



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 305 126**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01992896 .9**

86 Fecha de presentación : **05.11.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1330656**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **30.07.2003**

54 Título: **Medios de detección de la transformación patológica de la proteína APP y sus aplicaciones.**

30 Prioridad: **03.11.2000 FR 00 14143**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2008

73 Titular/es: **INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET
DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)
101, rue de Tolbiac
75654 Paris Cédex 13, FR**

72 Inventor/es: **Delacourte, André y
Sergeant, Nicolas**

74 Agente: **Ruo, Alessandro**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Medios de detección de la transformación patológica de la proteína APP y sus aplicaciones.

5 La invención se refiere a medios de detección de la transformación patológica de la proteína APP (proteína precursora de amiloide) en enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer.

Se refiere más en particular, a un procedimiento para detectar dicha transformación, a los kits para ponerlo en práctica, así como a sus aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico.

10 La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa que conduce a la pérdida de las funciones intelectuales y por lo tanto a la instalación progresiva e irreversible de una demencia. El futuro de esta enfermedad puede ser temible con el envejecimiento de la población, ya que el principal factor de riesgo es la edad.

15 El 99% de las formas observadas son no familiares. Para las formas familiares autosómicas dominantes, se observan mutaciones patológicas en el gen de APP en el cromosoma 21, y en los genes PSI y PS2 (presenilinas 1 y 2) que se encuentran en los cromosomas 14 y 1.

20 Dos procesos degenerativos caracterizan la enfermedad de Alzheimer. La amiloidogénesis, que resulta de una disfunción de la proteína APP, y la degeneración neurofibrilar (DNF), que corresponde a la acumulación de proteína tau en las células nerviosas.

La disfunción de la proteína APP está en el mismo origen de la patología del Alzheimer, pero la causa exacta de la degeneración y de la muerte neuronal todavía no se conocen.

25 Se han planteado dos hipótesis. De acuerdo con la primera hipótesis, que es la más respaldada, el producto de escisión de la APP, el péptido $A\beta$, de 39 a 43 restos de aminoácidos, es neurotóxico y responsable de la reacción en cadena de la DNF.

30 De acuerdo con la segunda hipótesis, la degeneración sería el resultado de una pérdida o de una ganancia en la función de la APP, que se traduciría paralelamente y de forma secundaria en una acumulación del péptido $A\beta$ en forma de placas amiloides.

35 El modelo de la amiloidogénesis es posible gracias a ratones transgénicos con los genes APP o APP+PS1 mutados. Estos ratones desarrollan progresivamente placas amiloides, pero no se observa DNF. La industria farmacéutica ya usa estos ratones para ensayar moléculas capaces de inhibir la formación del péptido $A\beta$. La estrategia principal consiste en bloquear las enzimas responsables de la producción del péptido $A\beta$. Las enzimas de este tipo que se conocen actualmente son las secretasas β y γ (1)

40 También se han ensayado moléculas que se fijan sobre los depósitos amiloides. Se trata de cazadores de estructuras β (rompedores de lámina β) o antiamiloides (2).

También está en desarrollo actualmente la vacuna contra el péptido amiloide (3).

45 Hasta ahora, no se ha descubierto ninguna modificación significativa y confirmada de la proteína APP en el tejido humano afectado por la enfermedad de Alzheimer, más que el aumento de la producción del péptido $A\beta$ 1-42, el aumento de la relación $A\beta$ 1-42/1-40 y su unión en forma de depósitos insolubles y de placas amiloides.

50 También se ha destacado una modificación de la secreción de la parte N-terminal de la APP, llamada sAPP, en ensayos *in vitro* para ensayar la mutación 715 en la APP (4).

55 El documento US 5.234.814 describe un aumento de la cantidad de los fragmentos APP-Cterminal en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con la enfermedad de Alzheimer. El documento WO 9407144 describe un aumento de la cantidad de los fragmentos APP-Cterminales que presentan modificaciones postraduccionales, en particular fosforilación, en el epitelio de pacientes con enfermedad de Alzheimer, y sugiere una detección basada en la electroforesis bidimensional.

