



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

MEDIKUNTZA
ETA ERIZAINNTZA
FAKULTATEA
FACULTAD
DE MEDICINA
Y ENFERMERÍA

Oligodendrozoen RNAren metabolismoaren eta itzulpenaren dinamiken alterazioak identifikatzen Alzheimer gaixotasunean

Adhara Gaminde Blasco

2023

Zuzendaria:

Dra. Elena Alberdi Alfonso

Zuzendarikidea:

Dra. Jimena Baleriola Gómez de Pablos

Edukien taula

LABURDURAK.....	V
SARRERA	1
1. Oligodendrozitoak	1
1.1 Oligodendrozitoen desberdintzapena	1
1.2 Oligodendrozitoen morfologia.....	4
1.3 Oligodendrozitoen funtzioak	5
2. Oligodendrozitoen mielinizazioa	7
2.1 Mielina	10
2.2 Mielinaren trinkotzea.....	12
2.3 Mielinaren berritzea eta plastikotasuna	12
3. Mielinaren oinarriko proteina: MBP	13
3.1 MBParen funtzioa	14
3.2 MBParen sintesia: mRNAren garraioa eta itzulpena.....	15
4. Alzheimer gaixotasuna	17
4.1 β -amiloide peptidoa	19
5. Alzheimerra eta substantzia zuria.....	20
5.1 Oligodendrozitoak eta β -amiloide peptidoa	21
5.2 Oligodendrozitoak eta AG animalia-ereduak.....	22
5.3 Oligodendrozitoak eta mielina AG pazientetan	24
HIPOTESI ETA HELBURUAK.....	27
MATERIAL ETA METODOAK	28
1. Animaliak	28
1.1 Saguak eta arratoiak.....	28
1.2 Zebra-arraina	28
2. Kultibo zelularrak.....	29
2.1 Oligodendrozito kortikalen kultibo primarioa.....	29
2.2 Neurona hipokanpalen kultibo primarioa	30
2.3 Hipokanpoko kultibo organotipikoa	31
3. Giza-laginak.....	31
4. A β oligomeroen prestaketa.....	32
5. Inhibitzaileak eta geneen isilpena siRNA bidez.....	33
6. Proteina estraktuen prestaketa and western blot bidezko detekzioa	33
6.1 Oligodendrozitoen proteinen prestaketa.....	33
6.2 Animalia-ehunen proteinen prestaketa	34

6.3 Western blot-a	34
7. Immunoprezipitazioa	36
7.1 Ko-immunoprezipitazioa	36
7.2 Immunoprezipitazioa	36
7.3 RNA immunoprezipitazioa (RIP).....	37
8. Immunoentseguak.....	38
8.1 Oligodendrozitoen eta neuronen kultibo primarioak	38
8.2 Ebakidura organotipikoak	38
8.3 Ebakidura akutuak.....	39
8.4 Saguen ehunak.....	39
8.5 Parafinan enbeditutako giza sekzioak	40
8.6 Analisi immunokimikoak.....	40
9. Puromizinare hurbiltasun-loturaren proba (Puro-PLA)	42
10. Nanofibretan hazitako oligodendrozitoen desberdintzapen entsegua	43
11. Mikroskopia elektronikoa	44
12. Injekzio intrahipokanpalak sagu helduetan	45
13. Magnetikoki aktibatutako sailkapen zelularra (MACS)	45
14. RNAREN erauzketa eta kuantifikazioa	46
14.1 RNA erauzketa	46
14.2 Alderantzizko transkripzioa and polimerasaren kate-erreakzio kuantitatiboa (RT-qPCR).....	46
14.3 RNA-seq	47
15. RNAREN hibridazioa.....	50
16. Entsegu immunoentzimatikoa (ELISA).....	50
17. Besikula estrazelularren (BE) purifikazioa	51
18. <i>In vivoko</i> irudien hartzea denbora errealean	51
18.1 Fluorescent recovery after photobleaching (FRAP)	51
18.2 Kaltzio zitosolikoaren neurketa oligodendrozito kultiboetan	53
18.3 Kaltzio zitosolikoaren neurketa kultibo organotipikoetan	53
18.4 Mielina zorroen bisualizazioa zebra-arrainean	54
19. Analisi estatistikoak.....	54
EMAITZAK	55
I. PARTEA: Oligodendrozitoen erantzun transkriptomiko diferentziala Alzheimer patologiaren aurrean.....	55
1.1 A β_{1-42} oligomeroek oligodendrozitoen transkriptoma aldatzen dute <i>in vitro</i>	55
1.2 A β_0 -rekin tratatuko eta 3xTg-AG-etik isolatutako oligodendrozitoen arteko analisi konparatiboa	58

2.3 A β -rekin tratatutako, 3xTg-AG-ko eta AGko oligodendrozoen arteko analisi konparatiboa	60
II. PARTEA: A β ₁₋₄₂ oligomeroen efektua RNAREN metabolismoan eta itzulpen lokalean.....	63
2.1 Fase goiztiarreko AG pazienteen hipokanpoek hnRNP A2 mailen handipena erakusten dute	63
2.2 hnRNP A2 gain-erregulatuta dago 3xTg-AG-ren hipokanpoan eta A β -injektatutako saguetan.....	64
2.3 A β ₁₋₄₂ oligomeroek hnRNP A2ren adierazpena gain-erregulatzen dute	67
2.4 A β ₁₋₄₂ oligomeroek hnRNP A2ren interaktoma aldatzen dute.....	68
2.5 A β ₁₋₄₂ oligomeroek hnRNP A2 eta <i>Mbp/Mobp</i> mRNAREN arteko elkarrekintza sustatzen dute	72
2.6 A β ₁₋₄₂ oligomeroek hnRNPA2ren fosforilazioa eragiten dute <i>Mbp</i> eta <i>Mobp</i> -ren itzulpen lokala sustatuz.....	73
2.7 A β ₁₋₄₂ oligomeroek <i>Mbp</i> eta <i>Mobp</i> -ren RNA granuluen kopurua eta dinamika aldatzen dute.....	76
2.8 A β ₁₋₄₂ oligomeroek desberdintzapen-markatzaileak gain-erregulatzen ditu <i>in vitro</i>	79
2.9 3xTg-AG-ko sagu helduek MBP eta MOBP maila handiagoak erakusten dituzte hipokanpoan eta mielinan	81
2.10 MBPAREN gainadierazpena oligodendrozoen funtzioak aldarazten ditu	84
2.10.1 MBPAREN gainadierazpenak kaltzioaren sarrera inhibitzen du.....	84
2.10.2 A β ₁₋₄₂ oligomeroek kaltzioaren sarrera inhibitzen dute ebaketa organotipiko hipokanpaletan.....	86
2.10.3 MBPAREN gainadierazpenak proteinen sintesia sustatzen du.....	87
PART III: A β ₁₋₄₂ oligomeroen efektua aktinaren dinamikan eta mielinizazioan	90
3.1 A β ₁₋₄₂ oligomeroen efektua aktinaren dinamikan <i>in vitro</i>	90
3.1.1 A β ₁₋₄₂ oligomeroak oligodendrozoen morfologia aldatzen dute	90
3.1.2 A β ₁₋₄₂ oligomeroek aktinaren dinamika sustatzen dute.....	93
3.1.3 A β ₁₋₄₂ oligomeroak F eta G-aktina ratioa aldatzen du kofilinaren bidez	94
3.2 A β ₁₋₄₂ oligomeroen efektua <i>in vivo</i> mielinizazioan	96
3.2.1 3xTg-AG saguen hipokanpoek mielina lodiagoa dute.....	97
3.2.2 A β -ekin injektatutako zebra-arrainek mielinizazioan aldaketak dituzte	97
IV. partea: Kontrol eta A β -rekin tratatutako oligodendrozoetatik eratorritako besikula estrazelularren deskribapena eta efektua.....	102
4.1 A β ₁₋₄₂ oligomeroak besikula estrazelularren askapena estimulatzen du oligodendrozoetan	102
4.2 Oligodendrozoen BEEN eragina neuronetan	104
EZTABAIDA.....	110
1. A β -ekin tratatutako oligodendrozoek energia eta kolesterol metabolismoan alterazioak erakusten dituzte	110

2. A β -ekin tratatutako oligodendroitoek hnRNP A2 eta RNAREN metabolismoan aldaketak erakusten dituzte	112
3. A β oligomeroek MBP eta MOBPren itzulpen lokala sustatzen dute RNA granuluen dinamika aldatuz	115
4. MBP and MOBP gain-erregulatuta daude 3xTg-AG sagu helduan.....	117
5. MBP gainadierazpenak kaltzioaren sarrera inhibitu eta proteinen sintesia sustatzen du	119
6. A β oligomeroek oligodendroitoen morfologia aldatzen dute aktina zitoeskeletoaren berrantolaketaren bidez.....	121
7. A β oligomeroek mielinizazioa bultzatzen dute <i>in vivo</i>	122
8. A β oligomeroek besikula estrazelularren askapena sustatzen dute eta hauek ondorio funtzionalak dituzte neuronetan	123
9. Azken oharrak.....	125
ONDORIOAK.....	128
ERREFERENTZIAK	130

LABURDURAK

3xTg-AG	Mutazio hirukoitza duen AGren sagu eredua
3'UTR	3' itzuli gabeko eskualdea
5XFAD	AGren sagu eredua bost mutazioekin
A2RE	<i>Cis-acting sequence A2-reponse element</i>
aCSF	Garuneko likido artifiziala
ACTB	β -aktina
AG	Alzheimer gaixotasuna
AICD	APPren domeinu intrazitoplasmatikoa
Akt	Serina/treonina proteina kinasas
ANOVA	Bariantza-analisia
ApoE	Apolipoproteina E
APP	Amiloidearen proteina prekursora
APP/PS1	Mutazio bikoitza duen AGren sagu eredua
Arp2/3	Actin related protein 2/3 complex
ATP	Adenosina trifosfatoa
Aβ	Amiloide β peptidoa
Aβo	Amiloide β oligomeroak
b.a.	Balio arbitrarioak
BACE	β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme
PB	Prozesu biologikoa
bHLH	<i>Basic helix-loop-helix</i>
BSA	Behi serualbumina
Ca²⁺	Kaltzioa
CAP	Compound action potential
Caspr	<i>Contactin associated protein 1</i>
cDNA	DNA osagarria
CERAD	Alzheimer gaixotasuna erregistratzeko konsentsua
CNPase	2', 3'-nukleotido zikliko-3'-fosfodiesterasa
NZS	Nerbio sistema zentrala
CNTF	<i>Ciliary neurotrophic factor</i>
CSF	Likido zefalorrakidea
Ct	<i>Threshold cycle</i>
DAPI	<i>4'-6-diamidino-2-phenylindole</i>
DAG	Diferentzialki adierazitako geneak
BH	Biraketa horzduna
EIV	Egun <i>in vitro</i>
DEPC	Dietilpirokarbonato

DMEM	Dulbecco-k aldatutako Eagle-en Medioa
DMSO	Dimetil sulfoxidoa
DNA	Azido deoxierrbonukleikoa
EPF	Egunak post fertilizazio
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ME	Mikroskopio elektronikoa
EE	Erretikulu endoplasmatikoa
BE	Besikula estrazelularra
F-aktina	Aktina filamentosoa
FBS	Behi serum fetala
FRAP	Fluorescence recovery after photobleaching
FTH1	<i>Ferritin heavy chain</i>
G-aktina	Aktina globularra
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
SG	Sustantzia grisa
GO	Geneen ontologia
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HFIP	Hexafluoroisopropanol
hnRNP	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein
Hp	Hippocampus
HPF	Hours post fertilization
HRP	Horseradish peroxidase
IP	Immunoprecipitation
Itgβ1	Integrin β1
KCl	Potassium chloride
kDa	Kilodalton
LatB	Latrunculin B
MAG	Myelin associated glycoprotein
MBP	Myelin basic protein
MCI	Mild cognitive impairment
MCT	Monocarboxylate transporter
MOBP	Myelin associated oligodendrocyte basic protein
MOG	Myelin oligodendrocyte glycoprotein
MRI	Magnetic resonance imaging
mRNA	Messenger ribonucleic acid
Myrf	Myelin regulatory factor
NFT	Neurofibrillary tangles
NGS	Normal goat serum
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NT-3	Neurotrophin 3
OL	Oligodendrocyte
Olig1 and 2	Oligodendrocyte transcription factor 1 and 2

OPC	Oligodendrocyte progenitor cell
ORG	Organotypic culture
PB	Phosphate buffer
PBS	Phosphate saline buffer
PCL	Polycaprolactone
PDGFR-α	Platelet-derived growth factor receptor- α
PDL	Poly-D-Lysine
PFA	Paraformaldehyde
PLA	Proximity ligation assay
PLP	Myelin proteolipid protein
PSD95	Postsynaptic density protein 95
PSN 1 and 2	Presenilin 1 and 2
RIP	RNA-immunoprecipitation
RNA	Azido erribonukleiokoa
RNA-seq	RNAren sekuentziakzioa
ROI	Intereseko eskualdea
RT-qPCR	Denbora errealeko polimerasaren kate-erreakzioa kuantitatiboa
S.E.M.	Standard error of the mean
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS polyacrylamide gel electrophoresis
SFP	Src family kinase
siRNA	Small interfering RNA
SIRT2	Deacetylase sirtuin 2
sncRNA	Small non-coding RNA
T3	Triiodotironina
T4	L-Trirosina
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TSG 101	Tumor susceptibility gene 101
VGCC	Boltai menpeko kaltzio kanalak
WB	Western blot-a
SZ	Substantzia zuria
WT	Jatorrizko andua

SARRERA

1. Oligodendroitoak

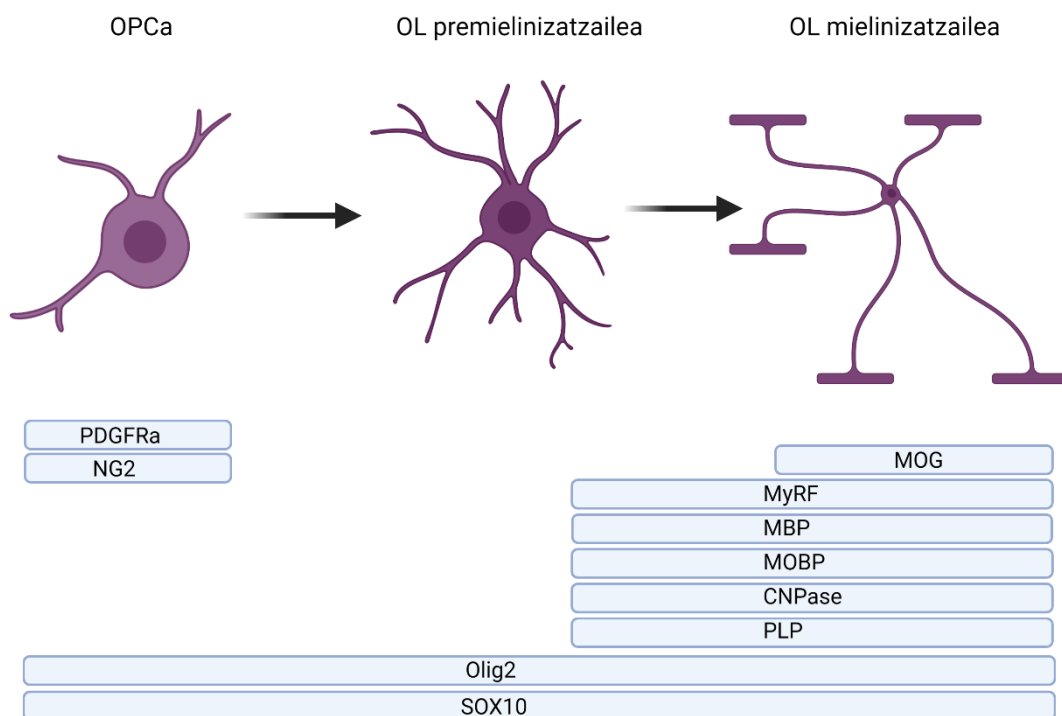
Giza burmuinaren bolumenaren erdia baino gehiago substantzia edo gai zuriak (SZ) osatzen du, zeinak nerbio-sistema zentralean (NSZ) funtzio kognitibo egokirako behar den nerbio-eroapen azkar eta eraginkorra ahalbidetzen duen. SZ NSZko axoi mielinizatuz osatutako eremuei dagokie. Oligodendroitoek mintz prozesuak hedatzen dituzte neurona anitzen axoiak inguratzeko. Modu horretan, lipido multilamelarrezko egitura oso espezializatuak sortu eta mantentzen dituzte axoien inguruan, mielina izenez ezagutzen direnak. Horri esker, oligodendroitoek laguntza trofiko eta metabolikoa ematen diete neuronei, biak ere bizirauteko funtsezkoak. Gainera, eroapen azkarra ere sustatzen dute, Ranvier nodoetan (mielinan dauden aldizkako hutsarteak) tentsio-menpeko sodio kanalak kontzentratuz (Moore et al., 2020; Nave, 2010).

Karraskarietan mielinen eraketa jaiotzean hasi, eta 2 hilabete inguruan bukatzen da. Gizakietan, berriz, bizitzako lehen 2 urteetan gertatzen da, baina SZ bolumena bizitzaren erdira arte handituz doa, proiektio axonal berriak mielinizatu ahala. Mielina etengabe trukutzen eta berritzen da, oso plastikoa baita; esperientziaren arabera alda daiteke, eta ikaskuntzan, oroimenean, eta funtzio kognitibo arruntean paper garrantzitsuak dituela dirudi (Fields, 2008).

1.1 Oligodendroitoen desberdintzapena

NSZeko zelula glialen mota nagusietako bat oligodendroitoak dira, mikroglia eta astrogliarekin batera. Zelula progenitore neural espezifiketatik eratortzen dira, zelula progenitore oligodendroitariorik (OPCak; NG2-glia ere esaten zaie), hain zuzen. Garapenean zehar, OPCek migratu egiten dute garatzen ari den substantzia zuria populatuz. Bertan, ugarituz eta modu uniforme sakabanatuz prozesu-sare bat osatzen dute. Migratu eta eskualde egoki batean ezarri ondoren, OPC batzuk aitzindari izaten jarraitzen dute, eta, beste batzuk, aldiz, mielina sortzen duten oligodendroitoetan desberdintzatzen dira, oligodendroito heldu berrien etengabeko iturria emanez.

Prozesu horri oligodendrogenesia deritzo, eta hiru etapa kanoniko ditu: OPCak, oligodendrozito pre-mielinizatzaileak (preOL) eta oligodendrozito mielinizatzaileak (OL). Fase fenotipiko espezifikoak markatzaile molekularrek eta morfologiak definitzen ditu (Baumann & Pham-Dinh, 2001) (**1. irudia**). OPCak migratu eta ugaltu egiten dira, plaketetatik eratorritako hazkunde-faktorearen (PDGFR- α) hartzailea adierazten dute bereziki, eta forma bipolarra edo izartua izaten dute. Leinuak aurrera egin ahala, OPCak oligodendrozito premielinizatzaile edo heldugabeetan bereizten dira; eta oso morfologia adarkatua garatzen dute axoiak lortzeko helburuarekin. Desberdintze-fase horren ezaugarri bezala oligodendrozitoek hiru markatzaile mieliniko nagusi adierazten dituzte: 2', 3'-nukleotido zikliko 3' fosfodiesterasa (CNPasa), eta O4 eta O1 mintz markatzaileak. Azkenik, zelula horiek oligodendrozito mielinizatzaileetan edo helduetan bereizten dira. Oligodendrozito helduek mielinaren eta mielina proteinen ekoizpena dute ezaugarri, besteak beste, mielinaren oinarritzko proteina (MBP), proteina proteolipidoa (PLP), mielinari lotutako oligodendrozitoen oinarritzko proteina (MOBP), mielinari lotutako glikoproteina (MAG) eta mielina-oligodendrozito glikoproteinarena (MOG). Mielinazko zorroak izaten dituzte, substantzia zurian paraleloki eta substantzia grisean ausaz orientatzen diren bastoi formako prozesuak, hain zuzen (Young et al., 2013).



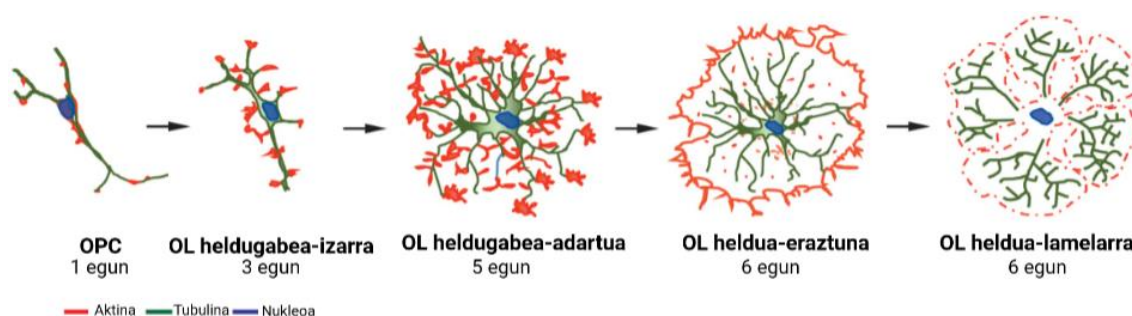
1. irudia. Oligodendrozoen desberdintzapen faseak. *Oligodendrozo leinuko zelulak hiru desberdintze-fasetan bereiz daitezke, proteinen adierazpenean oinarrituta: zelula progenitore oligodendrozoarioak, oligodendrozo premyelinatzaileak eta oligodendrozo mielinatzaileak. Funtsean, OPC guztiek NG2 proteoglikanoa eta PDGFR α adierazten dute, oligodendrozo premyelinatzaileek mielina faktore erregulatzailea (MyRF), eta oligodendrozo mielinatzaileek MBP, MOBP, PLP, CNPase eta MOBP bezalako mielina proteinak gainadierazten dituzte. MOG da oligodendrozoek adierazten duten azken markatzailea. Oligodendrozo leinuko zelula guztiek OLIG2 eta SOX10 transkripzio-faktoreak adierazten dituzte. Pepper et al., 2018etik egokituta. BioRenderren egindako ilustrazioa.*

Hala ere, desberdintasun fenotipiko horien atzean dauden mekanismo molekular eta zelularrak ez daude argi. Zelula bakarreko transkriptomikan egin berri diren aurrerapenek agerian utzi dute oligodendrozoen populazio desberdinak daudela, heterogeneotasun funtzional posible bat iradokitzen du (Marisca et al., 2020; Marques et al., 2016). Guztira, 12 populazio desberdin ikusi zituzten, OPCtik OL helduetara: OPCak, probestu diren oligodendrozoen aitzindariak (COP), eratu berri diren oligodendrozoak (NFOL1-2), mielina eratzen duten oligodendrozoak (MFOL1-2) eta oligodendrozo helduak (MOL1-6). OLak heltzeko hasierako etapak sekuentzialak eta uniformeak ziren NSZko eskualde guztietan, aldiz, OL helduek eskualde-espezifikotasuna erakutsi zuten, proportzio bakanetan egonez garuneko eskualde bakoitzean (Marques et al., 2016).

Oligodendrozoen desberdintzapen prozesuaren etapa guztiak transkripzio-faktoreek arautzen dituzte aktiboki. Erregulatzaile positiboak mielinaren faktore erregulatzailea (Myrf), Olig1/2, Sox2/3/10 eta Nkx2.2 dira, eta sinergikoki elkarreragiten dute heltze-prozesua bultzatzeko (Elbaz & Popko, 2019). Olig2 leinu oligodendrozoario osoan zehar adierazten da, etapa helduetan maila pixkanaka murriztuz (Kitada & Rowitch, 2006). Myrf, berriz, espezifikoki induzitzen da OL desberdintzapenean. Hes1/5 eta Id2/4 transkripzio-faktoreek erregulatzaile negatibo gisa jarduten dute transkripzio-faktore pro-desberdintzapenetara zuzenean batuz, adibidez, oligodendrozoen transkripzio faktorea 1 (Olig1) eta Sox10era, beren funtzioa inhibitzeko (Liu et al., 2006; Samanta & Kessler, 2004).

1.2 Oligodendroitoen morfologia

Morfologiari dagokionez, oligodendroitoak NSZko zelula aldakor eta konplexuenetariko bat dira. OPCek oligodendroito helduetara eboluzionatzen dute, zeintzuek prozesu-sare konplexu eta zabala hedatzen duten, mielina-zorroa sortzera daramana. OPCak OL helduetara ailegatu arte gertatzen diren trantsizio mekanikoak zelula birmoldaketa esanguratsuenetako bat dira. Aldaketa horiek, modu espazialean eta tenporalean erregulatuta daude aktinaren, miosina-II motorren eta zelula-mintzeko mikrotubuluaren eta itsaspen-konplexuen arteko interakzio dinamikoen bidez. Aktina filamentosoa (F-aktina) mikrotubuluak baino dinamikoagoa da, ordezte-tasa handiagoa eta berrantolaketa-potentzial azkarragoa baititu. Horri esker, zelulek forma azkar aldatu eta migratu dezakete. Aktinaren sare zelularren berrantolaketak, plastikotasun morfologikoa gobernatzen du oligodendroitoetan (Song, Goetz, Baas, & Duncan, 2001), haien garapen eta heltze prozesurako garrantzitsua dena.



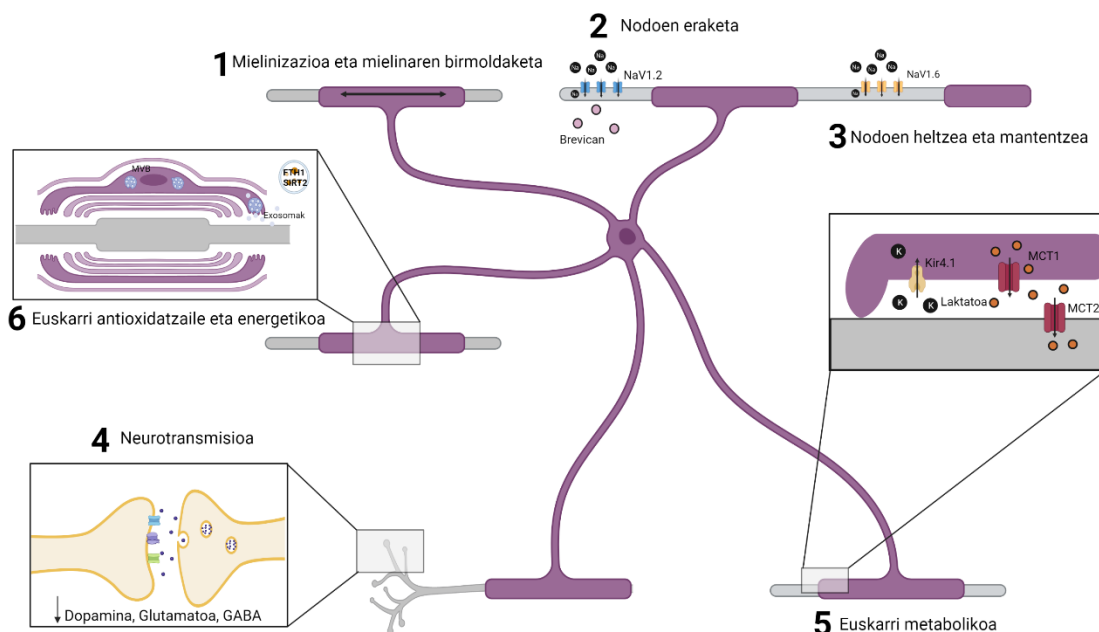
2. irudia. Zitoeskeletoaren banaketa espazio-tenporala eta dinamika in vitro OLen desberdintzapenean eta mielinizazioan. Aktinaren eta mikrotubuluaren antolaketa OLen garapenean zehar. OPC batek in vitro heltzeko 6 egun behar ditu gutxi gorabehera, eta beharrezkoa da aktina eta tubulina zitoeskeletoa birmoldatzea. Domingues et al., 2017etik egokitua.

In vitro oligodendroitoen desberdintzapenaren lehen egunetan, mintzaren luzapena eta arborizazioa aktinaren eta tubulinaren polimerizazioaren menpe daude. Aktinazko filamentuak, batez ere, protrusioetan agertzen dira, eta, mikrotubuluak, berriz, zelularen gorputzean. *In vitro*, OLen heltzea 5 eta 7 egun artean iristen da, non aktinaren adarren arteko konexio distal gehiago ezartzen diren, mikrotubuluaren inbasio gutxiagorekin. Fase horretan, aktinaren despolimerizazio-tasa handitzeak aukera

ematen du protrusioak orri bihurtzeko, zelulen zurruntasun-aldaketa esanguratsuekin batera (Domingues et al., 2018; Thomason, Escalante, Osterhout, & Fuss, 2020).

1.3 Oligodendroitoen funtzioak

Olen funtzio nagusia axoiaren inguruan mielina-zorroa eratzea da (**3. irudia**). Funtzionalki, mielinak eroapen-abiadura maximoa ahalbidetu eta energia axonalaren kontsumoa murrizten du (Crotty, Sangrey, & Levy, 2006; Waxman, 1997). Izan ere, mielina-zorroaren bidezko isolamendu axonalak murriztu egiten ditu energia-eskakizunak eta azeleratu egiten du nerbio-eroankortasuna 20-100 aldiz, mielinizatu gabeko axoiekin alderatuta. Gainera, oligodendroitoek 80 mielina-zorro ezberdin eratzen dituzte hainbat eremu axonaletan (internodoak), axoiaren kalibre eta luzeraren arabera (Snaidero & Simons, 2014). Horri dagokionez, kalibre handiko axoiak mielinatzen dituzten oligodendroito gehienek internodo gutxiago garatzen dituzte, luzeagoak eta mielina-zorro lodiagoak sortuz.



3. irudia. Oligodendroitoek funtzio ugari betetzen dituzte garapen bidean dagoen NSZe an eta NSZ helduan. (1) Oligodendroitoek mielinaren internodoak landu eta birmodelatzen dituzte. (2,3) Oligodendroitoek zelulaz kanpoko matrize-molekulak jariatzen dituzte, brevican bezalakoak, NaV1.2 aurre-nodoetan biltzea eragiten dutenak. Mielinizazioa ere garrantzitsua da nodoen heltze prozesurako (NaV1.2a NaV1.6rengatik trukutzen da) eta mantentzerako. (4) Oligodendroitoek eta mielinak neuronan

kitzikortasuna eta neurotransmisoreen askapena modulatzeko. (5) Oligodendroitoek laktatoa ematen diete axoiei espazio periaxonalaren bidez, eta K^+ ioiak kentzen dituzte. (6) Oligodendroitoek FTH1 eta SIRT2 bezalako molekulak jariatzen dituzte exosometan, energia eta antioxidatzaile euskarria emateko. Pepper et al., 2018tik egokituta. BioRenderren egindako ilustrazioa.

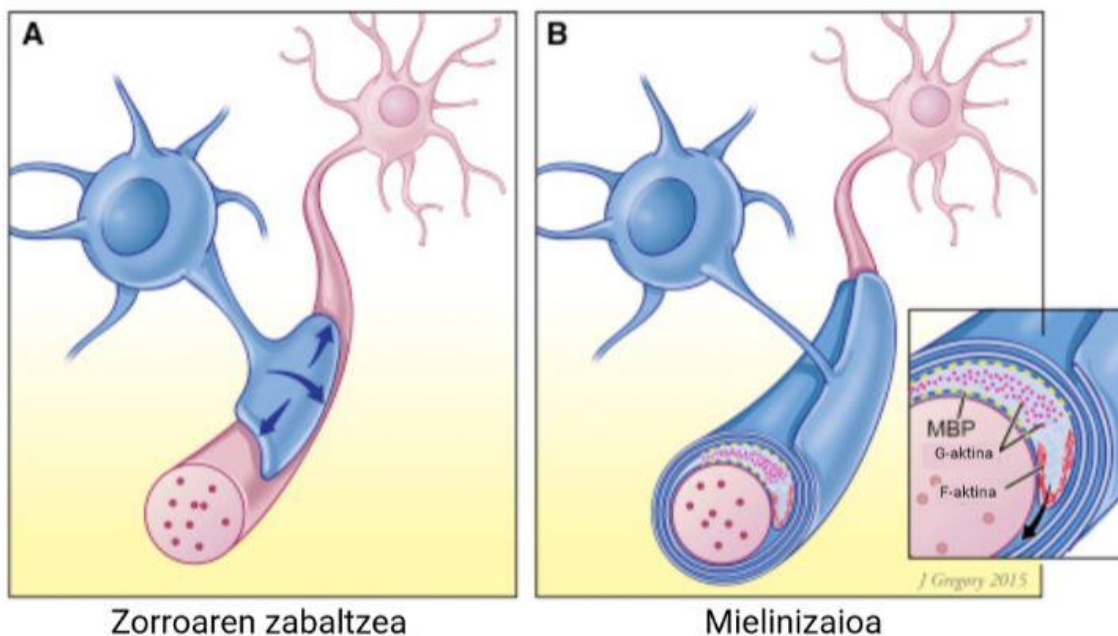
Axoiaren isolamendu elektrikoa ahalbidetzeaz gain, oligodendroitoek eta mielina-zorroek metabolikoki ere eusten diete axoiei **(3. irudia)**. Oligodendroitoek, neuronen behar metabolikoei erantzuteko, laktatoa eta pirubatoa sortu eta transferitzen dizkiete garraiatzaile monokarboxilato 1-aren (MCT1) bidez. Azken hau, mielina-zorroaren bRNAe-mihi trinkotu gabean kokatzen da. Neuronek laktatoa hartu eta katabolizatu egiten dute ATPa sortzeko. Beste metabolito, nutriente eta molekula seinaleztatzaileak oligodendroitoen sometatik axoietara eramaten dira trinkotu gabeko eremuetan zehar, kanal zitoplasmatikoak deituak, jarduera axonala bultzatzeko (Nave & Werner, 2014). CNPAsarik gabeko saguan, kanal zitoplasmatikoen galera ikusten da, zeinak endekapen axonal progresiboa garatzen duen mielina askoz trinkoago batekin. Aldiz, MBPrik gabeko saguak (sagu dardartia), desmielinizazio larria garatzen du, baina axoiaren osotasuna eta funtzioa mantentzen ditu, ziur asko, mielina mehe eta trinkotu gabeko prozesutik gliak bultzatutako euskarri metabolikoa mantentzearen ondorioz. Oligodendroitoen proteina espezifikoetarako nokeatutako saguetan egindako behaketek eusten diete oligodendroito-axoi euskarriaren garrantziaren ideari (Philips & Rothstein, 2017). Are gehiago, eredu horiek iradokitzen dute funtzio axonal egokiak mantentzeko mielina falta hobea dela, mielina akastuna izatea baino, mielina akastuna oligodendroito-axoi euskarri metabolikoko deskonexio bati lotuta baitago.

Duela gutxi, oligodendroitoek exosomen bidez laguntza axonala ematen dutela deskribatu da **(3. irudia)**. Hain zuzen ere, oligodendroitoek defentsa antioxidatzaile ematen diete neuronei, ferritin kate astuna (FTH1) eremu extrazelularrera jariatuz. Jariatze hori zahartzaroko estres oxidatiboaren aurkako babes-mekanismoa dela uste da (Mukherjee et al., 2020). Gainera, NAD-en menpeko deazetilasa sirtuina 2 (SIRT2) ere jariatzen dute. Horrek, ATPren ekoizpena hobetzen du proteina mitokondrialen deazetilazioaren bidez; bide hau baldintza patologikoetan metabolismo bioenergetiko axonala bultzatzeko erabil daiteke (Chamberlain et al., 2021).

2. Oligodendrozoitoen mielinizazioa

Mielinizazioa urrats anitzeko prozesu zehatz eta koordinatua da, NSZren funtzionamendu eta garapen egokiari eusten diona. Prozesu horren funtzio optimoa bermatzeko, mielina-zorroen hasierako eraketa eta mantenua zorrotz kontrolatzen dute hainbat seinalek.

Mielinizatorako behar diren molekulez horniturik, oligodendrozoito helduek beren prozesuak hedatzen dituzte axoiekin kontaktuan jartzeko, eta, gero, haien inguruan biltzeko. Hainbat eredu proposatu dira mielina biltzeko mekanismoa azaltzeko. Eredu onartuenak deskribatzen du oligodendrozoitoek lehenik mintz triangeluar bat osatzen dutela, bi norabideko mugimendu koordinatu batean axoiaren inguruan eta axoian zehar aldi berean hedatzen dena. Prozesu horretan, oligodendrozoitoek berehala berrantolatzen dute beren zitoeskeletoa, eta mikrofilamentuen polimerizazioa eta adarkadura areagotzen dituzte axoi-oligodendrozoito ezagutzari erantzunez (Snaidero et al., 2014). Azken hamarkadako datuek erakusten dute aktinaren polimerizazioak bereizketa zelularren lehen faseak bultzatzen dituela, eta despolimerizazioa elementu erabakigarria dela mielinizazioa bultzatzeko.



4. irudia. Aktinaren dinamikaren bidezko zorroaren zabaltzea eta mielinizazioa. (A) Prozesu oligodendroztario baten irudikapen eskematikoa axoia biltze fase goiztiar batean, non F-aktina nagusitzen den zorroaren zabaltzea sustatuz. **(B)** Prozesu oligodendroztario baten irudikapen

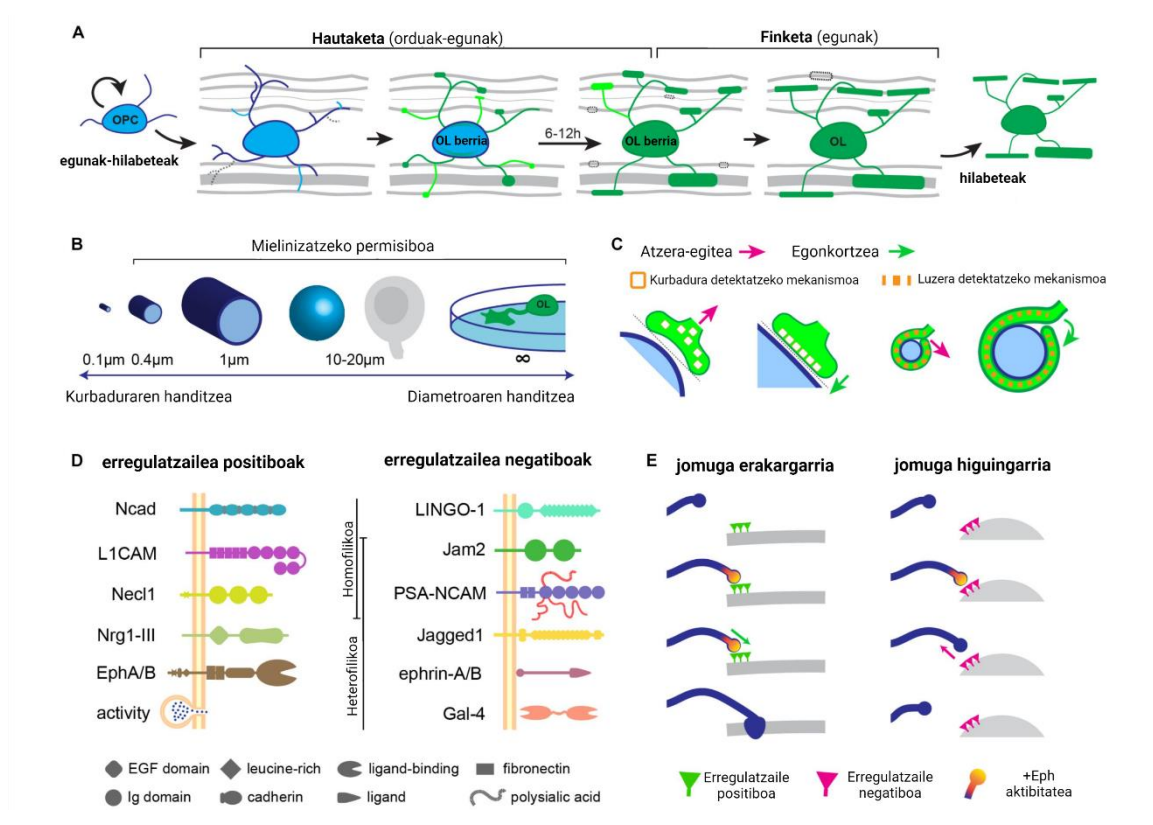
eskematikoa axoiaren mielinizazio aktiboan, non aktinaren despolimerizazioa nagusitzen den gelsolina eta ADF/kofilinaren bitartez. BRNAe-biraketaren aurreko ertzean F-aktina azpikortikalki adierazten da; aldiz, MBPn aberastutako eskualdeetan (horiz erakutsiak), G-aktina da nagusi, eta hori despolimerizazioaren zeharkako aktibazioaren ondorio izatea proposatzen da. Samanta and Salzer, 2015etik egokitua.

Lehenik eta behin, axoiekiko kontaktua eta prozesuen hedadura Arp2/3ren menpeko aktinaren polimerizazioak bultzatzen du, oligodendroitoen protrusioen lamelipodio motako egituren aurreko ertzean. Jarraian, ADF/kofilina1ren bidezko protuberantzien atzeko aldeko aktinaren despolimerizazioak, mintzaren gainazaleko tentsioa gutxituz, mielina-zorroen albo-hedapena sustatzen du. Mielina helduaren zorroan, mintzaren MBPa ADF/kofilina-1arekin lehiatzen da PI (4,5) P2arekin lotzeko, proteina hori zitosolera askatzea eraginez eta mintza deformatzea eta trinkotzea sustatzen duen aktinaren desmuntaketa aktibatuz. Azkenik, F-aktinan aberatsa den bRNAe-mihiak bultza egiten du aurretik zegoen mintzaren azpian. Horrela, axoia mintzeko geruza progresiboetan biltzen da, kanpo-geruza oligodendroitoaren gorputzetik gertuago egonez eta bRNAe-geruza axoiarekin zuzeneko kontaktuan geldituz (Nawaz et al., 2015; Samanta & Salzer, 2015; Zuchero et al., 2015) **(4. irudia)**. Gainera, azken urtean mielinizazioa kontrolatzen duten mekanismo gehiagarriak aurkitu dira. Duela gutxi egindako azterlan baten arabera, VAMP2/3k erdietsitako exozitosia beharrezkoa da mielina-mintza hedatzeko eta Ranvier-en Nodoak sortzeko (Lam et al., 2022).

In vitro, oligodendroitoek mielina nanofibretan biltzeko propietate intrintsekoa dute, neuronekiko independentea dena (Bechler, Byrne eta Ffrench-Constant, 2015; Lee et al., 2012). Hala ere, *in vivo*, mielina axoi jakin batzuetara bakarrik bideratzen da espezifikoki, propietate biofisiko (axoiaren tamaina) eta seinale erakargarri eta higuingarrien menpe dagoena **(5. irudia)**. Mielina kantitatea, axoien tamaina eta beharretara egokitu behar da. Doikuntza hori egiteko, neuronek oligodendroitoetan mielinizazioa bultzatzen duten seinaleztapen-bideak kontrolatu behar dituzte (Almeida, 2018; Snaidero eta Simons, 2014).

Seinale horiek guztiak oligodendroitoek integratu behar dituzte, erantzun neuronalak kontrolatzeko. Seinale neuronalen integratzaile gako bat Fyn da, kinasa zitoplasmatico

ez-hartzaileen tirosina familiako kidea (Src familia). Haren adierazpena goraka doa oligodendrozitoak bereizten diren bitartean, eta funtsezkoa da mielinizazioarako eta MBParen itzulpenarako (Krämer-Albers & White, 2011; Osterhout, Wolven, Wolf, Resh, & Chao, 1999). Gainera, *in vivo* egindako ikerketek erakutsi dute Fynek mielina sortzeko prozesuaren bitartekari gisa duen garrantzia, izan ere, Fyn ez duten sagu transgenikoen ezaugarri nagusiak mielinizazio asaldaturia eta oligodendrozitoen garapen anormaladira (Sperber & McMorris, 2001). Gainera, zebra-arrainean egindako analisiak erakutsi zuen oligodendrozitoetan Fyn kinasaren aktibazioak eta murrizketak zelula bakoitzeko zorro kopurua handitzen eta murrizten duela, hurrenez hurren (Czopka, Ffrench-Constant, & Lyons, 2013).



5. irudia. NSZren mielinizazioaren erregulazioa. (A) Mielina oligodendrozito baten bizitzako aldi labur batean zuzentzen da, eta badirudi bi etapa dituela: (1) diana hautatzeko etapa bat, desberdintzapena eta mielina-zorroak eratu bitartean, eta (2) diana fintzeko etapa bat, desberdintzatu ondoren, zorro batzuk atzera egiten dutenean. Ondoren, oligodendrozitoak eta mielina egonkor egoten dira hilabete askotan. (B) Diametroa eta/edo kurbadura duten propietate biofisikoek mielinizazioarako diana baten permisibitatea zehazten dute. (C) Prozesu oligodendrozitarioetan kurbadura edo luzera detektatzen duten proteinek tamaina egokiko helburuak detekta ditzakete. (D) NSZren mielinizazioa erregulatzen duten seinale erakargarriak eta higuigarriak. (E) Sinapsiaren eraketaren antzera, seinaleztapen-bide

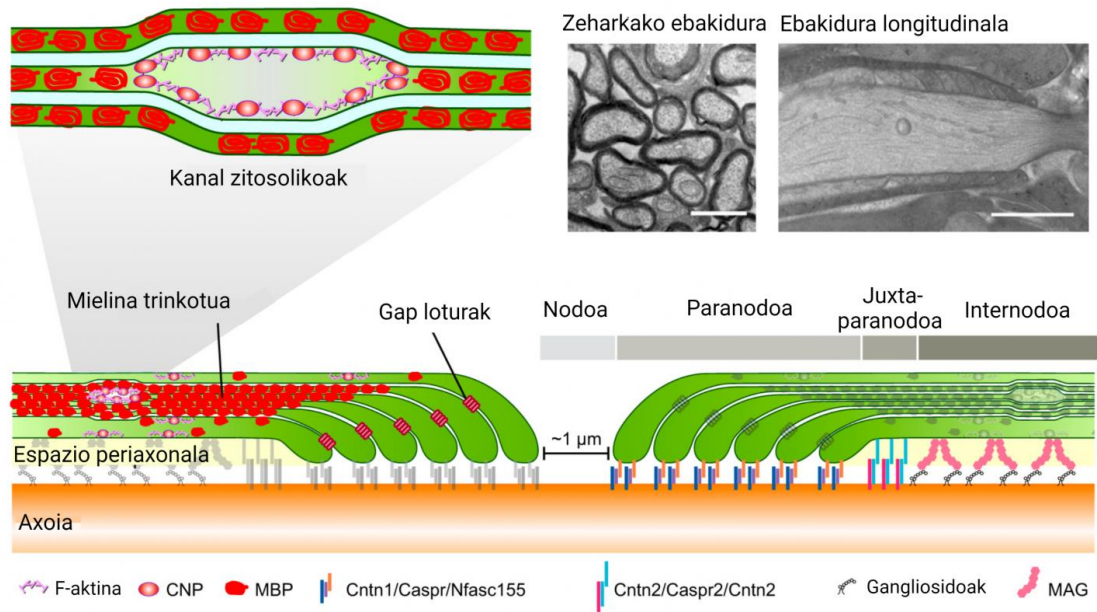
funtsezkoen denbora-dinamikek OPC prozesuen helmuga zehaztu dezake mielina-dianak hautatzean. Almeida et al., 2018etik egokitua.

Hala ere, mielinaren egitura-antolaketa konplexua ez da erraz koordinatzen, eta akatsak izateko joera du. Oraintsuko azterlanek mielinaren anomalia ultraestruktural batzuk dokumentatu dituzte, hala nola mielinizazio goiztiarrean sortzen diren baina garapenak aurrera egin ahala azkar konpontzen diren zabaltzeak, hanpadurak, zatiketak eta xehadurak. Mikroglia arduratzen da horretaz: mielinaren antolaketa modulatzeko eta garapenean zehar izandako akatsak zuzentzen ditu (Hughes & Appel, 2020), baina mielinaren osasuna eta osotasuna ere zaintzen ditu helduaroan (McNamara et al., 2022).

2.1 Mielina

Mielina-zorroa oligodendrozitoen mintz plasmatikoen hedadura da, axoiak NSZan biltzen dituena. Mielinazko mintzak hainbat geruza ditu, eta proteina anitzeko egitura desberdina eta konplexua du. Mielina terminoa Rudolf Virchowek sortu zuen 1864an, eta muinerako grezierazko hitzetik dator (*myelos*).

Mikroskopia elektronikoaren azterketek erakusten dute mielinak axoien inguruan duen espiral ereduak periodikoki bi ezaugarri morfologiko sortzen dituela: (1) geruza elektrodentsoa (lerro trinko nagusia), balba zitoplasmatikoen eremu kondentsatu estua irudikatzen duena, eta (2) geruza elektroniko-argitsua (lerro intraperiodikoa), balba extrazelularren aposizioa dena (Hartline, 2008). Geruza horietako bakoitzean mintzen arteko trinkotzeak 12 nm-ko patroia errepikatuak sortzen ditu, erresistentzia elektriko handia eta kapazitantzia txikia emanez, funtsezkoak potentzial axonikoak hedatzeko.



6. irudia. NSZeko mielinaren egitura. Mielinaren egituraren irudi grafikoa, axoi mielinizatuen eremuak bRNAe hartzen dituena. MBP funtsezkoa da mielina-mintz trinkotuen pilaketak sortzeko, gainazal zitoplasmikoak estu-estu kremaileratuz. CNP asak aktina-zitoeskeletoarekin elkarreragiten du eta MBParen indar polimerizatzaileak indargabetzen ditu, horrela kanal zitoplasmikoak sortuz mielina-zorroaren barruan. Gap loturek mielinazko begizta paranodalak mielinaren albo-ertzetan konektatzen dituzte. Stadelmann et al., 2019etik egokitua.

Axoietako mielinizatutako segmentuek aldizkako arrailak edo hutsarteak dituzte: Ranvier-en nodoak. Horiek, mielinarik gabeko gune extrazelularrean dauden eremu txikiak dira, sodio-kanaletan aberastuak. Ranvier-en nodo batek hedatutako ekintza-potentzialak jauzi egin, eta hurrengo nodoan birsortzen da, horrela, ekintza-potentzialak zuntzean zehar azkar bidaiatzea ahalbidetuz (Waxman eta Ritchie, 1993). Mielina-segmentu bakoitzaren ertzetan, mielina-xafla indibidualak axoiari lotzen zaizkio zitoplasma duten begizta terminal gisa, paranodo izenez ezagutzen direnak. Paranodoak hiru molekula osatutako konplexu baten atxikipenari esker mantentzen dira; konplexu hori Kontaktina-1 eta Caspr proteinek osatzen dute azalera axonalean, eta Neurofascina-155-ak glia aldean (Stadelmann, Timmler, Barrantes-Freer, & Simons, 2019) **(6. irudia)**.

Mielina-mintzaren ultraegituraz gain, bere osaera espezializatuak NSZko mintz paregabea bihurtzen du. Mintz plasmatico gehienak % 50 proteinaz eta % 50 lipidoz

osatuta dauden bitartean, mielina-zorroa gutxi hidratatuta dago: lipido-proporzio handia du (% 70-% 85), eta, ondorioz, proteina proporzio txikia (% 15-% 30), MBP eta PLP izanik proteina nagusiak. Mielinan lipido/proteina proporzio handiak mielina-zorroa trinkotzen eta estuki antolatzen laguntzen du, lipidoen eta mielinaren proteinen arteko elkarrekintza ez-kobalenteen bidez (Min et al., 2009). Mielina-zorroaren osagaiak, hala nola proteinek eta lipidoek, zenbait astetik hilabetera bitarteko batez besteko bizitza dute, eta horrek, oso egitura egonkorra bihurtzen du. Proteinez gain, mielina RNA mezulariz (mRNA) ere badago aberastuta, zeintzuek mielinaren proteinak, itzulpen-makinariako partaideak, eta proteinak garraiatzeko eta lokalizatzeko beharrezkoak diren molekulak kodetzen dituzten. Transkripto multzo hori izateak iradoki lezake mielinan tokiko itzulpena gertatzen dela, eta horrek mielinaren berritze efizientea ahalbidetzen duela, zelula-barneko garraio geldoaren beharrik gabe (Thakurela et al., 2016).

2.2 Mielinaren trinkotzea

Hesi hermetikoak eta mintz isolatzailezko geruza trinkoak sortzea beharrezkoa da ioien jariora saihesteko. Mielinaren trinkotzea MBParen bidez lortzen da eta garapenaren hasieran gertatzen da. Trinkotzea kanpoko geruzetan hasten da, eta barrurantz egiten du aurrera, bai erradialki bai longitudinalki, mintzaren hazkundearekin paraleloan. *Mbp* nukleotik barne-geruzetara garraiatzen da, eta, han, axoitik gertu, itzuli egiten da. Barne-mihian trinkotze goiztiarra saihesteko, mielina-mintzari lotutako CNPasa entzimak MBParen jardura antagonizatzen du, alboko bi mintz zitoplasmatikoren arteko tarte gisa jardunez eta mintza gehiegi trinkotzea eragotziz. Horrela, mielina zorro helduan eskualde zitoplasmatikoak bere horretan mantentzen ditu (Snaidero et al., 2017).

2.3 Mielinaren berritzea eta plastikotasuna

Mielina egitura dinamikoa da, eta neurona-aktibitate aldaketei erantzuteko gaitasuna du. Bitxia bada ere, neurotransmisoreek eta inguruko eskari neuronalek OPCen portaera

kontrola dezakete. Adibidez, jarduera neuronal handiagoa dagoenean, oligodendrozitoek mielina-zorroen kopuruak aldatzen dituzte, eta horrek sare neuronaleko transmisio elektrikoari eragiten dio (Fields, 2015). Plastikotasun horri esker, mielinak informazioaren prozesamendua eta sarearen aktibitatea modula ditzazke helduaroan (Fields, 2008). Garapenean zehar sintetizatutako mielina etengabe trukutzen eta berritzen da, eta prozesu horretan sortutako edo metatutako osagai toxiko eraldatuen edo mielina hondarren eliminazioa mielina ordeztearen parte bezala hartzen da. Duela gutxi, Aber eta kolaboratzaileek jakinarazi zuten OLeK makroautofagia erabiltzen dutela mielina berritzeko, eta, horrek, zirkuitu neuronal funtzionalak eta NSZ osasuntsua mantentzea ahalbidetzen duela (Aber et al., 2022). Hala eta guztiz ere, mielina-zorroa mintz plasmaticoaren hedadura bat denez, estuki paketatua dago somatik sarbide mugatua izanik, eta oligodendrozito bakar batek mielina-zorro asko mantentzen ditzakeenez, haren ordezkapena prozesu jarraitua baina luzea da (Williamson & Lyons, 2018).

Duela gutxi frogatu da oligodendrozito helduek bizitza osoan irauten dutela saguetan eta gizakietan (Tripathi et al., 2017; Yeung et al., 2014), eta haien mielinazko zorroak oso egonkorak direla eratu ondoren, gorabehera gutxi izanez luzeran. Ondorioz, ordezkapen motela mielina proteinen ezaugarria da, aste edo hilabete batzuetako bizidunborak baitituzte (Fornasiero et al., 2018). Iradokitzen denez, helduaroan jaiotako oligodendrozitoek sintetizatzen dituzten mielinazko zorroak aurretik zeuden mielinazko zorroetan sartzen dira, mielinazko zorroak ordezkatzuz edo mielina birmoldatuz; edo biluzik zeuden axoiak *de novo* mielinizatzeke erabil daitezke (Wang & Young, 2014). Duela gutxi egindako ikerketa batean frogatu da substantzia zuriaren osotasunari eusteko barne-mihian etengabeko mielinaren sintesia behar dela (Meschkat et al., 2022).

3. Mielinaren oinarrizko proteina: MBP

MBPa NSZren mielina-egituraren osagai nagusietako bat da; proteina totalaren %30 osatzen du, eta mielinaren pisu lehorraren %10 inguru. Orain arte, NSZean mielina

sortzeko beharrezkoa den funtsezko proteina bakarra da, eta, horregatik, "molekula exekutibo" deitu izan zaio (Moscarello, M.A. et al., 1997). Funtsezko eginkizun hori lehen aldiz sagu dardarkari mutante naturaletan frogatu zen, non MBP proportzio handi bat falta den, eta, ondorioz, hipomielinizazio larria ikusten den (Boggs, 2006).

Mbp-ren sekuentzia oso kontserbatuta dago hainbat espezieren artean, eta transkripzio-aldaerak bi familia nagusitan sailka daitezke: klasikoa eta Golli-MBP (oligodendrozito leinuaren geneak). MBP-klasikoko isoformak oligodendrozito helduetan eta mielina-zorroetan daude, eta funtsezko eginkizuna betetzen dute mielinak axoien inguruan duen trinkotze eta egonkortasunean. Golli-MBPko isoformak, aldiz, nonahiko moduan adierazten dira garapen goiztiarrean dauden oligodendrozitoetan, neuronetan eta zelula immunitarioetan (Boggs, 2006).

MBP klasikoan, *Mbp*-ren transkripto primario bakarraren ordezkoko *splicing*-ak hainbat isoforma sortzen ditu, 14-21 kDa karraskarietan eta 17-21.5 kDa gizakietan. Gizaki eta abelgorrietan nagusi den isoforma 18.5 kDa-ko MBParen aldaera klasikoa da, eta 14 kDa-ko aldaera, berriz, arratoi eta saguetan aurkitzen da bereziki. Aldaera-espektro konplexu eta dinamiko horrek MBParen proteoma sortzen du, eta funtzio edo paper espezifiko bat ematen dio bakoitzari oligodendrozitoetan.

3.1 MBParen funtzioa

MBP proteina multifuntzionala da, eta haren zeregin nagusia NSZko axoien inguruan eratzen ari diren mielina-zorroen trinkotze egokia kontrolatzea da. Kremlera bat bezala jokatzen du, balba zitoplasmatikoak lotuz. Horretarako, MBPk karga elektrostatiko positiboak daramatza, eta horiek elkarri eragiten diote barneko balban fosfolipidoen karga negatiboa duten buru-taldeekin. Horren ondorioz, mintz zitoplasmatikoaren bi geruza kontrajarriak trinkotzen dira (Bakhti, Aggarwal eta Simons, 2014; Boggs, 2006; Harauz eta Boggs, 2013). Zehazki, MBPk transkribatze osteko hainbat aldaketa jasan behar ditu kargan, eta aldaketa horiek garrantzitsuak dira funtzio anitzetarako (Harauz & Musse, 2007). Gainera, gero eta ebidentzia gehiago dago MBPk beste funtzio garrantzitsu batzuk ere betetzen dituela. Horien artean daude mielina-

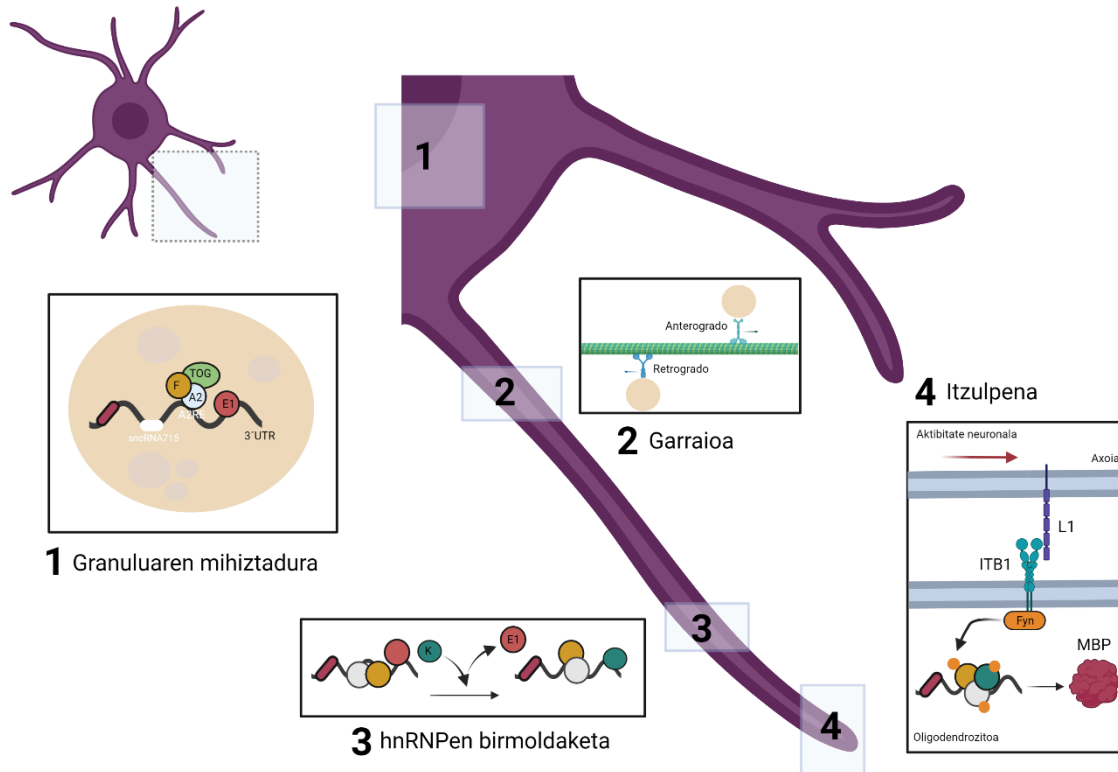
zorroaren osaera eta antolamendua erregulatzea (Fitzner et al., 2006; Aggarwal et al., 2011; Steshenko et al., 2016), mielinizazio-prozesuan zehar aktina-zitoeskeleto berrantolatzea (Zuchero et al., 2015), kaltzioaren homeostasia (Smith et al., 2011) eta zelula-seinaleztapenerako bideetan SH3 domeinua duten proteinekin egindako interakzioen bidez iradokitako papera (Harauz, Ladizhansky, & Boggs, 2009).

