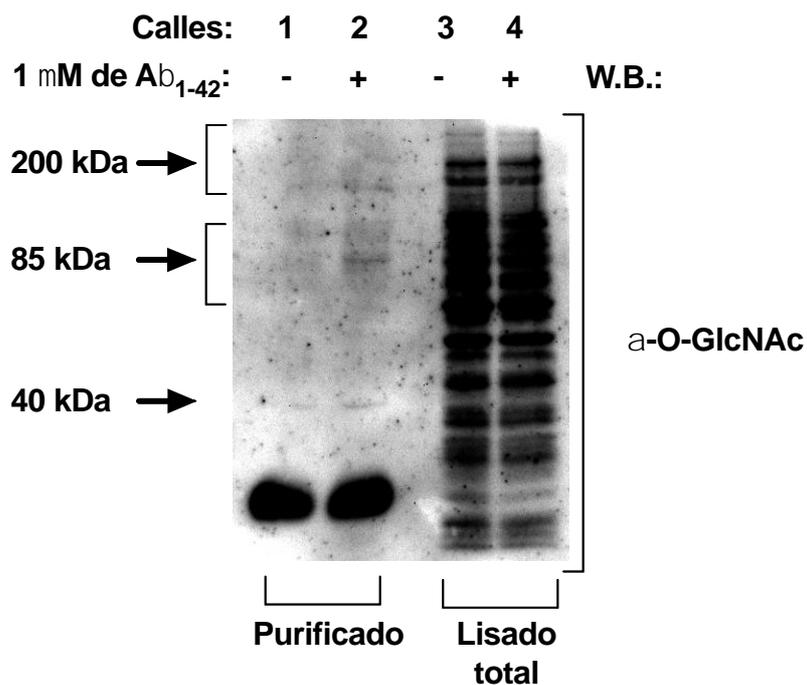


Figura 21. Los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ inducen modificaciones postraslacionales por O-GlcNAcilación de proteínas en astrocitos humanos immortalizados. 2 millones de astrocitos por condición se trataron o no con oligómeros de $A\beta_{1-42}$ durante 30 minutos a 37°C. Las células se lisaron y las proteínas O-glicosiladas se purificaron por afinidad con bolas de Lectina sefarosa, se separaron por SDS-PAGE seguidas de Western blot. Las flechas indican la talla de las proteínas susceptibles de sufrir O-Glicosilación tras el tratamiento con $A\beta_{1-42}$. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

Una vez desvelado que el tratamiento de los astrocitos con oligómeros de A β ₁₋₄₂ modificaba el patrón de O-GlcNAcilaciones de proteínas, se volvió a repetir la cromatografía de afinidad con lectinas, pero en esta ocasión a mayor escala. Se partió de 40 millones de astrocitos por condición y se procedió metodológicamente de la misma manera que la descrita en el apartado 2.4.6 de Material y Métodos.

En este caso las proteínas O-GlcNAcizadas purificadas una vez eluidas se enviaron directamente al Servicio de Proteómica (SGIKER) de la UPV/EHU dónde fueron analizadas siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.9 de Materiales y Métodos. El resultado que se obtuvo fue un listado de 155 proteínas en las que su nivel de O-GlcNAcilación aumentó con el tratamiento con oligómeros de A β ₁₋₄₂ respecto a los controles no tratados. Tras un estudio bibliográfico, de estas 155 proteínas listadas, seleccionamos a 9 proteínas con uno o más residuos O-GlcNAcizable en Serina y/o en Threonina (Tabla 1).

Tabla 1. Proteínas potencialmente O-GlcNAcizables en astrocitos por el tratamiento de treinta minutos con oligómeros de A β ₁₋₄₂.

Uniprot ID	Nombre	Péptido/s identificado/s	Residuos modificados	Función
Q92633 Q92633-2	LPAR1	<ul style="list-style-type: none"> HLATEWNTVS K 	<ul style="list-style-type: none"> T43 y T47 	Receptor del ácido lisofosfatídico (LPA). Participa en la señalización hacia la reorganización del citoesqueleto de actina, la migración, diferenciación y proliferación celular.
Q15836	VAMP3	<ul style="list-style-type: none"> ADALQAGASQ FETSAAK 	<ul style="list-style-type: none"> S58 y T62 	Proteína SNARE involucrada en la fusión de vesículas de transporte con su membrana diana.
P63027	VAMP2	<ul style="list-style-type: none"> ADALQAGASQ FETSAAK 	<ul style="list-style-type: none"> S77 y T81 	Proteína SNARE involucrada en la fusión de vesículas de transporte con su membrana diana.
P61204-2	ARF3	<ul style="list-style-type: none"> QDLPNAMNAA 	<ul style="list-style-type: none"> T140 	GTPasa involucrada en el transporte

		EITDK		de proteínas.
P84077	ARF1	<ul style="list-style-type: none"> • QDLPNAMNAA EITDK 	<ul style="list-style-type: none"> • T140 	GTPasa involucrada en el transporte de proteínas.
P68133	ACTA1	<ul style="list-style-type: none"> • AVFPSIVGR • DLTDYLMK • EITALAPSTMK • IWHHTFYNELR • YPIEHGIITNWD DMEK 	<ul style="list-style-type: none"> • S35 • T148 • T320, S325 y T326 • T91 • T79 	Actina alfa muscular esquelética (<i>Actin, alpha skeletal muscle</i>). Se encuentran en tejido muscular como el mayor integrante del aparato contráctil.
P68032	ACTC1	<ul style="list-style-type: none"> • AVFPSIVGR • DLTDYLMK • EITALAPSTMK • IWHHTFYNELR • YPIEHGIITNWD DMEK 	<ul style="list-style-type: none"> • S35 • T148 • T320, S325 y T326 • T91 • T79 	Precursor de la actina alfa muscular esquelética.
P63267	ACTG2	<ul style="list-style-type: none"> • AVFPSIVGR • DLTDYLMK 	<ul style="list-style-type: none"> • S34 • T148 	Actina gamma entérica del músculo liso (<i>Actin gamma-enteric smooth muscle</i>). Mediador de la motilidad interna celular.
P62736	ACTA2	<ul style="list-style-type: none"> • AVFPSIVGR • DLTDYLMK • EITALAPSTMK • YPIEHGIITNWD DMEK 	<ul style="list-style-type: none"> • S35 • T148 • T320, S325 y T326 • T79 	Actina muscular liso aórtica (<i>Actin, aortic smooth muscle</i>). Mediador de la motilidad interna celular.

Estas proteínas las asociamos a tres grupos funcionales : 1- receptor acoplado a proteínas G heterotriméricas (LPAR1), 2- proteínas involucradas en la formación o transporte de vesículas (GTPasas Arf y las proteínas SNARE VAMP) y 3- proteínas involucradas en modificaciones en el citoesqueleto de actina (actinas).

Nos llamó la atención la presencia del receptor del ácido lisofosfatídico tipo 1 (LPAR1) debido a su papel en el control de la fisiología celular en diferentes linajes celulares incluidos los astrocitos (Tabla 1). Por lo que nos planteamos investigar la relación entre el eje de señalización oligómeros de A β 1-

⁴²/Rac1/PYGM y la O-GlcNAcilación del LPAR1, así como su papel en la biología astrocitaria.

4.2. Los oligómeros de A β ₁₋₄₂ median la O-GlcNAcilación del LPAR1 en las treoninas 43 y 47 mientras que el LPA no induce la O-GlcNAcilación del LPAR1.

Para llevar a cabo la reacción de O-Glicosilación *in vitro* se siguió el protocolo de Yuzwa y Vocadlo (Yuzwa and Vocadlo 2017), con ligeras modificaciones. Brevemente, una vez identificadas las colonias de interés, en este caso las que co-expresaban el LPAR1 con OGT w.t. y LPAR1 con OGT^{H567A} (forma inactiva de la OGT), se hicieron los cultivos bacterianos correspondientes, se indujo la expresión de las proteínas recombinantes y se procedió a la reacción de O-GlcNAcilación en las condiciones indicadas en el apartado 2.11. de Materiales y Métodos. La reacción se detuvo centrifugando los cultivos y lisando los pellets bacterianos. A partir de la fracción soluble, se purificaron las proteínas de fusión GST-variantes de LPAR1 utilizando la resina de glutatión sefarosa (GE Healthcare) y siguiendo los pasos descritos en el apartado 2.4.2. de Material y Métodos. Las proteínas purificadas se separaron por SDS-PAGE, seguidas de Western blot y las bandas inmuno-reactivas se visualizaron con anticuerpos específicos seguidas de ECL.

Como muestra la Figura 22, la OGT *O-GlcNAcila* el receptor de LPA isoforma 1 (LPAR1) (segundo panel, calle 1). Este resultado se consolidó cuando la reacción de O-GlcNAcilación se llevó a cabo con la forma inactiva de la OGT (OGT^{H567A}), ya que en estas condiciones no se apreciaba O-GlcNAcilación del LPAR1 (Figura 22A, segundo panel, calle 2 y Figura 21B, barra 2 del comparada con la barra 1). Tanto el primer panel de la Figura 22A, como el tercero muestran los niveles de co-expresión de las proteínas de fusión.

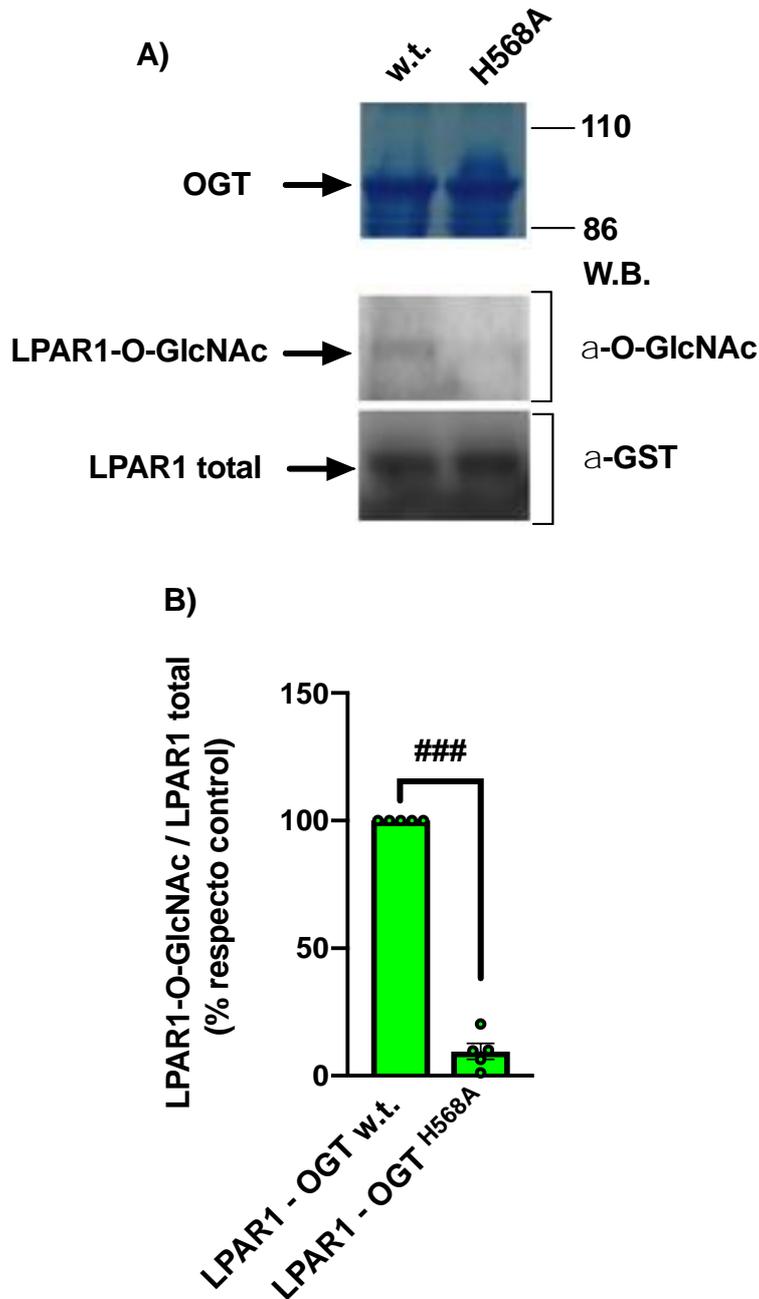
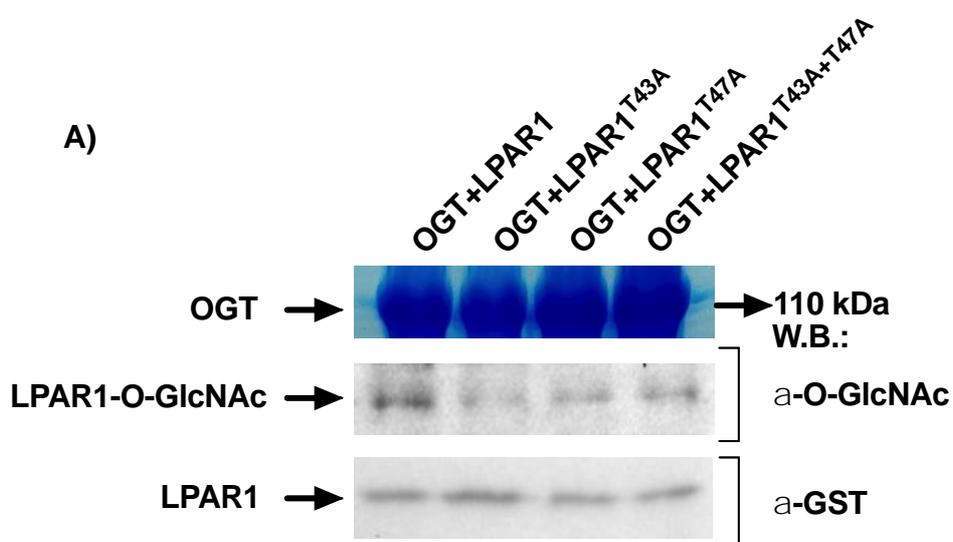


Figura 22. El LPAR1 es *O-GlcNAc*ilado por la OGT *in vitro*. **A)** La reacción de *O-GlcNAc*ilación se llevó a cabo en cultivos bacterianos que co-expresaban OGT y LPAR1, y OGT^{H568A} y LPAR1. Los paneles muestran el resultado de un experimento representativo de 5 experimentos independientes (n=5). **B)** El histograma representa la media ± SEM de las densitometrías de los 5 experimentos independientes. El análisis estadístico de la t-Student resultó ser significativo (### p<0,001).

En base a este resultado, nosotros examinamos si las treoninas 43 y 47 del LPAR1 se *O-GlcNAc*ilaban por la OGT. Para ello, procedimos de la misma manera que lo descrito en el párrafo anterior, salvo que ahora co-expresamos la OGT w.t. con LPAR1 w.t. y con sus mutantes sencillos T43A y T47A, y el

doble mutante T43A+T47A. Se hicieron los cultivos correspondientes, se indujo la expresión de las proteínas recombinantes y se procedió a la reacción de O-GlcNAcilación en las condiciones indicadas en el apartado 2.11. de Materiales y Métodos. La reacción se detuvo centrifugando los cultivos y lisando los pellets bacterianos. A partir de la fracción soluble, se purificaron las proteínas de fusión GST-variantes de LPAR1 con la resina de glutatión sefarosa (GE Healthcare) siguiendo los pasos descritos en el apartado 2.4.2. de Material y Métodos. Las proteínas purificadas se separaron por SDS-PAGE, seguidas de Western blot y las bandas inmuno-reactivas se visualizaron con anticuerpos específicos seguidos de ECL.

Como se esperaba, la OGT *O-GlcNAcilaba* el receptor LPAR1 (Figura 23A, calle 1, segundo panel), sin embargo, tanto la sustitución de la treonina 43, de la 47 como de ambas (43 y 47) por alanina, se traducían en una brusca caída de la O-GlcNAcilación de LPAR1 (Figura 23A, calles 2, 3 y 4 segundo panel). Tanto el primer panel de la Figura 23A, como el tercero panel muestran los niveles de co-expresión de las respectivas proteínas de fusión reveladas con Coomassie (OGT) o con α -GST (GST-LPAR1). El análisis densitométrico refleja los resultados mostrados en la Figura 22A, dando valor numérico a la caída del nivel de O-GlcNAcilación. Los tres mutantes de LPAR1 reducen su grado de glicosilación con respecto al LPAR1 w.t., 51,89 % \pm 5,29 (LPAR1^{T43A}), 60,96 \pm 6,22 (LPAR1^{T47A}) y de 68,24 % \pm 5,10 (LPAR1^{T43A+T47A}) (Figura 22B).



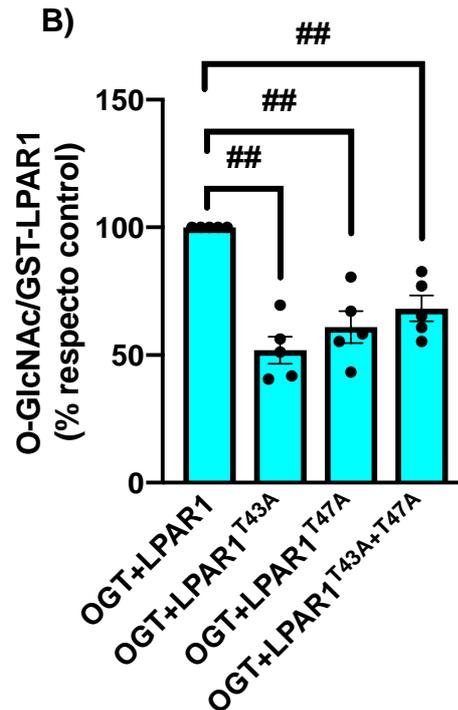


Figura 23. El LPAR1 se O-GlcNAcila en los residuos T43 y T47. A) La reacción de O-GlcNAcilación se llevó a cabo en cultivos bacterianos que co-expresan OGT y LPAR1 w.t., OGT y LPAR1^{T43A}, OGT y LPAR1^{T47A} y OGT y LPAR1^{T43A+T47A}. Los paneles muestran el resultado de un experimento representativo de 5 experimentos independientes (n=5). **B)** El histograma representa la Media \pm SEM de las densitometrías de los 5 experimentos independientes. El análisis estadístico de la t-Student resultó ser significativo (## p<0,001).

Estos resultados apuntaban a que el receptor de LPA isoforma 1 era un sustrato *in vitro* de la OGT, y además, que los residuos en treonina localizados en las posiciones 43 y 47 eran algunos de los aminoácidos receptores de los grupos O-GlcNAc transferidos de UDP-O-GlcNAc por la acción de la OGT.

Teniendo en cuenta estos resultados, nosotros examinamos en la línea de astrocitos humanos los niveles de expresión de las isoformas del LPAR (1-6). Para ello, se partió de 5 millones de células y se realizó la extracción de RNA mediante el método TRYZol. Seguidamente, se retrotranscribieron los RNA a cDNAs y se analizó la expresión de las isoformas, previamente mencionadas, por RT-PCR (ver apartado 2.5 de Material y Métodos).

Como muestra la Figura 24, los astrocitos humanos expresaban las seis isoformas del LPAR. La comparación de la expresión de cada una de ellas se hizo con respecto a un gen *house-keeping* (control) como es *gadh*. La Figura

24A representa las unidades de absorbancia relativas (RFU) obtenidas a lo largo de los ciclos de la PCR. Se observó la expresión de las seis isoformas del receptor del LPA, siendo la isoforma 1 la que más se expresaba (curva verde) y las isoformas 4 y 6 las que menor expresión tenían (curvas amarilla y azul cian). El cálculo de la proporción de mRNA verificó esta observación (Figura 24B). Concretamente, la proporción de mRNA de *lpar1* respecto al gen *gapdh* fue de un $3 \times 10^{-3} \pm 3,98 \times 10^{-4}$, valor significativamente mayor a las proporciones obtenidas para el resto de isoformas. Las siguientes isoformas que se expresaron fueron la isoforma 2 ($10^{-3} \pm 1,01 \times 10^{-4}$) y la isoforma 5 ($10^{-3} \pm 1,81 \times 10^{-4}$). Las expresiones de las otras tres isoformas fueron de $3,44 \times 10^{-4} \pm 7,75 \times 10^{-4}$ (isoforma 3), $1,60 \times 10^{-4} \pm 2,63 \times 10^{-5}$ (isoforma 5) y $6,51 \times 10^{-5} \pm 1,81 \times 10^{-5}$ (isoforma 6).

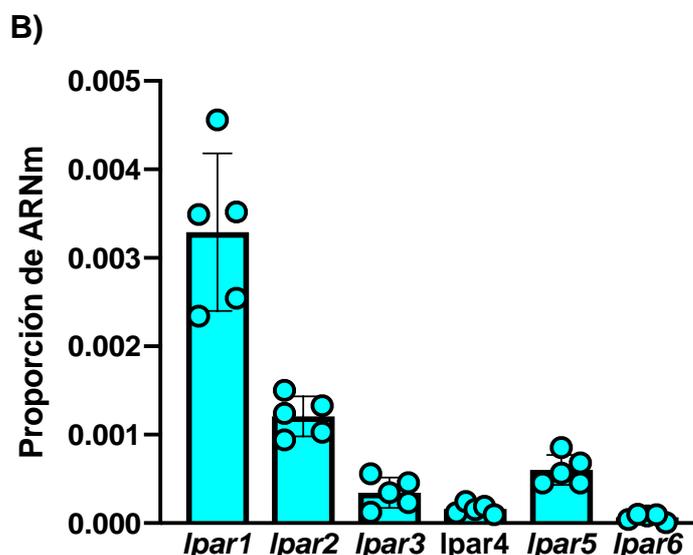
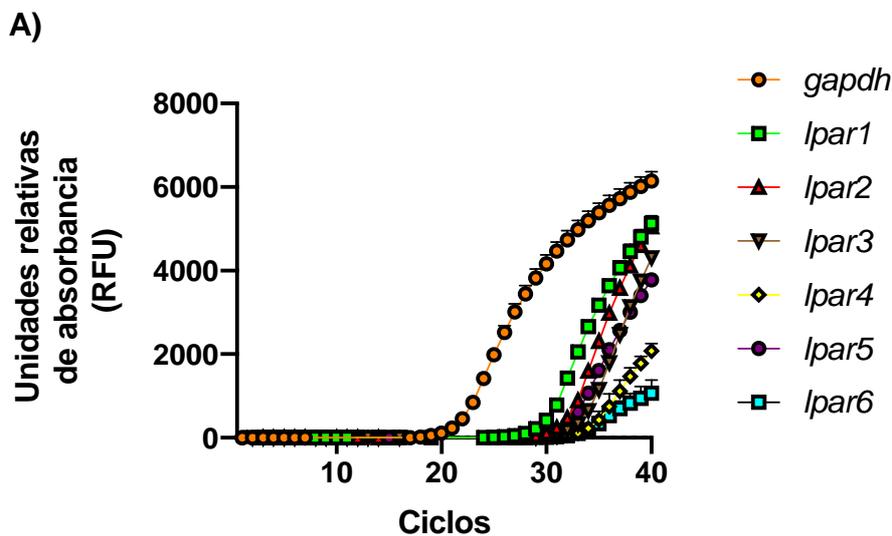
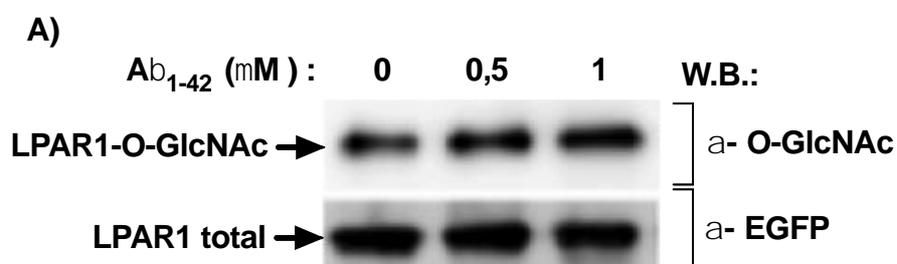


Figura 24. Expresión de las seis isoformas del receptor del ácido lisofosfatídico (LPAR1-6). **A)** Unidades relativas de absorbancia (RFU) \pm SEM de los siete genes analizados (*gapdh*, *lpar1*, *lpar2*, *lpar3*, *lpar4*, *lpar5* y *lpar6*). **B)** Proporción de mRNA \pm SEM calculada a partir de la fórmula $2^{-\Delta Ct}$, considerando el gen *gapdh* como control. El histograma representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado, y el análisis estadístico t-Student resultó ser significativo (* $<0,05$; ### $<0,001$).

Dado que esta línea celular de astrocitos humanos expresa mayoritariamente la isoforma 1 del receptor del LPA, examinamos si los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ mediaban su O-GlcNAcilación. Para ello, 8 millones de células por condición experimental se transfectaron con el plásmido pEGFP-LPAR1 que codifica para la isoforma 1 del LPAR etiquetado con EGFP. 24 horas post-transfección, las células se privaron de FBS durante 12-16 horas y se estimularon con 0,5 y 1 μ M de $A\beta_{1-42}$ oligomérico durante 30 minutos, al cabo de los cuales, las células se lisaron. Se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bio-Rad) para seguidamente inmunoprecipitar el LPAR1-EGFP, tal y como se describe en el apartado 2.4.5 de Material y Métodos. Finalmente se eluyeron las proteínas retenidas en la matriz de sefarosa y separaron por SDS-PAGE seguidas de Western blot y las bandas inmuno-reactivas se visualizaron con anticuerpos específicos seguidos de ECL.

Como muestra la Figura 25A, los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ inducían la O-GlcNAcilación del LPAR1 y ésta era dependiente de la concentración de oligómeros de $A\beta_{1-42}$. El segundo panel muestra el nivel de expresión EGFP-LPAR1. Mediante el análisis densitométrico de las bandas inmuno-reactivas comprobamos que 0,5 μ M incrementaba 1,5 veces la O-glicosilación del LPAR1 mientras que 1 μ M lo llevaba a 2 veces (Figura 25 B).



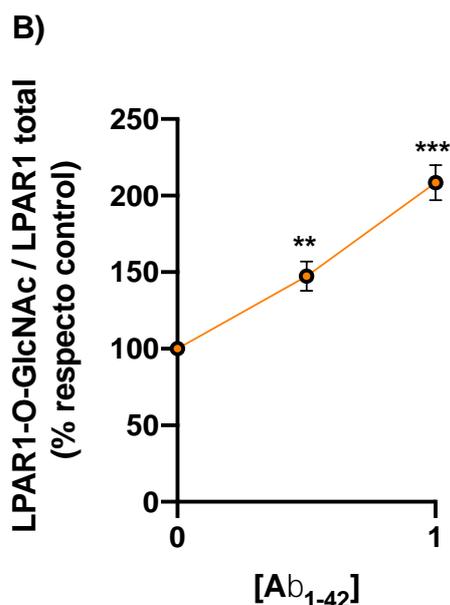


Figura 25. Los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ median la O-GlcNAcilación del LPAR1. A) 4 millones de astrocitos por condición fueron transfectados con pEGFP-LPAR1, se estimularon o no con 0,5 o 1 μM de Aβ₁₋₄₂ oligomérico y se inmunoprecipitó el LPAR1-EGFP. Los Western blots son el resultado de un experimento representativo de 5 experimentos independientes. B) La gráfica representa la Media ± SEM de las densitometrías de los 5 experimentos independientes. El análisis estadístico de la t-Student resultó ser significativo (**p<0,01; *** p<0,001).

Llegados a este punto, examinamos si el agonista fisiológico del LPAR1 y de las otras isoformas del receptor, el ácido lisofosfatídico (LPA), inducía al igual que los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ la O-GlcNAcilación del receptor. Para ello, 8 millones de células por condición experimental se transfectaron con el plásmido pEGFP-LPAR1. 24 horas post-transfección, las células se privaron durante 12-16 horas de FBS y se estimularon con una concentración máxima de LPA (100 nM) y con 1 μM de Aβ₁₋₄₂ oligomérico durante 30 minutos, al cabo de los cuales, las células se lisaron. Se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bio-Rad) y se llevó a cabo la inmunoprecipitación tal y como se describe en el apartado 2.4.5 de Material y Métodos. Finalmente, se eluyeron las proteínas retenidas en la matriz, y se separaron por SDS-PAGE seguidas de Western blot y las bandas inmuno-reactivas se visualizaron con anticuerpos específicos seguidos de ECL.

Como se esperaba, los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ inducían la O-GlcNAcilación del LPAR1 (Figura 26A, calle 3, panel 1). Sin embargo, el LPA no mediaba en esta modificación postrasduccional (Figura 26A, calle 2, panel 1 comparada con

calle 3). La cuantificación de las intensidades de las bandas inmuno-reactivas relacionadas con los niveles de expresión de EGFP-LPAR1 muestra que el LPA mantiene el nivel basal de O-GlcNAcilación, mientras que los oligómeros de A β ₁₋₄₂ multiplican por 2 esa modificación postrasduccional (Figura 26B).

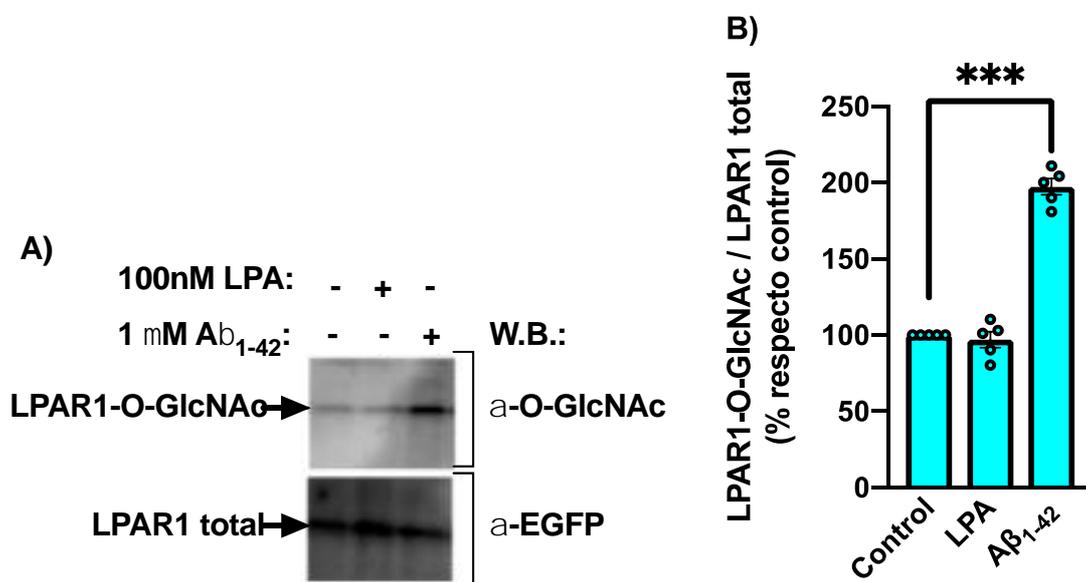


Figura 26. A diferencia de los oligómeros de A β ₁₋₄₂, el LPA no media en la O-GlcNAcilación de LPAR1. Astroцитos tratados durante 30 minutos con 5 μ M de A β ₁₋₄₂ o 100nM de LPA se lisaron y los lisados se sometieron a una inmunoprecipitación de LPAR1-EGFP. Se eluyeron las proteínas asociadas a la matriz y se separaron por SDS-PAGE seguidas de Western Blot, las bandas inmunoreactivas se visualizaron con anticuerpos anti-EGFP seguidas de ECL. **A)** El panel superior muestra el LPAR1 O-GlcNAcilado y el panel inferior la expresión de LPAR1 total. Ambos paneles son el resultado de un experimento, representativo de 5 experimentos independientes. **B)** Los resultados presentados en el histograma representan la media \pm SEM de las densitometrías de 5 experimentos independientes y el análisis estadístico de la t-Student resultó ser significativo (***) p < 0,01).

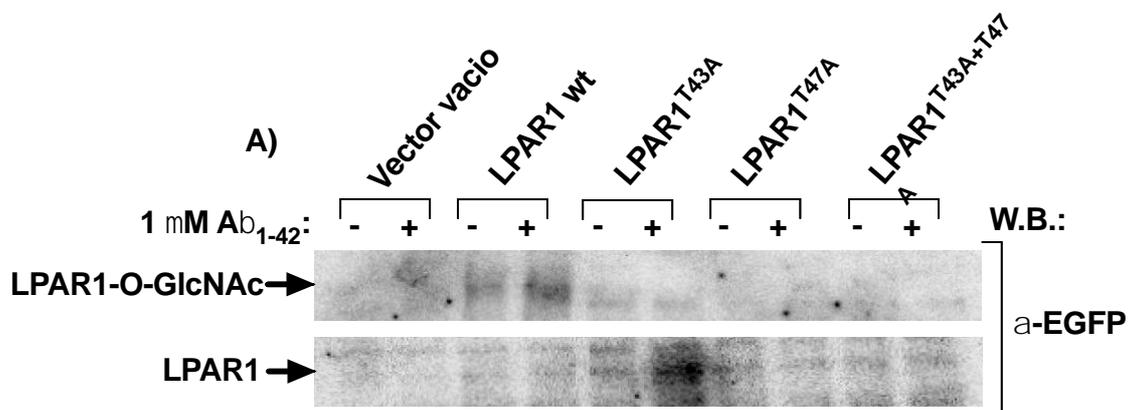
Este resultado es muy interesante porque permite postular que los oligómeros de A β ₁₋₄₂ estarían regulando la funcionalidad del LPAR1 por medio de modificaciones postrasduccionales por O-Glicosilación y que parecería que nada tiene que ver con la regulación del receptor mediada por el agonista fisiológico, LPA.

En su conjunto, los ensayos de O-GlcNAcilación *in vitro* apuntaban a que por una parte las treoninas 43 y 47 se O-GlcNAcilaban por la acción de la OGT, y

por otra, que los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ mediaban el aumento de O-GlcNAcilación del LPAR1.

Con estos resultados, examinamos si en astrocitos los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ controlaban también las O-GlcNAcilaciones de las treoninas 43 y 47 del LPAR1. Para ello, se partió de 8 millones de células por condición y se transfectaron con vector vacío pEGFP, pEGFP-LPAR1 w.t. o los mutantes LPAR1^{T43A}, LPAR1^{T47A} y LPAR1^{T43A+T47A} que previamente se habían subclonado en el vector de expresión eucariota pEGFP (ver apartado 2.1.2.1. de Material y Métodos). 24 horas post-transfección, las células se privaron durante 12-16 horas de FBS y se estimularon o no con 1 μ M de $A\beta_{1-42}$ durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, las células se lisaron con tampón RIPA y las proteínas de los lisados se cuantificaron por el método de Bradford (Bio-Rad). Una vez cuantificadas, se realizó la cromatografía de afinidad por lectinas para purificar las proteínas O-GlcNAciladas tal y como se describe en el apartado 2.4.6 de Material y Métodos. Para finalmente eluir las proteínas retenidas en la matriz, y separarlas por SDS-PAGE seguidas de Western blot. Las bandas inmuno-reactivas se visualizaron con anticuerpos específicos seguidos de ECL.

El $A\beta_{1-42}$ oligomérico inducía una potente O-GlcNAcilación del LPAR1 w.t. (Figura 27A carril 4 comparado con carril 3 y Figura 27B, barra 2 comparada con barra 1), esa O-GlcNAcilación no se producía cuando se sustituyeron las treoninas 43 y 47 por alaninas (Figuras 27 A y B). Este resultado apuntaba a que la O-GlcNAcilación tenía lugar en ambas treoninas (T43 y T47) por lo que posiblemente, la enzima OGT necesite de la disponibilidad de ambos residuos para reconocer las dianas de O-GlcNAcilación.



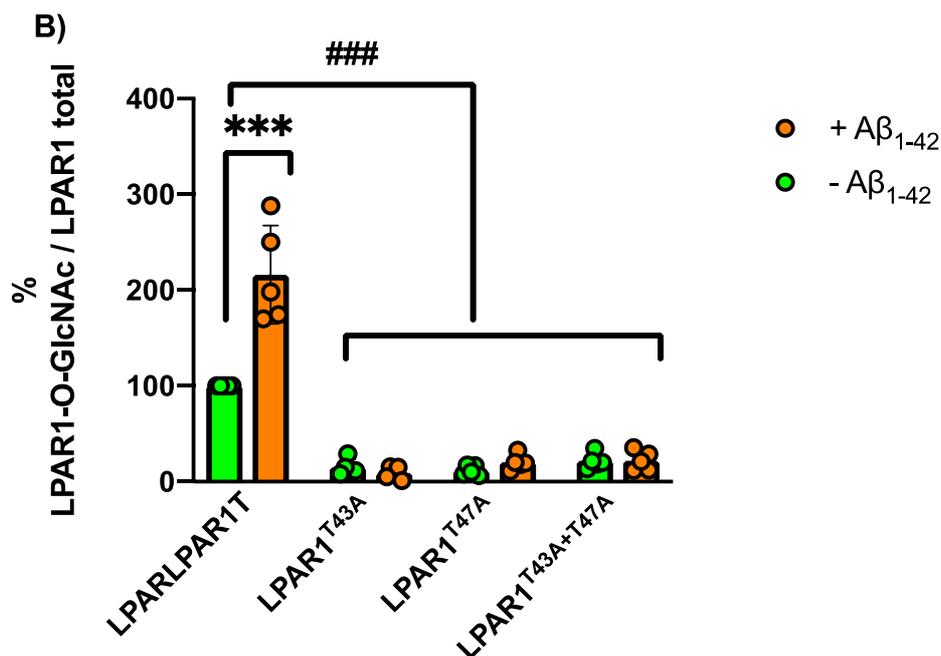


Figura 27. Los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ O-GlcNAcilan al LPAR1 en los residuos T43 y T47. Astroцитos transfectados con las LPAR1 wt y los diferentes mutantes de las treoninas de LPAR1 tratados o no durante 30 minutos con 5μM de Aβ₁₋₄₂ se lisaron y los lisados se sometieron a cromatografía de afinidad de lectinas. Se eluyeron las proteínas asociadas a la matriz y se separaron por SDS-PAGE seguidas de Western Blot, las bandas inmunoreactivas se visualizaron con anticuerpos anti-EGFP seguidas de ECL. **A)** El panel superior muestra el LPAR1 O-glicosilado y el panel inferior la expresión de LPAR1 total. Ambos paneles son el resultado de un experimento, representativo de 3 experimentos independientes. **B)** Los resultados presentados en el histograma representan la media ± SEM de las densitometrías de 3 experimentos independientes y el análisis estadístico de la t-Student resultó ser significativo (**p<0,001; ###p<0,001).

En su conjunto, podemos concluir que el receptor de LPA isoforma 1 se O-GlcNAcila en las treoninas 43 y 47 por medio de la OGT, tanto *in vitro* como *in vivo* y estas O-GlcNAcilaciones *in vivo* no están mediadas por el agonista natural que es el LPA, sino por los oligómeros de Aβ₁₋₄₂. Mostrando que este péptido sigue una dinámica de señalización sobre el LPAR1 que nada tiene que ver con el LPA.

Junto a los resultados obtenidos en el apartado 3, proponemos que la activación del eje Rac1/PYGM inducida por los oligómeros de Aβ₁₋₄₂, requiere la participación de la ITGβ₁ y controla la degradación del glucógeno intracelular con el fin de obtener monómeros de glucosa-1-P. Éstos son utilizados para la

síntesis de UDP-GlcNAc, molécula necesaria para la O-GlcNAcilación de proteínas mediada por la OGT (Figura 28).

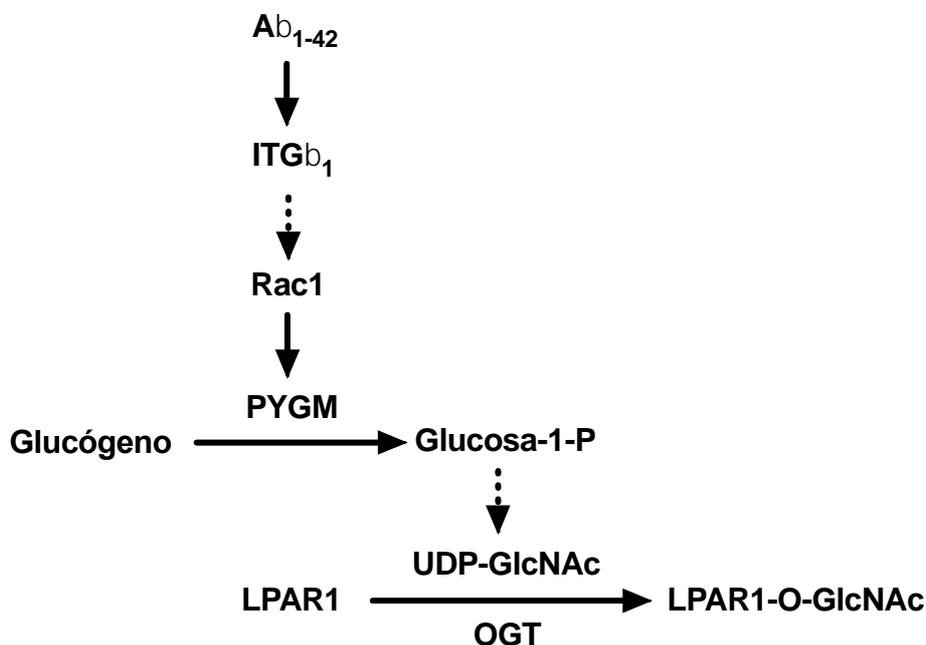


Figura 28. La O-GlcNAcilación del LPAR1 mediada por los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ está controlada por el tandem Rac1/PYGM. Los apartados 3 y 4 del capítulo de resultados sugieren que el tratamiento de 30 minutos con Aβ₁₋₄₂ oligomérico está regulando el aumento de O-GlcNAcilación del LPAR1 en las treoninas 43 y 47 mediante la degradación de glucógeno promovida por la activación del eje Rac1/PYGM. La glucosa 1-P obtenida se utiliza para la síntesis de UDP-GlcNAc, sustrato de la OGT que utiliza para la O-GlcNAcilación de proteínas.

5. Papel de la PYGM y de la O-GlcNAcilación de LPAR1 en la respuesta de los astrocitos a los oligómeros de Aβ₁₋₄₂.

5.1. La generación de especies reactivas de oxígeno mediadas por los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ implican al tandem Rac1/PYGM.

Dado que los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ modulan la activación del eje Rac1/PYGM, y que su señalización aguas abajo no parece estar relacionada con el metabolismo glucogenolítico, nos preguntamos qué respuestas celulares controladas por los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ estarían mediadas por este eje de señalización intracelular. Anteriormente, nuestro grupo de investigación describió que los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ controlaban la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en astrocitos primarios de rata a través de la GTPasa Rac1 (Wyssenbach et al. 2016).

Teniendo en cuenta ésto, nosotros postulamos que el tándem Rac1/PYGM podría intervenir en la generación de ROS inducida por los oligómeros de A β ₁₋₄₂. Para resolver esta cuestión, se sembraron 150.000 células por pocillo en una placa de 24 pocillos y se incubaron durante 12-16 horas en medio suplementado con 1% de FBS. Posteriormente, las células se trataron durante 1 hora a 37°C con 70 ng/ μ L de péptido TAT (TAT-EGFP o TAT-RBD-PYGM) para seguidamente estimularlas o no con 5 μ M de oligómeros de A β ₁₋₄₂ durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 20 minutos con 5 μ M de sonda CM-H2DCFDA (Invitrogen) a 37°C y se midió la generación de ROS tal y como se indica en el apartado 2.12 de Material y Métodos.

Como se esperaba, los oligómeros de A β ₁₋₄₂ potenciaban la producción de ROS 137,63 \pm 7,72% (Figura 29, barra 2) comparada con el control, células no tratadas (Figura 29, barra 1). Y esta producción de ROS se bloqueaba por la presencia de TAT-RBD-PYGM (92,61 \pm 9,23%) (Figura 29 barra 4 comparada con barra 1). El péptido control TAT-EGFP *per se* no tenía ningún efecto sobre la generación de ROS (Figura 29, barras 1 y 2).

Por lo tanto, estos resultados sugerían que el tandem Rac1/PYGM controlaba la producción de ROS inducida por los oligómeros de A β ₁₋₄₂.

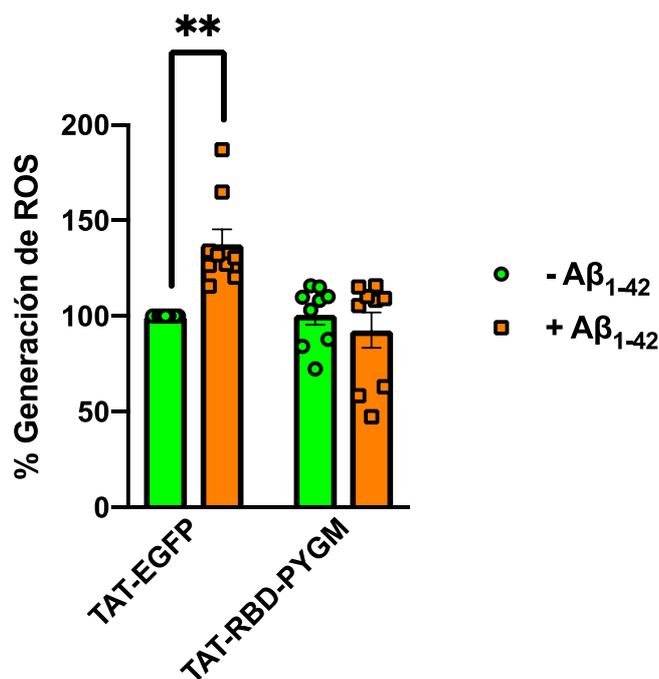


Figura 29. Los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ conducen a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) a través del tándem Rac1/PYGM. Cultivos de astrocitos expuestos a 70 ng/ μ L de TAT-EGFP o TAT-PYGM durante 1 hora, fueron estimulados o no con 5 μ M de $A\beta_{1-42}$ durante 30 minutos a 37°C. Se incubaron con 1 μ M de sonda CM-H2DCFDA y se midió la fluorescencia con una onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm. Las medidas se relativizaron con respecto al control negativo. Los resultados se representan en el histograma como la media \pm SEM de tres experimentos independientes realizados por triplicado, expresada en porcentaje de producción de ROS y el análisis estadístico por t de student resultó ser significativo (**p<0,01).

Con el fin de caracterizar la PYG responsable de la generación de ROS mediada por los oligómeros de $A\beta_{1-42}$, se silenciaron las tres isoformas. Para ello, 4 millones de astrocitos por condición se transfectaron con 10 pg de esiRNA (esiEGFP, esiPYGB, esiPYGL o esiPYGM) (ver apartado 2.1.2.1. de Material y Métodos). Al día siguiente de la transfección, de cada condición se recogieron y se sembraron 150.000 células por pocillo en una placa de 24 pocillos, utilizando medio suplementado con 1% de FBS. Se incubaron durante 12-16 horas y se estimularon o no con 1 μ M de oligómeros de $A\beta_{1-42}$ durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, las células se lavaron con PBS y se incubaron con 5 μ M de sonda CM-H2DCFDA (Invitrogen) tal y como se indica en el apartado 2.12 de Material y Métodos.

Como muestra la Figura 30, los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ producían un aumento significativo de la generación de ROS (128,16 % \pm 9,68, barra 2). Los mismos resultados se obtenían cuando se habían silenciado tanto la isoforma de cerebro (esiPYGB) (130,02 % \pm 9,88, barra 4) como la isoforma de hígado (esiPYGL) (118,50 % \pm 6,65, barra 6). Por el contrario, cuando se silenció la expresión de PYGM, estas células no respondían a la generación de ROS dependiente de la presencia de oligómeros de $A\beta_{1-42}$ (82,74 % \pm 3,06 (Figura 30 barra 6 comparada con barra 1). Incluso, este valor descendió ligeramente cuando fueron tratadas con los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ (70,09 % \pm 8,17) (Figura 30, barra 8).