60 Las investigaciones llevadas a cabo por los autores de la invención les han llevado a observar modificaciones significativas de la proteína APP que no están ligadas a la detección de los péptidos $A\beta$, y que se pueden detectar de forma específica en el tejido humano con Alzheimer y en modelos experimentales.

Estas modificaciones se ponen de manifiesto en el tejido humano (sistema nervioso central, líquidos y tejidos periféricos) afectado por la enfermedad de Alzheimer, así como en otras patologías neurodegenerativas con disfunción de la APP.

65 Las modificaciones significativas son a la vez cualitativas y cuantitativas y se detectan antes que la producción del péptido $A\beta$.

Se pueden encontrar anomalías similares en gran cantidad en los ratones transgénicos con las mutaciones patológicas de la APP o APP mutado + presenilina 1 mutada.

Por lo tanto, la invención trata del uso de estas modificaciones observadas en el tejido cerebral humano, como marcadores en un procedimiento de detección de la transformación patológica de la APP, en particular en un proceso degenerativo.

Trata de la aplicación de estos marcadores en particular para el diagnóstico y el seguimiento de un proceso neurodegenerativo, la puesta a punto de modelos animales y el cribado de medicamentos eficaces contra las patologías de la APP.

La invención trata también de un procedimiento de evaluación de dichas patologías que comprende la definición de un índice establecido en relación con una referencia.

El procedimiento para detectar en una muestra para analizar, las modificaciones patológicas de la proteína APP, se caracteriza porque se usan marcadores constituidos por fragmentos catabólicos y/o metabólicos de la parte carboxi terminal de la APP, llamados en lo sucesivo fragmentos APP-Cter, específicamente modificados en las situaciones patológicas neurodegenerativas en cuya etiología participa la APP.

Los estudios realizados por los autores de la invención han mostrado que, de forma inesperada, las modificaciones relativas a dichos fragmentos estaban directamente ligadas con la instalación y el progreso de los procesos degenerativos en las regiones cerebrales, en particular en el caso de la enfermedad de Alzheimer.

Se observará que los fragmentos en cuestión son productos catabólicos y/o metabólicos de la APP que han conservado la estructura primaria del extremo C-terminal de la APP y por lo tanto serán reconocidos por un anticuerpo dirigido contra esta parte C-terminal de la APP.

El término "fragmento", tal como se usa en la descripción y las reivindicaciones, abarca las variantes de carga y de punto isoelectrico diferentes debidas a modificaciones postraduccionales, como por ejemplo, fosforilación y/o metilación y/o acetilación y/o glicosilación, en la medida en que estas variantes son reconocidas por un anticuerpo anti-APP-Cter como se describe en los ejemplos.

Se trata en particular de fragmentos que son identificados por análisis bioquímico de una muestra para analizar, por electroforesis 1 D (electroforesis monodimensional) o 2 D (electroforesis bidimensional) acopladas con una inmunotransferencia y revelado por un conjunto de anticuerpos policlonales y/o monoclonales anti-APP-Cter, y adicionalmente por un conjunto de anticuerpos contra las modificaciones postraduccionales de la transformación patológica de la APP-Cter.

La electroforesis puede ser mono o bidimensional.

Dichos fragmentos son modificados específicamente en los tejidos patológicos. Se aprecia la disminución e incluso la desaparición de algunos de estos fragmentos con el progreso del proceso neurodegenerativo. Paralelamente, se aprecia una modificación de la carga eléctrica de estos fragmentos y una modificación de su solubilidad.

La invención trata en especial de la aplicación de este procedimiento al diagnóstico del proceso de desarrollo del Alzheimer, y en relación con esto, trata del uso como marcadores de las disfunciones de la APP, de 5 fragmentos 5 principales que son modificados en el transcurso del Alzheimer, cuyos pesos moleculares determinados por electroforesis monodimensional (1-D) son 14,5; 13,5; 12; 10,5 y 9,5 kDa. Por comodidad, estos fragmentos se designan con las letras A, B, C, D, E. Hay que indicar, que también se encuentran una banda de 9 kDa (F) y una banda de 6,5 kDa, en cantidades menores y variables.