3.2 MBParen sintesia: mRNAren garraioa eta itzulpena

MBP proteinaren sintesia funtsezko faktorea da oligodendrozitoen heltze prozesuan eta mielinaren eraketan, eta frogatuta dago transkripzio osteko mailan erregulatuta dagoela. Zehazki, *Mbp* mRNA izan zen mielinazko konpartimentuan garraiatu eta itzuli zen lehen mRNAetako bat (Ainger et al., 1993; Colman, Kreibich, Frey & Sabatini, 1982). MBPa mielina-konpartimentura azkar eta modu eraginkorrean garraiatzeko, *Mbp* mRNA granuluetan garraiatzen da nukleotik oligodendrozitoen prozesuetako eskualde distaletara edo mielina-mintzera, non lokalki itzultzen den. mRNAaren lokalizazioa proteina jakin batzuen adierazpena espazialki eta tenporalki kontrolatzeko eta zelularen beste leku batzuetan itzulpen ektopikoa saihesteko mekanismo eraginkortzat hartzen da.

Oligodendrozitoetan prozesua erribonukleoproteina nuklear heterogeneoaren A2/B1 (hnRNP A2/B1) transakzio-faktorea A2-reponse elementuari (A2RE) lotuz hasten da (Hoek, Kidd, Carson, & Smith, 1998). Lotura hori beharrezkoa da *Mbp* mRNA granuluetan muntatzeko. Gainera, hnRNP A2ren interakzio homotipikoek RNA kopia anitzak granulu berean muntatzeko indarra ematen diote (Carson, Worboys, Ainger, & Barbarese, 1997), sistemaren eraginkortasuna areagotuz. Behin zitoplasman, hainbat transakzio-faktorek aldi berean eragiten dute RNA granuluarekin hnRNP A2 edo RNAren bidez, proteinen sintesi kontrolatua eta lokalizatua erregulatzeko (**1. taula eta 7. irudia**). hnRNP A2 TOG proteinari batzen zaio, eta proteina horrek hainbat hnRNP A2 proteina kontzentratzeko balio dezake. A/B motako hnRNP CBF-A *Mbp* RNArekin lotzen da, eta *Mbp*-ren garraioa eta lokalizazioa kontrolatzen ditu (Raju et al., 2008). hnRNE1-ak (edo PCBP1), sncRNA 175arekin batera, itzulpena inhibitzen du garraioan zehar, *Mbp*-aren eskualde espezifiko batekin lotzerakoan (Bauer et al., 2012; Kosturko et al., 2006). Azkenik, hnRNPFk

hnRNP2rekin bat egiten du, eta MBParen itzulpenean parte hartzen du, mRNA azken helmugara iristen denean (Torvund-Jensen, Steengaard, Reimer, Fihl, & Laursen, 2014; White et al., 2012).



7. irudia. MBParen garraioa eta itzulpen lokala. *Mbp* mRNA erribonukleoproteinak, proteina motorrak eta proteina sintesiko makineriaren zatiak (1) dituzten granuletan mihiztatzen da, eta, ondoren, mikrotubuluaren gainean eramaten da oligodendrozoen kanpokaldera (2). Itzulpenaren aurretik, RNAko granuluaren konplexuak birmoldaketa bat jasaten du, E1 eta K (3) trukatur. Azkenik, mintz plasmatikoa, Fyn kinasak axoi-seinaleak MBParen itzulpen lokalizatu bihurtzen ditu (4). BioRenderren egindako ilustrazioa.

Aipatutako elementu horiek guztiek konplexu supramolekular bat osatzen dute, mintzik gabea, eta mikrotubuluetan zehar garraiatzen da bi norabidetan (aurrera eta atzera), kinesina eta dineina/dinaktina proteina motorretara lotuz (Carson et al., 1997; Herbert et al., 2017; Lyons, Naylor, Scholze, & Talbot, 2009). Behin periferian, hnRNP E1 hnRNP K-rengatik trukutzen da, zeina ezinbesteko baldintza den RNA granulua mielina-zorrorra bideratzeko eta itzulpenari hasiera emateko (Torvund-Jensen et al., 2014). Zehazki, hnRNP K hnRNPE1arekin lehiatzen da *Mbp*-arekin bat egiteko, eta, horrela, haren eragina indargabetzeko. Ondoren, jarduera neuronalak MBParen sintesia estimulatzen

du mekanismo baten bidez. Mekanismo horrek lamina-1 itsketa-molekula gainazal axonalean gainadieraztea dakar, eta, horrek, Fyn aktibatzea eragiten du. Fyn-en aktibazioak hnRNP A2 eta hnRNP F fosforilazioa eragiten du, eta, horrek, *Mbp*-a axoi-glia kontaktu-gunean itzultzea dakar (**7. irudia**).

MBPren sintesia transkripzio-faktoreek ere erregulatzen dute, hala nola, AMP ziklikoa delakoari lotutako erantzun-elementuak (CREB), zeina CaMKIIk, PKCk eta S6 ribosomakinasa bezalako hazkunde-faktoreek eragindako kinasek fosforilatu dezaketenk (Afshari, Chu, & Sato-Bigbee, 2001).

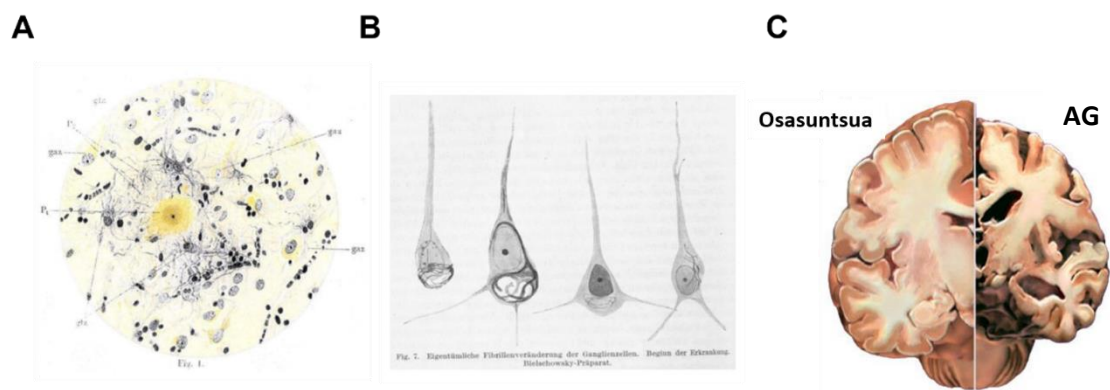
1. taula. *Mbp* RNA granuluen osagaien laburpena.

Molekula	Lotura gunea	Funtzioa	Erreferentziak
hnRNP A2	A2RE RTSren barruan 3'UTRn	Granuluaren mihizketa eta garraio zitoplasmatikoa	Hoek et al. (1998)
hnRNP K	Errekonozimendu-gune espezifiko 3'UTRn	Itzulpena	Laursen et al. (2011) & Torvund-Jensen et al. (2014)
hnRNP F	Seguruenik hnRNPA2ren bidez	Itzulpena	White et al., (2012)
hnRNP E1	Seguruenik hnRNPA2ren bidez, hnRNP Kren lotura gunearekin partekatua	Itzulpenaren garraioan zehar	inhibizioa Kosturko et al., (2005) & Torvund-Jensen et al. (2014)
hnRNP CBF-A	RTS 3'UTRn	Granuluen garraioa	Raju et al 2008
SncRNA 715	Errekonozimendu-gune espezifiko 3'UTRn	Itzulpenaren garraioan zehar	inhibizioa Bauer et al., (2012)
TOG	Seguruenik hnRNPA2ren bidez	Granuluen garraioa, kinesinaren aktibitatearen erregulazioa eta itzulpena	Kosturko et al. (2006)
Ago2	hnRNPA2ren bidez	Itzulpena	Muller et al. (2015)
DDX5		<i>Splicing</i> -a	Hoch-Kraft et al. (2018)

4. Alzheimer gaixotasuna

Alzheimer gaixotasuna (AG) dementziaren eragile nagusia da, eta kasu guztien % 60-80 hartzen ditu. AGa ondo karakterizatuta dagoen gaixotasuna da, zeinak ezaugarritzat tau hiperfosforilatuez osatutako zelula-barneko neurofibrilla-harilkoak eta beta amiloide

peptidoz ($A\beta$) osatutako agregatu disolbaezin estrazelularrak (senil plakak) dituen (**8. irudia**). Gaur egun ez dago sendabiderik, baina zenbait sintoma hobeto ditzaketen tratamendu aringarriak daude. Patologia bereizgarri horietara zuzendutako farmakoak garatu dira, baina $A\beta$ plaken karga murriztea lortzen duten terapiak ere, ezin izan dute gaixotasunaren progresioa behar bezala gelditu. Duela gutxi, proposatu da FDAk onartutako amiloidearen aurkako farmako bakarra, Aducanumab, eraginkorragoa izan daitekeela oligodendrozitoetara zuzentzen diren eta birmielinizazioa sustatzen duten sendagaiekin konbinatzen denean (Fessel, 2022).



8. irudia. Alzheimer gaixotasunaren ezaugarri patologikoak. Alois Alzheimer-en marrazkiak, peptido amiloidez (A) eta zelula barneko harilez (B) osatutako senil plakak erakusten dituztenak. (C) Garun-atrofia AD duen garunean, garun osasuntsuarekin alderatuta.

Esan bezala, AG neuroendekapenezko gaitza da, galera neuronal progresibo eta atzeraezin baten ondorioz gertatzen den gainbehera kognitibo sakon batek ezaugarritzen duena. AGko pazienteengan garatutako gertaera neurodegeneratibo horiek ongi ezarritako eredu anatomikoari jarraitzen diote. Amiloidezko metaketak neokortetik eremu alokortikaletara eta enbor entzefalikora hedatzen dira, eta, azkenean, zerebelora iristen dira (Thal, Rüb, Orantes eta Braak, 2002). Aitzitik, neurofibrilla-harilkoak eremu transentorrinalean hasten dira hedatzen, neokortexera iritsi arte (Braak & Braak, 1995). Gune espezifiko horien endekapena ikasteko eta oroitzen berriak eratzeko defizitekin lotuta dago. Hainbat ikerketek iradoki dute tau harilak ez direla neokortexera zabaltzen $A\beta$ gabe (Long & Holtzman, 2019), eta horrek iradokitzen du $A\beta$ tau patologia garatzeko ezinbesteko baldintza izan daitekeela.

Bi AD mota daude: (i) agertze goiztiarra duena (AD familiarra), AD mota arraroa, AD osoaren % 5-a baino gutxiago eragiten duena, eta (ii) berandu agertzen dena (AD esporadikoa), AD formarik nagusiena. Bi AD motek faktore anitzeko izaera dute, eta toxikotasun polifazetikoarekin lotzen dira. Hasiara goiztiarreko ADA eragiten duten geneak modu autosomikoan transmititzen dira, esaterako, amiloide-proteina aitzindaria (APP) eta presenilina-1 eta -2 sekretasak (PSEN1/2). Beranduko agertzea daukan AD motaren arrisku nagusia zahartzea da. Hala ere, zenbait arrisku-faktore karakterizatu dira, hala nola E apolipoproteina (ApoE), garuneko kolesterol-garraiatazailer nagusia dena.

4.1 β -amiloide peptidoa

A β 4,5 kDa-ko peptidoa da, APParen prozesu proteolitikotik sortua. Zelulaz kanpoko domeinu handia duen mintz zeharreko glikoproteina da, eta funtzio biologiko ugari betetzen ditu NSZean (Zheng & Koo, 2011). A β plaken osagai nagusi gisa hautemateak eta AD familiarrean A β sintesiarekin lotutako gene-mutazioak identifikatzeak amiloide ur-jauziaren hipotesia formulatzera eraman dute (Hardy & Higgins, 1992; Selkoe, 1991). Hipotesi honen arabera, burmuinean A β -ren metaketa anormalak, bere eraketaren eta eliminazioaren arteko desorekaren ondorioz, neuroendekapena eta ondorengo demenzia eragiten ditu.

APParen prozesamendu proteolitiko sekuentziala bi eratara gertatzen da nagusiki: (1) amiloidogenikoa ez den ur-jauzia eta (2) ur-jauzi amiloidogenikoa (**9. irudia**). APParen prozesamendu ez-amiloidogenikoa α -secretasa proteasak egiten du, eta APPs α (N-terminala) eta CTF α (C-terminala) zati disolbagarriak sortzen ditu; azken hori zelula-mintzean ainguratuta geratzen da. CTF α bigarren entzima batek zatitzen du gero, γ -sekretasak, bi peptido disolbagarri sortuz, zehazki peptido p3 eta AICDk (APP domeinu intrazitoplasmatikoa). Azkeneko horiek hainbat generen transkripzio-erregulatzailer gisa jarduten dute, hala nola, glikogeno sintasa kinasa 3 β edo p53rena (Kimberly, Zheng, Guénette, & Selkoe, 2001; von Rotz et al., 2004).

Aldiz, ur-jauzi amiloidogenikoan lehen zatiketa β -sekretasa proteasak egiten du, APPs β eta CTF β zatiak sortuz. γ -secretasaren bidezko CTF β ren geroko prozesamenduak, AICD

eta A β peptidoa sortzen dute, azkeneko hau, zelulaz kanpo askatzen delarik. Harrigarria bada ere, baldintza fisiologikoetan ur-jauzi ez-amiloidogenikoa nagusi den bitartean (A β peptido gehiegi sortzea saihesteko, ustez), bi bideen arteko oreka aldatu egiten da AD duten pazienteetan. Gainera, hainbat bide ez-kanoniko daude APPa prozesatzeko, eta horietako batzuek A β peptidoa sortzen ere laguntzen dute (Müller, Deller eta Korte, 2017).

APParen prozesamenduaren ondoren, A β monomeroek, bereziki A β ₁₋₄₂-ek, espezie desberdinetan agregatzeko joera dute, besteak beste, dimeroak, trimeroak, n-handiko oligomeroak, protofibrilak edo fibrilak, zeintzuk burmuinean jaikitzen diren, azkenik senil plakak sortuz (Recuero, Serrano, Bullido eta Valdivieso, 2004). A β peptidoen biokimikaren konplexutasuna dela eta, agregatzeko joera dute, eta hartzaile ugariren bidez seinaleztatzeko gai diren molekula oso promiskuoak dira, neuronetan eta beste zelula-mota batzuetan efektu sorta zabala eragin dezaketenak (Viola & Klein, 2015).

5. Alzheimerra eta substantzia zuria

Patologia honetan ematen den galera neuronala dela eta, AG substantzia griseko (SG) gaixotasuntzat hartu ohi da. Hala ere, gero eta froga gehiagok erakusten dute substantzia zuriaren endekapena eta desmielinizazioa ere ezaugarri fisiopatologiko garrantzitsuak direla. Substantzia zuria funtsezko osagaia da sare neuronaletan, eta funtsezkoa da ordena handiko prozesu kognitibo askorentzat, hala nola, arretarentzat, funtzionamendu exekutiboarentzat, hitzik gabeko prozesamendu ikusmen-espazialarentzat eta prozesamendu-abiadura orokorrarentzat; eta horiek guztiak asaldatuta daude AGn. Mielinaren galera eta mielinako kalteak konpontzeko oligodendrozitoen ezintasuna AGren beste ezaugarri nagusietako batzuk izan daitezke. Gainera, AGren patologiaren etapa goiztiarretan ikusi da SZren atrofia SGaren endekapenaren aurretik gertatzen dela, baita galera neuronala, plaken eraketa edo narriadura kognitiboaren aurretik ere, eta horrek iradokitzen du axoien edo mielinaren anormaltasun kimikoek galera neuronalen endekapena eragiten dutela (Nasrabad, Rizvi, Goldman, & Brickman, 2018; Sachdev, Zhuang, Braid, & Wen, 2013). Halaber,

duela gutxiko teoria batek proposatu zuen $A\beta$ eta tau bigarren mailako patologiak direla primarioak izan beharrean, eta burmuinak mielinaren homeostasia kalte-, konpontze- eta mantentze-ziklo baten bidez eusteko egindako saiakeraren emaitza izan daitezkeela (Bartzokis, 2011).

5.1 Oligodendroitoak eta β -amiloide peptidoa

SZ eta mielina AGren patologian garrantzitsuak izan arren, ezer gutxi dakigu AGko oligodendroitoetan $A\beta$ peptidoak duen eraginari buruz. Izan ere, oligodendroitoek APP adierazpen altua dute, baita BACE1arena ere, bide amiloidogenikoan inplikaturako sekretasarena, hain zuzen. BACE1ek eta APPk eginkizun garrantzitsuak eta desberdinak dituzte NSZ mielinazio, desmielinazio eta birmielinazio prozesuetan. BACE1ek mielina-zorroaren lodiera erregulatzen duen bitartean (Hu et al., 2006), APPk mielinazio eta birmielinazio normala ziurtatzen du nerbio helduetan (Truong et al., 2019). Bitxia bada ere, oligodendroitoak gai dira gaixotasunaren garapena areagotu dezaken $A\beta$ sortzeko (Skaper et al., 2009).

In vitro ikerketek frogatu zuten $A\beta$ toxiko bihurtzen dela oligomerizatzen denean (Zhao, Long, Mu, & Chew, 2012), eta oligodendroitoak eta mielina zuzenean kaltetu ditzakeela (Xu et al., 2001). Izan ere, $A\beta_{1-40}$ -k edo $A\beta_{25-35}$ -ek dosiaren menpeko heriotza zelularra eragiten dute, desintegrazio nuklear eta zitoesketikoa, DNA zatiketa eta disfunzio mitokondrial ezaugarri dituen (Xu et al., 2001). Gainera, arratoien gorputz kailukaran egindako kontzentrazio altuko $A\beta_{1-42}$ injekzioak kalte axonal handiak eragin zituen, baita mielina eta oligodendroitoen galerak eragin ere (Jantaratnotai, Ryu, Kim, & McLRNAon, 2003).

Bestalde, emaitza kontrajarriak eman dira oligodendroitoen leinuaren desberdintze-faseak zelulen sentikortasunean eraginik ba ote duen analizatzean. Ikusi da $A\beta_{1-42}$ tratamenduaren ondoren (0,5, 1, 2, 4 μ M 4 orduz), oligodendroito heldugabek zein helduek nukleo piknotiko gehiago zituztela (Desai et al., 2010). Horrez gain, deskribatu da $A\beta_{1-42}$ disolbagarriak (10 μ M 48 orduz) (1) OL helduen biziraupena inhibitzen duela, baina ez OPCena, eta (2) mielina-zorroaren eraketa eragozten duela F-aktinaren

banaketa inhibituz, zelula MBP+en kopurua edo MBP/PLP mailak aldatu gabe (Horiuchi et al., 2012). Aitzitik, duela gutxiko ikerketa batean $A\beta_{1-42}$ tratamenduak bideragarritasun zelularra areagotu zuen dosi-menpeko moduan, eta, horrez gain, oligodendrozoitoen desberdintzapena sustatu zuen, baita MBParen adierazpena bultzatu ere, $\beta 1$ integrinaren eta Fyn kinasaren seinaleen bidez (Quintela-López et al., 2019).

5.2 Oligodendrozoitoak eta AG animalia-ereduak

AGko animalia-ereduak sortzea oso baliagarria izan da gaitzari buruzko ezagutza zabaltzeko. Era berean, aukera eman dute SZaren patologiaren progresioa xehetasunez aztertzeko, eta AGrekin lotutako mutazioek gaixotasunaren hasieran eta progresioan duten eginkizun zuzena ulertzeko. Ildo horretan, $A\beta$ patologia SZren anomaliakin erlazionatu da Tg2576, 3xTg-AD, APP/PS1 eta 5XFAD saguetan, zeintzuek $A\beta$ gainproduzitzen duten. Animalia horien kasuan, foku-desmielinizazioko eremuak ikusi dira, $A\beta$ plakekin lotzen direnak, giza pazienteen laginetan deskribatutakoen antzera (Behrendt et al., 2013; Mitew et al., 2010). Hain zuzen ere, sagu transgenikoen plakarik gabeko ehunek ez dute mielinaren eta oligodendrozoitoen galera nabarmenik agertzen (Mitew et al., 2010). Hala ere, APP/PS1-en mielinaren mikroskopia elektronikoko irudiek mielina-aberrazioak dituzten zuntz kopuru handiago erakutsi zuten sagu transgenikoetan (Behrendt et al., 2013).

Gainera, APP/PS1 sagu transgenikoen zelula guraso-ugaltzaile eta zelula heldu berrien dentsitate handiagoa erakutsi zuten 6 eta 11 hilabeterekin sagu basatiekin alderatuta. Zehazki, oligodendrozoito helduen sorrera SZren eremuetan SG kortikalean baino handiagoa izan zen (Behrendt et al., 2013). Preseski, AGren fase goiztiar batean egindako APP/PS1 azterlan batek, mielinaren osotasunaren alterazioak frogatu zituen 2 hilabeteko sagu transgenikoen hipokanpoan. Bestalde, APP/PS1ek MBP adierazpen handiagoa eta mielina-zorro lodiagoak aurkeztu zituzten, nodoen arteko distantzia txikiagoarekin batera (Wu et al., 2017). Beste azterlan batean, APP/PS1 saguen hipokanpoan OPCen dentsitatea 9 hilabetera jaitsi egiten zela ikusi zuten, baina ez 14 hilabetera. Aldaketa horiek 9 eta 14 hilabete arteko MBParen murrizketarekin lotu zituzten, mielinizazioa aldatuta dagoela iradokitzen duena (Chacon-De-La-Rocha et al.,

2020). Beste ikerlan batean ikusi zuten APP/PS1 saguek mielina berriaren eraketa-tasa handiagoa zutela (Chen et al., 2021). Deskribatutako ezaugarrietaz aparte, sagu horietan OPCek seneszentzia-fenotipo bat ere erakutsi zuten A β plaken inguruan, eta horrek iradokitzen du seneszentzia zelularrak paper garrantzitsu bat joka lezakela ADko narriadura kognitiboa eragiten duten gertaeren ur-jauzian (Zhang et al., 2019). Ildo beretik, duela gutxiko azterlan batean, 2 eta 4 hilabeteko APP^{Sw.Ind} saguek (APP sagua) oligodendrogenesi handiagoa erakutsi zuten hipokanpo, finbria eta cortex entorrinalean; fenotipo hori animalia helduagoetan galdu egiten zen. Gainera, Ranvier nodo laburragoak, paranodo luzeagoak eta mielina lodiagoa ere aurkitu zuten 3 hilabeteko APP saguen hipokanpoan (Ferreira et al., 2020).

Desai eta kolaboratzaileek (2009) mielinan aldaketak ikusi zituzten hipokanpoaren CA1 eremuan eta kortex entorrinalean 3xTg-AG saguetan. Halaber, MBParen maila bi eremuetan murriztuak zeudela ikusi zuten, nahiz eta osotasun axonala bere horretan mantendu. Era berean, beste azterlan batean, 3xTg-AG saguen hipokanpoan, OPCen atrofia eta MBParen galera zegoela ikusi zuten (Vanzulli et al., 2020). 3xTg-AGan egindako irudi-azterketek, mielina-aldaketa nabarmenak erakutsi zituzten finbrian, zeinak hipokanpoaren irteera-traktu nagusi gisa jokatzen duen (Nie et al., 2019).

Azken urteetan AGko animalia-ereduetan egindako analisi transkriptomikoek adierazi dutenez, oligodendrozitoak gaixotasunean desregulatuen dauden zeluletariko bat dira Zhou eta kolaboratzaileek jakinarazi zuten 5xFAD saguaren garunean oligodendrozito kopuru handiagoa zela eta gene gainadierazi gehiago zituztela. Zehazki, ikusi zuten oligodendrozitoek egoera errektibo bat hartzen dutela, C4b, serina proteasaren inhibitzaile (Serpina3n) eta MHC-I (H2-D1) osagaien adierazpena areagotuz, A β -ren agregazioa erraztu dezakeena. Gainera, duela gutxi egindako ikerketa batean erakutsi zuten adinean gora egin ahala oligodendrozitoei lotutako geneen adierazpenak ere gora egiten duela 3xTg-AG saguen hipokanpoan (Balderrama-Gutierrez et al., 2021).

AG erduetan ematen diren oligodendrozitoen erantzunen desadostasunaren zergatia oraindik ez da ezagutzen, baina erdu desberdinetan patologia garatzeko unearekin eta azkartasunarekin lotuta egon daitezke.

5.3 Oligodendrozitoak eta mielina AG pazienteetan

SZ pixkanaka narriatzen doa zahartze normalarekin (Damoiseaux et al., 2009; Inano, Takao, Hayashi, Abe, & Ohtomo, 2011), eta garuneko irudien azterketek iradokitzen dute joera natural hori areagotu eta azkartu egiten dela AGn (Bartzokis et al., 2003; de la Monte, 1989; Stricker et al., 2009). *Post mortem* eta *in vivo* erresonantzia magnetikoan (IEM) egindako ikerketek frogatu dute AGn SZaren narriadura nabarmena dagoela. SZak bolumen txikiagoa eta mikroegituraren alterazioak erakusten ditu (Bartzokis, 2011; Roher et al., 2002), adibidez, mielinaren bikapa lipidikoaren antolaketa fisikoan desberdintasunak (Chia, Thompson eta Moscarello, 1984). Duela gutxi egindako ikerketa batean, non mielinaren estatusaren eta proba psikologikoaren hainbat neurketa konbinatzen diren, frogatu da adinarekin lotutako desmielinazioa, oroimenaren narriadurarekin lotuta dagoela, batez ere demenzia egoeretan (Kavroulakis et al., 2018). Ildo beretik, IEMko azterketa batean, non A β positibo diren AG pazienteak A β negatibo diren paziente kontrolarekin alderatu zituzten, aurkitu zen materia zuriaren hiperintensitateak (SZH) handiagoak zirela gorputz kailukaran, eta errendimendu kognitibo okerragoarekin lotzen zirela (Garnier-Crussard et al., 2022). ADko pazienteek mielina galtzen dute garuneko eskualde espezifikoetan, hala nola, SG eta SZ kortikaletan (Roher et al., 2002), eta zelula Olig2⁺ kopuru murriztua aurkezten dute goiko mailako giro tenporaleko eta kortex motore sentorialeko SZ eta SGean. Aitzitik, erdiko giro frontaleko SZak zelula Olig2⁺-en dentsitate handiagoa erakusten du (Behrendt et al., 2013). Era berean, gorputz kailukara ere kaltetzen da AGko garunetan, eta haren narriadura gaixotasunaren progresioarekin eta larritasunarekin lotzen da (Teipel et al., 2002).

Zenbait ikerketak SZaren alterazioen berri eman dute AG garatzeko arrisku handiagoa duten indibiduo asintomatikoetan eta narriadura kognitibo arina (NKA) duten pazienteetan (Bartzokis et al., 2006; Parente et al., 2008). Bartzokis-ek eta lankideek, adinarekin erlazionatutako prozesamendu kognitiboaren abiaduraren moteltasuna mielinazio berantiarreko SZko eremuetako mielinaren hausturarekin korrelazionatu zuten. Ildo horretan, AGrako arrisku genetikoko faktoreak dituzten banako asintomatikoekin egindako azterketa sakon batek erakusten duenez, gizabanako horiek

mielina edukian alterazioak dituzte, likido zefalorrakideoan (LZR) ondo ezarritako AG markatzaileekin korrelazionatzen direnak. Izan ere, lotura handia ikusi zuten mielina-edukiaren murrizketaren eta LZRko A β disolbagarriaren kontzentrazioaren artean. Azterketa horrek agerian utzi zuen adinarekin lotutako mielinaren aldaketak bereziki nabarmenak direla mielinizazio berantiarreko eremuetan, hala nola SZ frontalean eta gorputz kailukararen genuan, aurrez deskribatutako gertaerak berretsiz (Dean et al., 2017). Emaiza horiek erakusten dute mielinak zeregin garrantzitsua duela ADren fase aurreklinikoetan, eta horrek zerikusia izan dezakeela gainbehera kognitiboaren hasierarekin.

AGko oligodendrozoitoen eta mielinaren disfuntzioaren arrazoiak ez daude erabat argi. Hala eta guztiz ere, zenbait ikerketak SZren disfuntzioa sustatzen duen hautagai gisa A β proposatu dute. AG duten pazienteen kasuan, A β peptidoaren mailaren igoera mielinaren anomaliak dituzten garuneko eskualdeekin lotu da (Roher et al., 2002), A β metaketa horiek mielinizazio berantiarreko eremuetan egonik (Bartzokis et al., 2007). Gainera, NKAn SZren aldaketak ere dokumentatu dira, A β eta Tau patologiarekin potentzialki lotuta daudenak (Bartzokis et al., 2003; Dean et al., 2017; Selkoe & Hardy, 2016). Zehazki, desmielinizazio fokala ikusten da AG pazienteen kortexeko plakei lotutako axoi mielinizatuetan, aldiz, plakarik gabeko AG pazienteen SG kortikalek ez dute mielinaren edo oligodendrozoitoen dentsitatearen galera nabarmenik (Mitew et al., 2010).

Aurkikuntza horiekin bat etorriz, AG zuten pazienteen mielina-frakzio osoaren analisi biokimikoak agerian utzi zuen MBP, PLP eta CNPasa mailak nabarmen murriztuak zeudela. Gainera, mielinaren eduki lipidikoa ere aldatuta zegoen, kolesterol-mailen beherakada nabarmena ikusi baitzen, gantz-azidoen guztizko edukia handituta zegoen bitartean (Roher et al., 2002). Nabarmendu behar da berriki egindako azterlan batek frogatu duela *APOE4*ak, AGren arrisku genetikoko faktore indartsuenetako batek, mielinizazioa kaltetzen duela kolesterolaren metabolismoa aldatuz (Blanchard et al., 2022).

AG pazienteek, NKA pazientekin alderatuta, MBP maila txikiagoa dute SZ frontalean (Wang et al., 2004a), eta, aldiz, MBP maila handiagoa dute SG kortikalean (Selkoe, Brown, Salazar & Marotta, 1981; Zhan et al., 2015). Paziente horien kasuan, bitxiki, MBParen degradazio-tasa handiagoa da (Zhan et al., 2015). Era berean, AGn, MBParen eta mielinaren osagaia degradatuak, hala nola, galaktozerebrosidoa, areagotu egiten dira SZ peribentrikularrezko besikuletan (Zhan et al., 2014), mielinaren kaltetzea iradokiz. Gainera, autofagiako markatzaile espezifikoei lotutako MBP degradatuaren igoera deskribatu da (Zhan et al., 2015). Aurkikuntza horiek bat datoz AD pazienteen SZko eta SGeko mielinan eta lipidoetan izandako aldaketak dokumentatzen dituzten aurretiazko azterlanekin (Han et al., 2002; Han, 2007; Pernber et al., 2012). Hala ere, ez dago argi zein mekanismorengatik diren handiagoak MBP mailak AGko pazienteetan. Harrigarria bada ere, duela gutxi frogatu da MBPa gai dela A β rekin bat egiteko eta zuntz-formazioa inhibitzeko, eta, beharbada, modu horretan eginkizun bat betez parenkimako senil-plaken deposizio eta eraketan (Hoos et al., 2009; Liao et al., 2009; Dean et al., 2017).

Azken urteetan egindako azterketa transkriptomikoek funtzio deserregulatuak erakutsi dituzte AGko OLetan, desberdintzapenean, mielinazioan eta endekapen neuronalerako egokitzapen metabolikoan izandako aldaketak, esaterako. OLak eragile garrantzitsu gisa onartu dira gaixotasunaren progresioan, dimorfismo sexuala (Mathys et al., 2019), AD geneen diserregulazioa (Grubman et al., 2019), eta AGren aurkako terapeutika berrietarako diana potentzialen adierazpena erakutsiz (Morabito et al., 2021). Lauk eta lankideek, bitxiki, erakutsi zuten oligodendrozitoek erremielinizazio egoera bat hartzen dutela AGn, zelulak berreskuratzeko mekanismo-intrintseko posible bat iradokiz (Lau, Cao, Fu, & Ip, 2020).

Oro har, argi dago oligodendrozitoak eta mielina ez direla gaixotasunaren bigarren mailako eragileak, lesioei erantzun eta inplikazio garrantzitsuak baitituzte AGaren agerpenean eta garapenean. Beraz, oligodendroziten hutsegitea eta mielinaren galera ulertzea ezinbesteko faktoreak izan daitezke estrategia berritzaileak garatzeko, AD prebenitzeko edo tratatzeko aukera terapeutiko eraginkorrak eman ditzaketenak.

HIPOTESI ETA HELBURUAK

A β oligomero disolbagarrien burmuineko metaketa eta mielinaren eta substantzia zuriaren atrofia gertakari goiztiar garrantzitsuak dira Alzheimer gaixotasunaren patogenesisian, eta gaixotasun horri lotutako narriadura kognitiboarekin lotuta daude. Zenbait ikerketek frogatu dute oligodendrozitoak A β peptidoaren aurrean kalteberak direla. Gure laborategiko emaitzen arabera, A β k mielinaren osagai nagusia den MBParen maila handitzen du, oligodendrozitoen homeostasia mantentzeko funtsezkoa dena. MBParen garrantzia dela eta, proteina horren alterazioak oligodendrozito disfuntzionala ekar dezakeela eta, beraz, NSZko eskualdeen mielinizazio aberrantea eragin dezakeela planteatzen dugu. Alterazio horiek funtzio axonalaren narriadura ekar dezakete, AGren defizit kognitiboa eraginez. Hipotesi hori ikertzeko, mielinizazioan eta oligodendrozitoetan A β ok duen efektua 3xTg-AG saguan eta *in vitro*n ezaugarritzeko asmoa dugu. Gure hipotesia frogatzeko, honako helburu espezifiko hauek jorratuko ditugu:

- 1. helburua.** A β oligomeroek RNAren metabolismoan eragin dezaketen aldaketak aztertzea; oligodendrozitoen kultibo primarioetan, 3xTg-AG sagu ereduan eta AG pazienteen laginetan.
- 2. helburua.** A β oligomeroek proteina mielinikoen sintesian duten papera definitzea, oligodendrozitoen kultibo primarioetan eta 3xTg-AG sagu ereduan.
- 3. helburua.** A β oligomeroek *Mbp* eta *Mobp* mRNAren hnRNPetan duten eragina ikertzea, oligodendrozitoen kultibo primarioetan eta 3xTg-AG sagu ereduan.
- 4. helburua.** MBParen gainadierazpenak oligodendrozitoen funtzioetan duen inplikazioa ebaluatzea.
- 5. helburua.** A β oligomeroek zitoeskeletoaren dinamikan duten eragina aztertzea.
- 6. helburua.** A β oligomeroek *in vivo* mielinizazioan duten zeregina ebaluatzea.
- 7. Helburua.** A β oligomeroek oligodendrozitoen besikula estrazelularren jarioan duten efektua aztertzea eta horiek, neuronetan duen eragina ebaluatzea.

MATERIAL ETA METODOAK

1. Animaliak

Sagu eta arratoiekin egindako prozedura esperimental guztiak Euskal Herriko Unibertsitateko (UPV/EHU) Animalien Etika Batzordeak onartu zituen, eta Europako Erkidegoen Kontseiluaren 2010/63/EB Zuzentarauari jarraitu zioten. Zehazki, protokolo guztiak Animaliekin Esperimentatzeko Etika Batzordeak (CEEA) onartu zituen, zeina UPV/EHUko Ikerketa eta Irakaskuntzarako Etika Batzordearen (CEID) egitura operatiboko kidea den. Zebra-arrainaren kasuan, prozedura guztiak Koloradoko Anschutz Unibertsitateko Animalien Zaintza eta Erabilerarako Batzorde Instituzionalak (IACUC) onartu zituen eta haien estandarrak bete zituen.

1.1 Saguak eta arratoiak

Animaliak baldintza estandarretan mantendu ziren, 12 orduko argi-zikloarekin eta janaria eta ura *ad libitum* eskuratzeko aukerarekin. Ahalegin guztiak egin ziren animalien sufrimendua eta erabilitako animalia kopurua minimizatzeko. Esperimentuak Sprague-Dawley arratoietan eta Alzheimer gaixotasunaren sagu transgeniko hirukoitzaren eremuan (3xTg-AG) egin ziren. 3xTg-AD saguek giza beta-amiloidearen proteina aitzindariaren mutazio suediarra (APP^{Swe}), presenilinarekin knock-in mutazioa (PS1^{M146V}) eta tau P301L (Tau^{P301L}) transgen mutantea daukate (Oddo et al., 2003).

1.2 Zebra-arraina

Enbrio ez-transgeniko guztiak AB anduiko arrak eta emeak gurutzatuz lortu ziren. Enbrioak 28.5°C -ra hazi ziren E3 medioan (5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl₂, 0,33 mM MgSO₄ (pH 7,4), sodio bikarbonatoarekin) eta hautatu egin ziren osasun eta garapen eredu normaletarako.

2. Kultibo zelularrak

2.1 Oligodendrozito kortikalen kultibo primarioa

Purifikatutako OPCak Sprague-Dawley arratoi jaio berrien burmuinetik lortutako kultibo glial mistoetatik abiatuta prestatu ziren McCarthy eta de Vellis-en 1980 protokoloari jarraiki, aldaketa batzuekin (Canedo-Antelo et al., 2018; Chen et al., 2007; Sánchez-Gómez, Serrano, Alberdi, Pérez-Cerdá, & Matute, 2018). Laburki, garunak garezurretatik atera ziren, eta, meningeak kontu handiz kendu ondoren, kortexak isolatu eta inkubazio bidez digeritu ziren (15 min, 37°C) Hanks-en gatz orekatuko soluzioan (HBSS, Ca²⁺ eta Mg²⁺ gabe) % 0,25 tripsina eta % 0,004 desoxirribonukleasarekin (DNAasa) (Sigma-Aldrich). Ondoren, Iscove Dulbecco medio aldatua (IMDM) eta % 10eko behi-serum fetalarekin (FBS, Hyclone; biak Gibcorenak) osatutako medioa gehituz, entzima-erreakzioa gelditu zen. Zelula-esekidura 1.000 x g-tan zentrifugatu zen 5 minutuz. Jalkina, soluzio bereko 1 ml-tan berresekitu, zen eta zelulak jostorrazzetatik pasatuz disoziatu ziren (21G eta 23G). Gero, 1.000 x g-tan zentrifugatu zen 5 minutuz eta IMDM + % 10 Hyclone medioan berresekitu zen.

Zelulak poli-D-lisinez tratatuko 75 cm²-ko flaskoetan erein ziren (PDL; 1 µg/ml; Sigma-Aldrich). Kultiboak 37°C-tan eta % 5eko CO₂-arekin mantendu ziren, 3 egunetik behin medioa aldatuz. Hazkuntzan 7 egun eman ondoren, flaskoak astindu ziren (400 rpm, 1 h, 37°C-tan), atxikitako mikroglia kentzeko. Batzuetan, flaskoak 14 egunera berrerabiltzen ziren, flasko bera berriro astinduz. Astrozitoen geruza bakarraren gainean zeuden gainerako OPCak gauean zehar 400 rpm-tara astinduz askatzen ziren. Zelula-esekidura 10 µm-ko nylonezko sare batetik iragazi zen, eta 100 mm-ko Petri plaka (ThermoFisher Scientific) gaineztatuetan jarri zen ordubetez 37°C-tan eta % 5eko CO₂-arekin. Modu horretan, mikroglia tinko itsatsita geratzen da plakara eta OPCak plakak emeki astinduz jaso daitezke. Gero, garuneko OPC zelulen esekidura 10 µm-ko nylonezko sare batetik iragazi zen berriro.

Zelula-kopurua tripan-urdin tindaketaren bidez zehaztu zen (Sigma Aldrich). Zelula-esekidura 1.000 x g-tan zentrifugatu zen 10 minutuz, eta jalkina kimikoki definitutako

Sato medioan (Sato+) berreskitu zen 1.000 zelula/ μ l-ko kontzentrazioan (**2. taula**). Zelulak PDLz tratatutako 14 mm-ko eta 12 mm-ko estalkietan erein ziren, 24 putzuko plaketan. 6 putzuko plaken kasuan, ez ziren estalkirik jarri. Zelulak $1,5 \times 10^4$ eta 1×10^6 arteko dentsitateetan erein ziren, eta 37°C-tan eta % 5 CO₂-arekin, SATO+ medioan mantendu ziren. Kultibatutako oligodendrozitoak hiru egunez mantendu ziren *in vitro* (EIV). Oligodendrozito kultiboen purutasuna zelulen antigorputz espezifikoak erabiliz baieztatu zen. Kultiboaren lehenengo egunean, PDGFR⁺ OPCak zelula guztien % 97±5 ziren, eta hirugarren egunenean, OL desberdintzapen medioan egon ondoren, % 98 MBP⁺ zelulak ziren (Sánchez-Gómez et al., 2018).

2. taula Oligodendrozitoen SATO+ medioaren konposatuak.

Erreaktiboa	Kontzentrazioa	Konpainia
Dubelcco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Base medium	Sigma-Aldrich
Intsulina	5 μ g/ml	Lonza
Penizilina/estreptomizina	100 U/ml	Sigma-Aldrich
Behi seroalbumina (BSA)	1 mg/ml	Sigma-Aldrich
L-Glutamina	2 mM	Sigma-Aldrich
N-Azetil L-Zisteina	6.3 mg/ml	Sigma-Aldrich
Transferrina	100 μ g/ml	Sigma-Aldrich
Putreszina	16 ng/ml	Sigma-Aldrich
Progesterona	60 ng/ml	Sigma-Aldrich
Sodio-seleniatoa	40 ng/ml	Sigma-Aldrich
Triiodotironina (T3)	30 ng/ml	Sigma-Aldrich
L-Tiroxina (T4)	40 g/ml	Sigma-Aldrich
Faktore neurotrofiko ziliarra (CNTF)	10 ng/ml	Prepotech
Neurotrofina 3 (NT-3)	1 ng/ml	Prepotech

2.2 Neurona hipokanpalen kultibo primarioa

Neurona hipokanpalak 18 eguneko arratoi-enbrioetatik (E18) abiatuta prestatu ziren, aurretik deskribatu bezala (Banker eta Goslin, 1988). Laburki, enbrioigarunen hipokanpoak disezionatu ziren eta TrypLE Express-an (Gibco, Thermo Fisher Scientific) disoziatu ziren 10 minutuz 37°C-tan. Zelulak bi aldiz garbitu ziren HBSSn eta ereintze medioan berreskitu ziren (% 10 behi-serum fetala, 2 mM L-glutamina eta 50 U/ml penizilina/estreptomizina Neurobasal medioan (guztia Gibcorena)). Zelulak Pasteur pipeta batekin homogeneizatu ziren eta 5 minutuz zentrifugatu ziren 800 x g-tan. Zelulen jalkina ereintze-medioan berreskitu zen. Neurona hipokanpalak PDLz estalitako

estalkietan erein ziren 24 putzuko plaketan, dentsitate baxuan (20.000 zelula/putzuko). Kultiboak 37°C-tan mantendu ziren % 5 CO₂-arekin. 1 EIV ondoren, ereintze-medioa hazkuntza-medioarengatik ordezkatu zen (B27, 2 mM glutamina eta 50 U/ml penizilina/estreptomizina Neurobasal medioan). Gliarik ez hazteko, medioaren erdia medio freskoarekin ordezkatu zen (20 µM 5-fluorodeoxiuridina eta uridinarekin (Sigma Aldrich)) 3 egunetik behin. Tratamenduak 10 eta 21 EIVtan egin ziren.

2.3 Hipokanpoko kultibo organotipikoa

Hipokanpoko kultibo organotipikoak Sprague-Dawley P5-P7 arratoi-kumeen garun-sekzioetatik abiatuta prestatu ziren, aurrez deskribatutako prozedurei jarraiki (Stoppini, Buchs eta Muller, 1991). Laburki, burua moztu ondoren burmuina atera, eta 350 µm-ko ebakidura koronaletan moztu zen ehun-ebakigailu bat erabiliz (McIlwain); gero, hipokanpoak banandu eta meningeak kendu ziren. Ebakidurak 0,22 µm-ko (Millipore) hazkuntza-mintzetara transferitu ziren, horietako bakoitzak bi edo hiru ebakidura edukiz. Ebakidurak 6 putzutako plaketan mantendu ziren bederatzi egunez definitutako medioan 37°C-tan atmosfera hezetu batean, % 5 CO₂-rekin (% 25ko basal erdiko Earle gatz orekatuekin (Life technologies, EBSS), % 44ko oinarrizko medio minimoarekin (Life technologies, MEM), % 25ko aktibatu gabeko zaldi-serumarekin (Life technologies), % 35ko glukosa-disoluzioarekin (Panreac), % 50en fungisona g/ml-rekin, B-27 (Gibco, ThermoFisher), Glutamax (Gibco), % 1ean penizilina/estreptomizinarekin eta AraC % 4.4ean (soilik 2 EIVtan)). 2 EIV pasatutakoan, ebakidura organotipikoak GFP-ri lotutako MBP promotorea daraman adenobirusarekin infektatu ziren (AAV8-MBP-GFP; 1 µl 10¹² partikula biriko). Bi egun ondoren, medioak aldatu ziren. Ebakidurak 9 egunez mantendu ziren kultiboan, esperimenduak egin aurretik.

3. Giza-laginak

Pazienteek baimen informatua eman zuten ikerketa kliniko guztietarako, eta Helsinkiko Adierazpenean ezarritako printzipioen arabera egin ziren.

x subjektu kontrolen eta x AD pazienteren formalinan fixatutako eta parafinan inkluitutako hipokanpo sekzioak (**3. taula**) Ehun Neurologikoen Bankuko Ospitale Klinikoko IDIBAPSkoko Biobankutik lortu ziren. ADko laginak Braak-en eta Braak-en arabera (Braak & Braak, 1995) AD-II, AD-III, AD-IV eta AD-V-VIn taldeetan taldekatu ziren, eta CERAD sailkapenaren arabera (Mirra et al., 1991) AD-A, AD-B eta AD-C taldeetan (**3. taula**).

3. taula. Kontrol and AD subjektuen ezaugarriak I-etik VI-era Braak-en and Braak-en arabera eta A,B edo C CERADen kriteriaren arabera sailkatuak.

Kasu zenbakia	Erreferentzia	Braak eta NFT	CERAD Senil plakak	Generoa	Adina	Analisi eremua	Postmortem atzerapena
1	695	I		M	80	Hp	10:00
2	1378	-		M	78	Hp	6:00
3	1648	-		M	73	Hp	6:10
4	1357	II		F	79	Hp	10:30
5	1912	II	B	F	72	Hp	13:35
6	1937	II	B	F	83	Hp	7:20
7	1247	III	A	F	80	Hp	8:00
8	1345	III	A	M	78	Hp	8:00
9	1112	III	B	F	83	Hp	7:30
10	608	IV	-	M	78	Hp	7:00
11	1040	IV	C	M	76	Hp	8:25
12	1417	IV	-	F	79	Hp	4:30
13	977	VI	C	M	75	Hp	10:00
14	999	VI	C	F	76	Hp	10:00
15	1135	VI	C	M	79	Hp	6:25

4. A β oligomeroen prestaketa

A β ₁₋₄₂ oligomeroak lehen deskribatu bezala prestatu ziren (Dahlgren et al., 2002). Laburbilduz, A β ₁₋₄₂ (ABX) hasieran 1 mM-ra disolbatu zen hexafluoroisopropanolean (Sigma-Aldrich) eta mikrozentrifuga-hodi esteriletan alikuotatu zen. Hexafluoroisopropanola hutsean ezabatu zen *speed vac* sistema batean, eta film peptidiko lehortua -80°C-tan gorde zen. Agregazio-protokolorako, peptidoa DMSO lehorrean (Sigma-Aldrich) berresekitu zen lehenik, 5 mM-ko kontzentrazioan. Gero, Hams F-12 (PromoCell) gehitu zitzaion, peptidoa 100 μ M kontzentrazioa eramateko, eta 24 orduz 4°C-tan inkubatu zen.

Etiketatu A β ₁₋₄₂ aurretik deskribatu bezala prestatu zen (Jungbauer, Yu, Laxton, & LaDu, 2009). 24 orduko inkubazioaren ondoren, Alexa Fluor® 488 TFP ester Microscale Labelling Kit-a (A30006, Invitrogen) erabiliz etiketatu zen, fabrikatzailearen protokoloari jarraiki. Laburki, A β oligomeroen 50 μ L disoluzio (100 μ M) pH 9-ra doitu zen 5 μ L NaHCO₃ (1 M) gehituz, eta, jarraian, koloratzaile errektibo disolbagarriaren 4 μ L gehitu zitzaion. Giro tenperaturan eginiko 15 minutuko inkubazioaren ondoren, 55 μ L etiketatze-erreakzioaren nahasketa, Biogel P-6 erretxinaren 425 μ L-ko esekidurarekin paketatutako zentrifugazio-zutabe bati gehitu zitzaion, soberazko koloratzailea kentzeko. Amaierako eluentea (pH 7,4) 2 egunera arte biltegitatu zen 4°C-tan edo berehala erabili zen injekzioetarako.

5. Inhibitzaileak eta geneen isilpena siRNAn bidez

Medioari zuzenean gehitutako farmako eta inhibitzaile hauek erabili ziren: B latrunkulina (5 μ M; Santa Cruz), Jaspaklinolidea (5 μ M; Santa Cruz) eta puromicina dihidroklorikoa (2 μ M *in vitro* eta 10 μ M *in vivo*; Santa Cruz).

Oligodendrozitoak 5 μ L siRNA kontrol eta *Mbp*-ra zuzendutako siRNAnekin (5 nmol; HorizonDiscovery) transfektatu ziren Amaxa™ Basic Nucleofector™ (Lonza) kit-a erabiliz, fabrikatzailearen jarraibideak betez. Ondoren, zelulak kontrolarekin edo A β 1 μ M-rekin tratatu ziren 24 orduz.

6. Proteina estraktuen prestaketa and western blot bidezko detekzioa

6.1 Oligodendrozitoen proteinen prestaketa

Tratamendu bakoitzaren ondoren, ereindako OL kortikalak fosfatoarekin tanpoitutako gatz-disoluzio hotzean garbitu ziren (142 mM NaCl, 2,5 mM NaH₂PO₄, 75 mM Na₂HPO₄; PBS) bi aldiz, eta zelulak lagin-tanpoian arraspatu ziren (62,5 mM Tris pH 6,8, % 10 glizerola, % 2 SDS, % 0,002 bromofenol urdina eta % 5,7 β -mercaptoetanola dH₂O); gutxienez, 3 putzu/tratamenduko eta 90.000-120.000 zelula/putzuko erabili ziren.

Prozesu guztia izotzetan egin zen, lisi-prozesua hobetzeko eta proteinen degradazioa saihesteko. Azkenik, laginak 95°C-tan irakin ziren 5 minutuz.

6.1.1 G-eta F-aktinaren banaketa

Oligodendrozitoak 24 orduz tratatu ziren A β edo kontrolarekin, eta kontrol negatiboko zelulak Latrunkulin B-arekin tratatu ziren arraspatu baino 30 minutu lehenago. Ondoren, zelulak PBS hotzetan garbitu ziren, eta, ondoren, aktina egonkortzeko tanpoiarekin inkubatu ziren izotzetan 5 minutuz, lisatzeko (5 mM Tris, pH 7,4, 300 mM sakarosa, 2 mM EGTA, % 0,3 TX-100, 2 mM faloidina, osatuta proteasa eta fosfatasa inhibitzaileen koktel batekin osatuta (ThermoFisher Scientific)). Ondoren, G-aktina zuen gainjalkina jaso zen eta plastikoari itsatsitako zelulak askatu ziren RIPA (Thermofisher Scientific) tanpoiarekin arraspatuz askatu ziren, F-aktina lortzeko. Azkenik, lagin-tanpoia gehitu, eta laginak 95°C-tan irakin ziren 5 minutuz.

6.2 Animalia-ehunen proteinen prestaketa

Saguak isofluoranoarekin anesthesiatu (Schering-Plough), eta sakrifikatu egin ziren. Nerbio optikoa, gorputz kailukara eta hipokanpoa atera, izotz lehorrean jarri, eta -80°C-tan gorde ziren.

Animalia-ehunen laginak proteasa-inhibitzaileen koktelekin (ThermoFisher Scientific) osatutako RIPA (ThermoFisher Scientific) tanpoiarekin berresekitu, eta pistoi batekin homogeneousatu ziren. Ondoren, % 80ko anplitudezko 25 ziklotan sonifikatu (Labsonic M, Sartorius), 10 minutuz zentrifugatu (2.000 x g, 4° C), eta gainjalkinak jaso ziren. Proteinen edukia Bradford metodoaren bidez kuantifikatu zen (Bio-Rad).

6.3 Western blot-a

Proteinen laginak SDS-PAGE-aren bidez bereizi ziren poliakrilamidazko % 4-20ko gel prefabrikatuetan (Bio-Rad). Elektroforesia Tris-Glizinazko tanpoi batean egin zen (25 mM Tris, 192 mM glizina, % 0,1 SDS dH₂O, pH 8,3), Criterion (Bio-Rad) gelaxka-sistema erabiliz. Gelak nitrozelulosazko mintz batera transferitu ziren Trans-Blot[®] Turbo (Bio-Rad) transferentzia-sistemaren bidez. Mintzak ordubetez blokeatu ziren giro-

temperaturan, %5 BSArekin (Sigma-Aldrich/Nzytech) osatutako TBST (20 mM Tris, 137 mM NaCl, % 0,1 Tween-20 dH₂O, pH 7,6) blokeo-disoluzioan. Ondoren, mintza antigorputz primarioekin inkubatu zen (**4. taula**) blokeo-soluzioan gau osoan zehar 4°C-tara, agitazio leunarekin. Gero, mintzak hiru aldiz garbitu ziren TBSTrekin, eta errebalperoxidasarekin (HRP) edo fluorokromoarekin lotutako antigorputz sekundarioekin inkubatu ziren (1:5000) TBSTn ordubetez, giro temperaturan.

Banda immunoerreaktiboak luminiszentzia elektrokimikozko soluzioaren (NZY standard ECL eta NZY advanced ECL de Nzytech) eta ChemiDoc XRS Imaging System-aren (Bio-Rad) bidez detektatu ziren. Seinaleak Image Lab® (Bio-Rad) softwarearen bidez kuantifikatu ziren, eta β-aktina edo GAPDH seinalearen balioekin normalizatu ziren. Gutxienez hiru esperimentu independente egin ziren baldintza bakoitzeko. Beharrezkoa izan zenean, mintzetatik antigorputzak kendu ziren Restore Western Blot Stripping Buffer-a erabiliz (Thermo Fisher Scientific) 20 minutuz giro-temperaturan. Ondoren, mintzak hiru aldiz garbitu ziren TBSTn, blokeatu, eta beste antigorputz primario batzuekin inkubatu ziren berriro.

4.taula. Western Blot-ean erabilitako antigorputzak.

Antigorputza	Espezia	Pisu molekularra (kDa)	Diluzioa	Erreferentzia
Anti-MBP	Sagua	21.5-14	1:1000	BioLegend SMI-99
Anti-PLP	Untxia	23-25/20	1:1000	Millipore MAB388
Anti-MOG	Sagua	28	1:1000	Millipore MAB5680
Anti-MAG	Sagua	100	1:500	Santa Cruz sc-166849
Anti-CNP	Sagua	48	1:1000	Sigma C5922
Anti-MOBP	Sagua	17	1:1000	Santa Cruz sc-517016
Anti-hnRNPA2	Sagua	36/38	1:1000	Santa Cruz sc-374053
Anti-hnRNPE1	Untxia	43	1:1000	MBL RN024P
Anti-hnRNPF	Sagua	48	1:1000	Santa Cruz sc:32310
Anti-hnRNPK	Untxia	51/65	1:1000	MBL RN019P
Anti-Kofilin	Untxia	19-21	1:1000	Cell signalling #5175
Anti-f-Kofilin	Sagua	19-21	1:1000	Santa Cruz sc-3658882
Anti-Dinaktina	Sagua	135	1:1000	Santa Cruz sc-365274
Anti-Dineina	Sagua	10	1:1000	Santa Cruz sc-136287
Anti-Puromizina	Sagua		1:1000	Millipore MABE343
Anti-TSG101	Untxia	50	1:1000	Abcam ab30871
Anti-6E10	Sagua		1:1000	BioLegend SIG-39320
Anti-α-Tubulina	Sagua	50	1:5000	Abcam ab7291
Anti-β-Aktin	Untxia	43	1:5000	Sigma A2228
Anti-GAPDH	Sagua	36	1:5000	Millipore MAB374

7. Immunoprezipitazioa

7.1 Ko-immunoprezipitazioa

Kultibatutako oligodendrozitoetan ko-immunoprezipitazio-saiakuntzak egin ziren, A β oligomeroek RNAREN granuluen dinamikan eragindako aldaketak ikusteko. Laburki, agarosarekin konjugatutako anti-hnRNPA2 antigorputzaren 40 μ l (Santa Cruz) eta anti-IgG_{2b} antigorputzaren 10 μ l (Santa Cruz) erabili ziren. 1×10^6 OL hazi ziren baldintza bakoitzeko, eta 3 edo 24 orduz tratatu ziren A β -rekin. Zelulak bi aldiz garbitu ziren PBS hotzarekin, eta 1 ml-ko lisi-tanpoi ez-desnaturalizatzailean arraspatu ziren (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 nM NaCl eta % 1 NP40, proteasa- eta fosfatasa-inhibitzaileen koktelarekin osatuta (ThermoFisher Scientific)). Izotzetan 10 minutuz utzi ondoren, 5 minutuz zentrifugatu ziren 12.000 x g-tara. Gainjalkina konjugatutako agarosari (anti-hnRNPA2 edo anti-IgG_{2b}) gehitu zitzaion (1/10 gorde zen *input* bezala erabiltzeko), eta 2 orduz 4°C-tan inkubatu zen, interakzio ez-espezifikoak saihesteko. Immunokonplexuak 2.000 x g-tara zentrifugatu ziren 2 minutuz, eta hiru aldiz garbitu ziren lisi-tanpoi ez-desnaturalizatzailearekin, eta behin PBSrekin. Ondoren, beste zentrifugazio bat egin zen immunokonplexua lortzeko. Azkenik, proteinen eluzioa 40 μ l ligin-tanpoitan berreseki eta 95°C-tan irakin zen 5 minutuz. Proteinak eskuratzeko, 12.000 x g-tara zentrifugatu zen minutu batez.

7.2 Immunoprezipitazioa

Kultibatutako oligodendrozitoetan immunoprezipitazio-saiakuntzak egin ziren, A β oligomeroek eragindako hnRNP A2 fosforilazioaren aldaketak zehazteko. Laburki, agarosarekin konjugatutako anti-pTYR (PY99) antigorputzaren 30 μ l (Santa Cruz) eta anti-IgG antigorputzaren 10 μ l (Santa Cruz) erabili ziren. 1×10^6 OL hazi ziren baldintza bakoitzeko, eta 15 minutuz tratatu ziren A β -rekin. Zelulak bi aldiz garbitu ziren PBS hotzarekin, eta 1 ml-ko lisi-tanpoi ez-desnaturalizatzailean karrakatu ziren (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 nM NaCl eta % 1 NP40, proteasa- eta fosfatasa-inhibitzaileen koktelarekin osatuta (ThermoFisher Scientific)). Izotzetan 10 minutuz utzi ondoren, 5 minutuz

zentrifugatu ziren 12.000 x g-tara. Gainjalkina konjugatutako agarosari (anti-pTyr edo anti-IgG) gehitu zitzaion (1/10 gorde zen *input* gisa erabiltzeko), eta 2 orduz 4°C-tan inkubatu zen, interakzio ez-espezifikoak saihesteko. Immunokonplexuak 2.000 x g-tara zentrifugatu ziren 2 minutuz, eta hiru aldiz garbitu ziren lisi-tanpoi ez-desnaturalizatzailearekin, eta behin PBS 1X-rekin. Ondoren, beste zentrifugazio bat egin zen immunokonplexua lortzeko. Azkenik, proteinen eluzioa 40 µl lagin-tanpoitan berreseki eta 95°C-tan irakin zen 5 minutuz. Proteinak eskuratzeko, 12.000 x g-tara zentrifugatu zen minutu batez.