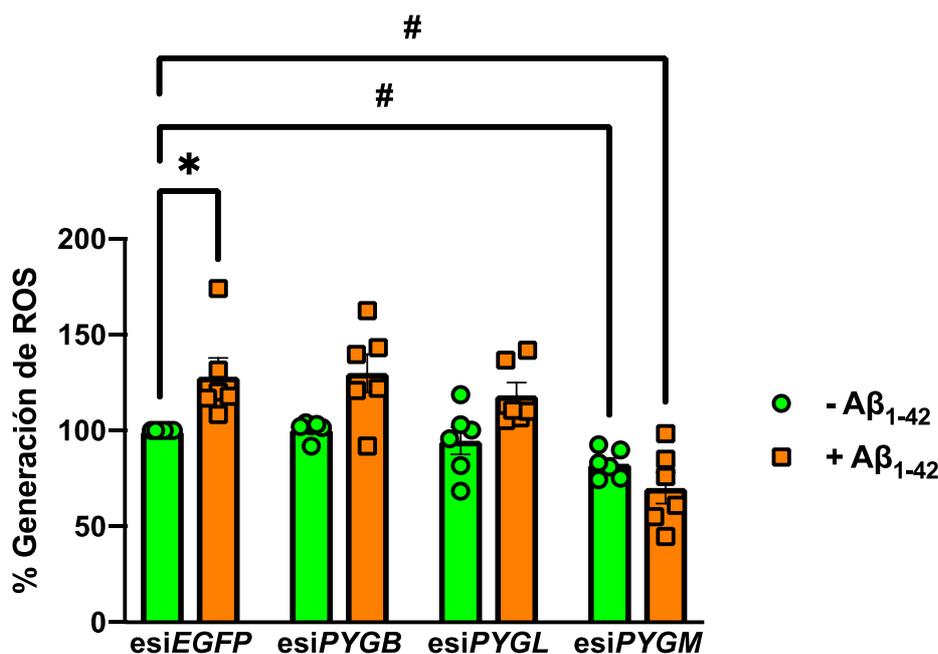


Figura 30. La generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) controladas por los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ requieren de la actividad de la PYGM. Cultivos de astrocitos silenciados con las diferentes isoformas de la PYG fueron estimulados o no con 1 μM de Aβ₁₋₄₂ durante 30 minutos a 37°C. Se incubaron con 5μM de sonda CM-H2DCFDA y se midió la fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 485 nm y una de emisión de 530 nm. Las medidas se relativizaron con respecto al control negativo. Los resultados se representan en el histograma como la media ± SEM de tres experimentos independientes realizados por triplicad, expresada en porcentaje de producción de ROS y el análisis estadístico por t de student resultó ser significativo (**p<0,01).

Estos resultados en su conjunto sugieren que no sólo la generación de ROS mediada por los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ está regulada por la GTPasa Rac1, sino que ésta implica a la isoforma muscular de la Glucógeno fosforilasa (PYGM).

5.2. Las O-GlcNAcilaciones de proteínas intervienen en la generación de ROS.

Nuestros resultados apuntaban a que la activación de la PYGM por parte de los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ conducirían al aumento de O-GlcNAcilaciones de proteínas. Por ese motivo, el siguiente paso consistió en comprobar si estas modificaciones postrasduccionales estaban mediando el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) inducido por los oligómeros de Aβ₁₋₄₂.

Para ello, se sembraron 150.000 células por pocillo en una placa de 24 pocillos y se trataron con 10 μM de OSMI (inhibidor de OGT) o 12,5 μM de Thiamet-G

(inhibidor de la OGA) durante 12-16 horas en medio suplementado con 1% de FBS. Seguidamente, los cultivos se estimularon o no con 1 μ M de $A\beta_{1-42}$ oligomérico durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 20 minutos con 5 μ M de sonda CM-H2DCFDA (Invitrogen) a 37°C para finalmente medir la generación de ROS tal y como se indica en el apartado 2.12 de Material y Métodos.

Los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ producían un aumento significativo de la generación de ROS de un $122,97\pm 6,95\%$ en las células tratadas con DMSO (vehículo) (Figura 31, barra 2 comparada con la barra 1). De forma inesperada, el porcentaje de ROS producido por las células tratadas con OSMI fue de $131,82\pm 9,57\%$, valor comparable al de las células pretratadas con DMSO y posteriormente tratadas con $A\beta_{1-42}$ oligomérico (Figura 31, barra 3 comparada con barra 2), esta producción de ROS no se modificó con el tratamiento con $A\beta_{1-42}$ oligomérico (Figura 31, $122,22\pm 5,35\%$, barra 4). Por el contrario, el tratamiento con Thiamet-G redujo la generación de ROS muy por debajo del nivel basal (Figura 30, $78,081\pm 8,79\%$, barra 5), y bloqueó eficazmente el efecto del $A\beta_{1-42}$ oligomérico ($80,60\pm 5,83\%$).

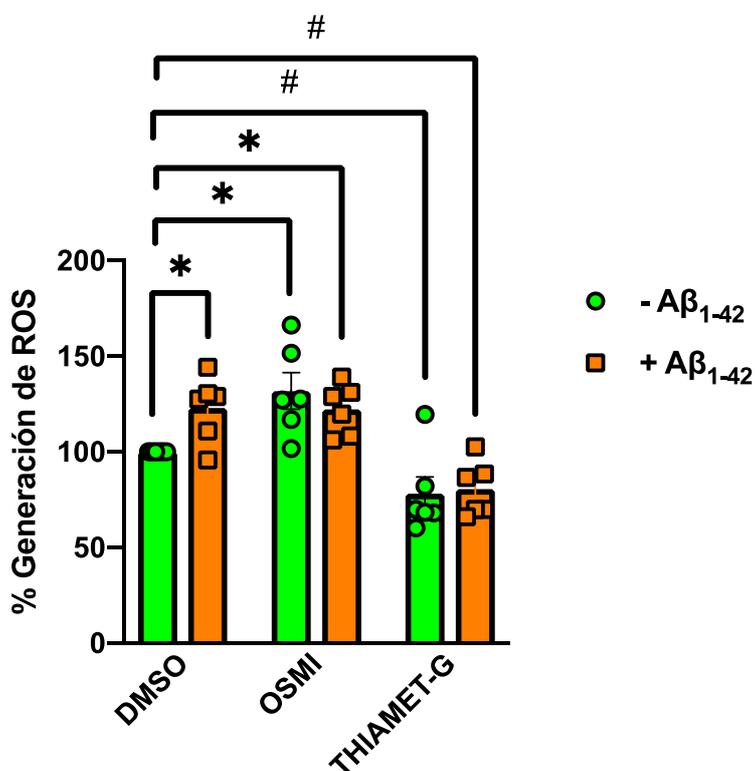


Figura 31. Los oligómeros de A β ₁₋₄₂ modifican el equilibrio OGT/OGA inducen la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) . Cultivos de astrocitos pre-tratados con OSMI (inhibidor de OGT) y con Thiamet-G (inhibidor de OGA) fueron estimulados o no con 1 μ M de A β ₁₋₄₂ durante 30 minutos a 37°C. Se incubaron con 5 μ M de sonda CM-H2DCFDA y se midió la fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 485 nm y una de emisión de 530 nm. Las medidas se relativizaron con respecto al control negativo. Los resultados se representan en el histograma como la media \pm SEM de tres experimentos independientes realizados por duplicado, expresado en porcentaje de producción de ROS y el análisis estadístico por t de student resultó ser significativo (*p<0,01; #p<0,01).

Los resultados obtenidos indican que tratamientos a tiempos cortos con A β ₁₋₄₂ oligomérico en células pre-tratadas con inhibidores farmacológicos de la OGT y la OGA, modifican el equilibrio entre ambas enzimas alterando así la generación de ROS en los astrocitos. Esto sugiere que los oligómeros de A β ₁₋₄₂ podrían desregular la actividad de las enzimas desencadenando a un aumento de generación de ROS.

5.3. La sobreexpresión de GFAP está regulada por el eje Rac1/PYGM.

Una vez examinado el papel del eje Rac1/PYGM y O-GlcNAcilaciones en la generación de especies reactivas de oxígeno, la siguiente pregunta fue si este eje de señalización participaba en la respuesta tardía de los astrocitos a los oligómeros de A β ₁₋₄₂. Dado que nuestro grupo de investigación ya había descrito que la GTPasa Rac1 participaba en la astrogliosis (Wyssenbach et al 2016), nosotros investigamos si la sobreexpresión de uno de los marcadores de astrogliosis, la proteína GFAP, dependía de la ruta de señalización controlada por el tándem Rac1/PYGM.

En primer lugar, comprobamos los niveles de proteína GFAP por Western blot. Para ello, 800.000 astrocitos fueron incubados en medio suplementado con 1% de FBS durante 12-16 horas a 37°C y se pre-trataron con 70 ng/ μ L de TAT-EGFP o TAT-RBD-PYGM durante 1 hora. A continuación, se estimularon o no con 1 μ M de A β ₁₋₄₂ y se incubaron durante 72 horas a 37°C para finalmente, lisar las células. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE seguidas de Western blot. Las bandas inmuno-reactivas incubadas con anticuerpos específicos se visualizaron con ECL.

Como se esperaba, los oligómeros de A β ₁₋₄₂ inducían la sobreexpresión de GFAP (Figura 32A, panel superior calle 2 comparada con calle 1). Y esta

expresión, fue eficazmente bloqueada por el tratamiento con el péptido TAT-RBD-PYGM (Figura 32A, panel superior calle 4 comparada con calle 2). El segundo panel corresponde a la expresión de GAPDH, utilizado para relativizar los valores de GFAP obtenidos en cada condición. La Figura 32B representa el análisis densitométrico llevado a cabo en los Western blot, mostrando una vez más que el bloqueo ejercido por parte del péptido TAT-RBD-PYGM sobre la expresión de GFAP mediado por los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ (barra 4 comparada con barra 2).

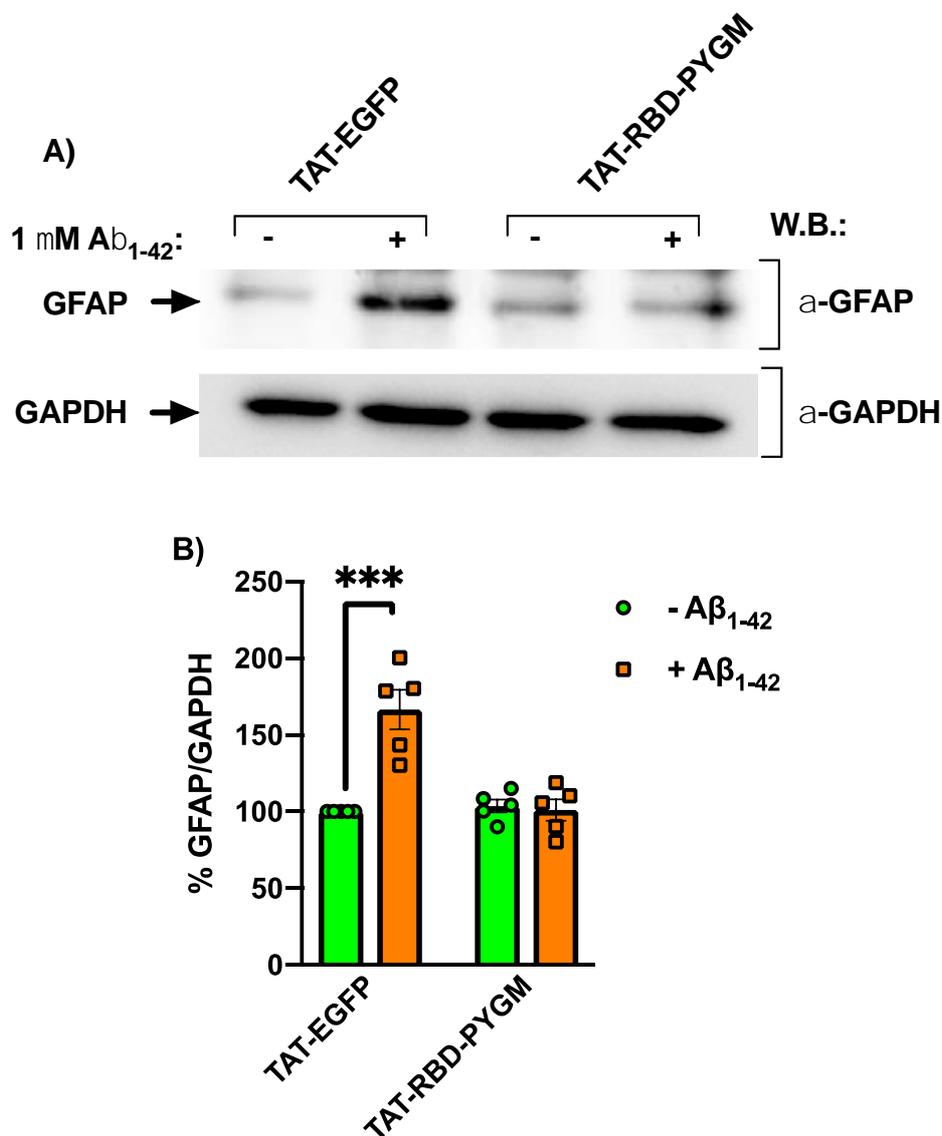


Figura 32. La expresión de GFAP mediada por los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ requiere del eje Rac1/PYGM. **A)** Astrocytos pre-tratados durante 1 hora con 70 ng/ μ L de TAT-EGFP o TAT-RBD-PYGM y posteriormente, tratados o no con 1 μ M de $A\beta_{1-42}$ oligomérico durante 72 horas se analizó la expresión de GFAP por Western blot. Los paneles son el resultado de un experimento independiente que es representativo de 5 experimentos. **B)** El histograma representa la media \pm SEM de las densitometrías de 5

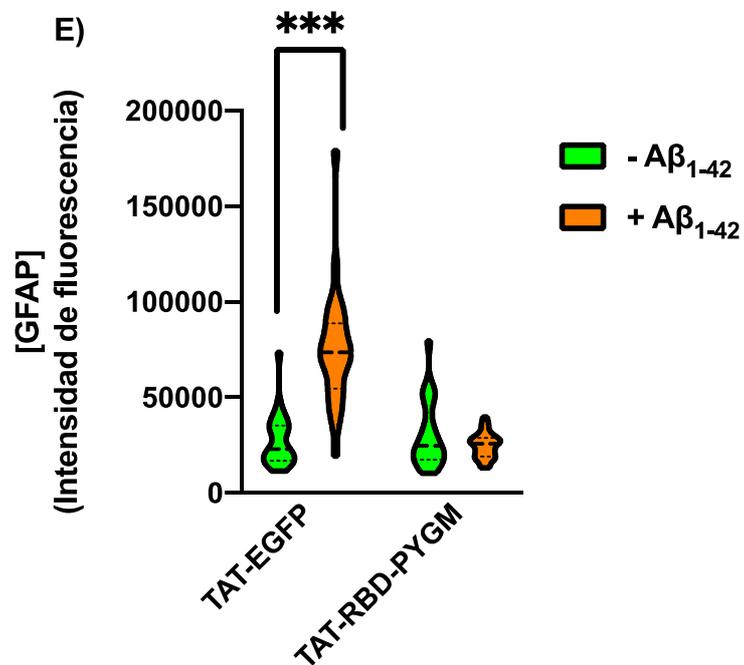
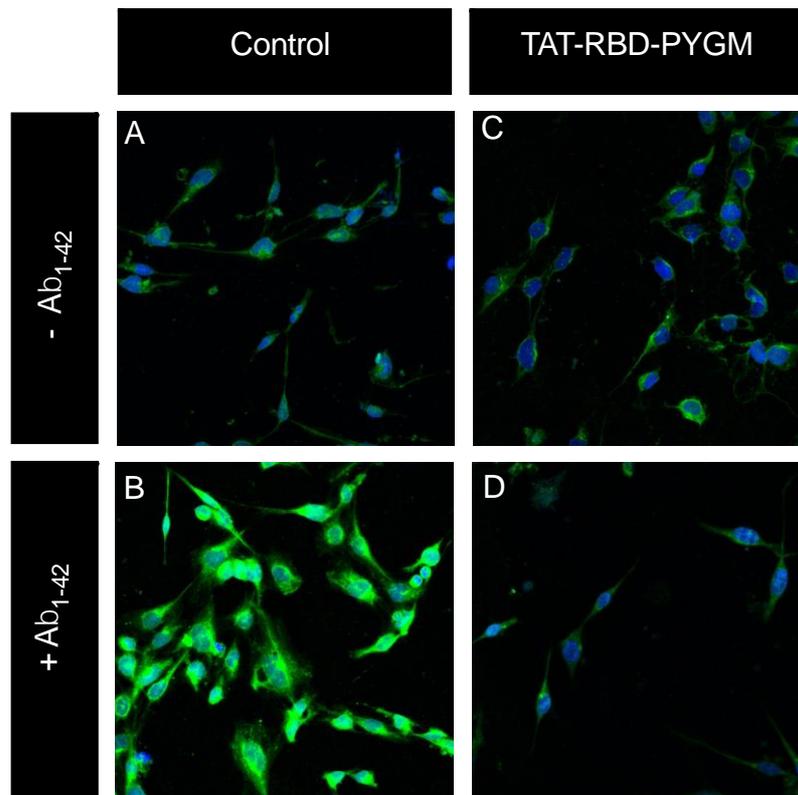
experimentos independientes. El análisis estadístico de la t-Student resultó ser significativo en 72 horas de estimulación (**p<0,001).

El siguiente paso fue verificar estos resultados de la expresión de GFAP mediante microscopía confocal. Para ello, 40.000 células cultivadas en *coverslips*, se mantuvieron en medio RPMI suplementado con 1% de FBS durante 12-16 horas y se incubaron durante 1 hora a 37°C con vehículo o con 70 ng/μL de TAT-RBD-PYGM. Posteriormente, las células se estimularon o no con 1 de Aβ₁₋₄₂ durante 72 horas a 37°C y se fijaron con 4% PFA durante 10 minutos. La inmunofluorescencia de GFAP se llevó a cabo como se indica en el apartado 2.12.1 de Material y Métodos.

Como esperábamos, los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ favorecían la expresión exacerbada de GFAP (Figura 32B). Sin embargo, esta sobreexpresión de GFAP mediada por los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ se bloqueó totalmente cuando los astrocitos se pretrataron con TAT-RBD-PYGM (Figura 32D). La sobreexpresión de GFAP, calculada por intensidad de fluorescencia de las células mostró que se pasaba de un nivel basal de 27.600,81 ± 2.749,45 a 75.316,67 ± 6.149,99 en las células tratadas con oligómeros de Aβ₁₋₄₂ (Figura 32E, violines 1 y 2). En cambio, en células pretratadas con TAT-RBD-PYGM y posteriormente con oligómeros de Aβ₁₋₄₂, la sobreexpresión de GFAP se vio eficazmente bloqueada, dando un valor de 24.838,06 ± 1.354,78, y un valor de 29.956,56 ± 3.443,30 cuando sólo se habían pretratado con TAT-RBD-PYGM (Figura 32E, violines 3 y 4).

Cuando cuantificamos el área que ocupaban las células en el *coverslip*, comprobamos que el tratamiento con Aβ₁₋₄₂ oligomérico inducía un aumento medio del área ocupada por las células desde 433,48 ± 32,48 μm² (Figura 31F, primer violín) a 749,76 ± 68,70 μm² (Figura 32F, segundo violín). Cuando las células se pretrataron con TAT-RBD-PYGM y posteriormente se estimularon con el Aβ₁₋₄₂ oligomérico el área ocupada por las células no se modificó respecto al control (Figura 32F, violín 4 (323,64 ± 23,50 μm²) comparado con violín 1 (433,48 ± 32,48 μm²)), ni tampoco respecto a las células tratadas sólo con TAT-RBD-PYGM (Figura 32F, violín 3 (444,760 ± 34,74 μm²)). Este

resultado sugería que el péptido TAT-RBD-PYGM impedía de manera eficaz el aumento de volumen celular mediado por los oligómeros de $A\beta_{1-42}$.



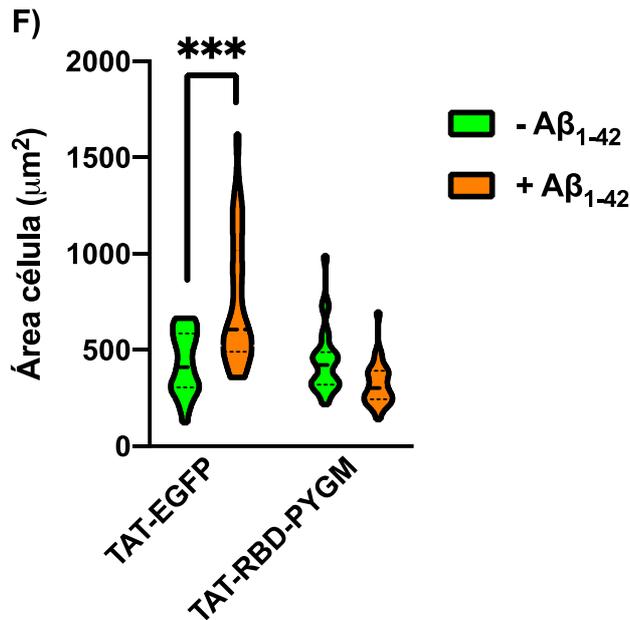


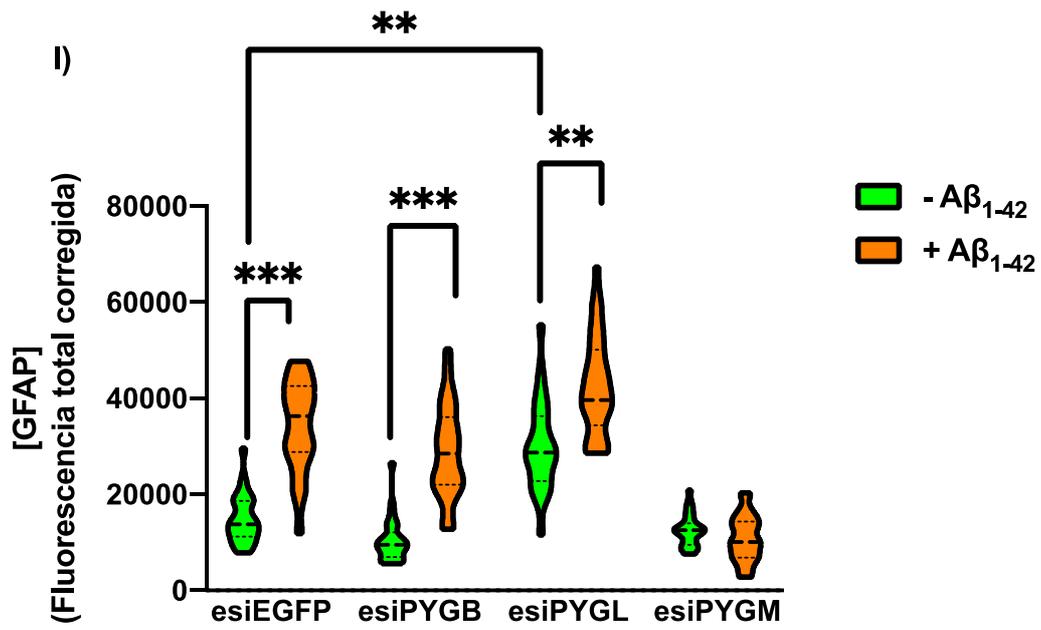
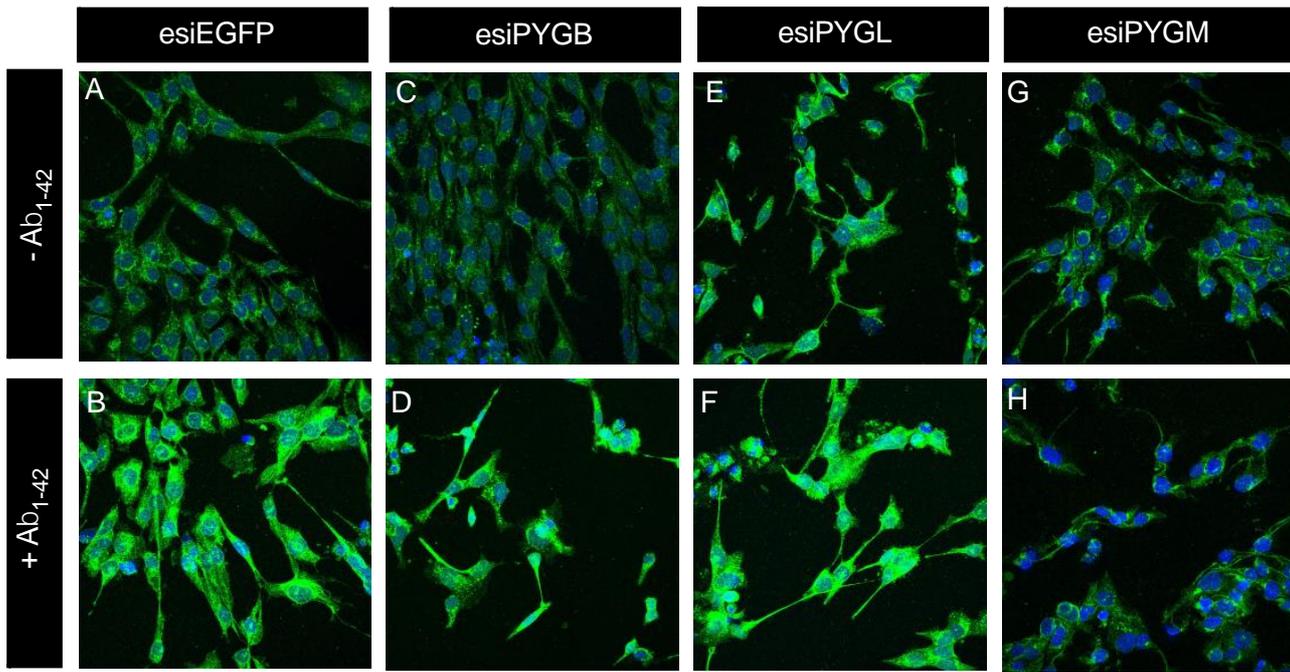
Figura 32. Los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ controlan la sobreexpresión de GFAP y el aumento del área celular a través de tándem Rac1/PYGM en astrocitos. A-D) Inmunofluorescencia de GFAP en astrocitos tratados con 70 ng/μL de TAT-EGFP o TAT-RBD-PYGM durante 1 hora y 1 μM Aβ₁₋₄₂ durante 72 horas. La inmunofluorescencia se llevó a cabo utilizando un primer marcaje con anticuerpo α-GFAP, seguido del secundario Goat α-Rabbit Alexa 488 (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las fotografías son representativas de tres experimentos independientes. **E)** La gráfica representa la media ± SEM de la expresión GFAP obtenida a partir del cálculo de fluorescencia total corregida por célula de cada condición del canal verde (GFAP) (n=90). **F)** La gráfica representa la media ± SEM del área que ocupan las células (n=90). El análisis estadístico t-Student de B y C resultó ser significativo (***) (***p<0,001)

Para confirmar el papel de la PYGM en la sobreexpresión de GFAP y en el aumento del área celular de los astrocitos, silenciamos individualmente cada una de las tres isoformas de la PYG. Para ello, astrocitos cultivados en *coverslips* al 70% de confluencia, se privaron de FBS y se transfectaron con 10 pg de esiRNA (*esiEGFP*, *esiPYGB*, *esiPYGL* y *esiPYGM*), siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.1.2.3 de Materiales y Métodos. Las células privadas y transfectadas se incubaron durante 24 horas adicionales y se trataron o no con 1 μM de oligómeros de Aβ₁₋₄₂ durante 30 minutos a 37°C. Al cabo de este tiempo, se fijaron con 4% PFA durante 10 minutos y el marcaje del GFAP se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.12.1. de Material y Métodos.

Como se esperaba, los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ inducían la sobreexpresión de GFAP en células control (*esiEGFP*) (Figura 33B). La ausencia de expresión de

la isoforma B (*esiPYGB*) no modificaba ese patrón de expresión de GFAP ni en las células no tratadas (Figura 33C) ni en las tratadas con los oligómeros de A β ₁₋₄₂ (Figura 33D). Aunque la ausencia de expresión de la isoforma de hígado en cultivos tratados con oligómeros de A β ₁₋₄₂ (Figura 33F) tampoco alteraba la expresión de GFAP, no ocurría lo mismo con su respectivo control. Es decir, la ausencia de expresión de la PYGL por sí misma aumentaba la expresión de la proteína GFAP (Figura 33E). Por el contrario, silenciando la isoforma muscular de la PYG (*esiPYGM*) no sólo se bloqueaba la expresión de GFAP mediada por los oligómeros de A β ₁₋₄₂ (Figura 33H), sino que incluso tenía efecto sobre los niveles basales de expresión de GFAP (Figura 33G), los cuales disminuían con respecto al control (Figura 33A).

De nuevo, la sobreexpresión de GFAP se calculó por la intensidad de fluorescencia de las células (Figura 33I) mostrando que se pasaba de un nivel basal de $14.874,10 \pm 1.024,48$ a $34.214,41 \pm 1.024,48$ en las células tratadas con oligómeros de A β ₁₋₄₂ (violines 1 y 2). Estos valores eran prácticamente similares a los obtenidos cuando se silenciaba la PYGB: $10.378,29 \pm 926,77$ sin tratar con A β ₁₋₄₂ oligomérico (violín 3), y $28.694,30 \pm 1.986,11$ en células tratadas (violín 4). Se observó una tendencia similar en los astrocitos silenciados para la PYGL, con la diferencia que el valor basal de expresión de GFAP fue significativamente mayor que la del control ($30.078,71 \pm 2.123,11$ frente a $14.874,10 \pm 1.024,48$, violines 6 y 1). Cuando las células silenciadas para la PYGL fueron tratadas con oligómeros de A β ₁₋₄₂, la intensidad de fluorescencia correspondía a $42.536,57 \pm 2.123,11$ (violín 6). Por último, tras el silenciamiento de la PYGM se mantuvo la intensidad de fluorescencia tanto en presencia como en ausencia de tratamiento con oligómeros de A β ₁₋₄₂, concretamente de $12.483,30 \pm 662,03$ y $10.894,70 \pm 961,32$, respectivamente (violines 7 y 8).



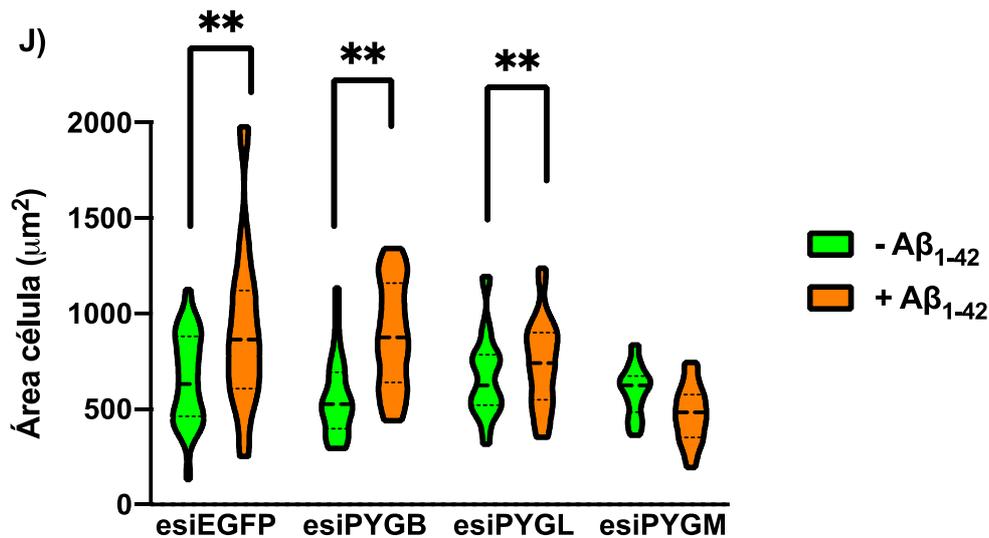


Figura 33. La PYGM controla la sobreexpresión de GFAP inducida por los oligómeros de Aβ₁₋₄₂. A-H) Inmunofluorescencia de GFAP en astrocitos transfectados con esiEGFP, esiPYGB, esiPYGL o esiPYGM fueron tratados o no con 5µM de Aβ₁₋₄₂ durante 72 horas. La inmunofluorescencia se llevó a cabo utilizando un primer marcaje con anticuerpo α-GFAP, seguido del secundario Goat α-Rabbit Alexa 488 (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las fotografías son representativas de tres experimentos independientes. I) La gráfica representa la media ± SEM de la expresión GFAP obtenida a partir del cálculo de fluorescencia total corregida por célula de cada condición del canal verde (GFAP) (n=90). J) La gráfica representa la media ± SEM del área que ocupan las células ((n=90). El análisis estadístico t-Student resultó ser significativo (***)p<0,001).

Al cuantificar el área que ocupaban las células en el *coverslip* (Figura 33J), se apreció un aumento significativo de ésta en las células controles (esiEGFP) y tratadas con Aβ₁₋₄₂ oligomérico (914,80 µm² ± 85,51) comparado con sus controles no tratados 660,76 µm² ± 49,082) (violines 2 y 1). La misma tendencia se observó en las células silenciadas con esiPYGB y con esiPYGL. Concretamente, se obtuvieron los siguientes valores basales 566,32 µm² ± 42,664 y de 675,64 µm² ± 675,600 ± 43,649, respectivamente (Figura 33, violines 3 y 5) y cuando se trataron las células con Aβ₁₋₄₂ oligomérico, éstos se incrementaron hasta 882,96 µm² ± 56,17 y 745,24 µm² ± 46,39 (Figura 33J, violines 4 y 6). Por otra parte, el tratamiento con oligómeros de Aβ₁₋₄₂ en las células a las que se silenció la isoforma muscular, no aumentó el área celular, siendo de 474,28 µm² ± 29,666 (violín 8), valor que se mantuvo como el basal (597,375 µm² ± 26,948, violín 7).

En conjunto, estos resultados sugieren que los oligómeros de A β ₁₋₄₂ a través de la activación del eje de señalización celular Rac1/PYGM controlan la astrogliosis. Siendo la isoforma muscular, PYGM, la que regula esa respuesta a los oligómeros de A β ₁₋₄₂ en los astrocitos humanos inmortalizados.

5.4. Las O-GlcNAcilaciones de proteínas inducen a la sobreexpresión de GFAP.

Nuestros resultados apuntaban a que los oligómeros de A β ₁₋₄₂ aumentaban las O-GlcNAcilaciones de proteínas a través de la PYGM. Por lo tanto, nuestro siguiente paso fue comprobar si estas modificaciones postraduccionales condicionaban la astrogliosis.

Para ello, 800.000 células se sembraron en medio suplementado con 1% de FBS y se trataron con 10 μ M de OSMI o 12,5 μ M de Thiamet-G durante 12-16 horas a 37°C. A continuación, se estimularon o no con 1 μ M de A β ₁₋₄₂ y se incubaron durante 72 horas a 37°C para finalmente lisarlas. Las proteínas de los lisados se separaron por SDS-PAGE seguidas de Western blot y las bandas inmuno-reactivas incubadas con anticuerpos específicos se visualizaron con ECL.

Como esperábamos, los oligómeros de A β ₁₋₄₂ aumentaban la expresión de GFAP (Figura 34A, primer panel, calle 2 comparada con calle 1). El pre-tratamiento con OSMI (inhibidor de OGT) bloqueó eficazmente la sobreexpresión de GFAP mediada por el A β ₁₋₄₂ oligomérico (Figura 34A, primer panel, calle 4 comparada con calle 2). Por otra parte, el pre-tratamiento con Thiamet-G indujo una cierta sobreexpresión de GFAP (Figura 34A, panel 1, calle 5 comparada con calle 1), mientras que la combinación Thiamet-G y oligómeros de A β ₁₋₄₂ bloqueaba la sobreexpresión de GFAP (Figura 34A, panel 1, calle 6 comparada con calle 2). La Figura 34B muestra el resultado de la cuantificación de las densitometrías de los Western blot. La expresión de GFAP en astrocitos tratados con A β ₁₋₄₂ aumentó hasta un 200,88% \pm 20,65 (barra 2), el pre-tratamiento de las monocapas con Thiamet-G incrementaba un 174,69% \pm 20,89, (barra 5) con respecto al control. Éste incremento se vió disminuido al tratar las células con la combinación Thiamet-G y A β ₁₋₄₂ oligomérico (126,47% \pm 16,33), y se bloqueó totalmente en la condición del pre-tratamiento con OSMI

tanto sin como con tratamiento de $A\beta_{1-42}$ oligomérico ($91,32 \% \pm 8,73$ y $105,45 \% \pm 4,50$, barras 3 y 4 respectivamente).

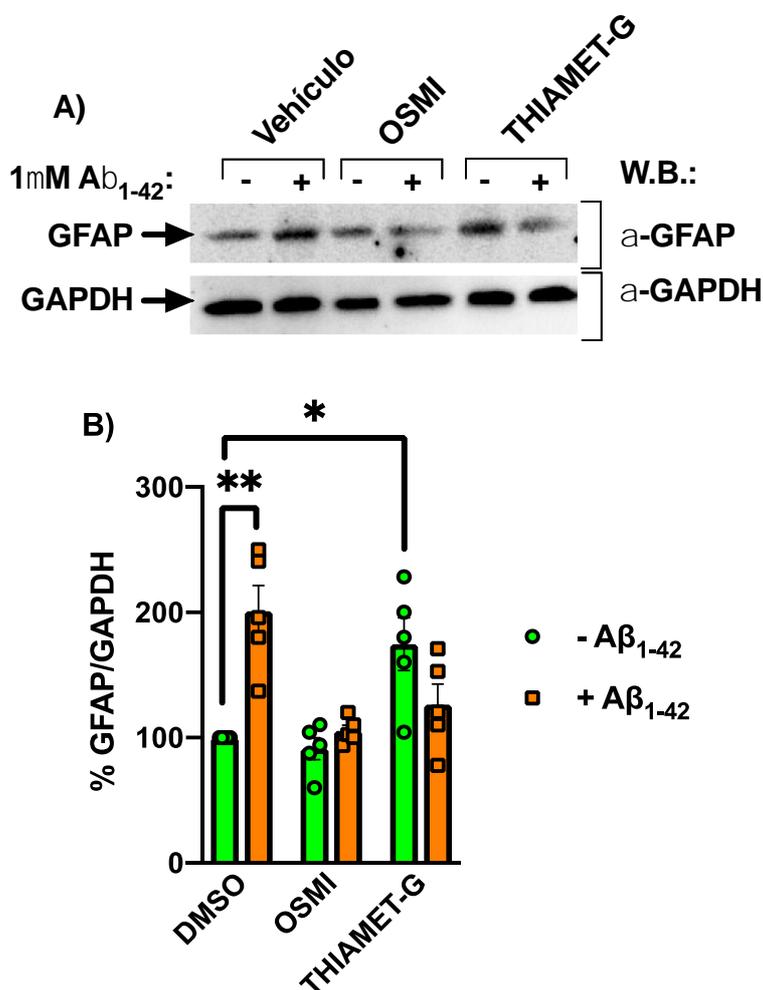


Figura 34. La expresión de GFAP mediada por los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ depende del equilibrio OGT/OGA. A) Astrocitos pre-tratados durante 12-16 horas con $10\mu\text{M}$ de OSMI o $12,5\mu\text{M}$ de Thiamet-G posteriormente tratados o no con $1\mu\text{M}$ de $A\beta_{1-42}$ durante 72 horas, fueron lisados y se analizó la expresión de GFAP por Western blot. Los Western blots son el resultado de un experimento representativo de 5 experimentos independientes. **B)** El histograma representa la media \pm SEM de las densitometrías de 5 experimentos independientes. El análisis estadístico de la t-Student resultó ser significativo en 72 horas de estimulación (** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

En resumen, estos resultados apuntan al igual que ocurría con la generación de ROS (Figura 31) que los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ podrían desregular el equilibrio OGT/OGA incidiendo en una alteración de las O-GlcNAcilaciones/de-O-GlcNAcilaciones modificando la sobreexpresión de GFAP.

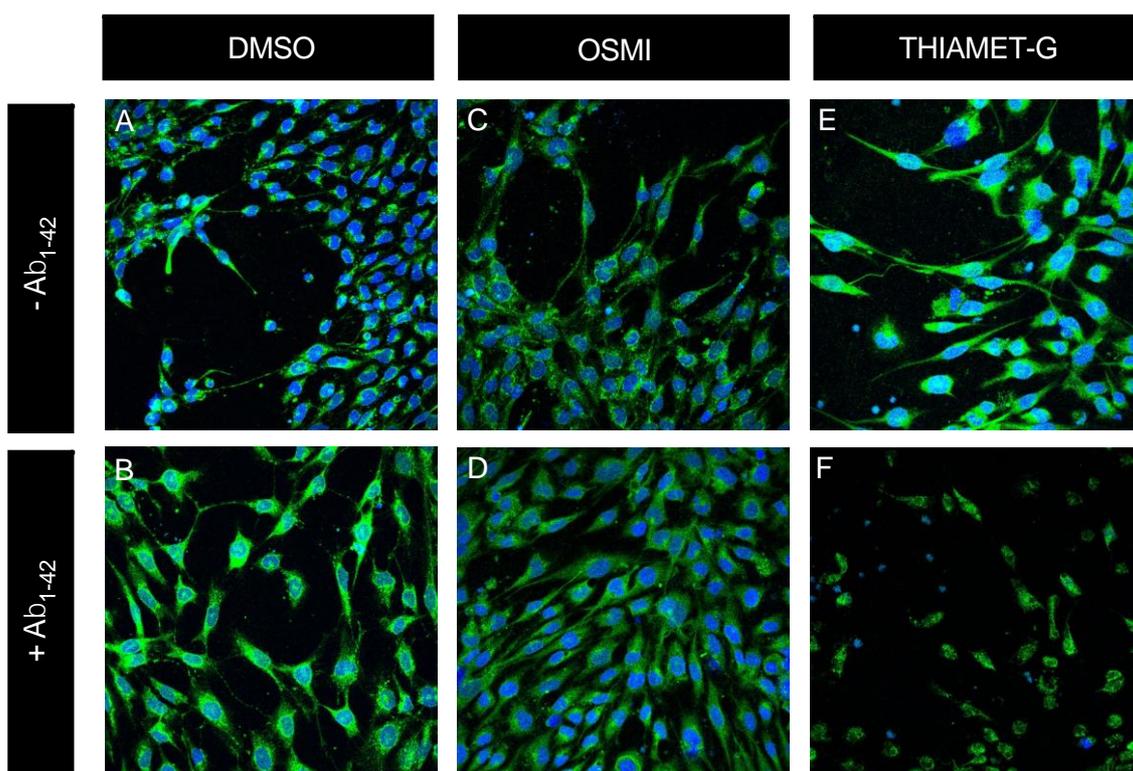
Para verificar este hallazgo, estudiamos la sobreexpresión de GFAP por microscopía confocal en astrocitos pre-tratados con los inhibidores OSMI y Thiamet-G y estimulados con los oligómeros de A β ₁₋₄₂. Para ello, 40.000 células cultivadas en *coverslips*, se trataron con 10 μ M de OSMI o 12,5 μ M de Thiamet-G y se mantuvieron en medio suplementado con 1% de FBS durante 12-16 horas. Posteriormente, las células se estimularon o no con 1 μ M de A β ₁₋₄₂ oligomérico durante 72 horas a 37°C y se fijaron con 4% PFA durante 10 minutos. La detección por inmunofluorescencia de GFAP se llevó a cabo como se indica en el apartado 2.12.1 de Material y Métodos.

Como se esperaba, los oligómeros de A β ₁₋₄₂ inducían la sobreexpresión de GFAP (Figura 35B). Al igual que ocurría en la Figura 33, el tratamiento con OSMI bloqueó eficazmente la sobreexpresión de GFAP mediada por los oligómeros de A β ₁₋₄₂ (Figura 35D). Por otro lado, el inhibidor de la OGA (Thiamet-G) presentaba un efecto positivo sobre la expresión de GFAP (Figura 35E), mientras que esta expresión decrecía bruscamente cuando se trataban con oligómeros de A β ₁₋₄₂ (Figura 35F). Observando tanto la morfología celular como su confluencia postulamos que la combinación de Thiamet-G con oligómeros de A β ₁₋₄₂ más que un efecto inhibitorio estaría ejerciendo un efecto tóxico para las células.

Con el fin de cuantificar la expresión de la proteína GFAP en cada una de las condiciones, se determinó la intensidad de fluorescencia celular del canal verde (Figura 35G). Las células tratadas con oligómeros de A β ₁₋₄₂ aumentaron su valor de intensidad de fluorescencia desde 25.927,88 \pm 2.376,51 hasta 41.058,49 \pm 4.445,75 (Figura 35G, violines 1 y 2). Por otra parte, las células pre-tratadas con OSMI mantuvieron su intensidad de fluorescencia, 21.395,75 \pm 2.227,75. Cuando se trataron con A β ₁₋₄₂ oligomérico, la intensidad pasó a 29.083,19 \pm 2.16 (Figura 35G, violines 3 y 4), ambos valores similares al control de 25.927,88 \pm 2.376,51 (violín 1). En el caso del pre-tratamiento con Thiamet-G, el valor basal de intensidad fue de 38.700,56 \pm 2.842,10, comparable al obtenido en las células tratadas con A β ₁₋₄₂ oligomérico (41.058,490 \pm 4.445,75, Figura 35G, violín 5 comparado con violín 2). Las células pre-tratadas con Thiamet-G y tratadas con A β ₁₋₄₂ oligomérico, descendieron el valor de

intensidad de fluorescencia hasta $27.171,23 \pm 2.718,94$ (violín 6), siendo comparable al valor de las células control (Figura 35G, violín 1).

Al cuantificar el área que ocupaban las células en el *coverslip* (Figura 35H), se apreció un aumento significativo de ésta en las células tratadas con $A\beta_{1-42}$ ($660,52 \pm 41,43 \mu\text{m}^2$) comparado con su control, $455,24 \pm 34,98 \mu\text{m}^2$) (Figura 35H, violín 2 comparado con 1). Por el contrario OSMI bloqueaba de manera eficaz el aumento del área celular mediada por los oligómeros de $A\beta_{1-42}$, siendo de $454,41 \pm 31,91 \mu\text{m}^2$ (Figura 35H, violín 4), además OSMI por sí mismo no ejercía ningún efecto aparente sobre el espacio ocupado de las células (Figura 35H, violín 3 ($488,16 \pm 46,863 \mu\text{m}^2$)). Finalmente, en células pre-tratadas con Thiamet-G, el área celular aumentó hasta $744,08 \pm 51,45 \mu\text{m}^2$, mientras que la combinación con los oligómeros de $A\beta_{1-42}$, producía una caída del área por debajo del control no tratado (Figura 35H, violín 6 ($354,33 \mu\text{m}^2 \pm 44,13$)).



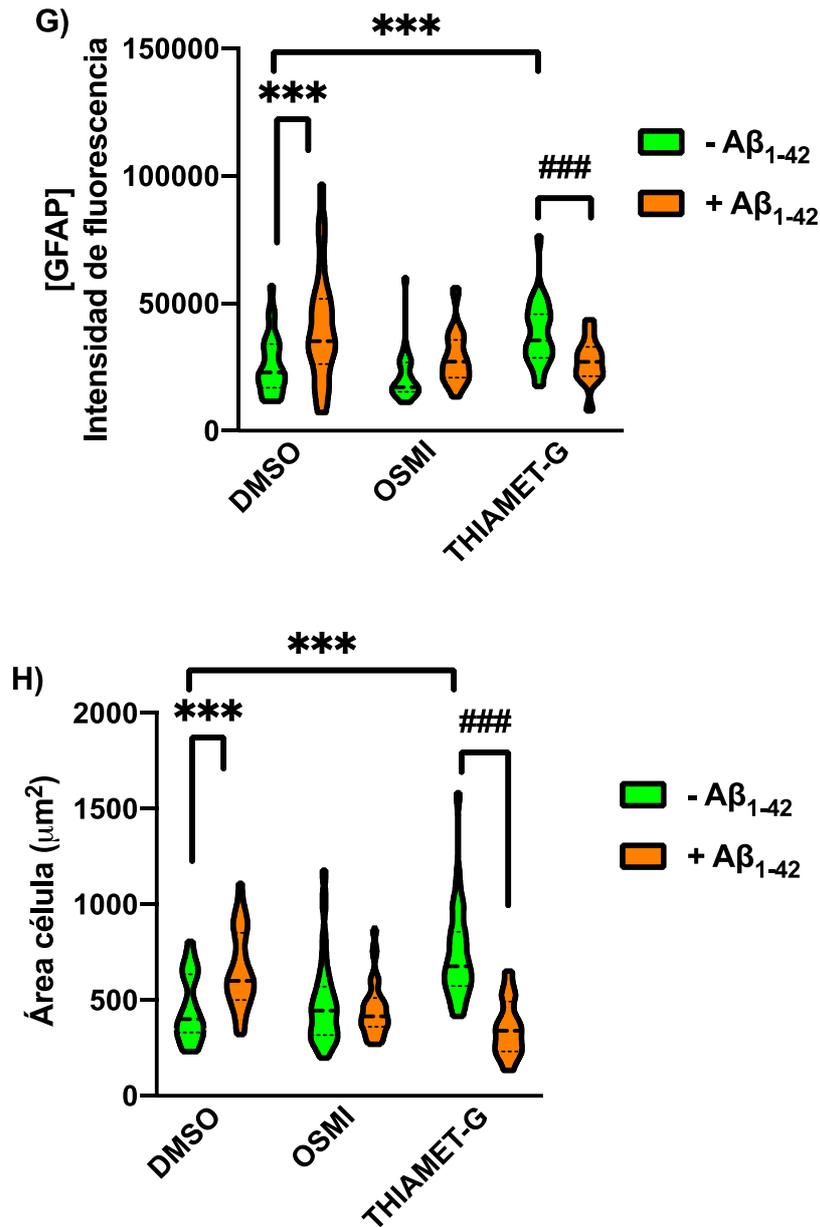


Figura 35. La OGT controla la sobreexpresión de GFAP inducida por los oligómeros de Aβ₁₋₄₂. A-F) Inmunofluorescencia de GFAP en astrocitos pre-tratados con 10μM de OSMI o 12,5μM de Thiamet-G durante 12-16 horas y posteriormente tratados o no con 5μM de Aβ₁₋₄₂ durante 72 horas. La inmunofluorescencia se llevó a cabo utilizando un primer marcaje con anticuerpo α-GFAP, seguido del secundario Goat α-Rabbit Alexa 488 (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las fotografías son representativas de tres experimentos independientes. **G)** La gráfica representa la media ± SEM de la expresión de GFAP obtenida a partir del cálculo de fluorescencia total corregida por célula de cada condición del canal verde (GFAP) (n=90). **H)** La gráfica representa la media ± SEM del área ocupada por las células (n=90). El análisis estadístico t-Student resultó ser significativo (**p<0,001).