Las variantes que desaparecen corresponden a la banda electroforética 1-D de 14,5 kDa, llamada A, desdoblada en dos componentes de 15 kDa y 14,5 kDa en 2-D, con variantes isoelectricas de puntos isoelectricos de 5,13 (representado por 15/5,13) y 15/5,37 para el componente de 15 kDa y de 14,5/5,64 y 14,5/5,95 para la otra componente. Desaparecen igualmente los fragmentos correspondientes a la banda electroforética B de 13,5 que se desdobra en dos componentes de 13,5 y 12,7 kDa, con las variantes isoelectricas 13,5/4,94 y 12,7/4,8; 12,7/5,29.

En la fase precoz de la enfermedad de Alzheimer se modifican también fragmentos de interés. Corresponden a las variantes electroforéticas 15/4,55; 14/5,2; 14/5,37; 12,7/5,45; 12,7/5,64; 10,5/5,91; 12,7/6,05. Estas variantes son particularmente informativas, en la medida en que son marcadores precoces.

Los fragmentos que aparecen en el transcurso del Alzheimer corresponden a la banda electroforética 1-D de 10,5 kDa, desdoblada en dos componentes de 11 kDa y 10,5 kDa en 2-D, con las variantes isoelectricas 11/4,94; 10,5/5,35 y 10,5/7,5 y el fragmento de 9,5 kDa y de pl 5,77.

Paralelamente, se observan también modificaciones de la solubilidad de los marcadores APP-Cter en el curso de la evolución del proceso patológico de neurodegeneración. Los fragmentos de 14,5 y 13,5 disminuyen su solubilidad y los fragmentos de 10,5 y 9,5 aumentan su solubilidad en el curso de desarrollo del Alzheimer en el tejido cerebral.

ES 2 305 126 T3

Dichos fragmentos están modificados en los tejidos o células llamados alzheimerizados. Pueden estar modificados de una forma similar en modelos experimentales, en los que animales transgénicos portan un gen o una combinación de genes mutados o no mutados, implicados en la patología del Alzheimer.

Es interesante indicar que estas diferencias de catabolismo y de metabolismo de la proteína APP, como se observan con los marcadores APP-Cter, se observan en modelos celulares neuronales (por ejemplo las células de neuroblastoma con la cepa SKNSH SY5Y, la cepa NT2, la cepa Kelly), las cepas de glioblastoma (CCF, U118, T98), pero también en células no neuronales, como las cepas CHO, COS, HT-29 y Hela.

Se apreciará también que cada línea celular posee naturalmente un patrón de expresión de estos fragmentos que le es propio (variación de la cantidad global de los fragmentos de masa molecular 13,5; 12; 10,5; 9,5; 9; 8,5 y 6,5 kDa expresados en relación con las proteínas totales del modelo celular; variaciones de la relación entre cada fragmento).

Para estos modelos, y de forma específica para cada modelo, se modifica igualmente la expresión de los fragmentos A-F en funcional del estado de diferenciación de las cepas celulares.

Estas variaciones también se observan en modelos animales, en particular en ratones transgénicos con las diferentes construcciones posibles (mutaciones APP y/o mutaciones PSI o PS2 y/o ausencia de expresión de PSI) y/o gen tau mutado o no mutado 14,5; 13,5; 12; 10,5; 9,5; 9; 8,5 y 6,5 kDa).

Por lo tanto, las muestras para analizar usadas en dicho procedimiento comprenden tanto tejidos o cepas celulares neuronales como tejidos o cepas celulares no neuronales, por ejemplo, líquidos biológicos como el líquido cefalorraquídeo, sangre y todo o parte de los elementos de los que constan, lo que facilita un diagnóstico precoz y la evaluación de factores de riesgo en un paciente o el seguimiento terapéutico.

Estos tejidos se homogeneizan o fraccionan ventajosamente, por ejemplo, por centrifugación, con el fin de usarlos en el procedimiento de detección.