7.3 RNA immunoprezipitazioa (RIP)

RIP-saiakuntzarako, agarosarekin konjugatutako 40 µl anti-hnRNPA2 (Santa cruz) eta 10 µl anti-IgG_{2b} (Santa cruz) erabili ziren. Laburki, 2x10⁶ OL hazi ziren baldintza bakoitzeko, eta zelulak polisoma-lisizko tanpoi egoki batekin arraspatuz lisatu ziren. Lisatuak bi aldiz zentrifugatu ziren, 30 minutuz 14.000 x g-tara 4°C-tan, eta gainjalkinaren zati bat, RNA osoari dagokiona, ondoren *input* gisa erabiltzeko biltegiratu zen. Input eta prezipitatuaren zati bat western blot analisirako gorde zen. RNA, RNA TRIzol (ThermoFisher Scientific) isolamendu-protokoloari jarraituz erauzi zen. RNA kontzentrazioa Nano DropTM 2000ekin neurtu eta lagin guztiak kontzentrazio berera eramane ziren, dietilpirokarbonatoz (DEPC) tratatutako ura gehituz.

Datuak geNorm softwarean lortutako normalizazio-faktore batekin normalizatu ziren, bi housekeeping generen adierazpenaren analisiaren bidez: Glizeraldehido-3-Fosfato Deshidrogenasa (*Gapdh*) eta β-actina (*Actb*). *Mbp*, *Mobp* eta *Tau*-ren mRNA aberastea RIP frakzioaren balioak sarrera-balio normalizatuekin erlatibizatuz aztertu ziren:

$$X \text{ mRNAren aberastea} = \frac{X \text{ mRNA RIP frakzioan}}{X \text{ mRNA input - era normalizatua}}$$

8. Immunoentseguak

8.1 Oligodendrozitoen eta neuronen kultibo primarioak

Zelulak paraformaldehidoa (PFA) eta sakarosa % 4an zuen PBS soluzioan fixatu ziren 15 minutuz, eta, ondoren, hiru aldiz garbitu ziren PBSrekin. Zelulak iragazkortu eta blokeatu egin ziren ordubetez giro tenperaturan, ahuntz serum arrunta % 4an (NGS, Palex) eta detergentea % 0,1ean zeukan PBSn (blokeo-soluzioa) inkubatuz; oligodendrozitoetan Triton X-100 (Sigma-Aldrich) erabili zen detergente gisa eta neuronetan aldiz, saponina. Jarraian, antigorputz primarioekin inkubatu ziren 4°C-tan gau osoan zehar. Ondoren, zelulak PBSarekin hiru aldiz garbitu ziren eta fluorokromoz konjugatutako antigorputz sekundarioekin inkubatu ziren ordubetez. Gero, zelulak bi aldiz PBSarekin garbitu eta DAPIrekin inkubatu ziren 8 minutuz (4 µg/ml, Sigma-Aldrich). Azkenik, zelulak PBSarekin bi aldiz garbitu ziren berriro, eta estalkiak beirazko objektu-euskarrietan muntatu ziren Fluoromount-G (SouthernBiotech) muntaketa-medioaren laguntzaz.

8.2 Ebakidura organotipikoak

Ebakidura organotipikoak % 4 PFA-n fixatu ziren ordubetez giro-tenperaturan, eta, ondoren, hiru aldiz garbitu ziren PBS 0,1 M-tan. Ondoren, iragazkortu eta blokeatu ziren NGS % 4an (Palex), eta Triton X-100 (Sigma-Aldrich) % 0,2an zeukan TBSn (100 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 4,25 mM MgCl₂; pH 7,4) (blokeo-soluzioa) ordubetez giro-tenperaturan, eta jarraian, bi aldiz garbitu ziren TBSrekin. Ondoren, ebaketak BSA % 1ean (Nzytech) eta Triton X-100 % 0,2an (Sigma-Aldrich) zeukan TBSn (inkubazio-disoluzioa) disolbatutako antigorputz primarioekin inkubatu ziren 4°C-tan gau osoan zehar. Antigorputz primarioen ondoren, ebakiak lau aldiz garbitu ziren TBSarekin, eta fluorokromoz konjugatutako antigorputz sekundarioekin inkubatu ziren 2 orduz giro-tenperaturan. Jarraian, ebakiak hiru aldiz garbitu ziren TBSarekin, eta bigarren garbiketan DAPIrekin inkubatu ziren 10 minutuz (4 µg/ml, Sigma-Aldrich). Azkenik, ebakiak beirazko objektu-euskarrietan muntatu ziren, Mowiol® (Calbichem) muntaketa-

mediao erabiliz. Irudiak, Leica Stellaris 5 mikroskopia konfokalarekin eskuratu ziren, 20X-eko objetiboa erabiliz.

8.3 Ebakidura akutuak

Saguak isofluoranoarekin anesthesiatu eta sakrifikatu ziren. Garuna Leica VT 1200S (Leica microsystems) bibratomoa erabiliz ebaki zen, 150 μm -ko ebaketa koronalak lortzeko. Ondoren, ebaketak oxigenatutako ganbera batean jarri ziren aCSF disoluzioan (NaCl 140 mM, KCl 2,5 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,2 Mm, HEPES 10 Mm, Glukosa 10 Mm, NaHCO_3 26 mM, Pirubato sodikoa 1 Mm, N-azetilzisteina 12 mM, pH 7,3) ordubetez 37°C-tan, horiek egonkortzeko. Ondoren, 20 minutuz tratatu ziren puromizinarekin (10 μM), eta kontrol negatiboak anisomizinarekin (40 μM) tratatu ziren 45 minutuz (puromizina baino 25 minutu lehenago gehitu zen). Ebaketak, % 4 PFAn fixatu ziren ordubetez giro-tenperaturan inkubatuz. Jarraian, iragazkortu eta blokeatu egin ziren NGS % 10ean (Palex), eta Triton X-100 (Sigma-Aldrich) % 0,3an zeukan PB 0,1 M-ean (blokeo-soluzioa) ordubetez giro-tenperaturan. Gero, ebaketak blokeo-soluzioan disolbatutako antigorputz primarioekin inkubatu ziren 4°C-tan gau osoan zehar. Antigorputz primarioen ondoren, ebakiak hiru aldiz garbitu ziren PB 0,1 M-rekin, eta fluorokromoz konjugatutako antigorputz sekundarioekin inkubatu ziren ordubetez giro-tenperaturan. Jarraian, ebakiak hiru aldiz garbitu ziren PB 0,1 M-tan, eta bigarren garbiketan DAPIrekin inkubatu ziren 10 minutuz (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma-Aldrich). Azkenik, ebakiak beirazko objektu-euskarrietan muntatu ziren, Fluoromount-G (SouthernBiotech) muntaketa-mediao erabiliz

8.4 Saguen ehunak

Sagu-ehunak Leica VT 1200S (Leica microsystems) bibratomoa erabiliz ebaki ziren, 40 μm -ko sekzio koronalak lortzeko. Sekzioak PB 0,1 M-rekin garbitu ziren, eta beroak eragindako tratamendu bat egin zitzaien (95°C, 5 minutuz), R-Universal (Aptum) tanpian, epitopoak berreskuratzeko. Ondoren, sekzioak hiru aldiz garbitu ziren PBS 0,1 M-rekin eta %100eko etanol (EtOH) hotzarekin tratatu ziren 10 minutuz. Jarraian, hiru

aldiz garbitu ziren PB 0,1 M-rekin, eta iragazkortu eta blokeatu egin ziren NGS % 4ean (Palex), eta Triton X-100 (Sigma-Aldrich) % 0,1an zeukan PBSn (blokeo-soluzioa) ordu erdiz giro-temperaturan. Blokeatu ostean, ebakiak hiru aldiz garbitu ziren PBSrekin fluorokromoz konjugatutako antigorputz sekundarioekin inkubatu ziren ordubetez giro-temperaturan. Ondoren, ebakiak hiru aldiz garbitu ziren PBSrekin, eta bigarren garbiketan DAPIrekin inkubatu ziren 10 minutuz (4 µg/ml, Sigma-Aldrich). 18 hilabeteko saguen ehunak autofluoreszentzia-ezabatzaile erreaktiboarekin tratatu ziren, fabrikatzailearen aginduei jarraituz (Millipore), lipofuszinaren antzeko autofluoreszentzia murrizteko. Azkenik, ebakiak beirazko objektu-euskarrietan muntatu ziren, Fluoromount-G (SouthernBiotech) muntaketa-medioa erabiliz.

8.5 Parafinan enbeditutako giza sekzioak

Parafinan enbeditutako 10 µm-ko giza sekzioak desparafinatu egin ziren xilenoan murgilduz, eta, ondoren, birhidratatu ziren alkohol-edukia zuten soluzioetan (% 100, % 96 eta % 75 diluituak H₂Oan) eta TBSan murgilduz 10 minutuz disoluzio bakoitzean. Ondoren, laginei beroak eragindako tratamendu bat egin zitzaien (121°C, 20 minutuz), R-Universal (Aptum) tanpoian, eta 30 minutuz hozten utzi ziren epitopoaren desmaskaratzea errazteko. Ondoren, laginak hiru aldiz garbitu ziren TBSrekin, eta blokeatu ziren % 4 BSA zuen TBSn ordubetez giro-temperaturan. Blokeatu ostean, sekzioak hiru aldiz garbitu ziren TBSrekin eta fluorokromoz konjugatutako antigorputz sekundarioekin inkubatu ziren ordubetez giro-temperaturan. Ondoren, ebakiak hiru aldiz garbitu ziren TBSrekin, eta bigarren garbiketan DAPIrekin inkubatu ziren 10 minutuz (4 µg/ml, Sigma-Aldrich). Ondoren, laginak TBSrekin garbitu ziren eta autofluoreszentzia-ezabatzaile erreaktiboarekin tratatu ziren, fabrikatzailearen aginduei jarraituz (Millipore), lipofuszinaren antzeko autofluoreszentzia murrizteko. Azkenik, ebakiak beirazko objektu-euskarrietan muntatu ziren, Fluoromount-G (SouthernBiotech) muntaketa-medioa erabiliz.

8.6 Analisi immunokimikoak

Irudiak Leica TCS STED CW SP8X (Leica) mikroskopia konfokala, Leica Stellaris 5 (Leica) mikroskopia konfokala eta Zeiss Apotome 2 (Zeiss) epifluoreszentziako mikroskopia erabiliz eskuratu ziren. Hainbat fluoroforoekin egindako esperimentuetan, kanalak sekuentzialki eskaneatu ziren, kanalen arteko gurutzamendua saihesteko. Esperimentu bereko irudi guztiei konfigurazio bera aplikatu zitzaien. Analisi guztiak ImageJ/Fiji (NIH) softwarearekin egin ziren.

8.6.1 Oligodendrozoitoen eta neuronen kultibo primarioak

hnRNPen irudiak Leica TCS STED CW SP8X mikroskopia konfokalarekin eskuratu ziren, 63Xeko olio-objetiboa erabiliz; esperimentu bakoitzean baldintza bakoitzerako 10 zelula eskuratu ziren. Lehenik eta behin, iragazki gaussiano bat aplikatu zitzaion seinaleari, atzealdea bereizteko eta irudia hobetzeko. Ondoren, nukleoak ezabatu ziren eta Fiji-ImageJn eskuragarri zegoen atalase predeterminatu bat aplikatu zen. "Image Calculator" funtzioa erabili zen hnRNP A2 eta hnRNP F kanalekin kolokalizazioa neurtzeko. Azkenik, "Analyze particles" funtzioa erabili zen kolokalizatutako eremua identifikatzeko. F-aktina (faloidina-TexasRed) eta G-aktina (DNAasa I-Alexa 488) irudiak Zeiss Apotome 2 epifluoreszentzia-mikroskopia (Zeiss) erabiliz eskuratu ziren, 40Xeko olio-objetiboa erabiliz. Baldintza bakoitzerako 10 eremu hartu ziren. Zelulak F-aktinaren seinalearekin delineatu egin ziren, intereseko eskualdea (ROI) definitzeko parametro gisa. Jarraian, bi kanalen batez besteko intentsitatea kuantifikatu zen.

Neurona hipokanpaleen kasuan, irudiak Stellaris 5 mikroskopia konfokalarekin eskuratu ziren, 40X-eko (puromizinarekin egindako esperimentuetarako) eta 63X-eko (sinapsia aztertzeko) olio-objetiboak erabiliz. Esperimentu bakoitzean baldintza bakoitzerako 10 zelula edo eremu eskuratu ziren. Soma zelularra eskuz mugatu zen eta ROIan puromizinarekin dentsitate integratua neurtu zen. Jorge Valero doktoreak diseinatutako makro bat erabili zen neurona primarioetako neurona-prozesu distaletan edo neuritetan markatzaile sinaptikoen tindaketa kuantifikatzeko, kalte sinaptikoaren neurri gisa. $20 \times 4 \mu\text{m}$ -ko ROIak fixatu ziren irudian, ROIa neuritaren orientazioa zehazteko erreminta errotagarri baten laguntzarekin, eta, ondoren, ROI bakoitzerako eremua kalkulatu zen.

8.6.2 Saguen ehunak

Ebakidura akutuen eta flotanteen ehunen irudiak Leica TCS STED CW SP8X mikroskopia konfokalarekin eskuratu ziren, 40X-eko olio-objektiboa erabiliz, z-stack proiektzioak sortzeko. Irudien analisia subjektu bakoitzeko 1-2 ebakiduretan egin zen. Puromizinareneko fluoreszentzia-intentsitatea aztertzeko, zelulak eskuz delineatu ziren eta oligodendrozitoen barruko dentsitate-integratua kuantifikatu zen. HnRNP A2 eta Olig2rako z-stack bakarreko irudiak hartu ziren, eta hnRNP A2ren batez besteko intentsitatea aztertu zen Olig2+ zelulen nukleoetan.

8.6.3 Giza ehunak

Giza laginen sekzioetako irudiak 3D Histech Panoramic MIDI II diapositiben eskanerrarekin eskaneatu ziren. Pertsona bakoitzaren hipokanpoaren 3 eremu desberdin erabili ziren. HnRNP A2ren fluoreszentiaren intentsitatea Olig2+ nukleoetan neurtu zen. Irudi adierazgarriak Leica TCS STED CW SP8X mikroskopia konfokalarekin eskuratu ziren, 40X-eko olio-objektiboa erabiliz, z-stack proiektzioak sortzeko.

6. taula. Immunofluoreszentziarako erabili diren antigorputzak

Antibody	Host	Dilution	Reference
<i>Anti-MBP</i>	Ms/ch/rb	1:1000/1:200/1:200	Biologend smi-99/Millipore ab9348/Abclonal a1664
<i>Anti-MOG</i>	Sagua	1:1000	Millipore MAB5680
<i>Anti-MOBP</i>	Untxia	1:100	Bioss bs-11184r
<i>Anti-hnRNPA2</i>	Sagua	1:1000	Santa Cruz sc-374053
<i>Anti-hnRNPE1</i>	Untxia	1:1000	MBL RNP024P
<i>Anti-hnRNPF</i>	Sagua	1:1000	Santa Cruz sc-32310
<i>Anti-hnRNPK</i>	Untxia	1:1000	MBL RNP019P
<i>Anti-Fyn</i>	Untxia	1:100	Santa Cruz sc-434
<i>Anti-Puromycin</i>	Sagua	1:500	Millipore MABE343
<i>Anti-Olig2</i>	Sagua	1:1000	Millipore MABN50
<i>Anti-Synaptophysin</i>	Oiloa	1:500	Synaptic systems #101006
<i>Anti-Homer1</i>	Untxia	1:500	Synaptic systems #160003
<i>Anti-α-Tubulin</i>	Sagua	1:5000	Abcam ab7291

9. Puromizinareneko hurbiltasun-loturaren proba (Puro-PLA)

3 EIV pasatu ostean, oligodendrozito kontrolak eta A β rekin tratatutakoak (2×10^4 zelula/putzuko) puromizinarekin ($2 \mu\text{M}$) tratatu ziren 10 minutuz, anisomizina sintesi proteikoaren inhibitzailearen absentsian edo presentzian ($40 \mu\text{M}$) 25 minutuz. Puromizinarik gabeko kontrol negatiboek medio freskoa baino ez zuten jaso. Zelulak digitonina zeukan PBS hotzarekin garbitu ziren, eta % 4 PFAn eta sakarosan fixatu ziren 15 minutuz.

PLA, Duolink[®] PLA (Sigma Aldrich) protokoloari jarraiki egin zen. Laburki, zelulak iragazkortu eta blokeatu zirenean, gau osoan zehar antigorputz primarioekin inkubatu ziren, MBP (untxia), MOBP (untxia) eta puromizinarekin (sagua) aurkako antigorputzekin (1:500), hain zuzen. Estalkiak tanpoi egoki batekin garbitu ziren, eta zegozkien PLA sondekin inkubatu ziren ordubetez. Kit-eko ligazio soluzioarekin 30 minutuz inkubatu ziren, eta, ondoren, seinalea anplifikatuko zuen polimerasa batekin inkubatuz 100 minutuz. Lau inkubazio-urratsak 37°C -ko ganbera heze batean egin ziren, garbiketaturratsekin txandakatuz. Azkenik, zelulak garbitu eta Alexa[®] 488-rekin konjugatutako faloidinarekin tratatu ziren % 1 BSA, zitoeskeletoa ikusarazteko. Estalkiak beirazko objektu-euskarrietan muntatu ziren, Duolink[®] In situ Mounting Media erabiliz.

Irudiak Zeiss Apoteome 2 (Zeiss) epifluoreszentziako mikroskopioarekin hartu ziren, 63Xeko olio-objetiboa erabiliz. Irudien analisisa ImageJ/Fiji softwarearekin egin zen. Faloidina seinalea "Gaussian Blur" pluginarekin prozesatu zen maskara bat sortzeko. "Concentric Circles" plugina erabiliz, $10 \mu\text{m}$ -ko tarteetan zirkulu zentrokideak sortu ziren, zelula-gorputzaren erdigunetik ateratzen zirenak, eta PLA fluoreszentzia-intentsitatearen batez besteko balioak lortu ziren.

10. Nanofibretan hazitako oligodendrozitoen desberdintzapen entsegua

14 EIV ondoren, PDLz (Sigma) estalitako nanofibrei atxikitako oligodendrozitoak (2×10^4 zelula/putzuko) % 4 PFAn eta sakarosan fixatu ziren 20 minutuz, eta hiru aldiz garbitu ziren 0,1 M PBSetan. Zelulak, iragazkortu eta blokeatu ziren NGS % 20ean (Palex), eta Triton X-100 (Sigma-Aldrich) % 0,1an zeukan PBS 0,1 M-ean (blokeo-soluzioa) ordubetez

giro-tenperaturan. Gero, blokeo-soluzioan disolbatutako anti-MBP (1:200) eta anti-MOG (1:200) antigorputz primarioekin inkubatu ziren 4°C-tan gau osoan zehar. Ondoren, hiru aldiz garbitu ziren PBS 0,1 M-tan, eta fluorokromoz konjugatutako antigorputz sekundarioekin inkubatu ziren ordubetez giro-tenperaturan. Jarraian, hiru aldiz garbitu ziren PBS 0,1 M-tan, eta bigarren garbiketan DAPIrekin inkubatu ziren 10 minutuz (4 µg/ml, Sigma-Aldrich). Azkenik, ebakiak beirazko objektu-euskarrietan muntatu ziren, Fluoromount-G (SouthernBiotech) muntaketa-medioa erabiliz. Leica TCS SP8 mikroskopia konfokolarekin z-stack irudiak hartu ziren, 63X-eko olio-objetiboa erabiliz. ImageJ/Fiji softwarea erabili zen zelula-prozesu guztien MBParen hedadura neurtzeko (zelula-nukleotik prozesuaren puntaraino dagoen MBP seinalearen distantzia, nanofibraren orientazioarekin paraleloan). Zelula bakoitzerako markatutako MBP eta MOGen batez besteko intentsitatea ere zehaztu zen (z-stack-eko 3 proiektzio bizienak hartu ziren kontuan).

11. Mikroskopia elektronikoa

Saguak % 4 PFAn, % 2,5 glutaraldehidoan (Electron microscopy Sciences) eta % 0,5 NaCl tanpoi fosfatoan, (pH 7,4) perfunditu ziren, deskribatu bezala (Möbius et al., 2010). Aldiz, ernaldurik ondoko 8 eguneko (EPF) zebra-arrainak, kakodilato tanpoian disolbatutako %2 glutaraldehidoan (Electron microscopy Sciences) eta % 4 PFAn (pH 7,4) fixatu ziren, gutxienez 5 egunez. Saguen garunak eta zebra-arrainen bizkarrezurreko muinak soluzio finkatzaile berarekin postfixatu ziren 4°C-tara gau osoan zehar. Ehunak sagitalki moztu ziren, Leica VT 1200S (Leica) bibrazio-horzdun mikrofito bat erabiliz, 200 µm-ko lodierako sekzioak lortzeko. Ehun-sekzioak % 2ko OsO4an portfixatu ziren, etanol abd propilenoxidoan deshidratatu eta EPONen (Serva) txertatu ziren 24 orduz, 60°C-tan. Sekzio ultrafinak (50 nm-ko lodiera) Leica Ultracut S (Leica) ultramikrotomoarekin lortu ziren. Ondoren, %4ko uranilo-azetatoarekin 30 minutuz inkubatuz, eta, jarraiki, berun-zitratoarekin 6 minutuz inkubatuz, kontrastatu ziren.

EM irudiak Zeiss EM900 (Zeiss) mikroskopia elektronikoan atera ziren. g-ratioa (100 axoi mielinizatuta animalia bakoitzeko), axoiaren diametroa (A) gehi barneko mihiaren

diametroa (I) zati zuntz guztiaren diametroa (M) formula erabiliz kalkulatu zen ((A+I)/M)). Diametroak ImageJ/Fiji eta Excel softwarrak erabiliz lortu ziren. g-ratorako 8000X irudiak erabili ziren, eta, aldiz, mielinizatutako axoien kopurua kuantifikatzeko 4000X irudiak eraili ziren.

12. Injekzio intrahipokanpalak sagu helduetan

10 asteko sagu arrak (C57BL6/J) injekzioak intrahipokanpalak jaso zituzten eskuineko biraketa horzdunean (BH). Kirurgiarako, animaliak anestesiatuak izan ziren 0,3 ml Avertinekin. Saguak estereotaxi-aparatu batekin immobilizatu ziren, eta zegozkien prestakinak injektatu zitzaizen: ibilgailua edo 3 μ l A β (10 μ M). Orratza bertan utzi zen 5 minutuz, errefluxua saihesteko.

Saguak ketamina /xilazina (100/10 mg/kg) duen soluzioan anestesiatu eta 30 ml tanpoi fosfatorekin eta 30 ml % 4 PFA zeukan 0,4 M PBn perfunditu ziren. Garuna atera eta postfixatu zen soluzio fixatzaile berarekin 4 orduz giro-tenperaturara. Ondoren, % 30 sakarosan (pH 7,5) utzi ziren 4°C-tan, eta azkenik, soluzio kriobabeslean (% 30 etilenglikola, % 30 glizerola eta % 10 PB 0,4 M dH₂O) -20°C-tan mantendu zen.

13. Magnetikoki aktibatutako sailkapen zelularra (MACS)

Saguak isofluoronarekin anestesiatu eta sakrifikatu egin ziren. Ondoren, oligodendrozitoak isolatu ziren, lehen deskribatu bezala (de la fuente et al., 2020). Laburki, burezurretik burmuinak atera, Hibernate A-n (Gibco) sartu eta zati txikitan moztu ziren (1 mm³, gutxi gorabehera). Garunak papaina (33 U/ml) eta DNasa (0,04 mg/ml) zituen disoluzio batekin digeritu ziren 30 minutuz 37°C-tan. Ehunaren digestioaren ostean, papaina, HBSSn (Ca²⁺-/Mg²⁺-) (Gibco) garbitu zen zentrifugazio baten bidez. Ondoren, ehuna birrindu egin zen beirazko Pasteur pipeta batekin, 1 × B27 (Gibco) eta 2 mM sodio pirubato (Gibco) Hibernate An disbatutako soluzioa erabiliz. Birrindu ondoren, zelula- esekidura 70 μ m-ko iragazki batetik (VWR) pasatu zen, eta 20 minutuz zentrifugatu zen 800 × g-tara, % 22,5eko Percoll soluzio batean (GE Healthcare), DMEM Glutamax-ekin (Gibco) batera. Zentrifugazioaren ondoren, Percoll-a xurgapen

bidez kendu zen eta zelulak HBSS (-/-)-rekin (Gibco) garbitu ziren. Zelulak O4-ren aurkako antigorputz batekin (Milteny Biotech) inkubatu ziren 15 minutuz izotzetan. Antigorputz soberakina berriro kendu zen HBSS (-/-)-rekin garbituz eta zelulak magnetikoki banandu ziren fabrikatzailearen jarraibideen arabera (Milteny Biotech). Zelulak SATO+ medioarekin eluitu ziren.

14. RNAREN ERAUZKETA ETA KUANTIFIKAZIOA

14.1 RNA ERAUZKETA

Ereindutako oligodendrozitoen RNA totala, RNA Mini Kit-a (Quiagen) edo TRIzol-a (ThermoFisher Scientific) erabiliz erauzi zen, fabrikatzailearen jarraibideen arabera. MACS bidez lortutako oligodendrozitoen RNA totala, RNA Micro Kit-a (Quiagen) erabiliz erauzi zen, fabrikatzailearen jarraibideen arabera. RNAREN KONTZENTrazioa eta OSOTASUNA Nano Drop (ThermoFisher Scientific) 2000 espektrofotometro batekin neurtu zen.

14.2 ALDERANTZIZKO TRANSKRIPZIOA AND POLIMERASAREN KATE-ERREAKZIO KUANTITATIBOA (RT-qPCR)

RNA, 5X tanpoi, DTT 0,1 M, primer aleatorioak, dNTPak, RNasa OUT eta Superscript III erretrotranskriptasa zituen 20 µl-ko erreakzio batean alderantziz transkribatu zen Verity termozikladorean (Applied Biosystems). Sortutako DNA osagarriak (DNAo) Mili-Q H₂O esterilean disolbatu ziren. Ondoren, polimerasaren kate-erreakzioa egin zen (qPCR) RNAasarik gabeko 3,5 µl ur, Sybr Green Master Mix 5 µl, primer soluzio 1 µl eta DNAoren 0,5 µl zituen soluzio batean. Erreakzio guztiak hirukoiztuta egin ziren eta erreakzioa CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) delakoan egin zen. Anplifikazio-erreakzioak optimizatu egin ziren: 3 min 95°C, eta 40 ziklo, 10 s eta 95°C artean, 30 s eta 60°C artean.

Primer-rak Primer 3 softwarea erabiliz diseinatu ziren, eta DNA Technologies Integrated (IDT) edo QUIAGEN enpresek sintetizatu zituzten. qPCR produktuaren espezifikotasuna fusio-kurben bidez egiaztatu zen. Datuak normalizatu egin ziren geNorm softwarean

hiru gene housekeeping desberdinen adierazpenaren analisiaren bidez lortutako normalizazio-faktore batekin. Primer-ren sekuentziak **6. taulan** zehazten dira.

6.taula. Erabilitako primerren sekuentziak talde desberdinetan sailkatuta.

Kategoria	Genea	Sekuentzia	Erreferentzia
Proteina mielinikoak	<i>Mbp</i>		Quiagen QT00199255
	<i>Mog</i>		Quiagen QT00177149
	<i>Mag</i>		Quiagen QT00195391
	<i>Mobp- 81a</i>	Fwd CGCTCTCCAAGAACCAGAAG Rev GCTTGGAGTTGAGGAAGGTG	IDT
	<i>Plp</i>	Fwd CGACATCCCGACAAGTTTGTG Rev CTAGGGAAGGCAATAGACTGGC	Eurofins
	<i>Cnp</i>	Fwd CGCCCACTCATCATGAGCAC Rev CCTGAGGATGACATTTTCTGAAGA	Eurofins
hnRNP-ak	<i>Hnrnpa2b1</i>		Quiagen QT01826545
	<i>Hnrnpf</i>		Quiagen QT00453110
	<i>Hnrnpk</i>		Quiagen QT00381626
	<i>Hnrnpe1</i>		Quiagen QT00507206
Microtubuluak	<i>Tau</i>	Fwd CGCTCTCCAAGAACCAGAAG Rev GCTTGGAGTTGAGGAAGGTG	IDT
	<i>Dynlt1</i>	Fwd TTACACACCGCAAGTTCCTG Rev GACTAGAAACGCTGGAACCG	IDT
	<i>Dnt1</i>	Fwd TTGACGTGGGTGGTAGCTGT Rev TCTGCGTCATACTCGCCTTC	IDT
	<i>Dnt2</i>	Fwd CAGATGCTGCAATCAACCTT Rev CAACTTTGGCAGCTTGAGAG	IDT
Housekeeping-ak	<i>Gapdh</i>	Fwd GAAGGTCGGTGTCAACGGATTT Rev CAATGTCCACTTTGTTCAAGAGAA	Eurofins
	<i>Bm2</i>	Fwd CACCGAGACCGATGTATATGCTT Rev TTACATGTTCTCGGTCCAGG	Eurofins
	<i>Cica</i>	Fwd CAAAGTTCCAAGACAGCAGAAAA Rev CCACCCTGGCACATGAATC	Eurofins
	<i>Actb</i>	Fwd TGTCACCAACTGGGACGATA Rev GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA	IDT

14.3 RNA-seq

RNA-seq-a burutzeko, laginak Biogunera bidali ziren. RNAREN kantitatea eta kalitatea ebaluatzeko, Qubit RNA assay kit (Invitrogen) eta Agilent 2100 bioanalizatzailea (Agilent RNA 6000 Pico Chips) erabili ziren. Lagin guztiek kontzentrazio eta osotasun nahikoa zuten esperimentuak egiteko.

Sekuentziazio-liburutegiak "SMARTer Stranded Total RNA-seq Kit v2 Pico Input Mammalian" (Takara Bio USA, Cat. # 634411) kit-a eta "SMARTer Stranded Total RNA-seq Kit v2 Pico Input Mammalian User Manual (Rev. 050619)" erabiliz sortu ziren. Protokoloa 4-10 ng-ko RNA totalarekin hasi zen. Laburbilduz, RNA zatitu eta 1. kateko DNAo-ren sintesia egin zen, alderantzizko SMARTScribe transkriptasa erabiliz, 90 minutuz 42°C-ra, 10 minutuz 70°C-ra eta 4°C-ra egindako etenaldi batez. Ondoren, indizeak zituzten Illumina egokigailuak gehitu ziren aurreanplifikazioko PCR batean (60 seg 94°C-ra, 5 ziklo 15 seg 98°C-ra, 15 seg 55°C-ra, 30 seg 68°C-ra, eta geldialdia 4°C-ra). Ondoren, ZapR v2 eta R-Probes v2 zituen DNAo erribosomikoa ezabatu zen. Azkenik, liburutegien aberastea PCR bidez lortu zen (60 s 94°C-tan; 12 edo 16 ziklo 15 s 98°C-ra, 15 s 55°C-ra, 30 s 68°C-ra; eta geldialdia 4°C-ra). Ondoren, liburutegiak Agilent 2100 bioanalizatzaile batean bistaratu ziren, Agilent sentsibilitate handiko DNA kit-a erabiliz (Agilent Technologies, Cat. # 5067-4626), eta DNA dsDNA HS Qubit kita erabiliz kuantifikatu ziren (Thermo Fisher Scientific, Cat. #Q32854). Illumina sekuentziaziaileak irudi landugabeak sortzen ditu RTA (Real Time Analysis) izeneko analisi primarioko software integratu baten bidez. BCL bitarra FASTQ bihurtarazten da, Illumina Inc-en bcl2fastq paketea erabiliz.

Kalitate-kontrolaren analisiaren ondoren (FastQC; Andrews, 2010), lerrokatzea STAR v2.7.1 (Dobin et al., 2013) proiektuarekin egin zen, *Rattus norvegicus* genomaren (BN7.2.toplevel ang gtf v105) kontra; beraz, ez zen beharrezkoa izan inolako murrizketarik egitea. Zenbaketa-matrizea lortzeko, htseq-count (s reverse) exekutatu zen (Anders, Pyl, & Huber, 2015) hari-espezifikotasunarekin, eta R v4.2.2ra inportatu zen, non DESeq2rekin aztertu zen (Love, Huber, & Anders, 2014). Lehen urratsa izan zen adierazten ez ziren > 2 (Interaktoma analisia) eta > 5 (Aβ-ren eraginaren analisia) geneak iragaztea, gutxienez 2/3 lagin motatan. Horrela, genetzat hartu zen 3tik 2 laginetan gutxienez adierazten bazen eta gainerako lagin-motetan inola ere adierazten ez bazen. Horrela, detekzio-alborapena saihestu zen.

Hurrengo urratsa inplikaturako faktoreak modelizatzea izan zen, hurrengo taulan agertzen diren faktoreak kontuan hartuz:

7. taula. Laginen taula. Lagin bakoitzari (errenkadaren izena) faktore baten maila bat esleitzen zaio (zutabearen izenak). IgG-ren laginak kontrol-zelulen nahasketa bat ziren, eta Awindoo-rekin tratatuak; beraz, zarata bi baldintzetan ezabatzen erabili ziren.

Laginen izena	Esperimentua	Bikotea	Baldintza
IgG2	IgG	2	Kontrola/A β
IgG3	IgG	3	Kontrola/A β
IgG4	IgG	4	Kontrola/A β
InputC2	Input	2	Kontrola
InputC3	Input	3	Kontrola
InputC4	Input	4	Kontrola
InputA β 2	Input	2	A β
InputA β 3	Input	3	A β
InputA β 4	Input	4	A β
RIPC2	RIP	2	Kontrola
RIPC3	RIP	3	Kontrola
RIPC4	RIP	4	Kontrola
RIPA β 2	RIP	2	A β
RIPA β 3	RIP	3	A β
RIPA β 4	RIP	4	A β

Analisi desberdinetarako, lagin mota desberdinak hautatu ziren, DESeq2rekin bateragarria zen faktore-matrize bat lortzeko. A2 interaktomaren analisian, kontrol-laginak bakarrik hautatu ziren (IgG, Input kontrola, RIP kontrola). Antzeko *pipelin-ak* jarraitu ziren (Moore et al, 2019; Tichy et al, 2018; Rossi et al, 2017; Gagliardi et al, 2016), erabilitako diseinua eta kontrastea \sim Parea + esperimentua ("Esperimentua_RIP_vs_Input", "Esperimentua_IgG_vs_Input"), hurrenez hurren. P balio doituak < 0,05 zuten geneak A2rekiko interaktuatzaile esanguratsu gisa identifikatu ziren. IgG-ren laginak kontroleko zelula parekatuen IgG-ren nahasketa bat direnez, eta A β orekin tratatuak, A β orekin tratatutako laginak ere erabili ziren, antzera tratatutako interaktoma lortzeko eta kontrol-emaitzekin alderatzeko.

Era berean, oligodendrozitoen transkriptoetan A β oren eragina aztertu zen diseinu honekin: \sim SV1 + SV2 + Parea + Esperimentua + Baldintza + Esperimentua: Baldintza. Hala ere, ereduaren konplexutasuna dela eta, IgG-ko laginak ezabatu egin ziren. SV1 eta SV2 faktoreak Ordezko Aldagaien Analisisian oinarrituta konputatu ziren, faktore zaratatsu ezezagunek eragindako aldakortasuna ateratzeko, hala nola A β -ren

oligomerizazioa, beste batzuk barne. Zelula osoen transkriptorean A β -en efektua aztertzeko, kontraste hau erabili zen: "Baldintza_A β _vs_C".

Datuak bistaratzeko eta aberastasun funtzionala ikusteko: ggplot2 (Wickham et al, 2016) eta clusterProfiler (Wu et al, 2021; Yu et al, 2012) erabili ziren. Erabilitako kodea <https://github.com/rodrisenovilla/AlberdiLab> helbidean aurki daiteke. Aztertutako datuak behar bezala kargatuko dira GEO biltegian (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), argitaratu ondoren.

15. RNAREN hibridazioa

RNAREN *in situ* hibridazio fluoreszentea RNAScope Multiplex V2 (Advanced Cell Diagnostics; ACD) kit fluoreszentea erabiliz gauzatu zen, PFAn fixatutako eta agarosan enbeditutako 15 μ m-ko kriosekzioetan, fabrikatzailearen jarraibideen arabera. Zenbait aldaketa gauzatu ziren, hala nola, sekzioak parafilm bidez estali ziren 40°C-ko inkubazio guztietan, hezetasuna mantentzeko eta erreaktiboak sekzioetan sakabanatzeko. Zebra-arrainaren transkripzio-zundak *mbpa*, *myrf* eta *sox10* fabrikatzaileak diseinatu eta sintetizatu zituen, eta 1:50eko diluzioetan erabili ziren, *mbpa*-rako izan ezik, ez baitzen diluitu. Transkriptoak TSAn oinarritutako Opal520 (1:1500), Opal570 (1:500) eta Opal650 (1:1500) fluoroforoekin markatu ziren Opal 7 Kit (PerkinElmer) erabiliz. Irudiak Zeiss Cell Observer Spinning Disk sistema konfokal batean atera ziren, 40 \times /1,20 NA uretako objetiboa erabiliz. Animalia bakoitzaren bizkarrezur-muineko 10 sekziotako irudiak eskuratu ziren 28 z-stack-koak (z pasabidea = 0,28 μ m). Kanal bakoitzak okupatutako eremu osoa ImageJ/Fiji-n zehaztu zen.

16. Entsegu immunoentzimatikoa (ELISA)

Giza A β ₁₋₄₂ mailak homogeneousizatu eta zehaztu ziren, giza amiloiderako sentsibilitate handiko ELISA kit-a (Millipore, #EZHS42) erabiliz. Kontzentrazioak fabrikatzailearen jarraibideen arabera kuantifikatu ziren, tripliken batez bestekoa eginez eta zelula bizien guztizko kopuruarekin normalizatuz.

50 µl antigorputz konjugatzeko soluzio gehitu zen putzu guztietan. Jarraian, 50 µl soluzio estandar eta lagin (prediluituak) gehitu zitzaizkion aurrez tratatutako 96 putzutako plaka bati. Plaka hori 5 minutuz inkubatu zen giro tenperaturan, astintze leunarekin, eta 4°C-tan gau osoan zehar astindu gabe. Hurrengo egunean, plaka 5 aldiz garbitu zen garbitzeko soluzioarekin, eta 100 µl konjugamendu entzimatikoko soluzio gehitu zitzaizkion, eta 30 minutuz inkubatu zen giro tenperaturara, astintze leunarekin. Ondoren, plaka berriro 5 aldiz garbitu zen, eta 100 µl substratu-disoluzio gehitu ziren eta 7 minutuz inkubatu zen giro tenperaturara, astintze leunarekin. Azkenik, gelditze-soluzioko 100 µl gehitu ziren, eta plaka berehala irakurri zen 450 eta 590 nm-ko fluorimetroan. Kurba estandarra x ardatzean kontzentrazio estandarra (pg/mL) eta y ardatzean xurgapena marraztuz lortu zen.

17. Besikula estrazelularren (BE) purifikazioa

Ereindutako oligodendrozitoak A β -rekin tratatu ziren 24 orduz (250.000 zelula/baldintza neuronak tratatzeko eta 1x10⁶ zelula/baldintza WBrako). Ondoren, oligodendrozitoen bideragarritasun-saiakuntza egin zen (zelula biziak kuantifikatzeko) eta hazkuntza-media jaso zen BEak isolatzeko. Gainerako zeluletatik proteinak atera eta kontrol gisa erabili zen.. Jarraian, media zentrifugatu zen 1.500 x g-tara 5 minutuz, altxatutako zelulak eta zelula-hondarrak kentzeko. Ondoriozko gainjalkina 315.000 x g-tara ultrazentrifugatu zen 75 minutuz, eta EB eta exosoma txikiak zituzten azken jalkinak 15 µl PBSn (pH 7,4) berreserkitu ziren. Jalkinak 2X lagin-tanpoian berreserkitu ziren eta 95°C-tan irakin ziren 5 minutuz. Lisatu zelularrak (input) eta gainjalkinak western blot-aren bidez aztertu ziren. Analisi eta tratamendurako kantitatea baldintza bakoitzerako zelula bizien kopuruarekiko normalizatu zen.

18. *In vivoko* irudien hartzea denbora errealean

18.1 Fluorescent recovery after photobleaching (FRAP)

FRAP esperimentuak ereindutako oligodendrozitoetan (2 eta 3 EIV) egin ziren, Life-Act eramaten duen Sindbis birusaren 1:100 diluzioarekin infektatuta, 16 orduz gutxienez.

Esperimentu bakoitza bi baldintza desberdinekin egin zen: tratamendurik gabeko kontrol-zelulak eta esperimentua baino 30 minutu lehenago A β peptidoaren 1 μ M-rekin tratatutako zelulak. 30 minutu horiek igaro ondoren, medioaren ordean "Live Cell Imaging Solution" (ThermoFisher Scientific) jarri zen mikroskopioan bistaratzeko, eta berriro gehitu zen A β , FRAP saiakuntzan presente egon zedin. Leica TCS STED CW SP8 mikroskopio konfokalarekin lortu ziren irudiak, Leica "FRAP with TCS SP8" protokoloari jarraituz. F-aktina-GFPa fotozuritzearen baino 20 segundo lehenago erregistratu zen 405 nm-ko uhin-luzera erabiliz. Ondoriozko fluoreszentsia berreskuratzea 280 segundoz neurtu zen. Seinale fluoreszentearen analisia Leica Application Suite X (LAS X) programarekin egin zen.

Teknika honen bidez, A β peptidoak ereindutako oligodendroitoetan fluoreszentsiaz markatutako F-aktinaren polimerizazioan duen eragina ikusi nahi genuen. Kontuan izan behar da ikusitako fluoreszentsiaren berreskurapenaren arrazoa ez dela polimerizazioa bakarrik izan, fluoroforoaren hedapen maila bat egon baitaiteke. Hori dela eta, fluoreszentsia ere erregistratu zen zelula bereko fotozuritu gabeko eremu batean, kontrol gisa. Horrela, datuen prozesamenduan zuzenketa-faktore bat sartu zen, honela kalkulatu: kontrol-eskualdeko balio bakoitzaren eta eskualde bereko hasierako balioaren arteko erlazioa. Eremu fotozuritzeari buruzko datuak dagokien zuzenketa-faktorearekin zatitu ziren, fluoroforoaren hedapenaren ondoriozko fluoreszentsia-ozilazioak konpentsatzeko, eta ez polimerizazioaren ondoriozkoak. Ondoren, datu gordinak trazatu ziren eta normalizatu egin ziren fotozuritzearen (1 gisa definitua) aurreko batez besteko fluoreszentsiarekiko eta fotozuritzearen (0 gisa definitua) uneko fluoreszentsiarekiko. Emaitzak aztertzeko, "Fast Half Life" parametroa aukeratu zen, fase azkarrean fluoreszentsia berreskuratzeko abiadura neurtzen duena. Zehazki, etapa honetan fluoreszentsiaren erdia berreskuratzen den denborari dagokio. Parametro honen balioak erregresio ez-linealaren bidez lortu ziren (bi faseko gainbehera eredu) GraphPad Prism 8 erabiliz.

18.2 Kaltzio zitosolikoaren neurketa oligodendrozito kultiboetan

Ca²⁺ zitosolikoaren neurketa aurrez deskribatu bezala egin zen (Ruiz, Alberdi, & Matute, 2014). Laburki, oligodendrozitoak Fluo-4 AM-rekin kargatu ziren (Molekular Probes, Invitrogen) 30 minutuz SATO+ hazkuntza-medioan 37°C-tan. Ondoren, hazkuntza-medioa kendu eta zelulak 20 minutuz mantendu ziren soluzio estrazelularrean (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 2 mM, Glukosa 10 mM eta HEPES 10 mM; pH 7,4), desesterifikazioa ahalbidetzeko. Oligodendrozitoei KCl (25 mM) gehitu zitzaien, eta irudiak LCS SP2 (Leica, Alemania) mikroskopio konfokal alderantzikatu baten bidez lortu ziren 40X olio-objetiboa erabiliz. Irudiak, 5 minutuz grabatu ziren 15 s fotogramako abiaduran. Datuen analisirako, 10-20 zelulako populazio homogeneo bat hautatu zen ikusmen-eremuan, eta somata zelularrak ROI gisa hautatu ziren. Irudien atzealdeko balioak ebatsi ziren, eta datuak $F/F_0 \pm SEM$ (%) gisa adierazi ziren. Bertan, F-k aldi baterako puntu jakin baterako fluoreszentsia-balioa adierazten du, eta F₀k atsedeneko fluoreszentsia-mailaren batez bestekoa.

18.3 Kaltzio zitosolikoaren neurketa kultibo organotipikoetan

Ebakidura organotipikoak Fura 2-AM (5, Molekular Probes, Invitrogen) eta % 0,01 PluronicTM F-127-rekin (Invitrogen) inkubatu ziren kultibo medioan 30 minutuz 37°C-tan. Ondoren, zelulak HEPES-Hank 's disoluzioan garbitu ziren (inkubazio-tanpoia) (HBSS, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 2 mM, Glucosa 10 mM, NaHCO₃ 4 mM eta HEPES 20 mM; pH 7,4) 10 minutuz giro-tenperaturara. Esperimentuak etengabe inkubazio-tanpoiarekin perfunditutako estalki-kamera batean egin ziren. Leica DMLFSA (Leica, Alemania) epifluoreszentsiazko mikroskopio alderantzikatu baten platinan muntatu zen perfusio-kamera. Kultibo organotipikoei KCl (50 mM) gehitu zitzaien mikroinjektore baten bidez (Eppendorf), 160 hPa-ko presioarekin (pultsuaren iraupena 10 s). Irudiak 40Xeko ur-objetiboarekin eskuratu ziren, 2 minutuz 1 fotograma/1 s-ko abiaduran, Aquacosmos softwarearekin (Hamamatsu, Japonia). Kaltzioaren kontzentrazio intrazelularra 340/380 ratioaren bidez kalkulatu zen.

18.4 Mielina zorroen bisualizazioa zebra-arrainean

5 EPF-ko zebra-arraineko larbak % 0,4ko trikainarekin anestesiatu ziren, eta % 1,2 agarosa eta % 0,4 trikainadun soluzioan sartu ziren, kristalezko hondoa duen plater batean immobilizatzeko. Irudiak Zeiss Cell Observer Spinning Disk sistema konfokal batean atera ziren, 63 ×/1,20 NA ur-objetiboa erabiliz. 1-2 eremutako irudiak jaso ziren animalia bakoitzako, 40 z-stack-eko irudiak (z-step = 0,28 μm) eginez. Zorroen luzera eta kopurua intentsitate handieneko proiektzioetan aztertu ziren, modu itsuan Fiji/ImageJ erabiliz.

19. Analisi estatistikoak

Datu guztiak ± S.E.M (bataz besteko errore estandarra) gisa adierazi ziren, irudian puntu bidez adierazitako laginaren tamainarekin. Analisi estatistikoak balio absolutuak eta GraphPad Prism 8 softwarea erabiliz egin ziren. Bi isatseko parekatu eta parekatu gabeko Student t-proba, bide bateko ANOVA eta bi bideko ANOVA probak aplikatu ziren *post-hoc* testekin batera laginaren ezaugarrien arabera. Esanahi estatistikoa honela irudikatu zen: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) eta $p < 0,0001$ (***)).

EMAITZAK

I. PARTEA: Oligodendrozoen erantzun transkriptomiko diferentziala Alzheimer patologiaren aurrean

Azken urteotan, zelula bakarrean egindako analisi genomikoek, AGko zelula mota askotan desregulatutako seinaleztapen-bide komunak erakutsi dituzte, esaterako hantura eta erantzun immunea, lipidoen seinaleztapena eta metabolismoa, estres metabolikoa eta proteinen tolestura, DNAREN kaltea eta seneszentzia zelularra, eta zelula baskularrekiko interakzioak (Murdock eta Tsai, 2023). Alzheimer gaixotasunean egindako oligodendrozoen analisi genomikoek alterazioak identifikatu dituzte zelula horien hainbat funtzioetan, hala nola mielinizazioan, jarduera neuronalaren detekzioan eta funtzio immunean. Gainera, AG duten sagu transgenikoetan egindako analisi transkriptomiko espazialek erakusten dute plaka amiloideek oligodendrozoen geneen adierazpena aldatzen dutela (Chen et al., 2020). Hala ere, ezer gutxi dakigu A β -ek oligodendrozoetan eta mielinizazio-prozesuetan izan dezaketen eraginari buruz, eta horrek gaixotasunaren garapenean eta progresioan nola lagun dezakeen.

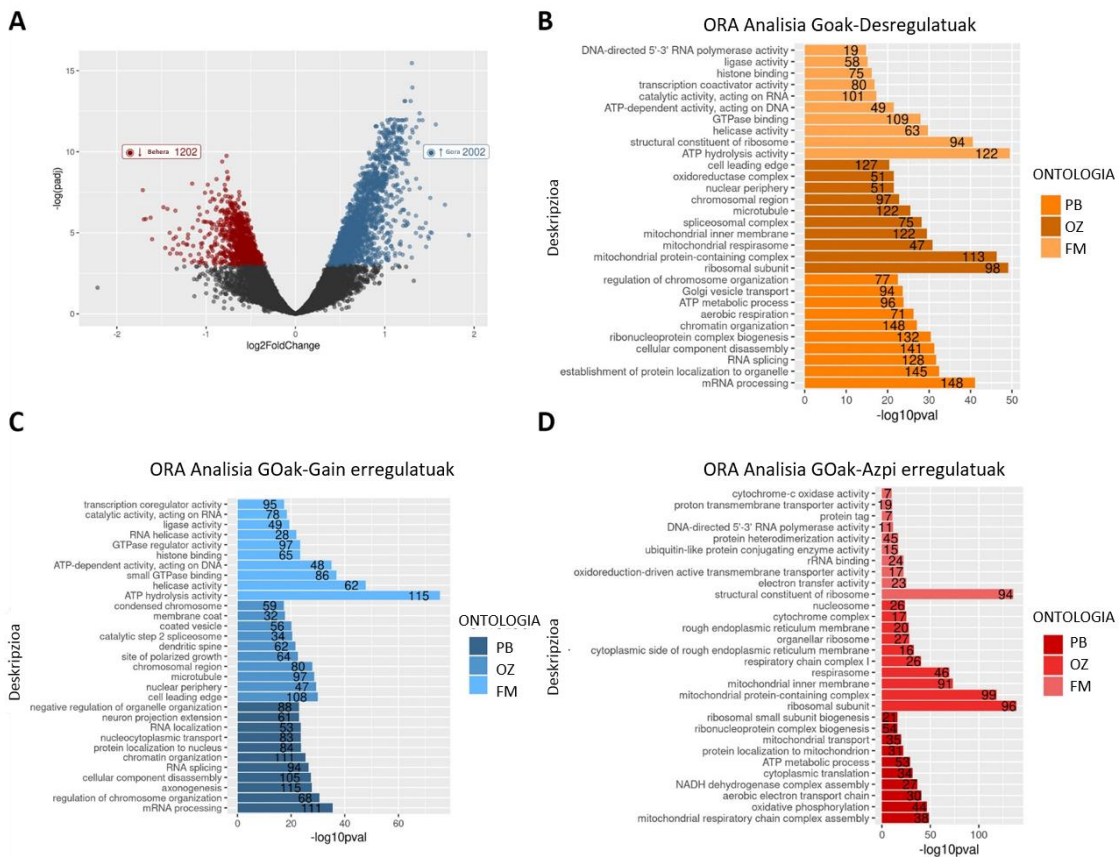
1.1 A β_{1-42} oligomeroek oligodendrozoen transkriptoma aldatzen dute *in vitro*

Oligodendrozoen erantzun transkripzionalak ikertzeko, RNAREN sekuentziazioa (RNA-seq) egin genuen kontrol eta A β -ekin tratatutako oligodendrozoetan. 24 orduko tratamenduaren ondoren, diferentzialki adierazitako 3204 gene (DAG) aurkitu genituen, non 2002 gainadierazita, eta 1202 azpiadierazita agertzen ziren (DeSeq2, P balio doitu $<0,05$) (**10A. irudia**). Adierazpen genikoaren desberdintasunak hobeto ulertzeko, Geneen Ontologiaren (GO) terminoak aberasteko analisia (*Cluster profiler* softwarea) eta *WikiPathways* bideak aztertzeke analisia (*Webgestalt* softwarearen tresna) egin genituen.

Gainadierazitako geneek parte hartzen duten prozesu biologikoen (PB) arabera sailkatu ziren, eta gene gehien zituzten prozesuak; RNAREN metabolismoa (*hnrnpu*, *hnrnpk*,

hnnpm, *hnnpa2b1*, *App* eta *Dhx9*), erregulazio kromosomikoa (*Upf1*, *Atrx*, *Parp1* eta *Top2a*) eta garraio nuklearra (*Ctnna1*, *Xpo*, *Htt*, *Nup133* eta *Stat3*) izan ziren. Besikulen lokalizazioa, Golgiren besikulen garraioa eta morfogenesia bezalako prozesu biologikoak ere gain-erregulatuta agertzen ziren (**10C. irudia**). Aitzitik, azpi-erregulatutako geneak, batez ere, arnas-kate mitokondrialarekin (*Nduf* desberdinak, *Tfam* eta *Cos19*), fosforilazio oxidatibo eta ATP sintesiarekin (*Uqcrcq*, *Cox1*, *Cycc*, *Cytc* eta *Park7*) lotuta zeuden (**10D. irudia**).

Gainadierazitako DAGekin lotutako bideak kolesterolaren metabolismoa eta biosintesia, hexosen metabolismoa, TNF- α NF-kB seinaleztapen-bidea eta foku-atxikipena ziren (**8. taula**). Bide horiek guztiak mielinizazioan funtsezkoak dira. Bestalde, azpiadierazitako DAGekin lotutako bideetan proteina erribosomiko zitoplasmatikoak eta transkripzio eukariotoaren hasiera sartzen ziren, itzulpenarekin lotuta daudenak. Aipatzekoa da, desregulatutako hainbat bide metabolismo energetikoarekin lotuta daudela (**8. taula**).



10. irudia. A β o-ekin tratatutako oligodendrozoeten analisi transkriptomikoa, zelula kontrolekin alderatuta. **(A)** Gorantz eta beherantz nabarmen erregulatutako geneen banaketa erakusten duten Volcano diagrama. **(B)** GO analisia; prozesu biologiko (PB), osagai zelularra (OZ) eta funtzio molekularra (FM). GO

termino bakoitzean lotutako gene kopurua adierazten da. **(C)** Gain adierazitako geneen GO analisia eta termino bakoitzari lotutako gene kopurua. **(D)** Azpi adierazitako geneen OG analisia eta termino bakoitzari lotutako gene kopurua.

Adierazpen-maila altuenak dituzten geneak oligodendrozoitoen funtzio garrantzitsuekin lotzeaz aparte, AGrekin lotura zuzena dute, hala nola mielinizazioarekin, burdinaren homeostasiarekin eta APP bidearekin. Gainadierazitako geneen artean, honako hauek nabarmentzen dira: *Actb*, *Nfasc*, *Cnp*, *Mag*, *ApoE*, *hnrnpa2b1* eta *App*; aldiz, azpiadierazitakoen artean *Fth1*, *Ftl1* eta *Mobp*.

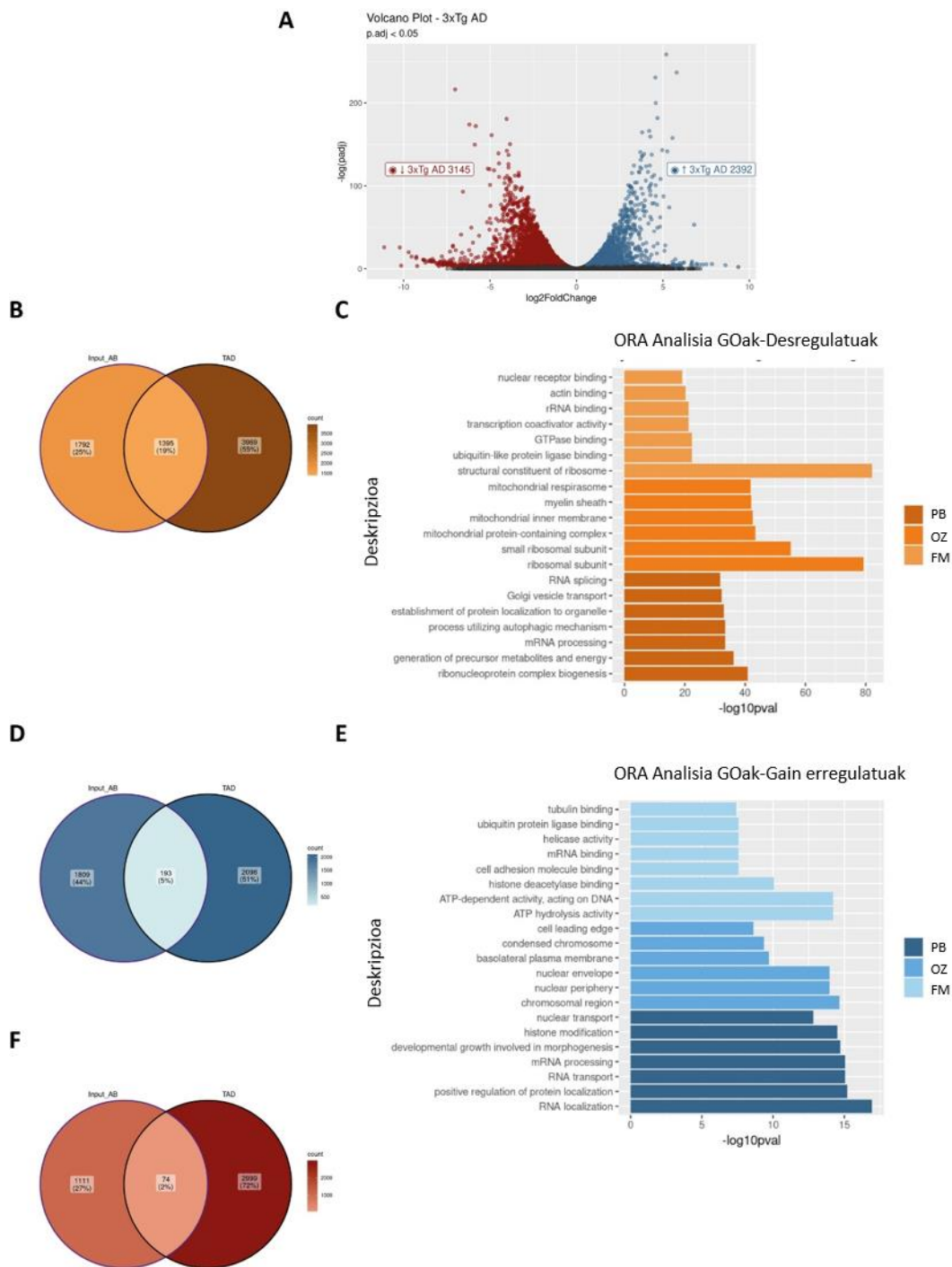
8. taula. A6o-ekin tratatutako oligodendrozoitoetan gain- eta azpi-erregulatutako DAGekin lotutako bidezidorrak.

geneSet-a	Deskripzioa	tamaina	gainjartzea	P balioa
WP529	mRNAaren prozesamendua	112	43	8,13E-03
WP632	Kolesterolaren metabolismoa	23	13	2,30E-09
WP3916	Hexosen metabolismoa	55	18	3,38E-12
WP439	Intsulinararen seinalizazioa	152	36	8,73E-11
WP457	TNF- α NF-kB seinalizazio bidea	174	39	0.001659
WP145	Estatinen bidea	18	8	0.001800
WP1292	Karbono bakarreko metabolismoa	26	10	0.001852
WP461	Kolesterolaren biosintesia	15	7	0.002502
WP188	Adhesio zelularra	190	41	0.002720
WP372	B-oxidazioa	32	10	0.010198
WP30	Erribosomak	108	47	<2.2E-16
WP59	Elektroien garraio katea	93	35	<2.2E-16
WP1283	Fosforilazio oxidatiboa	60	23	7,12E-02
WP491	Itzulpen eukariotikoaren hasiera	40	11	3,63E-11
WP1279	Estrogenoen seinalizazioa	69	12	0.0016441
WP1293	Seleinoaren metabolismoa	34	7	0.0059846
WP294	p38 MAPK seinalizazio bidea	37	7	0.0096622
WP1310	Selenioaren mikronutrienteen sarea	23	5	0.0155700
WP1311	Azido folikoaren sarea	25	5	0.0220634
WP4229	Intsulinararen induzitutako PI3K-Akt eta MAPK hepatozitoetan	34	5	0.0713909

1.2 A β -rekin tratatuko eta 3xTg-AG-etik isolatutako oligodendrozitoen arteko analisi konparatiboa

Ondoren, AGean oligodendrozitoek pairatzen duten efektua sakonago aztertzeko, *in vitro* ikusitako alterazioak 3xTg-AG sagu ereduan (APP^{Swe}, MAPT^{P301L} eta PSEN1^{M146V} mutazioen eramailea) egiaztatu genituen. Etapa goiztiarretan aldatutako bideak aztertu nahi genituen, MACS teknika erabili genuen 6 hilabeteko 3xTg-AG eta WT saguen garunetik oligodendrozito heldugabeak eta helduak (O4+) isolatzeko. Horiekin, RNA-seq masiboa egin genuen adierazpen genikoaren aldaketak zehazteko. 5537 DAGen artean, 2392 gene gainadierazita, eta 3145 gene azpiadierazita zeudela ikusi genuen (DeSeq2, P balio doitua < 0,05) **(11A. irudia)**. *In vitro* eta *in vivo*-ko DAGak alderatutakoan, bi kasuetan 1395 (% 19) gene aldatuta zeudela ikusi genuen. DAG horiek RNAREN metabolismoan (mRNAREN *splicing*-a eta mRNAREN prozesamendua), Golgiren besikulen garraioan, erribonukleoproteina konplexuaren biogenesia, autofagian eta metabolismo energetikoan inplikaturik zeuden nagusiki **(11B, C. irudia)**. Ondoren, *in vitro* eta *in vivo* aztertutako DAG guztietatik joera bera jarraitzen diotenak zehaztu genituen. 1395 geneetatik, 193 soilik zeuden gainadierazita eta, aldiz, 74 azpiadierazita **(11D, F. irudia)**. Ondoren, GO eta *Wikipathways* analisiak egin genituen. Gainadierazitako PBen artean batez ere RNAREN metabolismoarekin (mRNAREN prozesamendua, garraioa, lokalizazioa eta lotzea), proteinen lokalizazioaren erregulazio positiboarekin edo zitoeskeleto mikrotubularraren antolaketarekin zerikusia dutenak ikusi genituen **(11E. irudia)**.