En conjunto, estos resultados apuntan a que el aumento de O-GlcNAcilaciones mediado por OGT y promovido por el tratamiento con oligómeros de A β ₁₋₄₂ conduce a la astrogliosis. Por otra parte, parece ser necesaria la actividad de la OGA, ya que como indican los resultados con Thiamet G, si no se producen las correspondientes *des-O-GlcNAcilación* de proteínas, combinadas con oligómeros de A β ₁₋₄₂ reducen la supervivencia de los astrocitos

5.5. La sobreexpresión de GFAP mediada por oligómeros de A β ₁₋₄₂ depende de la O-GlcNAcilación del LPAR1.

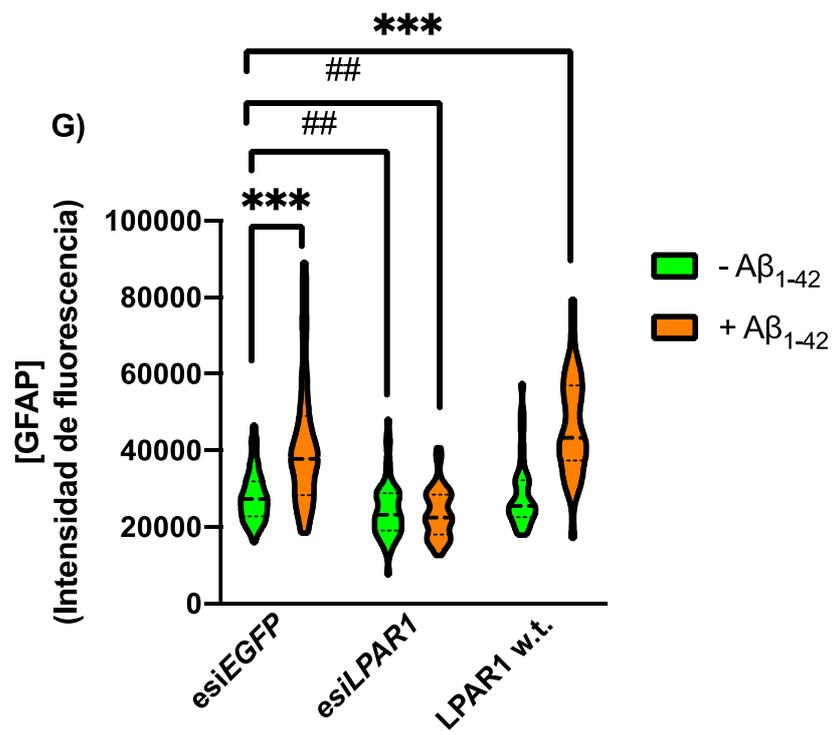
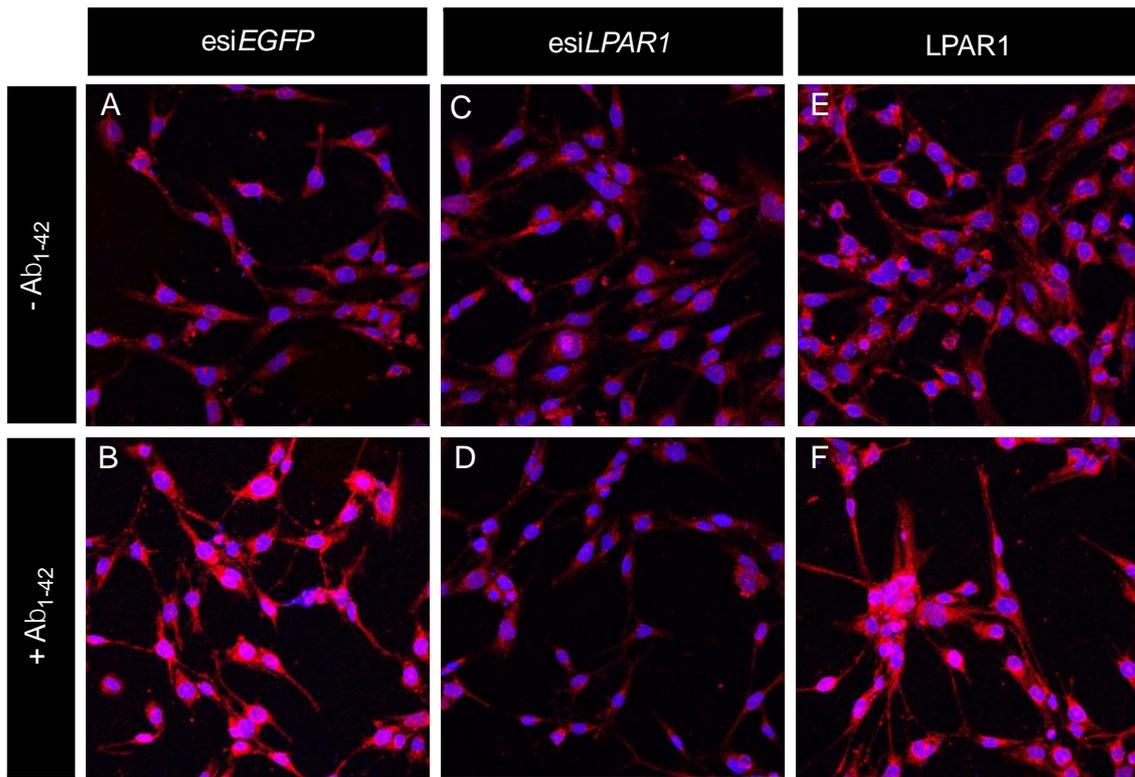
Una vez investigada la implicación del tándem Rac1/PYGM y de las O-GlcNAcilaciones en la astrogliosis mediada por los oligómeros de A β ₁₋₄₂, investigamos si el LPAR1 y concretamente en su forma O-GlcNAcilada, participaba en este proceso.

Para ello, astrocitos cultivados en *coverslips* al 70% de confluencia, se privaron de FBS y se transfectaron con 500 ng de pEGFP-LPAR1, con 40 pg de esiEGFP o con 40 pg de esiLPAR1, siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.1.2.3 de Materiales y Métodos. Se trataron o no con 1 μ M de oligómeros de A β ₁₋₄₂ durante 72 horas a 37°C. Al cabo de este tiempo, se fijaron con 4% PFA durante 10 minutos y el marcaje del GFAP se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.12.1. de Material y Métodos. En este caso, el marcaje de GFAP se cambió por el Donkey α -Rabbit Alexa 647 debido a que se transfectó una construcción con EGFP, etiqueta que se solapa con el marcaje del anticuerpo utilizado hasta ahora (Goat α -Rabbit Alexa 488).

Como se esperaba, los oligómeros de A β ₁₋₄₂ modulaban la sobreexpresión de GFAP en células control transfectadas con esiEGFP (Figura 36B). Sin embargo, el A β ₁₋₄₂ oligomérico no mediaba la sobreexpresión de GFAP en los astrocitos a los que previamente se les había silenciado el LPAR1 (Figura 36D) comparada con Figura 36B. Por otra parte, astrocitos que sobreexpresaban LPAR1 w.t. y se les estimulaba con los oligómeros de A β ₁₋₄₂, como era de esperar sobreexpresaban GFAP (Figura 36F).

Con el fin de cuantificar la expresión de la proteína GFAP en cada una de las condiciones, se determinó la intensidad de fluorescencia emitida en el canal rojo lejano (Figura 36G). Las células transfectadas con *esiEGFP* y tratadas con oligómeros de $A\beta_{1-42}$ incrementaron su intensidad de fluorescencia desde $28.081,06 \pm 1.022,19$ hasta $42.395,74 \pm 2.590,60$ (Figura 36G, violines 1 y 2). Por otra parte, la expresión de GFAP basal de las células transfectadas con *esiLPAR1* descendía significativamente comparada con la expresión de GFAP basal de las células transfectadas con *esiEGFP* (Figura 36G, violín 3 comparado con violín 1), siendo sus intensidades de fluorescencia de $24.650,79 \pm 1.177,23$. Y esa intensidad no varió en presencia de oligómeros de $A\beta_{1-42}$ (Figura 36G, violín 4; $23.748,34 \pm 992,31$). Finalmente, las células transfectadas con LPAR1 w.t. y tratadas con oligómeros de $A\beta_{1-42}$ incrementaron su intensidad de fluorescencia desde $28.924,62 \pm 1.713,82$ hasta $46.549,70 \pm 2.512,63$ (Figura 36G, violines 3 y 4).

Al cuantificar el área que ocupaban las células en el *coverslip* (Figura 36H), comprobamos un aumento significativo de ésta en las células transfectadas con *esiEGFP* y tratadas con $A\beta_{1-42}$ oligomérico ($707,98 \pm 30,76 \mu\text{m}^2$ comparado con su control, $505,37 \pm 16,80 \mu\text{m}^2$) (Figura 36H, violines 2 y 1). Por otra parte, el área ocupada por las células silenciadas de LPAR1 no varió con el tratamiento de $A\beta_{1-42}$ oligomérico, siendo de $493,75 \pm 21,72 \mu\text{m}^2$ y de $484,78 \pm 21,25 \mu\text{m}^2$ (Figura 34H, violines 3 y 4, respectivamente). Finalmente, las células que fueron transfectadas con LPAR1 w.t. respondieron de la misma forma al tratamiento con $A\beta_{1-42}$ oligomérico que las células *esiEGFP*, siendo de $760,40 \pm 46,44 \mu\text{m}^2$ las que fueron tratadas (Figura 36H, violín 6) y de $503,24 \pm 27,83 \mu\text{m}^2$ las que no lo fueron (Figura 36H, violín 5).



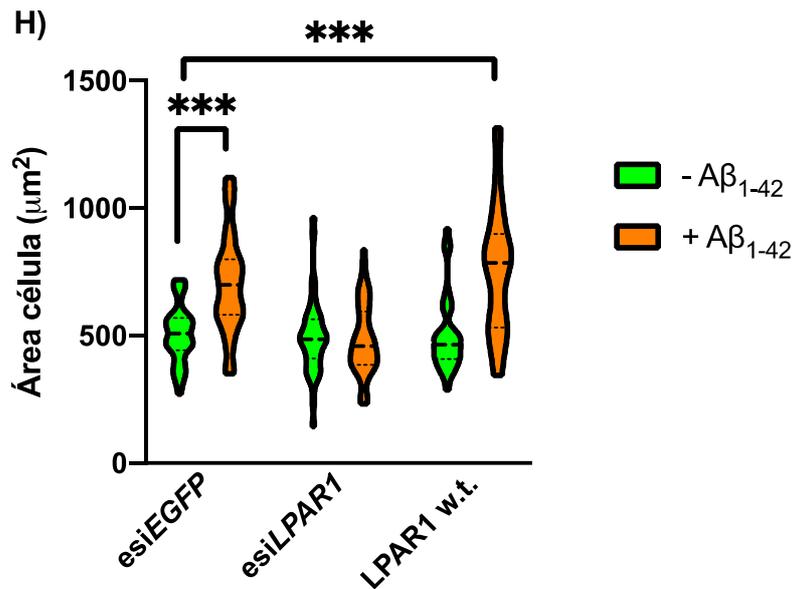


Figura 36. El LPAR1 participa en la sobreexpresión de GFAP y el aumento del área celular en astrocitos tratados con Aβ₁₋₄₂ oligomérico. A-F) Inmunofluorescencia de GFAP en astrocitos transfectados como se indica y tratados o no con 1 µM de Aβ₁₋₄₂. La inmunofluorescencia se llevó a cabo utilizando un primer marcaje con anticuerpo α-GFAP, seguido del secundario Goat α-Rabbit Alexa 647 (rojo lejano). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las fotografías son representativas de tres experimentos independientes. **G)** La gráfica representa la media ± SEM de la expresión de GFAP obtenida a partir del cálculo de fluorescencia total corregida por célula de cada condición del canal verde (GFAP) (n=90). **H)** La gráfica representa la media ± SEM del área ocupada por la célula (n=90). El análisis estadístico t-Student resultó ser significativo (**p<0,001; ##p<0,01).

Estos resultados sugieren que los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ implican al LPAR1 en la sobreexpresión de GFAP y en el aumento del área celular. Con todo ello, el siguiente paso fue examinar si la O-GlcNAcilación del LPAR1 mediada por el Aβ₁₋₄₂ oligomérico era el mecanismo mediante el cuál se controlaban estos dos procesos.

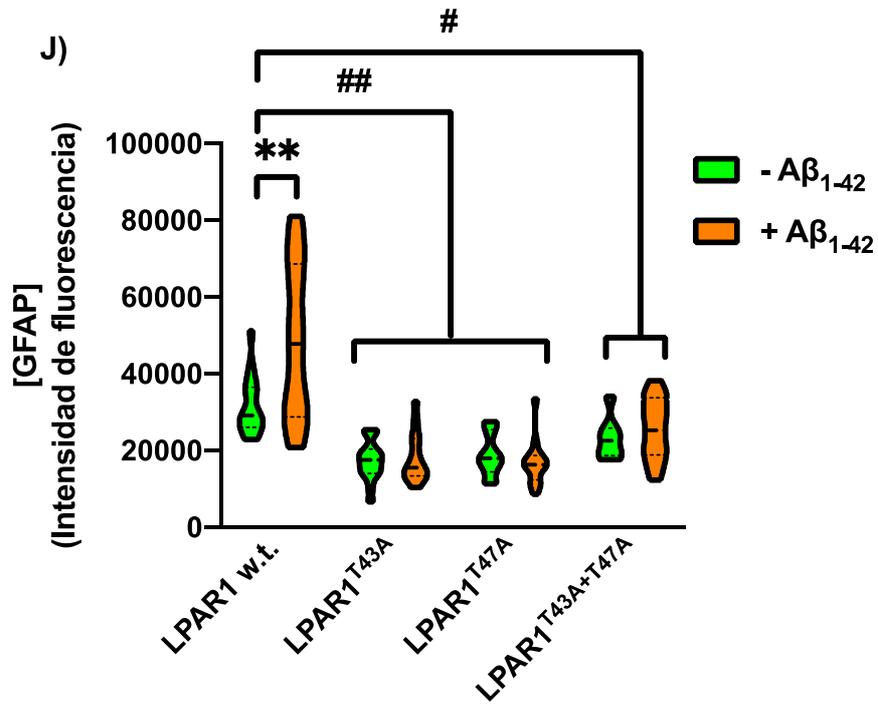
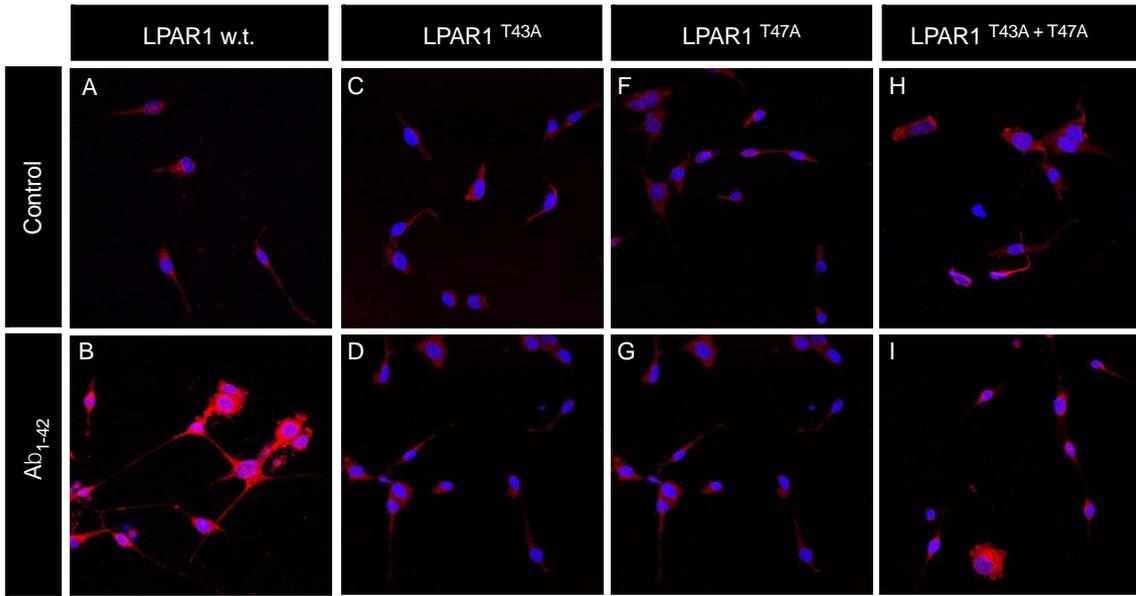
Para ello, astrocitos cultivados en *coverslips* al 70% de confluencia, se privaron de FBS y se transfectaron con 500 ng de pEGFP-LPAR1, pEGFP-LPAR1^{T43A}, pEGFP-LPAR1^{T47A} y pEGFP-LPAR1^{T43+T47A}, siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.1.2.3 de Materiales y Métodos. Se trataron o no con 1 µM de oligómeros de Aβ₁₋₄₂ durante 72 horas a 37°C. Al cabo de este tiempo, se fijaron con 4% PFA durante 10 minutos y el marcaje del GFAP se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.12.1. de Material y Métodos. En este caso, el marcaje de GFAP se cambió por el

Donkey α -Rabbit Alexa 647 debido a que se transfectaron construcciones con EGFP, etiqueta que se solapa con el marcaje del anticuerpo utilizado hasta ahora (Goat α -Rabbit Alexa 488).

Como se esperaba, los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ modulaban la sobreexpresión de GFAP en células transfectadas con LPAR1 w.t. (Figura 37B). Sin embargo, en todos los casos en los que los astrocitos expresaban los diferentes mutantes en alanina de LPAR1, la sobreexpresión de GFAP mediada por el tratamiento con $A\beta_{1-42}$ se encontraba bloqueada (Figuras 37D- I).

Con el fin de cuantificar la expresión de la proteína GFAP en cada una de las condiciones, se determinó la intensidad de fluorescencia emitida en el canal rojo lejano (Figura 37J). Las células transfectadas con LPAR1 w.t. y tratadas con oligómeros de $A\beta_{1-42}$ incrementaron su intensidad de fluorescencia desde $31.520,92 \pm 1.917,99$ hasta $49.012,78 \pm 6.043,97$ (Figura 37J, violines 1 y 2). Por otra parte, la expresión de GFAP basal de cada uno de los mutantes descendía significativamente comparada con la expresión de GFAP basal de las células transfectadas con LPAR1 w.t. (Figura 37J, violines 3, 5 y 7), siendo sus intensidades de fluorescencia de $17.470,04 \pm 1.299,56$ (LPAR1^{T43A}), $18.999,18 \pm 1.887,00$ (LPAR1^{T47A}) y de $23.266,32 \pm 2.143,11$ (LPAR1^{T43A+T47A}). Y esa intensidad no varió en presencia de oligómeros de $A\beta_{1-42}$ (Figura 37J, violines 4,6,8) $18.058,21 \pm 1.744,65$ (LPAR1^{T43A}), $16.680,00 \pm 1.497,60$ (LPAR1^{T47A}) y $25.719,95 \pm 2.049,22$ (LPAR1^{T43A+T47A}).

Al cuantificar el área que ocupaban las células en el *coverslip* (Figura 37K), comprobamos un aumento significativo de ésta en las células transfectadas con LPAR1 w.t. y tratadas con $A\beta_{1-42}$ ($808,37 \pm 79,20 \mu\text{m}^2$ comparado con su control, $567,31 \pm 44,99 \mu\text{m}^2$) (Figura 37K, violines 2 y 1). En células transfectadas con los mutantes de LPAR1 y tanto en presencia como en ausencia de oligómeros de $A\beta_{1-42}$ las áreas ocupadas por las células prácticamente no variaron con respecto a las células control (Figura 37J, violín 1), siendo de $516,43 \pm 29,14 \mu\text{m}^2$ (LPAR1^{T43A}), $538,47 \pm 60,37 \mu\text{m}^2$ (LPAR1^{T47A}) y $578,16 \pm 63,45 \mu\text{m}^2$ (LPAR1^{T43A+T47A}) (Figura 37J, violines 3, 5 y 7) $599,06 \pm 38,14 \mu\text{m}^2$ (LPAR1^{T43A}), $426,27 \pm 29,08 \mu\text{m}^2$ (LPAR1^{T47A}) y $446,56 \pm 39,64 \mu\text{m}^2$ (LPAR1^{T43A+T47A}) (Figura 37J, violines 4, 6 y 8).



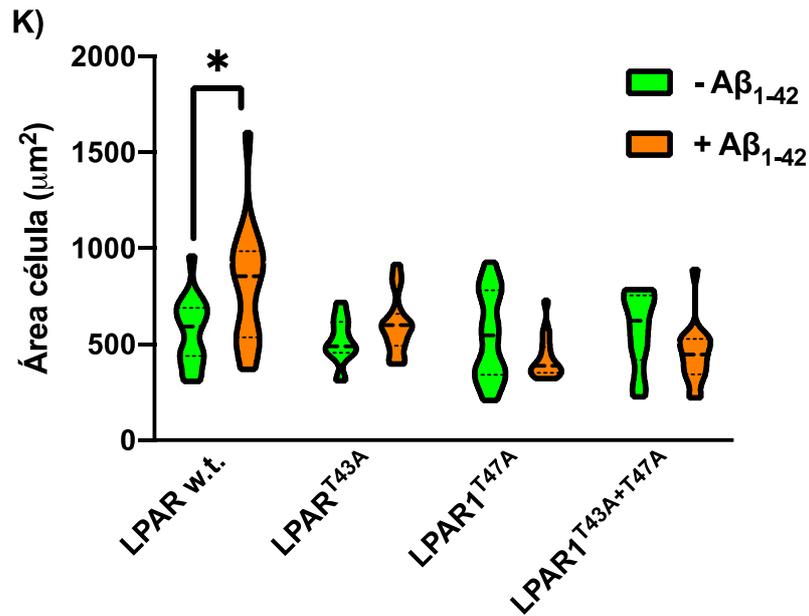


Figura 37. El LPAR1 O-GlcNAcilo en las treoninas 43 y 47 participa en la sobreexpresión de GFAP y el aumento del área celular en astrocitos tratados con Aβ₁₋₄₂ oligomérico. A-I) Inmunofluorescencia de GFAP en astrocitos transfectados con los plásmidos indicados y tratados o no con 5µM de Aβ₁₋₄₂. La inmunofluorescencia se llevó a cabo utilizando un primer marcaje con anticuerpo α-GFAP, seguido del secundario Goat α-Rabbit Alexa 647 (rojo lejano). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las fotografías son representativas de tres experimentos independientes. **J)** La gráfica representa la media ± SEM de la expresión de GFAP obtenida a partir del cálculo de fluorescencia total corregida por célula de cada condición del canal verde (GFAP) (n=90). **K)** La gráfica representa la media ± SEM del área ocupada por la célula (n=90). El análisis estadístico t-Student resultó ser significativo (**p<0,001).

Para confirmar el papel de la O-GlcNAcilo en los residuos treonina 43 y treonina 47 de LPAR1 en la astrogliosis mediada por los oligómeros de Aβ₁₋₄₂, y basándonos en la estrategia de interferencia utilizada con el péptido TAT-RBD-PYGM, nosotros desarrollamos los péptidos permeables TAT-OBD-LPAR1 y TAT-OBD-LPAR1^{T43A+T47A}. Estos péptidos están basados en una región de 22 aminoácidos del LPAR1 que incluye las treoninas 43 y 47 o sus mutantes en alanina, tal y cómo se indica en el apartado 2.2.4 de Material y Métodos.

Con todo ello, 40.000 astrocitos cultivados en *coverslips* se incubaron durante 12-16 horas con medio suplementado con 1% de FBS, se pre-trataron o no con 70 ng/µL de TAT-EGFP, TAT-OBD-LPAR1 o TAT-OBD-LPAR1^{T43A+T47A} durante 1 hora y seguidamente se trataron con 1 µM de oligómeros de Aβ₁₋₄₂ durante 72 horas a 37°C. Al cabo de este tiempo, se fijaron con 4% PFA durante 10

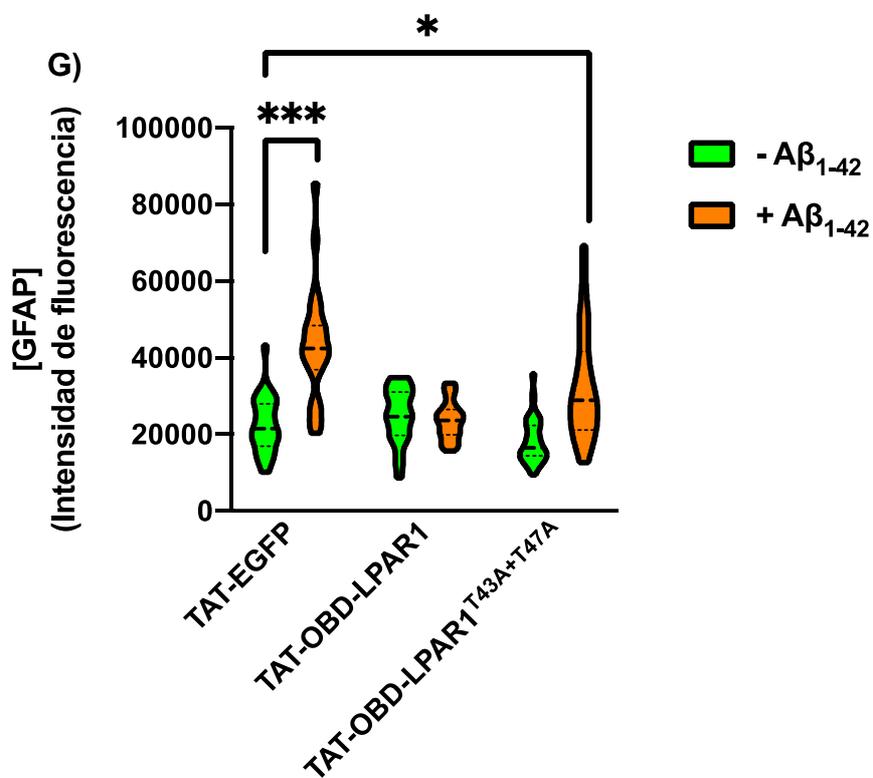
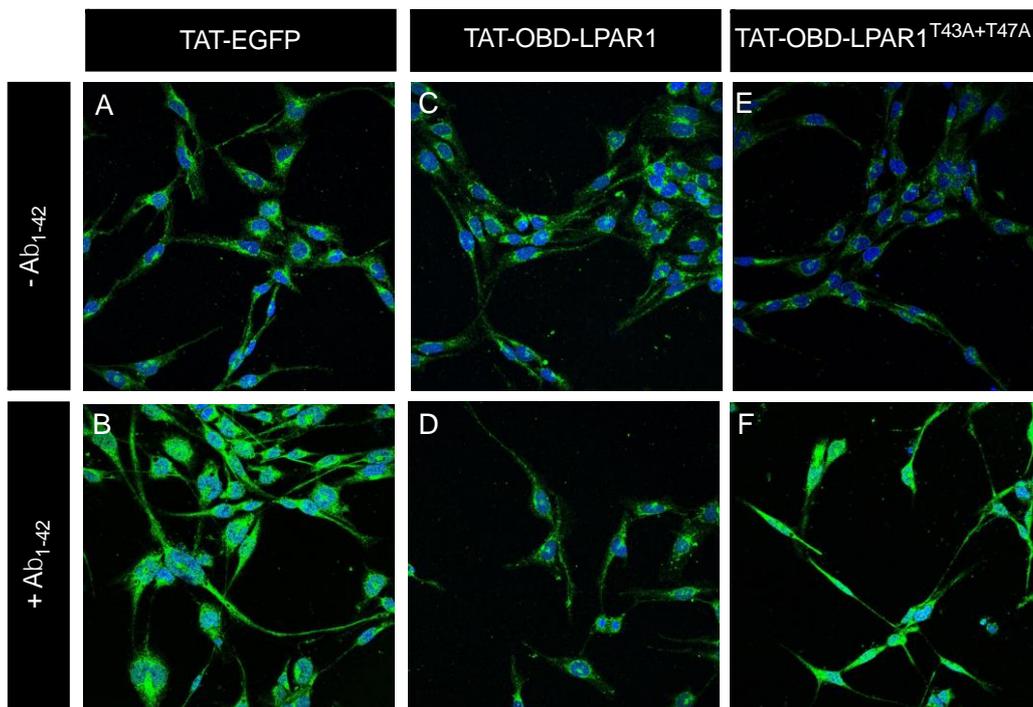
minutos y el marcaje del GFAP se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.12.1. de Material y Métodos.

Como se esperaba, los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ favorecían la sobreexpresión de GFAP (Figura 38B). Sin embargo, esto no sucedió cuando las células se habían pretratado previamente con TAT-OBD-LPAR1 (Figura 38D). El péptido TAT-OBD-LPAR1 por sí mismo no afectó a la sobreexpresión de GFAP (Figura 38C). Finalmente, la expresión de GFAP en las células pretratadas con TAT-OBD-LPAR1^{T43A+T47A}, tampoco se vio afectada (Figura 36E), pero si eran tratadas posteriormente con $A\beta_{1-42}$ oligomérico, la expresión de GFAP aumentaba ligeramente (Figura 38F).

Con el fin de cuantificar la expresión de la proteína GFAP en cada una de las condiciones, se determinó la intensidad de fluorescencia emitida en el canal rojo lejano (Figura 38J). Las células control tratadas con oligómeros de $A\beta_{1-42}$ incrementaron su intensidad de fluorescencia desde $22.504,86 \pm 1.390,15$ hasta $43.410,67 \pm 3.118,03$ (Figura 38G, violines 1 y 2). La intensidad de fluorescencia se mantuvo en valores comparables a los del control en las células que fueron pretratadas con TAT-OBD-LPAR1, siendo de $25.030,93 \pm 1.447,14$, y de $23.678,95 \pm 924,79$ en aquellas que posteriormente fueron tratadas con $A\beta_{1-42}$ oligomérico (Figura 38G, violines 3 y 4 comparados con violín 1). Lo mismo ocurrió con las células que fueron sólo tratadas con TAT-OBD-LPAR1^{T43A+T47A} ($18.251,48 \pm 1.073,78$, Figura 38G, violín 5). Sin embargo, en las que además fueron tratadas con $A\beta_{1-42}$ oligomérico, la intensidad de fluorescencia ascendió de forma significativa hasta $32.668,72 \pm 2.745,49$ (Figura 38G, violín 6).

Al cuantificar el área que ocupaban las células en el *coverslip* (Figura 38H), comprobamos un aumento significativo en las células tratadas con $A\beta_{1-42}$ ($722,03 \pm 51,00 \mu\text{m}^2$ comparado con su control, $504,34 \pm 26,56 \mu\text{m}^2$) (Figura 38H, violines 2 y 1). En células tratadas con TAT-OBD-LPAR1 y tanto en presencia como en ausencia de oligómeros de $A\beta_{1-42}$ las áreas ocupadas por las células prácticamente no variaron con respecto a las células control ($520,87 \pm 27,86 \mu\text{m}^2$ y $516,60 \pm 28,93 \mu\text{m}^2$, respectivamente; Figura 38H, violines 4 y 3). En cambio, en células que fueron pretratadas con TAT-OBD-LPAR1^{T43A+T47A} y posteriormente con $A\beta_{1-42}$ oligomérico, el área ocupada ascendió de forma

significativa respecto a las células control ($852,63 \mu\text{m}^2 \pm 72,72$ comparado con $504,34 \pm 26,56 \mu\text{m}^2$, Figura 38H, violines 6 y 1).



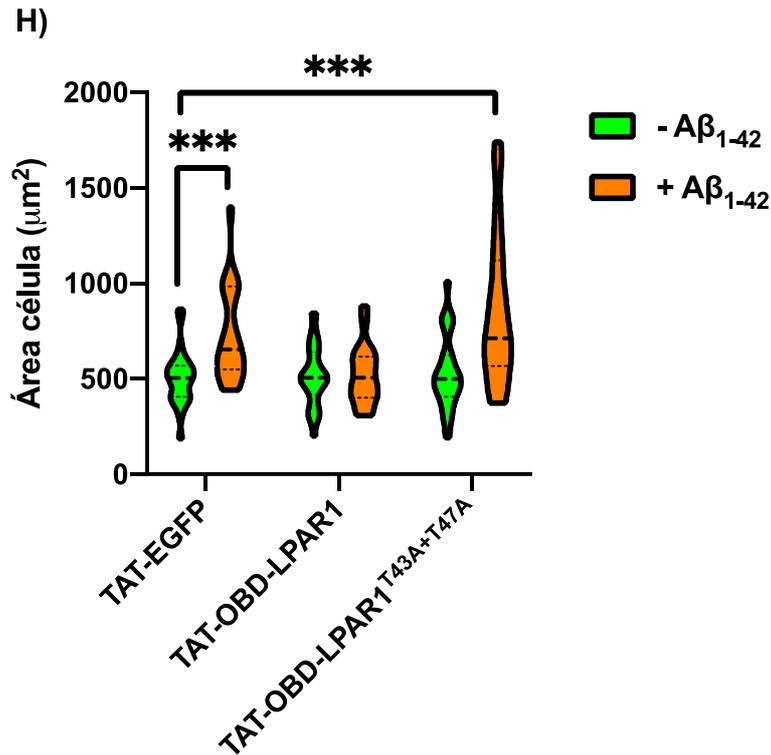


Figura 38. El tándem OGT/LPAR1 promueve la sobreexpresión de GFAP y el aumento del área celular mediada por los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$. A-F) Inmunofluorescencia de GFAP en astrocitos pre-tratados o no durante 1 hora con 70 ng/ μL de TAT-EGFP, TAT-ORB-LPAR1 o TAT-ORB-LPAR1^{T43A+T47A} y posteriormente tratados o no durante 72 horas con 5 μM de $\text{A}\beta_{1-42}$. La inmunofluorescencia se llevó a cabo utilizando un primer marcaje con anticuerpo α -GFAP, seguido del secundario Goat α -Rabbit Alexa 488 (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las fotografías son representativas de tres experimentos independientes. G) La gráfica representa la media \pm SEM de la expresión de GFAP obtenida a partir del cálculo de fluorescencia total corregida por célula de cada condición del canal verde (GFAP) (n=90). H) La gráfica representa la media \pm SEM del área ocupada por la célula (n=90). El análisis estadístico t-Student resultó ser significativo (**p<0,01; ***p<0,001).

Resumiendo, el conjunto de los resultados presentados en el apartado 5 de este capítulo sugieren que la astrogliosis mediada por los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ estaría controlada por la ruta de señalización Rac1/PYGM, la cual conduciría a modificaciones postraduccionales por O-GlcNAcilaciones de proteínas y entre ellas estaría las del receptor de LPAR1, el cual en esta configuración sería clave como mediador en la astrogliosis (Figura 38).

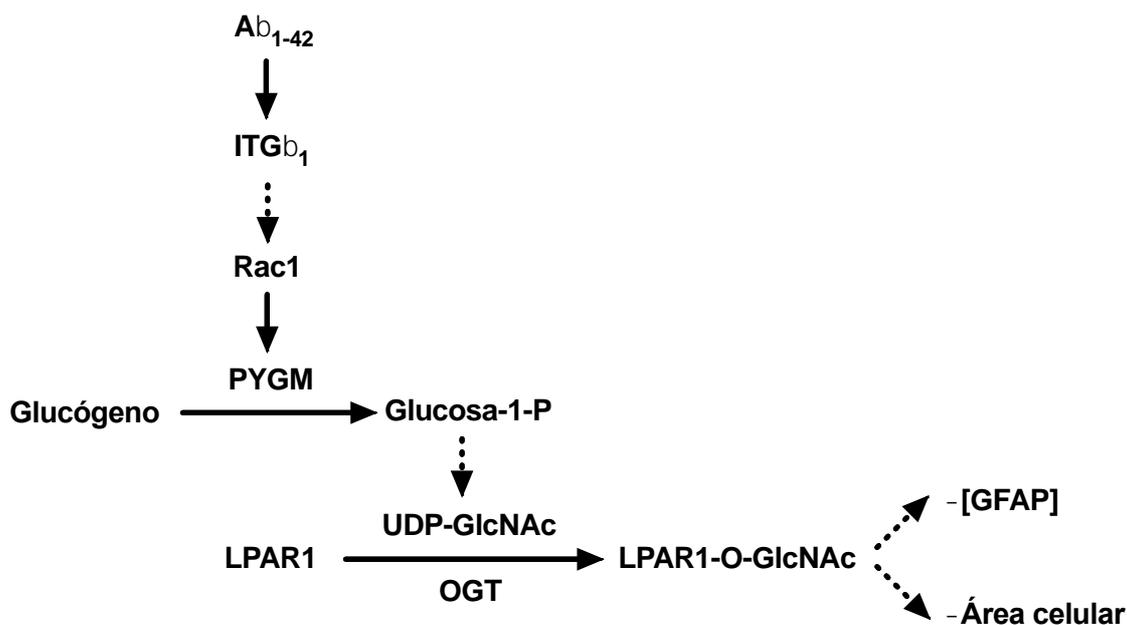


Figura 38. La astrogliosis mediada por $A\beta_{1-42}$ oligomérico estaría regulada por la O-GlcNAcilación de LPAR1. Los resultados obtenidos en el apartado 5 sugieren que la astrogliosis medida como sobreexpresión de GFAP y como el aumento del área celular ocupada en la superficie, depende de la O-GlcNAcilación del LPAR1.

6. Papel del LPA en el control de señalización emanada de los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ en astrocitos.

6.1. Papel del LPA en la degradación de los gránulos nucleares de los astrocitos.

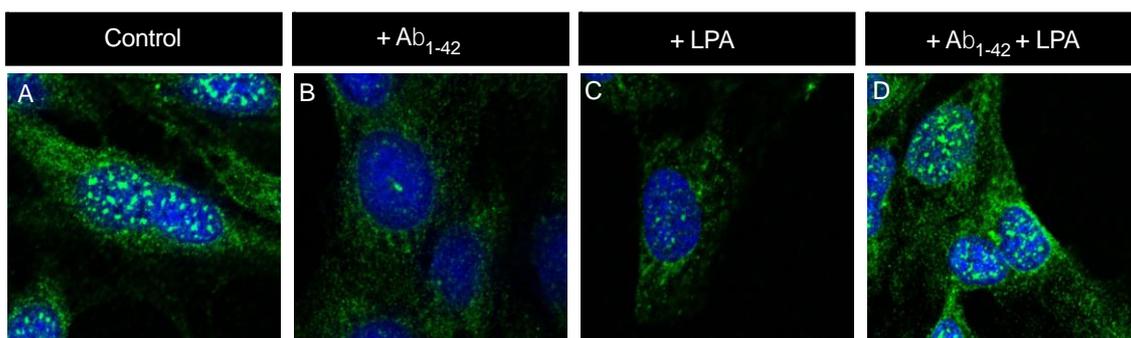
Dado que el LPAR1 parece que participa en el proceso de la astrogliosis inducida por los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ y teniendo en cuenta que el agonista de este receptor, LPA, no conduce a su O-GlcNAcilación (Figura 26), nosotros postulamos que la presencia de LPA en el medio de crecimiento de los astrocitos podría funcionar como un contrapeso a la presencia de los oligómeros de $A\beta_{1-42}$.

Para abordar esta cuestión, primero examinamos si la administración de LPA podía mediar en la degradación de los gránulos de glucógeno como lo hacía el tratamiento con oligómeros de $A\beta_{1-42}$. Para ello, 40.000 células por pocillo fueron sembradas en *coverslips*. Se mantuvieron en medio con 1% de FBS durante 12-16 horas y se estimularon con 1 μ M de $A\beta_{1-42}$ oligomérico, 100 nM LPA o una combinación de ambos compuestos durante 30 minutos.

Posteriormente, se fijaron las células con metanol frío (-20°C) durante 6 minutos. El marcaje del glucógeno se llevó a cabo siguiendo los pasos descritos en el apartado 2.12.2. de Material y Métodos.

Como se esperaba, los astrocitos no tratados presentaban acumulación de gránulos de glucógeno en el núcleo celular (Figura 39A), los cuáles prácticamente desaparecían con el tratamiento de A β ₁₋₄₂ oligomérico (Figura 39B). Por otra parte, cuando las células fueron tratadas con LPA, se produjo también un descenso brusco de los gránulos de glucógeno (Figura 39C). Sin embargo, el tratamiento combinado de ambos compuestos resultó sorprendente puesto que la degradación de los gránulos de glucógeno no se produjo (Figura 39D), presentaban la misma apariencia que las células control, no tratadas (Figura 39A).

El conteo de los gránulos nucleares de glucógeno (Figura 39E) dio como resultado que las células no tratadas (control) contenían $69,88 \pm 5,43$ gránulos, frente a los $5,88 \pm 0,98$ que le quedaban a los astrocitos tratados con A β ₁₋₄₂ oligomérico. El LPA también mediaba la degradación masiva de los gránulos de glucógeno ($15,80 \pm 2,64$), aunque no lo hacía con la misma eficacia que el A β ₁₋₄₂ oligomérico. La combinación de ambos compuestos no modificó el número de gránulos de glucógeno nucleares ($57,32 \pm 6,05$ frente a control $69,88 \pm 5,43$).



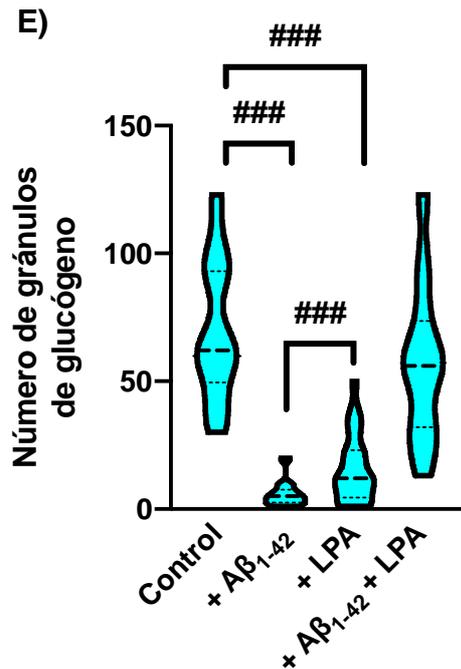


Figura 39. Efecto de los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ y del LPA sobre la degradación de gránulos de glucógeno. A-D) Marcaje del glucógeno celular con la sonda GST-GYSC en astrocitos tratados o no con 5μM de Aβ₁₋₄₂, 100nM LPA o una combinación de ambos. La inmunofluorescencia se llevó a cabo utilizando un primer marcaje con anticuerpo α-GST, seguido del secundario Goat α-Rabbit Alexa 488 (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las fotografías son representativas de tres experimentos independientes. E) La gráfica de violines representa la media ± SEM del número de gránulos de glucógeno nucleares de tres experimentos independientes (n= 63). El análisis estadístico t-Student resultó ser significativo (#p<0,05; ###p<0,001).

Este resultado sugiere que los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ y el LPA no comparten las mismas rutas de señalización que conducen a la degradación del glucógeno en los astrocitos.

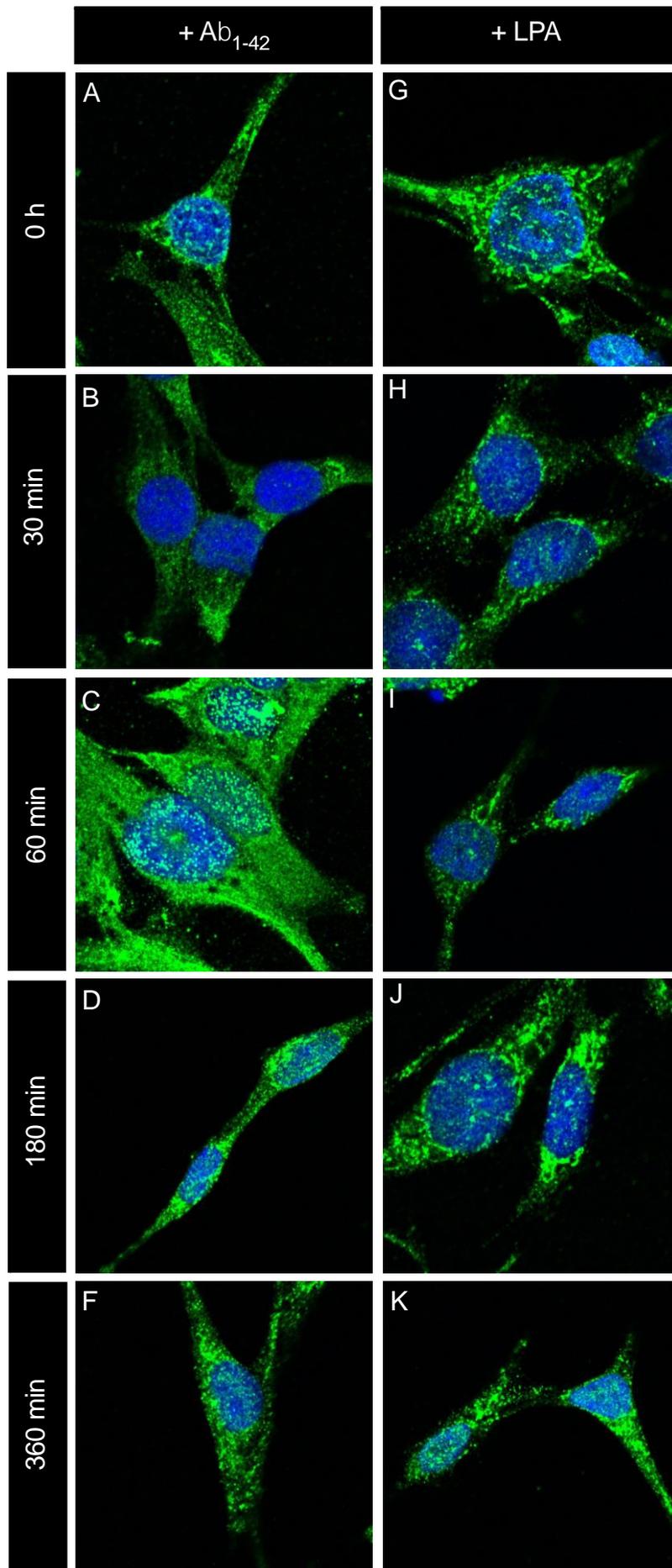
6.2. Cinética de degradación y recuperación del glucógeno nuclear mediada por Aβ₁₋₄₂ oligomérico y LPA.

Llegados a este punto, nosotros investigamos cómo evolucionaban los gránulos de glucógeno en presencia de oligómeros de Aβ₁₋₄₂ o de LPA a lo largo del tiempo. Para ello, se sembraron 40.000 astrocitos por *coverslip*, se mantuvieron en medio con 1% de FBS durante 12-16 horas y se estimularon o no con Aβ₁₋₄₂ oligomérico o con LPA durante los tiempos indicados en la Figura 40. Posteriormente, se fijaron las células con metanol frío (-20°C) durante 6 minutos. El marcaje del glucógeno se llevó a cabo siguiendo los pasos descritos en el apartado 2.12.2. de Material y Métodos.