El procedimiento anterior también se aplica al diagnóstico diferencial de patologías neurodegenerativas cercanas a la enfermedad de Alzheimer, como la demencia con cuerpos de Lewy o las angiopatías amiloides.

El procedimiento de detección definido antes permite definir un índice de transformación de la proteína APP en proteína patológica.

La invención trata en particular de un procedimiento de evaluación de un proceso patológico neurodegenerativo en una muestra para analizar, por análisis inmunoquímico, como se describe en los ejemplos, caracterizado porque se asigna un índice a los fragmentos identificados en la muestra estudiada, con respecto a una referencia en la que el índice 0 (cero) corresponde a la detección en tejido sano y el índice 100 (cien) en el tejido patológico, sea de ser humano, ratones transgénicos con mutaciones de los genes implicados en la patología de Alzheimer, o cepas celulares nativas o transfectadas con dichos genes.

Dicho índice presenta una ventaja en el diagnóstico y en el tratamiento terapéutico. Permite reflejar rápidamente el estado patológico. El valor del índice permite determinar si existe un riesgo de desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. La obtención de un índice elevado puede ayudar a confirmar un diagnóstico clínico.

Además, en el marco de un tratamiento terapéutico basado en el catabolismo y el metabolismo de la APP o su corrección, las modificaciones de dicho índice permitirán seguir el efecto del tratamiento.

Constituye una referencia que permite comparar el efecto de diferentes moléculas contra la enfermedad de Alzheimer u otras patologías neurodegenerativas, demostrando una modificación del índice la eficacia de las moléculas ensayadas y el potencial de su interés terapéutico.

El uso de dicho índice también tiene interés para analizar los sucesos etiológicos precoces responsables de la enfermedad, y llegar a descubrir nuevas moléculas eficaces, así como desarrollar nuevas estrategias terapéuticas.

Se apreciará igualmente, que este índice se puede usar para ralentizar o también para inducir una degeneración para establecer nuevos modelos experimentales. Este índice también puede proporcionar informaciones que permitan provocar una degeneración dirigida en el marco de acciones terapéuticas que requieren provocar la desaparición de una población de células determinada.

El procedimiento según la invención puede usar con ventaja adicionalmente un conjunto de anticuerpos policlonales y/o monoclonales con el fin de poner de manifiesto las modificaciones postraduccionales de la transformación patológica de los fragmentos APP-Cter, en particular una modificación de tipo fosforilación, y/o metilación y/o acetilación y/o glicosilación.

Preferiblemente, el conjunto de anticuerpos policlonales y/o monoclonales usados permite revelar las fosforilaciones y la variación de expresión de los fragmentos de 14,5; 12 y 10,5 kDa.

El procedimiento de detección según la invención se puede usar ventajosamente para establecer y validar modelos experimentales, células o modelos animales de la enfermedad de Alzheimer. Los moldeos pertinentes reproducirán las modificaciones de los fragmentos APP-Cter que se observan en el tejido humano, como se describe en los ejemplos.

5 Permite también ayudar a poner en práctica ensayos terapéuticos eficaces para mejorar la selección de los pacientes.

Otra aplicación de gran interés, se refiere al cribado farmacológico para seleccionar medicamentos eficaces contra las patologías neurodegenerativas de tipo Alzheimer. Así, las moléculas seleccionadas se caracterizan porque pueden modificar el perfil de Alzheimer mencionado antes, conduciendo a una restauración de las propiedades de los marcadores APP-Cter, o a una restauración de sus propiedades físico-químicas (solubilidad, carga eléctrica).

Por lo tanto, la invención permite realizar un cribado farmacológico rápido y pertinente de moléculas de interés.

15 La invención se refiere también a un kit de diagnóstico de la transformación patológica de la APP, caracterizado porque comprende un conjunto de anticuerpos policlonales y/o monoclonales dirigidos contra la región carboxi terminal de la APP. El uso de un conjunto de anticuerpos dirigidos contra las modificaciones postraduccionales ligadas a la transformación patológica, situadas en los fragmentos APP-Cter, como por ejemplo sitios de fosforilación, metilación, acetilación o glicosilación en estos fragmentos, podrá aportar ventajosamente informaciones complementarias de la evidencia y la cuantificación de la transformación patológica de los fragmentos APP-Cter.