Bestalde, *Wikipathway* analisiak bi eruedetan gehien aberastutako 10 bideak erakutsi zituen. Gain-erregulatutako DAGekin lotutako bideak intsulinaren seinalizazioa, mRNAREN prozesamendua edo pluripotenzia ziren. Azpi-erregulatutakoak, aldiz, MAPK eta Akt seinaleztapen-bideekin lotzen ziren. Gainera, *in vitro* ereduan deskribatu den bezala, energia-metabolismoarekin lotutako hainbat bide ikusi genituen, hala nola gantz-azidoen beta oxidazioa, estres oxidatiboa eta glukogenoaren metabolismoa **(9. taula)**.



11. irudia. In vitro eta 3xTg-AG saguen oligodendrozoen analisi transkriptomiko konparatiboa. (A) WT eta 3xTg-AG saguen oligodendrozo isolatuetan gain-eta azpi-erregulatutako geneen banaketa erakusten duten Volcano diagrama. (B) In vitro vs 3xTg-AG DAGen gainjartzea irudikatzen duen Venn diagrama. Ehunekoek gene komunen proportzioa adierazten dute. (C) GO analisia desregulatutako DAGekin; prozesu biologiko (PB), osagai zelularra (OZ) eta funtzio molekularra (FM). (D) In vitro vs 3xTg-AG azpiadierazitako DAGen gainjartzea irudikatzen duen Venn diagrama. Ehunekoek gene komunen proportzioa adierazten dute. (E) GOen analisia azpiadierazitako DAGekin; prozesu biologiko (PB), osagai zelularra (OZ) eta funtzio

molekularra (FM). (F) *In vitro* vs 3xTg-AG azpiadierazitako DAGen gainjartzea irudikatzen duen Venn diagrama. Ehunekoek gene komunaren proportzioa adierazten dute.

Mielinizazioan (*Mobp*, *Itgb1*, *App*, *Cnp*, *hnrnpa2b1* eta *Vamp2/3*), zitoeskeletoa (*Actb*, *Dnt1*, *Limk1*, *Rock1*, *Mapt* eta *Dyn*) eta burdinaren homeostasian (*Fth1*, *Ftl1* eta *Iscu*) inplikaturako geneak dira desregulatutako gene nabarmenetako batzuk, bai kultibo primariotik, bai 3xTg-AGtik eratorritako oligodendrozoetetan.

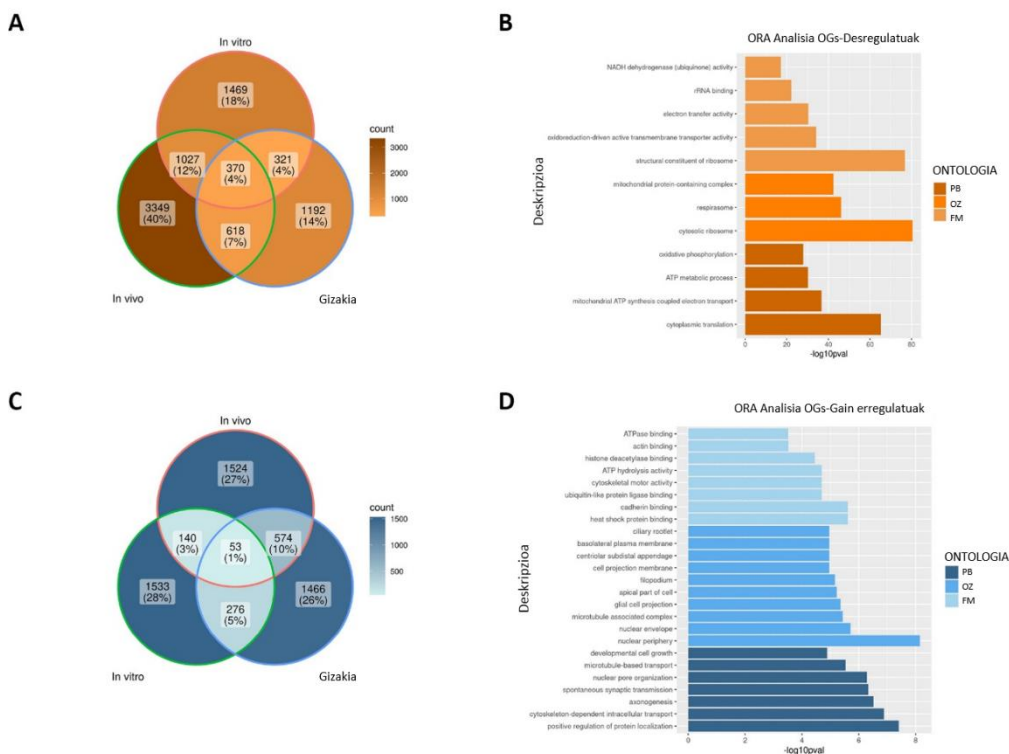
9. taula. Gain- (urdinez) eta azpi- (gorriz) erregulatutako geneak inplikaturako bidezidorrak kultibotako eta 3xTg-AG saguen oligodendrozoetetan.

geneset-a	deskripzioa	tamaina	gainjartzea	pbalioa
WP1763	Pluripotentiarekin erlazioatutako mekanismoak	293	16	3,29E-09
WP65	Intsulinarekin seinalizazioa	159	7	0,008329
WP571	FAS bidea eta estresa induzitutako HSParen erregulazioa	37	3	0,016581
WP310	MRNA-aren prozesamendua	460	12	0,034114
WP336	Gantz azidoen biosintesia	22	2	0,040802
WP4344	Esfingolipidoen metabolismoa	25	2	0,051524
WP403	Wnt seinalizazio bidea	60	3	0,057581
WP6	Integrina bidezko adhesio zelularra	100	4	0,058736
WP543	Gorputz zetonikoen sintesia eta degradazioa	5	1	0,071488
WP523	Aktina zitoeskeletoaren erregulazioa	152	5	0,071828
WP350	p38 MAPK seinalizazio bidea	36	3	6,05E-10
WP151	IL-5 seinalizazio bidea	69	3	0,004006
WP493	MAPK seinalizazio bidea	159	4	0,006085
WP387	IL-6 seinalizazio bidea	99	3	0,010936
WP373	IL-3 seinalizazio bidea	100	3	0,011240
WP2841	Adhesio fokala-PI3K-Akt-mTOR- seinalizazio bidea	325	5	0,016252
WP297	IL-7 seinalizazio bidea	44	2	0,018147
WP1261	ErbB seinalizazio bidea	46	2	0,019741

1.3 Aβo-rekin tratatutako, 3xTg-AG-ko eta AGko oligodendrozoeten arteko analisi konparatiboa

Azkenik, *in vitro* eta 3xTg-AG saguaren ereduaren identifikatutako gaixotasunari lotutako gene-sinadurak, AG pazienteengandik eratorritako oligodendrozoetetan ere asaldatuta ote zeuden jakin nahi genuen. Horretarako, fase goiztiarreko AG pazientetatik eta kontrol-subjektuetatik eratorritako oligodendrozoito-leinuko zelulekin argitaratutako datu-basea hautatu (Mathys et al., 2019), eta analisi konparatiboa egin genuen. 370

gene hiru baldintzekin bat zetozen (% 4), nagusiki itzulpen zitoplasmatikoan eta metabolismo mitokondrialarekin (ATP prozesu metabolikoa, fosforilazio oxidatiboa eta ATPren sintesi mitokondriala) lotuta zeudenak. Hiru baldintzetan joera berari jarraitzen dioten DAGak alderatzean, 53 gene baino ez genituen ikusi gainadierazita (% 1), eta bat ere ez azpiadierazita (**12C. irudia**). Gain-erregulatutako GOak zitoeskeletoarekin eta proteinen lokalizazioaren erregulazio positiboarekin lotutako bideak erakutsi zituzten, besteak beste.



12. irudia. *In vitro*, 3xTg-AG saguen eta AG duten oligodendrozoitoen analisi transkriptomiko konparatiboa. **(A)** Hiru ereduén DAGen gainjartzea irudikatzen duen Venn diagrama. Ehunekoek gene komunen proportzioa adierazten dute. **(B)** GO analisia desregulatutako DAGekin; prozesu biologiko (PB), osagai zelularra (OZ) eta funtzio molekularra (FM). **(C)** Hiru eruedetan gainadierazitako DAGen gainjartzea irudikatzen duen Venn diagrama. Ehunekoek gene komunen proportzioa adierazten dute. **(D)** Prozesu biologikoaren (BP), osagai zelularra (OZ) eta funtzio molekularra (FM) OG analisia.

Bideen analisiak hiru eruedetan aberastutako hainbat bide erakutsi zituzten, eta energia-metabolismoarekin (elektroien garraio-katea, fosforilazio oxidatiboa, i. mitokondria-komplexuaren mihizadura eta glukolisia eta glukoneogenesisia), proteasomarekin (Parkin-Ubikitina proteina-sistemaren bidea), itzulpenarekin

(erribosoma-proteina zitoplasmatikoak) eta mRNAren prozesamenduarekin lotuta zeudela ikusi genuen, besteak beste (**10. taula**). Hiru baldintzetan gain-erregulatutako bideak behatzean, intsulinaren seinaleztapena, mekanorregulazioa eta zilioarekin erlazionatutako bideak aipa ditzakegu.

Mielinizazioan (*Itgb1*, *App*, *hnrnpa2b1* eta *Bace1*), zitoeskeletoa (*Actb*, *Rock2* eta *Dync1l2*) eta burdinaren homeostasian (*Fth1*, *Iscu*) inplikaturako geneak dira hiru erduetan desregulatutako gene batzuk.

Oro har, emaitzek iradokitzen dute AG baldintzetan bide kaltetuenak RNAren metabolismoarekin, mielinizazioarekin eta metabolismo energetikoarekin lotuta daudela.

10. taula. Oligodendroziotan desregulatutako (laranja) eta gain-erregulatutako (urdina) bidezidorrak hiru erduetan.

geneSet-a	deskripzioa	tamaina	gainjartzea	pbalioa
WP477	Erribosomak	91	36	<2,2E-12
WP111	Elektroien arnas-katea	105	24	1,55E-15
WP4324	Mitokondriaren I. konplexuaren mihizadura	105	24	1,55E-11
WP623	Fosforilazio oxidatiboa	62	11	1,42E-10
WP3888	VEGFA-VEGFR2 seinalizazio bidea	438	28	6,80E-09
WP534	Glikolisia eta glukoneogenesisa	45	6	0,00184
WP3630	NAD metabolismoa, sirtuinak and zahartzarora	11	3	0,00343
WP2359	Parkin-Ubikitina proteosoma sistemaren bidea	70	7	0,00418
WP314	Fas Ligandoen (FasL) bidea and Estresak induzitutako Heat Shock Proteinen (HSP) erregulazioa	44	5	0,00879
WP411	mRNAren prozesamendua	133	8	0,04093
WP481	Intsulinaren seinalizazioa	161	4	0,00864
WP4534	Mekanoerregulazioa	48	2	0,02454
WP4352	Zilioa	220	4	0,02463

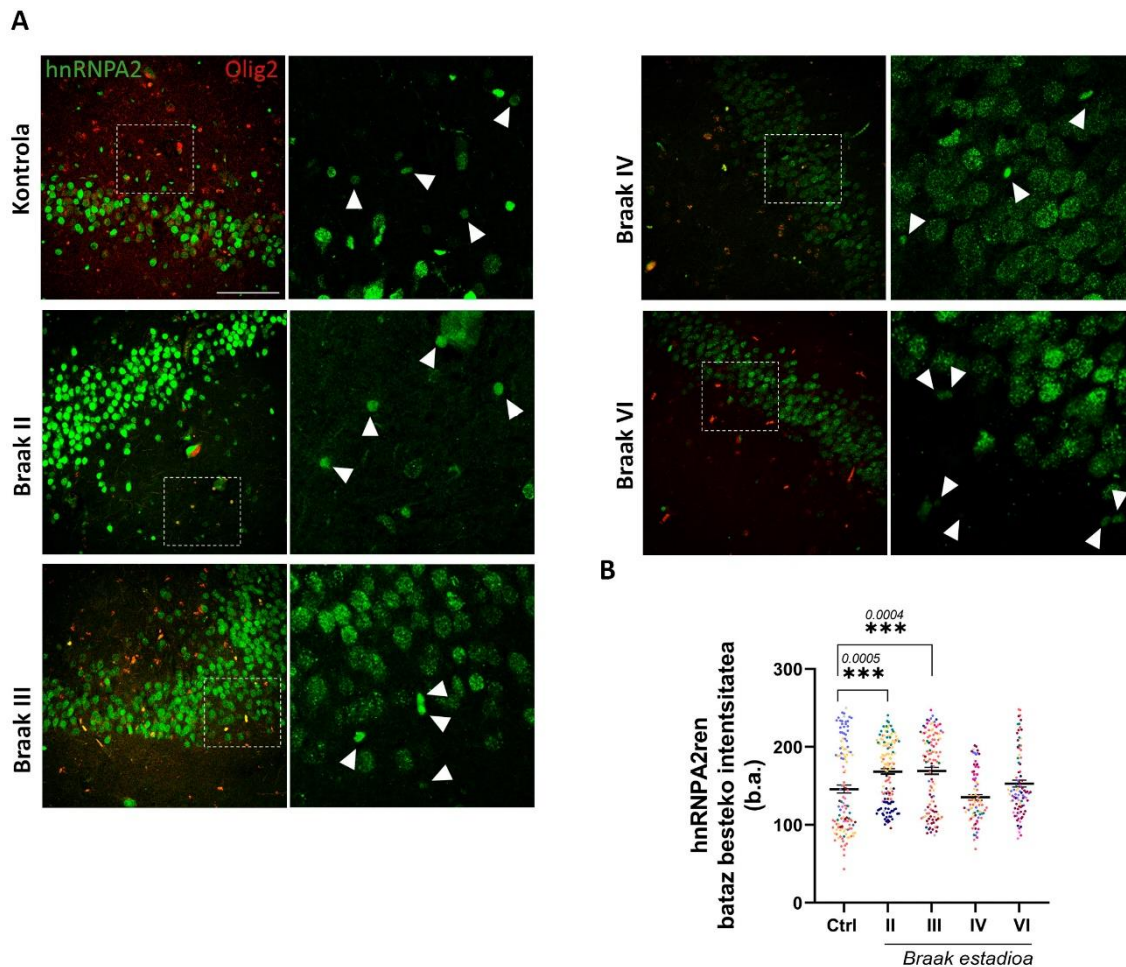
II. PARTEA: A β ₁₋₄₂ oligomeroen efektua RNAREN metabolismoan eta itzulpen lokalean

Zenbait ikerketek erribonukleoproteinekin (RBP) edota RNAREkin erlazionatutako moduluak asaldatuta ikusi dituzte AGEan (Rybak-Wolf & Plass, 2021). RBPak dira hain zuzen ere, RNA mailan gene-adierazpenaren erregulatzailer nagusiak, transkripzioa, prozesamendua, garraioa eta degradazioa erregulatzen baitituzte (Han, Tang eta Smith, 2010). A β o-ekin tratatutako oligodendroitoetan egindako RNA-seq analisiak, RNAREN metabolismoarekin lotutako hainbat bidezidor asaldatuta erakutsi zituen, bai eta RBPen azpimultzo baten gainadierazpena ere. Horrek iradokitzen du, RBPen alterazioak RNAREN prozesamenduan eta oligodendroitoen adierazpen genikoaren profileen eragina izan zezakela. Horietatik guztietatik, hnRNP A2an (eta hnRNP B1/A2b/B1b aldaerak; aurrerantzean hnRNP A2 deituko zaie laburtzeko) zentratu genuen gure atentzioa, AGEan *splicing-a* arautzen duela ikusi baita (Berson et al., 2012). Gainera, MBP eta MOBP mRNAren garraioa eta itzulpena ere erregulatzen ditu (Hoek et al., 1998).

2.1 Fase goiztiarreko AG pazienteen hipokanpoek hnRNP A2 mailen handipena erakusten dute

AG pazienteen neuronetan egindako aurretiko azterketek erakutsi zuten hnRNP A2ren adierazpena murriztuta zegoela kortex entorrinalean (Berson et al., 2012), baina handituta hipokanpoan (Mizukami et al., 2005). Hala ere, ez da ezer deskribatu oligodendroitoei buruz. Hortaz, hnRNP A2 adierazpena ebaluatu genuen osasuntsu eta AG dutenen *post mortem* giza laginen hipokanpoan. Laginak Braak-en estadioen arabera sailkatu ziren (II, III, IV, VI) (Braak eta Braak, 1995). Giza hipokanpoaren ehun-sekzioak hnRNP A2 eta oligodendroito-leinuko zelulen markatzaile espezifikoarekin (Olig2) immunotindatu ziren. Ondoren, hnRNP A2ren intentsitatea oligodendroitoen nukleoetan neurtu zen. Braak II eta III estadioetan hnRNP A2ren gorakada ikusi genuen kontrolarekin alderatuta (kontrola 145,9 \pm 5,13, Braak II 168,5 \pm 3,62 eta Braak III

168,5±3,62). Aitzitik, ondorengo estadioetan (Braak IV 135,3±3.66 eta Braak III 152,9±4.38) ez zen aldaketarik ikusi kontrolekin alderatuta (**13A, B. irudia**).



13. irudia. hnRNP A2 gain-erregulatuta dago AG fase goiztiarretako oligodendroitoetan. (A) Olig2 (gorria) eta hnRNP A2ren (berdea) irudi konfokal adierazgarriak kontrolen eta Braak II-VI AG pazienteen hipokanpoan. **(B)** Giza hipokanpoan Olig2+ zeluletan hnRNP A2ren intentsitatearen kuantifikazioa (b.a.; balio arbitrarioak). Eskala-barra, 100 μ m. Datuek \pm S.E.M batez bestekoak adierazten dituzte eta puntuek giza paziente bakoitzaren zelula indibidualak adierazten dituzte, *** $p < 0.001$, kontrol-kasuekin alderatuta. Esanahi estatistikoa bi isatsetako norabide bakarreko ANOVA arruntaren eta Dunnett post-hoc proba bidez lortu zen.

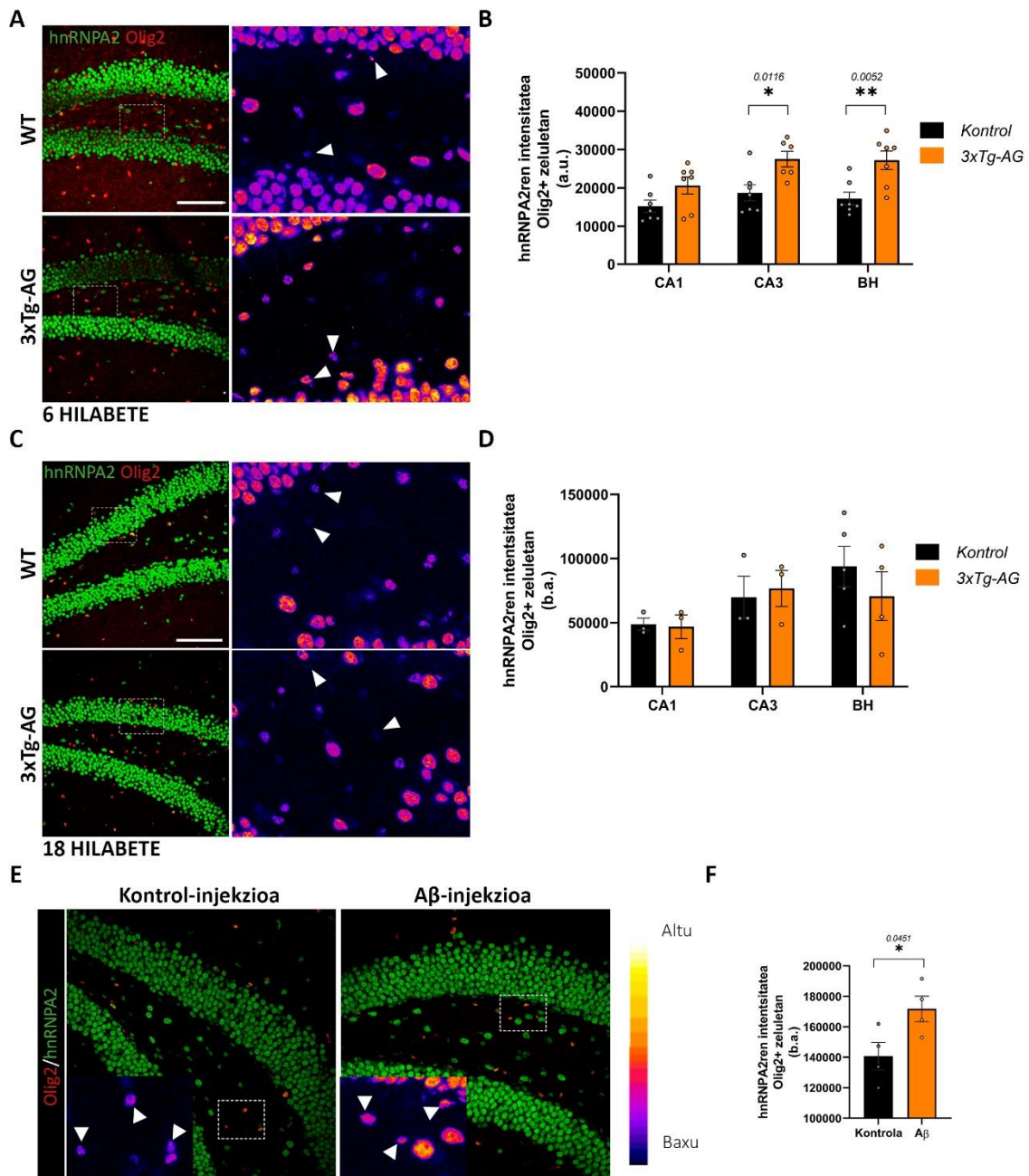
2.2 hnRNP A2 gain-erregulatuta dago 3xTg-AG-ren hipokanpoan eta A β -injektatutako saguetan

Oligodendroitoetan ikusitako hnRNP A2ren aldaketak zehatzago ebaluatzeko, 3xTg-AG saguaren eredua erabili genuen. Zehazki, 6 eta 18 hilabeteko saguen hipokanpoaren

hnRNP A2 mailak aztertu genituen. 6 hilabeteren buruan, sagu horiek A β intraneuronala dute kortexean eta hipokanpoan, baina ez harilka neurofibrilarrak (Oddo et al., 2003).

Ehun-sekzio koronalak hnRNP A2 eta Olig2rako immunotindatu ziren. 6 hilabeteko 3xTg-AG saguen hipokanpoan, hnRNP A2 immunomarkaketaren batez besteko intentsitatea handiagoa zela ikusi genuen CA3 (WT 18.715 \pm 2.077 vs 3xTg-AG27.554 \pm 2.020) eta biraketa horzdunaren (BH) eskualdeetan (WT 17.241 \pm 1.643 vs 3xTg-AG27.219 \pm 2.421), baina ez CA1 eskualdean (WT 15.276 \pm 1.595 vs 3xTg-AG20.659 \pm 2.209) **(14A, B. irudia)**. Hala ere, 18 hilabetera, ez genuen aldaketa esanguratsurik ikusi CA3n (WT 69.900 \pm 16.414 vs 3xTg-AG 76.753 \pm 14.117), CA1ean (WT 48.862 \pm 4.853 vs 3xTg-AG 46.890 \pm 9.238), ezta biraketa horzdunear ere (WT 93.970 \pm 15.600 vs 3xTg-AG 70.710 \pm 19.060) **(14C, D. irudia)**

Jarraian, A β o-ek hnRNP A2ren adierazpena *in vivo* areagotzea eragin dezakeen jakiteko, A β o-injekzioa jaso zuten saguetan A2ren batez besteko intentsitatea neurtu genuen. Kontrol eta A β o-injektatutako saguen ehun sekzio koronalak A2 eta Olig2rako immunotindatu ziren. 3xTg-AGren antzera, adierazpen-analisiak A β o-injektatutako saguetan A2ren intentsitatea nabarmen handiagoa zela erakutsi zuten, bereziki BHean (kontrola 140.772 \pm 9.011 vs A β -injekzioa 171.787 \pm 8.360) **(14E, F. irudia)**.



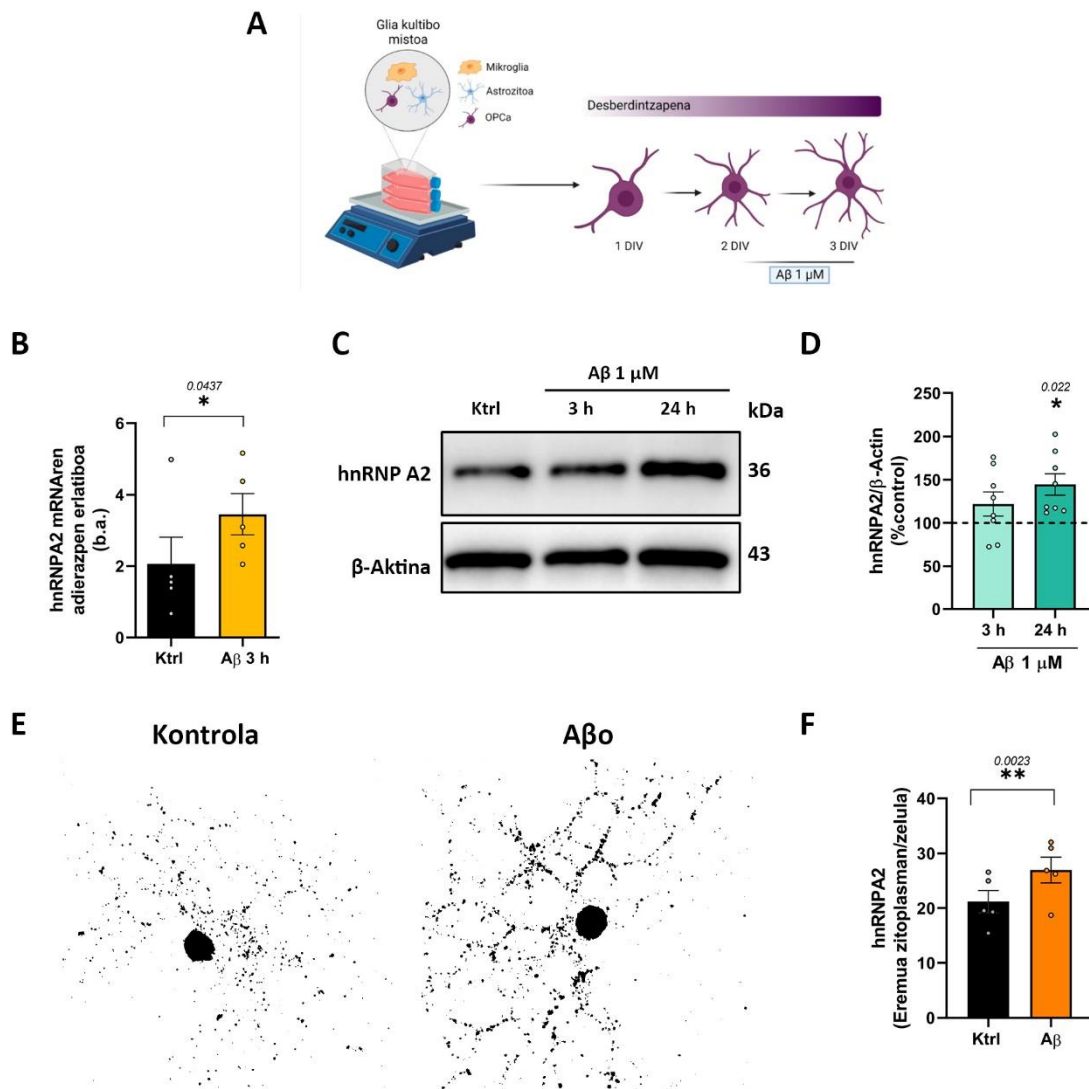
14. irudia. HnRNP A2 gain-erregulatuta dago 3xTg-AG saguetan eta Aβo-ekin injektatutako saguetan.

(A) Olig2 (gorria) eta hnRNP A2ren (berdea) irudi adierazgarriak 6 eta 18 hilabeteko saguen biraketa horzdunean. (B, C) Hipokanpoko Olig2+ zeluletan hnRNP A2ren intentsitatearen kuantifikazioa. (D) Olig2ren (gorria) eta hnRNP A2ren (berdea) irudi konfokal adierazgarriak, kontrol eta Aβo-injektatutako saguen biraketa horzdunean. (E) HnRNP A2ren intentsitatearen kuantifikazioa Olig2+ zeluletan, biraketa horzdunean. 100 μm-ko eskala barra. Datuek ±S.E.M batezbestekoak adierazten dituzte, eta puntuek banakako animaliak adierazten dituzte, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, WT saguekin edo kontrolekin alderatuta. Esanahi estatistikoa bi isatseko Student t-proba binakatu gabearen bidez lortu zen.

2.3 A β ₁₋₄₂ oligomeroek hnRNP A2ren adierazpena gain-erregulatzen dute

In vitro, hnRNP A2 nukleoatik zitoplasmara translokatzeko da, eta hori cis ekintza-elementua duten (A2RE) mRNA espezifikoaren erregulazioan parte hartzen du. A β -k RNA zein proteina mailan hnRNP A2 adierazpena aldatzen ote zuen ikusteko, arratoien kortexetik eratorritako oligodendrozitoen kultibo primarioak erabili genituen. Lehenik eta behin, OPCak glia-kultibo mistotik isolatu genituen, eta zelulak Sato+ desberdintzapen medioan kultibatu ziren 3 EIVz. Ondoren, oligodendrozitoak 1 μ M A β oligomeroekin tratatu ziren 3 edo 24 orduz, esperimentuaren arabera **(15A. irudia)**. 3 orduko tratamenduaren ostean, mRNA mailak nabarmen handitzen zirela ikusi genuen (kontrola $2,060 \pm 0,7519$ vs A β $3,451 \pm 0,5751$) **(15B. irudia)**.

Ondoren, proteina-mailak neurtzeko eta A2ren kokapena ikusteko, western blot eta immunozitokimikako analisiak egin genituen, hurrenez hurren. Western blot analisiak erakutsi zuen A2ren mailak % 44,5 igotzen zirela 24 orduko tratamendurekin, kontrolaren % 100-arekin alderatuta (% $144,5 \pm 12,45$ vs kontrolaren % 100) **(15C, D irudia)**. Bestalde, immunofluoreszentzia analisiak erakutsi zuen hnRNP A2 nukleoan lokalizatzen zela gehienbat, eta, gainera, patroia pikortsu bat erakusten zuela oligodendrozitoen prozesuetan **(15E. irudia)**. HnRNP A2 zitoplasmara translokatzeko denek, ondoren, A β -k desplazamendu hori sustatzen ote zuen jakin nahi genuen. Horretarako, hnRNP A2k zitoplasman hartzen duen azalera osoa neurtu genuen, eta gorakada nabarmena ikusi genuen 24 orduko tratamenduaren ondoren (kontrola $21,16 \pm 2,032$ vs A β $26,95 \pm 2,346$) **(15E, F. irudia)**.

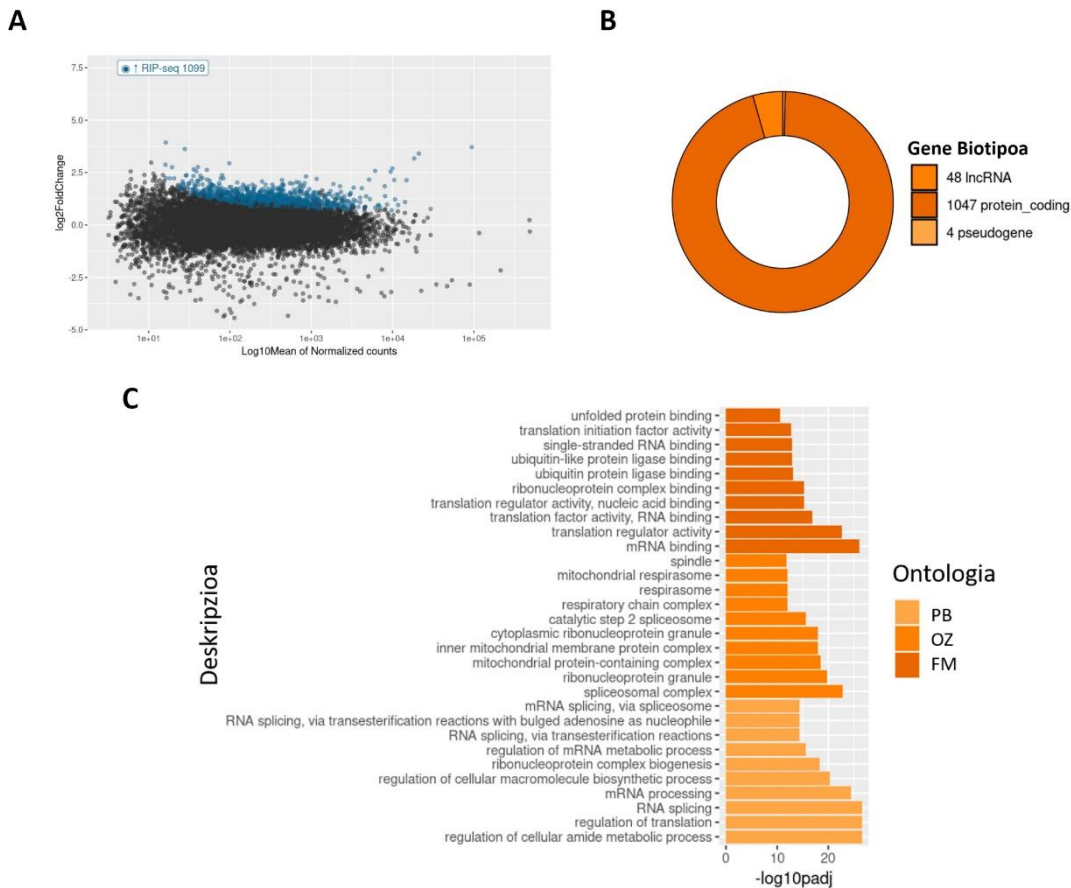


15. irudia. Aβ₁₋₄₂ oligomeroek hnRNP A2ren maila handitzen dute. (A) Zelulak 3 eta 24 orduz tratatuak izan ziren, eta esperimenduak 3 EIV egin ziren. (B) hnRNP A2ren RT-qPCR analisia tratatutako eta kontrol zeluletan. (C, D) HnRNP A2ren adierazpena eta kuantifikazio erlatiboa oligodendrozoiten estraktu zelularretan. (E) Kontrol eta Aβo-rekin tratatutako oligodendrozoetan hnRNP A2ren mikrofografia adierazgarriak. (F) HnRNP A2k okupatutako eremuan izandako aldaketak irudikatzen dituen histograma. Datuek ±S.E.M batez bestekoak adierazten dituzte eta puntuak esperimendu independenteak adierazten dituzte, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, kontrolarekin alderatuta. Esanahi estatistikoa bi isatsetako Student t proba binakatuaren eta norabide bakarreko ANOVA eta Dunnet post-hoc probaren bidez lortu zen.

2.4 Aβ₁₋₄₂ oligomeroek hnRNP A2ren interaktoma aldatzen dute

HnRNP A2k funtzio ugari betetzen ditu mRNAren prozesamenduan (*splicing* alternatiboa, egonkortasuna eta degradazioa) mRNAren sekuentzia espezifikoetara lotuz. Proteina hau osasunean eta gaixotasunean garrantzitsua den arren, gutxi dakigu

bere interaktomari buruz. Beraz, lehenik eta behin, oligodendrozoetan hnRNP A2ri lotutako RNAk deskribatzen hasi ginen, proteina horrek oligodendrozoen biologian izan ditzakeen funtzioei buruzko informazioa lortzeko.



16. irudia. hnRNP A2ren interaktoma oligodendrozoetan. (A) hnRNP A2ko RIP-sek datuen MA plot-a. Transkripto bakoitzerako, batez besteko seinalea irudikatu zen (zenbaketa normalizatuen log10 batezbestekoa bezala neurtua) RIP-sek aberasteko log2aren aurrean (RIP vs IgG). Nabarmen aberastutako geneak urdinez nabarmentzen dira. **(B)** hnRNP A2rekin lotutako RNAen sailkapena. Identifikatutako gene gehienak proteinak kodetzen dituzten geneak dira, baina RNA luze ez-kodifikatzaileak ("lncRNAs") eta pseudogeneak ere aurkitu ziren. **(C)** Interaktomaren GO analisia (PB, prozesu biologikoa; OZ, osagai zelularra; FM, funtzio molekularra). Barra bakoitzaren luzera aberastearen esanahi estatistikorekiko proportzionala da.

Horretarako, RIP-sek gauzatu genuen, hnRNP A2 eta isotipo-kontrolaren aurkako antigorputzak erabiliz, 24 orduz 1 μ M A β -ekin tratatutako oligodendrozoetan. RIP, antigorputzetan oinarritutako teknika da, RNA-proteina interakzioak identifikatzeko

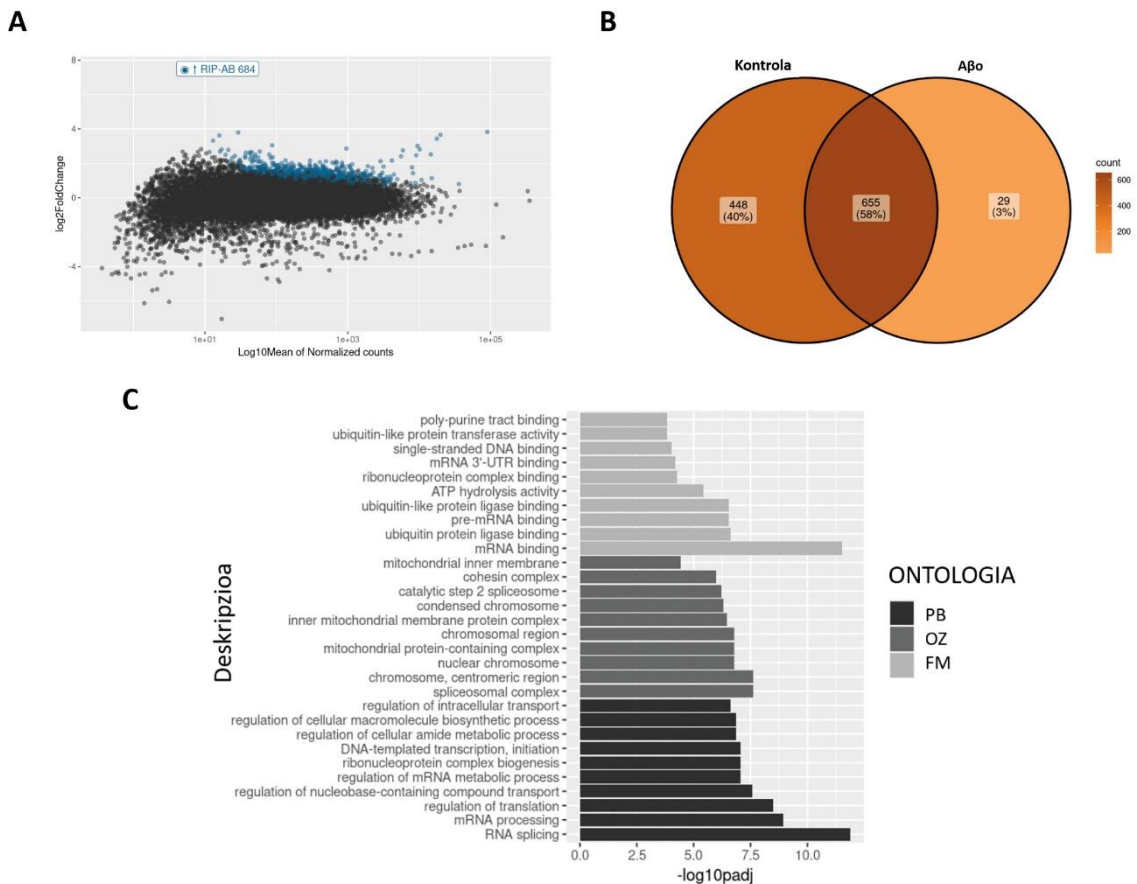
erabiltzen dena. Horrela, hnRNP A2ri berari lotutako RNAekin batera immunoprezipitatu zen. RIP-sek-en emaitzek erakutsi zuten 1099 transkrito nabarmen aberastuta zeudela immunoprezipitatutako hnRNP A2 konplexuan (**16A. irudia**). RNAen % 95 proteina kodifikatzaileak ziren, eta % 5, berriz, RNA luze ez-kodifikatzaileak (lncRNAak) eta pseudogeneak (**16B. irudia**).

Jarraian, GO terminoen aberaspen analisia (*Clusterprofiler* softwarea) eta *WikiPathway* analisia egin genituen. GO analisisiek erakutsi zuten, RNA elkarreragile ugarienen artean, mitokondrien metabolismoan (*Ndufa5, Cox3, Cytb, Cox2* eta *Nd4*), konplexu erribonukleoproteikoen biogenesisian (*Abce1, Bicd1, Brix1, Xpo1* eta *Snrpc*), mRNAren metabolismoan (*Ybx1, Clk1, Dddx1, Srsf10, RbmX, Hnnph2, Srsf7* eta *Hnrnpk*) eta itzulpen-kontrollean (*Eif1a, Pabpc1, Eef1b2, Eef1b2*, esaterako) inplikaturako hainbat faktore zeuden. Gainera, *WikiPathway* analisiak lipidoen metabolismoarekin (kolesterolaren biosintesia, kolesterolaren metabolismoa eta gantz-azidoen biosintesia), proteasomaren degradazioarekin eta TNF- α NF-kB seinaleztapen-bidearekin lotutako bidezidorrak erakutsi zituen (**11. taula**). HnRNP A2k bere mRNArekin elkarrekiten du, autoerregulazio eginkizuna iradokiz.

11. taula. hnRNP A2k erregulatutako bidezidorrak kontrol-baldintzetan.

geneSet-a	deskripzioa	tamaina	gainjartzea	pbalioa
WP529	mRNAren prozesamendua	112	25	2,82E-07
WP149	Itzulpen faktoreak	45	15	6,96E-06
WP59	Elektroi garraio katea	93	20	1,43E-10
WP302	Proteasomaren bidezko degradazioa	48	11	2,03E-12
WP461	Kolesterolaren biosintesia	15	6	2,31E-11
WP457	TNF- α NF-kB seinalizazio bidea	174	24	3,33E-12
WP1283	Fosforilazio oxidatiboa	60	12	4,09E-11
WP30	Proteina erribosomiko zitoplasmakoak	108	15	0,004196
WP632	Kolesterolaren metabolismoa	23	5	0,015002
WP504	Gantz azidoen biosintesia	19	4	0,032454

Ondoren, jakin nahi genuen ea A β -k hnRNP A2ren interaktoma aldatzeko gai ote zen eta ondorioz, RNAREN metabolismoa modifikatu. Horretarako, A β -ekin tratatutako oligodendrozoen interaktoma, interaktoma kontrolarekin alderatuko genuen. HnRNP A2k RNA gutxiagorekin elkarreragiten zuen A β -baldintzan, 684 RNAREkin, hain zuzen ere (**18A. irudia**). Horietatik guztietatik, 655 genek (% 58) kontrolean bezala elkarreragiten zuten; 29 geneek (% 3), aldiz, interakzio handiagoa erakusten zuten A β -ekin tratatutako zeluletan 448 geneek (% 40), berriz, interakzio handiagoa zuten kontrol-baldintzetan (**17B. irudia**). A β -ekin tratatutako oligodendrozoen gutxiago interakzionatzen duten geneek RNAREN metabolismoan (adibidez, *Hnrnpk*, *Hnnph1*, *Sf3b1*, *Hnpa2b1* eta *Dhx9*), mitokondrien aktibitatean (*Ndufb9*, *Atp5pd*, *Ndufa5*, *Atp5mg*, *Uqcfrfs1*, *Ndufc2* eta *Cox6c*) eta itzulpenean (*Pabpc1*, *Eef1b2* eta *Eef1g*) inplikaturik daude. A β -ekin tratatutako oligodendrozoen gehiago interakzionatzen duten geneek berriz, ioi metalikoen loturan (*Gse3*, *Osgelpl1*, *Prbnl2*, *Mbnl2*) inplikaturik daude.



17. irudia. A β ₁₋₄₂ oligomeroek hnRNP A2 interaktoma aldatzen dute. (A) hnRNP A2 RIP-sek-en MA plot-a, A β o tratatutako zeluletan. (B) Venn-en diagrama, kontrolaren eta A β o-ekin tratatutako zelulen artean

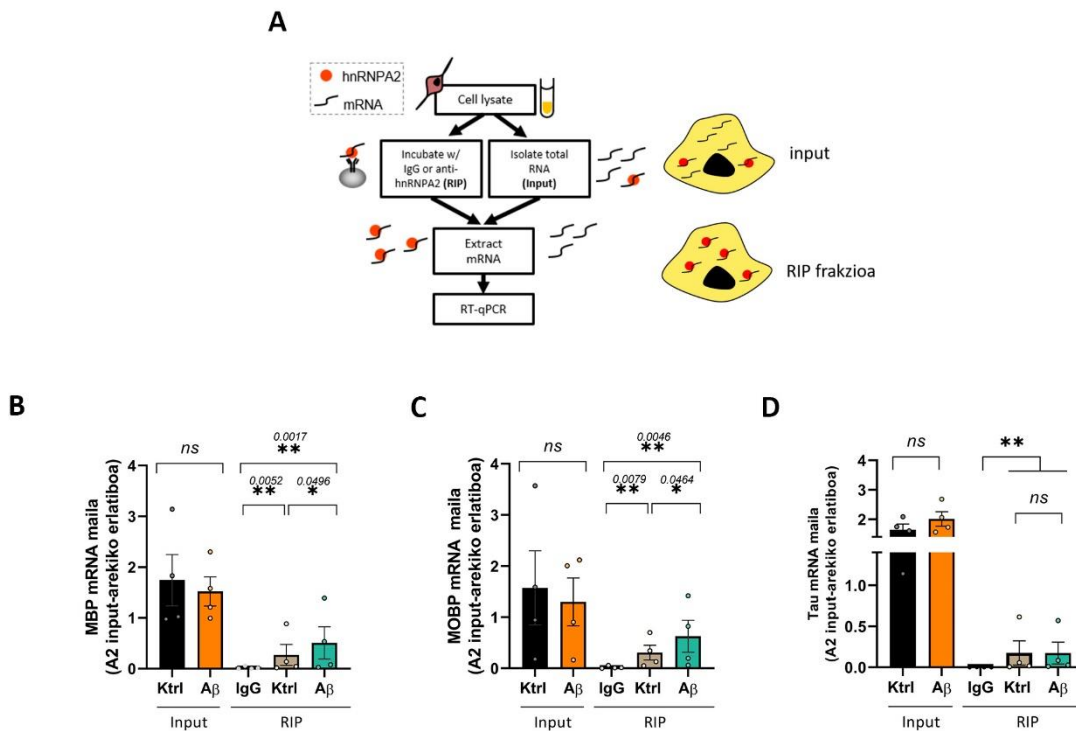
komunak diren edo ez diren transkriptoak. **(C)** Kontrol-baldintzatean A2ra bakarrik lotzen diren transkriptoen GO analisia (PB, prozesu biologikoa; OZ, osagai zelularra; FM, funtzio molekularra). Barra bakoitzaren luzera aberastearen esanahi estatistikoarekiko proportzionala da.

2.5 A β ₁₋₄₂ oligomeroek hnRNP A2 eta *Mbp/Mobp* mRNAren arteko elkarrekintza sustatzen dute

A β oligomeroek MBParen itzulpen lokala, ITG β 1 eta Fyn kinasaren seinalazio-bideen bitartez erregulatzen zutela frogatu genuen (Quintela-López et al., 2019). HnRNP A2, RNA garraio-granuluen osagai nagusia da oligodendroitoetan, eta *Mbp* eta *Mobp*-en 3'UTR eskualdeko cis ekintza-elementu bati lotzen zaio (Ainger et al., 1993; Carson, Worboys, Ainger, & Barbarese, 1997). Horrela, konplexu supramolekular bat eratzen du, mielina-konpartimentura garraiatzen dena. Beraz, hnRNP A2ren igoerak eta horren interaktomaren aldaketak MBP eta MOBPrek itzulpen lokalean eraginik izan ote zezaketen galdetu genion geure buruari.

Lehenik eta behin, hnRNP A2 eta *Mbp* edo *Mobp*-en arteko interakzioa A β o-k aldatu zezakeen ebaluatu genuen. Horretarako, RIP teknika erabili genuen, hnRNP A2 eta bere isotipo-kontrolaren aurkako antigorputzak erabiliz **(18A. irudia)**. IgGren aurkako antigorputza, immunoprezipitazioaren espezifikotasuna eta eraginkortasuna ebaluatzeko erabili zen. RT-qPCR bidezko mRNA mailen analisiak agerian utzi zuen *Mbp* (kontrola 0,2117 \pm 0,2064 vs A β o 0,5081 \pm 0,3158) eta *Mobp* (kontrola 0,3082 \pm 0,1447 vs A β o 0,6270 \pm 0,3131) mRNAak RIP frakzioan aberastuta zeudela A β o-ekin tratatutako zeluletan kontrol-zelulekin alderatuta; *input*-ean, berriz, ez zen aldaketa esanguratsurik ikusi (*Mbp* kontrola 1,744 \pm 0,5058 vs A β o 1,522 \pm 0,2864; *Mobp* kontrola 1,574 \pm 0,7259 vs A β o 1,301 \pm 0,4673) **(18B, C. irudia)**. Garrantzitsua da azpimarratzea *Mbp* (0,01785) eta *Mobp* (0,02301) oso gutxi adierazten direla IgG kontrol-baldintzetan. Azkenik, aberaste hori *Mbp* eta *Mobp*-arentzat espezifikoa ote zen zehazteko, *Tau* erabili genuen, hnRNP A2rekin ere elkarrengaitan duela ikusi baita (Behar, Marx, Sadot, Barg, & Ginzburg, 1995). RIP frakzioan (kontrola 0,1749 \pm 0,1473, A β o 0,1739 \pm 0,1331 eta IgG 0,001438 \pm 0,0006) eta *input*-ean (kontrola 1,645 \pm 0,1953 vs A β o 2,013 \pm 0,2466) ez zen aldaketa nabarmenik ikusi **(18D. irudia)**.

Oro har, emaitzek iradokitzen dute A β -ek A2ren eta *Mbp/Mobp* mRNAren arteko elkarreragina sustatzen dutela oligodendroezitoetan.



18. Irudia. A β ₁₋₄₂ oligomeroek hnRNP A2ren eta *Mbp/Mobp*-en mRNAren arteko interakzioa sustatzen dute. (A) hnRNP A2-RIP lan-fluxua ilustratzen duen diagrama. Kontrol IgG antigorputzak eta hnRNP A2ren aurkako antigorputzak erabili ziren RIPerako, oligodendroezitoen lisatuetatik abiatuta. (B, C, D) *Mbp*, *Mobp* eta *Tau* mRNAen mailen analisia RT-qPCR bidez. Datuek \pm S.E.M batez bestekoak adierazten dituzte eta puntuek esperimendu independenteak adierazten dituzte, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$, kontrol-zelulekin alderatuta. Esanahi estatistikoa bi isatseko Student *t* proba binakatuaren bidez lortu zen.**

2.6 A β ₁₋₄₂ oligomeroek hnRNP A2ren fosforilazioa eragiten dute *Mbp* eta *Mobp*-ren itzulpen lokala sustatuz

Itzulpena hasteko, hnRNP A2 mRNA granulotik desmihiztatu behar da. HnRNP A2ren desmihiztatzea, tirosina hondakinen fosforilazioaren bidez gertatzen da, Fyn tirosina-kinasaren bitartez, aurretik aktibatu behar dena (White et al., 2018). Aurretiaz, A β -ek ITG β 1ekin bat eginez Fyn aktibatzen zutela ikusi genuen (Quintela-López et al., 2019). Beraz, ondoren, A β hnRNP A2ren fosforilazioa sustatzen ari ote zen egiaztatu genuen.

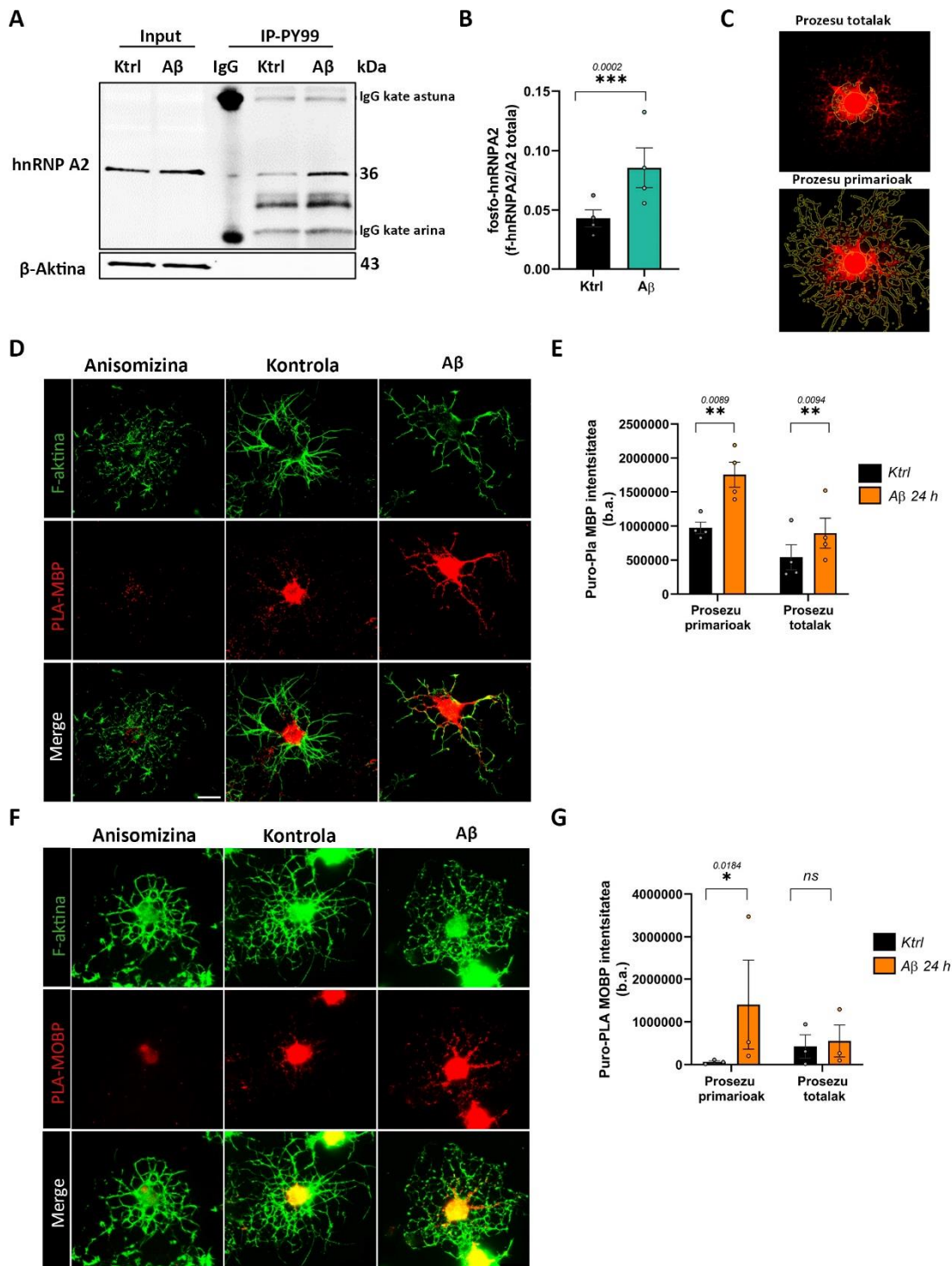
A β bidezko Fyn-en aktibazioak hnRNP A2ren fosforilazioa handitzen zuen zehazteko, immunoprezipitazio-saiakuntza egin genuen, western blot-arekin batera, tirosinen

aurkako antigorputza (PY99) eta isotipoaren kontrako antigorputzak erabiliz **(19A, B. irudia)**. A β -rekin 15 minutuz tratatu ondoren, fosforilatutako hnRNP A2 mailak kontrolean lortutakoak baino nabarmen handiagoak zirela ikusi genuen ($0,04298\pm 0,007$ vs $0,08557\pm 0,0167$, hurrenez hurren).

Jarraian, hnRNP A2ren fosforilazio mailen aldaketek *Mbp* eta *Mobp* mRNAren itzultzea sustatzen zuten zehazteko, puromizina PLArekin (Puro-PLA) batera egin genuen. MBP edo MOBPren aurkako antigorputz bat eta puromizinarekin aurkako beste bat erabiliz, proteina horien *de novo* sintesia antzeman dezakegu. Gainera, teknika horri esker, zelularen barruan sintesiaren kokapena ebaluatu daiteke. Puromizina antibiotiko bat da, proteinen sintesia inhibitzen du, eta itzulpenean kate polipeptidikoa behar baino lehenago amaitzea eragiten du. Puromizinarekin markatutako peptidoen mailek proteinen sintesi-tasa globala islatzen dute, eta beraz, proteinen sintesi-tasen aldaketak neurtzeko tresna bezala balio du. Prozesu oligodendrozoitikoak ikusteko, zitoeskeletoa faloidinarekin bistaratu zen, F-aktinara lotzen baita.