Como muestra la Figura 40, 30 minutos de exposición tanto a los oligómeros de $A\beta_{1-42}$, como al LPA, provocaban la degradación de los gránulos de glucógeno celulares en general y de los nucleares en particular, haciendo una limpieza de ellos casi absoluta en los tratados con oligómeros de $A\beta_{1-42}$ (Figura 40B) mientras que el LPA era un poco menos eficaz (Figura 40H). En efecto, al cuantificar el número de gránulos de glucógeno (Figura 40L), éste cayó a $10,00 \pm 5,17$ en el caso de los astrocitos tratados con oligómeros de $A\beta_{1-42}$ comparado con su control ($53,78 \pm 11,20$), mientras que en los astrocitos tratados con LPA descendieron de forma menos contundente, hasta $23,00 \pm 9,83$ frente a los $54,87 \pm 12,63$ de su respectivo control.

Cuando ambos tratamientos se prolongaron durante 60 minutos, los resultados sobre los gránulos de glucógeno fueron completamente diferentes y a su vez muy sorprendentes. Mientras que el número de los gránulos de glucógeno ($21,11 \pm 4,30$) se mantenía prácticamente igual al de 30 minutos con el tratamiento de LPA (Figuras 40I y L), la acumulación de los gránulos de glucógeno intracelulares en general, y los nucleares en particular en las células tratadas con oligómeros de $A\beta_{1-42}$ se dispararon hasta $121,22 \pm 14,55$ (Figura 40C y L).

Este número de gránulos de glucógeno descendió a los 180 minutos de exposición al $A\beta_{1-42}$ oligomérico ($79,50 \pm 13,10$, Figuras 40E y L), llegando a los valores control al cabo de 360 minutos ($49,89 \pm 5,94$ Figuras 40F y L). Por el contrario la recuperación de los gránulos de glucógeno tras el tratamiento con LPA fue progresiva, a los 180 minutos se detectaban $40,86 \pm 16,19$ gránulos (Figuras 40J y L), llegándose prácticamente a los valores control a los 360 minutos de tratamiento, $48,78 \pm 8,61$ gránulos de glucógeno (Figuras 40K y L).



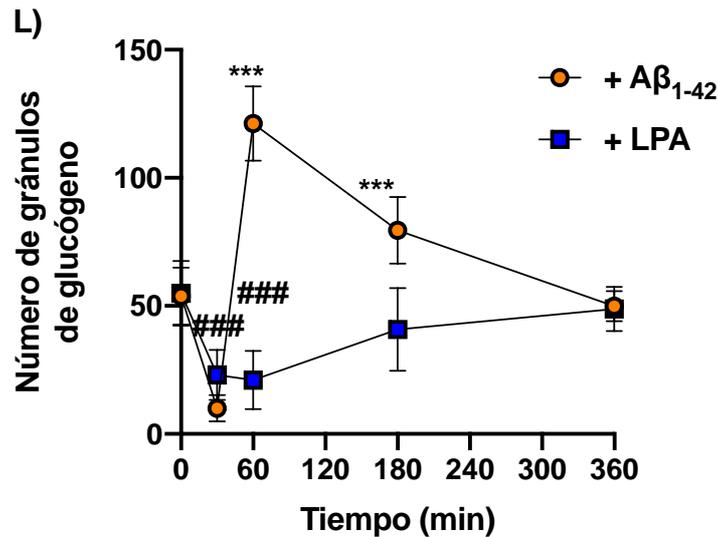


Figura 40. Cinética de degradación y recuperación de gránulos de glucógeno intranucleares en astrocitos tratados por Aβ₁₋₄₂ o por LPA. A-K) Marcaje del glucógeno celular con la sonda GST-GYSC en astrocitos tratados con 5 μM de Aβ₁₋₄₂ o 100nM de LPA durante los tiempos indicados. La inmunofluorescencia se llevó a cabo utilizando un primer marcaje con anticuerpo α-GST, seguido del secundario Goat α-Rabbit Alexa 488 (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las fotografías son representativas de tres experimentos independientes. L) El gráfico representa la media ± SEM del número de gránulos de glucógeno nucleares a lo largo del tiempo de tratamiento de tres experimentos independientes (n=63). El análisis estadístico t-Student resultó ser significativo ###p<0,001; ***p<0,001).

En resumen, las cinéticas de degradación y recuperación de los gránulos de glucógeno nucleares difieren totalmente en función del estímulo, siendo el período comprendido entre 30 y 180 minutos la ventana de tiempos en la que se pone de manifiesto ese comportamiento de un tratamiento con respecto al otro.

6.3. El LPA compensa el efecto de los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ sobre la degradación de los gránulos de glucógeno intranucleares.

Para comprobar qué papel podría tener el LPA en la degradación de los gránulos de glucógeno intranucleares de los astrocitos durante el tratamiento de Aβ₁₋₄₂ oligomérico, se cultivaron 40.000 células por *coverslips*, se mantuvieron en medio con 1% de FBS durante 12-16 horas y se pretrataron durante 30 minutos o 1 hora con Aβ₁₋₄₂ oligomérico para seguidamente estimularlas con LPA durante 30 minutos, a su vez y en paralelo, cultivos de astrocitos pretratados con LPA durante 30 minutos y 1 hora se estimularon con

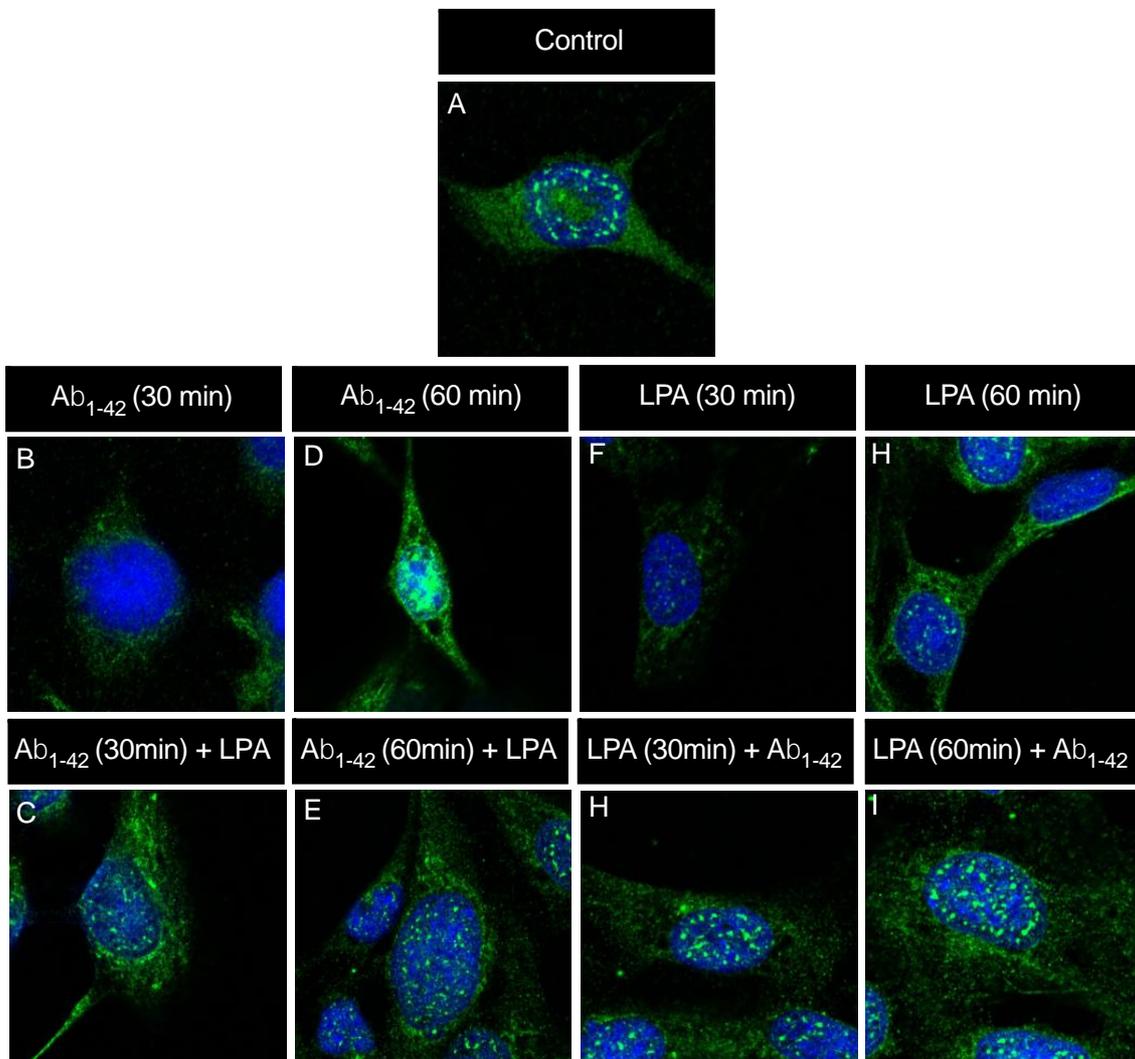
oligómeros de $A\beta_{1-42}$ también durante 30 minutos. En ambos caso las células posteriormente se fijaron con metanol frío (-20°C) durante 6 minutos. El marcaje del glucógeno se llevó a cabo siguiendo los pasos descritos en el apartado 2.12.2. de Material y Métodos.

Tal y cómo esperábamos, el tratamiento de los cultivos de astrocitos durante 30 minutos con los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ limpiaba prácticamente el núcleo de dichos gránulos (Figura 41B), mientras que al cabo de 1 hora de tratamiento no sólo recuperaban los niveles del control sino que los superaba de manera incuestionable (Figura 41D) como observamos en la Figura 40 (B y C). Sin embargo, el tratamiento con LPA no manifestaba el mismo comportamiento, a los 30 minutos reducía el número de gránulos y no se recuperaban con 60 minutos de tratamiento (Figuras 41F y H). La Figura 41J representa el resultado del conteo de los gránulos de glucógeno nucleares, partiendo de $60,88 \pm 5,078$ gránulos en las muestras control caen a $7,16 \pm 0,884$ tras tratar las células con $A\beta_{1-42}$ oligomérico durante 30 minutos para llegar a $103,56 \pm 9,93$ tras 60 minutos de exposición a los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ (Figura 41J, violines 1, 2 y 3 respectivamente). El tratamiento con LPA durante 30 minutos producía una reducción significativa de los gránulos de glucógeno (Figura 41J, violín 4; $15,68 \pm 2,58$) comparados con el control (Figura 41J, violín 1; $60,88 \pm 5,08$ gránulos) y aunque la reducción de los gránulos de glucógeno al cabo de 1 hora de tratamiento con LPA seguía siendo significativa respecto al control, se observaba una recuperación en su número (Figura 41J, violín 5; $26,28 \pm 3,20$ gránulos).

Esta dinámica cambió con el tratamiento secuencial de los agonistas. Cuando se pretrataron los astrocitos con $A\beta_{1-42}$ oligomérico durante 30 minutos y seguidamente se les añadió LPA otros 30 minutos, también se redujo el número de gránulos de glucógeno ($42,32 \pm 3,86$) con respecto al control ($60,88 \pm 5,08$) (Figura 41J, violines 6 y 1 respectivamente), sin embargo, en este caso el LPA facilitaba la recuperación de los gránulos de glucógeno del núcleo degradados por la acción del $A\beta_{1-42}$ oligomérico (Figura 41C comparada con la Figura 41B), Examinando lo que ocurría cuando los astrocitos se incubaban durante 1 hora con los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ y seguidamente, se estimulaban con LPA durante 30 minutos, observamos que el LPA reducía esa acumulación

de glucógeno nuclear excesiva, fruto de la exposición al A β ₁₋₄₂ oligomérico durante 1 hora (Figuras 41D y J, violín 3), a niveles de gránulos de glucógeno hasta $41,52 \pm 4,73$ (Figuras 41E y J, violín 6).

El pretratamiento con LPA durante 30 minutos o 1 hora seguido de A β ₁₋₄₂ oligomérico también realizó un efecto contrario al observado en los astrocitos tratados sólo con LPA. En ambos tiempos de tratamiento se observaban niveles de los gránulos intranucleares comparables a los del control ($60,88 \pm 5,08$, Figuras 41A y J, violín 1), siendo de $63,84 \pm 7,80$ los gránulos cuantificados en el pre-tratamiento de 30 minutos con LPA (Figuras 41G y J, violín 8), y de $64,48 \pm 4,17$ los cuantificados en el pretratamiento de 1 hora con LPA (Figuras 41I y J, violín 9).



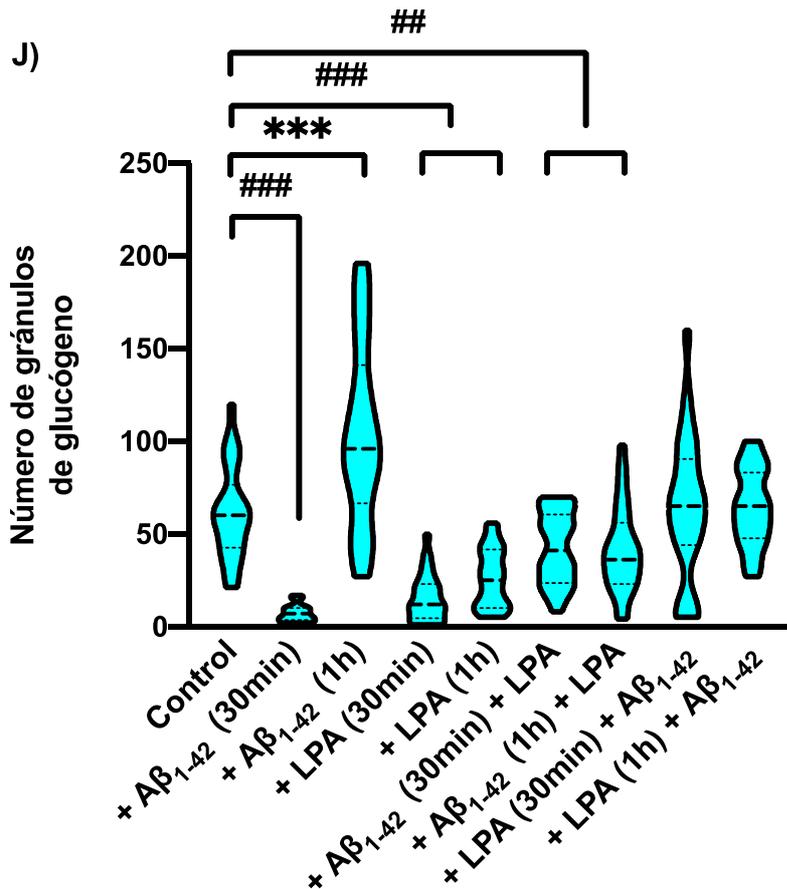


Figura 41. Control de la degradación de los gránulos nucleares de glucógeno por Aβ₁₋₄₂ oligomérico y por LPA. A-I) Marcaje del glucógeno celular con la sonda GST-GYSC en cultivos celulares pre-tratados o no durante los tiempos indicados con 5μM de Aβ₁₋₄₂ o 100nM de LPA y tratados o no con el agonista contrario durante 30 minutos. La inmunofluorescencia se llevó a cabo utilizando un primer marcaje con anticuerpo α-GST, seguido del secundario Goat α-Rabbit Alexa 488 (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las fotografías son representativas de tres experimentos independientes J) El gráfico de violines representa la media ± SEM del número de gránulos de glucógeno nucleares de tres experimentos independientes (n= 63). El análisis estadístico t-Student resultó ser significativo (#p<0,05; ###p<0,001).

Los resultados obtenidos indican por un lado que individualmente tanto los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ como el LPA conducen a una degradación y recuperación de los gránulos nucleares de glucógeno diferente. Sin embargo la administración previa de uno u otro compuesto y la subsecuente adición de su contrario, contrarresta los efectos individuales, intentando en ambos casos recuperar los gránulos nucleares de las células control, cosa que ocurre cuando se pretratan las células primero con LPA durante 1 hora y posteriormente durante 30 minutos con el Aβ₁₋₄₂ oligomérico.

Todo ello, sugeriría que la presencia simultánea de estos dos compuestos, oligómeros de A β ₁₋₄₂ y LPA en el medio extracelular podría funcionar como un sistema de vigilancia para mantener controlada la homeostasis celular, de tal manera que cuando uno de los elementos falta o está en exceso se altera la biología celular en este caso la astrocitaria, como hemos visto examinando los gránulos de glucógeno.

6.4. La administración combinada de LPA y A β ₁₋₄₂ oligomérico no genera especies reactivas de oxígeno.

Una vez desvelado el efecto que ejercía el LPA sobre la degradación de glucógeno mediada por el A β ₁₋₄₂ oligomérico, examinamos si la combinación de ambos compuestos también afectaba a otras respuestas de los astrocitos como la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Para resolver esta cuestión, se sembraron 150.000 células por pocillo en una placa de 24 pocillos y se incubaron durante 12-16 horas en medio suplementado con 1% de FBS. Los cultivos se estimularon o no con 1 μ M de oligómeros de A β ₁₋₄₂, 100 nM de LPA o la combinación de ambos durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 20 minutos con 5 μ M de sonda CM-H2DCFDA (Invitrogen) a 37°C y se midió la generación de ROS tal y como se indica en el apartado 2.12 de Material y Métodos.

Como era de esperar, los oligómeros de A β ₁₋₄₂ producían un aumento significativo de la generación de ROS en astrocitos humanos, se pasaba del 100% (control) a 149,88 \pm 9,32% (Figura 42 barras 1 y 2). Sin embargo, el tratamiento de 30 minutos de LPA no inducía generación de ROS (88,71 \pm 5,78%, Figura 42 barra 3). Ahora bien, la acción combinada del LPA con el A β ₁₋₄₂ oligomérico no sólo bloqueó el aumento de ROS inducido por los oligómeros de A β ₁₋₄₂, sino que provocó un descenso significativo de los valores basales de hasta 68,72 \pm 3,82% (Figura 42, barra 4).

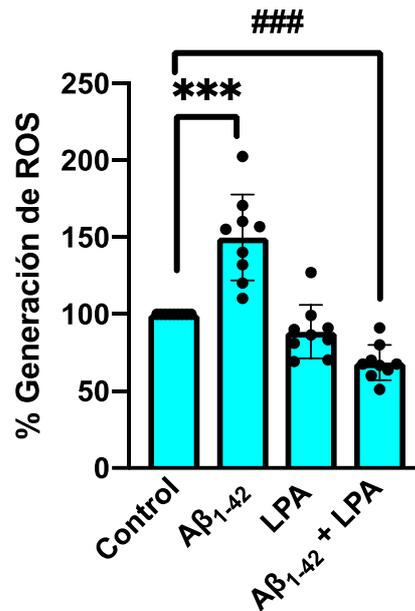


Figura 42. Efecto de la combinación de Aβ₁₋₄₂ oligomérico y LPA sobre la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Cultivos de astrocitos estimulados o no con 5μM de Aβ₁₋₄₂, 100nM de LPA o la combinación de ambos durante 30 minutos a 37°C, se incubaron con 5μM de sonda CM-H2DCFDA y se midió la fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm. Las medidas se relativizaron con respecto al control. El histograma representa la media ± SEM de tres experimentos independientes realizados por triplicado y el análisis estadístico por t de student resultó ser significativo (***)p<0,001; ###p<0,01).

Estos resultados sugerirían que el Aβ₁₋₄₂ oligomérico en presencia de LPA es incapaz de ejercer su acción oxidante, es más la combinación de ambos parece tener un efecto antioxidante, reforzando aun más nuestra hipótesis sobre su papel protector en la biología de los astrocitos.

6.5. La administración combinada de LPA y Aβ₁₋₄₂ oligomérico no produce sobreexpresión de GFAP.

Dados los resultados obtenidos sobre la respuesta de los astrocitos a la combinación de LPA y Aβ₁₋₄₂ oligomérico, nos planteamos investigar si también afectaba a la sobreexpresión del marcador de astrogliosis, GFAP, así como al área ocupada por los astrocitos.

Para ello, 40.000 astrocitos sembrados en *coverslips* fueron mantenidos en medio suplementado con 1% de FBS durante 12-16 horas. Las células deprivadas se pretrataron durante 30 minutos o 1 hora con 1 μM de oligómeros

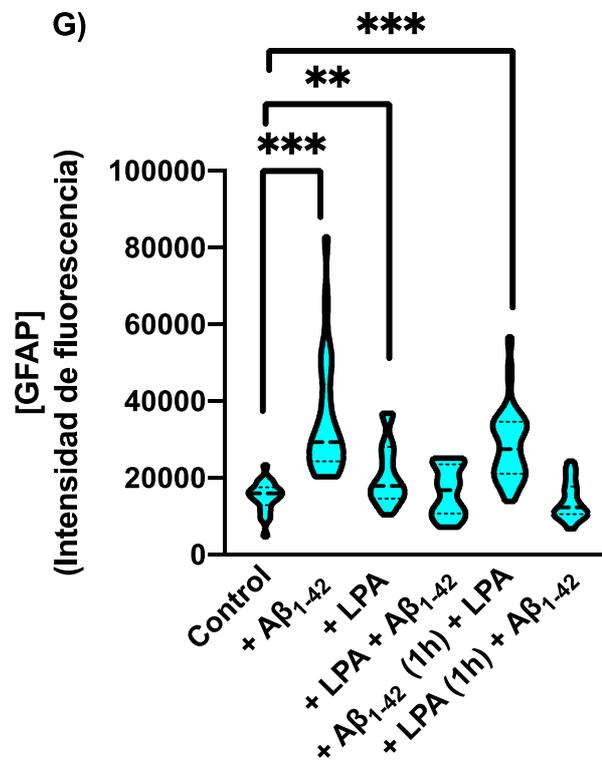
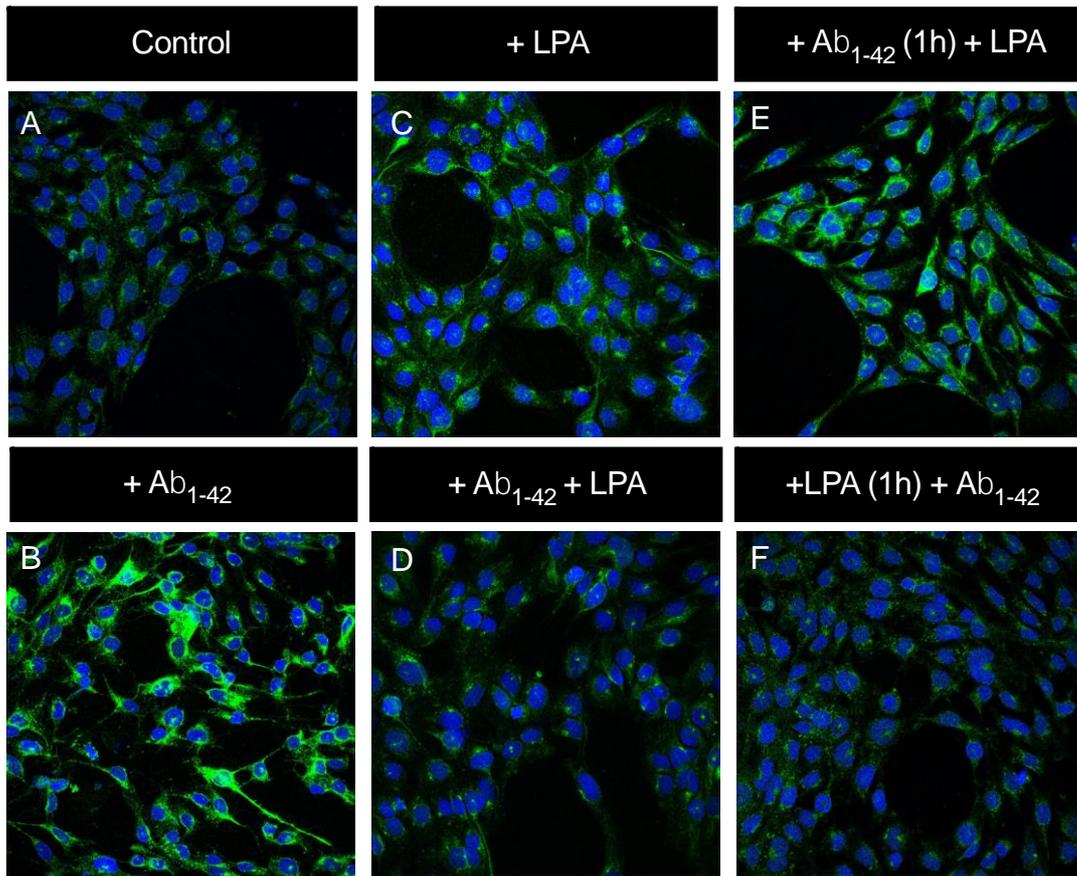
de $A\beta_{1-42}$ o con 100 nM de LPA, y seguidamente se trataron o no con el agonista contrario (1 μ M de oligómeros de $A\beta_{1-42}$ o 100 nM de LPA) durante 72 horas a 37°C. Al cabo de este tiempo, se fijaron con 4% PFA durante 10 minutos y el marcaje del GFAP se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.12.1. de Material y Métodos.

Como se esperaba, los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ inducían la sobreexpresión de GFAP (Figura 43B). De la misma forma, el tratamiento con LPA produjo un ligero aumento de la expresión de GFAP, aunque no fue comparable al producido por el $A\beta_{1-42}$ oligomérico (Figura 43C). Tal y cómo ocurría con la degradación del glucógeno (Figura 39D), o con la generación de ROS (Figura 42, barra 4), el tratamiento combinado bloqueaba la sobreexpresión de GFAP en los astrocitos (Figura 43D). Pero además, el pre-tratamiento de 1 hora con LPA y posterior tratamiento de 72 horas con los oligómeros de $A\beta_{1-42}$, era suficientemente eficaz como para bloquear la sobreexpresión de GFAP (Figura 43F). Sin embargo cuando se operó a la inversa, es decir, pre-tratamiento de 1 hora con oligómeros de $A\beta_{1-42}$, seguido de un tratamiento de 72 horas con LPA, la acción del LPA no resultó tan eficaz ya que se alcanzaban niveles de expresión de GFAP casi comparables a los del tratamiento individual con $A\beta_{1-42}$ oligomérico (Figura 43E).

Con el fin de cuantificar la expresión de la proteína GFAP en cada una de las condiciones, se determinó la intensidad de fluorescencia celular del canal verde (Figura 43G). Las células tratadas con oligómeros de $A\beta_{1-42}$ aumentaron su valor de intensidad de fluorescencia desde $15.105,07 \pm 892,92$ hasta $35.286,87 \pm 3.121,96$ (Figura 43G, violines 1 y 2), y las células tratadas con LPA lo hicieron hasta $21.011,36 \pm 1.733,71$ (Figura 43G, violín 3). La sobreexpresión de GFAP fue bloqueada cuando se trataron de forma combinada los astrocitos con $A\beta_{1-42}$ y con LPA, dando un valor de $16.484,21 \pm 1.351,99$ (Figura 43G, violín 4), siendo comparable al valor basal de intensidad de fluorescencia de $15.105,07 \pm 892,92$ (Figura 43G, violín 1). Tal y como hemos descrito anteriormente, cuando los astrocitos fueron pre-tratados con $A\beta_{1-42}$ oligomérico durante 1 hora y después tratados con LPA durante 72 horas, la intensidad ascendió hasta $28.836,61 \pm 1.971,00$ (Figura 43G violín 5). Por el contrario cuando se llevó a cabo el pretratamiento inverso, es decir 1 hora de pre-

tratamiento con LPA y posterior tratamiento con A β ₁₋₄₂ oligomérico, el valor fue de 14.023,64 \pm 1.060,29 con el control (Figura 43G, violín 6).

Al cuantificar el área que ocupaban las células en el *coverslip* (Figura 43H), se observó un claro aumento significativo de ésta en las células tratadas con A β ₁₋₄₂ (732,63 \pm 36,17 μm^2) comparado con su control, 480,26 \pm 33,69 μm^2 (Figura 43H, violín 2 comparado con 1). A pesar de aumentar la expresión de GFAP, el área celular se mantuvo similar en el tratamiento individual con LPA, siendo de 458,44 \pm 27,158 μm^2 (Figura 43H, violín 3). Aun así, los valores también se mantuvieron similares a los del control en aquellas condiciones donde la expresión de GFAP no aumentó. Concretamente, el tratamiento combinado entre LPA y A β ₁₋₄₂ dió un área de 546,83 \pm 30,62 μm^2 y el área ocupada por las células pretratadas 1 hora con LPA y seguidamente con A β ₁₋₄₂ oligomérico fue de 489,12 \pm 28,84 μm^2 (Figura 43H, violines 4 y 6, respectivamente). Por otro lado, el pretratamiento de 1 hora con oligómeros de A β ₁₋₄₂ incrementó el área de las células hasta 644,83 \pm 38,36 μm^2 (Figura 43H, violín 5), aunque este valor no resultó ser significativo respecto al del control.



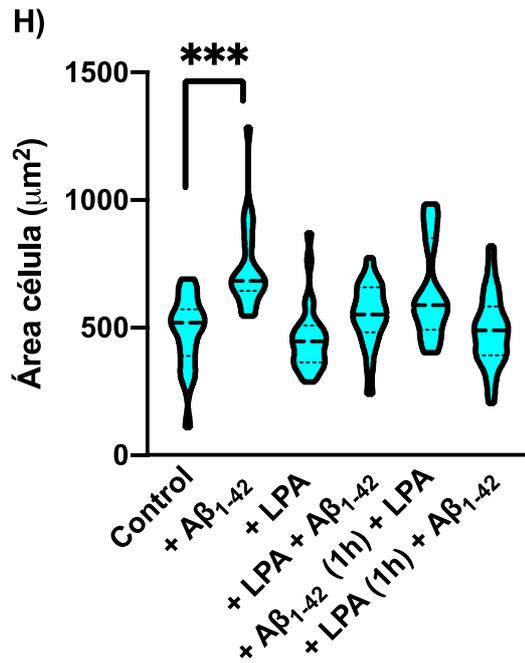


Figura 43. El LPA previene la sobreexpresión de GFAP y el aumento del área celular mediada por los oligómeros de Aβ₁₋₄₂. **A-F)** Inmunofluorescencia de GFAP en astrocitos pre-tratados o no durante 1 hora con 5µM de Aβ₁₋₄₂ o con 100nM de LPA y tratados o no durante 72 horas con 1µM de Aβ₁₋₄₂ o con 100nM de LPA. La inmunofluorescencia se llevó a cabo utilizando un primer marcaje con anticuerpo α-GFAP, seguido del secundario Goat α-Rabbit Alexa 488 (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las fotografías son representativas de tres experimentos independientes. **G)** La gráfica representa la media ± SEM de la expresión de GFAP (n=90) obtenida a partir del cálculo de fluorescencia total corregida por célula de cada condición del canal verde (GFAP). **H)** La gráfica representa la media ± SEM del área ocupada por la célula (n=90). El análisis estadístico t-Student resultó ser significativo (**p<0,01; ***p<0,001).

Estos resultados sugieren que la acción de los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ en la expresión de la proteína GFAP y el aumento del área celular como indicadores de astrogliosis estaría contrarrestada por la señalización intracelular dependiente del LPA y sus receptores.

6.6 El tratamiento combinado de LPA con Aβ₁₋₄₂ oligomérico no activa la migración de los astrocitos.

Llegados a este punto, investigamos si la presencia de LPA en los cultivos de astrocitos también contrarrestaba la migración celular mediada por los oligómeros de Aβ₁₋₄₂.

Para ello, se sembraron 800.000 células por pocillo en una placa de 6 pocillos y los cultivos se privaron de FBS durante 12-16 horas. Seguidamente, las células se trataron durante 72 horas con $1\mu\text{M}$ de $\text{A}\beta_{1-42}$ oligomérico, con 100nM de LPA o una combinación de ambos. Al cabo de este tiempo, se sembraron 100.000 células por *transwell*, tal y como se indica en el apartado ___ de Material y Métodos. Las células se dejaron incubar 24 horas adicionales, se fijaron las membranas de las cestas con metanol y se incubaron con hematoxilina.

Tanto el tratamiento con $\text{A}\beta_{1-42}$ oligomérico como con LPA promovieron la migración de los astrocitos (Figura 44B y C). Concretamente, migraron un $129,52\pm 4,568\%$ y un $151,81\pm 4,382\%$ respectivamente, comparados al control (Figura 44E, barras 2 y 3). Ahora bien, los astrocitos que fueron tratados con la combinación de $\text{A}\beta_{1-42}$ oligomérico y de LPA, vieron su capacidad de migración bloqueada (Figura 44D), $90,75\pm 5,36\%$ respecto al control (Figura 44E, barra 4).

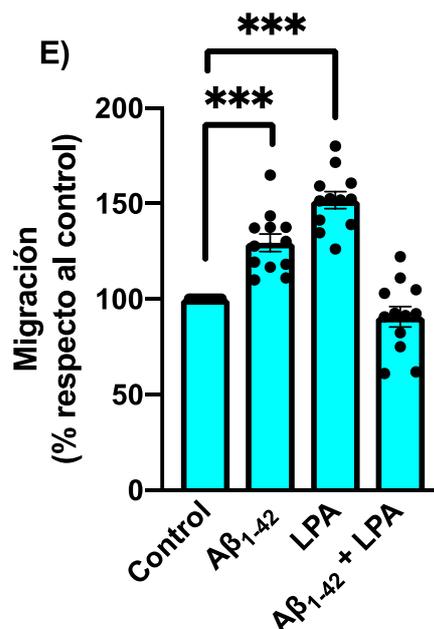
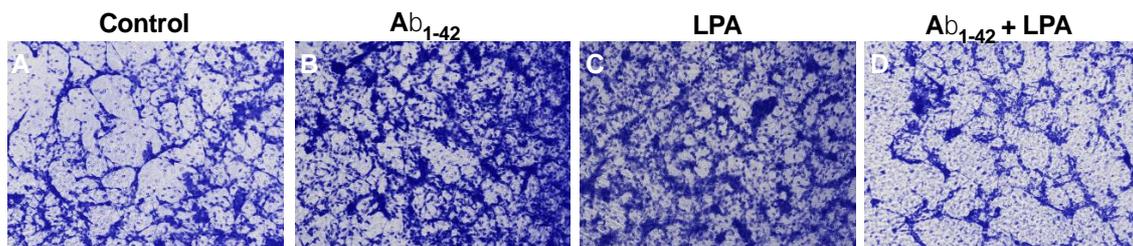


Figura 44. La combinación de $\text{A}\beta_{1-42}$ oligomérico y de LPA bloquea la migración de los astrocitos. A-D) 100.000 astrocitos por condición previamente tratados como

se indica durante 72 horas, fueron sembrados en *transwells*, se incubaron 24 horas y se tiñeron las membranas con hematoxilina. Se realizaron 3 fotografías por well y el área celular total fue calculado mediante ImageJ. Las fotografías son representativas de 2 experimentos independientes que fueron realizados por duplicado. **I)** El histograma representa la media \pm SEM del porcentaje de migración de los astrocitos y el análisis de t-Student resultó ser significativo (***) $p < 0,001$.

Los resultados obtenidos en el apartado 6 apuntan al LPA como un elemento que frena la señalización celular mediada por los oligómeros de $A\beta_{1-42}$. No sólo eso, sino que el $A\beta_{1-42}$ combinado con el LPA, también frena la señalización celular mediada por el LPA. Es decir, que un tratamiento combinado entre ambos agonistas mantiene a los astrocitos en un estado basal. Además, sugerimos que estos procesos están mediados por el LPAR1. Todo ello, junto a los resultados obtenidos en los apartados anteriores, se resumen de forma esquemática en la Figura 45.

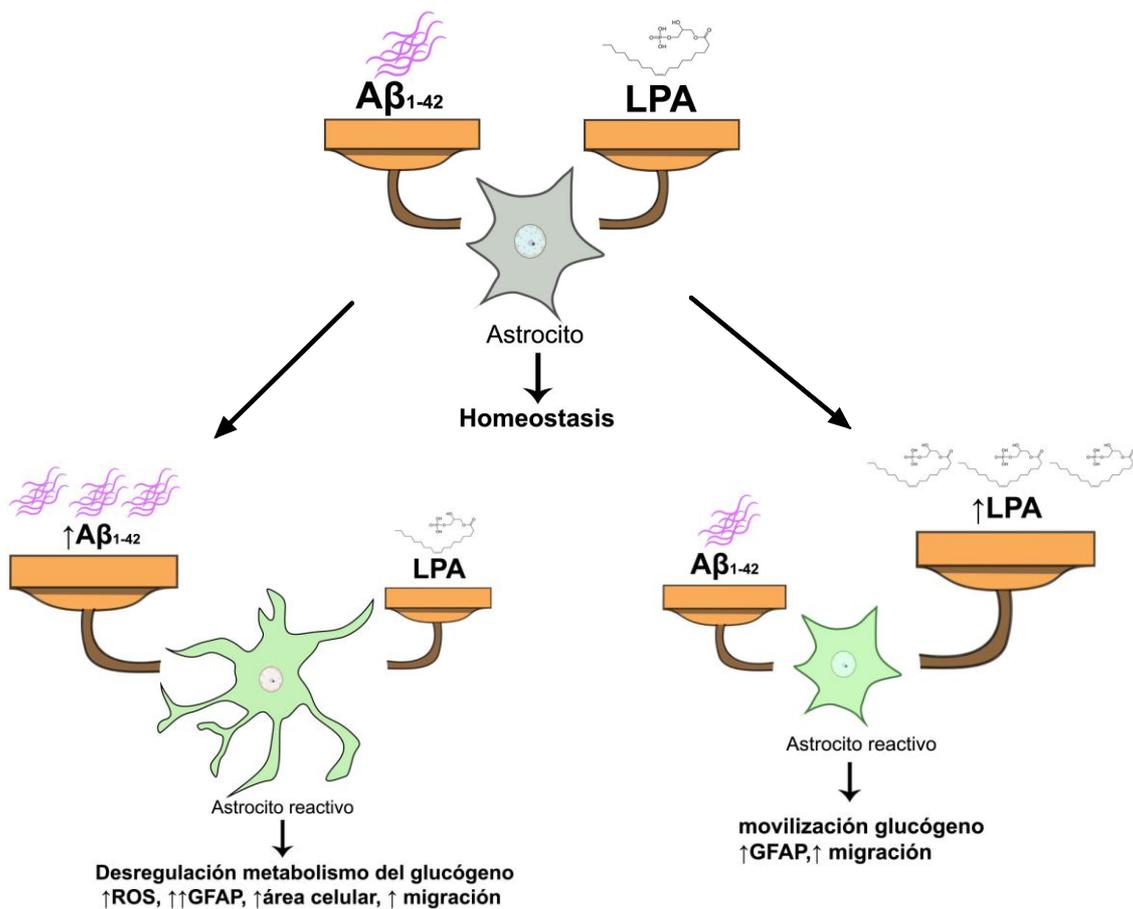


Figura 45. La combinación entre $A\beta_{1-42}$ oligomérico y LPA bloquea la respuesta temprana y tardía de los astrocitos dependiente de los oligómeros de $A\beta_{1-42}$. El tratamiento combinado entre oligómeros de $A\beta_{1-42}$ y LPA mantiene a los astrocitos en un estado de homeostasis. Si hay un exceso de tratamiento con $A\beta_{1-42}$ oligomérico, se

induce a una desregulación del metabolismo del glucógeno, a un aumento de generación de ROS, a la sobreexpresión de GFAP, al aumento del área celular y a la migración de los astrocitos. Si hay un exceso de tratamiento con LPA se promueve la movilización del glucógeno, a un aumento moderado de la expresión de GFAP y a la migración de los astrocitos.

7. La ruta de señalización Rac1/PYGM que conduce a las O-GlcNAcilaciones de proteínas gobernada por los oligómeros de A β ₁₋₄₂ está conservada en astrocitos primarios de rata.

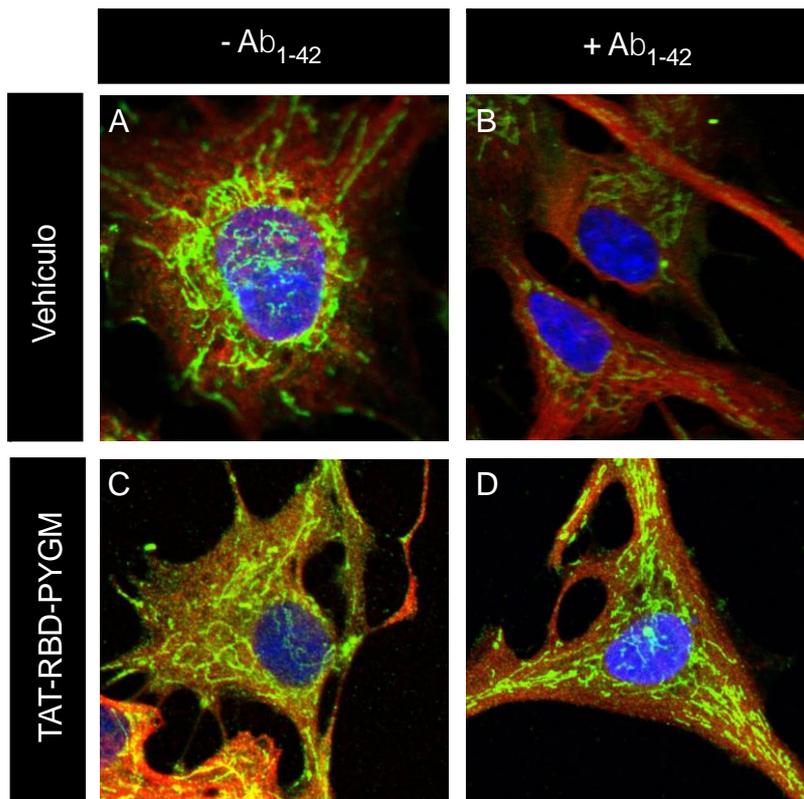
7.1. La degradación de gránulos nucleares de glucógeno por el tratamiento de oligómeros de A β ₁₋₄₂ está controlada por el tándem Rac1/PYGM en astrocitos primarios de rata.

Dado que todo el trabajo presentado hasta aquí se llevó a cabo en la línea humana de astrocitos inmortalizados, quisimos investigar si en cultivos primarios de astrocitos de rata se reproducía tanto la presencia de glucógeno en el núcleo celular como la dinámica de la degradación de este polímero mediada por los oligómeros de A β ₁₋₄₂ y si en todo ello estaba implicado el eje Rac1/PYGM.

Como ya indicamos en la sección 2.2 del capítulo de resultados, para evaluar la potencial implicación del eje de señalización Rac1/PYGM en la degradación del glucógeno gobernada por los oligómeros de A β ₁₋₄₂, utilizamos el péptido TAT-RBD-PYGM. Dado que el marcaje del glucógeno se llevó a cabo por inmunofluorescencia, no pudimos utilizar TAT-EGFP como péptido control ya que se solapaba con el marcaje del glucógeno. Para solventar esta situación, utilizamos como control una solución tamponada de 50 mM NaH₂PO₄ con 300 mM NaCl a pH 7.4. Por todo ello, 40.000 células por pocillo cultivadas en *coverslips*, se mantuvieron en medio con 1% de FBS durante 12-16 horas y se incubaron durante 1 hora a 37°C con vehículo o con 70 ng/ μ l de TAT-RBD-PYGM. Posteriormente, las células se estimularon o no con 1 μ M de A β ₁₋₄₂ oligomérico durante 30 minutos a 37°C y se fijaron con metanol frío (-20°C) durante 6 minutos. El marcaje del glucógeno se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.12.2. de Material y Métodos. Por último, para verificar que las células del cultivo primario eran astrocitos, se realizó una segunda inmunofluorescencia con α -GFAP, siguiendo el protocolo descrito en

el apartado 2.12.1., y como segundo anticuerpo Donkey α -Rabbit Alexa 647 (rojo lejano).

Como muestra la Figura 46, al igual que ocurría en la línea de astrocitos humanos, los astrocitos de rata también acumulaban gránulos de glucógeno en el núcleo celular $90,88 \pm 8,66$ gránulos (Figuras 46A y E, violín 1), y éstos desaparecían prácticamente del núcleo (Figura 46B) por la acción del tratamiento con los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ (Figura 46E, violín 2; $13,16 \pm 1,82$). Y de nuevo TAT-RBD-PYGM (Figura 46D) bloqueaba la degradación de los gránulos de glucógeno mediados por el $A\beta_{1-42}$ oligomérico (Figura 46E, violín 4; $87,44 \pm 6,05$), manteniéndose en unos niveles similares a los de su control (Figura 46C, y Figura 46E, violín 3; $81,88 \pm 6,70$) y a los del vehículo (Figura 46E, violín 1; $90,88 \pm 8,66$).



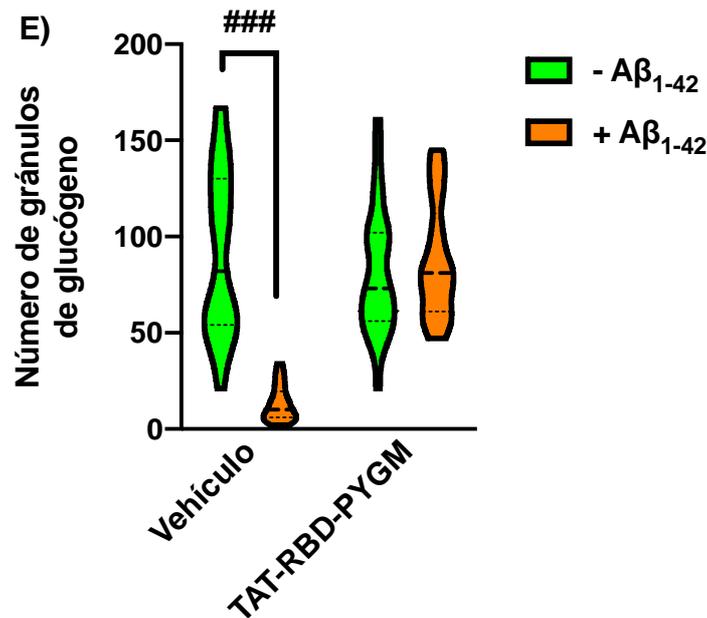


Figura 46. Los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ requieren de la ruta de señalización Rac1/PYGM para degradar los gránulos de glucógeno en astrocitos primarios de rata. A-D) Marcaje del glucógeno celular con la sonda GST-GYSC en cultivos celulares de astrocitos primarios de rata pre-tratados o no durante 1 hora con 70 ng/μL de TAT-RBD-PYGM y tratados o no con 1 μM Aβ₁₋₄₂ durante 30 minutos. La inmunofluorescencia se llevó a cabo utilizando un primer marcaje con anticuerpo α-GST, seguido del secundario Goat α-Rabbit Alexa 488 (verde). Se realizó una segunda inmunofluorescencia con anticuerpo α-GFAP, seguido del secundario Donkey α-Rabbit Alexa 647 (rojo lejano). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las fotografías son representativas de tres experimentos independientes. **E)** El gráfico representa la media ± SEM del número de gránulos de glucógeno nucleares de tres experimentos independientes (n=63). El análisis estadístico de t-Student resultó ser significativo (###p<0,001).

Estos resultados muestran que los astrocitos primarios de rata también acumulan gránulos en el núcleo celular. Y no sólo eso, sino que los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ controlan su degradación a través del dominio efector de Rac1 que interacciona con la PYGM, apuntando a que la señalización intracelular gobernada por el tándem Rac1/PYGM está conservada entre especies.

7.2. La generación de ROS mediada por oligómeros de A β ₁₋₄₂ está controlada por el eje Rac1/PYGM y las O-GlcNAcilaciones de proteínas en astrocitos primarios de rata.

Nos planteamos comprobar si el tándem Rac1/PYGM también estaba implicado en la señalización promovida por los oligómeros de A β ₁₋₄₂ hacia la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), en este caso en astrocitos primarios de rata.

Para resolver esta cuestión, se sembraron 10.000 células por pocillo en una placa de 24 pocillos y se incubaron hasta alcanzar un 80% de confluencia en medio IMDM suplementado con 10% de FBS. Una vez se alcanzó dicha confluencia, los cultivos celulares se incubaron en medio IMDM suplementado con 1% de FBS durante 12-16 horas y posteriormente, se trataron durante 1 hora con 70ng/ μ L de TAT-EGFP o TAT-RBD-PYGM para finalmente estimularlos o no con 1 μ M de oligómeros de A β ₁₋₄₂ durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 20 minutos con 5 μ M de sonda CM-H2DCFDA (Invitrogen) a 37°C y se midió la generación de ROS tal y como se indica en el apartado 2.12 de Material y Métodos.