20 La heterogeneidad de los fragmentos APP-Cter demostrada por las electroforesis 2-D, se explica en parte por las modificaciones de fosforilación, como demuestra un anticuerpo policlonal fosfodependiente dirigido contra la treonina 668 fosforilada (nomenclatura con la APP 695), situada en la región común a los fragmentos APP-Cter.

25 Son también resultado de la glicosilación, como demuestran los fármacos antiglicosilación que modifican el perfil de los fragmentos APP-Cter. La metilación y la acetilación son dos modificaciones postraduccionales que también están implicadas en la transformación patológica de los fragmentos APP-Cter. En efecto están localizadas esencialmente en los restos de lisina, lo cual provoca una acidificación y por lo tanto un cambio del punto isoeléctrico.

30 Son también resultado del control por genes implicados en la enfermedad de Alzheimer. De esta forma, la sobreexpresión de la proteína Tau puede influir en la relación de las bandas de 13,5; 9,5 y 6,5 kDa.

35 Estos anticuerpos pueden usarse en análisis inmunoquímicos, por ejemplo en ELISA, transferencia Western y transferencia en mancha. Los kits de acuerdo con la invención, contendrán por lo tanto ventajosamente los elementos necesarios para realizar dichos análisis.

Otras ventajas y características de la invención aparecerán en los siguientes ejemplos, con referencia a las figuras 1 a 16, que representan respectivamente,

40 - el esquema teórico de corte de los fragmentos APP-Cter y la localización de los epítomos de los anticuerpos usados (figura 1)

- las fotos de las transferencias Western de

45 - tejido cerebral humano (1-D) (figuras 2A a 2B), y análisis de los fragmentos APP-Cter (fig. 2C y 2D).

- fraccionamiento de tejido cerebral humano (figuras 3A y 3B)

- tejido cerebral humano (2-D) (figuras 4A a 4C),

50 - tejido cerebral de ratones transgénicos (1-D) (figuras 5A y 5B),

- tejido cerebral de ratón (2-D) (figura 6),

55 - un resumen de los perfiles 2-D de fragmentos APP-Cter en ratones, tejido cerebral humano y linfocitos humanos (figuras 7A, 7B y 7C respectivamente),

- las fotos de las transferencias Western de

60 - tejido cerebral de rata WT y SW, de cepas celulares no neuronales con APP wt y sw (figura 8),

- comparación del tejido cerebral humano con las cepas celulares de tipo neuronal transfectadas o no con APP wt, sw, PSI mutado, Tau 3R o 4R (figura 9),

65 - linfocitos humanos: análisis 1-D y 2-D (figuras 10A y 10B),

- la caracterización de los fragmentos APP-Cter con los anticuerpos anti-A β -N-terminal, APP-Cter y un anticuerpo APP-Cter fosfodependiente (figura 11)

ES 2 305 126 T3

- índice de transformación patológica (figuras 12 A a D),
- influencia de la fosforilación en la transformación patológica de APP-Cter (figura 13)
- tablas que recogen las variantes según la invención (figuras 14 a 16).

Materiales y procedimientos

Anticuerpos

Producción del anticuerpo policlonal APP-Cter-C17

Se prepara un anticuerpo policlonal dirigido contra la parte carboxi terminal de la APP, según el protocolo de inmunización descrito por Vaitukaitis y col. (5). Se inmunizan conejos de Nueva Zelanda con un péptido que comprende los 17 últimos aminoácidos de la secuencia de la APP humana, correspondientes a su extremo carboxi terminal. El péptido se acopla covalentemente a ovalbúmina. Se inyectan 200 μ g de inmunógeno cada dos semanas. Antes de la inyección, la solución de inmunógeno se completa con 1 volumen de adyuvante completo de Freund durante la primera revacunación y durante las siguientes revacunaciones con adyuvante incompleto de Freund en lugar del adyuvante completo. Se coge sangre una semana después de la 4ª inyección y una semana después de cada una de las siguientes inyecciones. Se obtiene el suero puro después de coagulación de la sangre y centrifugación 10 min a 2000 g. Se añade al suero puro 1 volumen de glicerol y se conserva la mezcla a -20°C.