PLAren intentsitatea neurtu genuen prozesu primarioetan, hau da, somatik sortzen diren prozesuetan eta prozesu totaletan, lokalizazioa desberdina zen ikusteko **(19C. irudia)**. MBPren tokiko itzulpena nabarmen handiagoa izan zen, bai prozesu primarioetan (kontrola $1.6250.88\pm 636.696$ vs A β $2.628.083\pm 764.320$) bai prozesu totaletan (kontrola 543.407 ± 185.673 vs A β 897.499 ± 219.650) **(19D, E. irudia)**. MOBPren tokiko itzulpenaren kasuan, emaitzak ez ziren aurrekoak bezain argiak izan: nahiz eta A β -ekin tratatutako zelulek MOBPren tokiko itzulpena prozesu primarioetan handiagoa aurkeztu (kontrola 643.70 ± 28.499 vs A β $1.403.583\pm 1.040.424$), ez zen desberdintasun esanguratsurik ikusi prozesu totaletan (kontrola 426.037 ± 272.836 vs A β 555.533 ± 373.571) **(19E, F. irudia)**. Puromizina baino 20 minutu lehenago anisomizina (40 μ M) gehitu zen, kontrol negatibo gisa erabiliz, itzulpenaren hasiera inhibitzen baitu erribosomaren 60S azpiunitatearen peptidil transferasa domeinuarekin bat egitean. Puro-PLA irudietan agertzen den bezala, anisomizinarekin inkubatutako zelulek ez zuten PLA+ punturik erakutsi, PLA seinalea itzulpenaren mende zegoela baieztatuz.

Oro har, behaketa hauek iradokitzen dute A β -ek *Mbp* eta *Mobp*-ren itzultzepena sustatzen dutela prozesu oligodendroglialetan hnRNP A2 fosforilazioaren bidez.

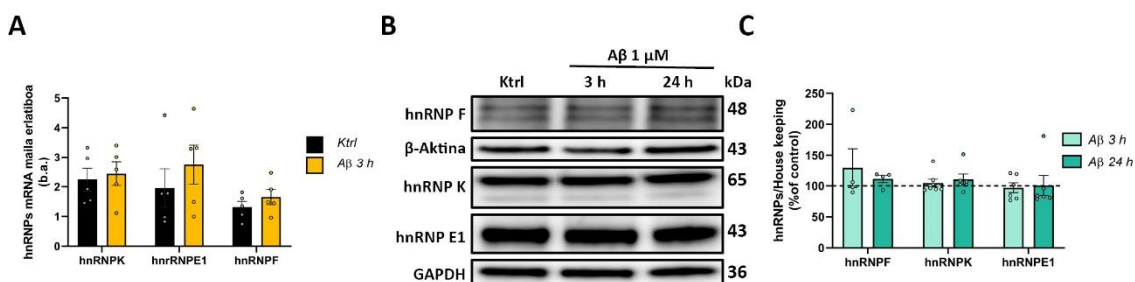


19. irudia. $A\beta_{1-42}$ oligomeroek hnRNPA2 fosforilazioaren bidez tokiko itzulpena eragiten dute. **(A)** pTYR eta IgG aurkako antigorputzekin egindako IParen western blot-a hnRNPA2ren fosforilazioa detektatzeko. **(B)** HnRNPA2ren fosforilazioa irudikatzen duen histograma, input-eko hnRNPA2rekin normalizatua. **(C)** MBPren eta MOBPren puro-PLA puntu positiboen intentsitatea neurtu zen, prozesu primarioetan eta totalatan somatik $10\ \mu\text{m}$ -ko tarteetan. **(D, E)** Puro-PLAren irudi adierazgarriak MBPrako, eta haien kuantifikazioa prozesu primarioetan eta totalatan. **(F, G)** Puro-PLAren irudi adierazgarriak MOBPPrako eta haien kuantifikazioa prozesu primarioetan eta totalatan. Eskala-barra, $10\ \mu\text{m}$. Datuek \pm S.E.M bates

bestekoak adierazten dituzte eta puntuek esperimendu independenteak adierazten dituzte, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ kontrol-zelulekin alderatuta. Esanahi estatistikoa bi isatseko Student t proba binakatuaren bidez lortu zen.

2.7 A β_{1-42} oligomeroek *Mbp* eta *Mobp-ren* RNA granuluen kopurua eta dinamika aldatzen dute

Mbp eta *Mobp*-en mRNAak granuluetan mihiztatu eta periferiara garraiatu behar dira, hnRNP desberdinen laguntzarekin. Bai itzulpen lokalak, bai hnRNP A2 adierazpena A β tratamenduarekin gora egiten zutela ikusi genuenez, ondoren, A β -ek beste hnRNPen adierazpen-mailetan eragina izan zezakeen zehaztu genuen. Horretarako, *Mbp* eta *Mobp*-en RNAREN granuluetan dauden hnRNPen (hnRNP F, hnRNP E1, hnRNP K) mRNA eta proteina mailak aztertu genituen. Hala ere, ez genuen aldaketa esanguratsurik lortu ez mRNA ez proteina mailan (**20A, B, C. irudia**).



20. irudia. A β_{1-42} oligomeroek ez dute hnRNP F, K eta E1 aldatzen. (A) HnRNPen RT-qPCR bidezko analisisa tratatutako zeluletan eta zelulaa-kontroletan. (B, C) HnRNPen western blot-a eta kuantifikazio erlatiboa oligodendrozoitoen-estraktuetan. Datuek batez besteko \pm S.E.M adierazten dute eta puntuek esperimendu independenteak adierazten dituzte. Esanahi estatistikoa bi isatseko Student t proba binakatuaren eta norabide bakarreko ANOVA eta Dunnett post-hoc probaren bidez lortu zen.

mRNA granuluak oso egitura dinamikoak dira, eta birmoldaketa-etapa desberdinak igarotzen dituzte mRNAren itzulpena gertatu aurretik. Lehenengo urratsean, hnRNP A2 *Mbp* eta *Mobp* mRNAekin batzen da nukleoan, eta gero zitoplasmara esportatzen da. Zitoplasman, hnRNP A2 hainbat hnRNPrekin elkartzen da: hnRNP E1k, mRNAren garraioan zehar itzulpena inhibitzen du, eta hnRNP Fk, MBP eta MOBP sintesia erregulatzen du. Behin periferian, hnRNP E1 hnRNP Krekin trukutzen da, eta hori da, mRNA mielina zorroan lokalizatzeko eta itzulpena hasteko aurretiazko baldintza (White

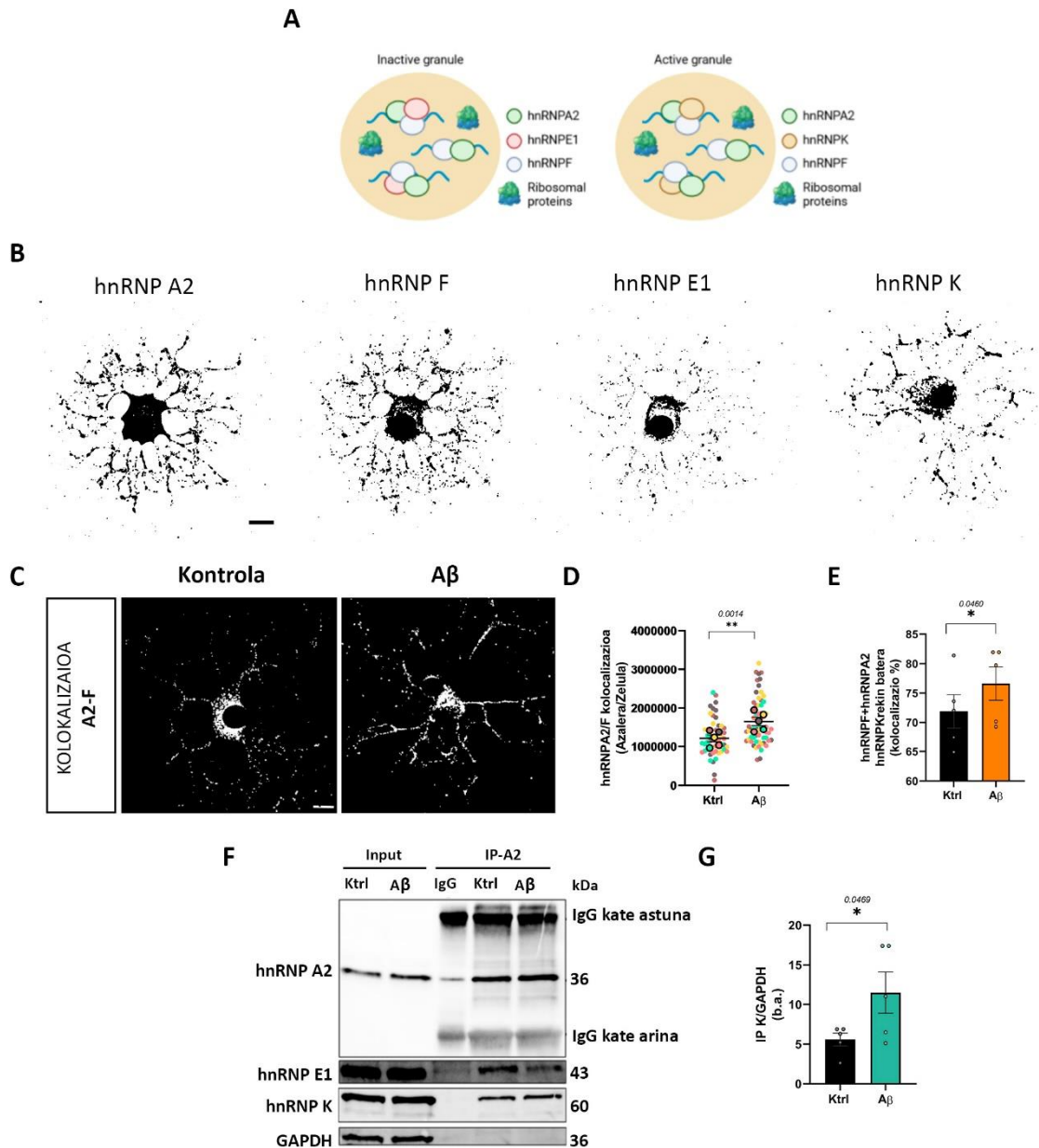
et al., 2008; Laursen et al., 2011; Torvund-Jensen et al., 2014). Beraz, bi granulu-komplexu desberdin defini ditzakegu: granulu ez-aktiboak (hnRNP E1, A2 eta F dituztenak) eta granulu aktiboak (hnRNP K, A2 eta F dituztenak) **(21A. irudia)**.

Oligodendrozoitoen prozesuetan hnRNP A2, MBP eta MOBPen gain-erregulazioa ikusi genuenez, gain-erregulazio hori RNAREN granuluen kopuruaren eta dinamikaren aldaketaren ondorio izan zitekeen galdetu genion gure buruari. Bestalde, granuluen osagaien kokapena, immunozitokimikaren bidez zehaztu genuen. Ikus daitekeenez, hnRNP K, hnRNP F, hnRNP E1 eta hnRNP A2 nukleoan daude nagusiki, baina soma eta oligodendrozoitoen prozesuetan ere patroikortsua erakusten dute. Zehazki, hnRNP A2 zelula osoan adierazten da, hnRNP K eta hnRNP F prozesuetan gailentzen dira, eta hnRNP E1 ugariagoa da soman **(21B. irudia)**.

Jarraian, hnRNP A2 eta hnRNP F kolokalizazio kuantifikatuko genuen granulu aktiboak eta ez-aktiboak identifikatzeko. Bi osagai horiek zituzten granulu gehiago aurkitu genituen A β -ekin tratatutako zeluletan (kontrola $1.207.778\pm 90.958$ vs A β $1.655.855\pm 108.033$) **(21C, D. irudia)**. Ondoren, hnRNP K zuten granuluen ehunekoak neurtu genuen, eta hnRNP A2-F konplexuen % 70 baino gehiago hnRNP Kekin kolokalizatzen zirela ikusi genuen, eta A β -ekin tratatutako zelulek hnRNP A2-F-K granuluen kopurua nabarmen handitzen zutela kontrol-zelulekin alderatuta (% $71,87\pm 2,845$ vs % $76,60\pm 2,845$, hurrenez hurren) **(21E. irudia)**.

Halaber, emaitzak ko-immunoprezipitazio-saiakuntzaren bidez balioztatu genituen. Zehazki, hnRNP A2k hnRNP E1ekin eta hnRNP Kekin batera prezipitatzen zirela ikusi genuen, aurretik immunozitokimikaren bidez frogatu zen bezala. Western blot bidezko granuluen osagaien kuantifikazioak erakutsi zuen hnRNP Kren mailen igoera esanguratsua izan zela A β -ekin tratatutako oligodendrozoitoetan kontrolarekin alderatuta ($5,588\pm 0,8006$ vs $11,49\pm 2,602$, hurrenez hurren) **(21F, G. irudia)**.

Orokorki, emaitzek adierazten dute A β -ek RNA granuluen kopurua handitu eta edukia aldatzen dutela itzulpena errazten duen konposizio molekularra erraztuz.

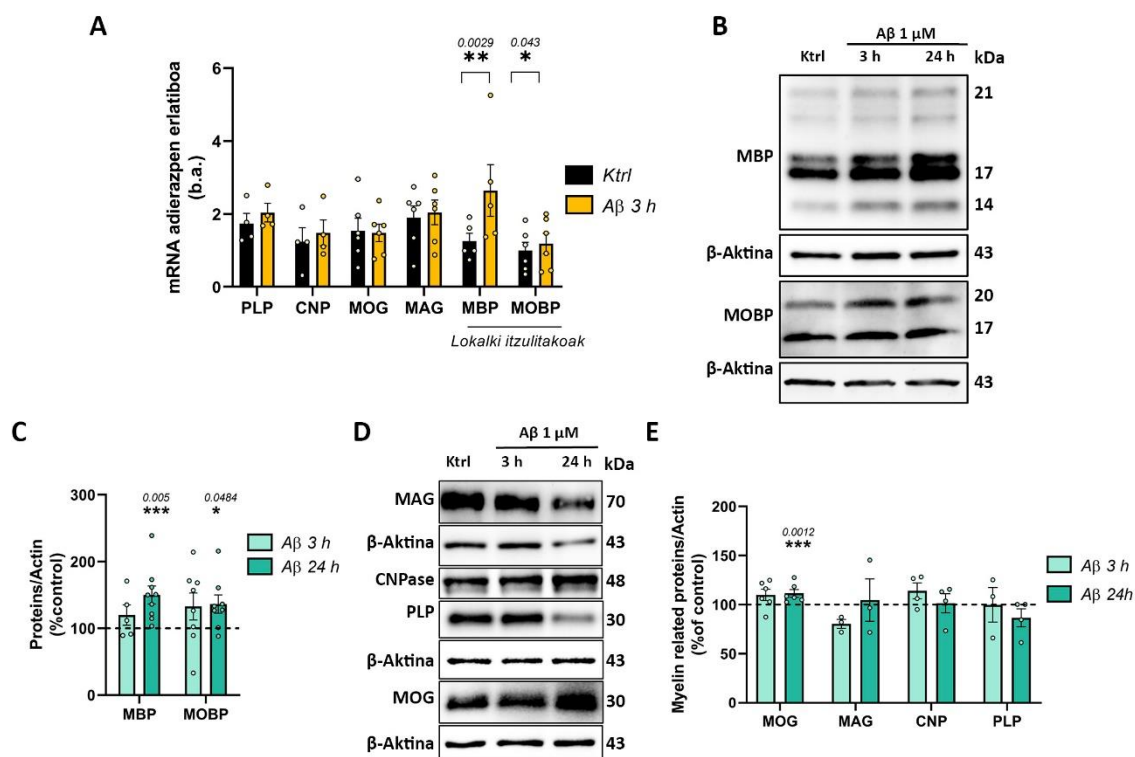


21. irudia. Aβ₁₋₄₂ oligomeroek mRNA granuluen dinamika aldatzen dute. (A) Granuluen bi konplexuak ilustratzen dituen argazkia: ez-aktiboa eta aktiboa. **(B)** HnRNP desberdinen kokapena erakusten duten mikrografia adierazgarriak. **(C, D)** HnRNP A2 eta hnRNP F kolokalizazio irudiak. Aβ-en eraginpean egoteak nabarmen handitzen du hnRNP A2/F kolokalizazioa. **(E)** Grafikoek erakusten dutenez, granuluen guztien % 70ek hnRNP K dute (granulu aktiboak), eta Aβ-ekin tratatutako zelulek, berriz, % 5 gehiago. **(F, G)** hnRNP A2ren CO-IP, granuluetan dauden hnRNPekin. Granuluaren barruan hnRNP K nabarmen handitzen da Aβ 1 μM-ko esposizioaren ondorioz. Datuek batez besteko ±S.E.M adierazten dute, puntu handiek esperimendu independenteak adierazten dituzte eta puntu txikiak zelula indibidualak adierazten dituzte, * p < 0,05, ** p < 0,01 kontrol-zelulekin alderatuta. Esanahi estatistikoa bi isatseko Student t proba binakatuaren bidez lortu zen.

2.8 A β ₁₋₄₂ oligomeroek desberdintzapen-markatzaileak gain-erregulatzen ditu *in vitro*

Ondoren, A β -ek mielinarekin lotutako beste proteina batzuen adierazpenari eragin ziezaioketen zehaztu nahi izan genuen. Oligodendrogliaen desberdintzapen-estadioak leinuaren berariazko markatzaile zelularren adierazpenak zehazten ditu. Olig2 leinu osoan zehar mantentzen den bitartean, CNPasaren espresioa progenitore berantiarretan hasten da. Oligodendrozito heldugabe eta helduek MBP, MOBP eta MAG adierazten dute eta azken etapan, MOG adierazten dute (Kuhn, Gritti, Crooks, & Dombrowski, 2019).

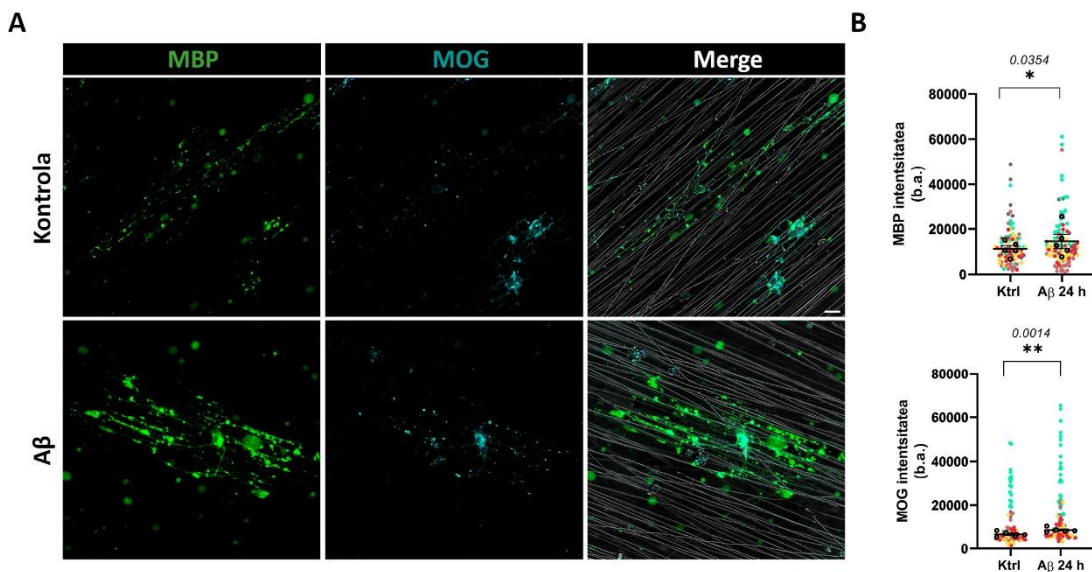
Hasieran, PLP, CNPasa, MOG, MAG, MBP eta MOBP mailak neurtu genituen; RNA maila RT-qPCR bidez eta maila proteikoa western blot bidez. Ez genituen desberdintasun esanguratsurik ikusi mRNA mailan, ez *Plp*, *Cnp*, *Mog* edo *Mag* (**22A. irudia**). Hala ere, *Mbp* (1,260 \pm 0,2195 vs 2,648 \pm 0,7077, hurrenez hurren) eta *Mobp* (0,7096 \pm 0,1658 vs 0,8470 \pm 0,2007, hurrenez hurren) 3 orduko A β o tratamenduaren ondoren, mRNAen mailak igo egin zirela ikusi genuen (**22A. irudia**). Bestalde, western blot-ak MBP (% 150 \pm 13,45), MOBP (% 138,3 \pm 17,46) eta MOG (% 111,6 \pm 3,908) 24 orduko tratamenduaren ondoren mailek nabarmen egin zutela gora ikusi genuen kontrolaren % 100arekin alderatuta (**22B, C, D, E. irudia**).



22. irudia. Aβ₁₋₄₂ oligomeroek mielinarekin erlazionatutako proteinak gain-erregulatu dituzte mRNA eta proteina mailan. (A) RT-qPCR bidez mielinarekin erlazionatutako proteinen analisia tratatutako eta kontrol zeluletan. (B, C) MBP eta MOBPren adierazpena eta kuantifikazio erlatiboa oligodendroitoen zelula-estraktuetan. (D, E) Mielinarekin erlazionatutako proteinen adierazpena eta kuantifikazio erlatiboa oligodendroitoen zelula-estraktuetan. Datuek batez besteko ±S.E.M adierazten dute eta puntuek banakako esperimenduak adierazten dituzte, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$ kontrol-zelulekin alderatuta. Esanahi estatistikoa bi isatseko Student t proba binakatuaren eta norabide bakarreko ANOVA eta Dunnett post-hoc probaren bidez lortu zen.**

Aurreko emaitzek zelulen heltzean duten eragina ebaluatzeko, saiakuntzak egin genituen nanofibrak erabiliz. PDLz estalitako nanofibretan oligodendroitoek bereizteko eta mielina-zorroak sortzeko duten gaitasuna lehen ere deskribatu da (Bechler, Byrne eta Ffrench-Constant, 2015; Lee et al., 2012). Beraz, esperimendu honek aukera eman zigun oligodendroitoen heltze prozesua aztertzeko neuronarik gabeko eredu batean. MBP (11.193 ± 1.424 vs 14.469 ± 3.092 , hurrenez hurren) eta MOG (6.521 ± 558.2 vs 8.417 ± 473.8 , hurrenez hurren) fluoreszentsia-intentsitate handiagoa erakutsi zuten Aβ_o-ekin tratatutako oligodendroitoek kontrolekin alderatuta (**23A, B. irudia**).

Oro har, emaitzek, A β -ek lokalki itzulitako proteinak, MBP eta MOBP, eta oligodendrozito helduetako MOG markatzaileak handitzen dutela erakusten dute.



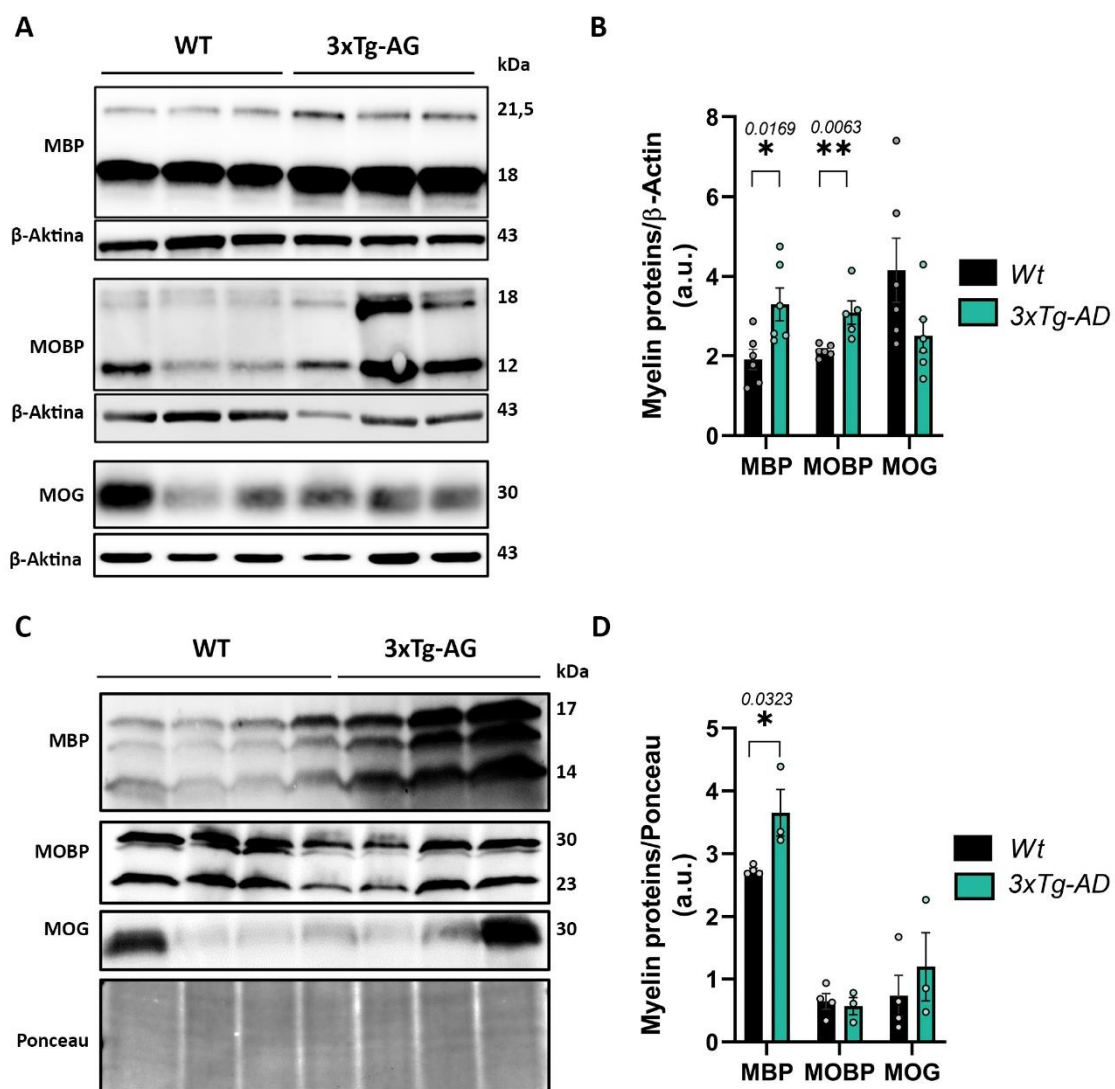
23. irudia. A β_{1-42} oligomeroek MBP eta MOG gain-erregulatu dituzte oligodendrozitoen 3D kultiboetan. (A) MBP (berdea) eta MOG (turkesa) immuntintzio bikoitza erakusten duten nanofibretan hazitako oligodendrozitoen mikrografia adierazgarriak. (B) MBPren eta MOGren fluoreszentsia-intentsitatearen analisia 24 orduko A β o tratamenduaren ondoren. Eskala-barra, 20 μ m. Datuek batez besteko \pm S.E.M adierazten dute eta puntu handienak esperimendu independenteen batez bestekoa dira, eta puntu txikieneak zelula indibidualak adierazten dituzte,* $p < 0,05$, $p < 0,01$, kontrol-zelulekin alderatuak. Esanahi estatistikoa bi isatseko Student t proba binakatuaren bidez lortu zen.**

2.9 3xTg-AG-ko sagu helduek MBP eta MOBP maila handiagoak erakusten dituzte hipokanpoan eta mielinan

Ostean, MBP, MOBP eta MOG adierazpena 3xTg-AG saguetan aldatzen ote zen zehaztu genuen. Horretarako, proteina horien mailak aztertuko genituen 6 hilabeteko 3xTg-AG eta WT saguen hipokanpoan eta mielina frakzioetan. Ondo deskribatuta dago AGean erasandako garuneko lehen eremuetako bat hipokanpoa dela. Gorputz kailukararekin alderatuta, oligodendrozitoen ordezkapena handiagoa da SGeen (Yeung et al., 2014). Aurreko datuek frogatu dutenez, MBPren adierazpena modu positiboan lotzen da A β mailekin 18 hilabeteko saguen hipokanpoan (Quintela et al., 2019). Hala ere, ez dakigu mielina-proteinak 3xTg-AG saguaren etapa goiztiarretan deserregulatuta dauden ala ez.

Proteinen mailen analisiak, MBP ($1,911\pm 0,2575$ vs $3,300\pm 0,411$, hurrenez hurren) eta MOBP ($2,1283\pm 0,062$ vs $3,097\pm 0,2928$, hurrenez hurren) mailak nabarmen handitu zirela erakutsi zuen, baina ez MOG maila ($4,155\pm 0,8029$ vs $2,512\pm 0,4147$, hurrenez hurren) 3xTg-AG saguetan, WT saguekin alderatuta (**24A, B. irudia**). Mielina-frakzioetan, aldiz, MBPren maila bakarrik handitu zen 3xTg-AG saguetan, WT-ekin alderatuta ($2,736\pm 0,036$ vs $3,654\pm 0,3696$, hurrenez hurren) (**24C, D. irudia**). Hipokanpoan MBPren isoforma nagusiak 17, 18 eta 21,5 kDa-koak ziren; eta mielina-frakzioetan berriz, 14, 17 eta 18 kDa-ko isoformak ziren nagusi, lehen deskribatu den bezala (Karthigasan, Garvey, Ramamurthy eta Kirschner, 1996).

Oro har, emaitzek erakusten dute 3xTg-AG hipokanpoak MBP eta MOBP maila handituak dituela AGren fase goiztiarretan, eta, gainera, mielinak MBP gehiago duela.



24. irudia. 3xTg-AG saguek MBP eta MOBP maila handiagoak dituzte. (A, B) MBP, MOBP eta MOG adierazpena 6 hilabeteko 3xTg-AG saguen hipokanpoen lisatuen kuantifikazio erlatiboan, WT-ekin alderatuta. (C, D) MBP, MOBP eta MOGen adierazpena 6 hilabeteko 3xTg-AG saguen mielina frakzioen kuantifikazio eraltiboa WT-ekin alderatuta. Datuek batez besteko \pm S.E.M adierazten dute eta puntuak banakako animaliak adierazten dituzte* $p < 0,05$, $p < 0,01$ WT-ekin alderatuta. Esanahi estatistikoa bi isatseko Student t proba binakatu gabearen bidez lortu zen.**

2.10 MBParen gainadierazpena oligodendrozitoen funtzioak aldarazten ditu

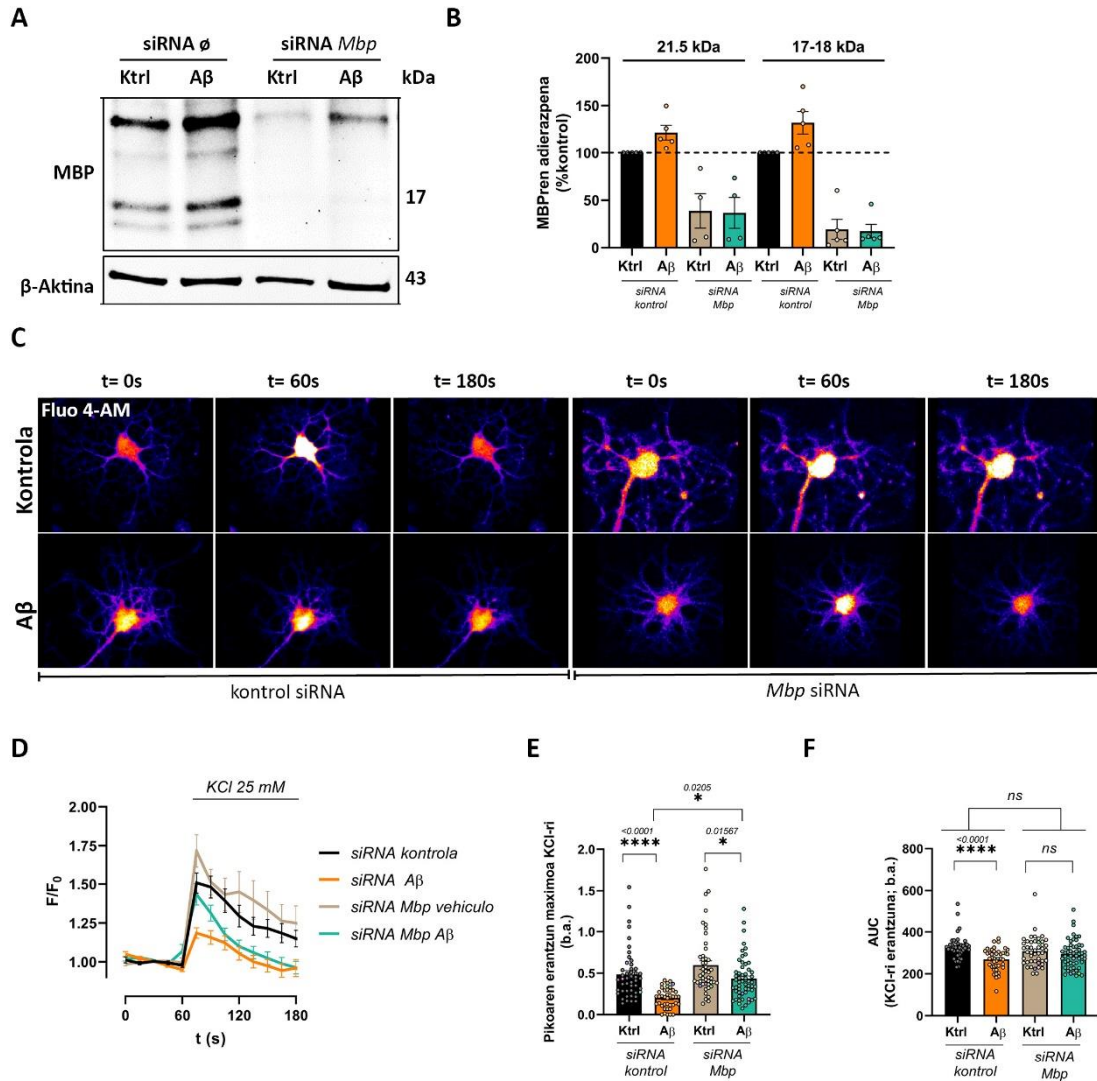
2.10.1 MBParen gainadierazpenak kaltzioaren sarrera inhibitzen du

MBP proteina multifuntzionala da, lipidoekin eta proteina ezberdinekin elkarreragiten duena (Smirnova et al., 2021). Aurretik deskribatu zen MBParen gainadierazpenak nabarmen murrizten duela kaltzioaren (Ca^{2+}) sarrera oligodendrozitoetan, tentsioaren bidez operatutako Ca^{2+} kanalen modulazioaren bidez (VGCC), zelulan Ca^{2+} -en erantzunei eraginez (Smith et al., 2011).

Beraz, zehazteko ea $\text{A}\beta$ -ren menpeko MBParen gainadierazpenak eta ez $\text{A}\beta$ -ak berak, VGCCen gaineko efektu bat eragiten zuten, Ca^{2+} intrazelularraren mailak erregistratu genituen KCl (25 mM) estimulazioaren pean, *Mbp*-ren adierazpena inhibituz. $\text{A}\beta$ -en presentzian edo absentzian. Lehenik eta behin, *Mbp* genearen adierazpena murrizteko gai ginela baieztatu genuen *Mbp*-ari zuzendutako eta kontrol siRNAk erabiliz **(25A. irudia)**. *Mbp*-ri zuzendutako siRNAk % $38,78\pm 10,14$ arte murriztu zuen 21 kD-ko isoforma, eta 17 eta 18 kDaren isoformak, berriz, $19,49\%\pm 10,50$ arte **(25B. irudia)**. Gainera, siRNA kontrolarekin $\text{A}\beta$ -tratatutako zeluletan, MBP 21 kDa % $121,6\pm 7,782$ eta 17-18 kDa isoformak % $132,1\pm 11,92$ gehitu zirela erakutsi zuten oligodendrozitoek, eta hori blokeatzen zen MBParen adierazpena inhibitzerakoan **(25A, B. irudia)**. Oligodendrozitoetan, kaltzio intrazelularraren mailen erregistroek kaltzioaren fluxua gutxitzen zela erakutsi zuten $\text{A}\beta$ 24 orduz tratatutakoan ($0,448\pm 0,043$ vs $0,2091\pm 0,024$), eta partzialki berreskuratzen zen *Mbp*-ren adierazpena inhibitzerakoan ($0,5967\pm 0,056$ vs $0,3966\pm 0,032$) **(25C, D, E. irudia)**. Horrez gain, kurbaren azpiko eremuak (AUC) behera egin zuela ikusi genuen $\text{A}\beta$ -ekin ($313,7\pm 5.494$ vs $272,8\pm 7,495$), eta guztiz berreskuratzen zen *Mbp*-ren adierazpena inhibitzerakoan ($300,7\pm 8,374$ vs $289,1\pm 8,365$) **(25F. irudia)**.

Emaitza hauek adierazten dute MBParen gainadierazpenak, batez ere 17 eta 18 kDa-ko isoformena, partzialki inhibitzen duela kaltzioaren sarrera; hala ere, $\text{A}\beta$ -ek MBParen

adierazpenaren mende ez dauden mekanismo independenteen bidez kaltzioaren dinamika inhibitu dezakeela dirudi.

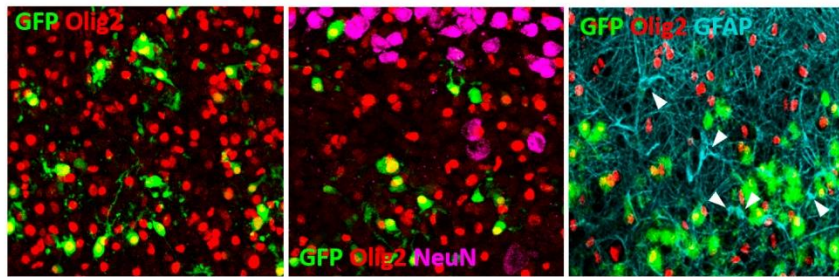


25. irudia. MBPren gainadierazpenak Ca^{2+} fluxua inhibitzen du zelulan. (A, B) MBPren western blot-eta adierazpen-mailen analisia kontrol eta *Mbp* siRNAekin transfektatutako zelulak A β -en esposizioaren ondoren. (C, D) Kontrol edo *Mbp* siRNAekin transfektatutako zelulak Fluo-4AM-ekin kargatu ziren, eta 24 orduz egon ziren A β -en eraginpean. Kaltzioaren maila mikroskopia konfokalaren bidez neurtu zen. (E) Baldintza desberdinen kurbaren azpiko eremua. (F) Baldintza desberdinetan lortutako puntu maximoa.. Datuek batez besteko \pm S.E.M adierazten dute eta Wb-an puntuek esperimendu independenteak adierazten dituzte eta kaltzioaren analisiaren kasuan puntuek zelula bakoitza adierazten dute,* $p < 0,05$,** $p < 0,0001$, kontrol-zelulekin alderatuta. Esanahi estatistikoa bi isatseko ANOVA arrunta, eta Tukey post-hoc probaren bidez lortu zen.**

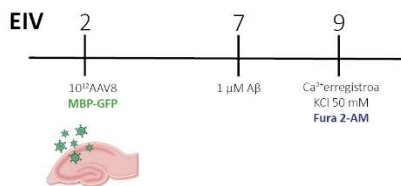
2.10.2 A β_{1-42} oligomeroek kaltzioaren sarrera inhibitzen dute ebaketa organotipiko hipokanpaletan

A β -ek kaltzioaren homeostasian aldaketak eragin zitzaketan ala ez ikertzen jarraitzeko, arratoiaren hipokanpoko kultibo organotipikoak erabili genituen zelula-sistema konplexuago eta animalien alternatiba gisa. Kultibo organotipikoak neuroendekapenezko gaixotasunen azpiko mekanismoak ikertzeko eta horiei aurre egiteko tratamendu-estrategiak aztertzeko eredu gisa erabili dira, ehunen arkitektura, erlazio anatomikoak eta sare-konexioak partzialki mantentzen baitituzte (Stoppini, Buchs eta Muller, 1991). Oligodendroitoak markatzeko, 2 EIVren ondoren, kultibo organotipiko hipokanpalak GFP proteina *Mbp* sustatzailearen pean adierazten duten AAV8 birusekin (10^{12} birus-partikula) infektatu ziren. Lehenik eta behin, birus horrek oligodendroitoak espezifikoki infektatzen ote zituen egiaztatu nahi izan genuen. Horretarako, immunofluoreszentzia-analisia gauzatu genuen, Olig2 markatzaile oligodendrogliala, NeuN markatzaile neuronalarekin eta GFAP markatzaile astrozitarioarekin batera. Irudietan ikusten denez, GFP+ diren zelulak Olig2rekin bakarrik ko-lokalizatzen dute (**26A. irudia**). Jarraian, ebaketa hipokanpalak 7 EIVren ondoren A β -ekin 48 orduz tratatu genituen (**26B. irudia**) eta zelula barneko Ca $^{2+}$ mailak erregistratuko genituen KCl (50 mM) bidezko estimulazioaren aurrean, puff teknikaren bidez. Argi eta garbi ikusi genuen A β -ek gehieneko kaltzio igoera eta AUC ($0,09034 \pm 0,002$ vs $0,03368 \pm 0,006$) nabarmen gutxitzea eragiten zutela (**26C, D. irudia**). Emaitzek, beraz, A β -ek tentsio bidez aktibatutako kaltzio-kanalen bitartez Ca $^{2+}$ -aren sarrera murrizten dutela iradokitzen dute.

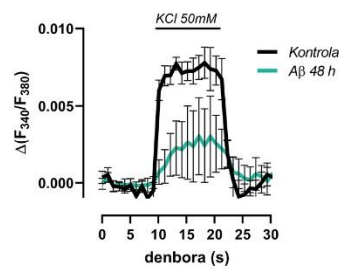
A



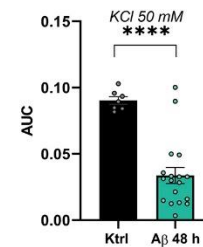
B



C



D



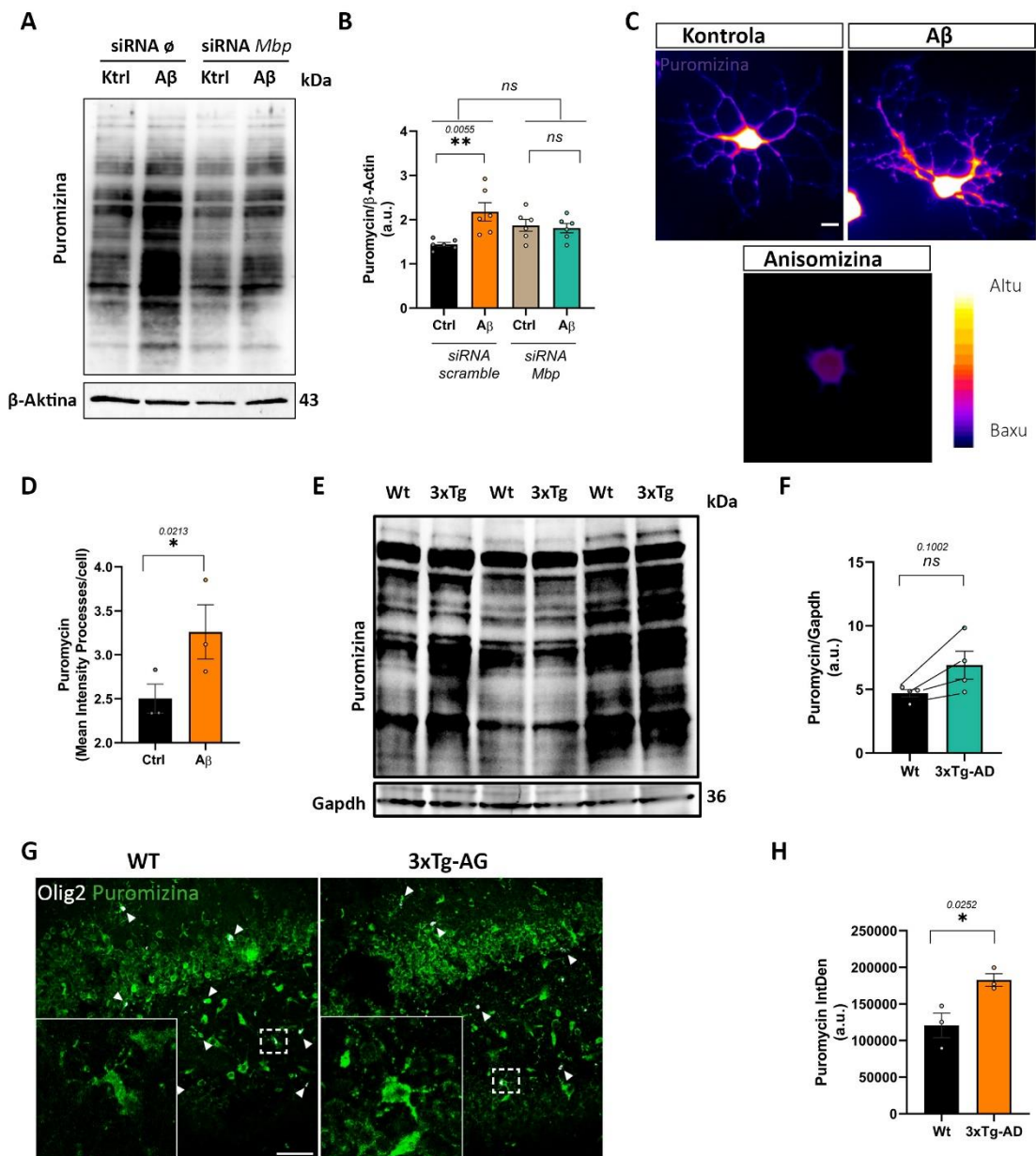
26. irudia. Aβ₁₋₄₂ oligomeroek inhibitu egiten dute zelulen kaltzio fluxua ebaketa organotipiko hipokanpaleko oligodendroitoetan. (A) AAV8-MBP-GFP (berdea), Olig2 (gorria), NeuN (magenta) eta GFAP (turkesa) infektatutako ebaketa hipokanpaleko z-stack proiektzio konfokal adierazgarriak. Ohartu Olig2 bakarrik gainjartzen dela GFPprekin. **(B)** Ereduek esperimentalaren eskema. **(C)** Zelulak Fura 2-AM-rekin kargatu ziren, eta zelula bRNAeko kaltzio-mailak puff teknikaren bidez neurtu ziren. **(D)** AUC adierazten duen histograma, kontrol eta Aβo-ekin tratatutako ebaketetan. Datuek batez besteko ±S.E.M adierazten dute eta puntuek zelula indibidualak adierazten dituzte, **** $p < 0.0001$, kontrolekin alderatuta. Esanahi estatistikoa bi isatseko de Student *t* proba binakatu gabearen bidez lortu zen.

2.10.3 MBParen gainadierazpenak proteinen sintesia sustatzen du

MBParekin elkarrengaitan duen proteina talde handienetako bat proteinen sintesirako makinerian eta itzulpenaren erregulazioan inplikaturako proteina da (Smirnova, E.V. et al., 2021). Itzulpenean MBPk izan dezakeen papera aztertzeko, oligodendroitoak kontrol edo *Mbp*-ri zuzendutako siRNAekin transfektatu ziren Aβo presentzian edo absentsian. Proteinak erauzi baino 10 minutu lehenago, oligodendroitoak puromizinarekin (2 μM) tratatu ziren. Western blot analisiak erakutsi zuen proteina-sintesi globala handitu egiten zela Aβo-ekin (1,439±0,046 vs 2,177±0,2082, hurrenez hurren) eta hori blokeatu egiten zela MBP isilaraziz (1,872±0,1347 vs 1,808±0,1058, hurrenez hurren) **(27A, B. irudia)**. MBPk itzulpena nola aldatzen duen jakiteko, immunofluoreszentzia-analisia egin genuen, puromizina zelularen zein toki zehatzetan

txertatzen zen ikusteko. Gorakada esanguratsu bat ikusi genuen espezifikoki A β -ekin tratatutako zelulen prozesuetan kontrolekin alderatuta ($2,502\pm 0,1625$ vs $3,206\pm 0,30888$, hurrenez hurren) **(27C, D. irudia)**. Nabarmendu behar da MBP kokatuta dagoen lekuan gorakada zegoela, eta horrek indartu egiten du MBPak proteinen sintesian parte hartu dezakeela dioen hipotesia.

3xTg-AG saguen hipokanpoan eta mielinan MBParen igoera ikusi genuenez, efektu hori itzulpena aldatzen ari ote zen zehaztu nahi genuen. Hasieran, mielina frakzio aberastuetan puromizinarekin inkorporazioa aztertu genuen, eta 3xTg-AGn goranzko joera zegoela ikusi genuen WT-ekin alderatuta **(27E, F. irudia)**. Jarraian, WT eta 3xTg-AG saguen ebaketa akutuak puromizinarekin ($10 \mu\text{M}$) tratatu genituen. Olig2 eta puromizinarekin immunotindatu ziren ebaketak **(27G. irudia)** eta puromizinarekin fluoreszentiaren dentsitate integratua neurtu genuen Olig2+ zeluletan. Analisisiek erakutsi zuten oligodendrozitoen itzulpena nabarmen handituta zegoela 3xTg-AG ($120.672\pm 16-857$ vs 182.662 ± 8.593 , hurrenez hurren) saguen hipokanpoko ebaketa akutuetan **(27H. irudia)**.



27. irudia. MBP proteinen itzulpena sustatzen du. (A, B) Puromizina-mailak western blot bidez azertu ziren, kontrol eta *Mbp*-ri zuzendutako siRNAekin transfektatutako zeluletan 24 orduko A β 0 esposizioaren ondoren. **(C, D)** Puromizina-mailak western blot bidez azertu ziren, WT eta 3xTg-AG saguen mielinaz aberastutako frakzioetan. **(E, F)** Immunofluoreszentzia-mikrografia adierazgarriak eta haien kuantifikazioa WT eta 3xTg-AG saguen ebaketa akutuetan. Olig2 (zuria) eta puromizinarekin (berdea) immunotindatu ziren. Datuek \pm S.E.M batez bestekoak adierazten dituzte eta puntuek banakako animaliak edo esperimendu independenteak adierazten dituzte, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, kontrolekin alderatuta. Esanahi estatistikoa bi isatseko Student *t* proba eta bi bideko ANOVA arrunta Tukey post-hoc probaren bidez lortu zen.

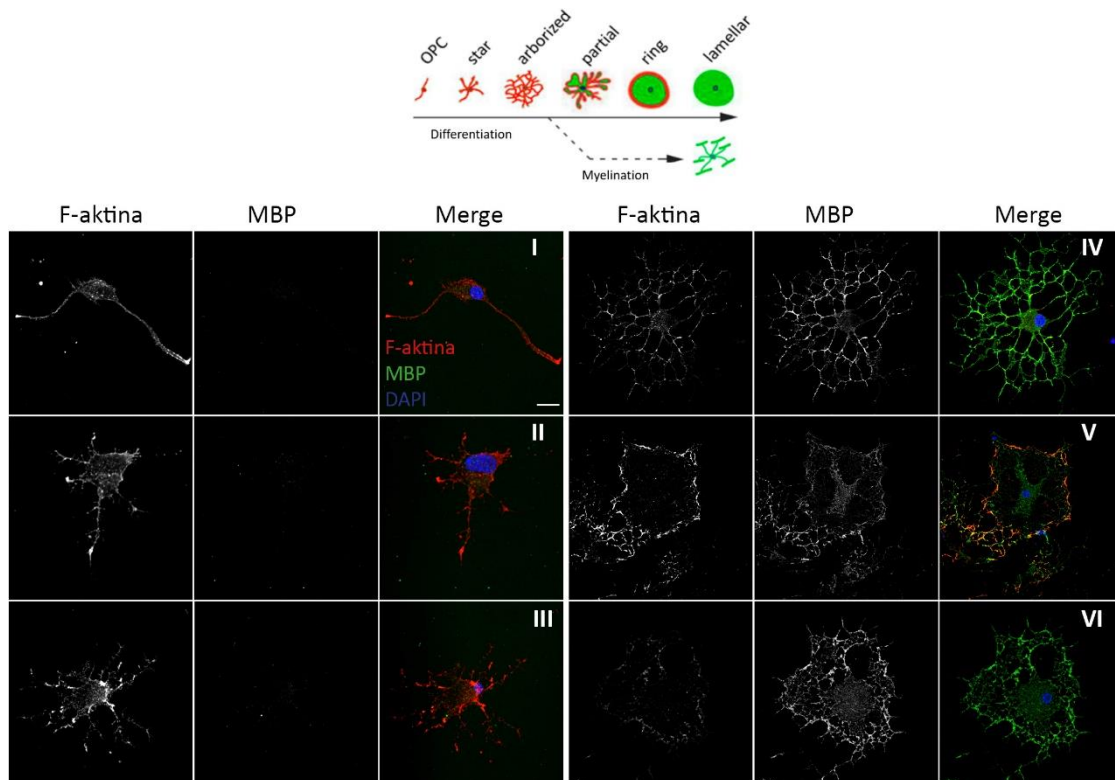
PART III: A β ₁₋₄₂ oligomeroen efektua aktinaren dinamikan eta mielinizazioan

3.1 A β ₁₋₄₂ oligomeroen efektua aktinaren dinamikan *in vitro*

Aktinaren dinamika funtsezko faktorea da oligodendrozoitoen oinarrizko funtzioetan; migrazioan, bereizketan eta mielinizazioan esku hartzen baitu (Brown & Macklin, 2019). Polimerizazio- eta despolimerizazio-orekan izandako aldaketek eragina izan dezakete zelula horien zitoeskeletoan, eta ondorioz, NSZko funtzio fisiologikoetan. Aktinaren dinamikan aberrazioak deskribatu izan dira *in vitro* eredu neuronaletan eta AGko animalia-ereduetan; hala ere, ez dago ikerketarik AG oligodendrozoitoen zitoeskeletoaren aldaketak deskribatzen dituenik. Gainera, gure RNA-seq esperimentuetan zitoeskeletoari lotutako geneen adierazpenean aldaketak ikusi genituen. Horrenbestez, oligodendrozoitoen zitoeskeletoaren dinamikan A β o-ak izan zezakeen efektua aztertu zen.

3.1.1 A β ₁₋₄₂ oligomeroak oligodendrozoitoen morfologia aldatzen dute

Aurretik deskribatu zen oligodendrozoitoek aldaketa morfologiko estereotipatuak jasaten dituztela desberdintzatu ahala, eta morfologia arborizatu batetik laminar antzeko egitura batera igarotzen direla. Gainera, zelulak heltzen diren heinean, F-aktina galdu egiten dute, MBP maila handitzen den bitartean. Dirudienez, MBParen adierazpenaren igoera aktinaren desmihizatzearekin batera gertatzen da **(28. irudia)** (Zuchero et al., 2015).

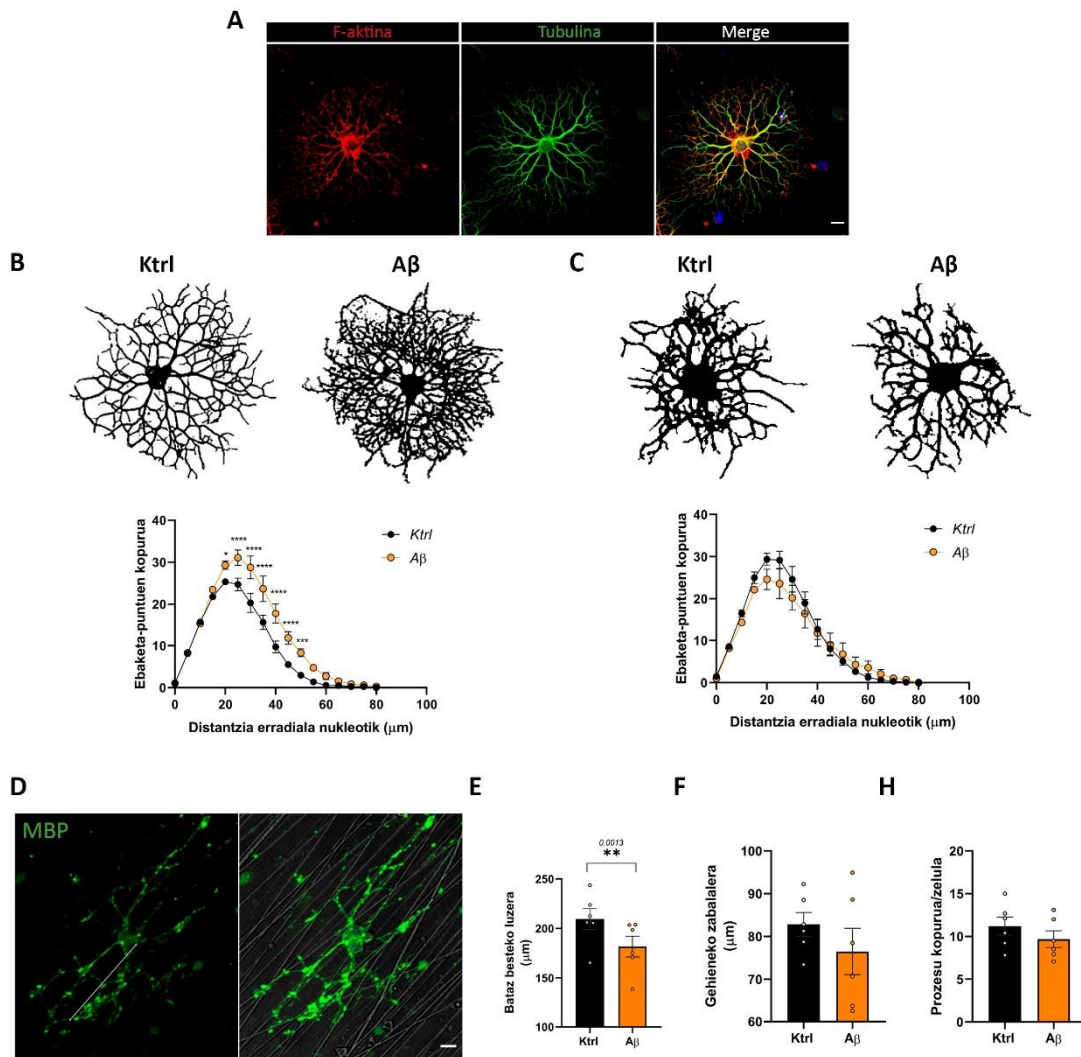


28. irudia. Aldaketa morfologikoaren eredu eskematikoa OPCen *in vitro* desberdintzapenean. Oligodendrozoitoak 1, 3 eta 6 EIV ondoren fixatu ziren, desberdintzapenean morfologia desberdinak irudikatuz: I, OPC; II, izartua; III, arborizatua; IV, partziala; V, eraztun; VI, lamelarra. OLak F-aktina (faloidina, gorria), MBP (berdea) eta nukleoetarako (DAPI, urdina) immunotindatu ziren. Eskala-barra, 10 μ m. Zuchero et al., 2015etik egokitua

Lehenengo, egiaztatu nahi genuen ea A β o-ek aktina zitoeskeletoa alda ote zezakeen eta ondorioz, oligodendrozoitoaren morfologiari eragin. Hortaz, oligodendrozoitoak *Phalloidin-TexasRed*-ekin (F-aktina) tindatu genituen tubulinarekin batera, eta zelularen konplexutasuna neurtu zen Sholl analisiaren bidez. Sholl eraztunen gurutzeen kopurua nabarmen handitu zela ikusi zen F-aktinarentzat, A β o-ekin tratatutako oligodendrozoitoan, kontrolarekin alderatuz (**29B. irudia**). Aitzitik, ez zen alde nabarmenik ikusi bi baldintzen artean tubulinaren sholl eraztunen kopuruan (**29C. irudia**). Datu horiek adierazten dute A β o-ek aldaketa morfologikoak eragiten dituela, ustez, aktina harizpiak aldatuz, baina ez mikrotubuluak.

Jarraian, 3D ingurune baten desberdintzapen morfologikoa zehatzago aztertzeko, oligodendrozoitoak PCLezko nanofibretan kultibatu ziren. Oligodendrozoitoak nanofibren inguruan bildu eta lerrokatu ziren, baldintza fisiologikoen antzeko morfologia hartuz.

Zelulak MBPrako tindatu ziren eta hainbat parametro kuantifikatu genituen, hala nola zelularen-luzera, zabalera, prozesu-kopurua eta prozesuen luzera. A β -k batez besteko zelula-luzera murrizten zuela (209,5 \pm 10,56 vs 181,7 \pm 10,49, hurrenez hurren) ikusi genuen, baina ez zuela ez zabaleran ez prozesuen kopurua aldatzen (**29F, G, H. irudia**).