Como muestra la Figura 47, los oligómeros de A β ₁₋₄₂ producían un aumento significativo de la generación de ROS 157,64 \pm 14,05% (barra 2) comparadas a las células control no tratadas (100%, barra 1). El péptido TAT-RBD-PYGM bloqueó eficazmente la generación de ROS inducida por el A β ₁₋₄₂ oligomérico (111,86 \pm 7,38%, barra 4). El péptido TAT-RBD-PYGM *per se* no tenía ningún efecto sobre los valores basales de generación de ROS 101,03 \pm 14,72%, barra 3).

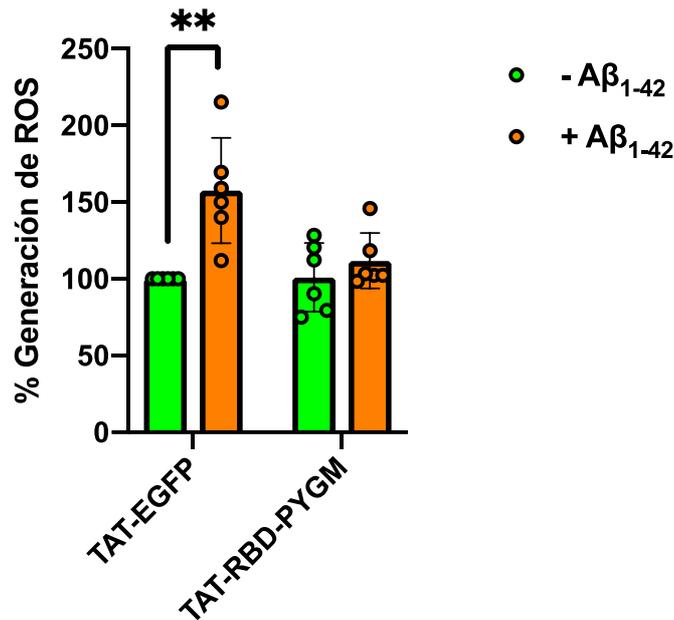


Figura 47. El tándem Rac1/PYGM controla la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) promovida por el Aβ₁₋₄₂ oligomérico en cultivos primarios de astrocitos de rata. Cultivos de astrocitos primarios de rata pre-tratados con 70 ng/μL de TAT-EGFP o TAT-RBD-PYGM fueron estimulados o no con 1 μM de Aβ₁₋₄₂ durante 30 minutos a 37°C. Se incubaron con 5 μM de sonda CM-H2DCFDA y se midió la fluorescencia con una longitudes de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 530 nm. Las medidas se relativizaron con respecto al control negativo. Los resultados se representan en el histograma como la media ± SEM del porcentaje de producción de ROS de dos experimentos independientes realizados por triplicado y el análisis estadístico por t de student resultó ser significativo (**p<0,01).

Estos resultados ponen de manifiesto que la generación de ROS inducida por el Aβ₁₋₄₂ oligomérico requiere la ruta de señalización que implica a Rac1/PYGM y que ésta se encuentra también conservada en astrocitos primarios de rata.

Lo siguiente fue verificar si la generación de ROS mediada por Aβ₁₋₄₂ en astrocitos primarios de rata requería modificaciones postraduccionales por O-GlcNAcilaciones de proteínas. Para ello, se sembraron 10.000 células por pocillo en una placa de 24 pocillos y se incubaron los cultivos hasta alcanzar un 80% de confluencia en medio IMDM suplementado con 10% de FBS. Una vez se alcanzó dicha confluencia, los cultivos celulares se trataron con 10 μM de OSMI o 12,5 μM de Thiamet-G e incubados en medio IMDM suplementado con 1% de FBS durante 12-16 horas. Posteriormente, fueron estimulados o no con 1 μM de oligómeros de Aβ₁₋₄₂ durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 20 minutos con 5 μM de

sonda CM-H2DCFDA (Invitrogen) a 37°C y se midió la generación de ROS tal y como se indica en el apartado 2.12 de Material y Métodos.

Como se esperaba, los oligómeros de A β ₁₋₄₂ producían un aumento significativo de la generación de ROS de un 155,89±12,14% en las células tratadas con DMSO (vehículo) (Figura 48, barra 2 comparada con la barra 1). Al igual que ocurría en la línea de astrocitos humanos inmortalizados (Figura 31), el inhibidor de OGT (OSMI) *per se*, producía un aumento significativo de la producción de ROS 159,49±18,36% (Figura 48, barra 3), generación de ROS que no se modificó por el tratamiento con A β ₁₋₄₂ oligomérico (139,66% ± 10,159, Figura 48, barra 4). Por el contrario, el tratamiento con thiamet-G (inhibidor de OGA), bloqueó eficazmente la generación de ROS (74,76±6,75% barra 5 de la Figura 48), y no se modificó por la presencia de A β ₁₋₄₂ oligomérico (64,16±6,58%).

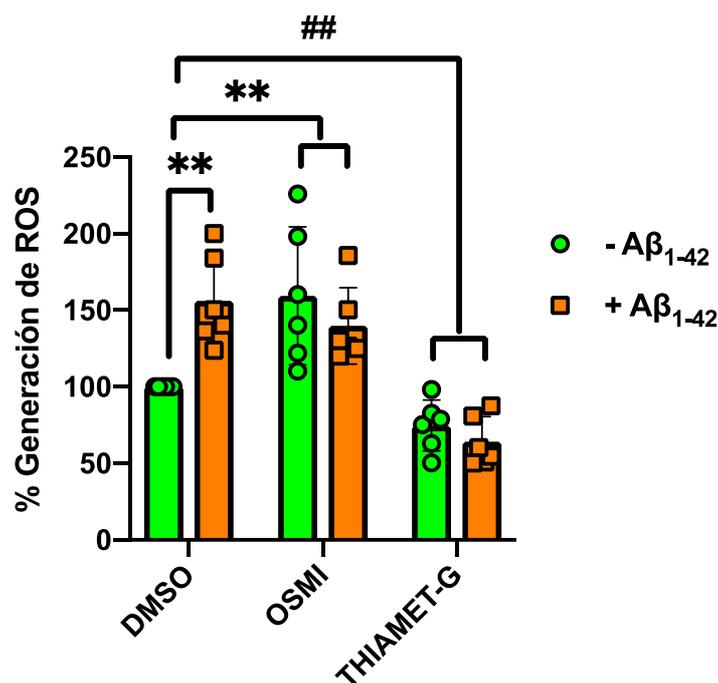


Figura 48. Los oligómeros de A β ₁₋₄₂ inducen a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de la OGA en astrocitos primarios de rata. Astrocitos primarios de rata fueron estimulados o no con 1 μ M de A β ₁₋₄₂ durante 30 minutos a 37°C. Se incubaron con 5 μ M de sonda CM-H2DCFDA y se midió la fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 485 nm y una emisión de 530 nm. Las medidas se relativizaron con respecto al control negativo. Los resultados se representan en el histograma como la media \pm SEM del porcentaje de producción de ROS de dos experimentos independientes realizados por triplicado y el análisis estadístico por t de student resultó ser significativo (**p<0,01; ##p<0,01).

Por tanto, estos resultados sugieren que tratamientos a tiempos cortos con inhibidores farmacológicos de la OGT y la OGA, modifican el equilibrio entre ambas enzimas alterando así la generación de ROS en los astrocitos. Esto apunta a que los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ podrían desregular la actividad de las enzimas desencadenando un aumento de generación de ROS.

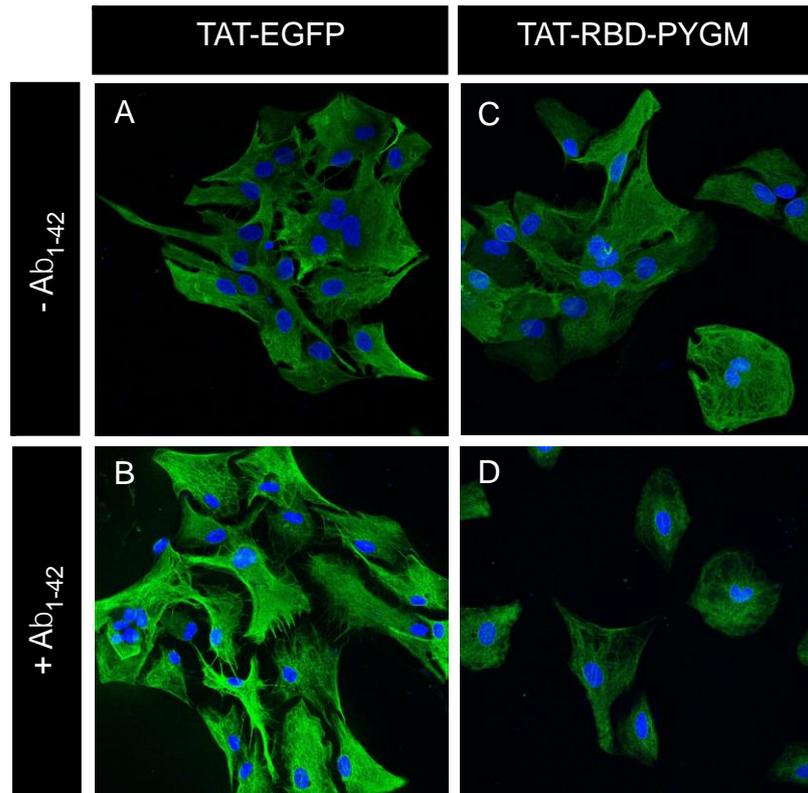
7.3. Los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ implican al tándem Rac1/PYGM para mediar la sobreexpresión de GFAP en cultivos primarios de rata.

Dado que en la línea de astrocitos humanos inmortalizados los oligómeros de $A\beta_{1-42}$, requerían la señalización mediada por Rac1/PYGM para sobreexpresar GFAP, nosotros examinamos si se mantenía la misma señalización en los astrocitos primarios de rata. Para ello, 40.000 células por pocillo cultivadas en *coverslips*, se mantuvieron en medio con 1% de FBS durante 12-16 horas. Las células se incubaron durante 72 horas adicionales con 5 μ M de oligómeros de $A\beta_{1-42}$ y, al cabo de este tiempo, se fijaron con 4% PFA durante 10 minutos. El marcaje del GFAP se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.12.1 de Material y Métodos.

Como se esperaba, los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ favorecían la expresión exacerbada de GFAP (Figura 49B). Sin embargo, esta sobreexpresión de GFAP mediada por los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ se bloqueó totalmente cuando los astrocitos se pretrataron con TAT-RBD-PYGM (Figura 49D). La sobreexpresión de GFAP, calculada por intensidad de fluorescencia de las células y representada en la Figura 49E, muestra que se pasaba de un nivel basal de $58.792,15 \pm 7.229,13$ de intensidad a $122.937,44 \pm 14.952,98$ en las células tratadas con oligómeros de $A\beta_{1-42}$ (violines 1 y 2). En cambio, en células tratadas con TAT-RBD-PYGM y posteriormente con oligómeros de $A\beta_{1-42}$, la sobreexpresión de GFAP se vio eficazmente bloqueada, dando un valor de $58.466,50 \pm 6.342,92$ (Figura 49E, violín 4) y un valor de $53.051,22 \pm 8.715,03$ cuando sólo eran tratadas con TAT-RBD-PYGM (Figura 49E, violín 3).

Cuando cuantificamos el área que ocupaban las células en el *coverslip*, comprobamos que el tratamiento con $A\beta_{1-42}$ oligomérico inducía un aumento medio del área ocupada por las células desde $1.476,62 \pm 105,93 \mu\text{m}^2$ (Figura

49F, violín 1) a $2.171,88 \pm 139,309 \mu\text{m}^2$ (Figura 49F, violín 2). Cuando las células se pretrataron con TAT-RBD-PYGM y posteriormente se estimularon con el $\text{A}\beta_{1-42}$ oligomérico el área ocupada por las células no se modificó (Figura 49F, violín 4 ($1.079,52 \pm 79,01 \mu\text{m}^2$; comparada con Figura 49F, violín 3; $1.184,56 \pm 148,85 \mu\text{m}^2$). Lo cual sugería que el péptido TAT-RBD-PYGM impedía de manera eficaz el aumento de volumen celular mediado por los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$.



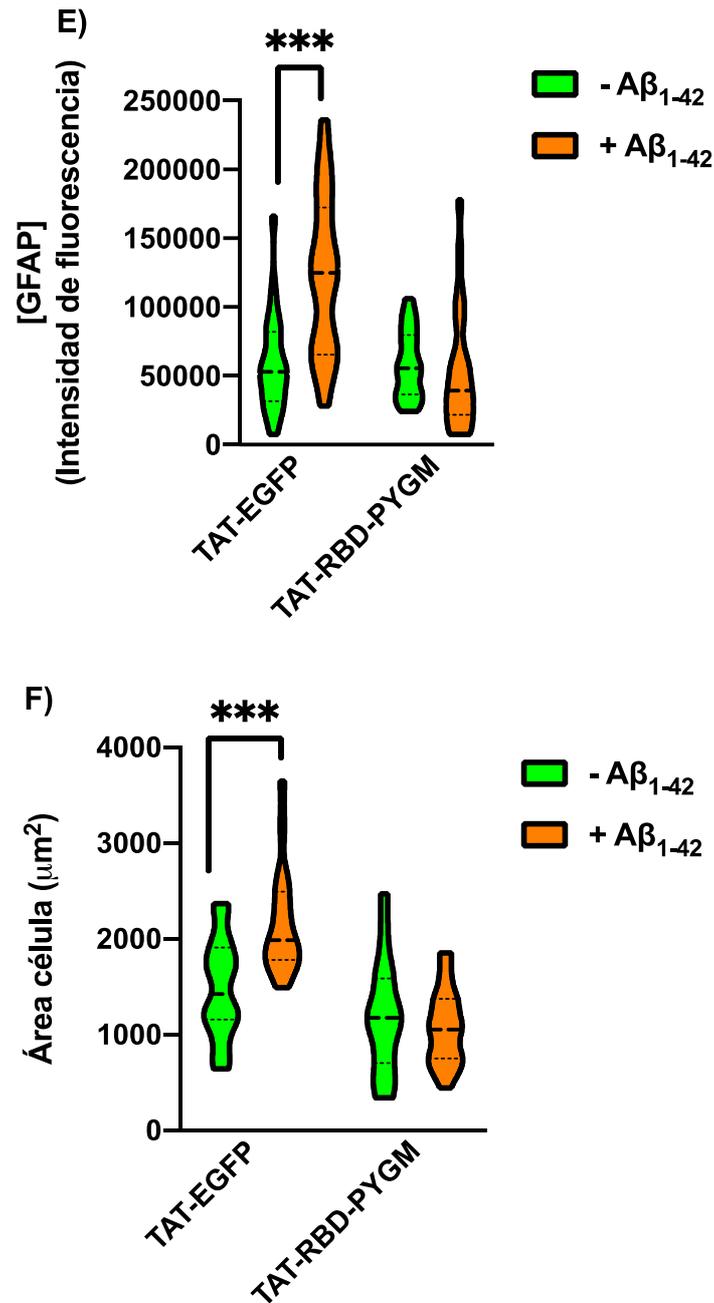


Figura 49. Los oligómeros de $\text{A}\beta_{1-42}$ controlan la sobreexpresión de GFAP y el aumento del área celular en astrocitos primarios de rata a través de tándem Rac1/PYGM en astrocitos primarios de rata. **A-D)** Inmunofluorescencia de astrocitos primarios de rata pre-tratados durante 1 hora con 70 ng/ μL de TAT-EGFP o 70 ng/ μL de TAT-RBD-PYGM y durante 72 horas con 1 μM de $\text{A}\beta_{1-42}$. La inmunofluorescencia se llevó a cabo utilizando un primer marcaje con anticuerpo α -GFAP, seguido del secundario Goat α -Rabbit Alexa 488 (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las fotografías son representativas de dos experimentos independientes. **E)** La gráfica representa la media \pm SEM de la expresión de GFAP, obtenida a partir del cálculo de fluorescencia total corregida por célula de cada condición del canal verde (GFAP)

(n=90). **F)** La gráfica representa la media \pm SEM del área ocupada por las células (n=90). El análisis estadístico t-Student de B y C resultó ser significativo (***) $p < 0,001$.

Estos resultados sugieren que en astrocitos primarios de rata, la sobreexpresión de GFAP, como marcador de astrogliosis mediada por oligómeros de $A\beta_{1-42}$, está controlada por el dominio efector de Rac1 que se une a la PYGM. Por lo tanto, los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ regulan la sobreexpresión de GFAP y el aumento del área celular vía Rac1/PYGM, resultados que demuestran el grado de conservación de esta ruta de señalización tanto en células derivadas de tejido humano e inmortalizadas como en cultivos primarios de astrocitos de rata.

7.4. El tratamiento con LPA en astrocitos primarios de rata bloquea la respuesta a los oligómeros de $A\beta_{1-42}$.

7.4.1. La cinética de degradación del glucógeno nuclear promovida por los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ y por LPA es distinta en astrocitos primarios de rata.

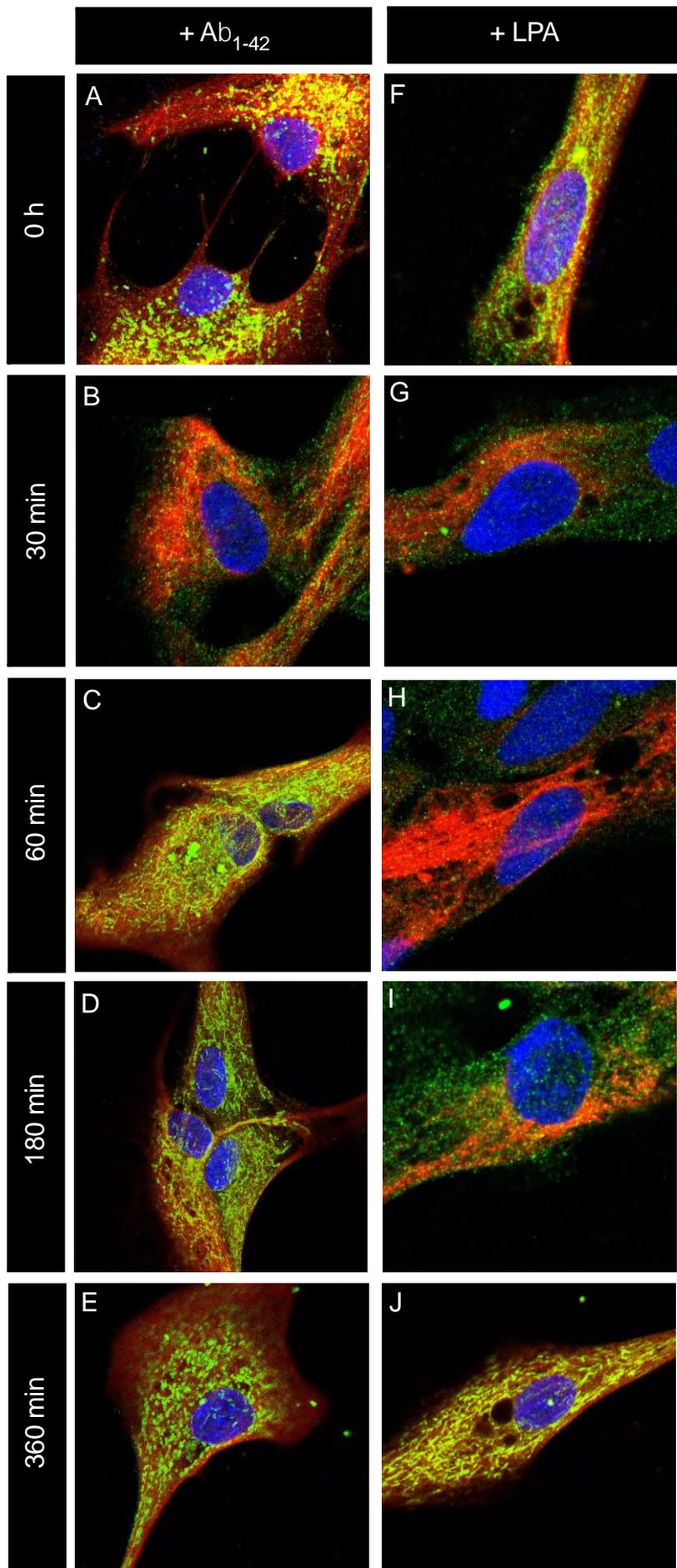
Una vez comprobada la implicación de la ruta de señalización Rac1/PYGM en la respuesta temprana y tardía de los astrocitos a los oligómeros de $A\beta_{1-42}$, nos preguntamos si el bloqueo de la señalización promovida por los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ por parte del LPA estaba conservada o no en los astrocitos primarios de rata. Por lo tanto, primero examinamos la cinética de degradación del glucógeno nuclear por parte de ambos agonistas, de la misma forma que se llevó a cabo en la línea de astrocitos humanos inmortalizados (apartado 6.2. de Resultados).

Para ello, 40.000 astrocitos fueron sembrados en *coverslip*, y mantenidos en medio con 1% de FBS durante 12-16 horas, seguidamente estimulados o no con $A\beta_{1-42}$ oligomérico o con LPA a diferentes tiempos. Posteriormente, se fijaron las células con metanol frío (-20°C) durante 6 minutos. El marcaje del glucógeno se llevó a cabo siguiendo los pasos descritos en el apartado 2.12.2. de Material y Métodos. Por último, para verificar que las células del cultivo primario eran astrocitos, se realizó una segunda inmunofluorescencia con α -

GFAP, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.12.1., y como segundo anticuerpo Donkey α -Rabbit Alexa 647 (rojo lejano).

Como muestra la Figura 50, 30 minutos de exposición tanto a los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ (Figura 50B) como al LPA (Figura 50G), activaban la degradación de los gránulos de glucógeno celulares en general y los nucleares en particular, haciendo una limpieza de ellos casi total. Concretamente, se pasó de $69,47 \pm 7,68$ gránulos nucleares a $14,33 \pm 7,68$ en el caso del tratamiento con oligómeros de $A\beta_{1-42}$ y a $17,78 \pm 4,20$ en el caso del tratamiento con LPA (Figura 50J).

Cuando ambos tratamientos se prolongaron durante 60 minutos, de la misma forma que ocurrió con la línea de astrocitos humanos inmortalizados, el número de los gránulos ($19,36 \pm 9,23$) se mantenía prácticamente igual al de 30 minutos con el tratamiento de LPA (Figura 50H), los gránulos de glucógeno en las células tratadas con oligómeros de $A\beta_{1-42}$ se dispararon hasta $100,17 \pm 11,40$ (Figuras 50C y J). Este número de gránulos descendió y se estabilizó a los 180 minutos (Figuras 50E y J, $69,90 \pm 11,70$), obteniéndose valores similares a los 360 minutos de tratamiento (Figuras 50F y J, $50,636 \pm 4,597$). Este comportamiento fue distinto en la línea de astrocitos humanos inmortalizados (Figura 40), debido a que en el tratamiento de 3 horas todavía no se recuperaban los gránulos de glucógeno a valores similares a los del control. Aun así, el comportamiento con el tratamiento de LPA se mantuvo igual en ambas tipos de astrocitos. La recuperación de los gránulos de glucógeno tras el tratamiento con LPA fue progresiva, a las 3 horas se tenían $31 \pm 8,41$ gránulos (Figura 50B y J), llegando a los valores control a las 6 horas de tratamiento ($84,27 \pm 17,11$ (Figura 50B) y Figura 50A y K).



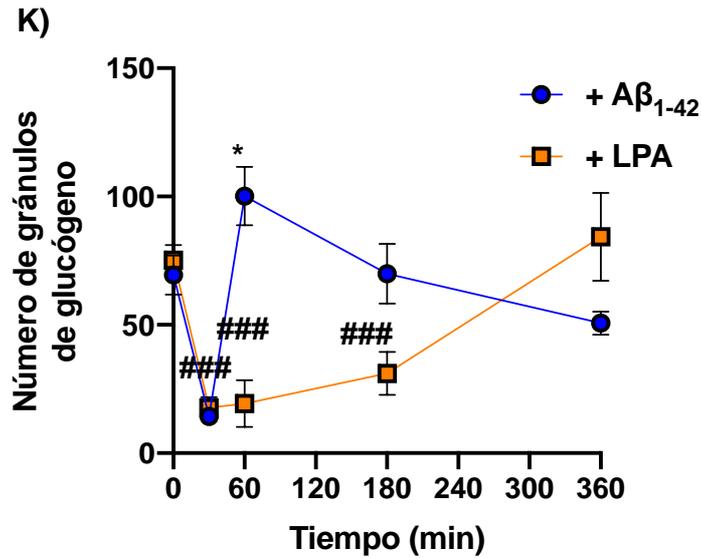


Figura 50. Cinética de degradación y recuperación de gránulos de glucógeno intranucleares en astrocitos primarios de rata tratados con oligómeros de Aβ₁₋₄₂ o con LPA. A-J) Marcaje del glucógeno celular con la sonda GST-GYSC en astrocitos tratados con 1 μM de Aβ₁₋₄₂ o 100nM de LPA durante los tiempos indicados. La inmunofluorescencia se llevó a cabo utilizando un primer marcaje con anticuerpo α-GST, seguido del secundario Goat α-Rabbit Alexa 488 (verde). Se realizó una segunda inmunofluorescencia con α-GFAP, seguido del secundario Donkey α-Rabbit Alexa 647 (rojo lejano). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las fotografías son representativas de dos experimentos independientes. **K)** El gráfico representa la media ± SEM del número de gránulos de glucógeno nucleares de dos experimentos independientes (n=42). El análisis estadístico t-Student resultó ser significativo ###p<0,001; *p<0,01).

En resumen, de la misma forma que ocurría en la línea de astrocitos humanos inmortalizados, las cinéticas de degradación y recuperación de los gránulos de glucógeno nucleares divergen totalmente en función del estímulo, Aβ₁₋₄₂ oligomérico o LPA, siendo la ventana de tiempos entre 30 y 180 minutos la que evidencia el comportamiento diferencial de un tratamiento con respecto al otro.

7.4.2. La administración combinada de LPA y de Aβ₁₋₄₂ no genera especies reactivas de oxígeno en astrocitos primarios de rata.

Una vez verificada que la dinámica de degradación del glucógeno intranuclear mediada por el Aβ₁₋₄₂ oligomérico y por el LPA era la misma que en la línea de astrocitos humanos inmortalizados, examinamos si la combinación de ambos

compuestos afectaba a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en cultivos primarios de astrocitos de rata.

Para ello, se sembraron 10.000 células por pocillo en una placa de 24 pocillos y se incubaron los cultivos hasta alcanzar un 80% de confluencia en medio IMDM suplementado con 10% de FBS. Una vez se alcanzó dicha confluencia, se incubaron durante 12-16 horas en medio suplementado con 1% de FBS. Los cultivos se estimularon o no con 1 μ M de oligómeros de A β ₁₋₄₂, 100nM de LPA o la combinación de ambos durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 20 minutos con 5 μ M de sonda CM-H2DCFDA (Invitrogen) a 37°C y se midió la generación de ROS tal y como se indica en el apartado 2.12 de Material y Métodos.

Como era de esperar, los oligómeros de A β ₁₋₄₂ producían un aumento significativo de la generación de ROS en astrocitos primarios de rata, se pasaba del 100% (control) a 154,3 \pm 7,01% (Figura 51 barras 1 y 2). Sin embargo, el tratamiento de 30 minutos de LPA no mediaba en la generación de ROS (92,01 \pm 12,18%, Figura 51 barra 3). Ahora bien, la administración combinada de LPA con A β ₁₋₄₂ oligomérico no sólo bloqueó la generación de ROS inducida por los oligómeros de A β ₁₋₄₂, sino que provocó un decremento de los valores comparado a los valores basales, 72,71 \pm 9,12% (Figura 51, barra 4).

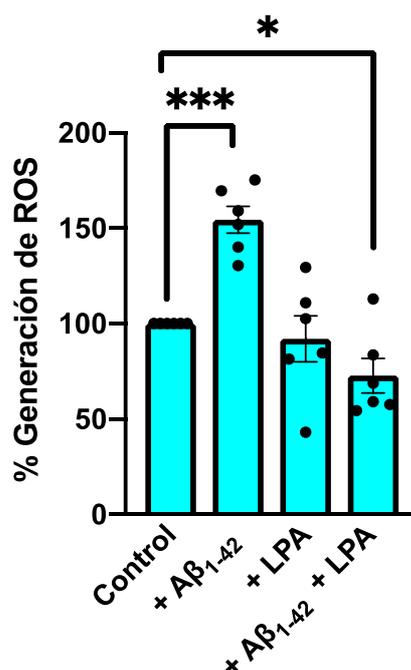


Figura 51. La generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) se bloquea con el tratamiento combinado de A β ₁₋₄₂ oligomérico y LPA en astrocitos primarios de rata. Cultivos de astrocitos primarios de rata se estimularon o no con 1 μ M de A β ₁₋₄₂, 100nM de LPA o la combinación de ambos durante 30 minutos a 37°C. Se incubaron con 5 μ M de sonda CM-H2DCFDA y se midió la fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 485 nm y una de emisión de 530 nm. Las medidas se relativizaron con respecto al control negativo. Los resultados se representan en el histograma como la media \pm SEM expresada en porcentaje de producción de ROS de tres experimentos independientes realizados por triplicado y el análisis estadístico por t de student resultó ser significativo (**p<0,001; ##p<0,01).

De la misma forma que ocurría en la línea de astrocitos humanos inmortalizada (Figura 42), en cultivos primarios de astrocitos la combinación de A β ₁₋₄₂ oligomérico con LPA bloqueaba la respuesta del A β ₁₋₄₂ oligomérico. Por lo que refuerza nuestra hipótesis sobre el papel protector del LPA en la biología de los astrocitos y además, sugiere que el efecto combinado de estos compuestos también funciona entre astrocitos de diferentes especies.

7.4.3. La administración combinada de LPA y de A β ₁₋₄₂ oligomérico no promueve la migración de los astrocitos primarios de rata.

En esta misma línea, nosotros quisimos también comprobar el efecto del tratamiento combinado LPA + A β ₁₋₄₂ sobre la migración de los astrocitos primarios de rata. Para ello, se sembraron en placas de 6 pocillos y se incubaron hasta que alcanzaron la confluencia. En ese momento, las células se privaron de FBS durante 12-16 horas y se trataron o no con 1 μ M de A β ₁₋₄₂, 100nM de LPA o una combinación de ambos durante 72 horas. Al cabo de este tiempo, se sembraron 100.000 células de cada condición en *transwell*, tal y como se indica en el apartado ___ de Material y Métodos. Al cabo de 24 horas, se fijaron las membranas y se tiñeron con hematoxilina.

Como ocurrió en la línea de astrocitos humanos inmortalizados, tanto el tratamiento con A β ₁₋₄₂ oligomérico como con LPA promovieron la migración de los astrocitos primarios de rata (Figura 52B y C). Concretamente, migraron un 163,17 \pm 7,52% y un 159,34 \pm 7,92% respectivamente, comparados al control (Figura 52E, barras 2 y 3). Ahora bien, los astrocitos que fueron tratados con la combinación de A β ₁₋₄₂ oligomérico y de LPA, vieron su capacidad de migración bloqueada (Figura 52D), 98,1 \pm 7,81% respecto al control (Figura 44E, barra 4).

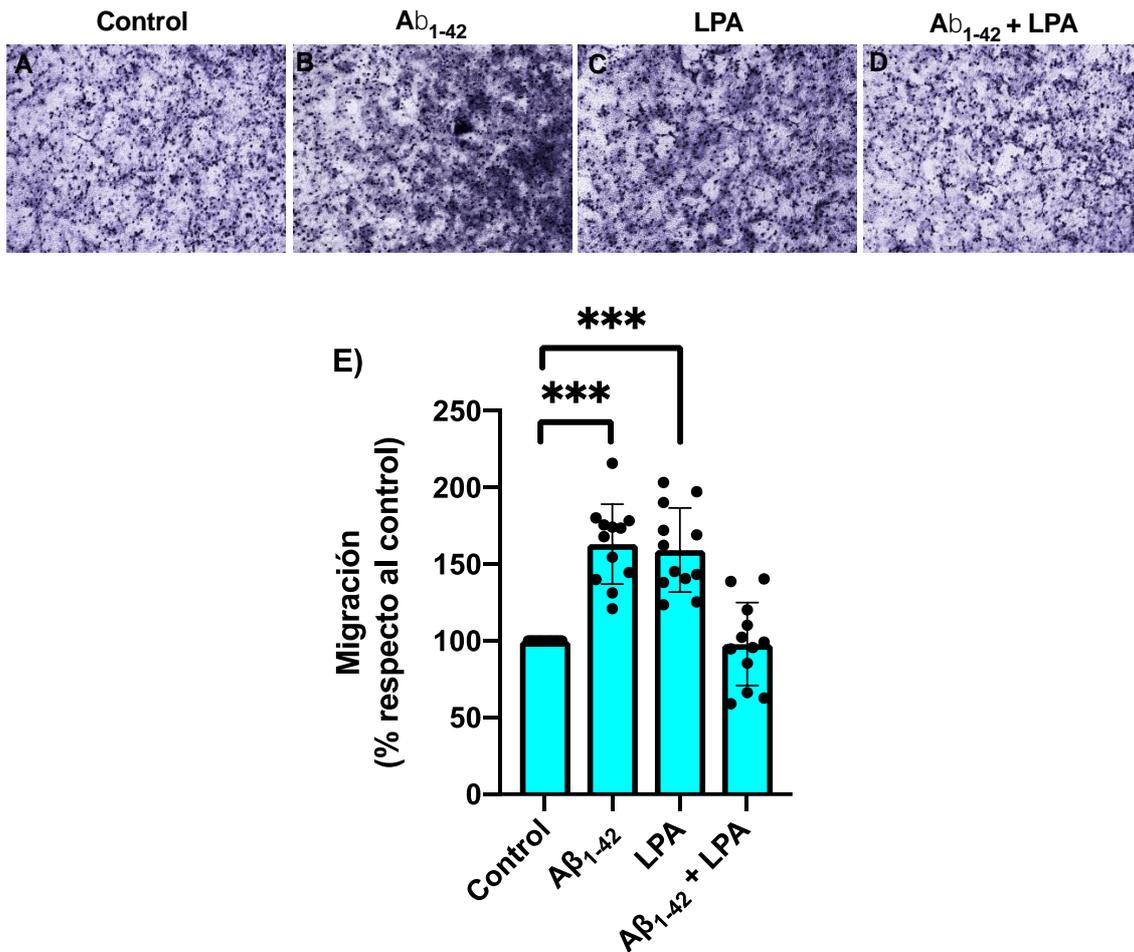


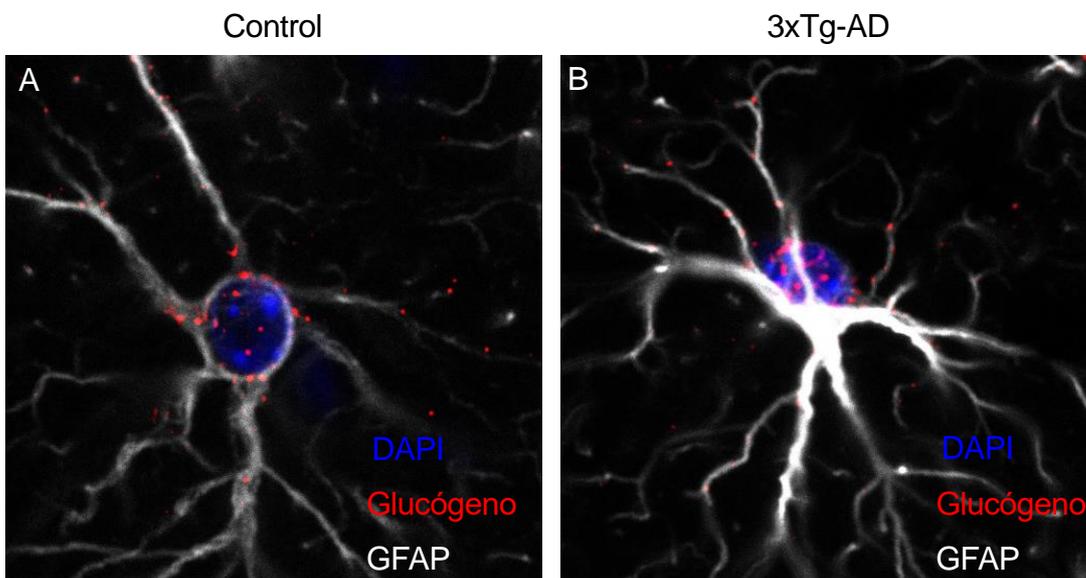
Figura 52. La combinación de A β ₁₋₄₂ oligomérico y de LPA no induce a la migración de los astrocitos primarios de rata. A-D) Astrocitos sembrados en monocapa fueron tratados durante 72 horas con 1 μ M de A β ₁₋₄₂, 100nM de LPA o la combinaciónb 1 μ M de A β ₁₋₄₂ y 100nM de LPA. A las 72 horas, fueron sembrados en *transwell*, se incubaron 24 horas adicionales y se tiñeron las membranas con hematoxilina. Se realizaron 3 fotografías por pocillo y el área celular total fue calculado mediante ImageJ. Las fotografías son representativas de 2 experimentos independientes que fueron realizados por duplicado. E) El histograma representa la media \pm SEM expresada como porcentaje de migración de los astrocitos (n=12). El análisis de t-Student resultó ser significativo Porcentaje de migración (**p<0,01; ***p<0,001).

Por lo tanto, de la misma forma que ocurría con la generación de ROS, la combinación entre A β ₁₋₄₂ oligomérico y LPA dejaba a las células en un estado de actividad basal.

8. Análisis de la acumulación de gránulos de glucógeno en tejido de ratón control y triple transgénico de 18 meses de edad.

Finalmente, examinamos la cantidad de gránulos de glucógeno nucleares acumulados en astrocitos de tejido de ratón control y de ratón triple transgénico (3xTg-AD). Para ello, a tejidos de cerebro de ratón de 18 meses de edad (control y triple transgénico), se incubaron durante 2 horas con 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de sonda GYSC y se les hizo una doble inmunofluorescencia con α -GST y α -GFAP como se detalla en Material y Métodos. El α -GST fue marcado con goat α -rabbit Alexa 597 y el α -GFAP fue marcado con goat α -mouse Alexa 647. Finalmente, los tejidos se trataron con Autofluorescence Eliminator Reagent (Millipore) y tras teñir los núcleos con DAPI, los tejidos se montaron con fluoromont.

La región examinada fue la zona del CA1 del hipocampo, en la cuál se detectaron astrocitos con glucógeno nuclear tanto en ratones control como en ratones 3xTg-AD. Con el fin de observar los gránulos de glucógeno con más detalle, se realizó un zoom óptico a los astrocitos de forma individual (Figura 53) y observamos que estos gránulos eran más numerosos y estaban más concentrados en el núcleo de los astrocitos de ratón 3xTg-AD que en el control (Figura 53B,F,D y H). La cuantificación de los gránulos de glucógeno en el núcleo, resultó que aumentaban de manera significativa en el tejido de ratón 3xTg-AD (Figura 53I, $20,29 \pm 2,68$ gránulos de glucógeno) comparados con el tejido de ratón control (Figura 53I, $12,71 \pm 2,05$ gránulos de glucógeno).



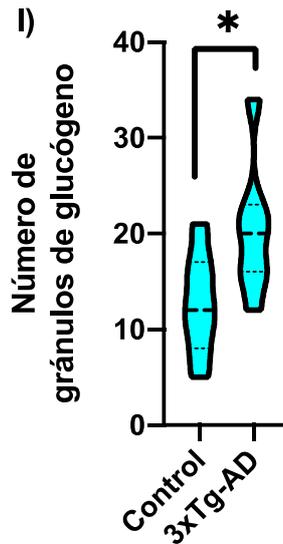


Figura 53. Los astrocitos de los ratones triple transgénico acumulan una mayor cantidad de glucógeno en el núcleo que los astrocitos de los ratones control. A-H) Marcaje del glucógeno celular con la sonda GST-GYSC en tejidos de cerebro de ratón control (A-D) y de ratón triple transgénico (E-H). Los tejidos fueron fijados con PFA, tratados con Antigen Retrieval y permeabilizados con etanol. Se trataron los tejidos con 0,5µg/µL de sonda GYSC y la inmunofluorescencia se llevó a cabo utilizando un doble marcaje con anticuerpo α -GST, seguido del secundario Goat α -Rabbit Alexa 594 (rojo), y con anticuerpo α -GFAP, seguido del secundario Goat α -mouse IgG1 Alexa 647 (rojo lejano). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las fotografías son representativas de tres tejidos independientes **J)** El gráfico de violines representa la media \pm SEM del número de gránulos de glucógeno nucleares de tres experimentos independientes (n=30). El análisis estadístico t-Student resultó ser significativo (#p<0,05; ###p<0,001).

Por lo tanto, estos resultados confirman el hallazgo observado tanto en la línea de astrocitos humanos como en astrocitos primarios de rata: que el glucógeno es acumulado en el núcleo y que en la Enfermedad de Alzheimer, esta acumulación difiere respecto al control, siendo acumulados en mayor cantidad.

Discusión

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología neurodegenerativa que se asocia tanto a la presencia en el espacio intracelular de ovillos neurofibrilares formados por la proteína tau fosforilada como a la presencia en el espacio extracelular de placas amiloides constituidas mayoritariamente por el péptido neurotóxico $A\beta_{1-42}$ amiloide. La acumulación y agregación de estas moléculas en los espacios intra y extracelulares, las convierten en elementos clave en la degeneración de las neuronas hipocampales y corticales que se traduce entre otras cosas en pérdida de memoria, desorientación espacio-temporal y cambios en el comportamiento, algunos de los síntomas característicos de la EA (Soria López, González, and Léger 2019).

La disfunción cognitiva en los pacientes con la EA correlaciona, entre otras cosas, con un bajo metabolismo de glucosa en el cerebro. Este hipometabolismo de glucosa cerebral aparece décadas antes que otros síntomas o marcas histopatológicas propias de la enfermedad. Por lo que se ha postulado que los cambios en el metabolismo energético podrían preceder a la pérdida de la función neuronal (Tarczyluk et al. 2015). Llegar a descifrar el nexo entre el metabolismo del cerebro con la muerte neuronal podría ser clave para entender la progresión de la neurodegeneración y especialmente la EA. Todo ello, implica entre otras cosas, la caracterización de la relación funcional entre los diferentes linajes celulares presentes en el cerebro y particularmente la relación entre astrocitos y neuronas.

Los astrocitos son las células de la glía más abundantes del cerebro y se encargan de mantener la actividad neuronal tanto desde un punto de vista estructural, como trófico y/o metabólico. Todo apunta a que los astrocitos juegan un papel clave en la regulación de la función neuroenergética (Pellerin 2010). Son células que tienen una elevada capacidad de almacenar glucógeno y es a partir de su movilización, promovida por moléculas como, la norepinefrina, el péptido intestinal vasoactivo, la adenosina o altos niveles de potasio, que se genera lactato (Bouzier-Sore and Pellerin 2013). Este lactato generado se transfiere a las neuronas por medio de los transportadores MCT, y les sirve a éstas para obtener la energía necesaria para llevar a cabo sus funciones (Belanger, Allaman, and Magistretti 2011). De hecho, se ha

demostrado que tanto la movilización del glucógeno astrocitario como este trasvase de lactato del astrocito a la neurona se precisa para procesos cognitivos como son el aprendizaje y la formación de la memoria a largo plazo (Gibbs and Hertz 2008; Suzuki et al. 2011).

Ahora bien, ¿qué papel juega la movilización del glucógeno y la posterior generación de lactato en una enfermedad neurológica como es la EA?. De momento, no se tiene conocimiento de cómo se encuentra el proceso de transferencia de lactato entre el astrocito y la neurona en esta enfermedad. Una de las causas de esta falta de conocimiento es que la clínica de esta enfermedad se manifiesta al cabo de décadas de iniciarse y la alteración de ese transporte de lactato puede ocurrir en estadios tempranos mediados por incipientes cambios en la concentración de oligómeros de $A\beta_{1-42}$ en el sistema nervioso.

Hace unos años, nuestro grupo de investigación describió que la GTPasa Rac1 en su forma activa (Rac1-GTP) interaccionaba con la región comprendida entre los aminoácidos 181 y 317 de la miofosforilasa (PYGM) y activaba a esta hidrolasa (Arrizabalaga et al. 2012). Este descubrimiento fue muy novedoso ya que fue la primera vez que se relacionaba una pequeña GTPasa de la superfamilia Ras directamente con el catabolismo del glucógeno a través de la PYGM. Esta activación temprana y transitoria del eje Rac1/PYGM resultó ser clave para modular la proliferación y migración de los linfocitos T dependientes de IL-2 (Arrizabalaga et al. 2012; Llaveró et al. 2015; Llaveró et al. 2016). Por ello, cabría esperar que en otros linajes celulares ese eje, Rac1/PYGM, podría también controlar respuestas celulares a un estímulo dado. Por otra parte, la actividad de la GTPasa Rac1 se asocia tanto a una respuesta neuroprotectora propiciada por el receptor 5HT₄ (Maillet et al. 2003), como a una respuesta neurodegenerativa temprana promovida por el péptido $A\beta_{1-42}$ oligomérico (Arrazola Sastre et al. 2020) que afecta tanto a neuronas (Manterola et al. 2013) como a astrocitos (Wyssenbach et al. 2016).

En esta tesis doctoral, hemos intentado relacionar la señalización intracelular gobernada por la GTPasa Rac1 con el metabolismo del glucógeno bajo el control de la PYGM en el contexto de la Enfermedad de Alzheimer. Primero, hemos descrito que, al igual que ocurría en la línea celular de linfocitos T

humana Kit 225 dependientes de IL-2 (Arrizabalaga et al. 2012), los oligómeros de A β ₁₋₄₂ también median la activación temprana y transitoria tanto de Rac1 como de la PYGM en astrocitos humanos inmortalizados.

La glucógeno fosforilasa (PYG) es una familia de hidrolasas constituida por tres miembros, las isoformas de cerebro (PYGB), de hígado (PYGL) y de músculo (PYGM) (Mathieu, Dupret, and Rodrigues-Lima 2019). Diferentes estudios ya revelaron la presencia de estas tres isoformas de la glucógeno fosforilasa en tejido cerebral, y concretamente, en astrocitos de rata (Pfeiffer-Guglielmi et al. 2000; Pfeiffer-Guglielmi et al. 2003). Pfeiffer-Guglielmi y colaboradores, describieron la presencia de ARNm de las tres isoformas (PYGB, PYGL y PYGM) tanto en cultivos primarios como en cerebro embrionario de rata. Sin embargo, la presencia de ARNm no implica traducción a proteína ya que, en este caso, la PYGL no sólo es minoritaria en el estadio embrionario, sino que además no se llegaba a detectar en tejido cerebral adulto (Pfeiffer-Guglielmi et al. 2000). En cambio, otros estudios sí encontraron expresión de la PYGL en astrocitos o en tejido cerebral. Uno y colaboradores mostraron por RT-PCR la expresión de las tres isoformas de la PYG en la línea celular de astrocitoma U251 (Uno et al. 1998) y otros grupos han detectado también la expresión de la PYGL en glioblastoma (Favaro et al. 2012; Abbadi et al. 2014; Zhao et al. 2021). Un estudio reciente, analizando la expresión de las isoformas de la glucógeno fosforilasa de astrocitos primarios de ratón, ha encontrado que la PYGB es la que se expresa mayoritariamente, seguida de la PYGM y por último, de la PYGL, detectándose también la expresión de esta última en el área del córtex frontal (Cai et al. 2020).

Al hilo de estos resultados, cuando nosotros analizamos por RT-PCR la expresión de las isoformas de la PYG en la línea de astrocitos humana, observamos que la isoforma de hígado (PYGL) era la mayoritaria, y las isoformas B y M presentaban ambas bajos niveles de expresión. Estas aparentes discrepancias en los resultados de expresión se pueden explicar, bien por la metodología empleada, mayor sensibilidad alcanzada en estos últimos años, y/o por la fuente de ARNm, dado que se han utilizado diferentes orígenes y cultivos celulares tanto entre los estudios citados como en esta tesis doctoral. Finalmente, es importante señalar que aunque el nivel de expresión

de ARNm detectado varíe según el tipo celular analizado, parece que se mantiene la expresión en linajes celulares del cerebro entre especies de las tres isoformas de la PYG.