Purificación del anticuerpo APP-Cter-C17

1 mg de péptido usado para la inmunización se acopla a una matriz NHS-Fast Flow Sepharose® (Amersham-Pharmacia Biotech) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se pone en contacto la matriz acoplada con 200 μ l de suero puro diluido en un volumen de tampón de unión 2X (Tris 50 mM pH 8,0; NaCl 300 mM y Tween-20 al 0,1% (v/v)) y se agita suavemente hasta el día siguiente a 4°C. Se hace pasar la totalidad de las soluciones por una columna PD-10. Se lava la matriz con 10 volúmenes de tampón de unión. El anticuerpo purificado se eluye con 2 volúmenes de tampón de acetato a pH 3,5. La concentración de proteína se determina con ayuda del kit de cuantificación de proteína BCA de Pierce.

Producción del anticuerpo policlonal APP-668P

Se produce un anticuerpo dirigido con un péptido sintético que corresponde a la secuencia Val-Asp-Ala-Ala-Ala-Val-Thr(fosforilada)-Pro-Glu-Glu-Arg-His-Leu, siguiendo el mismo protocolo que el usado para la APP-Cter-C17. Este anticuerpo reconoce el inmunógeno, pero no reconoce un péptido que tenga la misma secuencia, pero que no esté fosforilado.

Muestras

Muestras de tejido cerebral humano y murino

El tejido cerebral humano procede de pacientes a los que se hace un seguimiento prospectivo, y descritos en (6). Las muestras de tejido cerebral, obtenidas después de autopsia o biopsia y conservadas a -80°C, se diseccionan con ayuda de un atlas anatómico, y después se homogeneizan con un Potter-Teflon® en 10 volúmenes de tampón de lisis 1-D 1X (Tris-HCl 50 mM pH 6,8; EDTA 4 mM; SDS al 5% (p/v), glicerol al 10% (v/v), β -mercaptoetanol al 2% (v/v) y azul de bromofenol al 0,05%) para un análisis 1-D. Las muestras se llevan a 100°C durante 10 minutos y después se mantienen a -80°C hasta su uso. Para un análisis 2-D, el tejido se homogeneiza en tampón de Tris-HCl 10 mM pH 6,8, y después se complementa con un volumen de tampón 2-D 2X (urea 7 M; tiourea 2 M; Pharmalytes® 3-10 (p/v) al 0,4%; Triton X-100 al 8% (v/v); ditiotretitol 10 mM; azul de bromofenol al 0,1%) y se almacena a -80°C hasta su uso. Para las muestras de tejido cerebral de roedor, se saca el cerebro rápidamente después de la muerte del animal y se trata de la misma forma que las muestras humanas.

Linajes murinos usados

Se preparan muestras de tejido cerebral murino siguiendo el mismo protocolo que para las muestras de tejido cerebral humano. Se usan muestras de tejido cerebral de ratones no transgénicos y de ratones transgénicos con el gen humano APP de tipo salvaje (APPwt) o el gen humano APP mutado en los codones 670 y 671 (APPsw). Esta mutación de la APP está ligada a una forma familiar de la enfermedad de Alzheimer llamada mutación sueca (7). Se usan igualmente otras muestras que comprenden ratones no transgénicos y diferentes linajes de ratones transgénicos con el gen APPwt y APPsw. También se usa una muestra de tejido cerebral murino similar a la del ratón transgénico, desarrollado por Hsiao K. y col. (8).

Muestras de tejido cerebral después de fraccionamiento de proteínas

Las muestras de tejido cerebral se homogeneizan según una relación 1/10 (p/v) en un tampón Tris-HCl 10 mM pH 6,8, y después se centrifugan a 100.000 g durante 1 hora a 4°C. El líquido sobrenadante (F1) se conserva y el

ES 2 305 126 T3

sedimento se vuelve a homogeneizar en el mismo tampón complementado con Triton X-100 al 0,5% (v/v). Después de centrifugación, la fracción soluble en Triton X-100, llamada fracción F2, se guarda. Se lleva a cabo una etapa suplementaria de extracción y centrifugación en el mismo tampón en las mismas condiciones, lo que da la fracción F2'. El sedimento después se recoge directamente en el tampón de tisis 1-D (véase a continuación) y corresponde a la fracción F3.