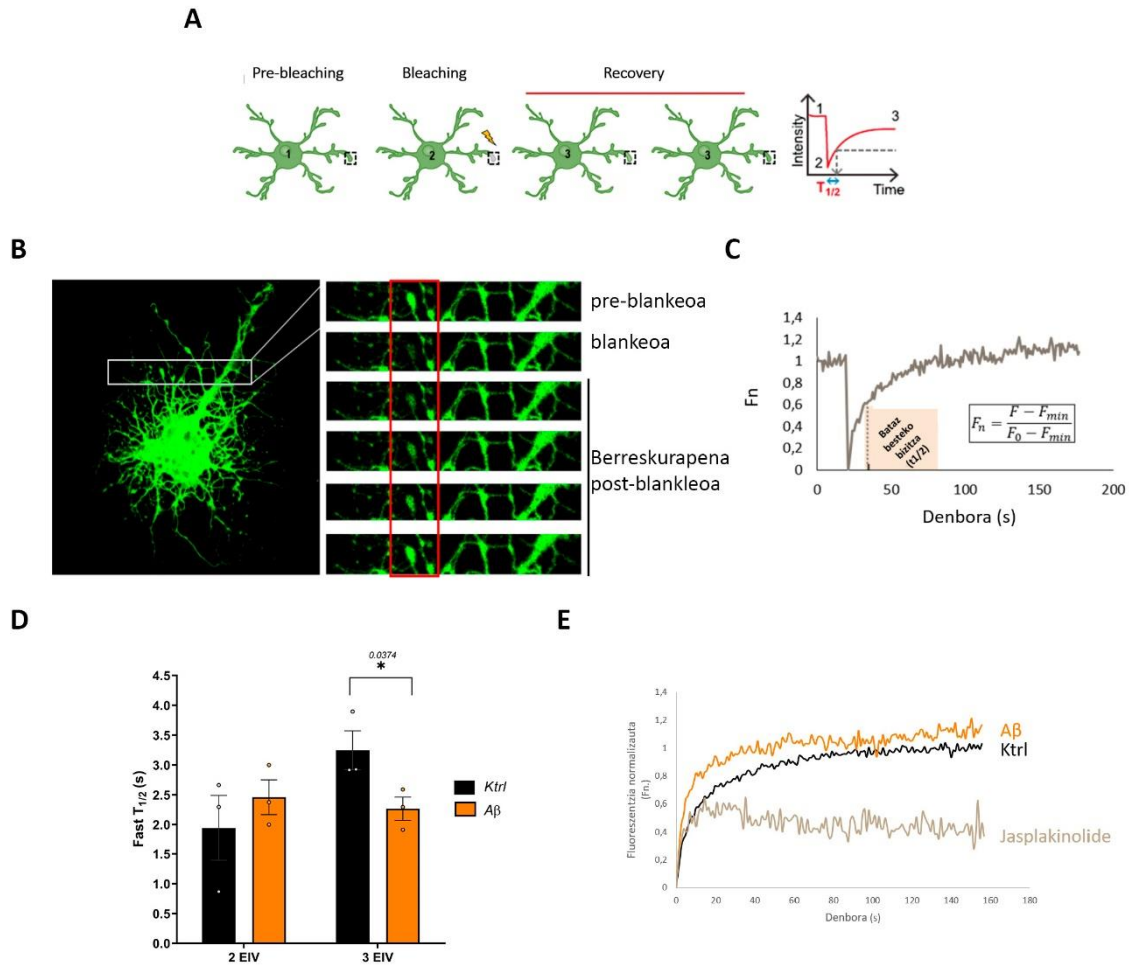
29. Irudia. A β ₁₋₄₂ oligomeroek aktina-zitoeskeletoa deserregulatzen dute. (A) F-aktinaren (faloidina, gorria) eta tubulinaren (berdea) mikrografiak oligodendrozioten. (B) Sholl analisiaren irudi adierazgarria (beltza) eta F-aktinarako kuantifikazioa, 24 orduz A β 1 μ M-ekin tratatutako oligodendroziotetan. (C) Sholl analisiaren irudi adierazgarria (beltza), eta tubulinarako kuantifikazioa oligodendroziotetan 24 orduz A β 1 μ M-ekin tratatutako oligodendroziotetan (D) Nanofibretan hazitako oligodendrozioten MBPrako (Berdea) gehieneko proiektzioren irudi adierazgarria. Gezi zuriak prozesuaren luzera erakusten du. Batez besteko zelula-luzera (E), batez besteko zelula-zabalera (F) eta zelula bakoitzeko prozesu-kopurua (G) adierazten duten histogramak. Eskala-barra, 10 μ m. Datuek \pm S.E.M batez bestekoa adierazten dute, eta puntuek

esperimentu independenteak adierazten dituzte, $p^* < 0,05$, $p^{**} < 0,01$ kontrol-zelulekin alderatuta. Esanahi estatistikoa bi isatseko Student t proba binakatuaren bidez lortu zen.

3.1.2 $A\beta_{1-42}$ oligomeroek aktinaren dinamika sustatzen dute

$A\beta$ -ek aktina zitoeskeletoan duten eragina, mikrofilamentu egonkortuen handitzearen ondorioa izan zitekeen behatzeko, fotozuritze ondorengo fluoreszentiaren berreskurapena (*fluorescent recovery after photobleaching*; FRAP) esperimentuak egin ziren. Aktinaren dinamika monitorizatzeko, aldezturik oligodendrozitoak *Life Act* birus eramaile batekin infektatutako ziren 2 eta 3 EIVetan. *Life Act* zelula eta ehun eukariotoetan F-aktinazko egiturak tindatzen dituen peptido txikia da. Analisia egiteko, fotozuritze zelularen puntu jakin batean aplikatu zen, eta baldintza bakoitzerako fluoreszentiaren berreskurapena erregistratu zen hurrengo segundoetan (**29A, B. irudia**).

2 EIVekin alderatuta, Fast $T_{1/2}$ gisa adierazitako fluoreszentiaren berreskurapena antzekoa izan zen $A\beta$ -ekin tratatutako oligodendrozitoetan eta kontrolatan ($1,943 \pm 0,5475$ s kontrolerako eta $2,459 \pm 0,2911$ s tratatutako zeluletarako). Aldiz, 3 EIVtan aldaketak ikusi ziren tratatutako eta kontrolaren arteko aktinaren polimerizazio-abiaduran, batez ere kurbaren lehen erdian ($3,247 \pm 0,3254$ s kontrolerako eta $2,266 \pm 0,1955$ s tratatutako zeluletarako). Jasplakinolideak harizpiak egonkortzen ditu eta aktinaren mihizadura filamentosoa sustatzen du; beraz, kontrol negatibo gisa erabili zen (**29D, E. irudia**). Datu hauek adierazten dute aktinaren polimerizazioa azkarrago gertatzen dela $A\beta$ -peptidoarekin tratatutako oligodendrozitoetan.

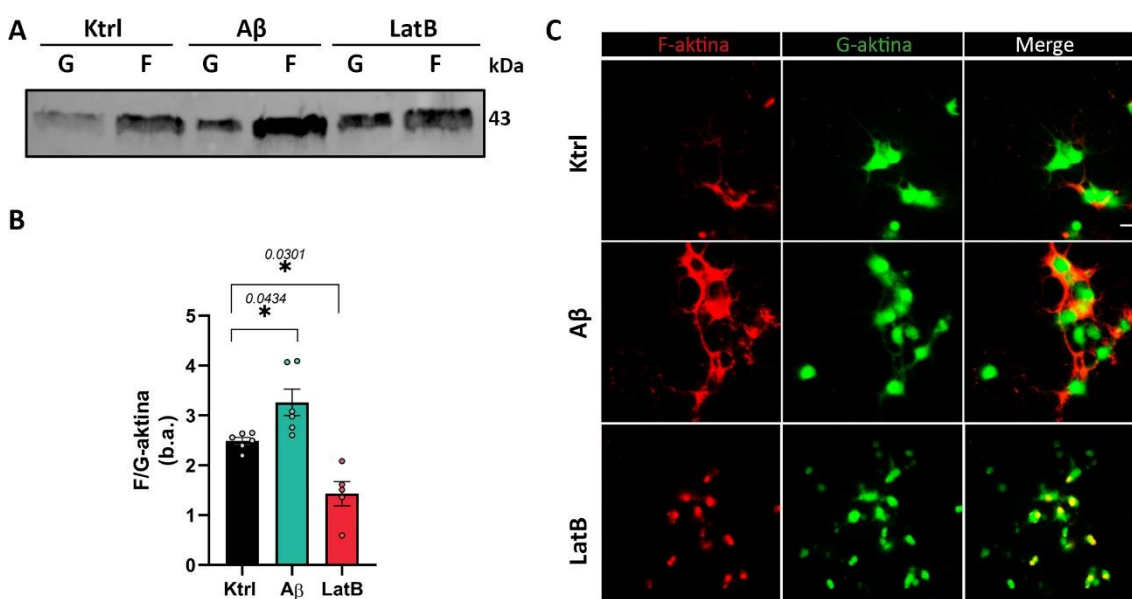


29. irudia. A β_{1-42} oligomeroek aktinaren dinamika aldatzen dute. (A) FRAPen faseak erakusten dituen diagrama. 1. Aurre-fotoblankeoa; 2. Laser bidezko fotozuritzea eta 3. Fluoreszentzia berreskurapena. ROIa OL prozesuen hazkunde-konoan egin zen. (B) LifeAct birusarekin infektatutako 3 EIV kontrolako OL baten FRAP irudia (1:100, 16 orduz). Hazkunde-konoak fotoblankeatu ziren eta fluoreszentzia berreskuratzeko denbora neurtu zen. (C) Fluoreszentzia berreskuratzeko intentsitate-kurba ehunekotan normalizatu zen, laukiaren ekuazioa eta batez besteko bizitza-parametroa erabiliz ($t_{1/2}$). (D, E) Kontrolako OLak (beltza) berreskuratzeko kurbak, A β o tratatuak (laranja) eta jasplakinolidarekin tratatuak (marroia). 2-3 zelula kuantifikatu ziren baldintzaren arabera esperimendu bakoitzean, eta zelula bakoitzaren barruan 3-5 puntu desberdin kuantifikatu ziren. Datuek \pm S.E.M batez bestekoa adierazten dute, eta puntuek esperimendu independenteak adierazten dituzte, * $p < 0,05$ kontrol-zelulekin alderatuta. Esanahi estatistikoa bi isatseko Student t proba binakatuaren bidez lortu zen.

3.1.3 A β_{1-42} oligomeroak F eta G-aktina ratioa aldatzen du kofilinaren bidez

Aktinaren dinamikaren egoera zehazteko modu on bat zeluleko aktina globular monomerikoaren (G-aktina) eta aktina filamentosoaren (F-aktina) arteko proportzioa

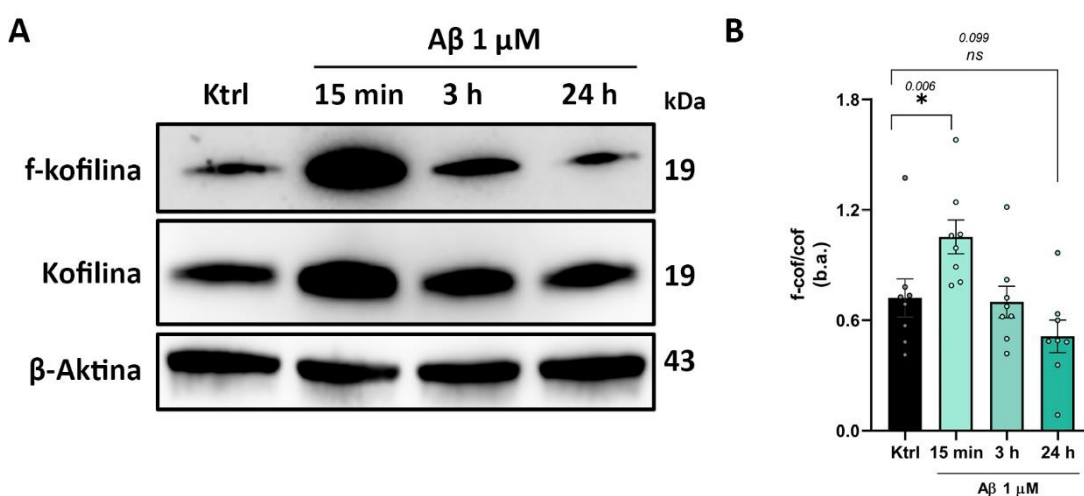
neurtzea da. Beraz, G- eta F-aktina mailak zehaztu ziren entsegu biokimiko eta immunofluoreszenteen bidez kontrol-, A β eta Latrunkulina Brekin (LatB) tratatutako oligodendroitoetan. LatB aktinaren polimerizazioaren inhibitzailea da, G-aktinarekin 1:1 proportzian elkarreragiten duena F-aktinaren polimerizazioa *in vitro* inhibitzeko. Bi esperimenteriek erakutsi zuten F/G-aktinaren ratioak gora egiten zuela A β -ekin tratatutako zeluletan, kontrolekin alderatuta ($2,489 \pm 0,07$ vs $3,264 \pm 0,2668$, hurrenez hurren), F-aktinaren handitzea sustatuz. Gainera, LatBrekin tratatutako zelulek F- eta G-aktina 1:1eko proportziora itzuli zuen ($1,431 \pm 0,2417$) (30A, C, D. irudia).



30. irudia. A β_{1-42} oligomeroek F/G-aktina erlazioa aldatzen dute. (A) Western blot G eta F-aktina, kontrol, A β -ekin eta LatB-ekin tratatutako zelulak. (B) F/G erlazioaren aldaketak irudikatzen dituen histogramahiru baldintzetan. (C) F-aktina (faloidina, gorria) eta G-aktina (DNAasa I, berdea) harizpien immunofluoreszentiako mikrografia adierazgarriak. Eskala-barra, 10 μ m. Datuek \pm S.E.M batez bestekoa adierazten dute, eta puntuak esperimenteru independeneteak adierazten dituzte, * $p < 0,05$, kontrolekin alderatuta. Esanahi estatistikoa norabide bakarreko ANOVA eta Dunnett post-hoc probaren bidez lortu zen.

A β -ek aktinaren dinamikan eragindako aldaketen azpian dagoen bide molekularra ikertzeko, aktinari lotutako proteinen familian jarriko dugu arreta. ADF/Kofilina: aktinaren aldaketan inplikaturako proteinetako bat da, eta bestalde, oligodendroitoetan aberastuta dago. ADF/Kofilinaren jarduerak oligodendroitoetan

aktinaren F/G-ren ratio baxuak sortzeko ardura duela deskribatu da (Nawaz et al., 2015). ADF/Kofilina bi egoeratan egon daiteke, fosforilazio-egoeraren arabera: desfosforilatzen denean aktibatzen da eta fosforilatzen denean inhibitzen da. Beraz, bere aktibazio egoera neurtu zen A β tratamenduaren ondoren hainbat denbora-puntutan: 15 minutu, 3 ordu eta 24 ordu. Western blot analisiak fosforilazio-egoera nabarmen handitu zela erakutsi zuen 15 minutuko estimuluaren ondoren, denborarekin egonkortu egiten zena (31A, B irudia).



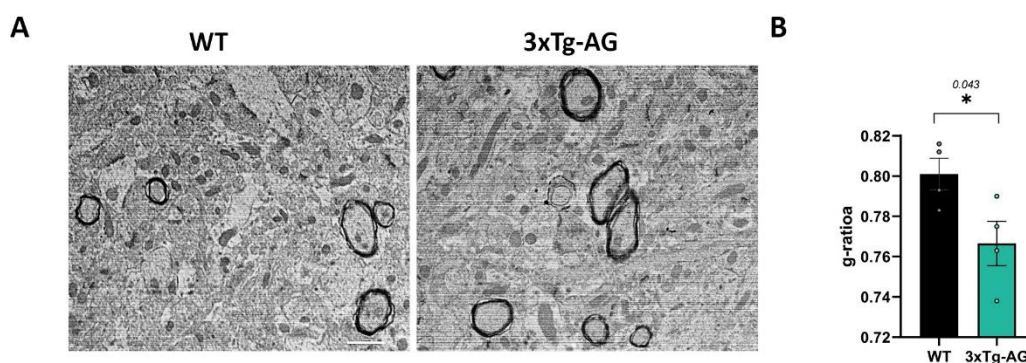
31. irudia. A β ₁₋₄₂ oligomeroek cofilinaren fosforilazioa sustatzen du. (A) Kofilin eta f-kofilinaren western blot-a. (B) f-kofilina-maila normalizatuen histograma, kofilina osoarekiko. Eskala-barra, 10 μ m Datuek \pm S.E.M batezbestekoa adierazten dute, eta puntuek esperimentu independeteak adierazten dituzte, *p < 0,05, kontrolekin alderatuta. Esanahi estatistikoa norabide bakarreko ANOVaren eta Dunnett post hoc probaren bidez lortu zen.

3.2 A β ₁₋₄₂ oligomeroen efektua *in vivo* mielinizazioan

NSZeko axoien mielinizazioa funtsezkoa da ekintza-potentzialak azkar hedatzeko. Gainera, mielinaren endekapena eta substantzia zuriaren galera AGko gertaerak dira, eta defizit kognitiboak eragiten dituzte. Gure RNA-seq azterketan mielinizazioarekin lotutako hainbat bide asaldatuta ikusi genituenez bai *in vitro*, bai 3xTg-AGko oligodendrozoetan, A β -ak *in vivo* mielinizazioan eragina izan ote zezakeen egiaztatu genuen.

3.2.1 3xTg-AG saguen hipokanpoek mielina lodiagoa dute

Gure laborategian aurretik deskribatu zen 3xTg-AG saguek mielina lodiagoa zutela gorputz kailukaran 6, 12 eta 18 hilabetera. Hipokanpoa, AGean erasandako lehen eremuetako bat denez, eta MOBP eta MBP sintesien gorakada nabarmena ikusi genuenez, 6 hilabeteko 3xTg-AG saguetan mielina aldatuta egon ote zitekeen galdetu genion geure buruari. Hipotesi hori aztertzeko, mikroskopia elektronikoko irudiak lortu genituen WT eta 3xTg-AG saguen biraketa horzdunear. Mielinaren lodiera, g-ratio balioaren bidez neurtu zen. 3xTg-AG saguen biraketa horzdunaren mielinak g-ratioa nabarmen murriztua zuela ikusi zen WTrekin alderatuta, iradokiz mielina lodiago zutela (32A, B. irudia).

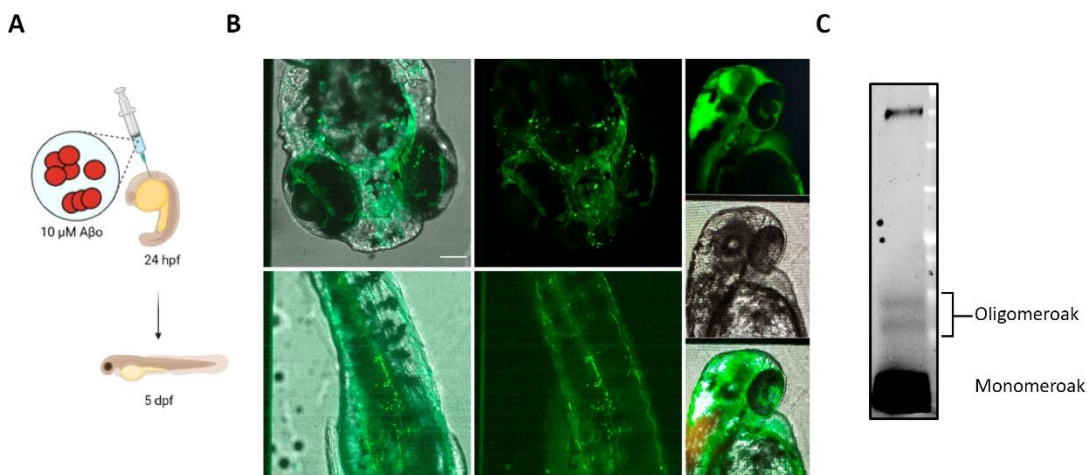


32. irudia. 3xTg-AG saguen hipokanpoak mielina lodiagoa du 6 hilabeterekin. (A) WT eta 3xTg-AG saguen biraketa horzdunaren zeharkako ebakiak irudikatzen dituzten mikrografia elektronikoak, 6 hilabetera. (B) WT eta 3xTg-AG saguetan g-ratioaren balioa erakusten duen histograma. Eskala-barra, 1 μ m. Datuek \pm S.E.M batez bestekoa adierazten dute, eta puntuek banakako animaliak adierazten dituzte, $p^* < 0,05$, WT saguekin alderatuta. Esanahi estatistikoa bi isatseko Student t proba binakatu gabearen bidez lortu zen.

3.2.2 A β -ekin injektatutako zebra-arrainek mielinizazioan aldaketak dituzte

Ezer gutxi dakigu A β -k mielinizazioan izan dezaken paperari buruz. Zebra-arraina mielinizazioa *in vivo* ikusteko animalia-eredu egokia da, bere garapena azkarra delako

eta larbak gardenak direlako. Gainera, gizakien *MBP*aren ortologo bat adierazten du, *Mbpa*.



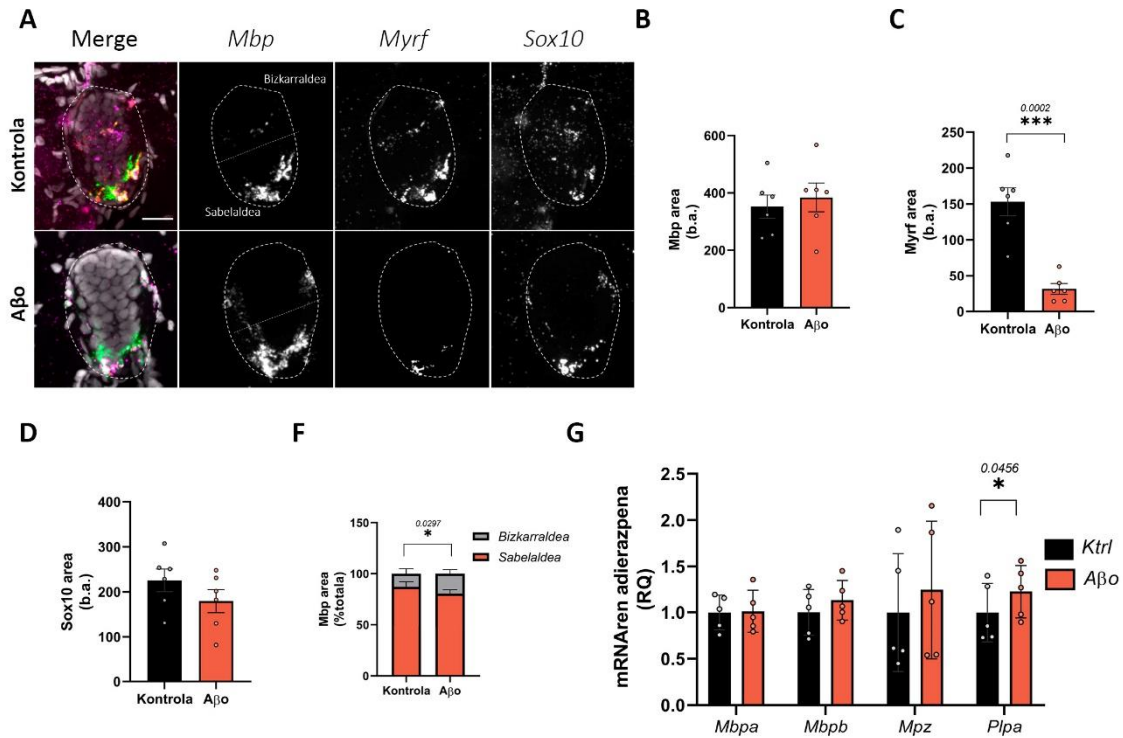
33. Irudia. Aβo markatuarekin Zebra-arrainari egindako injekzioa. (A) Planteamendu esperimentalaren eskema; 10 μM Aβo zebra-arrainen larben atzeko garunean injektatu ziren eta 5 dpf arte itxaron zen esperimentuak egiteko. **(B)** Markatutako Aβo-rekin injektatutako larben fluoreszentsia-irudiak, injekzioaren adierazgarri. **(C)** Injektatutako Aβo nahasketan aurkitzen diren espezieen western blot-a; monomeroak eta hainbat oligomero mota ikusi daitezke. Eskalako barra, 1 mm.

Beraz, zebra-arrainen larbetan Aβo-k mielinizazioan duen eragina aztertu genuen. Esperimentu horiek egiteko, Aβo edo ibilgailua ernaldu ondorengo 24 orduko (hpf), enbrioietan injektatu zen, eta ernaldu ondorengo 3 eta 5 egun (dpf) arte itxoin zen esperimentuak egiteko. Hasieran, injekzioa behar bezala egiten zela egiaztatu genuen markatutako Aβo erabiliz. Argi eta garbi ikusi ahal izan genuen markatutako Aβo garun eta bizkarrezur-muin osoan zehar hedatzen zela (**33A, B, C irudia**). Injekzioaren eraginkortasuna egiaztatu ondoren, immunohistokimika eta *in vivo* irudien bidez aztertu genuen mielinizazio prozesua.

3.2.2.1 Aβ₁₋₄₂-injektatutako zebra-arrainen larbek bizkarrezur-muinean RNA adierazpenean aldaketak erakusten dituzte

Oligodendrozoitoen desberdintzapenean izan daitezkeen aldaketak identifikatzeko, lehenik eta behin, RNAscope FISH saiakuntza egin genuen bizkarrezur-muinean, hainbat markatzaile oligodendroglialetarako; *Myrf*, *Mbpa* eta *Sox10*. Zundek betetako eremua

neurtu genuen. *Myrf*-ek betetako eremua txikiagoa zen A β o-injektatutako zebra-arrainetan ($153,1\pm 19,58$ vs $31,27\pm 7,456$, hurrenez hurren); beste bi markatzaileek, berriz, ez zuten aldaketarik erakutsi (**34A, B, C, D. irudia**). Bizkarrezur-muinean, oligodendroito gehienak jatorriz sabelaldean kokatutako zeluletatik garatzen dira. Zelula horiek bizkarraldera migratzen dute, eta bertan ugaltu eta oligodendroitoetan desberdintzatzen dira (Lee et al., 2010).



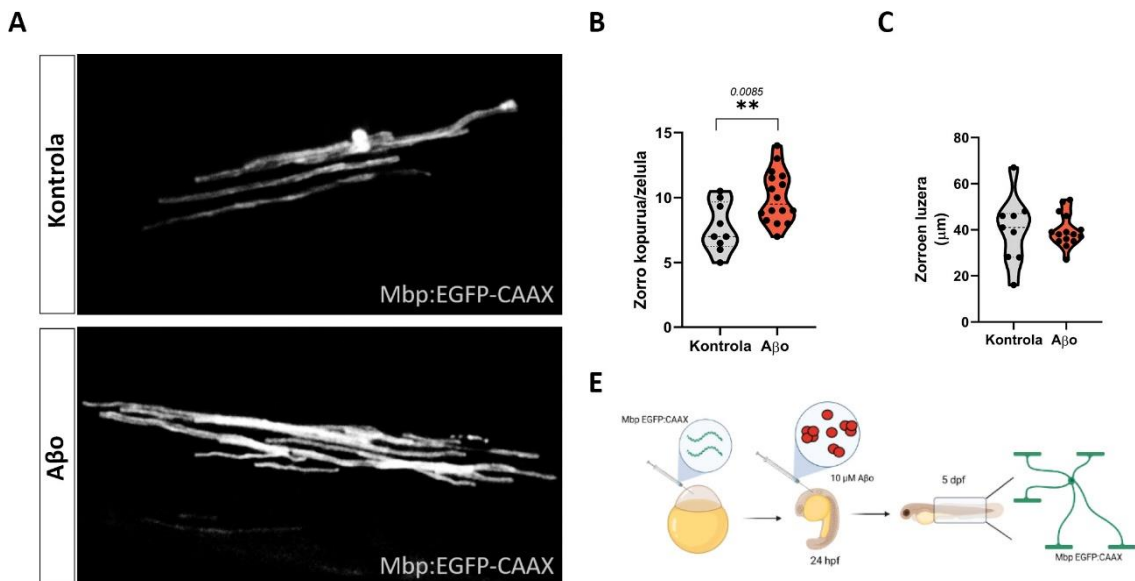
34. irudia. A β o-ekin injektatutako zebra-arrainen larbek aldaketak erakusten ditu mRNA mailetan eta banaketan. (A) Bizkarrezur-muinaren zeharkako sekzioen irudi konfokal adierazgarriak *Mbp*, *Myrf* eta *Sox10*erako, A β o eta kontrolarekin injektatutako zebra-arrainetan. **(B, C, D)** Bizkarrezur-muineko mRNAen eremuaren RNAscope analisi kuantitatiboa. **(F)** *Mbp* mRNAren banaketaren kuantifikazioa sabelaldean eta bizkarraldean. **(G)** *Mbpa/b*, *Mpb* eta *Plpa*-rako RT-qPCR analisia Eskala-barra, 20 μ m. Datuek \pm S.E.M bategi bestekoa adierazten dute, eta puntuek larba indibidualak adierazten dituzte, $p < 0,05$, $p < ****0,001$ kontrolarekin injektatutako zebra-arrainarekin alderatuta. Esanahi estatistikoa bi isatseko Student t proba binakatu gabearen bidez lortu zen

Hortaz, ondoren, egiaztatu genuen ea oligodendroitoak gehiago migratzen ote zuten bizkarraldera eta, ondorioz, gehiago heltzen ote ziren. *Mbp*-ak bizkarraldean eta sabelaldean okupatzen zuen eremua neurtu genuen eta desplazamendu esanguratsua ikusi genuen bizkarralderantz A β o-ekin injektatutako arrainen kasuan kontrolarekin alderatuta (**Figure 34F**). Gainera, *Mbpa*, *Mpb*, *Mpz* eta *Plpa*-rako RT-qPCRa ere egin

genuen eta A β -injektatutako arrainetan *Plpa* gainadierazita zegoela ikusi genuen (0,9998 \pm 0,1317 vs 1,208 \pm 0,1288, hurrenez hurren).

3.2.2.2 A β -injektatutako zebra-arrainen oligodendroitoek mielina-zorro gehiago dituzte

Behin ohartuta A β -k oligodendroitoen desberdintzapenean eragina izan zezakeela, jarraian, horrek mielina-zorroen kopurua eta luzera alda zitzakeen galdetu genion geure buruari. Banakako oligodendroitoetan mielina-zorroak aztertzeko, *mbp:egfp-caax* adierazi genuen pasakorki, zebra-arrainaren zelula bateko estadioko enbrioietan mikroinjekzioen bidez. Zelula horiek EGFP-CAAX adierazten zuten, larben mielina-traktuetan mintzari lotuta (**35A. irudia**). Ez genituen aldaketarik ikusi zorroen luzeran, baina nabarmen handitu zen zorroen kopurua A β -injektatutako zebra-arrainetan kontrolarekin alderatuz (7,704 \pm 0,629 vs 10,06 \pm 0,4997, hurrenez hurren) (**35A, B, C. irudia**).



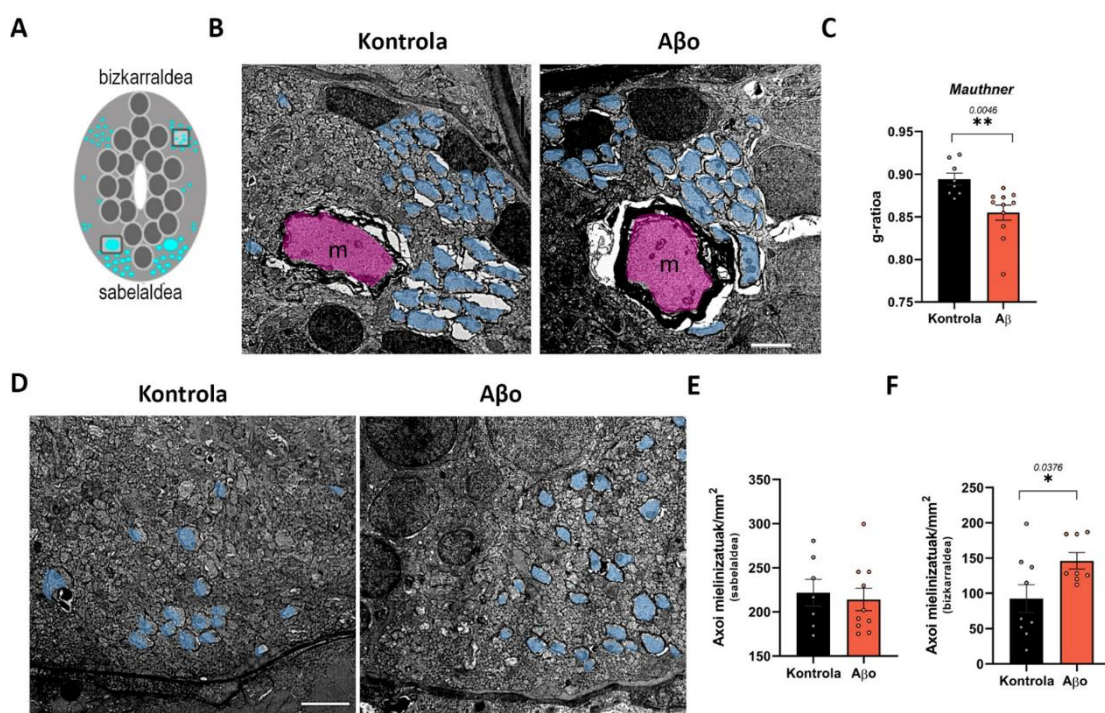
35. irudia. A β -injektatutako zebra-arrainak zelula bakoitzeko zorro gehiago ditu. (A) Kontrol eta A β -ekin injektatutako zebra-arrainen bizkarrezur-muinean dauden oligodendroitoen in vivo irudi adierazgarriak. (B) Zelula bakoitzeko zorro kopurua adierazten duen histograma. (C) Banakako zorroaren luzera adierazten duen histograma. (E) Planteamendu esperimentalaren eskema; *mbp: egfp-caax* injektatu zen enbrioietan, eta 24 ordu pasata 10 μ M A β injektatu ziren, eta 5 dpf arte itxaron zen esperimenduak egiteko. Datuek \pm S.E.M batez bestekoa adierazten dute, eta puntuek larba indibidualak adierazten dituzte, $p < **0,01$ kontrol zebra-arrainekin alderatuta. Esanahi estatistikoa bi isatseko Student *t* proba binkatu gabearen bidez lortu zen.

3.2.2.3 A β -injektatutako zebra-arrainek mielinizazioan alterazioak aurkezten dituzte

Azkenik, gure buruari galdetu genion ea mielinarekin lotutako zorro kopuruaren aldaketek, horien banaketak eta proteinen mRNAk mielinizazioa alda zezaketen. Horretarako, zebra-arrainen larben bizkarrezur-muinean mikroskopia elektronikoa egin genuen, eta bizkarraldea eta sabelaldea aztertu ziren. Lehenbizi, Mauthner-en zelulen g-ratioa neurtu eta A β -ak g-ratio nabarmen murrizten zuela ikusi genuen. Horrek adierazi zigun mielina lodiagoa zutela A β -injektatutako arrainek ($0,8942 \pm 0,007$ vs $0,8549 \pm 0,009$, hurrenez hurren) (**36B, C. irudia**).

Segidan, sabelaldeko mielinizatutako axoiak neurtu genituen, eta beheranzko joera ez esanguratsua ikusi genuen (**36B, E. irudia**). Bizkarraldean, aldiz, axoi mielinizatuen kopurua nabarmen altuagoa zen A β -injektatutako zebra-arrainetan, kontrol zebra-arrainekin alderatuta ($0,8942 \pm 0,007$ vs $0,8549 \pm 0,009$, hurrenez hurren) (**36D, F. irudia**).

Oro har, emaitzek agerian uzten dute A β -ek oligodendrozitoen desberdintzapena eta mielinaren egituraren aldatzen dutela *in vivo*.



36. irudia. A β -ekin injektatutako zebra-arrainak mielinizazioan aldaketak erakusten ditu. (A) Bizkarrezur-muinearen zeharkako sekzio eskematikoa, sabelaldea eta bizkarraldea ilustratzen dituena. (B)

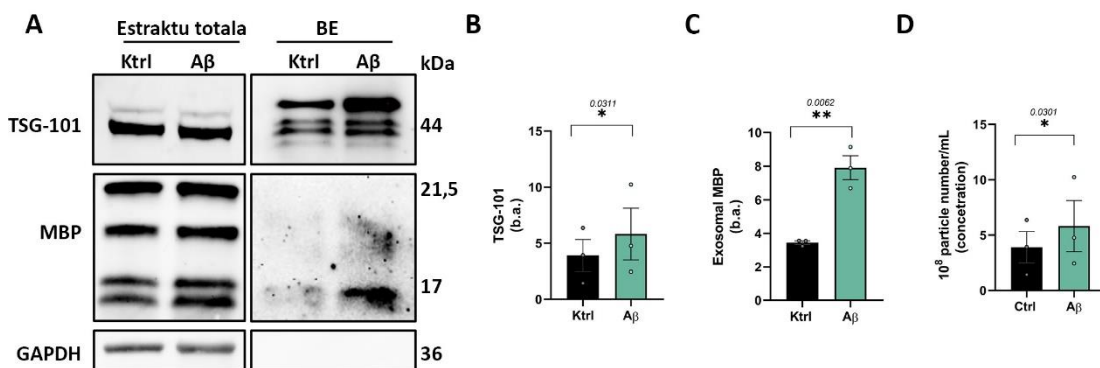
Kontrol eta A β o-ekin injektatutako 8 dpf larben sabelaldeko bizkarrezur-muinaren irudi elektroniko adierazgarriak. (C) Kontrol eta A β o-ekin injektatutako zebra-arrainen Mauthner zelulen g-ratioaren balioa erakusten duen histograma. (D) Kontrol eta A β o-ekin injektatutako 8 dpf larben bizkarraldeko bizkarrezur-muinaren irudi elektroniko adierazgarriak. (E, F) Zebra-arrainen sabelaldeko eta bizkarraldeko axoi mielinizatuen ehunekoa erakusten duten histogramak. Eskala-barra, 2 μ m. Datuek \pm S.E.M batez bestekoa adierazten dute, eta puntuek larba indibidualak adierazten dituzte, $p^ < 0,05$, kontrol zebra-arrainekin alderatuta. Esanahi estatistikoa bi isatseko Student t proba binakatu gabearen bidez lortu zen.*

IV. parte: Kontrol eta A β o-rekin tratatutako oligodendroitoetatik eratorritako besikula estrazelularren deskribapena eta efektua

4.1 A β ₁₋₄₂ oligomeroak besikula estrazelularren askapena estimulatzen du oligodendroitoetan

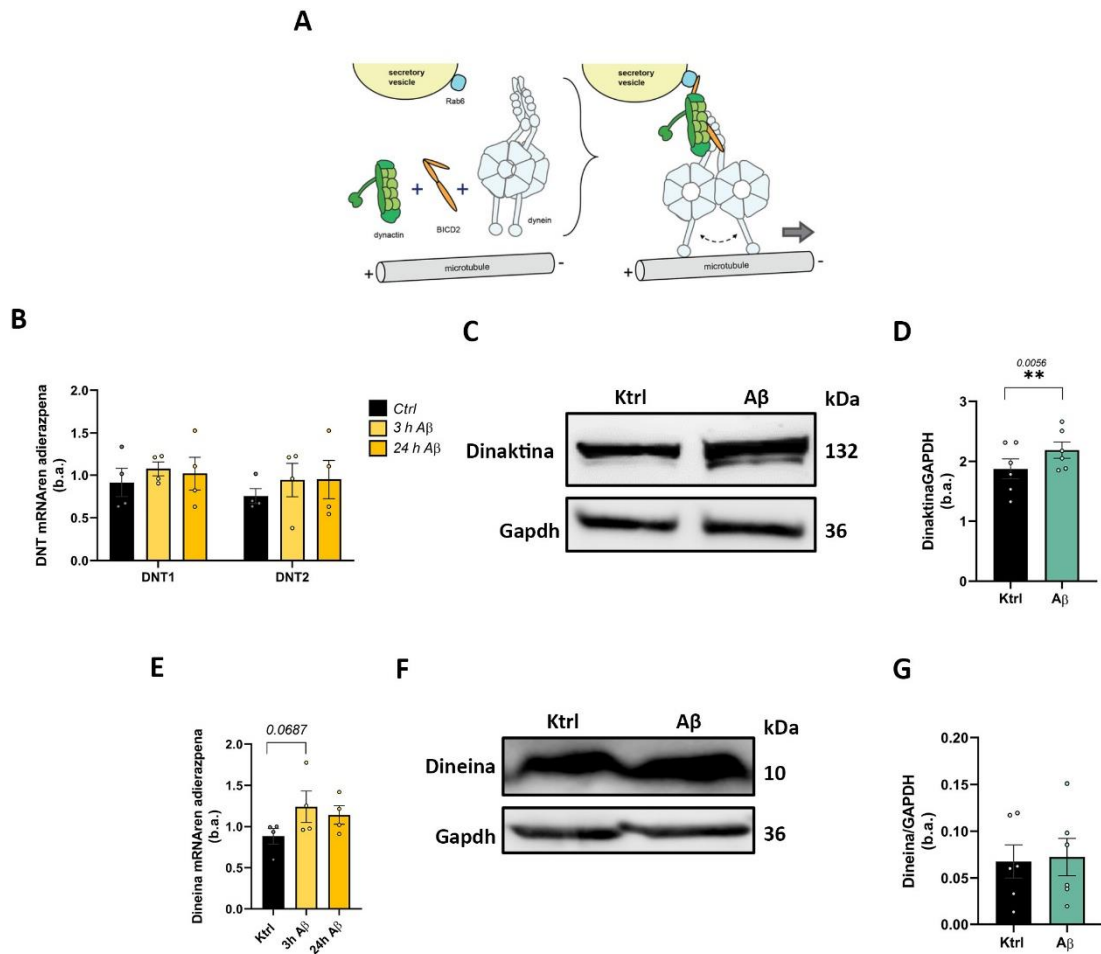
Aurreko ikerketek frogatu dute oligodendroitoek proteina ugari daramaten besikula estrazelular (BE) kopuru nabarmena jariatzen dutela, hala nola mielinarekin erlazionatutako proteinak (PLP, CNP, MOG eta MBP) eta RNAak (Krämer-Albers et al., 2007). Iradoki da BEek eginkizun nagusia betetzen dutela gaixotasun neurodegeneratiboen hedapenean eta progresioan (Howitt & Hill, 2016). RNA-seq-en gain-erregulatuta zegoen bideetako bat besikulen garraioarekin eta kokapenarekin lotuta zegoenez, geure buruari galdetu genion ea A β o-k bizkortu zezakeen BE jariaketa. Aukera hori probatzeko, kultibo primarioko oligodendroitoak A β 1 μ M-ekin tratatu ziren 24 orduz eta BEak ultrazentrifugazio bidez isolatu ziren. Western blot-ak erakutsi zuen TSG-101, BE markatzailearen mailak nabarmen igotzen zirela A β o-rekin tratatutako zeluletan (0,807 \pm 0,363 kontrola vs 1,953 \pm 0,28 A β o) **(37A, B. irudia)**. Gainera, mielinazko

proteinen western blot analisiak MBP maila handiagoak erakutsi zituen A β -rekin tratatutako zeluletatik eratorritako BEetan ($3,454\pm 0,1073$ vs $7,909\pm 0,7095$, hurrenez hurren) (**37A, C. irudia**). Era berean, nanopartikulen jarraipenaren analisiak (*nanoparticle tracking analysis*, NTA) A β -rekin tratatutako oligodendroitoek besikulen jariapena areagotzen zutela erakutsi zuen (**37D. irudia**).



37. irudia. A β_{1-42} oligomeroek MBP duten BEren askapena sustatzen dute oligodendroitoen. (A) MBP, GAPDH eta TSG-101rako (markatzaile exosomal) western blot-a estraktu totalen eta ultrazentrigugazioaren bidez isolatutako BEetan, 24 orduz A β o 1 μ M-rekin tratatutako eta kontrol oligodendroitoetan. (B) TSG-101 BE markatzailearen kuantifikazioa. (C) BEetako MBP mailen kuantifikazioa. (D) Kultibatutako oligodendroitoen medioetatik isolatutako BEen nanopartikulen jarraipenaren analisia. Datuek \pm S.E.M batez bestekoa adierazten dute, eta puntuek esperimendu independeteak adierazten dituzte, ** $p < 0,01$ kontrol zelulekin alderatuta. Esanahi estatistikoa bi isatsekot Student t proba binakatuaren bidez lortu zen.

Espazio estrazelularra jariatu aurretik, BEak proteina motorren bidez garraiatu behar dira, hala nola, dinaktina, kinesina eta dineinaren bidez. Hori horrela, geure buruari galdetu genion ea A β -k besikulen garraioa alda zezakeen. RT-qPCR eta western blot analisiak egin ziren dinaktina eta dineinarentzat. Ez genuen aldaketarik ikusi mRNA mailan (**38B, E. irudia**). Hala eta guztiz ere, proteina mailan, dinektinak gora egiten zuela ikusi genuen A β -ekin tratatutako oligodendroitoetan kontrolekin alderatuta ($1,873\pm 0,1654$ vs $2,187\pm 0,1361$) (**38C, D. irudia**). Oro har, emaitza hauek iradokitzen dute A β -ek BEen sekrezioa sustatzen duela espazio estrazelularra.



38. irudia. Aβ₁₋₄₂ oligomeroek dinaktina proteina motorea erregulatzten dute. (A) Dineina eta dinektinaren funtzionamenduaren eskema. (B) Dinaktina 1 (DNT1) eta 2-ren (DNT2) RT-qPCR analisia kontrol eta Aβo 3 eta 24 orduz tratatutako oligodendrozoitoetan. (C, D) Dinaktinaren adierazpen eta kuantifikazio erlatiboa, kontrol eta 24 orduz 1 μM-rekin tratatutako oligodendrozoitoetan. (E) Dineinaren RT-qPCR analisia kontrol eta Aβo 3 eta 24 orduz tratatutako oligodendrozoitoetan. (C, D) Dineinaren adierazpena eta kuantifikazio erlatiboa, kontrol eta 24 orduz 1 μM-rekin tratatutako oligodendrozoitoetan. Datuek ±S.E.M batez bestekoa adierazten dute, eta puntuek esperimendu independenteak adierazten dituzte, **p<0,01 kontrol-zelulekin alderatuta. Esanahi estatistikoa bi isatseko Student t proba binakatuaren eta norabide bakarreko ANOVA eta Dunnett post hoc probaren bidez lortu zen.

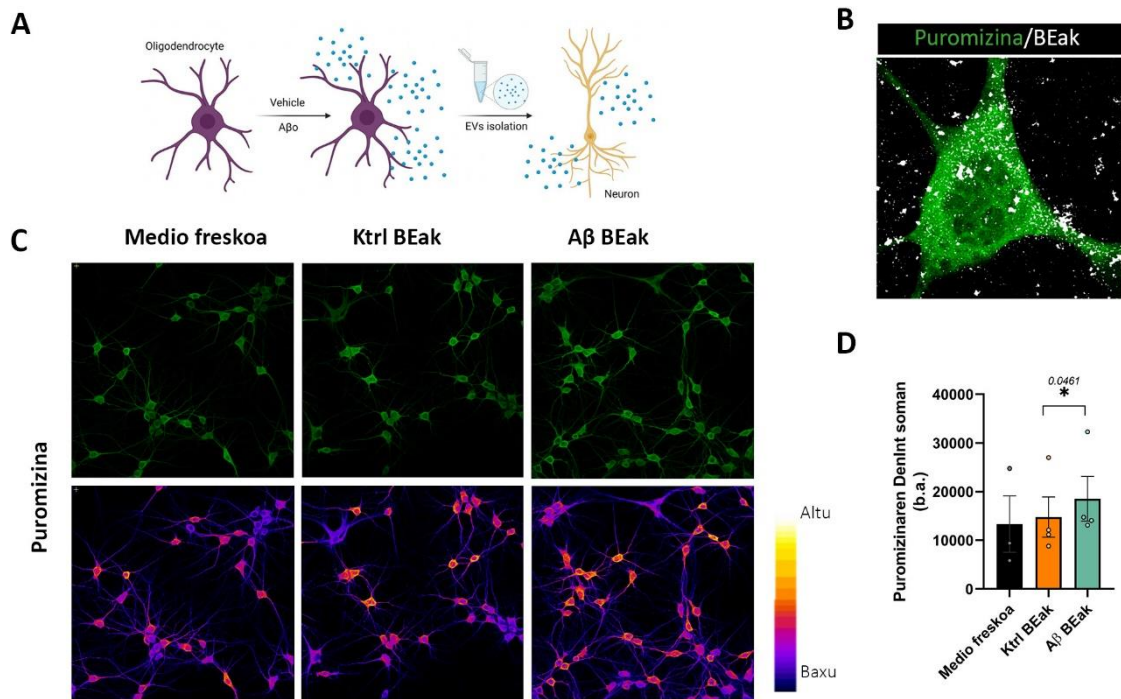
4.2 Oligodendrozoiten BEEen eragina neuronetan

Hasieran, BEak molekula zaharkituak baztertzeko erabiltzen ziren besikulatzat hartu ziren, baina gero eta froga gehiagok iradokitzen dute BEek funtzio garrantzitsuak betetzen dituztela zelulen arteko komunikazioan. BEEen jarioa Aβo-ekin handitzen zela

ikusi genuenez, horiek neuronengan eraginik izan zezaketen galdetu genion geure buruari.

Deskribatu da oligodendrozoetarik eratorritako BEek neurobabesa eman, homeostasi neuronala hobetu eta garraioa eta mantentze axonala errazten dutela (Frühbeis et al., 2020; Howitt & Hill, 2016). Beraz, gure buruari galdetu genion ea baldintza patologikoetan oligodendrozoetarik eratorritako BEk eraginik izan ote zezaketen funtzio neuronaletan. Aldez aurretik genituen datuen arabera, A β o-rekin tratatutako astrozitoetarik eratorritako BErek neuronen neuritetako itzulpen globala areagotzen zutela ikusi genuen (Gamarrá et al., 2021) . Hortaz, ondoren, oligodendrozoetarik eratorritako itzulpenari ere eragin ziezaioketen ikertu nahi genuen. Horretarako, neurona hipokanpal primarioak (10 EIV) medio freskoekin, kontrol- edo A β o-tratatutako oligodendrozoetarik eratorritako BEekin 24 orduz tratatu ziren. Fixatu aurretik, zelulak puromizinarekin tratatu ziren 10 minutuz **(39A. irudia)**.

Lehenik eta behin, neuronak oligodendrozoetarik eratorritako BEak harrapatzeko gai ote ziren egiaztatu nahi genuen. Horretarako, isolatutako BEak koloratzaile batekin tindatu ziren, eta neuronen barruan eta kanpoan ikusi genituen soman eta prozesuetan **(39B. irudia)**. Jarraian, immunofluoreszentzia-analisiak gauzatu ziren, eta A β o-ekin tratatutako oligodendrozoetarik isolatutako BErek itzulpena handitzen zutela ikusi genuen kontrolekin alderatuta, puromizinarekin intentsitatea neuronan soman handitzen baitzen (medio freskoa 13.339 ± 5.797 ; kontrola 14.760 ± 4.135 ; A β o 18.550 ± 4.596) **(39C, D irudia)**.

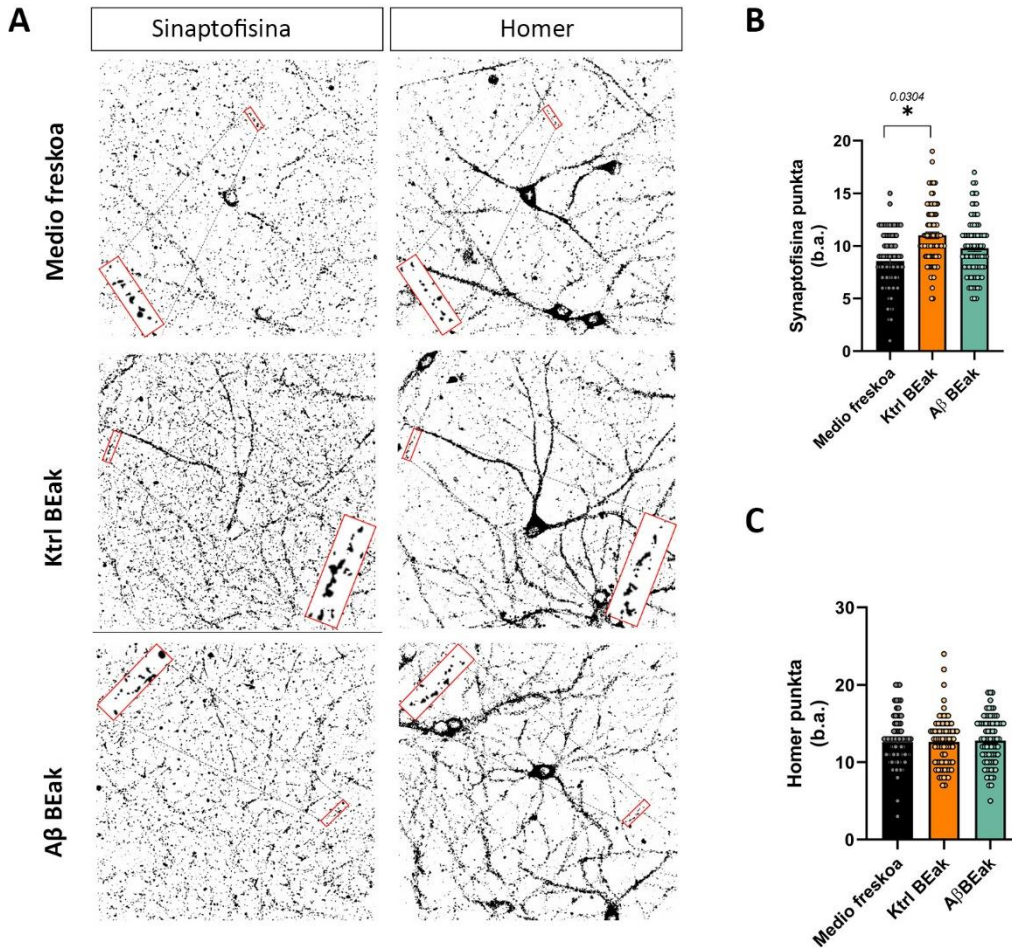


39. irudia. Aβ0-tratatutako oligodendrozytoetaik eratorritako BEak proteinen sintesia handitzen dute.

(A) Planteamendu esperimentalak ilustratzen duen diagrama. (B) Neuronen barruan puromizina (berdea) eta BE etiketatua (zuria) erakusten duten mikrofotografia adierazgarria. (C) Neurona hipokanpaletan puromizina (berdea eta pseudokolorea) erakusten duten mikrofotografia adierazgarriak, medio freskoarekin, Ktrl edo Aβ0-tratatutako Ol eratorritako BEekin tratatuak. (D) Neuronen soman puromizina dentsitate integratuaren analisia. Datuek batez besteko S.E.M. adierazten dute, eta puntuak esperimentu independenteak adierazten dituzte, ** $p < 0,05$. Esanahi estatistikoa norabide bakarreko ANOVA eta Tukey post-hoc probaren bidez lortu zen.

Gero eta frogak gehiago egiaztatzen dute BEak baldintza fisiologiko eta patologikoetan jardura sinapikoaren funtsezko modulatuzaile gisa aritzen direla. Beraz, ostean, sinapsien kopurua handitu zezaketen frogatu nahi genuen. Aukera hori frogatzeko, neurona hipokanpal primarioetan (21 EIV) markatzaile pre-sinaptikoak eta postsinaptikoak kuantifikatu ziren. Ikusi genuen sinaptofisina proteina presinaptikoaren puntuak areagotuta zeudela kontrol-BEkin tratatutako neuritetan, aldiz beste baldintzetan ez zen aldaketarik ikusi (medio freskoa $8,575 \pm 0,3205$; kontrola $11,01 \pm 0,3083$; Aβ0 $9,808 \pm 0,3172$) (40A, B. irudia). Ez zen aldaketarik ikusi homer markatzaile postsinaptikoan baldintza bakar batean ere (40A, C. irudia). Oro har, datuek iradokitzen dute oligodendrozytoetatik eratorritako BEek sinapsiei eragiten dietela

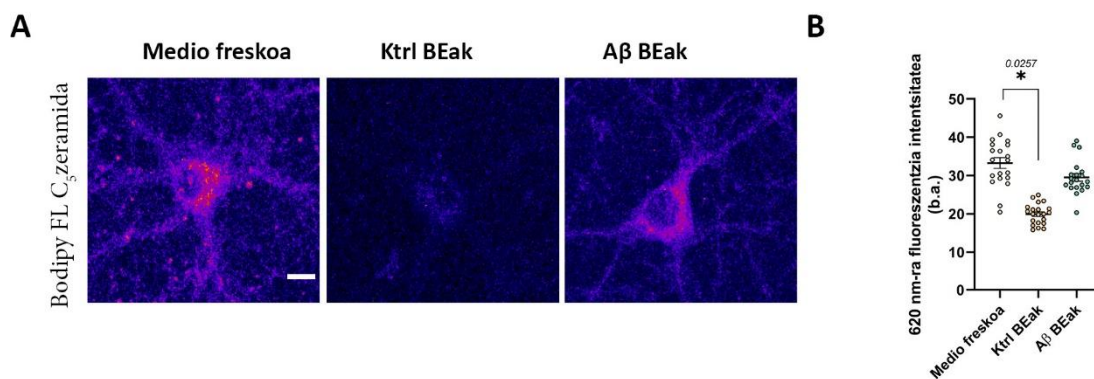
kontroleko oligodendroitoek askatzen dituztenean, baina ez A β -rekin tratatutako oligodendroitoek askatzen dituztenean.



40. irudia. Kontrol-oligodendroitoetatik eratorritako BErek sinaptofisinaren adierazpena areagotzen dute neuronetan. (A) Sinaptofisina eta homer markatzaile sinaptikoen mikrografia adierazgarriak neurona hipokanpaletan, medio freskoarekin, Ktrl edo A β -ekin tratatutako Oletatik isolatutako BEekin tratatuak. **(B)** Neuritetako sinaptofisina-puntuen kuantifikazioa adierazten duen histograma. **(C)** Neuritetan homer punkta kuantifikatzea adierazten duen histograma. Datuek batez besteko S.E.M. adierazten dute, eta puntuek zelula indibidualak edo esperimendu independenteak adierazten dituzte, * $p < 0.05$. Esanahi estatistikoa bide bakarreko Nested ANOVA Tukey post-hoc probaren bidez lortu zen.

A β , proteina aitzindari amiloidearen (APP) prozesamendu proteolitiko intrazelularretik sortzen da. Duela gutxi egindako ikerketek agerian utzi dute, Golgiren-aparatua eta bide sekretorioa direla APP prozesatzeko eta A β ekoiztu eta jariatzeko toki nagusiak. Horrela,

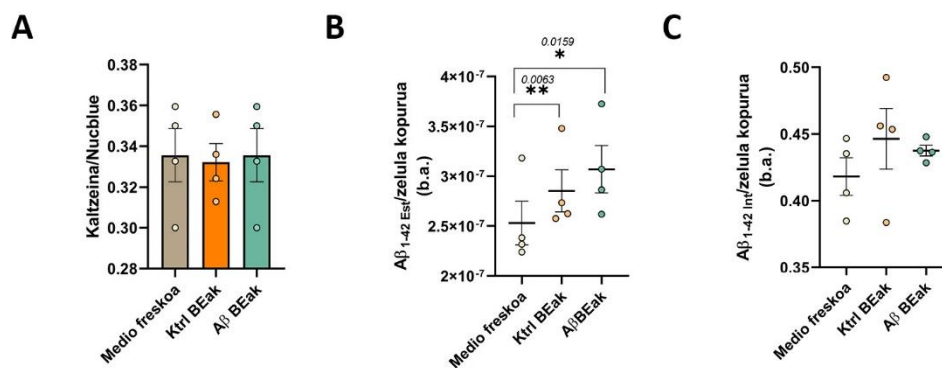
jarraian egiaztatu nahi izan genuen oligodendroitoetik eratorritako BEek exozitosis bultzatzen neuronetan. Horretarako, BODIPY FL C5-zeramida gehitu genien neurona kultiboan. Kontzentrazio handietan, BODIPY FL C5-zeramidak exzimerok eratzen ditu, 620 nm-ra emitituz, baina fluoreszentsia berdea du (515 nm) kontzentrazio baxuagoetan dagoenean (Pagano, Martin, Kang eta Haugland, 1991). Ezaugarri bakar horrek etiketatze gorri bizia eragiten du trans-Golgi sarean eta Golgi saretik eratorritako besikuletan. Mintz plasmatikorekin bat egitean, BODIPY etiketa berehala desagitzen da mintzean, eta, horren ondorioz, exzimerok banandu egiten dira. Ondorioz, 620 nm-ko fluoreszentsia jaisten da. Gure emaitzetan, fluoreszentsia gorria murrizten zela ikusi genuen kontroleko oligodendroitoetik eratorritako BEekin tratatutako neuronetan, exozitosis areagotzen dutela iradokiz; aldiz, A β -ekin tratatutako oligodendroitoetik eratorritako BEekin edo medio freskoarekin tratatutako neuronek ez zuten inolako efekturik erakutsi (medio freskoa $37,16 \pm 2,75$; kontrol BEak $19,63 \pm 1,715$; A β BEak $29,51 \pm 2,434$) (**41A, B. irudia**).