En cuanto a su secuencia, las tres isoformas de la PYG presentan una alta homología entre ellas y, por lo tanto, podría ocurrir que Rac1 modulara también la activación de PYGB y/o PYGL, además de la PYGM. Arrizabalaga y colaboradores ya descartaron esa posibilidad, ya que los resultados de la espectrometría de masas eran inequívocos, identificaban a un péptido C terminal exclusivo de la PYGM (Arrizabalaga et al. 2012). Además, hemos comparado las tres isoformas de la glucógeno fosforilasa mediante su alineamiento por ClustalW y hemos deducido que la región de unión entre Rac1 y PYGM es específica de isoforma. La región entre los aminoácidos 191 y 270 de la PYGM, tiene un 79% de homología con las otras dos isoformas, el 21% no homólogo lo constituyen 17 aminoácidos que han servido de base para diseñar y producir el péptido TAT-RBD-PYGM, el cuál ha sido utilizado en este trabajo como herramienta para interferir la señalización entre Rac1 y la glucógeno fosforilasa.

Este eje de señalización Rac1/PYGM parece que juega un papel crucial en el funcionamiento del cerebro. De hecho, Pinacho y colaboradores, postulaban que la *downregulation* de Rac1 y PYGM podría disminuir la transferencia de energía de los astrocitos a las neuronas y ser clave en el desarrollo de la esquizofrenia crónica (Pinacho et al. 2016). En el contexto de la Enfermedad de Alzheimer, hemos apuntado que la señalización temprana iniciada por los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ y que implica al eje Rac1/PYGM, se traduce en la degradación exacerbada de los depósitos de glucógeno. Además, nuestros resultados fueron sorprendentes debido a que nos encontramos primero con que los astrocitos no sólo de origen humano, sino también los de rata y ratón acumulaban grandes cantidades de gránulos de glucógeno en el núcleo celular y, en segundo lugar, que el efecto de los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ era contundente tanto en la degradación como en su recuperación.

A este respecto, al inicio de la década de los años 80 se describió la presencia de glucógeno en el núcleo celular de los astrocitos (Horita et al. 1981; Miyakawa et al. 1982). A pesar de ello, no tuvo mucho seguimiento, quizás

porque los gránulos detectados mediante microscopía electrónica podían confundirse con estructuras relacionadas con la cromatina. A lo largo de esta última década se ha retomado este asunto de los gránulos nucleares de glucógeno y ya se han detectado en otros linajes celulares como en el núcleo de neuronas murinas (Kakhlon et al. 2013), o en tejido humano de célula no pequeña de cáncer de pulmón (Sun et al. 2019).

Por lo que, la cuestión que nos planteamos fue si la maquinaria de degradación de glucógeno se encontraba también en el núcleo celular o se translocaba del citoplasma al núcleo. A este respecto, ya se ha descrito la presencia de la isoforma de cerebro PYGB tanto en el núcleo de células de carcinoma gástrico de la línea celular AGS (Uno et al. 1998) como en el núcleo de células HEK293 (Sun et al. 2019). En esta tesis, nosotros mostramos la PYGM localizada en el núcleo de los astrocitos humanos inmortalizados y observamos que los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ promueven su traslocación primero al citoplasma y posteriormente vuelve al núcleo. Es más, sorprendentemente, la GTPasa Rac1, también se transloca al núcleo tras 30 minutos de tratamiento con $A\beta_{1-42}$ oligomérico, coincidiendo con el estado de máxima actividad de la PYGM y con la máxima degradación del glucógeno nuclear.

La localización de Rac1 en el núcleo ha sido detectada por fluorescencia en fibroblastos 3T3 (Kraynov et al. 2000) y su translocación al núcleo se da mediante su secuencia NLS (Lanning, Ruiz-Velasco, and Williams 2003; Sandrock et al. 2010). Pero no ha sido hasta el año 2020 cuando se ha sugerido que una de las funciones de esta translocación de Rac1 al núcleo celular es la de regular el procesamiento del ARNm (*splicing*). A este respecto, Abdrabou y colaboradores, investigando la respuesta al EGF de las células COS-7, han concluido que este factor de crecimiento favorece la translocación de Rac1 al núcleo para colocalizar con el factor de *splicing* 2 rico en serina y arginina (SRSF2) (Abdrabou and Wang 2021). No obstante, siendo novedosa la colocalización nuclear de la PYGM y la GTPasa Rac1, era algo esperable, dado que ya se han descrito la presencia de otros elementos de la maquinaria del metabolismo del glucógeno en el núcleo, como la glucogenina (Miozzo et al 1996, Baqué et al 1997), la glucógeno sintasa (Granzow, Kopun, and Zimmermann 1981; Ferrer, Baque, and Guinovart 1997; Cid et al. 2005; Vilchez

et al. 2007), la enzima ramificadora de glucógeno (GBE) (Sun et al. 2019) y la enzima desramificadora (GDE) (Cheng et al. 2007).

Es importante señalar que el grado de colocalización de Rac1 y PYGM en astrocitos humanos es mayor a medida que aumenta el tiempo de tratamiento con A β ₁₋₄₂ oligomérico, siendo el más alto tras una hora en presencia del péptido. Sin embargo, eso no se traduce en términos de máxima degradación de glucógeno. Tras una hora de tratamiento, observamos que el glucógeno se acumula en el núcleo, alcanzando valores significativamente superiores a los del control. Con lo que deducimos que la maquinaria de síntesis de glucógeno se encuentra en el núcleo de los astrocitos humanos y, que el A β ₁₋₄₂ oligomérico la activa y modifica tanto la síntesis como la degradación del glucógeno en el núcleo.

En cuanto a la acumulación anormal de glucógeno, resultó paradójico observar que en ausencia de expresión de PYGL y de PYGM se producía un incremento significativo de la acumulación de glucógeno nuclear. Llamó especialmente la atención que la acumulación era tremendamente desproporcionada en ausencia de expresión de la PYGM. Estos resultados van en la línea de los descritos por Müller y colaboradores, cuando detectaron niveles de glucógeno superiores a los basales en cultivos primarios de astrocitos de rata a los que se les había silenciado la PYGM (Muller et al. 2015). El mismo estudio también detectó mayor nivel de glucógeno en células a las que se les había silenciado la PYGB, algo que nosotros no lo hemos observado. Esta diferencia podría explicarse en base a la metodología utilizada para la detección del glucógeno, debido a que nosotros hemos determinado la cantidad de gránulos de glucógeno de forma cualitativa mediante inmunofluorescencia, y además, sólo hemos cuantificado los gránulos nucleares, mientras que en el estudio de Müller y colaboradores, éstos cuantificaron la cantidad de glucógeno total por colorimetría (Muller et al. 2015). Sin embargo, estos autores no determinaron qué ocurría cuando se silenciaba la PYGL de los astrocitos.

A pesar de ser una situación paradójica, la acumulación del glucógeno cuando se silencia la PYGM y/o la PYGL, es una característica propia de las enfermedades de McArdle y de Hers, las cuáles están producidas por mutaciones inactivantes en la PYGM y en la PYGL, respectivamente (Quinlivan

et al. 2010; Labrador and Weinstein 1993; Patterson 2017). En el caso de la Enfermedad de McArdle, la acumulación del glucógeno se da en el músculo esquelético y se traduce en intolerancia al ejercicio (Nielsen et al. 2018; Fiuza-Luces et al. 2018). Y en el caso de la Enfermedad de Hers, la deficiencia de PYGL, va acompañada de una acumulación del glucógeno hepático progresiva asociada a la edad y que se traduce en un incremento del daño hepático (Wilson et al. 2019). Aun así, en ninguna de las dos enfermedades se ha descrito si hay afectación en el sistema nervioso central u otros órganos. Nuestros resultados muestran que cuando se silencia PYGL o PYGM se produce una acumulación exacerbada de glucógeno en astrocitos por lo que podría traducirse esta acumulación anormal de glucógeno en posibles afectaciones neurológicas tanto en la Enfermedad de McArdle como en la Enfermedad de Hers.

Otra patología relacionada con una acumulación anormal de agregados intracelulares de glucógeno insoluble, en este caso independiente de PYG, es la Enfermedad de Lafora, un tipo de epilepsia producida por mutaciones en los genes que codifican a las proteínas laforina (*Epm2a*) y malina (*Epm2b*). En el modelo de ratón malina^{KO} (Valles-Ortega et al. 2011) se ha descrito que la acumulación del glucógeno en los astrocitos conduce a la neurodegeneración (Duran et al. 2021). La acumulación del glucógeno en astrocitos no sólo se ha asociado a la Enfermedad de Lafora, sino que también se ha detectado tanto en el modelo murino de envejecimiento acelerado (ratones SAMP8) y en el modelo murino con mayor síntesis de glucógeno (ratones PTG^{OE}) (Auge et al. 2018). Esto no quiere decir que la ausencia de glucógeno sea tolerada por el cerebro, de hecho, se ha demostrado que en el modelo murino *knockout* de glucógeno sintasa en cerebro (GYS1^{Nestin-KO}), la ausencia de glucógeno en estos ratones está relacionada con deficiencias en el aprendizaje y en la memoria y presentan una mayor susceptibilidad a sufrir epilepsia (Lopez-Ramos et al. 2015; Duran et al. 2013). Por lo tanto, la desregulación en sí del metabolismo del glucógeno conduce a situaciones patológicas diversas.

Volviendo a nuestro estudio, los resultados de esta tesis doctoral indican que los oligómeros de A β ₁₋₄₂ promueven la degradación total del glucógeno

intranuclear a los treinta minutos de tratamiento, mientras que cuando comparamos con 1 hora de tratamiento, los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ disparan los niveles de acumulación de glucógeno, se asemeja a una montaña rusa, para volver a su estado basal a las 6 horas de tratamiento. Esto significa que el péptido $A\beta_{1-42}$ favorece en un período corto de tiempo que los depósitos de glucógeno se degraden totalmente y, a la vez, sea el inicio de la recuperación y acumulación de esos depósitos de forma descontrolada hasta llegar a los valores basales. Sin embargo, analizando los astrocitos en tejido de ratón de 18 meses, hemos verificado que los niveles de depósitos de glucógeno intranucleares se encuentran más elevados en el modelo murino de la EA, el triple transgénico (3xTg-AD) que en los animales control. Estas observaciones sugieren que tanto la degradación como la posterior acumulación de glucógeno intranuclear podría participar en la neurodegeneración que se manifiesta en la EA. Por todo ello sugerimos que una utilización exacerbada del glucógeno en estadios iniciales podría conducir, a largo plazo, a una acumulación anormalmente elevada de este polímero probablemente debido a que los sistemas de degradación no son operativos. En resumen, esta acumulación de glucógeno a largo plazo implicaría un cambio de paradigma en la fuente de carbono que derivaría en cambios irreversibles en las funciones de los astrocitos.

Ante este panorama, quisimos conocer qué relación guardaba la movilización masiva del glucógeno iniciada por los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ y la glicolisis. Sorprendentemente, la degradación casi total del glucógeno intranuclear promovida por el tratamiento agudo con los oligómeros de $A\beta_{1-42}$, no se traducía en cambios en la glicolisis de los astrocitos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros grupos en los que demuestran que el $A\beta_{1-42}$ no media la generación de lactato ni en astrocitos derivados de las células embrionarias NT2 (Tarczyluk et al. 2015) ni en astrocitos primarios de ratón (Byman et al. 2019).

No obstante, debemos recordar que, la EA se caracteriza por su bajo metabolismo glicolítico (Fu and Jhamandas 2014), dado que genes relacionados con la ruta glicolítica, el ciclo de ácidos tricarboxílicos y la fosforilación oxidativa, se encuentran *downregulados* en modelos de ratón

transgénicos de EA y en cerebro de pacientes con la EA (Brooks et al. 2007; Chen et al. 2012). En astrocitos primarios de ratón y rata también hay una menor glicolisis cuando son expuestos durante 24 horas al péptido $A\beta_{1-42}$ (Schubert, Soucek, and Blouw 2009). Por el contrario, en astrocitos primarios de ratón se ha visto un aumento de la glicolisis y de la acumulación de glucógeno tras 48 horas de tratamiento con agregados de $A\beta_{25-35}$ y $A\beta_{1-42}$ (Allaman et al. 2010). Esto podría ser debido a que los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ estarían alterando de forma aguda el metabolismo glicolítico y éste no tendría capacidad a medio-largo plazo de compensar y corregir esas alteraciones metabólicas generadas en la fase aguda. Una vez más, el acúmulo anormalmente elevado de glucógeno nuclear que hemos encontrado en el modelo de 18 meses murino transgénico 3xTg-AD podría traducirse en un descenso de la capacidad glicolítica de los astrocitos, debido a que los mecanismos de degradación del glucógeno se encuentran alterados.

Sin embargo, la evaluación de la glicolisis en astrocitos a los que se les silenció individualmente las isoformas de la PYG (B, L y M), mostraron que la fosforilación oxidativa en este linaje celular estaba controlada por la isoforma de hígado (L) mientras que la generación de lactato por la isoforma muscular (M). Es decir, la glicolisis es un proceso controlado por la PYGM en astrocitos humanos inmortalizados que no se ve estimulada por medio del $A\beta_{1-42}$ oligomérico. Por lo tanto, nosotros postulamos que la liberación masiva de monómeros de glucosa-1-fosfato, resultado de la degradación de los depósitos de glucógeno, no está siendo destinada para la glicolisis y que debe de haber otra ruta no energética para dar salida al aumento anormal de concentración de glucosa-1-fosfato. Esta ruta podría implicar la modificación de la función biológica del astrocito y, como consecuencia, de la neurona en el contexto de la EA.

Entonces, conocer hacia dónde se dirige la glucosa-1-fosfato generada por el glucógeno degradado y qué consecuencia tiene en la respuesta de los astrocitos a los oligómeros de $A\beta_{1-42}$, parece importante en el contexto de la EA. Está bien establecida la relación entre la movilización del glucógeno y la activación de la ruta de las hexosaminas cuando se produce un pico agudo de nutrientes o bien un exceso de ellos en períodos cortos de tiempo. La ruta de

las hexosaminas, como ya se ha explicado en la Introducción, consiste en una serie de reacciones químicas que transforma azúcares simples como puede ser la glucosa-1-P a hexosamina-uridina-difosfato N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) (Zachara and Hart 2004; Bond and Hanover 2015; Yuzwa and Vocadlo 2014). El UDP-GlcNAc sirve de sustrato a la OGT para que este enzima transfiera grupos GlcNAc a determinadas proteínas y genere modificaciones postraduccionales de proteínas por O-GlcNAcilación en serina y treonina (Hart, Housley, and Slawson 2007). De hecho, la privación de glucosa en células tumorales incrementa el nivel de O-GlcNAcilaciones (Taylor et al. 2008; Cheung and Hart 2008), siendo estas PTMs controladas por la degradación del glucógeno intracelular (Kang et al. 2009).

En este sentido, nuestros resultados han revelado que los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ en astrocitos humanos inmortalizados, promueven el aumento de O-GlcNAcilaciones de proteínas. Esto coincide con el estudio de Forster y col. donde relacionan un patrón de O-GlcNAcilaciones de proteínas alterado en cerebros de pacientes con Enfermedad de Alzheimer. De hecho, encuentran un aumento de O-GlcNAcilaciones en proteínas de 25, 50-60 kDa, pero no en proteínas de mayor peso molecular (Forster et al. 2014). Nosotros también detectamos que los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ aumentan en astrocitos las O-GlcNAcilaciones de proteínas de entre 30 y 60 kDa y de alrededor de 180-200kDa. Quizás, esta diferencia de O-GlcNAcilaciones de proteínas de alto peso molecular podría explicarse en que nosotros hemos analizado el patrón de O-GlcNAcilaciones en una línea de astrocitos humanos inmortalizada y, en cambio, Forster y colaboradores lo hacen a partir de homogenizado de cerebro. En cualquier caso, estas modificaciones postraduccionales por O-GlcNAcilación de proteínas mediadas por los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ pueden modificar la función de las proteínas afectadas, alterando la homeostasis celular y promoviendo el desarrollo de la EA. Un ejemplo conocido es el de la O-GlcNAcilación de c-fos mediada por los oligómeros de $A\beta_{1-42}$, la cual promueve la muerte neuronal (Choi, Kim, Song, et al. 2019).

Todo ello, nos permite apuntar a que la degradación masiva del glucógeno intranuclear debida a la activación del eje de señalización Rac1/PYGM y mediada por los oligómeros de $A\beta_{1-42}$, está generando un aumento de las O-

GlcNAcilaciones de proteínas. Esto justificaría que los oligómeros de A β ₁₋₄₂ no modularan la glicolisis aunque sí la degradación del glucógeno mediante dicho eje de señalización para proporcionar el substrato que la enzima OGT necesita para transferir y O-GlcNAcilar determinadas proteínas.

En este sentido, y con respecto a la acumulación de glucógeno nuclear, recientemente, Sun y colaboradores, estudiando su papel en célula pequeña de cáncer de pulmón (NSCL) han descubierto que en condiciones biológicas la glucogenolisis nuclear genera piruvato como recurso para regular cambios epigenéticos por acetilación. Lo que ocurre en las células NSCL es que éstas bloquean la glucogenolisis nuclear por lo que se acumula el glucógeno en el núcleo y no se producen los cambios epigenéticos pertinentes por lo que potencian la tumorigenicidad (Sun et al. 2019). En el caso de los astrocitos *in vitro*, la situación biológica es diferente ya que en condiciones normales se observa una importante acumulación de glucógeno nuclear, tanto en la línea de astrocitos humanos inmortalizados como en astrocitos de rata o ratón, incluso en tejido control. Por lo que la acumulación de glucógeno nuclear tiene un efecto negativo caso de las células NSCL, mientras que la acumulación de glucógeno nuclear en los astrocitos tiene un efecto fisiológico positivo. Ahora bien, la movilización del glucógeno inducida por los oligómeros de A β ₁₋₄₂ (degradación rápida y masiva, síntesis exacerbada y vuelta a la normalidad progresivamente) es lo que podría alterar la funcionalidad del astrocito. Además, cuando analizamos los astrocitos en tejido de animales control y transgénicos 3xTg-AD de 18 meses, observamos lo mismo que describe Sun y col. en NSCL, en los astrocitos hay una mayor acumulación de gránulos de glucógeno en el núcleo de los 3xTg-AD de 18 meses comparado a los animales control. Quizás, en este caso, tampoco se producen los cambios epigenéticos necesarios para el mantenimiento de la homeostasis astrocitaria y, como consecuencia, se deriva hacia el proceso neurodegenerativo.

Investigando sobre el papel del eje Rac1/PYGM/O-GlcNAcilaciones en las respuestas de los astrocitos que conllevan a la neurodegeneración, Wyssenbach y col. ya describieron que la GTPasa Rac1 controlaba la generación de ROS en astrocitos murinos (Wyssenbach et al. 2016). El aumento de ROS en astrocitos ha sido ampliamente descrito en el contexto de

la Enfermedad de Alzheimer. Concretamente, el aumento de ROS en los astrocitos provoca a las neuronas: daños en el ADN, en la membrana de la mitocondria, incremento de la producción del péptido A β (Moreira, Santos, and Oliveira 2007) y neurotoxicidad mediada por la glía en la Enfermedad de Alzheimer (Angelova and Abramov 2014).

Dada la relación potencial que los oligómeros de A β ₁₋₄₂ estarían estableciendo entre la actividad de PYGM y el aumento de O-GlcNAcilaciones de proteínas, nosotros hipotetizamos que el mismo mecanismo podría estar detrás de la generación de ROS. Nuestros resultados apuntan a que los oligómeros de A β ₁₋₄₂ promueven la generación de ROS a través del eje Rac1/PYGM. Teniendo en cuenta que Rac1 regula la generación de ROS a través de la activación de la enzima NOX2 (Wyssenbach et al. 2016), podría ocurrir que la degradación de glucógeno fuera también necesaria para la actividad de esta enzima. De hecho, estudiando como afecta la hiperglicemia a las células cardíacas, diferentes autores han mostrado que la O-GlcNAcilación de CamKII conduce a la activación de la enzima NOX2 para seguidamente generar ROS (Backs 2020; Hegyi et al. 2020). En el caso que nos ocupa, bien podría ocurrir que el aumento de O-GlcNAcilaciones promovido por el tratamiento de A β ₁₋₄₂ oligomérico estuviese afectando a otras proteínas reguladoras aguas arriba de la enzima NOX2.

Al investigar la implicación de las O-GlcNAcilaciones con la generación de ROS, hemos observado que la inhibición farmacológica de la OGA con Thiamet-G (Yuzwa et al. 2008) bloqueaba la generación de ROS. Mientras que cuando se inhibía la actividad de la OGT con OSMI-1 (Ortiz-Meoz et al. 2015), es decir las O-GlcNAcilaciones, esta inhibición farmacológica conducía a un aumento de ROS. Esto parece una contradicción entre los resultados obtenidos y los esperados en los que los oligómeros de A β ₁₋₄₂ favorecerían la generación de ROS en astrocitos por acción de la actividad de la OGT más que por la de la OGA. La explicación que proponemos es que en realidad existe un equilibrio basal entre las O-GlcNAcilaciones y las des-O-GlcNAcilaciones que puede afectar a un amplio espectro de proteínas. De tal manera, que cuando se hace un pretratamiento con los inhibidores, éstos pueden actuar sobre O-GlcNAcilaciones estructurales, de tal manera que cuando se inhibe la OGA, la

OGT, O-GlcNacila los residuos que la OGA des-O-GlcNacila, o viceversa, y de esa forma cuando le llega el mensaje procedente de los oligómeros de $A\beta_{1-42}$, éste no se transduce de la misma manera.

Otra explicación plausible viene dada por la investigación de Levine y col., en la que recientemente han descrito que la enzima OGT tiene doble función: por un lado, O-GlcNacila proteínas en residuos de serina y treonina y por otro lado, posee una función no catalítica que se ha relacionado con la proliferación celular. La acción del inhibidor OSMI-1 sobre la OGT sólo se daría en la función de O-GlcNacilación, y cuando esto ocurre, se produce automáticamente una up-regulación de OGT (Levine et al. 2021). Por lo que el inhibidor de la OGT potenciaría esta segunda función de la OGT y podría justificar ese aumento de los niveles de ROS en células no tratadas con $A\beta_{1-42}$ oligomérico. En este contexto, sería necesario el estudio de la generación de ROS en astrocitos a los que previamente se les ha silenciado la OGT.

Todo lo anteriormente discutido era consecuencia de una respuesta temprana del astrocito al efecto de los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ y resultaba que todo ello estaba controlado por la ruta de señalización Rac1/PYGM/O-GlcNacilaciones. La cuestión que surgió posteriormente fue si esta respuesta tenía repercusión a largo plazo en la biología de los astrocitos. En efecto, está bien establecido que la GTPasa Rac1 se relaciona con la astrogliosis mediada por los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ (Wyssenbach et al. 2016), con la astrogliosis inducida tras lesión en el sistema nervioso central (Ishii et al. 2017) y en la gliosis de la glía de Müller tras la lesión de la retina (Nomura-Komoike, Saitoh, and Fujieda 2020). Además, la desregulación del patrón de O-GlcNacilaciones ha sido ampliamente estudiada en el cerebro de pacientes con la Enfermedad de Alzheimer (Alfaro et al. 2012; Forster et al. 2014; Wang et al. 2017). Por lo que, la activación temprana de la PYGM y el posterior cambio del patrón de O-GlcNacilaciones de proteínas podrían indicar el camino que conduce a la astrogliosis.

En efecto, nuestros resultados van en esta dirección: determinamos que la sobreexpresión de GFAP y el aumento del área ocupada por los astrocitos, dos marcadores que se utilizan para evaluar la astrogliosis mediada por oligómeros de $A\beta_{1-42}$, dependían de la PYGM y del aumento de O-GlcNacilaciones. En esta misma línea, recientemente, se ha relacionado el aumento de expresión de

GFAP con un aumento de O-GlcNAcilación en células de retina (Liu et al. 2021), por lo que representa un hallazgo con el que nuestros resultados concuerdan. Lo que nos llamó la atención con el uso de inhibidores farmacológicos de la OGT fue que la combinación de Thiamet-G con oligómeros de A β ₁₋₄₂ fuera letal para los astrocitos.

Una vez puesto de manifiesto que las proteínas sufrían PTMs por O-GlcNAcilación debido a la acción de los oligómeros de A β ₁₋₄₂, conseguimos identificar por espectrometría de masas (MS), ciento cincuenta y cinco proteínas que se O-GlcNAcaban tras 30 minutos de tratamiento con oligómeros de A β ₁₋₄₂, coincidiendo con la máxima degradación del glucógeno intranuclear. Entre las proteínas con un cambio en su nivel de O-GlcNAcilación se encontraban las proteínas SNARE: VAMP 2 y VAMP3 y las GTPasas Arf1 y Arf3, todas ellas relacionadas con el transporte vesicular (Ropert, Jalil, and Li 2016; Sztul et al. 2019), las siguientes isoformas de actina: ACTA1, ACTC1, ACTG2, ACTA2, implicadas en la remodelación del citoesqueleto (Perrin and Ervasti 2010; Dominguez and Holmes 2011), y finalmente, el receptor LPAR1, el cuál está implicado en la transmisión de la señalización celular mediada por el ácido lisofosfatídico (Fukushima and Chun 2001; Choi and Chun 2013; Yung, Stoddard, and Chun 2014). Todas estas proteínas podrían participar en la fisiopatología de la EA modificando la biología de los astrocitos.

Primeramente, debemos de puntualizar que la detección de péptidos O-GlcNAcificados por MS ha identificado secuencias que se encuentran en varias isoformas de un grupo de proteínas (Tabla 1, apartado de Resultados). Es decir, en el caso de VAMP2 y VAMP3, el péptido identificado es el mismo para ambas, sólo que por la situación de la secuencia, los residuos susceptibles de O-GlcNAcarse son la S58 y la T62, y la S77 y la T81, respectivamente. En el caso de Arf-1 y Arf-3 tanto el péptido identificado como la posición coinciden, siendo la T140 en ambos casos el residuo susceptible de ser O-GlcNAcificado. En el caso de las actinas, ocurre lo mismo: el residuo S35 se encuentra en ACTA1, ACTC1 y ACTA2. Sin embargo, en ACTG2 también está, sólo que en la posición 34. Las cuatro también comparten el residuo T148. El resto de residuos comunes se encuentran entre las isoformas ACTA1, ACTC1 y ACTA2, siendo: T79, T320, S325 y T326. Por último, el residuo T91 se encuentra tanto

en ACTC1 como en ACTA1. En cuanto al LPAR1, el péptido identificado es específico sólo para esta isoforma y no para el resto de isoformas de LPAR que existen (LPAR2-6). Todo ello conduce a que en un futuro próximo comprobemos la expresión de las isoformas anteriormente citadas, con el fin de asegurar que todas las proteínas listadas se encuentran expresadas en la línea de astrocitos humana inmortalizada.

En el caso de VAMP2 y VAMP3, se ha comprobado que en astrocitos corticales de ratón sólo se expresa la proteína VAMP3, mientras que ambas proteínas están expresadas en neuronas (Li et al. 2015; Ropert, Jalil, and Li 2016). Por lo que extrapolando, podría ser que el péptido identificado en el MS fuera VAMP3. Aun así, si seguimos el razonamiento dado en la discusión de la expresión de las isoformas de la PYG, no deberíamos descartar la expresión de VAMP2 en la línea de astrocitos humanos inmortalizados. Tanto si la O-GlcNAcilación se encuentra en VAMP3 exclusivamente o en ambas, VAMP2 y VAMP3, podríamos relacionar esta PTM con el ciclo glutamina/glutamato que se lleva a cabo entre los astrocitos y las neuronas. Una de las múltiples funciones que tienen los astrocitos es la de recoger el glutamato liberado durante la sinapsis y utilizarlo de sustrato para la síntesis de glutamina y transportar esta glutamina sintetizada *de novo* a las neuronas (Markiewicz and Lukomska 2006; Sofroniew and Vinters 2010). En la EA, se ha relacionado la desregulación del metabolismo de la glucosa con la alteración del ciclo de glutamato/glutamina, afectando de forma negativa a la sinapsis de las neuronas y, por lo tanto, al aprendizaje y a la memoria (Findley et al. 2019). VAMP2 y VAMP3 son dos proteínas que forman parte del complejo SNARE y que están involucradas tanto en el transporte del receptor de glutamato GLT-1 (Ropert, Jalil, and Li 2016) como en el proceso de formación de vesículas transportadoras de glutamato (Mahmoud et al. 2019). Por lo que, la O-GlcNAcilación en VAMP2 y VAMP3 podría modular negativamente la función de ambas proteínas y afectar al ciclo glutamato/glutamina en los astrocitos.

Con respecto a las pequeñas GTPasas Arf, ambas se encuentran expresadas en astrocitos, por lo que ambas podrían ser susceptibles de O-GlcNAcilación (Nakagawa and Schwartz 2004). En su forma inactiva, las GTPasas Arf se encuentran en el citosol, mientras que cuando son activadas pasan a ser

localizadas en el aparato de Golgi. Se conoce que participan en el control del tráfico de APP en células HEK293 y HeLa, y en la secreción de especies de A β en células de neuroblastoma de ratón N2A y APP695 (Arrazola Sastre et al. 2021). Recientemente, se ha puesto en evidencia que los astrocitos podrían estar involucrados en la síntesis de especies de A β , debido a que, en su estado reactivo, expresan niveles suficientes de BACE1, APP y γ -secretasa (Frost and Li 2017). Por lo que la O-GlcNAcilación de Arf-1 y Arf-3 podría afectar de forma global al transporte de proteínas a nivel del aparato de Golgi y específicamente a la síntesis de especies de A β en los astrocitos.

Por último, las actinas isoformas musculares esqueléticas α 1 (ACTA1) y α 2 (ACTA2), la isoforma muscular cardíaca α 1 (ACTC1) y la isoforma muscular lisa α 2 (ACTG2), participan de diferente forma en la modulación del citoesqueleto de actina, puestas de manifiesto en los modelos de ratón *knockout* para estas isoformas ya que presentan diferentes fenotipos relacionados con la debilidad muscular y la desorganización de las fibrillas musculares (Perrin and Ervasti 2010). Sin embargo, en cultivos primarios de astrocitos de ratón o rata sólo se ha detectado ACTA2 (Lecain et al. 1991; Abd-El-Basset 2000; Moreels et al. 2008) y en el caso de ACTC1 se ha detectado en homogeneizado de cerebro humano (Ohtaki et al. 2017). ACTA2 también ha sido detectada en astrocitos reactivos de pacientes con esclerosis múltiple (Moreels et al. 2008). Por lo que podría ocurrir que los péptidos identificados pertenecieran sólo a estas dos isoformas de las actinas. De la misma forma que hemos comentado para las proteínas VAMP, no descartamos que ACTA1 y ACTG2 pudieran estar expresadas en la línea de astrocitos humanos inmortalizada. Por lo que sería necesario medir la expresión de todas las isoformas de actina susceptibles de ser O-GlcNAciladas.

La O-GlcNAcilación de las distintas isoformas de actina podría traducirse en desajustes en su polimerización/despolimerización, y por lo tanto, a una reorganización anormal del citoesqueleto de actina de los astrocitos. La desregulación de la expresión de las distintas isoformas de actina ha sido ampliamente estudiada en cáncer, y se asocia a un aumento en la migración y proliferación de las células tumorales (Suresh and Diaz 2021). Por ejemplo, ACTC1, se ha propuesto como un marcador de invasión en glioblastoma,

encontrándose una mayor expresión en aquellos pacientes con peor ratio de supervivencia (Ohtaki et al. 2017). En líneas celulares de carcinoma hepatocelular se ha visto que la expresión de ACTG2 está asociada a un aumento de la capacidad de migración y de invasión (Wu et al. 2017). Y no sólo se ha visto que las actinas están implicadas en el aumento de migración en cáncer, sino que, por ejemplo, Moreels y colaboradores, han sugerido que la presencia de ACTA2 en astrocitos de tejido de pacientes con esclerosis múltiple podría estar asociada con un incremento de la migración y de la movilidad de estas células durante la gliosis reactiva (Moreels et al 2008). Finalmente, la hipertrofia muscular está mediada por la activación de ITGβ1, la cuál señala hacia la actividad del promotor de ACTA1 mediante la activación de RhoA (Carson and Wei 2000). Por lo tanto, la O-GlcNAcilación de las actinas podría afectar a la capacidad migratoria, a la proliferación y a la morfología celular. Estas respuestas se relacionarían con la astrogliosis reactiva, donde el astrocito, en respuesta a una señal o lesión en el sistema nervioso central, se hipertrofia, prolifera y pierde su control sobre el medio celular que le rodea (Sofroniew 2014).

En su conjunto, estas proteínas plantean un escenario muy interesante donde el aumento de O-GlcNAcilaciones mediado por el eje Aβ₁₋₄₂/ITGβ1/Rac1/PYGM afectaría a diversas respuestas que en, su conjunto, conducirían a una disfunción astrocitaria en la EA (**Figura 1**). Este conjunto de observaciones y postulados abren nuevos enfoques a investigar para llegar a una comprensión mecánica más exhaustiva de la EA.

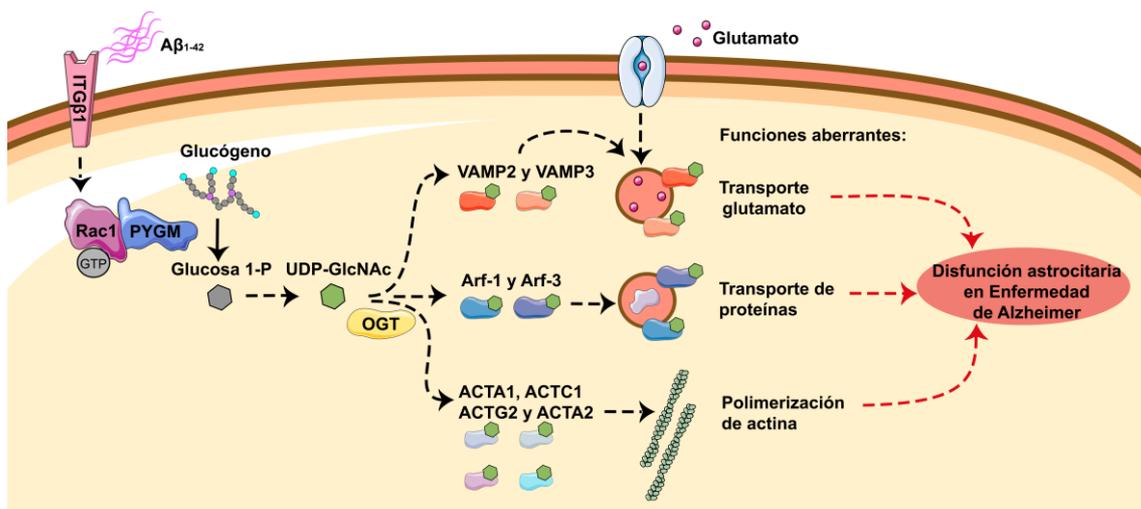


Figura 1. La señalización mediada por el eje oligómeros de $A\beta_{1-42}$ /Rac1/PYGM promueve la disfunción astrocitaria a través de la O-GlcNAcilación de proteínas. El tratamiento de 30 minutos con oligómeros de $A\beta_{1-42}$ promueve una marcada glucogenólisis nuclear a través de la activación del eje Rac1/PYGM. El glucógeno es transformado en glucosa la cual deriva en UDP-GlcNAc. El UDP-GlcNAc es utilizado como sustrato por la OGT para O-GlcNAcilar las siguientes proteínas: las GTPasas Arf-1 y Arf-3, las proteínas SNARE VAMP2 y VAMP3, y las actinas ACTA1, ACTC1, ACTG2 y ACTA2. La O-GlcNAcilación de estas proteínas alteraría sus funciones en el transporte de glutamato, transporte de proteínas y polimerización de actina, llevando a una posible disfunción astrocitaria en la EA.

El receptor del ácido lisofosfatídico tipo 1 (LPAR1), junto al resto de miembros de su familia (LPAR2-6), modula las respuestas celulares iniciadas por el ácido lisofosfatídico (LPA) a través de diferentes rutas de señalización controladas por proteínas G heterotriméricas (Yung, Stoddard, and Chun 2014). Concretamente, algunas respuestas biológicas controladas por LPAR1 están relacionadas con: supervivencia, proliferación, adhesión, migración, cambios en el citoesqueleto, movilización del calcio, función inmune, mielinización e inhibición de la adenil ciclasa (Kihara, Mizuno, and Chun 2015; Yung, Stoddard, and Chun 2014). Debido a este amplio abanico de respuestas, y a que era la única isoforma de la familia identificada en el MS, el LPAR1 fue la proteína que decidimos investigar sobre el efecto de su O-GlcNAcilación modulada por los oligómeros de $A\beta_{1-42}$. De hecho, LPAR1 está relacionado con la isoforma de actina ACTA2, debido a que, en el contexto de fibrosis, promueve su sobreexpresión a través de la producción de TGF- β 1 (Olianas, Dedoni, and Onali 2020).

Funciones aberrantes de la familia de receptores LPAR (LPAR1-6) se han relacionado con distintos desórdenes neurológicos, entre ellos, la EA, la esquizofrenia, el dolor neuropático o el cáncer (Yung et al. 2015; Xiang et al. 2020; Yang et al. 2015). Y aunque las funciones biológicas controladas por el eje LPA/LPAR1 son muy amplias, a día de hoy no hay constancia de una O-GlcNAcilación del LPAR1 y ni mucho menos del papel que puedan jugar la O-GlcNAcilación de las treoninas 43 y 47 del LPAR1 tras el tratamiento con $A\beta_{1-42}$ en la biología de los astrocitos.

Nuestros resultados apuntan a que los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ median la astrogliosis a través del LPAR1, concretamente vía la O-GlcNAcilación de las

treoninas 43 y 47. Uno de los ejes de señalización gobernados por el tándem LPA/LPAR1 está relacionado con la regulación de la transcripción génica, detectándose LPAR1 incluso en el núcleo en zonas de alta actividad transcripcional (Waters et al. 2006) y siendo señalado como modulador de la transcripción génica de diferentes genes en el contexto de cáncer (Valdes-Rives et al. 2021; Xu et al. 2019). A este respecto, podríamos relacionar la modulación de la expresión de GFAP con el LPAR1. Concretamente, estudios realizados en ratones con estrés crónico y tratados con antidepresivos cloripramina y mianserina han mostrado mayores niveles de GFAP que sus respectivos controles (Sillaber et al. 2008; Liu, Li, et al. 2009). Y por otro lado, se ha demostrado que las respuestas celulares a estos mismos antidepresivos están controladas por LPAR1 (Olianas, Dedoni, and Onali 2016, 2020). Por lo tanto, la bibliografía sugiere una posible regulación de la expresión de GFAP vía LPAR1. De hecho, el tratamiento con LPA ha aumentado de forma significativa los niveles de GFAP, aunque no de forma tan drástica a cómo lo ha hecho el péptido $A\beta_{1-42}$. Cuando silenciamos la expresión de LPAR1 no se produce sobreexpresión de GFAP promovida por los oligómeros de $A\beta_{1-42}$. Por lo que, hipotetizamos que las respuestas al LPA por parte de los astrocitos están reguladas por LPAR1. Y, además no descartamos que module la expresión de otros marcadores de astrogliosis

Por otra parte, el aumento del área que ocupan los astrocitos, otra de las características de la astrogliosis, no se ve afectada con el tratamiento con LPA. Pero, sí se modifica en presencia de los oligómeros de $A\beta_{1-42}$, estando relacionado directamente la O-GlcNAcilación de LPAR1. Cambios en la ocupación del espacio intercelular implican cambios morfológicos en lo que las GTPasas de la familia Rho y concretamente RhoA y Rac 1, tienen mucho que decir.

Estas dos GTPasas modulan cambios en el citoesqueleto de actina, y concretamente, el fenómeno de *stellation*, un cambio fenotípico en astrocitos *in vitro* que los convierte en más ramificados (Schiweck, Eickholt, and Murk 2018; Salinero et al. 1997) y que es inducido por el tratamiento a largo plazo con $A\beta_{25-35}$ (Salinero et al. 1997). A este respecto, se ha confirmado que las pequeñas GTPasas de la familia Rho participan activamente en este

fenómeno, de tal manera que la activación de Rac1 induce *stellation* mientras que la activación de RhoA la inhibe, manteniendo a los astrocitos en su forma poligonal (Zeug et al. 2018).

Es preciso resaltar que, el LPA cuando activa el LPAR1, la señalización intracelular dependiente del receptor modula la actividad tanto de RhoA como de Rac1 (Yung, Stoddard, and Chun 2014). Sin embargo, la actividad de Rac1 en este caso no parece que controle la remodelación del citoesqueleto de actina para favorecer el aumento del área que ocupan los astrocitos, de hecho ésta no se ve modificada. Esto no contradice al papel de Rac1 y RhoA en la activación e inhibición de la *stellation*, respectivamente, descrito en la bibliografía (Ramakers and Moolenaar 1998; Racchetti, D'Alessandro, and Meldolesi 2012). Nosotros postulamos que hay diferentes *pools* de Rac1 y, en función de quién los active, se genera una respuesta u otra. Así, cuando los oligómeros de A β ₁₋₄₂ activan a Rac1 por medio de la ITG β 1, esta activación conduce a su vez a la activación de PYGM, promoviendo la O-GlcNAcilación del LPAR1. En esta configuración, la señalización de este receptor se magnifica y el astrocito se encuentra ante una participación de Rac1 aguas arriba del LPAR1.

La combinación de LPA y oligómeros de A β ₁₋₄₂ o la administración primero de LPA y posteriormente del A β ₁₋₄₂ oligomérico, no alteraba ni las respuestas tardías: expresión de GFAP, aumento del área celular ocupada, migración; ni las respuestas tempranas: cinética de degradación y recuperación del glucógeno nuclear o generación de ROS. Esto significaría que en estas circunstancias los oligómeros de A β ₁₋₄₂ no tendrían opción de implicar a LPAR1 O-GlcNAcilado en sus mecanismos de señalización. Sin embargo, este efecto se perdía cuando el pretratamiento se realizaba de forma contraria: primero se trataban las monocapas con A β ₁₋₄₂ oligomérico y posteriormente con LPA. El A β ₁₋₄₂ oligomérico ya había activado de manera irreversible su programa tóxico y el LPA no era capaz de detenerlo. Quizás, entre otras cosas, porque el A β ₁₋₄₂ oligomérico *downregula* al LPAR1 y cuando llega el LPA no tiene dónde interaccionar.

Todos estos hallazgos nos permiten hipotetizar que los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ desestabilizan el LPAR1. Esto se podría deber a un desequilibrio entre la presencia de LPA y los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ en el medio extracelular. Esta descompensación, entendiéndose como una disminución de la concentración de LPA y un aumento o el mantenimiento de la concentración de oligómeros de $A\beta_{1-42}$, conduciría a la alteración de la homeostasis celular. Y su significado estaría relacionado con una función anormal de los astrocitos como se produce en la EA.

La administración de LPA para restablecer el equilibrio entre ambos agonistas podría ser clave para la recuperación de la función de los astrocitos y como consecuencia de la homeostasis celular. A este respecto y en el contexto de la EA, distintos estudios realizados con gintonina (Kim et al. 2018) *in vivo* han mostrado que la administración de este compuesto bloquea la generación de ROS y la sobreexpresión de GFAP en ratones a los que previamente se les indujo EA por inyección de $A\beta_{1-42}$ oligomérico (Ikram et al. 2021) y rescata la función cognitiva tanto en los modelos animales (Hwang et al. 2012) como en pacientes con la EA (Kim et al. 2018). La gintonina es un compuesto derivado del ginseng que contiene las distintas formas de LPA (C16:0, C18:1 y C18:2 (Kim et al. 2018)), siendo el C18:1 la forma de LPA utilizada en investigación (Yung, Stoddard, and Chun 2014) y la que hemos empleado en esta tesis doctoral. Desde un punto de vista molecular, la gintonina parece que facilita la ruta no amidoilogenica en la línea celular de neuroblastoma SH-SY-5Y, aumenta la liberación de acetilcolina y la expresión de la acetilcolina transferasa en células progenitoras neurales e inhibe la activación de la microglia.

En resumen, los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ podrían estar promoviendo en primer lugar una internalización del LPAR1 a través de la ITG β 1 que sería necesaria para que el eje Rac1/PYGM actuara sobre la de O-GlcNAcilación de LPAR1. En este escenario la presencia de agonista LPA, no tendría ningún efecto porque no encontraría receptor al que unirse. Nuestro postulado apunta a que el $A\beta_{1-42}$ oligomérico estaría regulando la O-GlcNAcilación del LPAR1 mediante un fenómeno biológico denominado transactivación de receptores (Figura 2).

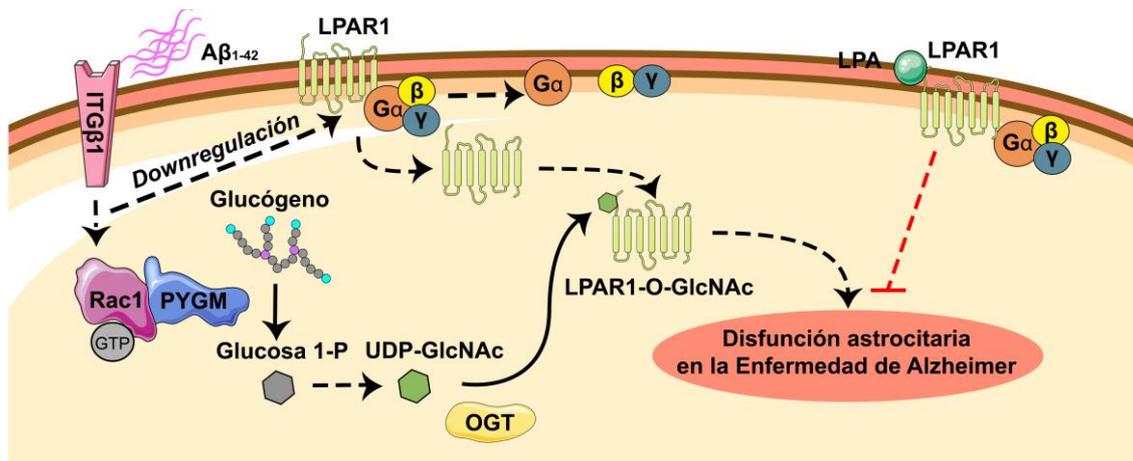


Figura 2. La sobreexpresión de GFAP y el aumento del área celular mediada por los oligómeros de Aβ₁₋₄₂ es promovida por la O-GlcNAcación del LPAR1. El tratamiento con Aβ₁₋₄₂ oligomérico en la línea de astrocitos humanos inmortalizados induce a la activación del eje Rac1/PYGM a través de su interacción con la ITGB1, y su vez, a la ITGB1 desensibilizaría a LPAR1. Las subunidades Gα, β y γ de LPAR1 se disocian para posteriormente ser endocitado. Una vez está en el interior de la célula, LPAR1 es O-GlcNAcilar por la OGT en las T43 y T47 a partir del UDP-GlcNAc generado a través de la glucogenolisis nuclear mediada por la PYGM. La O-GlcNAcación de LPAR1 conduce a la disfunción astrocitaria observada en la EA mientras que el eje LPA/LPAR1 protege a los astrocitos del efecto del péptido Aβ₁₋₄₂.

Este tipo de modulación de la actividad receptoral sin necesidad de ligando se ha descrito anteriormente por Daub y colaboradores. Concretamente, el Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR), un tipo de receptor tirosina quinasa, es transactivado por las subunidades G_i y G₀ de GPCRs. Como resultado, la ruta de las MAPK se activa y posteriormente, las respuestas mitogénicas por parte de las células (Daub et al. 1996; Daub et al. 1997). Curiosamente, EGFR es también susceptible de O-GlcNAcilarse en los aminoácidos: T654, S1046 y S1047 (Stateva and Villalobo 2015). Lo interesante de esto es que el residuo T654 se fosforila por la PKC, y esta fosforilación impide la unión del receptor a la calmodulina (Martin-Nieto and Villalobo 1998), bloqueando así la internalización del EGFR (Sanchez-Gonzalez, Jellali, and Villalobo 2010). Por lo que, la O-GlcNAcación de este receptor podría no sólo modular el destino del EGFR y sino también su función.