41. irudia. Ktrl oligodendroitoetik eratorritako BEak exozitosis sustatzen dute neuronetan. (A), Neurona hipokanpaletan 620 nm-ko Bodipy (pseudokolora) seinalea erakusten duten mikrofografia adierazgarriak, medio freskoarekin, Ktrl edo A β -ekin tratatutako OLetatik isolatutako BEekin tratatuak. **(B)** Neuronen somako fluoreszentsia-intentsitatearen analisisa. Datuek batezbestekoak adierazten dituzte, eta puntuek banakako esperimenduak adierazten dituzte. Eskala-barra, 10 μ m. Datuek batez besteko S.E.M. adierazten dute, eta puntuek zelula indibidualak adierazten dituzte, * $p < 0.05$. Esanahi estatistikoa bide bakarreko Nested ANOVA Tukey post-hoc probaren bidez lortu zen.

A β exosomala Rajendran eta kolaboradoeek (Rajendran et al., 2006) reportatu zuten lehen aldiz. Haiek, Suediako APP mutantea adierazten duten N2a zelulek A β jariatzen

zutela ikusi zuten. Oligodendrozitoen BEek Golgiren aparatutik eratorritako besikulak modulatu dituztenez, eta aparatu horrek, aldi berean, BEren ekoizpena erregulatzen duenez, gure buruari galdetu genion ea BEek exozitosis alda zezaketen. Horretarako, A β etengabe sortzen duen N2a/APP^{SWE} lerro zelularra erabili genuen eta medio freskoarekin, kontrol-edo A β o-rekin tratatutako oligodendrozitotatik isolatutako BEekin tratatu ziren 24 orduz. Lehenengo, BEak neuronentzat toxikoak ote ziren aztertu genuen. Horretarako, bideragarritasun-saiakuntza bat egin zen, eta ez zen alderik ikusi aztertutako hiru baldintza esperimentalen artean (**42A. irudia**). Ondoren, ELISA bidez, A β ₁₋₄₂ maila estrazelularrak neurtu ziren. Ikus zitekeenez, BEekin tratatutako neuronon medioan nabarmen handitzen zen A β ₁₋₄₂ maila medio freskoekin tratatutakoekin alderatuta (medio freskoa $2,30E-07 \pm 0,2194E-07$, kontrol BEak $2,853E-07 \pm 0,2113E-07$, A β o BEak $3,070E-07 \pm 0,2372E-07$) (**42B. irudia**). Kontrol eta A β o-tik eratorritako BEak alderatzean, goranzko joera ikusi genuen azkenengo honetan. Halaber, A β ₁₋₄₂ intrazelularra neurtzerakoan, ez genuen desberdintasun esanguratsurik aurkitu hiru talde esperimentalen artean (**42C. irudia**).



42. irudia. Oligodendrozitoen BEek A β ₁₋₄₂ sekrezioa handitzen dute N2a/APP^{SWE} neuronetan. (A) Zelulen bideragarritasunaren kuantifikazioa hiru baldintzetan; medio freskoarekin, ktrl edo A β o-ekin tratatutako OLetatik isolatutako BEekin. **(B)** Sentikortasun handiko ELISaren bidez A β ₁₋₄₂ estrazelularren kuantifikazioa. **(C)** Sentikortasun handiko ELISaren bidez A β ₁₋₄₂ intrazelularren kuantifikazioa. Datuek batez besteko \pm S.E.M. adierazten dute, eta puntuek esperimentu independenteak adierazten dituzte, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Esanahi estatistikoa norabide bakarreko ANOVA eta, Tukey post-hoc probaren bidez lortu zen.

EZTABAIDA

Gero eta proba gehiagok erakusten dute substantzia zuriaren endekapenak Alzheimer gaixotasunean duen garrantzia. Zenbait azterlanek adierazten dute mielinarene eta oligodendrozitoen aberrazioak lotuta daudela AG duten pazienteen garuneko A β peptidoaren mailen igoera bereizgarriarekin (Dean et al., 2017; Roher et al., 2002). AGn, oligodendrozitoen alterazioak narriadura neuronal baina lehen gertatzen dira, eta oligodendrozitoen galerak defizit kognitiboak eragin ditzakete (Behrendt et al., 2013; Zhan et al., 2014; Zhan et al., 2015). Gainera, duela gutxi amiloidosia duten sagu helduen garunean mielina lodiagoa izateaz gain, oligodendrogenesia ere handiagoa dela ikusi da. (Ferreira et al., 2020). Hala ere, OLak disfuntzional bihurtzeko eta hauek AGren patologia eragiteko mekanismoak ezezagunak dira. Tesi honetan, A β oligomeroek oligodendrozitoen biologian hainbat aspektu aldatzen dituztela deskribatu dugu.

1. A β -ekin tratatutako oligodendrozitoek energia eta kolesterol metabolismoan alterazioak erakusten dituzte

Azken urteotan analisi transkriptomiko ugari egin dira AG duten pazienteetan (Grubman et al., 2019; Mathys et al., 2019; Morabito et al., 2021; Zhou et al., 2020). Guztietan, oligodendrozitoek hainbat funtzioetan alterazioak erakutsi dituzte, hala nola mielinizazioan, jardura neuronalaren detekzioan eta sistema immunearen funtzioan (Murdock & Tsai, 2023). Gainera, analisi transkriptomiko espazialek (Chen et al., 2020) frogatu dute, oligodendrozitoek erantzun transkriptomiko desberdina dutela plakaren inguruan. Horrek iradokitzen du, A β peptido disolbagarriak oligodendrozitoen erantzuna aldatzen duela gaixotasunean. Analisi horiekin bat eginez, 24 orduko A β oligomeroen tratamenduak oligodendrozitoen transkriptoma aldatzen duela ikusi dugu.

Transkriptoma analisiak agerian utzi du gain-erregulatutako bide garrantzitsu asko mielinizazioarekin lotuta daudela, adibidez metabolismoa eta kolesterolaren biosintesia, hexosaren metabolismoa eta karbonoaren metabolismoa. Mielina, lipidoek osatzen dute batez ere (kolesterola, fosfolipidoak eta glikolipidoak). Kolesterola mielina-zorroetako lipido ugarienetako bat da, eta % 26 osatzen du. Azpimarratzekoa da AG

esporadikoarekin lotutako arrisku-gene nagusiak, *APOE*, *TREM2*, *APOJ*, *PICALM*, *ABCA1* eta *ABCA7* zuzenean inplikaturik daudela lipidoen trafikuan edo metabolismoan. Era berean, kolesterolaren metabolismoaren funtsezko erregulatzaile bat, *SREBP2*, ere dago genetikoki lotuta AG garatzeko arriskuarekin (Yin, 2022). Duela gutxi egindako azterlan baten arabera, ApoE-k, AGren arriskurik handienak, mielinizazioa hondatzen duela ikusi da kolesterolaren metabolismoa deserregulatuz oligodendrozoetan (Blanchard et al., 2022). Gainera, garuneko kolesterolaren kontrolik gabeko sintesia AGren okerragotzearekin ere lotzen da (Barbero-Camps, Fernández, Martínez, Fernández-Checa eta Colell, 2013). Bestalde, hexosak glikano-iturriak dira, eta nerbio-sistemaren garapenean eta funtzioan bereziki garrantzitsuak diren itzulpen osteko aldaketetan inplikaturik daude. Gainera, MOG eta MAG proteinak, mielina-zorroaren proteina garrantzitsuak direnak, glikosilatuta daude. Horri dagokionez, AG duten pazienteek glikosilazio profil anormala dutela ikusi da (Haukedal & Freude, 2021).

Ildo beretik, A β -ekin tratatutako oligodendrozoetan gain-erregulatutako beste bide bat energia-metabolismoarekin lotuta dago. AG pazienteen garunen ezaugarri nagusiak honako hauek dira: glukosaren hipometabolismoa, disfuntzio mitokondrialak, estres oxidatiboa eta dishomeostasi lipidikoa (Yin, 2022). Izan ere, lipidoekin lotutako anomaliak, Alois Alzheimerrek 1907an identifikatutako hasierako aurkikuntza neuropatologikoen artean daude (Alzheimer et al., 1995). OL garuneko homeostasi lipidikoa erregulatzeko funtsezkoa da, eta frogatu da glukolisia nahiago dutela fosforilazio oxidatiboa baino, energia-eskaera handiak dituzten arren (Rone et al., 2016). Disfuntzio mitokondrialaren ondorioz gertatzen den glukolisiaren alterazioak AGri laguntzen diola uste da (Zhang et al., 2020). Zentzu horretan, badirudi A β -k gantz-azidoen β -oxidazioa errazten duela eta aldiz, fosforilazio oxidatiboa eta elektroien garraio-katea azpi-erregulatzen dituela. Datu horiek erakusten dute oligodendrozoek, metabolismoa aldatu behar dutela mitokondria-disfuntzioa dela eta. Izan ere, duela gutxiko proben arabera, disfuntzio mitokondrialak gantz-azidoen β -oxidazioa bultzatzen duela ikusi da neuronetan (Audano et al., 2019). *In vivo* eta *in vitro* emaitzak alderatzean, emaitza kontrajarriak ikusi ditugu. Izan ere, *in vitro* A β -k fosforilazio oxidatiboa azpi-erregulatzen duela ikusi dugu, 3xTg-AG sagan gain-erregulatzen den bitartean. Emaitza

kontrajarri horiek oligodendroziotoetan A β oligomeroen eraginpean egondako denboragatik izan daitezke, *in vivo* kronikoa delako eta *in vitro* aldiz, akutuagoa.

Oro har, emaitza horiek iradokitzen dute mielinizazio-prozesua A β ekin bultzatzen dela. Aldi berean, badirudi A β ek mitokondriak aldatzen dituela, ziurrenik disfuntzionalak bihurtaraziz. Beraz, hurrengo hipotesia planteatzea posiblea da: homeostasi ezarri berriari aurre egiteko energia-eskaera handiagoa behar duten zelulak (energia-eskaera berriak dituztenak) gantz-azidoen β -oxidaziora aldatzen dira. Energia-metabolismoaren aldaketa horiek mielinizazioan eta axoien euskarri metabolikoan eragina izan dezakete.

2. A β ekin tratatutako oligodendroziotoek hnRNP A2 eta RNAREN metabolismoan aldaketak erakusten dituzte

Alteratuta dagoen beste bidezidor nagusi bat mRNAren metabolismoarekin erlazionatuta dago eta zehazki, *in vitro* eta *in vivo* oligodendroziotoetan gain-erregulatuta dagoela ikusi dugu. RNArekin lotzen diren proteinek RNArekin elkarrengaitzen dute RBP izeneko konplexuak sortuz. Hauek, RNAren metabolismoko hainbat prozesuen funtzioak erregulatzen dituzte, hala nola *splicing*-a, transkripzioa eta itzulpenaren erregulazioa. AGn, RNAren prozesamenduaren alterazioak, RBPn isoformen adierazpenean, kokapenean eta ugaritasun erlatiboan izandako aldaketen ondorioz sortzen dira, eta/edo erregulatzen dituzten geneen sekuentzian edo adierazpenean izandako mutazioen ondorioz (Rybak-Wolf & Plass, 2021). AG duten garuneko neuronetan RNA prozesatzeko alterazioak deskribatu berri dira (Rybak-Wolf & Plass, 2021). RBP ugarienen artean, hnRNP A/B erribonukleoproteina nuklear heterogeneoen familiako kideak daude, hnRNP A1 eta A2/B1. HnRNP A2k paper zentrala betetzen du RNAren aurreko prozesamenduan eta mielinaren proteina garrantzitsuen garraioan eta itzulpenean, hala nola MBP eta MOBP. AG duten pazienteen kasuan, hnRNP A2 azpi-erregulatuta dago kortex entorrinalean (Berson et al., 2012), baina gain-erregulatuta dago hipokanpoan (Mizukami et al., 2005), AGan eskualdeko erantzun espezifikoak iradokiz. Are gehiago, hnRNP A2ren deplezioaren ondorioz, β -sekretasaren

(BACE1) isoforma aktiboago bat sortzen da, A β plaken metaketa sustatzen duena (Kolisnyk et al., 2017).

Gure azterlanean oligodendroitoek hnRNP A2rako immunoerreaktibitate handia erakusten zutela ikusi genuen kontrol eta AG pazienteen hipokanpoko sekzioetan. Braak-en estadioak alderatzean, hnRNP A2 maila handiagoak ikusi genituen AG fase-goiztiarreko kasuetan eta aldiz, AG larriko pazienteen mailak kontrol-mailetara jaisten ziren. Halaber, oligodendroitoen hnRNP A2 mailak 6 eta 18 hilabeteko 3xTg-AG saguen hipokanpoan, bai eta A β o-injektatutako saguen hipokanpoan ere neurtu genituen. HnRNP A2 adierazpen hipokanpala zehatz-mehatz aztertu zen, eta CA3 eta biraketa horzdunetan soilik igotzen ziren mailak. Datu hauen arabera, oligodendroitoetan A β o mendeko A2ren igoera iragankorra izan daiteke, ziurrenik konpentsazio-mekanismoen ondorioz.

hnRNP A2k funtzio ugari dituela uste den arren, NSZn duen papera ez da ondo ezagutzen. AGn hnRNPA2 proteinaren funtzio zitoplasmatikoak ez daude ezaugarrituta, baina hnRNP A2k erregulatutako transkriptomaren deskripzioa eta funtzioaren ulermena beharrezkoak dira AGn duen eginkizuna ulertzeko. Lan honetan, frogatu dugu hnRNP A2 A β o-ekin tratatutako oligodendroitoen kultibo primarioetan handitzen dela. Gainera, bere interaktoma A β o-rekin aldatzen dela deskribatuko dugu. Baldintza normaletan, hnRNP A2k RNAren biologiarekin lotutako geneak erregulatzen zituela ikusi genuen, RNAren metabolismoan, prozesamenduan eta *splicing*-ean, erribonukleoproteinen biogenesian eta itzulpenaren erregulazioan inplikaturik daudenak esaterako. Hala eta guztiz ere, A β o-ek mRNAen erdia baino gehiagoren interakzioa ahuldu zuen. A2 eta hauek erregulatzen dituen RNAen loturen murrizteak isoforma proteikoak sortzea edo atxikitako sekuentzia intronikoak dituen mRNAren *nonsense* bidezko deskonposizioa eragiten du (Thibault et al., 2021). Beraz, posiblea da pentsatzea hnRNP A2ren interakzioetan gertatzen diren aldaketak transkriptoman eta proteoma zelularrean eragin esanguratsuak izan ditzaketela.

HnRNP A2k itzulpena erregulatzen du, RNArri lotzeko jardueren bidez. Jakina da hnRNP A2k, AU-n (adenina eta urazilo) aberatsak diren elementuekin (AREk) bat egiten duela itzulpena erreprimitzeko edo mRNAren degradazioa sustatzeko. Gainera, A2 erribosoman sartzeko barneko gunearen (IRES) faktore transaktibatzaile gisa ezagutzen

da, cap-independentea den itzulpen mota errazten duena (Thibault et al., 2021). Beraz, A2-RNA lotura ahulago batek mRNAren itzulpena eta prozesamendua aldatu dezakeela pentsatzea posiblea da, eta aukera hori bat egiten du gure RNA-seq-eko emaitzekin. Beste aukera intrigagarri bat da hnRNP A2 beste RBP batzuekin bat egitea, RNAekin elkarreragiteko modua aldatuz.

loi metalikoen arteko loturan parte hartzen duten proteinak kodetzen dituzten RNAek interakzio handiagoa dute A β -ekin tratatutako oligodendrozoetan. Ioi metalikoen homeostasia funtsezkoa da garuneko funtzio normalak mantentzeko. AG duten pazienteen kasuan, burmuineko ioi metalikoen oreka dinamikoan gertatzen diren aldaketek lotura estua dute A β eta tau proteinen metaketarekin. Gainera, frogatu da hnRNP A2-k kobreak homeostasia modulatu duela (McCann, Hasan, Padilla-Benavides, Roy, & Lutsenko, 2022). Hori dela eta, baliteke A β -k homeostasi ionikoa aldatzen ari izatea oligodendrozoetan hnRNP A2 bidez.

Aipatzekoa da A2ren diana ugarien artean bere mRNA propioa dagoela (McGlinchy et al., 2010). Dagoeneko deskribatu da hnRNP A2ren gainadierazpenak *Hnrnpa2* azpierregrulatzen duela, NMDagatik. Mekanismoa hau geneen adierazpen normala erregulatzen duela, NMDn defizitak eragiten dituela deskribatu da, burmuinean RNAen prozesamendua kaltetuz eta ondorioz, neurona-galera eraginez (Zuniga et al., 2022). Gure ikerketan, A β -n esposiziopean zeuden oligodendrozoek A2ren proteina- eta mRNA -maila handiagoak zituztela ikusi genuen. Halaber, hnRNP A2ren eta bere mRNAren arteko interakzioa ere ahultzen zela aztertu genuen, autoerregulazioaren galtzea iradokiz.

Hainbat probek erakusten dute burmuinetik eratorritako faktore neurotrofikoak (BDNF) hnRNP A2ren adierazpena gain-erregulatzen duela neuronetan (Jung et al., 2020). Oligodendrozoetan, BDNFk Fyn aktibatzen du mielinizazioa sustatzeko (Peckham et al., 2016), eta, aldi berean, A β -k Fyn aktibatzen du oligodendrozoen desberdintzapena sustatzeko (Quintela-López et al., 2019). Beraz, nahiz eta oligodendrozoetan ez dagoen argi nola A β -k handitzen duen hnRNP A2-ren adierazpena, hainbat ekintza-modu (hipotesi) aurkez ditzakegu: lehenik eta behin, A β -k *Hnrnpa2* RNAren transkripzioa aktibatzen du. A β eta ITG β 1 hartzailearen arteko elkarreraginak Fyn kinasak aktibatzen du, transkripzio-faktoreak aktibatzen dituzten seinaleztapen-bide batzuk abiaraziz

(Peckham et al., 2016). Bigarrenik, A β -k MBParen sintesia sustatzen duenez, eta denbora-korrelazio bat dagoenez A2 granulu zitoplasmatikoen gorakada eta *Mbp*-ren mRNA maila gorenaren artean (Maggipinto et al., 2004), litekeena da pentsatzea oligodendroitoek gain-erregulatzen dutela hnRNP A2, *Mbp*-ren mRNA igoserari aurre egiteko. Hirugarrenik, litekeena da A β -k NMDri nolabait kalte egitea, mRNAren degradazioa murriztuz eta egonkortasuna areagotuz.

Oro har, datu hauek adierazten dute hnRNP A2ren gain-erregulazioa izan daitekela RNAren metabolismoaren narriadura eragin dezakeena.

3. A β oligomeroek MBP eta MOBPren itzulpen lokala sustatzen dute RNA granuluen dinamika aldatuz

Mielinaren konpartimentuetako proteinen sintesi lokala espazioan eta denboran erregulatuta dago estimulazio neuronalari erantzunez, eta mielina berritzeko erreserba bat eskaintzen du. *Mbp* eta *Mobp* mRNAen kokapena, neurri handi batean, A2-rekin duen loturaren eta RNAren garraio-granuluen eraketaren mende dago. Lehenago ere frogatu genuen A β -en kontzentrazio baxuek MBP sintesia sustatzen zutela (Quintela-López et al., 2019). Jakina da Fyn tirosina kinasak *Mbp* eta *Mobp*-en transkripzioa eta tokiko itzulpena sustatzen dituela oligodendroitoen heltze-prozesua suspertuz (Krämer-Albers & White, 2011; Schäfer, Müller, Luhmann, & White, 2016; Umemori et al., 1999). Gainera, *in vitro* eta animalia-ereduetan, deskribatu da A β -ren diana bat, hain zuzen ere, Fyn dela (Boehm, 2013; Quintela-López et al., 2019). Fyn-ek hnRNP A2 eta hnRNP F granuluaren proteinak fosforilatzen ditu, *Mbp* eta *Mobp*-en itzulpena estimulatuz (Schafer, Muller, Luhmann, & White, 2016; White et al., 2008; White et al., 2012).

Azterlan honetan, A β -k *Mbp* eta *Mobp*-en itzulpen lokala sustatzen duela iradokitzen duen lehen ebidentzia aurkezten dugu, mRNA-granuluen kopurua eta dinamika aldatuz, hnRNP A2 erregulazioaren bidez. Aurretiko azterketek iradokitzen dute hnRNP A2 maila globala handitu egiten dela oligodendroitoetan, MBP zelula positiboetan bereizten diren heinean, eta handitze hori nagusiki granulu gisa agertzen den hnRNP A2ren *pool* zitoplasmatikoan islatzen dela (Maggipinto et al., 2004). Immunozitokimikako teknikak

erabiliz, A β o tratamenduaren ondoren hnRNP A2 eta F duten granuluen kopurua nabarmen handitzen zela ikusi genuen, baita granulu aktiboen (hnRNP K dutenak) kopurua ere. Iradoki izan da hnRNP E1 hnRNP K bidez trukatzea aurretiazko baldintza dela mRNA mielina-zorroan kokatzeko, edo itzulpena hasteko behar diren proteina-faktoreak biltzeko (Torvund-Jensen et al., 2014). Beraz, hnRNP K duten granulu gehiago izateak iradokiko luke granulu gehiago hurbiltzen ari direla azken helmugara, eta, beraz, itzultzen. Gainera, immunoprezipitazio-saiakuntzen bidez, A β o-ekin tratatutako zelulek, hnRNP A2 eta *Mbp/Mobp* mRNAn arteko elkarreragina handiagoa eta hnRNP A2ren fosforilazio maila handiagoak erakutsi zituzten.

Sintetizatu berri diren MBP eta MOBP proteinak zuzenean bistaratzeko, berriki deskribatutako teknika bat erabili genuen, Puro-PLA izenekoa (tom Dieck et al., 2015). Aipatu behar da, nahiz eta bi proteinak oligodendozitoen prozesu periferikoetan bertan produzitzen diren A β o-ri erantzunez, *Mbp* eta *Mobp*-ren itzulpen-igoeraren patroia desberdina dela. *Mbp*-ren tokiko itzulpena biziagoa da bai prozesu handietan bai meheetan, eta *Mobp*-ren sintesia, berriz, oligodendrozitoen prozesu handietan gertatzen da nagusiki. Hau bat dator aurrez deskribatutako MBP eta MOBPren sintesi diferentzialaren ereduarekin (Montague et al., 1998). Bitxia bada ere, Fyn kinasak batez ere mintz-zorroak zeharkatzen dituzten prozesu handienetan eta zain txikienetan hauteman daiteke (Osterhout, Wolven, Wolf, Resh, & Chao, 1999), eta horrek pentsarazten du hauek direla *Mbp* eta *Mobp*-en itzulpen-gune primarioak. Gure datuek agerian utzi dute A β o-ek espezifikoki igotzen dituztela MBP eta MOBP adierazpen-mailak, baina ez beste proteina batzuenak.

Oro har, datu hauek adierazten dute A β o-k aldatu egiten duela proteinen sintesi lokala, RNA granuluen konposizioa eta dinamika aldatuz, Fyn-en bidez. Zehazki, A β oligomeroek aktibatutako Fyn kinasak *Mbp* eta *Mobp*-en itzulpen lokala eragingo luke hnRNP A2ren fosforilazioaren bidez, mRNA-granuluak dauden konpartimentu guztietan. Era berean, *Hnrnpa2*, *Mpb* eta *Mobp*-en transkripzioa ere eragingo luke.

4. MBP and MOBP gain-erregulatuta daude 3xTg-AG sagu helduan

Alzheimer gaixotasuna faktore anitzeko asaldura neurodegeneratiboa da, eta proteina-diana batzuk ditu, etiologia areagotzen dutenak. AG imitatzeko eta haren ezaugarri patologikoak hobeto ulertzeko hainbat animalia-eredu erabili dira. Hala ere, horietako bat ez da gai izan ezaugarri guztiak biltzeko. 3xTg-AG sagua aurrerapen handia izan da AGren ikerketan, gizakien AG gogorazten duten patroia eta garun-eskualdeetan plaka amiloideak eta haril neurofibrilarrak garatzen baitituzte. Era berean, eredu honek A β -ren metaketa estrazelularrak garatzen ditu harilak eratu aurretik, eta hori bat dator kaskada amiloidearen hipotesiarekin.

Gure aurreko datuek erakutsi zuten MBPk gora egiten zuela gorputz kailukaran, eta hipokanpoan, 12 eta 18 hilabeteko 3xTg-AG saguetan, axoietan kalte nabarmenik gabe (Quintela-López, 2018). Lan honetan, oligodendrozito helduen (MOG, MBP eta MOBP) markatzaileen adierazpena aztertu genuen, 6 hilabeteko 3xTg-AD saguen hipokanpoan, AGn kaltetutako lehenengo eremuetako bat baita. Hemen, MBP eta MOBP adierazpenen gorakada nabarmena ikusi genuen, gure *in vitro* aurkikuntzekin bat datozenak. Era berean, azterlan batek erakutsi zuen MBPren gain-erregulazioa 2 hilabeteko APP/PS1 sagu transgenikoen hipokanpoan (Wu et al., 2017). Gainera, ikusi genuen MBPren adierazpena handitu egin zelan baita ere 6 hilabeteko 3xTg-AG saguen mielinan aberastutako frakzioetan. Bitxia bada ere, MBPren ekoizpenak modulatu egiten du SZren plastikotasuna, mielina-zorroen lodiera erregulatuz ikaskuntzak eragindako jardura neuronalari erantzuteko (Martini eta Schachner, 1997). Gure datuek adierazten dute MBP eta MOBPren gain-erregulazioa patologiaren hasierako faseetan gertatzen dela, kalte axonalaren aurretik, eta, seguru asko, AGrekin erlazionatutako substantzia zuriaren aldaketa primarioekin lotuta dagoela.

Hipotetikoki, mielinaren proteinetan gertatzen diren aldaketa horien aurretik, AGrekin lotutako mekanismo fisiopatologikoak daude. Hala ere, baliteke garuneko kaltea konpentsatzeko erantzuna ere izatea. Sagu-eredu honetan, desmielinazioa hauteman da eremu espezifikoetan, hala nola hipokanpoan eta kortex entorrinalean, 6 hilabetetan (Desai et al., 2009; Vanzulli et al., 2020). Hipotesi hori erabat baztertu ezin dugun arren,

ebidentzia sendoek adierazten dute A β peptidoaren jarduerak eragin ditzakeela AG sagu-ereduan ikusitako leinu oligodendroglialeko aldaketak.

Alde horretatik, 3xTg-AG eta APP/PS1 sagu transgenikoetan substantzia zuriaren anomaliak jakinarazi dira, zelula bRNAeko A β maila handiekin korrelazioan daudenak, plaka eta harien patologiaren agerpenaren aurretik (Desai et al., 2010; Wirths et al., 2006). Era berean, alde aurretik jakinarazi genuen korrelazio positiboa zegoela 18 hilabeteko sagu transgenikoen hipokanpoko MBParen gain-erregulazioaren eta A β mailaren artean (Quintela-López, 2018). Gainera, MBP eta MOBPren sintesian aldaketak hauteman genituen, A β -ren oligomero kopuru handiak eta amiloide plaka gutxi daudenean, eta Tau-ren aldi bereko patologia-zantzurik ikusten ez denean (Oddo et al., 2006). Are interesgarriago, Desaik eta haren kolaboradoreek CC1+ zelula helduen igoera deskribatu zuten 3xTg-AG-ko hipokanpoan. Zelula horien mailak gutxitzen ziren A β 1-42-ren kontrako intragorputzaren injekzioaren bidez. Horrek adierazten zuen A β -k eragin zuzena zuela oligodendrozitoen biziraupenean edo desberdintzapenean (Desai et al., 2010). Gainera, duela gutxi frogatu da APP/PS1 saguetan mielinaren sintesia areagotuta dagoela (Chen et al., 2021). Horrek iradokitzen du oligodendrozitoek A β -ri erantzuten diotela mielina-proteina gehiago sintetizatuz, eta hori babes-mekanismo bat izan liteke. Oro har, emaitzek adierazten dute sagua transgeniko hirukoitzaren ereduan hautemandako oligodendrozitoen bereizketaren narriadura A β oligomeroek eragiten dutela nagusiki.

Sagu hirukoitz transgenikoek hiru mutazio dituzte: giza tau mutatua (htaup301L), giza proteina aitzindari amiloidea, mutazio suediarra duena (hAPPSwe) eta gizakien presenilina mutatua (hPS1M146V). hAPPSwe eta htaup301L transgene mutanteak neuronetan soilik adierazten dira; hPS1M146V, berriz, nonahi adieraz daiteke, baita oligodendrozitoetan ere. PS1 γ -sekretasa konplexuaren osagai katalitikoa da, batez ere APParen prozesamendu amiloidogenikoan duen paperagatik ezaguna (Scheuner et al., 1996). Aurreko azterketek ere deskribatu dute γ -secretasa oligodendrozitoen heltze-prozesuan inplikaturik dagoela, baina emaitza kontraesankorrak jakinarazi dira oligodendrozitoen zelula primarioetan eta neuronekin batera egindako kultiboetan (Lai eta Feng, 2004; Watkins et al., 2008). Gainera, frogatu da AGren aldaketa genetiko horrek handitu egiten duela oligodendrozitoen zaugarritasuna AGrekin lotutako

zenbait efektuekin, A β barne (Pak et al., 2003; Desai et al., 2011). Alde horretatik, gure emaitzak bat datoz APP/PS1 saguetako oligodendrozoitoen leinuekin egindako behaketekin (Behrendt et al., 2013; Wu et al., 2017). Eredu horretan, bi mutazioak neuronetan soilik adierazten dira, eta horrek PS1 mutazioen ondorio zuzenak oligodendrozoitoetan baztertzeari laguntzen dio. Beraz, ebidentziek iradokitzen dute A β -rekin lotutako efektuak oligodendrozoitoei eragiten dietela, PS1 mutazioaren adierazpena edozein dela ere, nahiz eta PS1 mutazioak A β -ren efektuak areagotu ditzakeen.

5. MBP gainadierazpenak kaltzioaren sarrera inhibitu eta proteinen sintesia sustatzen du

Deskribatu da MBParen gain-erregulazioak VGCCak inhibitzen dituela, eta, ondorioz, murriztu egiten dela oligodendrozoitoetan kaltzioaren sarrera (Smith et al., 2011). Mintzkanalen bidezko Ca²⁺-aren sarrera funtsezko da hazkundera, heldzea eta plastikotasun funtzionala erregulatzen duten seinaleen transdukzio-bideetan. Gainera, zelula barneko kaltzio-maila handitzeak MBParen sintesia sustatzen du oligodendrozoitoetan (Friess et al., 2016). Hemen, A β -k zelularen kaltzio-sarrera inhibitzen duela frogatu dugu; gainera, MBPa azpi-erregulatuta dagoenean kaltzio-sarrera hori hein handi batean berreskuratzen dela ikusi dugu. Halaber, A β -k kaltzioaren sarrera inhibitzen duela ikusi dugu hipokanpoko kultibo organotipikoetako oligodendrozoitoetan. Kaltzioaren sarrerak MBParen sintesia estimulatu duenez eta, aldi berean, MBPk kaltzioaren sarrera inhibitzen duenez, gure emaitzek autorregulazio-mekanismo bat iradoki lezakete, non MBPk VGCCak inhibitzen dituen bere sintesia erregulatzeko. Mintzean MBParen metatzeak mintzean dagoen VGCC kopurua inhibitu edo murriztuko luke, lehenago esan bezala (Smith et al., 2011), eta, hala, kanal horien bidez kaltzioa sarrerari eragingo lioke.

Hala ere, MBP murriztu ondoren kaltzioaren maila guztiz berreskuratzen ez denez, ondoriozta dezakegu A β -k kaltzioaren sarrera inhibi dezakeela mekanismo gehigarrien bidez. Lehenago deskribatu den bezala (Quintela-López et al., 2019), A β -ek Ca²⁺-en maila basalak handitu egiten dituzte oligodendrozoitoetan, erretikulu endoplasmatikokoan dauden rianodina-hartzaileen bidez. Beraz, litekeena da A β -ek hasieran kaltzioaren

sarrera erraztea zelula barneko erreserbetatik, rianodina-hartzaileen bidez, kaltzio zitosolikoaren maila handitzea ekarriz. Zelula barneko Ca^{2+} maila handitzeak eragina izan lezake oligodendroitoek zelulaz kanpoko erantzunen aurrean duten kitzikagarritasunean. Emaitza horiek bat datoz azterlan batekin. Azterlan horren arabera, AG duten sagu-burmuinek, kronikoki $\text{A}\beta$ oligomero eta fibrilen eraginpean egonda, kaltzio geldiaren maila handitu egiten dute, aldi berean zelulaz kanpoko kaltzioa eta zelula barneko kaltzioa moteltzeko sistemak deserregulatu egiten direlako (Kuchibhotla et al., 2008). Beraz, 3xTg-AG saguen hipokanpoan MBParen maila handitzen dela ikusi dugunez, litekeena da pentsatzea kaltzioaren homeostasiari ere eragin diezaiokeela in vivo MBParen metaketa aberranteak. Oro har, ikusi dugu $\text{A}\beta$ peptidoak ezegonkortu egiten duela kaltzioaren homeostasia. Horren ondorioz, oligodendroitoak kaltzioaren zelula-barneko mailak igotzen dituzten ingurumen-estimuluekiko hain sentikorrek ez diren zelula bihurtuko lituzke

Proteinen metatze aberrantea asaldura neurodegeneratiboen ezaugarri komuna da, eta horren arrazoiak izan daitezke proteinen sintesia handitzea, egonkortasuna areagotzea edo degradazioa gutxitzea. Ikusi genuenez $\text{A}\beta$ -k MBP eta MOPBen sintesia handitzen zuela, $\text{A}\beta$ ok prozesu horretan eragin globalik izan ote lezakeen galdetu genion geure buruari. $\text{A}\beta$ -ri erantzunez kultibatutako oligodendroitoetako *de novo* proteinen sintesia aztertu genuen. Proteinen sintesia zuzenean monitorizatzeko, SUnSET saiakuntza erabili genuen (Schmidt, Clavarino, Ceppi, & Pierre, 2009), puromizina erabiltzen duena mRNA *in vitro* itzulpen-tasa zuzenean islatzeko. Aldez aurretik egindako azterketek frogatu dutenez, $\text{A}\beta_{1-42}$ -ko dosi subtoxikoek handitu egiten dute proteinen itzulpena neuronetan (Gamarra, Txurrejola, Batista, Imaz, & Baleriola, 2020; Ghosh et al., 2020; Li & Gotz, 2017; Schmidt et al., 2009; Westmark et al., 2011). Alde horretatik, frogatuko dugu $\text{A}\beta$ -k proteina-sintesi orokorra handitzen duela MBP parte hartzen duen bide batetik. Gure emaitzen arabera, nabarmen handitu zen MBP eta $\text{A}\beta$ -ren mendeko proteinen sintesi orokorra, eta galdu egiten zen MBP isilaraztean. Gainera, 3xTg-AG saguen oligodendroitoetan proteinen sintesia nabarmen handitzen zela erakutsi genuen, hipokanpo ebaketa akutuetan, non aldez aurretik MBP gain-erregulatuta ageri den. Bitxia bada ere, MBPak erribosomaren 40S eta 60S azpiunitateen proteinekin elkarreragiten du (Smirnova et al., 2021), eta, beraz, MBPak berak ere

erregulatu dezake itzulpena. Beraz, baliteke MBPk bi azpiunitateen ainguratze gisa jokatzeko, horrela itzulpena sustatuz.

6. A β oligomeroek oligodendrozitoen morfologia aldatzen dute aktina zitoeskeletoaren berrantolaketaren bidez

Aktina-zitoeskeletoa kritikoa da zelula-morfologiari eta zelula-prozesu askori eusteko, bereizketa eta mielinizazioa barne (Brown & Macklin, 2019). NSZren garapenean, OPCak pozesu-sare bat zabaltzeaz arduratzen dira axoiekin harremanetan jartzeko eta mielinizazioari ekiteko. Ekintza horretan, ezinbestekoa da zitoeskeletoaren dinamika, eta mielinaren sintesian nahiz konponketan gertatzen den edozein aldaketak neuroendekapenezko gaixotasunak eragiten ditu, hala nola AG. Gainera, Hirano gorputzak, aktina duten zelula barneko inklusioak eta aktinari lotutako proteinak, garunak AGrekin duen ezaugarri nabarmena dira (Mitake, Ojika, & Hirano, 1997).

Lan honetan frogatu dugu oligodendrozitoek aktinaren dinamika aldatzen dutela A β -ri erantzunez. Zehazki, erakutsi dugu A β bidezko tratamendu akutuak kofilinaren fosforilazioa (aktinarekin lotzeko proteina gakoa) eragiten duela eta F-aktinaren maila handitzen duela. Era berean, A β -rekin tratatutako neurona primarioetan egindako azterketek frogatu zuten Rac1 eta Cdc42 aktibatzeak (Mend-Naranjo, González Billault, & Maccioni, 2007) eta kofilinaren fosforilazioak (Rush et al., 2018) F-aktinaren kontzentrazioa handitzea dakartela. Bitxia bada ere, MBPk bat egiten du F-aktinarekin 1:1 proportzioan eta F-aktinaren harizpi sorta ordenatuak eratzea eragiten du (Baryko & Dobrowolski, 1984). Gure lanak erakutsi zuen aktinaren polimerizazio-tasa nabarmen handitzen zela, A β -ri erantzunez, 3 EIVtan kultibatutako oligodendrozitoetan, eta ez 2 EIVtan. Izan ere, baliteke zelulak oraindik behar bezala desberdinduta ez egotea eta F-aktinaren proteina despolimerizatzaileak askatzeko behar adina MBP ez izatea.

Hortik abiatuta, AGko oligodendrozitoen aktina-polimerizazioan parte hartzen duten mekanismoei buruzko zenbait hipotesi sor daitezke. Honako eszenatoki hau iradokitzen dugu: oligodendrozitoak A β -rekin estimulatzeak Rac1 aktibatzea eragiten du, aurrez deskribatu den bezala (Manterola et al., 2013; Mend-Naranjo et al., 2007), ziur aski Fyn-en bidez (Elaquint-López et al., 2019). Horrek kofilinaren fosforilazioa eta F-aktina maila

aldi baterako handitzea ekartzen du. Ondorengo etapetan, MBP aktina-despolimerizazioko proteinekin (gelsolina eta kofilina) lehiatuko litzateke, PI(4,5)P₂ mintz-lipidoari lotzeagatik (Zuchero et al., 2015). Beraz, A β bidez MBP gain-erregulazioak proteina despolimerizatzaile horiek gehiago askatzea eragin lezake, eta, hala, polimerizazioa handitu eta, ondorioz, prozesuaren dinamika handitu. Oro har, ondoriozta dezakegu A β -k aktinaren dinamika bultzatzen duela, F-aktina handituz eta adarkatzea sustatuz, oligodendrozitoen morfologia azken instantzian gobernaturik.

F-aktina oligodendrozitoen aurreko ertzean kokatzen da mielina-zorroan, eta, horren ondorioz, zitoplasma hedatu egiten da, aurreko mielina-zorroen azpitik eta zorro horien eta axoiaren artean, eta, hala, mintza eratzen da axoiaren inguruan. F-aktina berehala despolimerizatzen da, eta mielina aurreko ertzaren atzean trinkotzen uzten du. RNAseq analisisian A β bidezko tratamenduaren ondoren aktinarekin lotutako bideetan parte hartzen duten proteinen mRNAk aldatuta identifikatu genituen. Gainera, jakinarazi genuen mielinaren lodiera handitu egiten zela 6, 12 eta 18 hilabeteko 3xTg-AG saguen gorputz kailukarian (Quintela-López, 2018) eta 6 hilabeteko 3xTg-AG saguen hipokanpoan. Garrantzitsua da nabarmentzea amiloidosia mielina lodiago batekin lotu dela (Ferreira et al., 2020). Beraz, mielinaren loditzea azaltzen duen mekanismo posible bat F-aktinaren polimerizazio-indarrak handitzearen ondorio izan daiteke, zeinak kanporantz bultzatzen dituen axoiaren eta mielina-zorroaren artean estutzen diren mintzaren protuberantziak. Ondoren, F-aktinaren desmuntatzea gertatzen da MBParen igoeraren ondorioz, horrek MBP aurkitzen den leku espezifikoetan desmuntatzeko aukera ematen baitio. Hala ere, aurrez ikusi genuen zuntz hipermielinizatuek abiadura gutxiagoz gidatzen dutela, eta horrek axoiaren eroapenerako kaltegarria izan daitekeela iradokitzen du. Oro har, deskribatutako mekanismoa defentsa-mekanismo bat izan liteke, denborarekin neuronarentzat kaltegarria bihurtu daitekena.

7. A β oligomeroek mielinizazioa bultzatzen dute *in vivo*

Gero eta ikerketa gehiagok sostengatzen dute mielinak jasandako kaltea AGren osagai garrantzitsua dela, eta mielinaren narriadurak disfunzio neuronala eta defizit kognitiboa eragiten dituela iradoki da. Hala ere, ez dago definituta A β -k mielinizazioa

in vivo modulatu dezakeen. Azken urteotan, zebra-arraina oligodendrozoen biologia eta *in vivo* mielinizazioa aztertzeke eredu egoki bihurtu da.

A β -k mielinizazioan duen eragina aztertu genuen, zebra-arrainak erabiliz. Azterketa honetan frogatu genuen A β -k handitu egiten zuela oligodendrozo bakoitzeko zorro kopurua. Zehazki, *Mbp* bizkarrezur-muinaren bizkarraldean metatzen zela ikusi genuen, eta horrek iradokitzen du A β -k oligodendrozoen migrazioa sustatzen duela. Gainera, erakutsi genuen *Myrf*, mielina-proteinen transkripzio-faktore gakoa, azpiadierazten dela A β -rekin injektatutako zebra-arrainean. Azpimarratu behar da oligodendrozoak heldu ahala murriztu egiten dutela haien transkripzio-jarduera. Hala, A β -k *Myrf* mailan eragindako gutxitzeak oligodendrozoen diferentziazioa handitu lezake. Alde horretatik, *Plp1*, NSZren mielinan proteina ugarienetako bat, ere handitzen zen. Horren ondorioz, bizkarrezur-muinaren bizkarraldean axoi mielinizatuak ugaritu egin zirela erakutsiko dugu, baita Mauthnerren zelularen mielina lodiagoa izan ere. Mauthnerren zelulak arrainen ihes-jokabideetan parte hartzen duten bi neurona errestikuloespinal dira, funtsezkoak direnak bizirauteko. Aurreko datuen arabera, A β -rekin injektatutako zebra-arrainek ibilgailuarekin injektatutako animaliek baino eraginkortasun txikiagoa dute kontrako estimuluak saihesteko (Nery et al., 2014). Beraz, A β orekin injektatutako zebra-arrainean behatutako hipermielinizazio aberranteak portaera-aldaketak eragin ditzake. Oro har, emaitza horiek iradokitzen dute A β -k *in vivo* mielinizazioa aldatzen duela.

8. A β oligomeroek besikula estrazelularren askapena sustatzen dute eta hauek ondorio funtzionalak dituzte neuronetan

Neuronak bezala, oligodendrozoak ere gai dira jarduera neuronalak eragindako besikula estrazelularrak jariatzeko. Aurreko probek adierazten dute oligodendrozoak gai direla mielina-proteinak duten BEak askatzeko, hala nola PLP, CNP eta MBP (Krämer-Albers et al., 2007). Neuronek endozitu egiten dituzte besikula horiek, neurobabesa eta homeostasi neuronala hobetzen baituzte (Kramer-Albers, 2020). Gainera, BE oligodendroglialek ere modulatu dezakete oligodendrozoen desberdintzea eta mielinaren eratzea (Bakhti, Winter eta Simons, 2011). Jatorrizko zelulak paketatutako

kargak garraiatzeko BEEK duten gaitasuna dela eta, gaixotasun neurologikoen patogenesisian duten zeregina gero eta garrantzitsuagoa da. Hala ere, orain arte ez da ikerketarik egin A β -rekin tratatutako oligodendrozitoek askatutako BEEK AGn garapenean eraginik duten jakiteko.

Beraz, A β -k oligodendrozitoek BEEen askapena alda zezaketen eta BEEK funtzio neuronalei eragin diezaieketen ikertzea proposatu genuen. Gure analisiak erakutsi zuen A β -k handitu egiten zuela EBen askapena. Gainera, oligodendrozitoen BEEK MBP zuten. Oligodendrozitoetan MBP handitzeak bere funtzioari eragiten ziola ikusten dugunez, horien BEn barruko MBP jariatzeak alboko zelulei ere (batez ere neuronei) eragin diezaiekeen aztertu genuen. Aurretiko emaitzen arabera, A β -rekin tratatutako astrozitoen ondoriozko BEEK handitu egiten dute neuritetako proteinen sintesia (Gamarrá et al., 2021). Era berean, A β -rekin tratatutako oligodendrozitoetatik eratorritako BEEK handitu egiten zuten neuronan somako itzulpena. Hori ez da berria, lehenago frogatu baita exosoma oligodendroglialek gene-adierazpen neuronala aldatzen dutela (Frohlich et al., 2014).

Proteinen, lipidoen eta azido nukleikoen transferentzia horizontalaren bidez, BEEK azkar modulatu dezakete jardura sinaptikoa, neurotransmisoreen askapena kontrolatuz edo, pixkanaka, plastikotasun neuronala erregulatuz, sinapsiaren eraketa bRNAe. Hortaz, oligodendrozitoek sinapsian duten eragina aztertu genuen jarraian. BEEK ez zuten aldaketa esanguratsurik eragin homer markatzaile postsinaptikoan, baina bai nabarmen handitu zela sinaptofisina markatzaile presinaptikoa kontrol-oligodendrozitoetatik eratorritako BEEkin tratatzerakoan. Uste da proteina presinaptikoen galera dela gizakien AGn gertatzen den aldaketa goiztiarrenetako bat (eta klinikoki esanguratsuenetako bat), eta txosten batzuen arabera, aldaketa postsinaptiko zabalen aurretik gertatzen da. Gainera, sinaptofisinaren gainadierazpenak neurotransmisoreen jariaketa handitzen duela ikusi da (Alder, Kanki, Valtorta, Greengard eta Poo, 1995). Beraz, emaitza horiek adieraz lezakete oligodendrozitoek neurotransmisoreak askatzea bultzatzen dutela, neuronan erantzuna aldatuz, ingurune patologiko batean inhibitzen dena.

OLetik eratorritako VEEK neurotransmisoreen jarioari eragin ziezaiokeela frogatu genuenez, ondoren exozitosisia oligodendrozitoei erantzuteko modu gisa handitu ote

zezaketen zehazten saiatu ginen. Exozitosisia ikertzeko, BEekin estimulatu ondoren, neuronei esfingomielinaren eta BODIPY FL C5-zeramidaren aitzindariak aplikatu genien. Kontzentrazio handietan, BODIPY FL C5-zeramidak exzimerok eratzten ditu, 620 nm-ko gehienezko emisioarekin, baina fluoreszentzia berdea (515 nm) igortzen du kontzentrazio txikienetan. Propietate bakar horrek etiketa gorri bizia eragiten die trans-Golgi sareari eta Golgitik eratorritako besikulei. EBak mintz plasmaticoarekin fusionatu ondoren, BODIPY etiketa berehala disipatzen da mintzean, eta, ondorioz, exzimeroen disoziazioa eragiten du. Horren ondorioz, fluoreszentiaren intentsitatea 620 nm-ra handitzen da. Medio freskoarekin tratatutako neuronetan eta A β -OLetik eratorritako BEetan inkubazioaren ondoren BODIPY-zeramida asko metatzen zela ikusi genuen, baina kontrol-OLetik eratorritako BEekin berriz gutxitzen zen. Horrek aditzera ematen du oligodendrozitoen BEek exozitosisia areagotu egiten dutela baldintza fisiologikoetan, segur aski elkar komunikatzeko bitarteko gisa. BODIPY-zeramida Golgiren besikulasarean metatzen da, eta, aldi berean, A β ₁₋₄₂ trans-golgi sarean sortzen da, eta besikuletan paketatzen da. Beraz, BODIPY-zeramidaren metaketan aldaketak ikusi genituen, oligodendrozitoek neuronan A β ₁₋₄₂ jariaketa eragin zezaketen aztertu genuen. Espero genuena ez bezala, A β - eta kontrol-oligodendrozitoetatik eratorritako BEek nabarmen estimulatzen zuten A β ₁₋₄₂ jarioa ingurumen estrazelularra. BE oligodendroglialek A β -ren jariaketan eragiten dutela aurkitzeak ikuspegi mekanizista bat ematen du, non BE oligodendrozitarioek A β plakak sortzen lagun dezaketela erakusten duena.

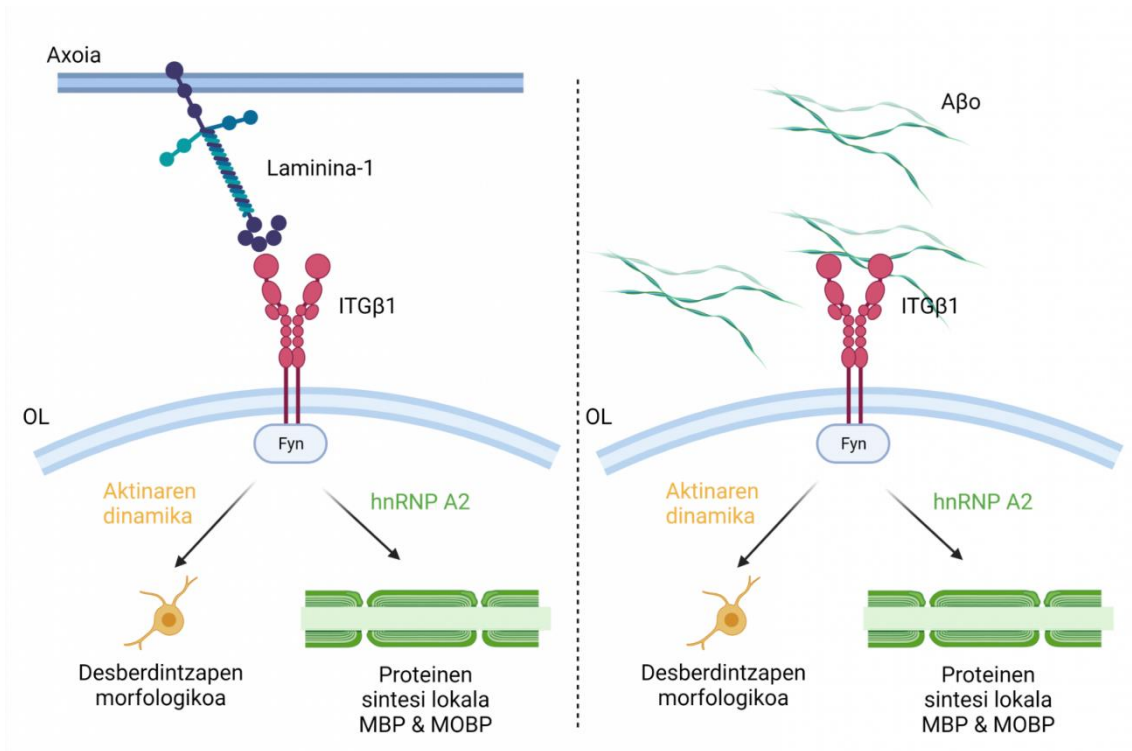
Oro har, emaitza horiek iradokitzen dute A β -rekin tratatutako oligodendrozitoetatik eratorritako exosomek eragina dutela A β -ren itzulpenean, sinapsian eta jariaketan. Interesgarria litzateke aztertzea nola eragiten dieten exosoma oligodendrozitarioek aipatutako funtzioei.

9. Azken oharrak

Orokorrean, tesi honetan jasotako datuek A β -k oligodendrozitoen funtzioetan duen eraginari buruzko ezagutza sakonagoa ematen dute. Oligodendrozitoen funtzio fisiologikoak erregulatzeko ardatz gisa deskribatu dugu MBP, eta hori nola areagotu

daitekeen AGn deskribatu dugu. Gure datuek iradokitzen dutenez, A β -k axoian dagoen laminina-1 hartzailea mimetizatzen jardun lezake (ITG β 1-ekin bat egiten baitu); hala, mielinazioa sustatuko luke, eta, seguruenik, leinu oligodendrogliala oligodendrozito helduagoetara aldatuko litzateke eta baita morfologian eragina izan ere **(43. irudia)**. Heltze-aldaketa horrek OPCen kopurua murriztu lezake, lehenago AGen ereduetan ikusi den bezala (Chacon-De-La-Rocha et al., 2020; Vanzulli et al., 2020), eta oligodendrozito helduen iturria galtzea ekar lezake. Hala ere, OPCen funtzioak ez dira oligodendrogenesira mugatzen; izan ere, duela gutxi oligodendrozitoen eginkizuna berri bat deskribatu da, non saguetako zirkuituak birmoldatzean dituzten sinapsiak irenketaren bidez (Auguste et al., 2022). Gainera, gure laborategiaren azken azterketek berretsi egiten dute hipotesi hori. Izan ere, 3xTg-AG saguetan eta A β -ren injekzioak jaso zituzten WT animalietan oligodendrozito helduen populazio handiagoa erakusten baitute, eta, ondorioz, oligodendrozito heldugabeen populazio txikiagoa (Balantzategi et al., 2021). Beraz, pentsa liteke leinuaren dinamikan gertatzen diren aldaketa horiek burmuina maniobragarritasun gutxiagorekin utz dezaketela desmielinizazioari erantzuteko, eta, horrekin batera, OPCen funtzioen galera, garuneko homeostasian ondorioak dituena. Gainera, mielinaren zenbait proteinaren sintesia handitzeak eta arestian deskribatutako degradazioa gutxitzeak oligodendrozitoaren proteostasia alda lezakete, eta horrek eragina izan dezake neuronekiko komunikazioan.

Diziplina anitzeko azterketa honek agerian uzten du leinu oligodendrozitoko zelulek gutxietsitako inplikazioa dutela AGren fisiopatologian. Beraz, emaitza hauek iradokitzen dute A β -k oligodendrozitoetan eta mielinan aktibatutako seinale-bideetara jotzea estrategia terapeutikoa izan daitekeela oroimenaren errendimendua hobetzeko, AGren lehenengo faseetan, progresio neuregeneratiboari prebenitzeko, edo, gutxienez, moteltzeko.

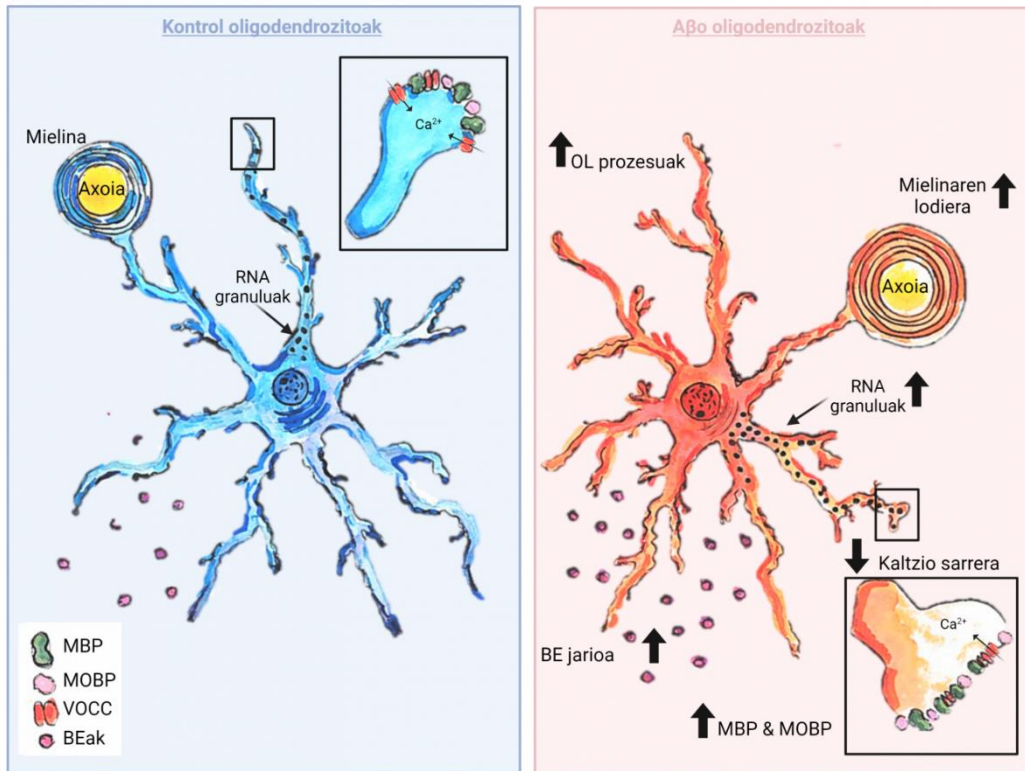


43. irudia. Aβo-ek aktibatzen duten bidea eta ondorioak erakusten dituen eskema.

ONDORIOAK

1. A β oligomeroek aldaketak sustatzen dituzte RNAREN metabolismoan, RNARI lotzen diren proteinak aldatuz.
2. AG duten pazienteek hnRNP A2 adierazpena handituta dute oligodendroitoetan, etapa goiztiarretan.
3. A β oligomeroek hnRNP A2 gain-erregulatzen dute, eta haren interaktoma aldatzen dute.
4. A β oligomeroek MBP eta MOBPren itzulpen lokala eragiten dute, mRNA granuluen kopurua eta dinamika modulatu.
5. MBPren gainadierazpenak kaltzioaren sarrera inhibitzen du eta proteinen itzulpena sustatzen du.
6. A β oligomeroek aldatu egiten dute zebra-arrainaren oligodendroitoen mielinizazioa eta heldzea.
7. A β oligomeroek aktinaren dinamika aldatzen dute, eta haren adarkadurak sustatzen dute.
8. A β oligomeroek besikula estrazelularren jarioa handitzen dute, eta horiek eragina dute funtzio neuronaletan.

Oro har, doktorego-tesian jasotako emaitzen arabera, A β oligomeroek transkriptomika eta proteomika alda ditzakete oligodendroitoetan, eta, beraz, funtzio oligodendroglial garrantzitsuak modulatu, hala nola RNAREN metabolismoa, proteinen itzulpena eta kaltzioaren homeostasia. Efektu horiek Alzheimer gaixotasunaren sorreran eta progresioan eragin dezakete.



44. irudia. Aβ-en eragina laburbiltzen duen eskema.

ERREFERENTZIAK

- Aber, E. R., Griffey, C. J., Davies, T., Li, A. M., Yang, Y. J., Croce, K. R., et al. (2022). Oligodendroglial macroautophagy is essential for myelin sheath turnover to prevent neurodegeneration and death. *Cell Reports*, 41(3), 111480. doi:S2211-1247(22)01330-4
- Afshari, F. S., Chu, A. K., & Sato-Bigbee, C. (2001). Effect of cyclic AMP on the expression of myelin basic protein species and myelin proteolipid protein in committed oligodendrocytes: Differential involvement of the transcription factor CREB. *Journal of Neuroscience Research*, 66(1), 37-45. doi:10.1002/jnr.1195
- Ainger, K., Avossa, D., Morgan, F., Hill, S. J., Barry, C., Barbarese, E., et al. (1993). Transport and localization of exogenous myelin basic protein mRNA microinjected into oligodendrocytes. *The Journal of Cell Biology*, 123(2), 431-441. doi:94012987 [pii]
- Alder, J., Kanki, H., Valtorta, F., Greengard, P., & Poo, M. M. (1995). Overexpression of synaptophysin enhances neurotransmitter secretion at xenopus neuromuscular synapses. *The Journal of Neuroscience*, 15(1), 511-519. doi:10.1523/JNEUROSCI.15-01-00511.1995
- Almeida, R. G. (2018). The rules of attraction in central nervous system myelination. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 367. doi:10.3389/fncel.2018.00367 [doi]
- Alzheimer, A., Stelzmann, R. A., Schnitzlein, H. N., & Murtagh, F. R. (1995). An english translation of alzheimer's 1907 paper, "uber eine eigenartige erkankung der hirnrinde". *Clinical Anatomy (New York, N.Y.)*, 8(6), 429-431. doi:10.1002/ca.980080612
- Amata, I., Maffei, M., & Pons, M. (2014). Phosphorylation of unique domains of src family kinases. *Frontiers in Genetics*, 5, 181. doi:10.3389/fgene.2014.00181 [doi]
- Anders, S., Pyl, P. T., & Huber, W. (2015). HTSeq--a python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 31(2), 166-169. doi:10.1093/bioinformatics/btu638
- Audano, M., Pedretti, S., Crestani, M., Caruso, D., De Fabiani, E., & Mitro, N. (2019). Mitochondrial dysfunction increases fatty acid beta-oxidation and translates into

impaired neuroblast maturation. *FEBS Letters*, 593(22), 3173-3189. doi:10.1002/1873-3468.13584

Bakhti, M., Aggarwal, S., & Simons, M. (2014). Myelin architecture: Zippering membranes tightly together. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 71(7), 1265-1277. doi:10.1007/s00018-013-1492-0

Bakhti, M., Winter, C., & Simons, M. (2011). Inhibition of myelin membrane sheath formation by oligodendrocyte-derived exosome-like vesicles. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(1), 787-796. doi:10.1074/jbc.M110.190009

Balantzategi, U., Quintela-Lopez, T., Gaminde-Blasco, A., Hernandez, N., Zugaza, J. L., Matute, C., Ruiz, A., Alberdi, E. (2021). The role of A β oligomers in the myelin regulatory factor MYRF regulation and oligodendrocyte differentiation. *Glia*, meeting abstract.

Balderrama-Gutierrez, G., Liang, H., Rezaie, N., Carvalho, K., Forner, S., Matheos, D., Rebboah, E., Green, K.N., Tenner, A.J., LaFerla, F., & Mortazavi, A. Single-cell and nucleus RNA-seq in a mouse model of AD reveal activation of distinct glial subpopulations in the presence of plaques and tangles. (2021). *bioRxiv*. doi: 10.1101/2021.09.29.462436

Bamburg, J. R. (1999). Proteins of the ADF/cofilin family: Essential regulators of actin dynamics. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 15, 185-230. doi:10.1146/annurev.cellbio.15.1.185

Banker, G., & Goslin, K. (1988). Developments in neuronal cell culture. *Nature*, 336(6195), 185-186. doi:10.1038/336185a0 [doi]

Barbero-Camps, E., Fernandez, A., Martinez, L., Fernandez-Checa, J. C., & Colell, A. (2013). APP/PS1 mice overexpressing SREBP-2 exhibit combined abeta accumulation and tau pathology underlying Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*, 22(17), 3460-3476. doi:10.1093/hmg/ddt201

Bartzokis, G. (2011). Alzheimer's disease as homeostatic responses to age-related myelin breakdown. *Neurobiology of Aging*, 32(8), 1341-1371. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2009.08.007

Bartzokis, G., Cummings, J. L., Sultzer, D., Henderson, V. W., Nuechterlein, K. H., & Mintz, J. (2003). White matter structural integrity in healthy aging adults and patients with Alzheimer disease: A magnetic resonance imaging study. *Archives of Neurology*, 60(3), 393-398. doi:10.1001/archneur.60.3.393

Bartzokis, G., Lu, P. H., Geschwind, D. H., Edwards, N., Mintz, J., & Cummings, J. L. (2006). Apolipoprotein E genotype and age-related myelin breakdown in healthy individuals: Implications for cognitive decline and dementia. *Archives of General Psychiatry*, 63(1), 63-72. doi:10.1001/archpsyc.63.1.63

Bartzokis, G., Lu, P. H., Geschwind, D. H., Tingus, K., Huang, D., Mendez, M. F., et al. (2007). Apolipoprotein E affects both myelin breakdown and cognition: Implications for age-related trajectories of decline into dementia. *Biological Psychiatry*, 62(12), 1380-1387. doi:10.1016/j.biopsych.2007.03.024

Baryko, B., & Dobrowolski, Z. (1984). Ca²⁺-calmodulin-dependent regulation of F-actin-myelin basic protein interaction. *European Journal of Cell Biology*, 35(2), 327-335.

Bauer, N. M., Moos, C., van Horsen, J., Witte, M., van der Valk, P., Altenhein, B., et al. (2012). Myelin basic protein synthesis is regulated by small non-coding RNA 715. *EMBO Reports*, 13(9), 827-834. doi:10.1038/embor.2012.97

Baumann, N., & Pham-Dinh, D. (2001). Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiological Reviews*, 81(2), 871-927. doi:10.1152/physrev.2001.81.2.871

Bechler, M. E., Byrne, L., & Ffrench-Constant, C. (2015). CNS myelin sheath lengths are an intrinsic property of oligodendrocytes. *Current Biology: CB*, 25(18), 2411-2416. doi:S0960-9822(15)00890-8

Behar, L., Marx, R., Sadot, E., Barg, J., & Ginzburg, I. (1995). Cis-acting signals and trans-acting proteins are involved in tau mRNA targeting into neurites of differentiating neuronal cells. *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 13(2), 113-127. doi:10.1016/0736-5748(95)00001-w

- Behrendt, G., Baer, K., Buffo, A., Curtis, M. A., Faull, R. L., Rees, M. I., et al. (2013). Dynamic changes in myelin aberrations and oligodendrocyte generation in chronic amyloidosis in mice and men. *Glia*, 61(2), 273-286. doi:10.1002/glia.22432
- Bernstein, B. W., & Bamburg, J. R. (2010). ADF/cofilin: A functional node in cell biology. *Trends in Cell Biology*, 20(4), 187-195. doi:10.1016/j.tcb.2010.01.001
- Berson, A., Barbash, S., Shaltiel, G., Goll, Y., Hanin, G., Greenberg, D. S., et al. (2012). Cholinergic-associated loss of hnRNP-A/B in Alzheimer's disease impairs cortical splicing and cognitive function in mice. *EMBO Molecular Medicine*, 4(8), 730-742. doi:10.1002/emmm.201100995
- Blanchard, J. W., Akay, L. A., Davila-Velderrain, J., von Maydell, D., Mathys, H., Davidson, S. M., et al. (2022). APOE4 impairs myelination via cholesterol dysregulation in oligodendrocytes. *Nature*, 611(7937), 769-779. doi:10.1038/s41586-022-05439-w
- Boehm, J. (2013). A 'danse macabre': Tau and fyn in STEP with amyloid beta to facilitate induction of synaptic depression and excitotoxicity. *The European Journal of Neuroscience*, 37(12), 1925-1930. doi:10.1111/ejn.12251
- Boggs, J. M. (2006). Myelin basic protein: A multifunctional protein. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 63(17), 1945-1961. doi:10.1007/s00018-006-6094-7
- Borit, A., & McIntosh, G. C. (1981). Myelin basic protein and glial fibrillary acidic protein in human fetal brain. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 7(4), 279-287. doi:10.1111/j.1365-2990.1981.tb00099.x
- Braak, H., & Braak, E. (1995). Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiology of Aging*, 16(3), 271-284. doi:10.1016/0197-4580(95)00021-6
- Brown, T. L., & Macklin, W. B. (2019). The actin cytoskeleton in myelinating cells. *Neurochemical Research*, 10.1007/s11064-0. doi:10.1007/s11064-019-02753-0
- Canedo-Antelo, M., Serrano, M. P., Manterola, A., Ruiz, A., Llaverro, F., Mato, S., et al. (2018). Inhibition of casein kinase 2 protects oligodendrocytes from excitotoxicity by attenuating JNK/p53 signalling cascade. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 333. doi:10.3389/fnmol.2018.00333

- Carson, J. H., Worboys, K., Ainger, K., & Barbarese, E. (1997). Translocation of myelin basic protein mRNA in oligodendrocytes requires microtubules and kinesin. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 38(4), 318-328. doi:10.1002/(SICI)1097-0169
- Chacon-De-La-Rocha, I., Fryatt, G., Rivera, A. D., Verkhatsky, A., Raineteau, O., Gomez-Nicola, D., et al. (2020). Accelerated dystrophy and decay of oligodendrocyte precursor cells in the APP/PS1 model of Alzheimer's-like pathology. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14, 575082. doi:10.3389/fncel.2020.575082
- Chamberlain, K. A., Huang, N., Xie, Y., LiCausi, F., Li, S., Li, Y., et al. (2021). Oligodendrocytes enhance axonal energy metabolism by deacetylation of mitochondrial proteins through transcellular delivery of SIRT2. *Neuron*, 109(21), 3456-3472.e8. doi:10.1016/j.neuron.2021.08.011
- Chen, J., Liu, K., Hu, B., Li, R., Xin, W., Chen, H., et al. (2021). Enhancing myelin renewal reverses cognitive dysfunction in a murine model of Alzheimer's disease. *Neuron*, 109(14), 2292-2307.e5. doi:10.1016/j.neuron.2021.05.012
- Chen, W., Lu, A., Craessaerts, K., Pavie, B., Sala Frigerio, C., Corthout, N., et al. (2020). Spatial transcriptomics and in situ sequencing to study Alzheimer's disease. *Cell*, 182(4), 976-991.e19. doi:10.1016/j.cell.2020.06.038
- Chen, Y., Balasubramaniyan, V., Peng, J., Hurlock, E. C., Tallquist, M., Li, J., et al. (2007). Isolation and culture of rat and mouse oligodendrocyte precursor cells. *Nature Protocols*, 2(5), 1044-1051. doi:10.1038/nprot.2007.149
- Chia, L. S., Thompson, J. E., & Moscarello, M. A. (1984). X-ray diffraction evidence for myelin disorder in brain from humans with Alzheimer's disease. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 775(3), 308-312. doi:0005-2736(84)90185-8
- Colman, D. R., Kreibich, G., Frey, A. B., & Sabatini, D. D. (1982). Synthesis and incorporation of myelin polypeptides into CNS myelin. *The Journal of Cell Biology*, 95(2 Pt 1), 598-608. doi:10.1083/jcb.95.2.598
- Crotty, P., Sangrey, T., & Levy, W. B. (2006). Metabolic energy cost of action potential velocity. *Journal of Neurophysiology*, 96(3), 1237-1246. doi:10.1152/jn.01204.2005

Czopka, T., French-Constant, C., & Lyons, D. A. (2013). Individual oligodendrocytes have only a few hours in which to generate new myelin sheaths *in vivo*. *Developmental Cell*, 25(6), 599-609. doi:S1534-5807(13)00287-6

Dahlgren, K. N., Manelli, A. M., Stine, W. B., Baker, L. K., Krafft, G. A., & LaDu, M. J. (2002). Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(35), 32046-32053. doi:10.1074/jbc.M201750200

Damoiseaux, J. S., Smith, S. M., Witter, M. P., Sanz-Arigita, E. J., Barkhof, F., Scheltens, P., et al. (2009). White matter tract integrity in aging and Alzheimer's disease. *Human Brain Mapping*, 30(4), 1051-1059. doi:10.1002/hbm.20563

de la Fuente, A. G., Queiroz, R. M. L., Ghosh, T., McMurrin, C. E., Cubillos, J. F., Bergles, D. E., et al. (2020). Changes in the oligodendrocyte progenitor cell proteome with ageing. *Molecular & Cellular Proteomics*, 19(8), 1281-1302. doi:10.1074/mcp.RA120.002102

de la Monte, S. M. (1989). Quantitation of cerebral atrophy in preclinical and end-stage Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, 25(5), 450-459. doi:10.1002/ana.410250506

Dean, D. C., Hurley, S. A., Kecskemeti, S. R., O'Grady, J. P., Canda, C., Davenport-Sis, N. J., et al. (2017). Association of amyloid pathology with myelin alteration in preclinical Alzheimer disease. *JAMA Neurology*, 74(1), 41-49. doi:10.1001/jamaneurol.2016.3232

Desai, M. K., Mastrangelo, M. A., Ryan, D. A., Sudol, K. L., Narrow, W. C., & Bowers, W. J. (2010). Early oligodendrocyte/myelin pathology in Alzheimer's disease mice constitutes a novel therapeutic target. *The American Journal of Pathology*, 177(3), 1422-1435. doi:10.2353/ajpath.2010.100087

Desai, M. K., Sudol, K. L., Janelisins, M. C., Mastrangelo, M. A., Frazer, M. E., & Bowers, W. J. (2009). Triple-transgenic Alzheimer's disease mice exhibit region-specific abnormalities in brain myelination patterns prior to appearance of amyloid and tau pathology. *Glia*, 57(1), 54-65. doi:10.1002/glia.20734

Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., et al. (2013). STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 29(1), 15-21. doi:10.1093/bioinformatics/bts635

- Domingues, H. S., Cruz, A., Chan, J. R., Relvas, J. B., Rubinstein, B., & Pinto, I. M. (2018). Mechanical plasticity during oligodendrocyte differentiation and myelination. *Glia*, 66(1), 5-14. doi:10.1002/glia.23206
- Elbaz, B., & Popko, B. (2019). Molecular control of oligodendrocyte development. *Trends in Neurosciences*, 42(4), 263-277. doi:S0166-2236(19)30002-5
- Ferreira, S., Pitman, K. A., Wang, S., Summers, B. S., Bye, N., Young, K. M., et al. (2020). Amyloidosis is associated with thicker myelin and increased oligodendrogenesis in the adult mouse brain. *Journal of Neuroscience Research*, 98(10), 1905-1932. doi:10.1002/jnr.24672
- Fessel, J. (2022). Reversing Alzheimer's disease dementia with clemastine, fingolimod, or rolipram, plus anti-amyloid therapy. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 8(1), e12242. doi:10.1002/trc2.12242
- Fields, R. D. (2008). White matter in learning, cognition and psychiatric disorders. *Trends in Neurosciences*, 31(7), 361-370. doi:10.1016/j.tins.2008.04.001
- Fields, R. D. (2015). A new mechanism of nervous system plasticity: Activity-dependent myelination. *Nature Reviews. Neuroscience*, 16(12), 756-767. doi:10.1038/nrn4023
- Fornasiero, E. F., Mandad, S., Wildhagen, H., Alevra, M., Rammner, B., Keihani, S., et al. (2018). Precisely measured protein lifetimes in the mouse brain reveal differences across tissues and subcellular fractions. *Nature Communications*, 9(1), 4230. doi:10.1038/s41467-018-06519-0
- Friess, M., Hammann, J., Unichenko, P., Luhmann, H. J., White, R., & Kirischuk, S. (2016). Intracellular ion signalling influences myelin basic protein synthesis in oligodendrocyte precursor cells. *Cell Calcium*, 60(5), 322-330. doi:10.1016/j.ceca.2016.06.009
- Fröhlich, D., Kuo, W. P., Frühbeis, C., Sun, J., Zehendner, C. M., Luhmann, H. J., et al. (1983). Research. *Research*, 369(1652), 20130510. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4142031/>
- Frohlich, D., Kuo, W. P., Fruhbeis, C., Sun, J., Zehendner, C. M., Luhmann, H. J., et al. (2014). Multifaceted effects of oligodendroglial EVs on neurons: Impact on neuronal

firing rate, signal transduction and gene regulation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 369(1652), 20130510. doi:10.1098/rstb.2013.0510. doi:10.1098/rstb.2013.0510

Frühbeis, C., Kuo-Elsner, W. P., Müller, C., Barth, K., Peris, L., Tenzer, S., et al. (2020). Oligodendrocytes support axonal transport and maintenance via exosome secretion. *PLoS Biology*, 18(12), e3000621. doi:10.1371/journal.pbio.3000621

Fruhbeis, C., Kuo-Elsner, W. P., Muller, C., Barth, K., Peris, L., Tenzer, S., et al. (2020). Oligodendrocytes support axonal transport and maintenance via exosome secretion. *PLoS Biology*, 18(12), e3000621. doi:10.1371/journal.pbio.3000621

Frykman, S., Teranishi, Y., Hur, J., Sandebring, A., Yamamoto, N. G., Ancarcrona, M., et al. (2012). Identification of two novel synaptic gamma-secretase associated proteins that affect amyloid beta-peptide levels without altering notch processing. *Neurochemistry International*, 61(1), 108-118. doi:10.1016/j.neuint.2012.03.016

Gamarra, M., Gonzalez, E., Azkargorta, M., Falcon, J. M., Elortza, F., & Baleriola, J. (2021). Astrocyte-derived extracellular vesicles modulate local translation in neurons. Paper presented at the *Glia*, 69. pp. E295-E296.

Gamarra, M., Blanco-Urrejola, M., Batista, A. F. R., Imaz, J., & Baleriola, J. (2020). Object-based analyses in FIJI/ImageJ to measure local RNA translation sites in neurites in response to Aβ₁₋₄₂ oligomers. *Frontiers in Neuroscience*, 14, 547. doi:10.3389/fnins.2020.00547

Garnier-Crussard, A., Bougacha, S., Wirth, M., Dautricourt, S., Sherif, S., Landeau, B., et al. (2022). White matter hyperintensity topography in Alzheimer's disease and links to cognition. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 18(3), 422-433. doi:10.1002/alz.12410

Ghosh, A., Mizuno, K., Tiwari, S. S., Proitsi, P., Gomez Perez-Nievas, B., Glennon, E., et al. (2020). Alzheimer's disease-related dysregulation of mRNA translation causes key pathological features with ageing. *Translational Psychiatry*, 10(1), 192-7. doi:10.1038/s41398-020-00882-7

- Grubman, A., Chew, G., Ouyang, J. F., Sun, G., Choo, X. Y., McLean, C., et al. (2019). A single-cell atlas of entorhinal cortex from individuals with Alzheimer's disease reveals cell-type-specific gene expression regulation. *Nature Neuroscience*, 22(12), 2087-2097. doi:10.1038/s41593-019-0539-4
- Han, S. P., Tang, Y. H., & Smith, R. (2010). Functional diversity of the hnRNPs: Past, present and perspectives. *The Biochemical Journal*, 430(3), 379-392. doi:10.1042/BJ20100396
- Harauz, G., & Boggs, J. M. (2013). Myelin management by the 18.5-kDa and 21.5-kDa classic myelin basic protein isoforms. *Journal of Neurochemistry*, 125(3), 334-361. doi:10.1111/jnc.12195
- Harauz, G., Ladizhansky, V., & Boggs, J. M. (2009). Structural polymorphism and multifunctionality of myelin basic protein. *Biochemistry*, 48(34), 8094-8104. doi:10.1021/bi901005f
- Harauz, G., & Musse, A. A. (2007). A tale of two citrullines--structural and functional aspects of myelin basic protein deimination in health and disease. *Neurochemical Research*, 32(2), 137-158. doi:10.1007/s11064-006-9108-9
- Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis. *Science (New York, N.Y.)*, 256(5054), 184-185. doi:10.1126/science.1566067
- Hartline, D. K. (2008). What is myelin? *Neuron Glia Biology*, 4(2), 153-163. doi:10.1017/S1740925X09990263
- Haukedal, H., & Freude, K. K. (2021). Implications of glycosylation in Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience*, 14, 625348. doi:10.3389/fnins.2020.625348
- Hector, A., & Brouillette, J. (2021). Hyperactivity induced by soluble amyloid-beta oligomers in the early stages of Alzheimer's disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13, 600084. doi:10.3389/fnmol.2020.600084
- Herbert, A. L., Fu, M., Drerup, C. M., Gray, R. S., Harty, B. L., Ackerman, S. D., et al. (2017). Dynein/dynactin is necessary for anterograde transport of mbp mRNA in oligodendrocytes and for myelination *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(12), 3175-3180. doi:10.1073/pnas.1616000114

Sciences of the United States of America, 114(43), E9153-E9162.
doi:10.1073/pnas.1711088114

Hirschfeld, L. R., Risacher, S. L., Nho, K., & Saykin, A. J. (2022). Myelin repair in Alzheimer's disease: A review of biological pathways and potential therapeutics. *Translational Neurodegeneration*, 11(1), 47. doi:10.1186/s40035-022-00321-1

Hoch-Kraft, P., White, R., Tenzer, S., Krämer-Albers, E., Trotter, J., & Gonsior, C. (2018). Dual role of the RNA helicase DDX5 in post-transcriptional regulation of myelin basic protein in oligodendrocytes. *Journal of Cell Science*, 131(9), jcs204750. doi:10.1242/jcs.204750

Hoek, K. S., Kidd, G. J., Carson, J. H., & Smith, R. (1998). hnRNP A2 selectively binds the cytoplasmic transport sequence of myelin basic protein mRNA. *Biochemistry*, 37(19), 7021-7029. doi:bi9800247

Horiuchi, M., Maezawa, I., Itoh, A., Wakayama, K., Jin, L., Itoh, T., et al. (2012). Amyloid β 1-42 oligomer inhibits myelin sheet formation in vitro. *Neurobiology of Aging*, 33(3), 499-509. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2010.05.007

Howitt, J., & Hill, A. F. (2016). EVs in the pathology of neurodegenerative diseases. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(52), 26589-26597. doi:10.1074/jbc.R116.757955

Hu, X., Hicks, C. W., He, W., Wong, P., Macklin, W. B., Trapp, B. D., et al. (2006). Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system. *Nature Neuroscience*, 9(12), 1520-1525. doi:10.1038/nn1797

Hughes, A. N., & Appel, B. (2020). Microglia phagocytose myelin sheaths to modify developmental myelination. *Nature Neuroscience*, 23(9), 1055-1066. doi:10.1038/s41593-020-0654-2

Inano, S., Takao, H., Hayashi, N., Abe, O., & Ohtomo, K. (2011). Effects of age and gender on white matter integrity. *AJNR. American Journal of Neuroradiology*, 32(11), 2103-2109. doi:10.3174/ajnr.A2785

Jantaratnotai, N., Ryu, J. K., Kim, S. U., & McLRNAon, J. G. (2003). Amyloid beta peptide-induced corpus callosum damage and glial activation *in vivo*. *Neuroreport*, 14(11), 1429-1433. doi:10.1097/00001756-200308060-00005

Jung, Y., Seo, J., Ryu, H. G., Kim, D., Lee, K., & Kim, K. (2020). BDNF-induced local translation of GluA1 is regulated by HNRNP A2/B1. *Science Advances*, 6(47), eabd2163. doi: 10.1126/sciadv.abd2163. Print 2020 Nov. doi:10.1126/sciadv.abd2163

Jungbauer, L. M., Yu, C., Laxton, K. J., & LaDu, M. J. (2009). Preparation of fluorescently-labeled amyloid-beta peptide assemblies: The effect of fluorophore conjugation on structure and function. *Journal of Molecular Recognition: JMR*, 22(5), 403-413. doi:10.1002/jmr.948

Karthigasan, J., Garvey, J. S., Ramamurthy, G. V., & Kirschner, D. A. (1996). Immunolocalization of 17 and 21.5 kDa MBP isoforms in compact myelin and radial component. *Journal of Neurocytology*, 25(1), 1-7. doi:10.1007/BF02284781

Kavroulakis, E., Simos, P. G., Kalaitzakis, G., Maris, T. G., Karageorgou, D., Zaganas, I., et al. (2018). Myelin content changes in probable Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: Associations with age and severity of neuropsychiatric impairment. *Journal of Magnetic Resonance Imaging: JMRI*, 47(5), 1359-1372. doi:10.1002/jmri.25849 [doi]

Kimberly, W. T., Zheng, J. B., Guénette, S. Y., & Selkoe, D. J. (2001). The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(43), 40288-40292. doi:10.1074/jbc.C100447200

Kitada, M., & Rowitch, D. H. (2006). Transcription factor co-expression patterns indicate heterogeneity of oligodendroglial subpopulations in adult spinal cord. *Glia*, 54(1), 35-46. doi:10.1002/glia.20354

Kolisnyk, B., Al-Onaizi, M., Soreq, L., Barbash, S., Bekenstein, U., Haberman, N., et al. (2017). Cholinergic surveillance over hippocampal RNA metabolism and Alzheimer's-like pathology. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 27(7), 3553-3567. doi:10.1093/cercor/bhw177

Kosturko, L. D., Maggipinto, M. J., D'Sa, C., Carson, J. H., & Barbarese, E. (2005). The microtubule-associated protein tumor overexpressed gene binds to the RNA trafficking protein heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2. *Molecular Biology of the Cell*, 16(4), 1938-1947. doi:10.1091/mbc.E04-08-0709

Kosturko, L. D., Maggipinto, M. J., Korza, G., Lee, J. W., Carson, J. H., & Barbarese, E. (2006). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) E1 binds to hnRNP A2 and inhibits translation of A2 response element mRNAs. *Molecular Biology of the Cell*, 17(8), 3521-3533. doi:10.1091/mbc.E05-10-0946

Kramer-Albers, E. (2020). Extracellular vesicles in the oligodendrocyte microenvironment. *Neuroscience Letters*, 725, 134915. doi:10.1016/j.neulet.2020.134915

Krämer-Albers, E., Bretz, N., Tenzer, S., Winterstein, C., Möbius, W., Berger, H., et al. (2007). Oligodendrocytes secrete EVs containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons? *Proteomics. Clinical Applications*, 1(11), 1446-1461. doi:10.1002/prca.200700522

Krämer-Albers, E., & White, R. (2011). From axon-glia signalling to myelination: The integrating role of oligodendroglial fyn kinase. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 68(12), 2003-2012. doi:10.1007/s00018-010-0616-z

Kuchibhotla, K. V., Goldman, S. T., Lattarulo, C. R., Wu, H., Hyman, B. T., & Bacskai, B. J. (2008). Abeta plaques lead to aberrant regulation of calcium homeostasis *in vivo* resulting in structural and functional disruption of neuronal networks. *Neuron*, 59(2), 214-225. doi:10.1016/j.neuron.2008.06.008

Kuhn, S., Gritti, L., Crooks, D., & Dombrowski, Y. (2019). Oligodendrocytes in development, myelin generation and beyond. *Cells*, 8(11), 1424. doi:10.3390/cells8111424

Lam, M., Takeo, K., Almeida, R. G., Cooper, M. H., Wu, K., Iyer, M., et al. (2022). CNS myelination requires VAMP2/3-mediated membrane expansion in oligodendrocytes. *Nature Communications*, 13(1), 5583-4. doi:10.1038/s41467-022-33200-4

Lanoiselée, H., Nicolas, G., Wallon, D., Rovelet-Lecrux, A., Lacour, M., Rousseau, S., et al. (2017). APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases. *PLoS Medicine*, 14(3), e1002270. doi:10.1371/journal.pmed.1002270

Lau, S., Cao, H., Fu, A. K. Y., & Ip, N. Y. (2020a). Single-nucleus transcriptome analysis reveals dysregulation of angiogenic endothelial cells and neuroprotective glia in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(41), 25800-25809. doi:10.1073/pnas.2008762117

Lau, S., Cao, H., Fu, A. K. Y., & Ip, N. Y. (2020b). Single-nucleus transcriptome analysis reveals dysregulation of angiogenic endothelial cells and neuroprotective glia in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(41), 25800-25809. doi:10.1073/pnas.2008762117

Lee, J., Padmanabhan, A., Shin, J., Zhu, S., Guo, F., Kanki, J. P., et al. (2010). Oligodendrocyte progenitor cell numbers and migration are regulated by the zebrafish orthologs of the NF1 tumor suppressor gene. *Human Molecular Genetics*, 19(23), 4643-4653. doi:10.1093/hmg/ddq395

Lee, S., Leach, M. K., Redmond, S. A., Chong, S. Y. C., Mellon, S. H., Tuck, S. J., et al. (2012). A culture system to study oligodendrocyte myelination processes using engineered nanofibers. *Nature Methods*, 9(9), 917-922. doi:10.1038/nmeth.2105 [doi]

Li, C., & Gotz, J. (2017). Somatodendritic accumulation of tau in Alzheimer's disease is promoted by fyn-mediated local protein translation. *The EMBO Journal*, 36(21), 3120-3138. doi:10.15252/emj.201797724

Liu, A., Li, J., Marin-Husstege, M., Kageyama, R., Fan, Y., Gelin, C., et al. (2006). A molecular insight of Hes5-dependent inhibition of myelin gene expression: Old partners and new players. *The EMBO Journal*, 25(20), 4833-4842. doi:10.1038/sj.emboj.7601352

Long, J. M., & Holtzman, D. M. (2019). Alzheimer disease: An update on pathobiology and treatment strategies. *Cell*, 179(2), 312-339. doi:10.1016/j.cell.2019.09.001

Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550-8. doi:550

Lyons, D. A., Naylor, S. G., Scholze, A., & Talbot, W. S. (2009). Kif1b is essential for mRNA localization in oligodendrocytes and development of myelinated axons. *Nature Genetics*, 41(7), 854-858. doi:10.1038/ng.376

Maggipinto, M., Rabiner, C., Kidd, G. J., Hawkins, A. J., Smith, R., & Barbarese, E. (2004). Increased expression of the MBP mRNA binding protein HnRNP A2 during oligodendrocyte differentiation. *Journal of Neuroscience Research*, 75(5), 614-623. doi:10.1002/jnr.20014

Manterola, L., Hernando-Rodriguez, M., Ruiz, A., Apraiz, A., Arrizabalaga, O., Vellon, L., et al. (2013). 1-42 beta-amyloid peptide requires PDK1/nPKC/rac 1 pathway to induce neuronal death. *Translational Psychiatry*, 3(1), e219. doi:10.1038/tp.2012.147

Marisca, R., Hoche, T., Agirre, E., Hoodless, L. J., Barkey, W., Auer, F., et al. (2020). Functionally distinct subgroups of oligodendrocyte precursor cells integrate neural activity and execute myelin formation. *Nature Neuroscience*, 23(3), 363-374. doi:10.1038/s41593-019-0581-2

Marques, S., Zeisel, A., Codeluppi, S., van Bruggen, D., Mendanha Falcão, A., Xiao, L., et al. (2016a). Oligodendrocyte heterogeneity in the mouse juvenile and adult central nervous system. *Science (New York, N.Y.)*, 352(6291), 1326-1329. doi:10.1126/science.aaf6463

Marques, S., Zeisel, A., Codeluppi, S., van Bruggen, D., Mendanha Falcão, A., Xiao, L., et al. (2016b). Oligodendrocyte heterogeneity in the mouse juvenile and adult central nervous system. *Science (New York, N.Y.)*, 352(6291), 1326-1329. doi:10.1126/science.aaf6463

Martini, R., & Schachner, M. (1997). Molecular bases of myelin formation as revealed by investigations on mice deficient in glial cell surface molecules. *Glia*, 19(4), 298-310.

Mastrangelo, M. A., & Bowers, W. J. (2008). Detailed immunohistochemical characterization of temporal and spatial progression of Alzheimer's disease-related pathologies in male triple-transgenic mice. *BMC Neuroscience*, 9, 81-81. doi:10.1186/1471-2202-9-81

Mathys, H., Davila-Velderrain, J., Peng, Z., Gao, F., Mohammadi, S., Young, J. Z., et al. (2019). Single-cell transcriptomic analysis of Alzheimer's disease. *Nature*, 570(7761), 332-337. doi:10.1038/s41586-019-1195-2

McCann, C. J., Hasan, N. M., Padilla-Benavides, T., Roy, S., & Lutsenko, S. (2022). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein hnRNP A2/B1 regulates the abundance of the copper-transporter ATP7A in an isoform-dependent manner. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9, 1067490. doi:10.3389/fmolb.2022.1067490

McGlinchy, N. J., Tan, L., Paul, N., Zavolan, M., Lilley, K. S., & Smith, C. W. J. (2010). Expression proteomics of UPF1 knockdown in HeLa cells reveals autoregulation of hnRNP A2/B1 mediated by alternative splicing resulting in nonsense-mediated mRNA decay. *BMC Genomics*, 11, 565-565. doi:10.1186/1471-2164-11-565

McNamara, N. B., Munro, D. A. D., Bestard-Cuche, N., Uyeda, A., Bogie, J. F. J., Hoffmann, A., et al. (2022). Microglia regulate central nervous system myelin growth and integrity. *Nature*, doi:10.1038/s41586-022-05534-y

Mendoza-Naranjo, A., Gonzalez-Billault, C., & Maccioni, R. B. (2007). Abeta1-42 stimulates actin polymerization in hippocampal neurons through Rac1 and Cdc42 rho GTPases. *Journal of Cell Science*, 120(Pt 2), 279-288. doi:10.1242/jcs.03323

Meschkat, M., Steyer, A. M., Weil, M., Kusch, K., Jahn, O., Piepkorn, L., et al. (2022). White matter integrity in mice requires continuous myelin synthesis at the inner tongue. *Nature Communications*, 13(1), 1163. doi:10.1038/s41467-022-28720-y

Miller, R. H. (2018). Calcium control of myelin sheath growth. *Nature Neuroscience*, 21(1), 2-3. doi:10.1038/s41593-017-0043-7

Min, Y., Kristiansen, K., Boggs, J. M., Husted, C., Zasadzinski, J. A., & Israelachvili, J. (2009). Interaction forces and adhesion of supported myelin lipid bilayers modulated by myelin basic protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(9), 3154-3159. doi:10.1073/pnas.0813110106

Mirra, S. S., Heyman, A., McKeel, D., Sumi, S. M., Crain, B. J., Brownlee, L. M., et al. (1991). The consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD). part II.

standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology*, 41(4), 479-486. doi:10.1212/wnl.41.4.479

Mitake, S., Ojika, K., & Hirano, A. (1997). Hirano bodies and alzheimer's disease. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 13(1), 10-18.

Mitew, S., Kirkcaldie, M. T. K., Halliday, G. M., Shepherd, C. E., Vickers, J. C., & Dickson, T. C. (2010). Focal demyelination in alzheimer's disease and transgenic mouse models. *Acta Neuropathologica*, 119(5), 567-577. doi:10.1007/s00401-010-0657-2

Mizukami, K., Ishikawa, M., Iwakiri, M., Ikonovic, M. D., Dekosky, S. T., Kamma, H., et al. (2005). Immunohistochemical study of the hnRNP A2 and B1 in the hippocampal formations of brains with Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 386(2), 111-115. doi:10.1016/j.neulet.2005.05.070

Möbius, W., Cooper, B., Kaufmann, W. A., Imig, C., Ruhwedel, T., Snaidero, N., et al. (2010). Electron microscopy of the mouse central nervous system. *Methods in Cell Biology*, 96, 475-512. doi:10.1016/S0091-679X(10)96020-2

Montague, P., Barrie, J. A., Thomson, C. E., Kirkham, D., McCallion, A. S., Davies, R. W., et al. (1998). Cytoskeletal and nuclear localization of myelin oligodendrocytic basic protein isoforms. *The European Journal of Neuroscience*, 10(4), 1321-1328. doi:10.1046/j.1460-9568.1998.00143.x

Moore, S., Meschkat, M., Ruhwedel, T., Trevisiol, A., Tzvetanova, I. D., Battefeld, A., et al. (2020). A role of oligodendrocytes in information processing. *Nature Communications*, 11(1), 5497-7. doi:10.1038/s41467-020-19152-7

Morabito, S., Miyoshi, E., Michael, N., Shahin, S., Martini, A. C., Head, E., et al. (2021). Single-nucleus chromatin accessibility and transcriptomic characterization of Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, 53(8), 1143-1155. doi:10.1038/s41588-021-00894-z

Mukherjee, C., Kling, T., Russo, B., Miebach, K., Kess, E., Schifferer, M., et al. (2020). Oligodendrocytes provide antioxidant defense function for neurons by secreting ferritin heavy chain. *Cell Metabolism*, 32(2), 259-272.e10. doi:10.1016/j.cmet.2020.05.019

Muller, C., Bauer, N. M., Schafer, I., & White, R. (2013). Making myelin basic protein - from mRNA transport to localized translation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, 169. doi:10.3389/fncel.2013.00169

Müller, C., Schäfer, I., Luhmann, H. J., & White, R. (2015). Oligodendroglial argonaute protein Ago2 associates with molecules of the mbp mRNA localization machinery and is a downstream target of fyn kinase. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 328. doi:10.3389/fncel.2015.00328

Müller, U. C., Deller, T., & Korte, M. (2017). Not just amyloid: Physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nature Reviews. Neuroscience*, 18(5), 281-298. doi:10.1038/nrn.2017.29

Munro, T. P., Magee, R. J., Kidd, G. J., Carson, J. H., Barbarese, E., Smith, L. M., et al. (1999). Mutational analysis of a heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 response element for RNA trafficking. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(48), 34389-34395. doi:10.1074/jbc.274.48.34389

Murdock, M. H., & Tsai, L. (2023). Insights into Alzheimer's disease from single-cell genomic approaches. *Nature Neuroscience*, doi:10.1038/s41593-022-01222-2

Nasrabady, S. E., Rizvi, B., Goldman, J. E., & Brickman, A. M. (2018a). White matter changes in Alzheimer's disease: A focus on myelin and oligodendrocytes. *Acta Neuropathologica Communications*, 6(1), 22. doi:10.1186/s40478-018-0515-3

Nasrabady, S. E., Rizvi, B., Goldman, J. E., & Brickman, A. M. (2018b). White matter changes in Alzheimer's disease: A focus on myelin and oligodendrocytes. *Acta Neuropathologica Communications*, 6(1), 22-3. doi:10.1186/s40478-018-0515-3 [doi]

Nave, K. (2010). Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature*, 468(7321), 244-252. doi:10.1038/nature09614

Nave, K., & Werner, H. B. (2014). Myelination of the nervous system: Mechanisms and functions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30, 503-533. doi:10.1146/annurev-cellbio-100913-013101

Nawaz, S., Sanchez, P., Schmitt, S., Snaidero, N., Mitkovski, M., Velte, C., et al. (2015). Actin filament turnover drives leading edge growth during myelin sheath formation in the central nervous system. *Developmental Cell*, 34(2), 139-151. doi:10.1016/j.devcel.2015.05.013

Nery, L. R., Eltz, N. S., Hackman, C., Fonseca, R., Altenhofen, S., Guerra, H. N., et al. (2014). Brain intraventricular injection of amyloid-beta in zebrafish embryo impairs cognition and increases tau phosphorylation, effects reversed by lithium. *PloS One*, 9(9), e105862. doi:10.1371/journal.pone.0105862

Nie, X., Falangola, M. F., Ward, R., McKinnon, E. T., Helpert, J. A., Nietert, P. J., et al. (2019). Diffusion MRI detects longitudinal white matter changes in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *Magnetic Resonance Imaging*, 57, 235-242. doi:10.1016/j.mri.2018.12.003

A novel fluorescent ceramide analogue for studying membrane traffic in animal cells: Accumulation at the golgi apparatus results in altered spectral properties of the sphingolipid precursor.(1991). *The Journal of Cell Biology*, 113(6), 1267-1279. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2289039/>

Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., et al. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: Intracellular abeta and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39(3), 409-421. doi:10.1016/s0896-6273(03)00434-3

Oddo, S., Caccamo, A., Tran, L., Lambert, M. P., Glabe, C. G., Klein, W. L., et al. (2006). Temporal profile of amyloid-beta (abeta) oligomerization in an in vivo model of alzheimer disease. A link between abeta and tau pathology. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(3), 1599-1604. doi:10.1074/jbc.M507892200

Osterhout, D. J., Wolven, A., Wolf, R. M., Resh, M. D., & Chao, M. V. (1999). Morphological differentiation of oligodendrocytes requires activation of fyn tyrosine kinase. *The Journal of Cell Biology*, 145(6), 1209-1218. doi:10.1083/jcb.145.6.1209

Ovadi, J., & Orosz, F. (2009). An unstructured protein with destructive potential: TPPP/p25 in neurodegeneration. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 31(6), 676-686. doi:10.1002/bies.200900008

Pagano, R. E., Martin, O. C., Kang, H. C., & Haugland, R. P. (1991). A novel fluorescent ceramide analogue for studying membrane traffic in animal cells: Accumulation at the golgi apparatus results in altered spectral properties of the sphingolipid precursor. *The Journal of Cell Biology*, 113(6), 1267-1279. doi:91258396

Parente, D. B., Gasparetto, E. L., da Cruz, L. C. H., Domingues, R. C., Baptista, A. C., Carvalho, A. C. P., et al. (2008). Potential role of diffusion tensor MRI in the differential diagnosis of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *AJR. American Journal of Roentgenology*, 190(5), 1369-1374. doi:10.2214/AJR.07.2617

Peckham, H., Giuffrida, L., Wood, R., Gonsalvez, D., Ferner, A., Kilpatrick, T. J., et al. (2016). Fyn is an intermediate kinase that BDNF utilizes to promote oligodendrocyte myelination. *Glia*, 64(2), 255-269. doi:10.1002/glia.22927

Philips, T., & Rothstein, J. D. (2017). Oligodendroglia: Metabolic supporters of neurons. *The Journal of Clinical Investigation*, 127(9), 3271-3280. doi:10.1172/JCI90610

Quintela-Lopez, T., Ortiz-Sanz, C., Serrano-Regal, M. P., Gaminde-Blasco, A., Valero, J., Baleriola, J., et al. (2019). Abeta oligomers promote oligodendrocyte differentiation and maturation via integrin beta1 and fyn kinase signaling. *Cell Death & Disease*, 10(6), 445-8. doi:10.1038/s41419-019-1636-8

Rajendran, L., Honscho, M., Zahn, T. R., Keller, P., Geiger, K. D., Verkade, P., et al. (2006). Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with EVsEVs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(30), 11172-11177. doi:10.1073/pnas.0603838103

Raju, C. S., Göritz, C., Nord, Y., Hermanson, O., López-Iglesias, C., Visa, N., et al. (2008). In cultured oligodendrocytes the A/B-type hnRNP CBF-A accompanies MBP mRNA bound to mRNA trafficking sequences. *Molecular Biology of the Cell*, 19(7), 3008-3019. doi:10.1091/mbc.e07-10-1083

Recuero, M., Serrano, E., Bullido, M. J., & Valdivieso, F. (2004). Abeta production as consequence of cellular death of a human neuroblastoma overexpressing APP. *FEBS Letters*, 570(1-3), 114-118. doi:10.1016/j.febslet.2004.06.025

Roher, A. E., Weiss, N., Kokjohn, T. A., Kuo, Y., Kalback, W., Anthony, J., et al. (2002). Increased A beta peptides and reduced cholesterol and myelin proteins characterize white matter degeneration in Alzheimer's disease. *Biochemistry*, 41(37), 11080-11090. doi:10.1021/bi026173d

Ruiz, A., Alberdi, E., & Matute, C. (2014). CGP37157, an inhibitor of the mitochondrial Na^+/Ca^{2+} exchanger, protects neurons from excitotoxicity by blocking voltage-gated Ca^{2+} channels. *Cell Death & Disease*, 5(4), e1156. doi:10.1038/cddis.2014.134

Rush, T., Martinez-Hernandez, J., Dollmeyer, M., Frandemiche, M. L., Borel, E., Boisseau, S., et al. (2018). Synaptotoxicity in Alzheimer's disease involved a dysregulation of actin cytoskeleton dynamics through cofilin 1 phosphorylation. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 38(48), 10349-10361. doi:10.1523/JNEUROSCI.1409-18.2018

Rybak-Wolf, A., & Plass, M. (2021a). RNA dynamics in Alzheimer's disease. *Molecules*, 26(17), 5113. doi:10.3390/molecules26175113

Rybak-Wolf, A., & Plass, M. (2021b). RNA dynamics in Alzheimer's disease. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(17), 5113. doi: 10.3390/molecules26175113.

Sachdev, P. S., Zhuang, L., Braidy, N., & Wen, W. (2013). Is alzheimer's a disease of the white matter? *Current Opinion in Psychiatry*, 26(3), 244-251. doi:10.1097/YCO.0b013e32835ed6e8

Samanta, J., & Kessler, J. A. (2004). Interactions between ID and OLIG proteins mediate the inhibitory effects of BMP4 on oligodendroglial differentiation. *Development (Cambridge, England)*, 131(17), 4131-4142. doi:10.1242/dev.01273

Samanta, J., & Salzer, J. L. (2015). Myelination: Actin disassembly leads the way. *Developmental Cell*, 34(2), 129-130. doi:S1534-5807(15)00457-8

- Sánchez-Gómez, M. V., Serrano, M. P., Alberdi, E., Pérez-Cerdá, F., & Matute, C. (2018). Isolation, expansion, and maturation of oligodendrocyte lineage cells obtained from rat neonatal brain and optic nerve. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 1791, 95-113. doi:10.1007/978-1-4939-7862-5_8
- Schäfer, I., Müller, C., Luhmann, H. J., & White, R. (2016). MOBP levels are regulated by fyn kinase and affect the morphological differentiation of oligodendrocytes. *Journal of Cell Science*, 129(5), 930-942. doi:10.1242/jcs.172148
- Schafer, I., Muller, C., Luhmann, H. J., & White, R. (2016). MOBP levels are regulated by fyn kinase and affect the morphological differentiation of oligodendrocytes. *Journal of Cell Science*, 129(5), 930-942. doi:10.1242/jcs.172148
- Schmidt, E. K., Clavarino, G., Ceppi, M., & Pierre, P. (2009). SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nature Methods*, 6(4), 275-277. doi:10.1038/nmeth.1314
- Selkoe, D. J., Brown, B. A., Salazar, F. J., & Marotta, C. A. (1981). Myelin basic protein in alzheimer disease neuronal fractions and mammalian neurofilament preparations. *Annals of Neurology*, 10(5), 429-436. doi:10.1002/ana.410100505
- Selkoe, D. J. (1991). The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron*, 6(4), 487-498. doi:10.1016/0896-6273(91)90052-2
- Selkoe, D. J., & Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine*, 8(6), 595-608. doi:10.15252/emmm.201606210
- Skaper, S. D., Evans, N. A., Evans, N. A., Rosin, C., Facci, L., & Richardson, J. C. (2009). Oligodendrocytes are a novel source of amyloid peptide generation. *Neurochemical Research*, 34(12), 2243-2250. doi:10.1007/s11064-009-0022-9
- Smirnova, E. V., Rakitina, T. V., Ziganshin, R. H., Arapidi, G. P., Saratov, G. A., Kudriaeva, A. A., et al. (2021). Comprehensive atlas of the myelin basic protein interaction landscape. *Biomolecules*, 11(11), 1628. doi:10.3390/biom11111628
- Smith, G. S. T., Paez, P. M., Spreuer, V., Campagnoni, C. W., Boggs, J. M., Campagnoni, A. T., et al. (2011). Classical 18.5-and 21.5-kDa isoforms of myelin basic protein inhibit

calcium influx into oligodendroglial cells, in contrast to golli isoforms. *Journal of Neuroscience Research*, 89(4), 467-480. doi:10.1002/jnr.22570

Snaidero, N., Mobius, W., Czopka, T., Hekking, L. H. P., Mathisen, C., Verkleij, D., et al. (2014). Myelin membrane wrapping of CNS axons by PI(3,4,5)P3-dependent polarized growth at the inner tongue. *Cell*, 156(1-2), 277-290. doi:S0092-8674(13)01530-4

Snaidero, N., & Simons, M. (2014). Myelination at a glance. *Journal of Cell Science*, 127(Pt 14), 2999-3004. doi:10.1242/jcs.151043

Snaidero, N., Velte, C., Myllykoski, M., Raasakka, A., Ignatev, A., Werner, H. B., et al. (2017). Antagonistic functions of MBP and CNP establish cytosolic channels in CNS myelin. *Cell Reports*, 18(2), 314-323. doi:S2211-1247(16)31760-0

Söderberg, O., Gullberg, M., Jarvius, M., Ridderstråle, K., Leuchowius, K., Jarvius, J., et al. (2006). Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nature Methods*, 3(12), 995-1000. doi:10.1038/nmeth947

Song, J., Goetz, B. D., Baas, P. W., & Duncan, I. D. (2001). Cytoskeletal reorganization during the formation of oligodendrocyte processes and branches. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 17(4), 624-636. doi:10.1006/mcne.2001.0974

Sperber, B. R., & McMorris, F. A. (2001). Fyn tyrosine kinase regulates oligodendroglial cell development but is not required for morphological differentiation of oligodendrocytes. *Journal of Neuroscience Research*, 63(4), 303-312. doi:10.1002/1097-4547

Stadelmann, C., Timmler, S., Barrantes-Freer, A., & Simons, M. (2019a). Myelin in the central nervous system: Structure, function, and pathology. *Physiological Reviews*, 99(3), 1381-1431. doi:10.1152/physrev.00031.2018

Stadelmann, C., Timmler, S., Barrantes-Freer, A., & Simons, M. (2019b). Myelin in the central nervous system: Structure, function, and pathology. *Physiological Reviews*, 99(3), 1381-1431. doi:10.1152/physrev.00031.2018

Stoppini, L., Buchs, P. A., & Muller, D. (1991a). A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *Journal of Neuroscience Methods*, 37(2), 173-182. doi:10.1016/0165-0270(91)90128-m

Stoppini, L., Buchs, P. A., & Muller, D. (1991b). A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *Journal of Neuroscience Methods*, 37(2), 173-182. doi:10.1016/0165-0270(91)90128-m

Stricker, N. H., Schweinsburg, B. C., Delano-Wood, L., Wierenga, C. E., Bangen, K. J., Haaland, K. Y., et al. (2009). Decreased white matter integrity in late-myelinating fiber pathways in Alzheimer's disease supports retrogenesis. *NeuroImage*, 45(1), 10-16. doi:10.1016/j.neuroimage.2008.11.027

Teipel, S. J., Bayer, W., Alexander, G. E., Zebuhr, Y., Teichberg, D., Kulic, L., et al. (2002). Progression of corpus callosum atrophy in alzheimer disease. *Archives of Neurology*, 59(2), 243-248. doi:10.1001/archneur.59.2.243

Thakurela, S., Garding, A., Jung, R. B., Muller, C., Goebbels, S., White, R., et al. (2016). The transcriptome of mouse central nervous system myelin. *Scientific Reports*, 6, 25828. doi:10.1038/srep25828

Thal, D. R., Rüb, U., Orantes, M., & Braak, H. (2002). Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*, 58(12), 1791-1800. doi:10.1212/wnl.58.12.1791

Thibault, P. A., Ganesan, A., Kalyanamoorthy, S., Clarke, J. W. E., Salapa, H. E., & Levin, M. C. (2021). hnRNP A/B proteins: An encyclopedic assessment of their roles in homeostasis and disease. *Biology*, 10(8), 712. doi: 10.3390/biology10080712.

Thomason, E. J., Escalante, M., Osterhout, D. J., & Fuss, B. (2020). The oligodendrocyte growth cone and its actin cytoskeleton: A fundamental element for progenitor cell migration and CNS myelination. *Glia*, 68(7), 1329-1346. doi:10.1002/glia.23735

tom Dieck, S., Kochen, L., Hanus, C., Heumuller, M., Bartnik, I., Nassim-Assir, B., et al. (2015). Direct visualization of newly synthesized target proteins in situ. *Nature Methods*, 12(5), 411-414. doi:10.1038/nmeth.3319

Torvund-Jensen, J., Steengaard, J., Reimer, L., Fihl, L. B., & Laursen, L. S. (2014). Transport and translation of MBP mRNA is regulated differently by distinct hnRNP proteins. *Journal of Cell Science*, 127(Pt 7), 1550-1564. doi:10.1242/jcs.140855

Transport and localization of exogenous myelin basic protein mRNA microinjected into oligodendrocytes. (1993). *The Journal of Cell Biology*, 123(2), 431-441. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2119827/>

Tripathi, R. B., Jackiewicz, M., McKenzie, I. A., Kougioumtzidou, E., Grist, M., & Richardson, W. D. (2017). Remarkable stability of myelinating oligodendrocytes in mice. *Cell Reports*, 21(2), 316-323. doi:10.1016/j.celrep.2017.09.050

Truong, P. H., Ciccotosto, G. D., Merson, T. D., Spoerri, L., Chuei, M. J., Ayers, M., et al. (2019). Amyloid precursor protein and amyloid precursor-like protein 2 have distinct roles in modulating myelination, demyelination, and remyelination of axons. *Glia*, 67(3), 525-538. doi:10.1002/glia.23561

Umemori, H., Kadowaki, Y., Hirose, K., Yoshida, Y., Hironaka, K., Okano, H., et al. (1999). Stimulation of myelin basic protein gene transcription by fyn tyrosine kinase for myelination. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(4), 1393-1397. doi:10.1523/JNEUROSCI.19-04-01393.1999

Umemori, H., Sato, S., Yagi, T., Aizawa, S., & Yamamoto, T. (1994). Initial events of myelination involve fyn tyrosine kinase signalling. *Nature*, 367(6463), 572-576. doi:10.1038/367572a0

Vanzulli, I., Papanikolaou, M., De-La-Rocha, I. C., Pieropan, F., Rivera, A. D., Gomez-Nicola, D., et al. (2020a). Disruption of oligodendrocyte progenitor cells is an early sign of pathology in the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 94, 130-139. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2020.05.016

Vanzulli, I., Papanikolaou, M., De-La-Rocha, I. C., Pieropan, F., Rivera, A. D., Gomez-Nicola, D., et al. (2020b). Disruption of oligodendrocyte progenitor cells is an early sign of pathology in the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 94, 130-139. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2020.05.016

Viola, K. L., & Klein, W. L. (2015). Amyloid β oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. *Acta Neuropathologica*, 129(2), 183-206. doi:10.1007/s00401-015-1386-3

von Jonquieres, G., Mersmann, N., Klugmann, C. B., Harasta, A. E., Lutz, B., Teahan, O., et al. (2013). Glial promoter selectivity following AAV-delivery to the immature brain. *PloS One*, 8(6), e65646. doi:10.1371/journal.pone.0065646

von Rotz, R. C., Kohli, B. M., Bosset, J., Meier, M., Suzuki, T., Nitsch, R. M., et al. (2004). The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 19), 4435-4448. doi:10.1242/jcs.01323

Wang, S., & Young, K. M. (2014). White matter plasticity in adulthood. *Neuroscience*, 276, 148-160. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.10.018

Waxman, S. G. (1997). Axon-glia interactions: Building a smart nerve fiber. *Current Biology: CB*, 7(7), 406. doi:10.1016/s0960-9822(06)00203-x

Waxman, S. G., & Ritchie, J. M. (1993). Molecular dissection of the myelinated axon. *Annals of Neurology*, 33(2), 121-136. doi:10.1002/ana.410330202

Westmark, C. J., Westmark, P. R., O'Riordan, K. J., Ray, B. C., Hervey, C. M., Salamat, M. S., et al. (2011). Reversal of fragile X phenotypes by manipulation of AbetaPP/abeta levels in Fmr1KO mice. *PloS One*, 6(10), e26549. doi:10.1371/journal.pone.0026549

White, R., Gonsior, C., Bauer, N. M., Kramer-Albers, E., Luhmann, H. J., & Trotter, J. (2012a). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) F is a novel component of oligodendroglial RNA transport granules contributing to regulation of myelin basic protein (MBP) synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(3), 1742-1754. doi:10.1074/jbc.M111.235010

White, R., Gonsior, C., Bauer, N. M., Kramer-Albers, E., Luhmann, H. J., & Trotter, J. (2012b). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) F is a novel component of oligodendroglial RNA transport granules contributing to regulation of myelin basic protein (MBP) synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(3), 1742-1754. doi:10.1074/jbc.M111.235010

- White, R., Gonsior, C., Kramer-Albers, E., Stohr, N., Huttelmaier, S., & Trotter, J. (2008). Activation of oligodendroglial fyn kinase enhances translation of mRNAs transported in hnRNP A2-dependent RNA granules. *The Journal of Cell Biology*, 181(4), 579-586. doi:10.1083/jcb.200706164
- Williamson, J. M., & Lyons, D. A. (2018). Myelin dynamics throughout life: An ever-changing landscape? *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 424. doi:10.3389/fncel.2018.00424
- Wu, Y., Ma, Y., Liu, Z., Geng, Q., Chen, Z., & Zhang, Y. (2017a). Alterations of myelin morphology and oligodendrocyte development in early stage of Alzheimer's disease mouse model. *Neuroscience Letters*, 642, 102-106. doi:10.1016/j.neulet.2017.02.007
- Wu, Y., Ma, Y., Liu, Z., Geng, Q., Chen, Z., & Zhang, Y. (2017b). Alterations of myelin morphology and oligodendrocyte development in early stage of Alzheimer's disease mouse model. *Neuroscience Letters*, 642, 102-106. doi:10.1016/j.neulet.2017.02.007
- Xu, J., Chen, S., Ahmed, S. H., Chen, H., Ku, G., Goldberg, M. P., et al. (2001). Amyloid- β peptides are cytotoxic to oligodendrocytes. *The Journal of Neuroscience*, 21(1), RC118. doi:10.1523/JNEUROSCI.21-01-j0001.2001
- Yeung, M. S. Y., Zdunek, S., Bergmann, O., Bernard, S., Salehpour, M., Alkass, K., et al. (2014). Dynamics of oligodendrocyte generation and myelination in the human brain. *Cell*, 159(4), 766-774. doi:10.1016/j.cell.2014.10.011
- Yin, F. (2022). Lipid metabolism and Alzheimer's disease: Clinical evidence, mechanistic link and therapeutic promise. *The FEBS Journal*, doi:10.1111/febs.16344
- Young, K., Psachoulia, K., Tripathi, R., Dunn, S., Cossell, L., Attwell, D., et al. (2013). Oligodendrocyte dynamics in the healthy adult CNS: Evidence for myelin remodelling. *Neuron*, 77(5), 873-885. doi:10.1016/j.neuron.2013.01.006
- Yu, Y., Herman, P., Rothman, D. L., Agarwal, D., & Hyder, F. (2018). Evaluating the gray and white matter energy budgets of human brain function. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 38(8), 1339-1353. doi:10.1177/0271678X17708691

Zhan, X., Jickling, G. C., Ander, B. P., Stamova, B., Liu, D., Kao, P. F., et al. (2015). Myelin basic protein associates with A β PP, A β 1-42, and amyloid plaques in cortex of Alzheimer's disease brain. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 44(4), 1213-1229. doi:10.3233/JAD-142013

Zhan, X., Jickling, G. C., Ander, B. P., Liu, D., Stamova, B., Cox, C., et al. (2014). Myelin injury and degraded myelin vesicles in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, 11(3), 232-238. doi:10.2174/1567205011666140131120922

Zhang M., Zhang J., Zhang W., Yao Z. (2018). Demyelination takes place prior to neuronal damage following intracerebroventricular injection of amyloid-beta oligomer. *Neuropsychiatry*, 8, 1770–1785. doi:10.4172/NEUROPSYCHIATRY.1000519

Zhang, P., Kishimoto, Y., Grammatikakis, I., Gottimukkala, K., Cutler, R. G., Zhang, S., et al. (2019). Senolytic therapy alleviates A β -associated oligodendrocyte progenitor cell senescence and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. *Nature Neuroscience*, 22(5), 719-728. doi:10.1038/s41593-019-0372-9

Zhang, X., Wang, R., Hu, D., Sun, X., Fujioka, H., Lundberg, K., et al. (2020). Oligodendroglial glycolytic stress triggers inflammasome activation and neuropathology in Alzheimer's disease. *Science Advances*, 6(49), eabb8680. doi:10.1126/sciadv.abb8680

Zhao, L. N., Long, H. W., Mu, Y., & Chew, L. Y. (2012a). The toxicity of amyloid beta oligomers. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(6), 7303-7327. doi:10.3390/ijms13067303

Zhao, L. N., Long, H., Mu, Y., & Chew, L. Y. (2012b). The toxicity of amyloid β oligomers. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(6), 7303-7327. doi:10.3390/ijms13067303

Zheng, H., & Koo, E. H. (2011). Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein. *Molecular Neurodegeneration*, 6(1), 27. doi:10.1186/1750-1326-6-27

Zhou, Y., Song, W. M., Andhey, P. S., Swain, A., Levy, T., Miller, K. R., et al. (2020a). Human and mouse single-nucleus transcriptomics reveal TREM2-dependent and

TREM2-independent cellular responses in Alzheimer's disease. *Nature Medicine*, 26(1), 131-142. doi:10.1038/s41591-019-0695-9

Zhou, Y., Song, W. M., Andhey, P. S., Swain, A., Levy, T., Miller, K. R., et al. (2020b). Human and mouse single-nucleus transcriptomics reveal TREM2-dependent and TREM2-independent cellular responses in Alzheimer's disease. *Nature Medicine*, 26(1), 131-142. doi:10.1038/s41591-019-0695-9

Zuchero, J. B., Fu, M., Sloan, S. A., Ibrahim, A., Olson, A., Zaremba, A., et al. (2015). CNS myelin wrapping is driven by actin disassembly. *Developmental Cell*, 34(2), 152-167. doi:S1534-5807(15)00400-1

Zuniga, G., Levy, S., Ramirez, P., De Mange, J., Gonzalez, E., Gamez, M., et al. (2022). Tau-induced deficits in nonsense-mediated mRNA decay contribute to neurodegeneration. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, doi:10.1002/alz.12653