Por lo tanto, la O-GlcNAcación puede favorecer la participación de otras rutas de señalización emanadas de los mismos receptores que tienen como

consecuencia una respuesta biológica completamente opuesta a la que resulta del agonista o agonistas fisiológicos. En este sentido, y como muestra la Figura 2, la interacción entre LPA y LPAR1 no resulta en la O-GlcNAcilación de éste último, y entre otras cosas, impediría la disfunción astrocitaria observada en la EA. Sin embargo, cuando LPAR1 se transactiva por la O-GlcNAcilación en los residuos T43 y T47 mediada por la acción del A β ₁₋₄₂ oligomérico, los astrocitos manifiestan la respuesta contraria: un aumento de marcadores de astrogliosis y por ende, una disfunción astrocitaria. De esta forma, dependiendo de la PTM que reciba el LPAR1, los astrocitos responderán de una forma u otra.

En este sentido y volviendo hacia la vertiente protectora que ejerce el LPA, comparado con los oligómeros A β ₁₋₄₂, es interesante observar que, en la glucogenolisis nuclear, el tratamiento con LPA tanto en la línea de astrocitos humanos inmortalizada como en los astrocitos primarios de rata, se producía una fuerte degradación de los gránulos de glucógeno incluido los nucleares. Esta degradación concuerda con lo descrito por Choi y colaboradores en la que demostraron que la glucogenolisis inducida por gintonina en astrocitos corticales de ratón llegaba a su valor máximo a los 30 minutos de tratamiento y no se recuperaba hasta las 2 horas (Choi, Kim, Cho, et al. 2019).

Hay que tener en cuenta que estos autores relacionan la glucogenolisis mediada por el LPA con el aumento de la producción de ATP y de la captación de glutamato reduciendo la toxicidad ejercida por el glutamato en las sinapsis y mejorando así la supervivencia de las neuronas (Choi, Kim, Song, et al. 2019). Esto sugiere que la degradación del glucógeno en general, y la nuclear en particular, observada en astrocitos tratados con LPA podría funcionar como un mecanismo de protección para los astrocitos, mientras que los oligómeros de A β ₁₋₄₂ tendrían un efecto contrario. De hecho, LPA podría actuar sobre la glucogenolisis nuclear con el fin de generar ATP y los oligómeros de A β ₁₋₄₂ activarían la glucogenolisis con el fin de generar el sustrato (UDP-GlcNAc) para promover la O-GlcNAcilación de proteínas incluida el LPA. Esta interpretación está avalada por los resultados obtenidos en los análisis del metabolismo de los astrocitos, los cuáles muestran de manera incontestable que los oligómeros de A β ₁₋₄₂ no activan la glicolisis para generar energía a pesar de que provocan claramente la degradación de los depósitos de glucógeno.

En cuanto a la relación entre el LPA y la generación de ROS, nuestros resultados indican que el LPA no mediaba en su aumento por lo menos tras 30 minutos de exposición tanto en astrocitos humanos inmortalizados como en astrocitos murinos. En otras líneas celulares, PC-3 y progenitores de adipocitos (ASC), se ha descrito que el LPA conduce a la generación de ROS a través de los receptores LPAR1/3 (Lin et al. 2013; Kang et al. 2015). Hay que tener en cuenta que la estimulación de las células PC-3 con LPA, sólo produjo un aumento significativo de las ROS a los 10 minutos, volviendo a valores basales a partir de los 20 minutos (Lin et al. 2013), mientras que los niveles de ROS en las células ASC sólo fueron medidos a los 20 minutos de tratamiento (Kang et al. 2015). Además, debemos de incidir que se tratan de modelos celulares distintos al nuestro. Pero, en cualquier caso, incluso si el LPA media la generación de ROS, ésta parece que está controlada debido a que regresa a los niveles basales y podría ser que a tiempos cortos en astrocitos ocurriera lo mismo, aumento rápido de ROS y caída a los 30 minutos a niveles control.

Sin embargo, en este caso, no tenemos los datos de lo que ocurre cuando el tratamiento es a tiempos cortos (menos de 30 minutos). Aun así, el estudio de Olianás y colaboradores demostró tanto en astrocitos corticales de rata como en la línea C6 de glioma, que LPAR1 protege de la apoptosis promovida por especies de peróxido de oxígeno (Olianás, Dedoni, and Onali 2016). Más tarde, el estudio de Ikram y colaboradores demostró que ratones a los cuáles se les indujo EA por inyección de $A\beta_{1-42}$ oligomérico, cuando eran tratados con gintonina, bloqueaba la generación de ROS y la sobreexpresión de GFAP (Ikram et al. 2021). El primer estudio nos avanza un efecto protector por parte del LPA en astrocitos que han recibido especies reactivas de oxígeno, situación en la que se encuentran en la EA, y en el segundo, un efecto bloqueante de la generación de estas especies. Por lo que, junto a nuestros datos, refuerzan la hipótesis del efecto protector del LPA en el sistema nervioso central.

En resumen, hemos investigado el papel que juega el metabolismo del glucógeno a nivel de los astrocitos en presencia de los oligómeros de $A\beta_{1-42}$. Nuestro modelo propone que la señalización temprana iniciada por la interacción entre oligómeros de $A\beta_{1-42}$ y la ITG β 1 promueve la degradación del glucógeno nuclear mediante la activación del eje de señalización Rac1/PYGM.

Este mismo eje, modula respuestas de los astrocitos tanto a corto plazo (generación de ROS) como a largo plazo (astrogliosis).

Nuestros análisis a nivel de glicolisis refuerzan nuestra hipótesis de que el glucógeno no se utiliza como fuente de energía, sino como generador de sustrato para favorecer modificaciones postraduccionales de proteínas, concretamente, las O-GlcNAcilaciones. Toda una batería de proteínas (155), entre las que se encuentran actinas, proteínas SNARE, GTPasas Arf y LPAR1, aumentan sus niveles de O-GlcNAcilaciones y esto afecta de forma potencial a la funcionalidad de los astrocitos.

Una de las proteínas O-GlcNAciladas, el LPAR1, ha resultado ser la clave para entender desde otra perspectiva los mecanismos moleculares que emplean los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ para promover la astrogliosis. La O-GlcNAcilación en las treoninas 43 y 47 de este receptor modula tanto la sobreexpresión de GFAP como el aumento del área ocupada por el astrocito. Finalmente, hemos demostrado el papel protector del LPA en la respuesta astrocitaria a los oligómeros de $A\beta_{1-42}$. Esto apunta a que el equilibrio entre LPA y $A\beta_{1-42}$ oligomérico es esencial para mantener la homeostasis de los astrocitos, y que cuando la balanza favorece a los oligómeros de $A\beta_{1-42}$, las respuestas que se producen hacen que el astrocito pierda su funcionalidad y entre en la vía de la neurodegeneración (**Figura 3**).

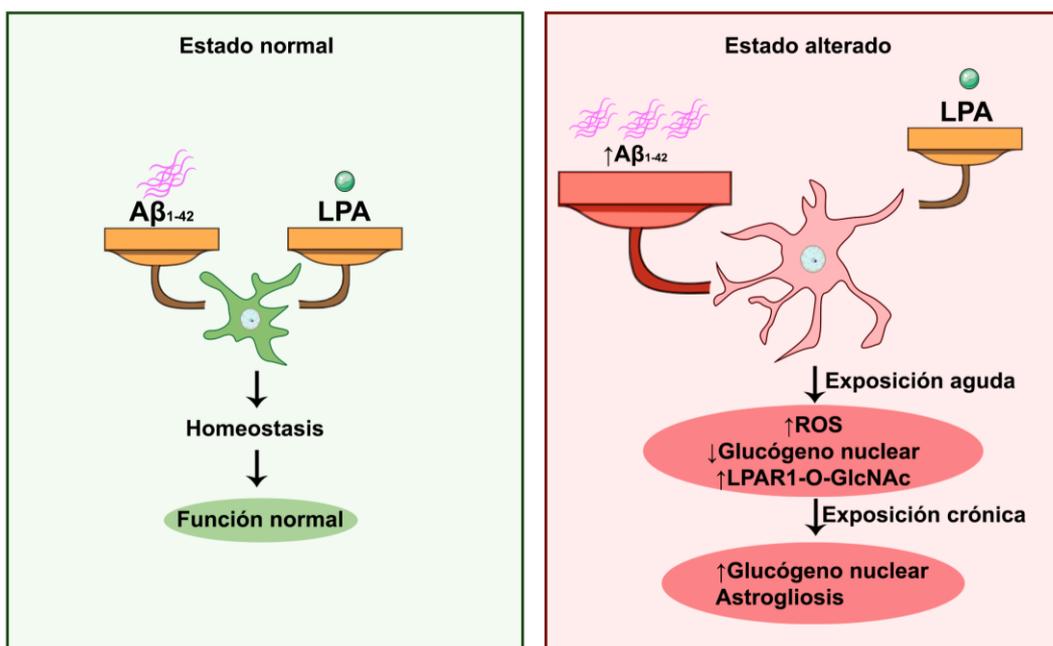


Figura 3. El equilibrio entre el $A\beta_{1-42}$ oligomérico y el LPA es esencial para mantener la homeostasis del astrocito. Una presencia equilibrada del $A\beta_{1-42}$ oligomérico y el LPA resulta en la funcionalidad de los astrocitos. Sin embargo, un desequilibrio en favor del $A\beta_{1-42}$ oligomérico con respecto a LPA favorece que la señalización intracelular derive hacia las rutas gobernadas por este péptido, promoviendo la transactivación del LPAR1 con todo lo que conlleva, a corto plazo: descenso del glucógeno nuclear acompañado del aumento de ROS y de LPAR1-O-GlcNAc que se traduce a largo plazo en astrogliosis y aumento del glucógeno nuclear. En base a este equilibrio, nos encontramos ante un receptor, LPAR1, controlando dos funciones antagónicas.

La siguiente pregunta que nos planteamos para estudiar en un futuro es: ¿Qué ocurre en un sistema dónde el equilibrio entre el péptido $A\beta_{1-42}$ y LPA está descompensado hacia LPA? La señalización controlada por LPA ha sido ampliamente estudiada en cáncer debido a que se encuentra alterada (Liu, Umezú-Goto, et al. 2009; Wang et al. 2016; Xu et al. 2019). Por ejemplo, se ha encontrado una alta expresión de LPAR1 en pacientes de cáncer de mama basal, la cual se ha asociado a un mal pronóstico de la enfermedad (Sahay et al. 2015). Además, el LPAR1 ha sido señalado como modulador de la transcripción génica de diferentes genes en el contexto de cáncer (Valdes-Rives et al. 2021; Xu et al. 2019). Por otra parte, se ha detectado una *downregulación* de LPAR1 en cáncer colon-rectal frente a una *upregulación* de LPAR2 (Shida et al. 2004), por lo que dependiendo del contexto, el LPA interactúa con una u otra isoforma de sus receptores. De hecho, en cáncer de ovario, se ha encontrado altos niveles de LPA en suero (Sedlakova et al. 2011), por lo que en este tipo de cáncer la producción de este agonista se ve alterada y se puede sugerir que las rutas de señalización controladas por LPA están *upreguladas* en este tipo de cáncer.

Por otra parte, el péptido $A\beta$ ha sido relacionado con la supresión del crecimiento tumoral. Distintos estudios han observado una menor probabilidad de desarrollo de cáncer en pacientes diagnosticados con EA, y también, una menor probabilidad de desarrollo de EA en pacientes diagnosticados con cáncer (Driver et al. 2012; White et al. 2013; Catala-Lopez et al. 2014; Shi et al. 2015; Yarchoan et al. 2017; Frain et al. 2017). La revisión realizada por Brothers y colaboradores sugiere que el papel del $A\beta$ se encuentra en la intercepción de virus oncogénicos, debido a que no se ha esclarecido un papel directo del péptido $A\beta$ con la supresión del crecimiento tumoral (Brothers,

Gosztyla, and Robinson 2018). Sin embargo, los siguientes estudios *in vitro* indican lo contrario: el tratamiento a largo plazo en líneas tumorales humanas (U87-L y MDA-MB231-L) y de ratón (B16F-L) con medio enriquecido de especies de A β inhibe la proliferación celular (Zhao et al. 2009), y el tratamiento con dímeros, trimeros y pentadecámeros de A β ₁₋₄₂ en las líneas tumorales humanas NB4, A549 y MCF-7 ha inhibido su crecimiento (Pavliukeviciene et al. 2019).

En estas circunstancias, la disminución de la concentración de péptido A β ₁₋₄₂ y mantenimiento o aumento de la concentración de agonista LPA, hace que este desequilibrio desemboque o justifique los procesos tumorales. Todas estas evidencias nos hace hipotetizar que en situaciones dónde la balanza se encuentra inclinada hacia el LPA, cuando se administra el péptido A β ₁₋₄₂ se restablece el equilibrio por lo que el fenotipo patológico se revierte (Dorandish et al. 2021). Por lo tanto, ocurre una situación equivalente a lo que hemos descrito en esta tesis doctoral.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral han dado a pie a las siguientes conclusiones:

1. Los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ activan al eje de señalización Rac1/PYGM a través de la ITG β 1 en astrocitos humanos inmortalizados.
2. Los astrocitos acumulan gránulos de glucógeno en el núcleo, los cuales los se degradan de forma masiva por mediación de los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ a través de la activación específica del eje Rac1/PYGM. Este mecanismo se conserva tanto en astrocitos humanos inmortalizados como en astrocitos primarios de rata.
3. La PYGM no sólo controla la degradación de estos gránulos sino que controla también su acumulación: en ausencia de expresión de esta hidrolasa se exagera la acumulación del glucógeno.
4. El glucógeno co-localiza en el núcleo de los astrocitos humanos inmortalizados con la GTPasa Rac1 y la PYGM y esta co-localización se dispara con el tratamiento con los oligómeros de $A\beta_{1-42}$.
5. Los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ no influyen en el metabolismo glicolítico de los astrocitos humanos inmortalizados. Este metabolismo glicolítico es dependiente de la PYGM y no de la PYGB ni de la PYGL.
6. Los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ favorecen la O-GlcNAcilación de proteínas en astrocitos humanos inmortalizados. Entre ellas se encuentra la isoforma 1 del receptor de LPA (LPAR1), el cual se O-GlcNAcila en las treoninas 43 y 47. Sin embargo, estas treoninas no sufren una O-GlcNAcilación cuando el LPAR1 se activa por medio de su agonista LPA.
7. Los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ implican al tándem Rac1/PYGM y la actividad OGT en la generación de ROS y en la sobreexpresión de GFAP y el aumento del área celular en astrocitos humanos inmortalizados y en astrocitos primarios de rata.
8. La sobreexpresión de GFAP y el aumento del área celular mediada por los oligómeros de $A\beta_{1-42}$ requieren de la O-GlcNAcilación del LPAR1 en las treoninas 43 y 47 en astrocitos humanos inmortalizados.

9. La movilización del glucógeno por parte de los astrocitos humanos inmortalizados y de los astrocitos primarios de rata cambia según el agonista. El A β ₁₋₄₂ oligomérico induce a los 30 minutos de tratamiento un descenso masivo de los gránulos de glucógeno y a la hora de tratamiento una acumulación exacerbada. Mientras que, el LPA sólo induce a un descenso controlado de los gránulos de glucógeno y una recuperación lenta hasta llegar a los niveles basales.

10. El tratamiento combinado entre A β ₁₋₄₂ y LPA bloquea la degradación del glucógeno, la generación de ROS, la sobreexpresión de GFAP, el incremento del área celular y la migración de los astrocitos. El equilibrio entre el A β ₁₋₄₂ oligomérico y el LPA mantiene la homeostasis astrocitaria.

11. El análisis de la acumulación de gránulos de glucógeno en tejido de cerebro de ratón muestra que los astrocitos de animales control de 18 meses presentan gránulos de glucógeno en el núcleo, los cuales aumentan significativamente en los ratones triple transgénicos (3xTg-AD) de la misma edad.

Bibliografía

- Abbadi, S., J. J. Rodarte, A. Abutaleb, E. Lavell, C. L. Smith, W. Ruff, J. Schiller, A. Olivi, A. Levchenko, H. Guerrero-Cazares, and A. Quinones-Hinojosa. 2014. 'Glucose-6-phosphatase is a key metabolic regulator of glioblastoma invasion', *Mol Cancer Res*, 12: 1547-59.
- Abd-El-Basset, E. M. 2000. 'The effect of dibutyryl cyclic AMP on the expression of actin isoforms in astroglia', *Histochem J*, 32: 581-90.
- Abdrabou, A., and Z. Wang. 2021. 'Regulation of the nuclear speckle localization and function of Rac1', *FASEB J*, 35: e21235.
- Abo, A., E. Pick, A. Hall, N. Totty, C. G. Teahan, and A. W. Segal. 1991. 'Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1', *Nature*, 353: 668-70.
- Alberdi, E., M. V. Sanchez-Gomez, F. Cavaliere, A. Perez-Samartin, J. L. Zugaza, R. Trullas, M. Domercq, and C. Matute. 2010. 'Amyloid beta oligomers induce Ca²⁺ dysregulation and neuronal death through activation of ionotropic glutamate receptors', *Cell Calcium*, 47: 264-72.
- Alekhina, O., E. Burstein, and D. D. Billadeau. 2017. 'Cellular functions of WASP family proteins at a glance', *J Cell Sci*, 130: 2235-41.
- Alfaro, J. F., C. X. Gong, M. E. Monroe, J. T. Aldrich, T. R. Clauss, S. O. Purvine, Z. Wang, D. G. Camp, 2nd, J. Shabanowitz, P. Stanley, G. W. Hart, D. F. Hunt, F. Yang, and R. D. Smith. 2012. 'Tandem mass spectrometry identifies many mouse brain O-GlcNAcylated proteins including EGF domain-specific O-GlcNAc transferase targets', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 7280-5.
- Allaman, I., M. Gavillet, M. Belanger, T. Laroche, D. Viertl, H. A. Lashuel, and P. J. Magistretti. 2010. 'Amyloid-beta aggregates cause alterations of astrocytic metabolic phenotype: impact on neuronal viability', *J Neurosci*, 30: 3326-38.
- Alzheimer, A. 1907. 'Über eine eigenartige Erikkrankung der Hirnrinde', *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtlich Medizin*, 64: 146-48.
- Andreeva, I. E., N. A. Rice, and G. M. Carlson. 2002. 'The regulatory alpha subunit of phosphorylase kinase may directly participate in the binding of glycogen phosphorylase', *Biochemistry (Mosc)*, 67: 1197-202.
- Angelova, P. R., and A. Y. Abramov. 2014. 'Interaction of neurons and astrocytes underlies the mechanism of Abeta-induced neurotoxicity', *Biochem Soc Trans*, 42: 1286-90.
- Arrazola Sastre, A., M. Luque Montoro, P. Galvez-Martin, H. M. Lacerda, A. M. Lucia, F. Llaveró, and J. L. Zugaza. 2020. 'Small GTPases of the Ras and Rho Families Switch on/off Signaling Pathways in Neurodegenerative Diseases', *Int J Mol Sci*, 21.
- Arrazola Sastre, A., M. Luque Montoro, H. M. Lacerda, F. Llaveró, and J. L. Zugaza. 2021. 'Small GTPases of the Rab and Arf Families: Key Regulators of Intracellular Trafficking in Neurodegeneration', *Int J Mol Sci*, 22.
- Arrizabalaga, O., H. M. Lacerda, A. M. Zubiaga, and J. L. Zugaza. 2012. 'Rac1 protein regulates glycogen phosphorylase activation and controls interleukin (IL)-2-dependent T cell proliferation', *J Biol Chem*, 287: 11878-90.
- Aspenstrom, P. 2018. 'Activated Rho GTPases in Cancer-The Beginning of a New Paradigm', *Int J Mol Sci*, 19.
- Association, Alzheimer's. 2021. '2021 Alzheimer's disease facts and figures', *Alzheimers Dement*, 17: 327-406.

- Auge, E., C. Pelegri, G. Manich, I. Cabezon, J. J. Guinovart, J. Duran, and J. Vilaplana. 2018. 'Astrocytes and neurons produce distinct types of polyglucosan bodies in Lafora disease', *Glia*, 66: 2094-107.
- Backs, J. 2020. 'CaMKII Transforms Glucose Into Reactive Oxygen Species', *Circ Res*, 126: 1327-29.
- Bao, F., L. Wicklund, P. N. Lacor, W. L. Klein, A. Nordberg, and A. Marutle. 2012. 'Different beta-amyloid oligomer assemblies in Alzheimer brains correlate with age of disease onset and impaired cholinergic activity', *Neurobiol Aging*, 33: 825 e1-13.
- Barber, C. N., and D. M. Raben. 2019. 'Lipid Metabolism Crosstalk in the Brain: Glia and Neurons', *Front Cell Neurosci*, 13: 212.
- Barford, D. 1991. 'Molecular mechanisms for the control of enzymic activity by protein phosphorylation', *Biochim Biophys Acta*, 1133: 55-62.
- Barford, D., and L. N. Johnson. 1992. 'The molecular mechanism for the tetrameric association of glycogen phosphorylase promoted by protein phosphorylation', *Protein Sci*, 1: 472-93.
- Bautista, L., C. M. Knippler, and M. D. Ringel. 2020. 'p21-Activated Kinases in Thyroid Cancer', *Endocrinology*, 161.
- Belanger, M., I. Allaman, and P. J. Magistretti. 2011. 'Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation', *Cell Metab*, 14: 724-38.
- Bergau, N., S. Maul, D. Rujescu, A. Simm, and A. Navarrete Santos. 2019. 'Reduction of Glycolysis Intermediate Concentrations in the Cerebrospinal Fluid of Alzheimer's Disease Patients', *Front Neurosci*, 13: 871.
- Bernards, A., and J. Settleman. 2004. 'GAP control: regulating the regulators of small GTPases', *Trends Cell Biol*, 14: 377-85.
- Berridge, M. J. 2012. 'Calcium signalling remodelling and disease', *Biochem Soc Trans*, 40: 297-309.
- Bishop, A. L., and A. Hall. 2000. 'Rho GTPases and their effector proteins', *Biochem J*, 348 Pt 2: 241-55.
- Bond, M. R., and J. A. Hanover. 2015. 'A little sugar goes a long way: the cell biology of O-GlcNAc', *J Cell Biol*, 208: 869-80.
- Bouzier-Sore, A. K., and L. Pellerin. 2013. 'Unraveling the complex metabolic nature of astrocytes', *Front Cell Neurosci*, 7: 179.
- Boveris, A., and A. Navarro. 2008. 'Brain mitochondrial dysfunction in aging', *IUBMB Life*, 60: 308-14.
- Broer, S., and N. Brookes. 2001. 'Transfer of glutamine between astrocytes and neurons', *J Neurochem*, 77: 705-19.
- Brooks, W. M., P. J. Lynch, C. C. Ingle, A. Hatton, P. C. Emson, R. L. Faull, and M. P. Starkey. 2007. 'Gene expression profiles of metabolic enzyme transcripts in Alzheimer's disease', *Brain Res*, 1127: 127-35.
- Brothers, H. M., M. L. Gosztyla, and S. R. Robinson. 2018. 'The Physiological Roles of Amyloid-beta Peptide Hint at New Ways to Treat Alzheimer's Disease', *Front Aging Neurosci*, 10: 118.
- Brugnera, E., L. Haney, C. Grimsley, M. Lu, S. F. Walk, A. C. Tosello-Tramont, I. G. Macara, H. Madhani, G. R. Fink, and K. S. Ravichandran. 2002. 'Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex', *Nat Cell Biol*, 4: 574-82.
- Bu, G. 2009. 'Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy', *Nat Rev Neurosci*, 10: 333-44.

- Buchbinder, J. L., C. B. Luong, M. F. Browner, and R. J. Fletterick. 1997. 'Partial activation of muscle phosphorylase by replacement of serine 14 with acidic residues at the site of regulatory phosphorylation', *Biochemistry*, 36: 8039-44.
- Burianek, L. E., and S. H. Soderling. 2013. 'Under lock and key: spatiotemporal regulation of WASP family proteins coordinates separate dynamic cellular processes', *Semin Cell Dev Biol*, 24: 258-66.
- Bustelo, X. R., V. Sauzeau, and I. M. Berenjeno. 2007. 'GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo', *Bioessays*, 29: 356-70.
- Butkinaree, C., K. Park, and G. W. Hart. 2010. 'O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress', *Biochim Biophys Acta*, 1800: 96-106.
- Byman, E., N. Schultz, Bank Netherlands Brain, A. M. Blom, and M. Wennstrom. 2019. 'A Potential Role for alpha-Amylase in Amyloid-beta-Induced Astrocytic Glycogenolysis and Activation', *J Alzheimers Dis*, 68: 205-17.
- Cacace, R., K. Slegers, and C. Van Broeckhoven. 2016. 'Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited', *Alzheimers Dement*, 12: 733-48.
- Cai, Y., H. Guo, Z. Fan, X. Zhang, D. Wu, W. Tang, T. Gu, S. Wang, A. Yin, L. Tao, X. Ji, H. Dong, Y. Li, and L. Xiong. 2020. 'Glycogenolysis Is Crucial for Astrocytic Glycogen Accumulation and Brain Damage after Reperfusion in Ischemic Stroke', *iScience*, 23: 101136.
- Carson, J. A., and L. Wei. 2000. 'Integrin signaling's potential for mediating gene expression in hypertrophying skeletal muscle', *J Appl Physiol (1985)*, 88: 337-43.
- Catala-Lopez, F., M. Suarez-Pinilla, P. Suarez-Pinilla, J. M. Valderas, M. Gomez-Beneyto, S. Martinez, V. Balanza-Martinez, J. Climent, A. Valencia, J. McGrath, B. Crespo-Facorro, J. Sanchez-Moreno, E. Vieta, and R. Tabares-Seisdedos. 2014. 'Inverse and direct cancer comorbidity in people with central nervous system disorders: a meta-analysis of cancer incidence in 577,013 participants of 50 observational studies', *Psychother Psychosom*, 83: 89-105.
- Cerbai, F., D. Lana, D. Nosi, P. Petkova-Kirova, S. Zecchi, H. M. Brothers, G. L. Wenk, and M. G. Giovannini. 2012. 'The neuron-astrocyte-microglia triad in normal brain ageing and in a model of neuroinflammation in the rat hippocampus', *PLoS One*, 7: e45250.
- Chasiotis, D. 1983. 'The regulation of glycogen phosphorylase and glycogen breakdown in human skeletal muscle', *Acta Physiol Scand Suppl*, 518: 1-68.
- Chen, X. D., W. Zhao, and A. G. Shen. 2011. 'Expression and role of PAK6 after spinal cord injury in adult rat', *Chin J Traumatol*, 14: 277-81.
- Chen, Y., Z. Tian, Z. Liang, S. Sun, C. L. Dai, M. H. Lee, F. M. LaFerla, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, F. Liu, and C. X. Gong. 2012. 'Brain gene expression of a sporadic (icv-STZ Mouse) and a familial mouse model (3xTg-AD mouse) of Alzheimer's disease', *PLoS One*, 7: e51432.
- Cheng, A., M. Zhang, M. S. Gentry, C. A. Worby, J. E. Dixon, and A. R. Saltiel. 2007. 'A role for AGL ubiquitination in the glycogen storage disorders of Lafora and Cori's disease', *Genes Dev*, 21: 2399-409.

- Cheung, W. D., and G. W. Hart. 2008. 'AMP-activated protein kinase and p38 MAPK activate O-GlcNAcylation of neuronal proteins during glucose deprivation', *J Biol Chem*, 283: 13009-20.
- Choi, H., C. Kim, H. Song, M. Y. Cha, H. J. Cho, S. M. Son, H. J. Kim, and I. Mook-Jung. 2019. 'Amyloid beta-induced elevation of O-GlcNAcylated c-Fos promotes neuronal cell death', *Aging Cell*, 18: e12872.
- Choi, J. W., and J. Chun. 2013. 'Lysophospholipids and their receptors in the central nervous system', *Biochim Biophys Acta*, 1831: 20-32.
- Choi, J. W., D. R. Herr, K. Noguchi, Y. C. Yung, C. W. Lee, T. Mutoh, M. E. Lin, S. T. Teo, K. E. Park, A. N. Mosley, and J. Chun. 2010. 'LPA receptors: subtypes and biological actions', *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 50: 157-86.
- Choi, S. H., H. J. Kim, H. J. Cho, S. D. Park, N. E. Lee, S. H. Hwang, I. H. Cho, H. Hwang, H. Rhim, H. C. Kim, and S. Y. Nah. 2019. 'Gintonin, a Ginseng-Derived Exogenous Lysophosphatidic Acid Receptor Ligand, Protects Astrocytes from Hypoxic and Re-oxygenation Stresses Through Stimulation of Astrocytic Glycogenolysis', *Mol Neurobiol*, 56: 3280-94.
- Chun, Y. S., O. H. Kwon, and S. Chung. 2017. 'O-GlcNAcylation of amyloid-beta precursor protein at threonine 576 residue regulates trafficking and processing', *Biochem Biophys Res Commun*, 490: 486-91.
- Cid, E., D. Cifuentes, S. Baque, J. C. Ferrer, and J. J. Guinovart. 2005. 'Determinants of the nucleocytoplasmic shuttling of muscle glycogen synthase', *FEBS J*, 272: 3197-213.
- Civiero, L., and E. Greggio. 2018. 'PAKs in the brain: Function and dysfunction', *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1864: 444-53.
- Cote, J. F., and K. Vuori. 2002. 'Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity', *J Cell Sci*, 115: 4901-13.
- Cruts, M., L. Hendriks, and C. Van Broeckhoven. 1996. 'The presenilin genes: a new gene family involved in Alzheimer disease pathology', *Hum Mol Genet*, 5 Spec No: 1449-55.
- Daub, H., C. Wallasch, A. Lankenau, A. Herrlich, and A. Ullrich. 1997. 'Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor', *EMBO J*, 16: 7032-44.
- Daub, H., F. U. Weiss, C. Wallasch, and A. Ullrich. 1996. 'Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors', *Nature*, 379: 557-60.
- de Leon-Bautista, M. P., M. D. Cardenas-Aguayo, D. Casique-Aguirre, M. Almaraz-Salinas, S. Parraguirre-Martinez, A. Olivo-Diaz, M. D. Thompson-Bonilla, and M. Vargas. 2016. 'Immunological and Functional Characterization of RhoGDI3 and Its Molecular Targets RhoG and RhoB in Human Pancreatic Cancerous and Normal Cells', *PLoS One*, 11: e0166370.
- Demuro, A., E. Mina, R. Kaye, S. C. Milton, I. Parker, and C. G. Glabe. 2005. 'Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers', *J Biol Chem*, 280: 17294-300.
- Derry, J. M., H. D. Ochs, and U. Francke. 1994. 'Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome', *Cell*, 79: following 922.
- Diekmann, D., A. Abo, C. Johnston, A. W. Segal, and A. Hall. 1994. 'Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity', *Science*, 265: 531-3.

- Dienel, G. A., and L. Hertz. 2001. 'Glucose and lactate metabolism during brain activation', *J Neurosci Res*, 66: 824-38.
- Diniz, D. G., C. A. Foro, C. M. Rego, D. A. Gloria, F. R. de Oliveira, J. M. Paes, A. A. de Sousa, T. P. Tokuhashi, L. S. Trindade, M. C. Turiel, E. G. Vasconcelos, J. B. Torres, C. Cunningham, V. H. Perry, P. F. Vasconcelos, and C. W. Diniz. 2010. 'Environmental impoverishment and aging alter object recognition, spatial learning, and dentate gyrus astrocytes', *Eur J Neurosci*, 32: 509-19.
- DiNuzzo, M., and A. Schousboe (ed.)^(eds.). 2019. *Brain Glycogen Metabolism* (Springer).
- Dominguez, R., and K. C. Holmes. 2011. 'Actin structure and function', *Annu Rev Biophys*, 40: 169-86.
- Dorandish, S., A. Williams, S. Atali, S. Sendo, D. Price, C. Thompson, J. Guthrie, D. Heyl, and H. G. Evans. 2021. 'Regulation of amyloid-beta levels by matrix metalloproteinase-2/9 (MMP2/9) in the media of lung cancer cells', *Sci Rep*, 11: 9708.
- Dovas, A., and J. R. Couchman. 2005. 'RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities', *Biochem J*, 390: 1-9.
- Driver, J. A., A. Beiser, R. Au, B. E. Kreger, G. L. Splansky, T. Kurth, D. P. Kiel, K. P. Lu, S. Seshadri, and P. A. Wolf. 2012. 'Inverse association between cancer and Alzheimer's disease: results from the Framingham Heart Study', *BMJ*, 344: e1442.
- Duran, J., A. Gruart, J. C. Lopez-Ramos, J. M. Delgado-Garcia, and J. J. Guinovart. 2019. 'Glycogen in Astrocytes and Neurons: Physiological and Pathological Aspects', *Adv Neurobiol*, 23: 311-29.
- Duran, J., A. Gruart, O. Varea, I. Lopez-Soldado, J. M. Delgado-Garcia, and J. J. Guinovart. 2019. 'Lack of Neuronal Glycogen Impairs Memory Formation and Learning-Dependent Synaptic Plasticity in Mice', *Front Cell Neurosci*, 13: 374.
- Duran, J., A. Hervera, K. H. Markussen, O. Varea, I. Lopez-Soldado, R. C. Sun, J. A. Del Rio, M. S. Gentry, and J. J. Guinovart. 2021. 'Astrocytic glycogen accumulation drives the pathophysiology of neurodegeneration in Lafora disease', *Brain*, 144: 2349-60.
- Duran, J., I. Saez, A. Gruart, J. J. Guinovart, and J. M. Delgado-Garcia. 2013. 'Impairment in long-term memory formation and learning-dependent synaptic plasticity in mice lacking glycogen synthase in the brain', *J Cereb Blood Flow Metab*, 33: 550-6.
- Fakhoury, M. 2018. 'Microglia and Astrocytes in Alzheimer's Disease: Implications for Therapy', *Curr Neuropharmacol*, 16: 508-18.
- Fan, J., L. J. Ma, S. J. Xia, L. Yu, Q. Fu, C. Q. Wu, X. H. Huang, J. M. Jiang, and X. D. Tang. 2005. 'Association between clinical characteristics and expression abundance of RTKN gene in human bladder carcinoma tissues from Chinese patients', *J Cancer Res Clin Oncol*, 131: 157-62.
- Favaro, E., K. Bensaad, M. G. Chong, D. A. Tennant, D. J. Ferguson, C. Snell, G. Steers, H. Turley, J. L. Li, U. L. Gunther, F. M. Buffa, A. McIntyre, and A. L. Harris. 2012. 'Glucose utilization via glycogen phosphorylase sustains proliferation and prevents premature senescence in cancer cells', *Cell Metab*, 16: 751-64.
- Ferrer, J. C., S. Baque, and J. J. Guinovart. 1997. 'Muscle glycogen synthase translocates from the cell nucleus to the cytosol in response to glucose', *FEBS Lett*, 415: 249-52.

- Fiacco, T. A., and K. D. McCarthy. 2006. 'Astrocyte calcium elevations: properties, propagation, and effects on brain signaling', *Glia*, 54: 676-90.
- Fields, R. D., and B. Stevens-Graham. 2002. 'New insights into neuron-glia communication', *Science*, 298: 556-62.
- Findley, C. A., A. Bartke, K. N. Hascup, and E. R. Hascup. 2019. 'Amyloid Beta-Related Alterations to Glutamate Signaling Dynamics During Alzheimer's Disease Progression', *ASN Neuro*, 11: 1759091419855541.
- Fischer, E. H. 2013. 'Cellular regulation by protein phosphorylation', *Biochem Biophys Res Commun*, 430: 865-7.
- Fiuza-Luces, C., A. Santos-Lozano, M. Joyner, P. Carrera-Bastos, O. Picazo, J. L. Zugaza, M. Izquierdo, L. M. Ruilope, and A. Lucia. 2018. 'Exercise benefits in cardiovascular disease: beyond attenuation of traditional risk factors', *Nat Rev Cardiol*, 15: 731-43.
- Forster, S., A. S. Welleford, J. C. Triplett, R. Sultana, B. Schmitz, and D. A. Butterfield. 2014. 'Increased O-GlcNAc levels correlate with decreased O-GlcNAcase levels in Alzheimer disease brain', *Biochim Biophys Acta*, 1842: 1333-9.
- Frain, L., D. Swanson, K. Cho, D. Gagnon, K. P. Lu, R. A. Betensky, and J. Driver. 2017. 'Association of cancer and Alzheimer's disease risk in a national cohort of veterans', *Alzheimers Dement*, 13: 1364-70.
- Frost, G. R., and Y. M. Li. 2017. 'The role of astrocytes in amyloid production and Alzheimer's disease', *Open Biol*, 7.
- Fu, W., and J. H. Jhamandas. 2014. 'Role of astrocytic glycolytic metabolism in Alzheimer's disease pathogenesis', *Biogerontology*, 15: 579-86.
- Fukushima, N., and J. Chun. 2001. 'The LPA receptors', *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 64: 21-32.
- Galea, E., W. Morrison, E. Hudry, M. Arbel-Ornath, B. J. Bacsikai, T. Gomez-Isla, H. E. Stanley, and B. T. Hyman. 2015. 'Topological analyses in APP/PS1 mice reveal that astrocytes do not migrate to amyloid-beta plaques', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112: 15556-61.
- Ge, T., J. Yang, S. Zhou, Y. Wang, Y. Li, and X. Tong. 2020. 'The Role of the Pentose Phosphate Pathway in Diabetes and Cancer', *Front Endocrinol (Lausanne)*, 11: 365.
- Geraldo, L. H. M., Tcls Spohr, R. F. D. Amaral, Acdd Fonseca, C. Garcia, F. A. Mendes, C. Freitas, M. F. dosSantos, and F. R. S. Lima. 2021. 'Role of lysophosphatidic acid and its receptors in health and disease: novel therapeutic strategies', *Signal Transduct Target Ther*, 6: 45.
- Gibbs, M. E., and L. Hertz. 2008. 'Inhibition of astrocytic energy metabolism by D-lactate exposure impairs memory', *Neurochem Int*, 52: 1012-8.
- Glabe, C. C. 2005. 'Amyloid accumulation and pathogenesis of Alzheimer's disease: significance of monomeric, oligomeric and fibrillar Abeta', *Subcell Biochem*, 38: 167-77.
- Goate, A., M. C. Chartier-Harlin, M. Mullan, J. Brown, F. Crawford, L. Fidani, L. Giuffra, A. Haynes, N. Irving, L. James, and et al. 1991. 'Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease', *Nature*, 349: 704-6.
- Goitre, L., E. Trapani, L. Trabalzini, and S. F. Retta. 2014. 'The Ras superfamily of small GTPases: the unlocked secrets', *Methods Mol Biol*, 1120: 1-18.

- Gong, C. X., F. Liu, I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal. 2006. 'Impaired brain glucose metabolism leads to Alzheimer neurofibrillary degeneration through a decrease in tau O-GlcNAcylation', *J Alzheimers Dis*, 9: 1-12.
- Granzow, C., M. Kopun, and H. P. Zimmermann. 1981. 'Role of nuclear glycogen synthase and cytoplasmic UDP glucose pyrophosphorylase in the biosynthesis of nuclear glycogen in HD33 Ehrlich-Lette ascites tumor cells', *J Cell Biol*, 89: 475-84.
- Griner, E. M., and D. Theodorescu. 2012. 'The faces and friends of RhoGDI2', *Cancer Metastasis Rev*, 31: 519-28.
- Grosche, A., J. Grosche, M. Tackenberg, D. Scheller, G. Gerstner, A. Gumprecht, T. Pannicke, P. G. Hirrlinger, U. Wilhelmsson, K. Huttmann, W. Hartig, C. Steinhauser, M. Pekny, and A. Reichenbach. 2013. 'Versatile and simple approach to determine astrocyte territories in mouse neocortex and hippocampus', *PLoS One*, 8: e69143.
- Hall, A. 2012. 'Rho family GTPases', *Biochem Soc Trans*, 40: 1378-82.
- Hardy, J. A., and G. A. Higgins. 1992. 'Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis', *Science*, 256: 184-5.
- Hart, G. W., M. P. Housley, and C. Slawson. 2007. 'Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins', *Nature*, 446: 1017-22.
- He, H., and G. S. Baldwin. 2013. 'p21-activated kinases and gastrointestinal cancer', *Biochim Biophys Acta*, 1833: 33-9.
- He, W., Z. Zhao, A. Anees, Y. Li, U. Ashraf, Z. Chen, Y. Song, H. Chen, S. Cao, and J. Ye. 2017. 'p21-Activated Kinase 4 Signaling Promotes Japanese Encephalitis Virus-Mediated Inflammation in Astrocytes', *Front Cell Infect Microbiol*, 7: 271.
- Hecht, J. H., J. A. Weiner, S. R. Post, and J. Chun. 1996. 'Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex', *J Cell Biol*, 135: 1071-83.
- Hegyi, B., J. M. Borst, L. R. J. Bailey, E. Y. Shen, A. J. Lucena, M. F. Navedo, J. Bossuyt, and D. M. Bers. 2020. 'Hyperglycemia regulates cardiac K(+) channels via O-GlcNAc-CaMKII and NOX2-ROS-PKC pathways', *Basic Res Cardiol*, 115: 71.
- Heneka, M. T., M. J. Carson, J. El Khoury, G. E. Landreth, F. Brosseon, D. L. Feinstein, A. H. Jacobs, T. Wyss-Coray, J. Vitorica, R. M. Ransohoff, K. Herrup, S. A. Frautschy, B. Finsen, G. C. Brown, A. Verkhratsky, K. Yamanka, J. Koistinaho, E. Latz, A. Halle, G. C. Petzold, T. Town, D. Morgan, M. L. Shinohara, V. H. Perry, C. Holmes, N. G. Bazan, D. J. Brooks, S. Hunot, B. Joseph, N. Deigendesch, O. Garaschuk, E. Boddeke, C. A. Dinarello, J. C. Breitner, G. M. Cole, D. T. Golenbock, and M. P. Kummer. 2015. 'Neuroinflammation in Alzheimer's disease', *Lancet Neurol*, 14: 388-405.
- Herms, J., B. Anliker, S. Heber, S. Ring, M. Fuhrmann, H. Kretzschmar, S. Sisodia, and U. Muller. 2004. 'Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members', *EMBO J*, 23: 4106-15.
- Hoffman, G. R., N. Nassar, and R. A. Cerione. 2000. 'Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with the multifunctional regulator RhoGDI', *Cell*, 100: 345-56.
- Horita, N., M. Matsushita, T. Ishii, S. Oyanagi, and K. Sakamoto. 1981. 'Ultrastructure of Alzheimer type II glia in hepatocerebral disease', *Neuropathol Appl Neurobiol*, 7: 97-102.

- Huang, W., Z. Zhou, S. Asrar, M. Henkelman, W. Xie, and Z. Jia. 2011. 'p21-Activated kinases 1 and 3 control brain size through coordinating neuronal complexity and synaptic properties', *Mol Cell Biol*, 31: 388-403.
- Huang, Y. 2006. 'Apolipoprotein E and Alzheimer disease', *Neurology*, 66: S79-85.
- Hue, L., F. Bontemps, and H. Hers. 1975. 'The effects of glucose and of potassium ions on the interconversion of the two forms of glycogen phosphorylase and of glycogen synthetase in isolated rat liver preparations', *Biochem J*, 152: 105-14.
- Hwang, S. H., E. J. Shin, T. J. Shin, B. H. Lee, S. H. Choi, J. Kang, H. J. Kim, S. H. Kwon, C. G. Jang, J. H. Lee, H. C. Kim, and S. Y. Nah. 2012. 'Gintonin, a ginseng-derived lysophosphatidic acid receptor ligand, attenuates Alzheimer's disease-related neuropathies: involvement of non-amyloidogenic processing', *J Alzheimers Dis*, 31: 207-23.
- Ikram, M., M. G. Jo, T. J. Park, M. W. Kim, I. Khan, M. H. Jo, and M. O. Kim. 2021. 'Oral Administration of Gintonin Protects the Brains of Mice against Abeta-Induced Alzheimer Disease Pathology: Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects', *Oxid Med Cell Longev*, 2021: 6635552.
- Ishii, T., T. Ueyama, M. Shigyo, M. Kohta, T. Kondoh, T. Kuboyama, T. Uebi, T. Hamada, D. H. Gutmann, A. Aiba, E. Kohmura, C. Tohda, and N. Saito. 2017. 'A Novel Rac1-GSPT1 Signaling Pathway Controls Astroglialosis Following Central Nervous System Injury', *J Biol Chem*, 292: 1240-50.
- Ito, H., R. Morishita, and K. I. Nagata. 2018. 'Functions of Rhotekin, an Effector of Rho GTPase, and Its Binding Partners in Mammals', *Int J Mol Sci*, 19.
- Iwai, T., A. Saitoh, M. Yamada, K. Takahashi, E. Hashimoto, W. Ukai, T. Saito, and M. Yamada. 2012. 'Rhotekin modulates differentiation of cultured neural stem cells to neurons', *J Neurosci Res*, 90: 1359-66.
- Jakel, S., and L. Dimou. 2017. 'Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation', *Front Cell Neurosci*, 11: 24.
- Johnson, D. S., and Y. H. Chen. 2012. 'Ras family of small GTPases in immunity and inflammation', *Curr Opin Pharmacol*, 12: 458-63.
- Johnson, K., and S. R. D'Mello. 2005. 'p21-Activated kinase-1 is necessary for depolarization-mediated neuronal survival', *J Neurosci Res*, 79: 809-15.
- Johnson, L. N. 1992. 'Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation and allosteric effectors', *FASEB J*, 6: 2274-82.
- Kakhlon, O., H. Glickstein, N. Feinstein, Y. Liu, O. Baba, T. Terashima, H. O. Akman, S. Dimauro, and A. Lossos. 2013. 'Polyglucosan neurotoxicity caused by glycogen branching enzyme deficiency can be reversed by inhibition of glycogen synthase', *J Neurochem*, 127: 101-13.
- Kamphuis, W., M. Orre, L. Kooijman, M. Dahmen, and E. M. Hol. 2012. 'Differential cell proliferation in the cortex of the APPswePS1dE9 Alzheimer's disease mouse model', *Glia*, 60: 615-29.
- Kang, J. G., S. Y. Park, S. Ji, I. Jang, S. Park, H. S. Kim, S. M. Kim, J. I. Yook, Y. I. Park, J. Roth, and J. W. Cho. 2009. 'O-GlcNAc protein modification in cancer cells increases in response to glucose deprivation through glycogen degradation', *J Biol Chem*, 284: 34777-84.
- Kang, J., L. Jiang, S. A. Goldman, and M. Nedergaard. 1998. 'Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission', *Nat Neurosci*, 1: 683-92.
- Kang, S., J. Han, S. Y. Song, W. S. Kim, S. Shin, J. H. Kim, H. Ahn, J. H. Jeong, S. J. Hwang, and J. H. Sung. 2015. 'Lysophosphatidic acid increases the

- proliferation and migration of adiposederived stem cells via the generation of reactive oxygen species', *Mol Med Rep*, 12: 5203-10.
- Kankaanpaa, J., S. P. Turunen, V. Moilanen, S. Horkko, and A. M. Remes. 2009. 'Cerebrospinal fluid antibodies to oxidized LDL are increased in Alzheimer's disease', *Neurobiol Dis*, 33: 467-72.
- Kao, Y. C., P. C. Ho, Y. K. Tu, I. M. Jou, and K. J. Tsai. 2020. 'Lipids and Alzheimer's Disease', *Int J Mol Sci*, 21.
- Katanov, C., N. Novak, A. Vainshtein, O. Golani, J. L. Dupree, and E. Peles. 2020. 'N-Wasp Regulates Oligodendrocyte Myelination', *J Neurosci*, 40: 6103-11.
- Kihara, Y., H. Mizuno, and J. Chun. 2015. 'Lysophospholipid receptors in drug discovery', *Exp Cell Res*, 333: 171-77.
- Kim, E., U. Otgontenger, A. Jamsranjav, and S. S. Kim. 2020. 'Deleterious Alteration of Glia in the Brain of Alzheimer's Disease', *Int J Mol Sci*, 21.
- Kim, H. J., A. B. DiBernardo, J. A. Sloane, M. N. Rasband, D. Solomon, B. Kosaras, S. P. Kwak, and T. K. Vartanian. 2006. 'WAVE1 is required for oligodendrocyte morphogenesis and normal CNS myelination', *J Neurosci*, 26: 5849-59.
- Kim, H. J., S. W. Jung, S. Y. Kim, I. H. Cho, H. C. Kim, H. Rhim, M. Kim, and S. Y. Nah. 2018. 'Panax ginseng as an adjuvant treatment for Alzheimer's disease', *J Ginseng Res*, 42: 401-11.
- Kimberly, W. T., J. B. Zheng, S. Y. Guenette, and D. J. Selkoe. 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: 40288-92.
- Kitamura, Y., K. Shibagaki, K. Takata, D. Tsuchiya, T. Taniguchi, P. J. Gebicke-Haerter, H. Miki, T. Takenawa, and S. Shimohama. 2003. 'Involvement of Wiskott-Aldrich syndrome protein family verprolin-homologous protein (WAVE) and Rac1 in the phagocytosis of amyloid-beta(1-42) in rat microglia', *J Pharmacol Sci*, 92: 115-23.
- Klein, W. L. 2002. 'Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets', *Neurochem Int*, 41: 345-52.
- Kolch, W. 2005. 'Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6: 827-37.
- Kraynov, V. S., C. Chamberlain, G. M. Bokoch, M. A. Schwartz, S. Slabaugh, and K. M. Hahn. 2000. 'Localized Rac activation dynamics visualized in living cells', *Science*, 290: 333-7.
- Ksiezak-Reding, H., W. K. Liu, and S. H. Yen. 1992. 'Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments', *Brain Res*, 597: 209-19.
- Kuffler, D. P. 1996. 'Chemoattraction of sensory neuron growth cones by diffusible concentration gradients of acetylcholine', *Mol Chem Neuropathol*, 28: 199-208.
- Kumar, R., R. Sanawar, X. Li, and F. Li. 2017. 'Structure, biochemistry, and biology of PAK kinases', *Gene*, 605: 20-31.
- Labrador, E., and D. A. Weinstein. 1993. 'Glycogen Storage Disease Type VI.' in M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. H. Bean, G. Mirzaa and A. Amemiya (eds.), *GeneReviews((R))* (Seattle (WA)).
- Lai, W., J. Wu, X. Zou, J. Xie, L. Zhang, X. Zhao, M. Zhao, Q. Wang, and J. Ji. 2013. 'Secretome analyses of Abeta(1-42) stimulated hippocampal astrocytes

- reveal that CXCL10 is involved in astrocyte migration', *J Proteome Res*, 12: 832-43.
- Lambert, M. P., A. K. Barlow, B. A. Chromy, C. Edwards, R. Freed, M. Liosatos, T. E. Morgan, I. Rozovsky, B. Trommer, K. L. Viola, P. Wals, C. Zhang, C. E. Finch, G. A. Krafft, and W. L. Klein. 1998. 'Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins', *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 6448-53.
- Lane, C. A., J. Hardy, and J. M. Schott. 2018. 'Alzheimer's disease', *Eur J Neurol*, 25: 59-70.
- Lanning, C. C., R. Ruiz-Velasco, and C. L. Williams. 2003. 'Novel mechanism of the co-regulation of nuclear transport of SmgGDS and Rac1', *J Biol Chem*, 278: 12495-506.
- Laurin, M., and J. F. Cote. 2014. 'Insights into the biological functions of Dock family guanine nucleotide exchange factors', *Genes Dev*, 28: 533-47.
- Lebowitz, P. F., J. P. Davide, and G. C. Prendergast. 1995. 'Evidence that farnesyltransferase inhibitors suppress Ras transformation by interfering with Rho activity', *Mol Cell Biol*, 15: 6613-22.
- Lecain, E., F. Alliot, M. C. Laine, B. Calas, and B. Pessac. 1991. 'Alpha isoform of smooth muscle actin is expressed in astrocytes in vitro and in vivo', *J Neurosci Res*, 28: 601-6.
- Lenhossék, M. 1895. *Der feinere Bau des Nervensystems im Lichte neuester Forschungen* (Kornfeld, Berlin).
- LeVine III, H., and L.C. Walker. 2006. 'Models of Alzheimer's Disease', *Handbook of Models for Human Aging*.
- Levine, Z. G., S. C. Potter, C. M. Joiner, G. Q. Fei, B. Nabet, M. Sonnett, N. E. Zachara, N. S. Gray, J. A. Paulo, and S. Walker. 2021. 'Mammalian cell proliferation requires noncatalytic functions of O-GlcNAc transferase', *Proc Natl Acad Sci USA*, 118.
- Li, D., K. Herault, K. Zylbersztejn, M. A. Lauterbach, M. Guillon, M. Oheim, and N. Ropert. 2015. 'Astrocyte VAMP3 vesicles undergo Ca²⁺ -independent cycling and modulate glutamate transporter trafficking', *J Physiol*, 593: 2807-32.
- Liberti, M. V., and J. W. Locasale. 2016. 'The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?', *Trends Biochem Sci*, 41: 211-18.
- Liddel, S. A., and B. A. Barres. 2017. 'Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential', *Immunity*, 46: 957-67.
- Lin, C. C., C. E. Lin, Y. C. Lin, T. K. Ju, Y. L. Huang, M. S. Lee, J. H. Chen, and H. Lee. 2013. 'Lysophosphatidic acid induces reactive oxygen species generation by activating protein kinase C in PC-3 human prostate cancer cells', *Biochem Biophys Res Commun*, 440: 564-9.
- Lin, Y. T., J. Seo, F. Gao, H. M. Feldman, H. L. Wen, J. Penney, H. P. Cam, E. Gjoneska, W. K. Raja, J. Cheng, R. Rueda, O. Kritskiy, F. Abdurrob, Z. Peng, B. Milo, C. J. Yu, S. Elmsaouri, D. Dey, T. Ko, B. A. Yankner, and L. H. Tsai. 2018. 'APOE4 Causes Widespread Molecular and Cellular Alterations Associated with Alzheimer's Disease Phenotypes in Human iPSC-Derived Brain Cell Types', *Neuron*, 98: 1294.
- Liu, C. A., M. J. Wang, C. W. Chi, C. W. Wu, and J. Y. Chen. 2004. 'Overexpression of rho effector rhotekin confers increased survival in gastric adenocarcinoma', *J Biomed Sci*, 11: 661-70.

- Liu, G., Y. Wang, K. Keyal, L. Feng, C. Zhang, H. Wang, and F. Wang. 2021. 'Identification of connexin43 in diabetic retinopathy and its downregulation by O-GlcNAcylation to inhibit the activation of glial cells', *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 1865: 129955.
- Liu, Q., B. Li, H. Y. Zhu, Y. Q. Wang, J. Yu, and G. C. Wu. 2009. 'Clomipramine treatment reversed the glial pathology in a chronic unpredictable stress-induced rat model of depression', *Eur Neuropsychopharmacol*, 19: 796-805.
- Liu, S., M. Umezū-Goto, M. Murph, Y. Lu, W. Liu, F. Zhang, S. Yu, L. C. Stephens, X. Cui, G. Murrow, K. Coombes, W. Muller, M. C. Hung, C. M. Perou, A. V. Lee, X. Fang, and G. B. Mills. 2009. 'Expression of autotaxin and lysophosphatidic acid receptors increases mammary tumorigenesis, invasion, and metastases', *Cancer Cell*, 15: 539-50.
- Llavero, F., A. Artaso, H. M. Lacerda, L. A. Parada, and J. L. Zugaza. 2016. 'Lck/PLCγ control migration and proliferation of interleukin (IL)-2-stimulated T cells via the Rac1 GTPase/glycogen phosphorylase pathway', *Cell Signal*, 28: 1713-24.
- Llavero, F., M. Luque Montoro, A. Arrazola Sastre, D. Fernandez-Moreno, H. M. Lacerda, L. A. Parada, A. Lucia, and J. L. Zugaza. 2019. 'Epidermal growth factor receptor controls glycogen phosphorylase in T cells through small GTPases of the RAS family', *J Biol Chem*, 294: 4345-58.
- Llavero, F., B. Urzelai, N. Osinalde, P. Galvez, H. M. Lacerda, L. A. Parada, and J. L. Zugaza. 2015. 'Guanine nucleotide exchange factor alphaPIX leads to activation of the Rac 1 GTPase/glycogen phosphorylase pathway in interleukin (IL)-2-stimulated T cells', *J Biol Chem*, 290: 9171-82.
- Lopez-Ramos, J. C., J. Duran, A. Gruart, J. J. Guinovart, and J. M. Delgado-Garcia. 2015. 'Role of brain glycogen in the response to hypoxia and in susceptibility to epilepsy', *Front Cell Neurosci*, 9: 431.
- Luccarini, I., C. Grossi, C. Traini, A. Fiorentini, T. Ed Dami, and F. Casamenti. 2012. 'Aβ plaque-associated glial reaction as a determinant of apoptotic neuronal death and cortical gliogenesis: a study in APP mutant mice', *Neurosci Lett*, 506: 94-9.
- Lukacs, C. M., N. G. Oikonomakos, R. L. Crowther, L. N. Hong, R. U. Kammlott, W. Levin, S. Li, C. M. Liu, D. Lucas-McGady, S. Pietranico, and L. Reik. 2006. 'The crystal structure of human muscle glycogen phosphorylase a with bound glucose and AMP: an intermediate conformation with T-state and R-state features', *Proteins*, 63: 1123-6.
- Lynch, A. M., K. J. Murphy, B. F. Deighan, J. A. O'Reilly, Y. K. Gun'ko, T. R. Cowley, R. E. Gonzalez-Reyes, and M. A. Lynch. 2010. 'The impact of glial activation in the aging brain', *Aging Dis*, 1: 262-78.
- Magistretti, P. J., and L. Pellerin. 1999. 'Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging', *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 354: 1155-63.
- Mahmoud, S., M. Gharagozloo, C. Simard, and D. Gris. 2019. 'Astrocytes Maintain Glutamate Homeostasis in the CNS by Controlling the Balance between Glutamate Uptake and Release', *Cells*, 8.
- Maillet, M., S. J. Robert, M. Cacquevel, M. Gastineau, D. Vivien, J. Bertoglio, J. L. Zugaza, R. Fischmeister, and F. Lezoualc'h. 2003. 'Crosstalk between Rap1 and Rac regulates secretion of sAPPα', *Nat Cell Biol*, 5: 633-9.

- Manterola, L., M. Hernando-Rodriguez, A. Ruiz, A. Apraiz, O. Arrizabalaga, L. Vellon, E. Alberdi, F. Cavaliere, H. M. Lacerda, S. Jimenez, L. A. Parada, C. Matute, and J. L. Zugaza. 2013. '1-42 beta-amyloid peptide requires PDK1/nPKC/Rac 1 pathway to induce neuronal death', *Transl Psychiatry*, 3: e219.
- Markiewicz, I., and B. Lukomska. 2006. 'The role of astrocytes in the physiology and pathology of the central nervous system', *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 66: 343-58.
- Marlatt, M. W., J. Bauer, E. Aronica, E. S. van Haastert, J. J. Hoozemans, M. Joels, and P. J. Lucassen. 2014. 'Proliferation in the Alzheimer hippocampus is due to microglia, not astroglia, and occurs at sites of amyloid deposition', *Neural Plast*, 2014: 693851.
- Martin-Nieto, J., and A. Villalobo. 1998. 'The human epidermal growth factor receptor contains a juxtamembrane calmodulin-binding site', *Biochemistry*, 37: 227-36.
- Mathieu, C., J. M. Dupret, and F. Rodrigues-Lima. 2019. 'The Structure and the Regulation of Glycogen Phosphorylases in Brain', *Adv Neurobiol*, 23: 125-45.
- Meller, N., M. Irani-Tehrani, W. B. Kiosses, M. A. Del Pozo, and M. A. Schwartz. 2002. 'Zizimin1, a novel Cdc42 activator, reveals a new GEF domain for Rho proteins', *Nat Cell Biol*, 4: 639-47.
- Migocka-Patrzalek, M., and M. Elias. 2021. 'Muscle Glycogen Phosphorylase and Its Functional Partners in Health and Disease', *Cells*, 10.
- Miyakawa, T., R. Kuramoto, A. Shimoji, and Y. Higuchi. 1982. 'Fine structure of inclusion body in the nucleus of Alzheimer glia type II in the brain of hepatocerebral degeneration', *Acta Neuropathol*, 56: 315-9.
- Moreels, M., F. Vandenabeele, D. Dumont, J. Robben, and I. Lambrichts. 2008. 'Alpha-smooth muscle actin (alpha-SMA) and nestin expression in reactive astrocytes in multiple sclerosis lesions: potential regulatory role of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1)', *Neuropathol Appl Neurobiol*, 34: 532-46.
- Moreira, P. I., M. S. Santos, and C. R. Oliveira. 2007. 'Alzheimer's disease: a lesson from mitochondrial dysfunction', *Antioxid Redox Signal*, 9: 1621-30.
- Morley, J. E., and S. A. Farr. 2014. 'The role of amyloid-beta in the regulation of memory', *Biochem Pharmacol*, 88: 479-85.
- Mosaddeghzadeh, N., and M. R. Ahmadian. 2021. 'The RHO Family GTPases: Mechanisms of Regulation and Signaling', *Cells*, 10.
- Muller, M. S., S. E. Pedersen, A. B. Walls, H. S. Waagepetersen, and L. K. Bak. 2015. 'Isoform-selective regulation of glycogen phosphorylase by energy deprivation and phosphorylation in astrocytes', *Glia*, 63: 154-62.
- Murali, A., and K. Rajalingam. 2014. 'Small Rho GTPases in the control of cell shape and mobility', *Cell Mol Life Sci*, 71: 1703-21.
- Nagy, Z., M. M. Esiri, A. M. Cato, and A. D. Smith. 1997. 'Cell cycle markers in the hippocampus in Alzheimer's disease', *Acta Neuropathol*, 94: 6-15.
- Nakagawa, T., and J. P. Schwartz. 2004. 'Gene expression patterns in in vivo normal adult astrocytes compared with cultured neonatal and normal adult astrocytes', *Neurochem Int*, 45: 203-42.
- Nedergaard, M., B. Ransom, and S. A. Goldman. 2003. 'New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain', *Trends Neurosci*, 26: 523-30.

- Nelson, D.L., and M.M Cox (ed.)^(eds.). 2017. *Lehninger Principles of Biochemistry* (W.H. Freeman).
- Nguyen, L. K., B. N. Kholodenko, and A. von Kriegsheim. 2018. 'Rac1 and RhoA: Networks, loops and bistability', *Small GTPases*, 9: 316-21.
- Nguyen, T. B., S. M. Louie, J. R. Daniele, Q. Tran, A. Dillin, R. Zoncu, D. K. Nomura, and J. A. Olzmann. 2017. 'DGAT1-Dependent Lipid Droplet Biogenesis Protects Mitochondrial Function during Starvation-Induced Autophagy', *Dev Cell*, 42: 9-21 e5.
- Nielsen, T. L., T. Pinos, A. Brull, J. Vissing, and T. O. Krag. 2018. 'Exercising with blocked muscle glycogenolysis: Adaptation in the McArdle mouse', *Mol Genet Metab*, 123: 21-27.
- Nishikimi, A., M. Kukimoto-Niino, S. Yokoyama, and Y. Fukui. 2013. 'Immune regulatory functions of DOCK family proteins in health and disease', *Exp Cell Res*, 319: 2343-9.
- Nomura-Komoike, K., F. Saitoh, and H. Fujieda. 2020. 'Phosphatidylserine recognition and Rac1 activation are required for Muller glia proliferation, gliosis and phagocytosis after retinal injury', *Sci Rep*, 10: 1488.
- Novak, N., V. Bar, H. Sabanay, S. Frechter, M. Jaegle, S. B. Snapper, D. Meijer, and E. Peles. 2011. 'N-WASP is required for membrane wrapping and myelination by Schwann cells', *J Cell Biol*, 192: 243-50.
- Oddo, S., A. Caccamo, M. Kitazawa, B. P. Tseng, and F. M. LaFerla. 2003. 'Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease', *Neurobiol Aging*, 24: 1063-70.
- Oddo, S., A. Caccamo, J. D. Shepherd, M. P. Murphy, T. E. Golde, R. Kaye, R. Metherate, M. P. Mattson, Y. Akbari, and F. M. LaFerla. 2003. 'Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction', *Neuron*, 39: 409-21.
- Ohtaki, S., M. Wanibuchi, Y. Kataoka-Sasaki, M. Sasaki, S. Oka, S. Noshiro, Y. Akiyama, T. Mikami, N. Mikuni, J. D. Kocsis, and O. Honmou. 2017. 'ACTC1 as an invasion and prognosis marker in glioma', *J Neurosurg*, 126: 467-75.
- Oikonomakos, N. G., L. N. Johnson, K. R. Acharya, D. I. Stuart, D. Barford, J. Hajdu, K. M. Varvill, A. E. Melpidou, T. Papageorgiou, D. J. Graves, and et al. 1987. 'Pyridoxal phosphate site in glycogen phosphorylase b: structure in native enzyme and in three derivatives with modified cofactors', *Biochemistry*, 26: 8381-9.
- Olianas, M. C., S. Dedoni, and P. Onali. 2016. 'LPA1 Mediates Antidepressant-Induced ERK1/2 Signaling and Protection from Oxidative Stress in Glial Cells', *J Pharmacol Exp Ther*, 359: 340-53.
- . 2020. 'Antidepressants induce profibrotic responses via the lysophosphatidic acid receptor LPA1', *Eur J Pharmacol*, 873: 172963.
- Ortiz-Meoz, R. F., J. Jiang, M. B. Lazarus, M. Orman, J. Janetzko, C. Fan, D. Y. Duveau, Z. W. Tan, C. J. Thomas, and S. Walker. 2015. 'A small molecule that inhibits OGT activity in cells', *ACS Chem Biol*, 10: 1392-7.
- Osaka, N., Y. Hirota, D. Ito, Y. Ikeda, R. Kamata, Y. Fujii, V. R. Chirasani, S. L. Campbell, K. Takeuchi, T. Senda, and A. T. Sasaki. 2021. 'Divergent Mechanisms Activating RAS and Small GTPases Through Post-translational Modification', *Front Mol Biosci*, 8: 707439.
- Oz, G., M. DiNuzzo, A. Kumar, A. Moheet, and E. R. Seaquist. 2015. 'Revisiting Glycogen Content in the Human Brain', *Neurochem Res*, 40: 2473-81.

- Pang, X., R. Li, D. Shi, X. Pan, C. Ma, G. Zhang, C. Mu, and W. Chen. 2017. 'Knockdown of Rhotekin 2 expression suppresses proliferation and induces apoptosis in colon cancer cells', *Oncol Lett*, 14: 8028-34.
- Park, J., H. J. Ha, E. S. Chung, S. H. Baek, Y. Cho, H. K. Kim, J. Han, J. H. Sul, J. Lee, E. Kim, J. Kim, Y. R. Yang, M. Park, S. H. Kim, T. V. Arumugam, H. Jang, S. W. Seo, P. G. Suh, and D. G. Jo. 2021. 'O-GlcNAcylation ameliorates the pathological manifestations of Alzheimer's disease by inhibiting necroptosis', *Sci Adv*, 7.
- Parpura, V., T. A. Basarsky, F. Liu, K. Jęftinija, S. Jęftinija, and P. G. Haydon. 1994. 'Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling', *Nature*, 369: 744-7.
- Parri, H. R., T. M. Gould, and V. Crunelli. 2001. 'Spontaneous astrocytic Ca²⁺ oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation', *Nat Neurosci*, 4: 803-12.
- Patterson, M.C. 2017. 'Diseases Associated with Primary Abnormalities in Carbohydrate Metabolism.' in, *Swaiman's Pediatric Neurology*.
- Pavliukeviciene, B., A. Zentelyte, M. Jankunec, G. Valiuliene, M. Talaikis, R. Navakauskiene, G. Niaura, and G. Valincius. 2019. 'Amyloid beta oligomers inhibit growth of human cancer cells', *PLoS One*, 14: e0221563.
- Pellerin, L. 2010. 'Food for thought: the importance of glucose and other energy substrates for sustaining brain function under varying levels of activity', *Diabetes Metab*, 36 Suppl 3: S59-63.
- Pellerin, L., and P. J. Magistretti. 2004. 'Neuroenergetics: calling upon astrocytes to satisfy hungry neurons', *Neuroscientist*, 10: 53-62.
- Perez-Nievas, B. G., and A. Serrano-Pozo. 2018. 'Deciphering the Astrocyte Reaction in Alzheimer's Disease', *Front Aging Neurosci*, 10: 114.
- Perrin, B. J., and J. M. Ervasti. 2010. 'The actin gene family: function follows isoform', *Cytoskeleton (Hoboken)*, 67: 630-4.
- Pfeiffer-Guglielmi, B., S. Broer, A. Broer, and B. Hamprecht. 2000. 'Isozyme pattern of glycogen phosphorylase in the rat nervous system and rat astroglia-rich primary cultures: electrophoretic and polymerase chain reaction studies', *Neurochem Res*, 25: 1485-91.
- Pfeiffer-Guglielmi, B., B. Fleckenstein, G. Jung, and B. Hamprecht. 2003. 'Immunocytochemical localization of glycogen phosphorylase isozymes in rat nervous tissues by using isozyme-specific antibodies', *J Neurochem*, 85: 73-81.
- Pike, C. J., M. J. Overman, and C. W. Cotman. 1995. 'Amino-terminal deletions enhance aggregation of beta-amyloid peptides in vitro', *J Biol Chem*, 270: 23895-8.
- Pinacho, R., E. Vila, R. Prades, T. Tarrago, E. Castro, I. Ferrer, and B. Ramos. 2016. 'The glial phosphorylase of glycogen isoform is reduced in the dorsolateral prefrontal cortex in chronic schizophrenia', *Schizophr Res*, 177: 37-43.
- Prats, C., T. E. Graham, and J. Shearer. 2018. 'The dynamic life of the glycogen granule', *J Biol Chem*, 293: 7089-98.
- Puzzo, D., and O. Arancio. 2013. 'Amyloid-beta peptide: Dr. Jekyll or Mr. Hyde?', *J Alzheimers Dis*, 33 Suppl 1: S111-20.
- Querfurth, H. W., and F. M. LaFerla. 2010. 'Alzheimer's disease', *N Engl J Med*, 362: 329-44.
- Quinlivan, R., J. Buckley, M. James, A. Twist, S. Ball, M. Duno, J. Vissing, C. Bruno, D. Cassandrini, M. Roberts, J. Winer, M. Rose, and C. Sewry. 2010. 'McArdle disease: a clinical review', *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 81: 1182-8.

- Racchetti, G., R. D'Alessandro, and J. Meldolesi. 2012. 'Astrocyte stellation, a process dependent on Rac1 is sustained by the regulated exocytosis of enlargeosomes', *Glia*, 60: 465-75.
- Raftopoulou, M., and A. Hall. 2004. 'Cell migration: Rho GTPases lead the way', *Dev Biol*, 265: 23-32.
- Ramakers, G. J., and W. H. Moolenaar. 1998. 'Regulation of astrocyte morphology by RhoA and lysophosphatidic acid', *Exp Cell Res*, 245: 252-62.
- Rambold, A. S., S. Cohen, and J. Lippincott-Schwartz. 2015. 'Fatty acid trafficking in starved cells: regulation by lipid droplet lipolysis, autophagy, and mitochondrial fusion dynamics', *Dev Cell*, 32: 678-92.
- Ramesh, S., M. Govindarajulu, V. Suppiramaniam, T. Moore, and M. Dhanasekaran. 2018. 'Autotaxin(-)Lysophosphatidic Acid Signaling in Alzheimer's Disease', *Int J Mol Sci*, 19.
- Raychaudhuri, M., and D. Mukhopadhyay. 2007. 'AICD and its adaptors - in search of new players', *J Alzheimers Dis*, 11: 343-58.
- Reid, T., T. Furuyashiki, T. Ishizaki, G. Watanabe, N. Watanabe, K. Fujisawa, N. Morii, P. Madaule, and S. Narumiya. 1996. 'Rhotekin, a new putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN, and rhophilin in the rho-binding domain', *J Biol Chem*, 271: 13556-60.
- Richter, F., H. J. Bohme, and E. Hofmann. 1983. 'Developmental changes of glycogen phosphorylase b isozymes in rat tissues', *Biomed Biochim Acta*, 42: 1229-35.
- Rivers, E., and A. J. Thrasher. 2017. 'Wiskott-Aldrich syndrome protein: Emerging mechanisms in immunity', *Eur J Immunol*, 47: 1857-66.
- Rodríguez-Arellano, J.J., V. Parpura, R. Zorec, and A. Verkhratsky. 2015. 'Astrocytes in physiological ageing and Alzheimer's disease', *Neuroscience*.
- Roepstorff, K., I. Rasmussen, M. Sawada, C. Cudre-Maroux, P. Salmon, G. Bokoch, B. van Deurs, and F. Vilhardt. 2008. 'Stimulus-dependent regulation of the phagocyte NADPH oxidase by a VAV1, Rac1, and PAK1 signaling axis', *J Biol Chem*, 283: 7983-93.
- Rojas, A. M., G. Fuentes, A. Rausell, and A. Valencia. 2012. 'The Ras protein superfamily: evolutionary tree and role of conserved amino acids', *J Cell Biol*, 196: 189-201.
- Ropert, N., A. Jalil, and D. Li. 2016. 'Expression and cellular function of vSNARE proteins in brain astrocytes', *Neuroscience*, 323: 76-83.
- Roux, P. P., and J. Blenis. 2004. 'ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions', *Microbiol Mol Biol Rev*, 68: 320-44.
- Rozengurt, E. 2007. 'Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors', *J Cell Physiol*, 213: 589-602.
- Sahay, D., R. Leblanc, T. G. Grunewald, S. Ambatipudi, J. Ribeiro, P. Clezardin, and O. Peyruchaud. 2015. 'The LPA1/ZEB1/miR-21-activation pathway regulates metastasis in basal breast cancer', *Oncotarget*, 6: 20604-20.
- Salinero, O., M. T. Moreno-Flores, M. L. Ceballos, and F. Wandosell. 1997. 'beta-Amyloid peptide induced cytoskeletal reorganization in cultured astrocytes', *J Neurosci Res*, 47: 216-23.
- Sampedro-Piquero, P., P. De Bartolo, L. Petrosini, C. Zancada-Menendez, J. L. Arias, and A. Begega. 2014. 'Astrocytic plasticity as a possible mediator of the cognitive improvements after environmental enrichment in aged rats', *Neurobiol Learn Mem*, 114: 16-25.

- Sanchez-Gonzalez, P., K. Jellali, and A. Villalobo. 2010. 'Calmodulin-mediated regulation of the epidermal growth factor receptor', *FEBS J*, 277: 327-42.
- Sandrock, K., H. Bielek, K. Schradi, G. Schmidt, and N. Klugbauer. 2010. 'The nuclear import of the small GTPase Rac1 is mediated by the direct interaction with karyopherin alpha2', *Traffic*, 11: 198-209.
- Santos, A. N., M. Ewers, L. Minthon, A. Simm, R. E. Silber, K. Blennow, D. Prvulovic, O. Hansson, and H. Hampel. 2012. 'Amyloid-beta oligomers in cerebrospinal fluid are associated with cognitive decline in patients with Alzheimer's disease', *J Alzheimers Dis*, 29: 171-6.
- Sato, K., K. Satoh, T. Sato, F. Imai, and H. P. Morris. 1976. 'Isozyme patterns of glycogen phosphorylase in rat tissues and transplantable hepatomas', *Cancer Res*, 36: 487-95.
- Schiweck, J., B. J. Eickholt, and K. Murk. 2018. 'Important Shapeshifter: Mechanisms Allowing Astrocytes to Respond to the Changing Nervous System During Development, Injury and Disease', *Front Cell Neurosci*, 12: 261.
- Schmidt, A., and A. Hall. 2002. 'Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch', *Genes Dev*, 16: 1587-609.
- Schnier, J. B., K. Nishi, A. Monks, F. A. Gorin, and E. M. Bradbury. 2003. 'Inhibition of glycogen phosphorylase (GP) by CP-91,149 induces growth inhibition correlating with brain GP expression', *Biochem Biophys Res Commun*, 309: 126-34.
- Schreurs, M. P., C. A. Hubel, I. M. Bernstein, A. Jeyabalan, and M. J. Cipolla. 2013. 'Increased oxidized low-density lipoprotein causes blood-brain barrier disruption in early-onset preeclampsia through LOX-1', *FASEB J*, 27: 1254-63.
- Schubert, D., T. Soucek, and B. Blouw. 2009. 'The induction of HIF-1 reduces astrocyte activation by amyloid beta peptide', *Eur J Neurosci*, 29: 1323-34.
- Sedlakova, I., J. Vavrova, J. Tosner, and L. Hanousek. 2011. 'Lysophosphatidic acid (LPA)-a perspective marker in ovarian cancer', *Tumour Biol*, 32: 311-6.
- Selkoe, D. J. 2004. 'Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases', *Nat Cell Biol*, 6: 1054-61.
- Selkoe, D. J., and J. Hardy. 2016. 'The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years', *EMBO Mol Med*, 8: 595-608.
- Serrano-Pozo, A., S. Das, and B. T. Hyman. 2021. 'APOE and Alzheimer's disease: advances in genetics, pathophysiology, and therapeutic approaches', *Lancet Neurol*, 20: 68-80.
- Shi, H. B., B. Tang, Y. W. Liu, X. F. Wang, and G. J. Chen. 2015. 'Alzheimer disease and cancer risk: a meta-analysis', *J Cancer Res Clin Oncol*, 141: 485-94.
- Shi, J., Y. Dong, M. Z. Cui, and X. Xu. 2013. 'Lysophosphatidic acid induces increased BACE1 expression and Aβ formation', *Biochim Biophys Acta*, 1832: 29-38.
- Shida, D., T. Watanabe, J. Aoki, K. Hama, J. Kitayama, H. Sonoda, Y. Kishi, H. Yamaguchi, S. Sasaki, A. Sako, T. Konishi, H. Arai, and H. Nagawa. 2004. 'Aberrant expression of lysophosphatidic acid (LPA) receptors in human colorectal cancer', *Lab Invest*, 84: 1352-62.
- Sillaber, I., M. Panhuysen, M. S. Henniger, F. Ohl, C. Kuhne, B. Putz, T. Pohl, J. M. Deussing, M. Paez-Pereda, and F. Holsboer. 2008. 'Profiling of behavioral changes and hippocampal gene expression in mice chronically treated with the SSRI paroxetine', *Psychopharmacology (Berl)*, 200: 557-72.

- Simpson, I. A., K. R. Chundu, T. Davies-Hill, W. G. Honer, and P. Davies. 1994. 'Decreased concentrations of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in the brains of patients with Alzheimer's disease', *Ann Neurol*, 35: 546-51.
- Skurat, A. V., D. M. Segvich, A. A. DePaoli-Roach, and P. J. Roach. 2017. 'Novel method for detection of glycogen in cells', *Glycobiology*, 27: 416-24.
- Sofroniew, M. V. 2014. 'Astrogliosis', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7: a020420.
- . 2020. 'Astrocyte Reactivity: Subtypes, States, and Functions in CNS Innate Immunity', *Trends Immunol*, 41: 758-70.
- Sofroniew, M. V., and H. V. Vinters. 2010. 'Astrocytes: biology and pathology', *Acta Neuropathol*, 119: 7-35.
- Song, S., W. Cong, S. Zhou, Y. Shi, W. Dai, H. Zhang, X. Wang, B. He, and Q. Zhang. 2019. 'Small GTPases: Structure, biological function and its interaction with nanoparticles', *Asian J Pharm Sci*, 14: 30-39.
- Soria López, J.A., H.M. González, and G.C. Léger (ed.)^(eds.). 2019. *Alzheimer's disease* (Elsevier B.V.).
- Stateva, S. R., and A. Villalobo. 2015. 'O-GlcNAcylation of the human epidermal growth factor receptor', *Org Biomol Chem*, 13: 8196-204.
- Sun, R. C., V. V. Dukhande, Z. Zhou, L. E. A. Young, S. Emanuelle, C. F. Brainson, and M. S. Gentry. 2019. 'Nuclear Glycogenolysis Modulates Histone Acetylation in Human Non-Small Cell Lung Cancers', *Cell Metab*, 30: 903-16 e7.
- Suresh, R., and R. J. Diaz. 2021. 'The remodelling of actin composition as a hallmark of cancer', *Transl Oncol*, 14: 101051.
- Sutherland, E. W., and C. F. Cori. 1951. 'Effect of hyperglycemic-glycogenolytic factor and epinephrine on liver phosphorylase', *J Biol Chem*, 188: 531-43.
- Suzuki, A., S. A. Stern, O. Bozdagi, G. W. Huntley, R. H. Walker, P. J. Magistretti, and C. M. Alberini. 2011. 'Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation', *Cell*, 144: 810-23.
- Sztul, E., P. W. Chen, J. E. Casanova, J. Cherfils, J. B. Dacks, D. G. Lambright, F. S. Lee, P. A. Randazzo, L. C. Santy, A. Schurmann, I. Wilhelmi, M. E. Yohe, and R. A. Kahn. 2019. 'ARF GTPases and their GEFs and GAPs: concepts and challenges', *Mol Biol Cell*, 30: 1249-71.
- Takagi, M., T. Fukui, and S. Shimomura. 1982. 'Catalytic mechanism of glycogen phosphorylase: pyridoxal(5')diphospho(1)-alpha-D-glucose as a transition-state analogue', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79: 3716-9.
- Tang, B. L. 2020. 'Glucose, glycolysis, and neurodegenerative diseases', *J Cell Physiol*, 235: 7653-62.
- Tarczyluk, M. A., D. A. Nagel, H. Rhein Parri, E. H. Tse, J. E. Brown, M. D. Coleman, and E. J. Hill. 2015. 'Amyloid beta 1-42 induces hypometabolism in human stem cell-derived neuron and astrocyte networks', *J Cereb Blood Flow Metab*, 35: 1348-57.
- Tashiro, A., J. Goldberg, and R. Yuste. 2002. 'Calcium oscillations in neocortical astrocytes under epileptiform conditions', *J Neurobiol*, 50: 45-55.
- Taylor, R. P., G. J. Parker, M. W. Hazel, Y. Soesanto, W. Fuller, M. J. Yazzie, and D. A. McClain. 2008. 'Glucose deprivation stimulates O-GlcNAc modification of proteins through up-regulation of O-linked N-acetylglucosaminyltransferase', *J Biol Chem*, 283: 6050-7.
- Tnimov, Z., Z. Guo, Y. Gambin, U. T. Nguyen, Y. W. Wu, D. Abankwa, A. Stigter, B. M. Collins, H. Waldmann, R. S. Goody, and K. Alexandrov. 2012. 'Quantitative

- analysis of prenylated RhoA interaction with its chaperone, RhoGDI', *J Biol Chem*, 287: 26549-62.
- Tomiyama, T., S. Matsuyama, H. Iso, T. Umeda, H. Takuma, K. Ohnishi, K. Ishibashi, R. Teraoka, N. Sakama, T. Yamashita, K. Nishitsuji, K. Ito, H. Shimada, M. P. Lambert, W. L. Klein, and H. Mori. 2010. 'A mouse model of amyloid beta oligomers: their contribution to synaptic alteration, abnormal tau phosphorylation, glial activation, and neuronal loss in vivo', *J Neurosci*, 30: 4845-56.
- Uno, K., S. Shimada, J. Tsuruta, H. Matsuzaki, S. Tashima, and M. Ogawa. 1998. 'Nuclear localization of brain-type glycogen phosphorylase in some gastrointestinal carcinoma', *Histochem J*, 30: 553-9.
- Valdes-Rives, S. A., D. Arcos-Montoya, M. de la Fuente-Granada, C. J. Zamora-Sanchez, L. E. Arias-Romero, O. Villamar-Cruz, I. Camacho-Arroyo, S. M. Perez-Tapia, and A. Gonzalez-Arenas. 2021. 'LPA1 Receptor Promotes Progesterone Receptor Phosphorylation through PKCalpha in Human Glioblastoma Cells', *Cells*, 10.
- Valles-Ortega, J., J. Duran, M. Garcia-Rocha, C. Bosch, I. Saez, L. Pujadas, A. Serafin, X. Canas, E. Soriano, J. M. Delgado-Garcia, A. Gruart, and J. J. Guinovart. 2011. 'Neurodegeneration and functional impairments associated with glycogen synthase accumulation in a mouse model of Lafora disease', *EMBO Mol Med*, 3: 667-81.
- van Dam, T. J., J. L. Bos, and B. Snel. 2011. 'Evolution of the Ras-like small GTPases and their regulators', *Small GTPases*, 2: 4-16.
- van Meer, G., D. R. Voelker, and G. W. Feigenson. 2008. 'Membrane lipids: where they are and how they behave', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9: 112-24.
- Vehmas, A. K., C. H. Kawas, W. F. Stewart, and J. C. Troncoso. 2003. 'Immune reactive cells in senile plaques and cognitive decline in Alzheimer's disease', *Neurobiol Aging*, 24: 321-31.
- Vilchez, D., S. Ros, D. Cifuentes, L. Pujadas, J. Valles, B. Garcia-Fojeda, O. Criado-Garcia, E. Fernandez-Sanchez, I. Medrano-Fernandez, J. Dominguez, M. Garcia-Rocha, E. Soriano, S. Rodriguez de Cordoba, and J. J. Guinovart. 2007. 'Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy', *Nat Neurosci*, 10: 1407-13.
- Virchow, R. 1858. *Die cellularpathologie in ihrer begründung auf physiologische und pathologische* (Berlin).
- von Rotz, R. C., B. M. Kohli, J. Bosset, M. Meier, T. Suzuki, R. M. Nitsch, and U. Konietzko. 2004. 'The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor', *J Cell Sci*, 117: 4435-48.
- Walker, T. L., R. W. Overall, S. Vogler, A. M. Sykes, S. Ruhwald, D. Lasse, M. Ichwan, K. Fabel, and G. Kempermann. 2016. 'Lysophosphatidic Acid Receptor Is a Functional Marker of Adult Hippocampal Precursor Cells', *Stem Cell Reports*, 6: 552-65.
- Walsh, D. M., E. Thulin, A. M. Minogue, N. Gustavsson, E. Pang, D. B. Teplow, and S. Linse. 2009. 'A facile method for expression and purification of the Alzheimer's disease-associated amyloid beta-peptide', *FEBS J*, 276: 1266-81.
- Wang, J., Y. Sun, J. Qu, Y. Yan, Y. Yang, and H. Cai. 2016. 'Roles of LPA receptor signaling in breast cancer', *Expert Rev Mol Diagn*, 16: 1103-11.

- Wang, Q., D. M. Walsh, M. J. Rowan, D. J. Selkoe, and R. Anwyl. 2004. 'Block of long-term potentiation by naturally secreted and synthetic amyloid beta-peptide in hippocampal slices is mediated via activation of the kinases c-Jun N-terminal kinase, cyclin-dependent kinase 5, and p38 mitogen-activated protein kinase as well as metabotropic glutamate receptor type 5', *J Neurosci*, 24: 3370-8.
- Wang, S., F. Yang, V. A. Petyuk, A. K. Shukla, M. E. Monroe, M. A. Gritsenko, K. D. Rodland, R. D. Smith, W. J. Qian, C. X. Gong, and T. Liu. 2017. 'Quantitative proteomics identifies altered O-GlcNAcylation of structural, synaptic and memory-associated proteins in Alzheimer's disease', *J Pathol*, 243: 78-88.
- Wang, Z. V., Y. Deng, N. Gao, Z. Pedrozo, D. L. Li, C. R. Morales, A. Criollo, X. Luo, W. Tan, N. Jiang, M. A. Lehrman, B. A. Rothermel, A. H. Lee, S. Lavandero, P. P. A. Mammen, A. Ferdous, T. G. Gillette, P. E. Scherer, and J. A. Hill. 2014. 'Spliced X-box binding protein 1 couples the unfolded protein response to hexosamine biosynthetic pathway', *Cell*, 156: 1179-92.
- Waraich, R. S., C. Weigert, H. Kalbacher, A. M. Hennige, S. Z. Lutz, H. U. Haring, E. D. Schleicher, W. Voelter, and R. Lehmann. 2008. 'Phosphorylation of Ser357 of rat insulin receptor substrate-1 mediates adverse effects of protein kinase C-delta on insulin action in skeletal muscle cells', *J Biol Chem*, 283: 11226-33.
- Warner, H., B. J. Wilson, and P. T. Caswell. 2019. 'Control of adhesion and protrusion in cell migration by Rho GTPases', *Curr Opin Cell Biol*, 56: 64-70.
- Waters, C. M., B. Saatian, N. A. Moughal, Y. Zhao, G. Tigyi, V. Natarajan, S. Pyne, and N. J. Pyne. 2006. 'Integrin signalling regulates the nuclear localization and function of the lysophosphatidic acid receptor-1 (LPA1) in mammalian cells', *Biochem J*, 398: 55-62.
- Weidemann, A., S. Eggert, F. B. Reinhard, M. Vogel, K. Paliga, G. Baier, C. L. Masters, K. Beyreuther, and G. Evin. 2002. 'A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing', *Biochemistry*, 41: 2825-35.
- Wennerberg, K., K. L. Rossman, and C. J. Der. 2005. 'The Ras superfamily at a glance', *J Cell Sci*, 118: 843-6.
- Wharton, S. B., G. H. Williams, K. Stoeber, C. H. Gelsthorpe, L. Baxter, A. L. Johnson, P. G. Ince, and Cfas Mrc. 2005. 'Expression of Ki67, PCNA and the chromosome replication licensing protein Mcm2 in glial cells of the ageing human hippocampus increases with the burden of Alzheimer-type pathology', *Neurosci Lett*, 383: 33-8.
- White, R. S., R. B. Lipton, C. B. Hall, and J. R. Steinerman. 2013. 'Nonmelanoma skin cancer is associated with reduced Alzheimer disease risk', *Neurology*, 80: 1966-72.
- Wilson, L. H., J. H. Cho, A. Estrella, J. A. Smyth, R. Wu, T. Chengsupanimit, L. M. Brown, D. A. Weinstein, and Y. M. Lee. 2019. 'Liver Glycogen Phosphorylase Deficiency Leads to Profibrogenic Phenotype in a Murine Model of Glycogen Storage Disease Type VI', *Hepatol Commun*, 3: 1544-55.
- Wu, W., X. Zheng, J. Wang, T. Yang, W. Dai, S. Song, L. Fang, Y. Wang, and J. Gu. 2018. 'O-GlcNAcylation on Rab3A attenuates its effects on mitochondrial oxidative phosphorylation and metastasis in hepatocellular carcinoma', *Cell Death Dis*, 9: 970.

- Wu, Y., Z. G. Liu, M. Q. Shi, H. Z. Yu, X. Y. Jiang, A. H. Yang, X. S. Fu, Y. Xu, S. Yang, H. Ni, S. J. Shen, and W. D. Li. 2017. 'Identification of ACTG2 functions as a promoter gene in hepatocellular carcinoma cells migration and tumor metastasis', *Biochem Biophys Res Commun*, 491: 537-44.
- Wyssenbach, A., T. Quintela, F. Llaverro, J. L. Zugaza, C. Matute, and E. Alberdi. 2016. 'Amyloid beta-induced astrogliosis is mediated by beta1-integrin via NADPH oxidase 2 in Alzheimer's disease', *Aging Cell*, 15: 1140-52.
- Xia, S., Z. Zhou, C. Leung, Y. Zhu, X. Pan, J. Qi, M. Morena, M. N. Hill, W. Xie, and Z. Jia. 2016. 'p21-activated kinase 1 restricts tonic endocannabinoid signaling in the hippocampus', *Elife*, 5.
- Xiang, H., Y. Lu, M. Shao, and T. Wu. 2020. 'Lysophosphatidic Acid Receptors: Biochemical and Clinical Implications in Different Diseases', *J Cancer*, 11: 3519-35.
- Xiao, D., X. Su, H. Gao, X. Li, and Y. Qu. 2021. 'The Roles of Lpar1 in Central Nervous System Disorders and Diseases', *Front Neurosci*, 15: 710473.
- Xie, F., S. Shao, A. U. R. Aziz, B. Zhang, H. Wang, and B. Liu. 2017. 'Role of Rho-specific guanine nucleotide dissociation inhibitor alpha regulation in cell migration', *Acta Histochem*, 119: 183-89.
- Xu, L., L. H. Zeng, and M. Wong. 2009. 'Impaired astrocytic gap junction coupling and potassium buffering in a mouse model of tuberous sclerosis complex', *Neurobiol Dis*, 34: 291-9.
- Xu, M., H. Yin, Y. Cai, W. Huang, Q. Ji, F. Liu, S. Shi, and X. Deng. 2019. 'Lysophosphatidic acid induces integrin beta6 expression in human oral squamous cell carcinomas cells via LPAR1 coupling to Galphai and downstream SMAD3 and ETS-1 activation', *Cell Signal*, 60: 81-90.
- Yan, X., Y. Hu, B. Wang, S. Wang, and X. Zhang. 2020. 'Metabolic Dysregulation Contributes to the Progression of Alzheimer's Disease', *Front Neurosci*, 14: 530219.
- Yang, X. Y., E. Y. Zhao, W. X. Zhuang, F. X. Sun, H. L. Han, H. R. Han, Z. J. Lin, Z. F. Pan, M. H. Qu, X. W. Zeng, and Y. Ding. 2015. 'LPA signaling is required for dopaminergic neuron development and is reduced through low expression of the LPA1 receptor in a 6-OHDA lesion model of Parkinson's disease', *Neurol Sci*, 36: 2027-33.
- Yarchoan, M., B. D. James, R. C. Shah, Z. Arvanitakis, R. S. Wilson, J. Schneider, D. A. Bennett, and S. E. Arnold. 2017. 'Association of Cancer History with Alzheimer's Disease Dementia and Neuropathology', *J Alzheimers Dis*, 56: 699-706.
- Yeo, D., H. He, G. S. Baldwin, and M. Nikfarjam. 2015. 'The role of p21-activated kinases in pancreatic cancer', *Pancreas*, 44: 363-9.
- Young, F. G. 1957. 'Claude Bernard and the discovery of glycogen; a century of retrospect', *Br Med J*, 1: 1431-7.
- Yung, Y. C., N. C. Stoddard, and J. Chun. 2014. 'LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology', *J Lipid Res*, 55: 1192-214.
- Yung, Y. C., N. C. Stoddard, H. Mirendil, and J. Chun. 2015. 'Lysophosphatidic Acid signaling in the nervous system', *Neuron*, 85: 669-82.
- Yuzwa, S. A., M. S. Macauley, J. E. Heinonen, X. Shan, R. J. Dennis, Y. He, G. E. Whitworth, K. A. Stubbs, E. J. McEachern, G. J. Davies, and D. J. Vocadlo. 2008. 'A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo', *Nat Chem Biol*, 4: 483-90.

- Yuzwa, S. A., and D. J. Vocadlo. 2014. 'O-GlcNAc and neurodegeneration: biochemical mechanisms and potential roles in Alzheimer's disease and beyond', *Chem Soc Rev*, 43: 6839-58.
- . 2017. 'Production of O-GlcNAc Modified Recombinant Tau in E. coli and Detection of Ser400 O-GlcNAc Tau In Vivo', *Methods Mol Biol*, 1523: 237-48.
- Zachara, N. E., and G. W. Hart. 2004. 'O-GlcNAc a sensor of cellular state: the role of nucleocytoplasmic glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress', *Biochim Biophys Acta*, 1673: 13-28.
- Zamanian, J. L., L. Xu, L. C. Foo, N. Nouri, L. Zhou, R. G. Giffard, and B. A. Barres. 2012. 'Genomic analysis of reactive astrogliosis', *J Neurosci*, 32: 6391-410.
- Zeug, A., F. E. Muller, S. Anders, M. K. Herde, D. Minge, E. Ponimaskin, and C. Henneberger. 2018. 'Control of astrocyte morphology by Rho GTPases', *Brain Res Bull*, 136: 44-53.
- Zhang, W., Z. Liang, and J. Li. 2016. 'Inhibition of rhotekin exhibits antitumor effects in lung cancer cells', *Oncol Rep*, 35: 2529-34.
- Zhao, C. Y., C. H. Hua, C. H. Li, R. Z. Zheng, and X. Y. Li. 2021. 'High PYGL Expression Predicts Poor Prognosis in Human Gliomas', *Front Neurol*, 12: 652931.
- Zhao, H., J. Zhu, K. Cui, X. Xu, M. O'Brien, K. K. Wong, S. Kesari, W. Xia, and S. T. Wong. 2009. 'Bioluminescence imaging reveals inhibition of tumor cell proliferation by Alzheimer's amyloid beta protein', *Cancer Cell Int*, 9: 15.
- Zheng, H., and E. H. Koo. 2011. 'Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein', *Mol Neurodegener*, 6: 27.
- Zheng, Y., and L. A. Quilliam. 2003. 'Activation of the Ras superfamily of small GTPases. Workshop on exchange factors', *EMBO Rep*, 4: 463-8.
- Zhou, J., Y. Zhang, Y. Qi, D. Yu, Q. Shao, and J. Liang. 2017. 'MicroRNA-152 inhibits tumor cell growth by directly targeting RTKN in hepatocellular carcinoma', *Oncol Rep*, 37: 1227-34.