De acuerdo con la técnica bioquímica usada, en el momento de uso se añaden a los líquidos sobrenadantes los tampones correspondientes: 1 volumen de tampón de tisis 1-D 2X (Tris-HCl 100 mM pH 6,8; EDTA 8 mM; SDS al 10% (p/v); glicerol al 20% (v/v); p-mercaptoetanol al 4% (v/v) y azul de bromofenol al 0,1%) para el estudio por electroforesis monodimensional (1-D) o 1 volumen de tampón de tisis 2-D (urea 7 M; tiourea 2 M; Pharmalytes® 3-10 al 0,4% (p/v); Triton X-100 al 4% (v/v); ditiotretitol 10 mM; azul de bromofenol al 0,1%) para el estudio por electroforesis bidimensional (2-D).

Inmunoprecipitación

La fracción F2 se usa para la inmunoprecipitación de los fragmentos APP-Cter. Se diluyen 100 µl de la fracción F2 en 300 µl de tampón Tris 10 mM 5 pH 7,4 que contiene NP-40 al 1% (tampón de inmunoprecipitación). Se añaden 10 µl de anticuerpo APP-CterC17 o APP668P y el conjunto se incuba con agitación durante la noche a 4°C. Se añaden 40 µl de proteína A fijada sobre bolas de agarosa (Pierce) a la solución y el conjunto se incuba a 4°C durante una hora. Las bolas de agarosa se lavan tres veces en tampón de inmunoprecipitación y después los fragmentos APP-Cter se desenganchan por tratamiento con 50 µl de tampón SDS y se recuperan en el líquido sobrenadante de la centrifugación. Después los fragmentos APP-Cter se analizan por inmunotransferencia después de electroforesis en gel de Tris-Tricina.

Muestras de cultivos celulares de CHO (hámster) o SKNSH SY5Y (humano)

Las células son transfectadas de forma estable con el gen APP humano de tipo salvaje o el gen APP humano que lleva la mutación sueca. El sedimento celular se recoge en tampón de Tris-HCl 10 mM pH 6,8 y después se pasa por ultrasonidos. Antes de usarla, la muestra se completa con 1 volumen del tampón de lisis correspondiente al experimento (1-D o 2-D) 2X. En el caso de un análisis 1-D, la muestra se lleva 10 min a 100°C.

Muestras de leucocitos humanos

Preparación de leucocitos humanos: se recogen 10 mililitros de sangre en tubos con EDTA (tetraacetato de etilendiamina). Se lleva a cabo una centrifugación a 4500 rpm (revoluciones por minuto) durante 15 minutos. Se elimina el plasma. El tubo se rellena hasta dos tercios con una solución de tisis de glóbulos rojos (solución de lisis: NH₄CO₃ 0,91 mM y NH₄Cl 0,132 mM). Se agita delicadamente el tubo y se pone al baño maría refrigerado a 5°C. Se lleva a cabo una centrifugación a 4000 rpm durante 15 minutos y se elimina el líquido sobrenadante. El sedimento de leucocitos se aclara dos veces con la solución de tisis siguiendo la misma metodología. Después el sedimento se oscurece, sea para ser usado en las 24 horas siguientes o sea para congelar a -20°C para su transporte y posterior uso.

El sedimento de leucocitos se recoge en un tampón de Tris-HCl 10 mM pH 6,8 y después se pasa por ultrasonidos. Antes de usarla, la muestra se completa con 1 volumen de tampón de tisis 2X correspondiente al experimento (1-D o 2-D). En el caso de un análisis 1-D, la muestra se lleva 10 min a 100°C.

Técnicas electroforéticas

Electroforesis 1-D

Los experimentos se realizan con ayuda del sistema de electroforesis Protean IIXi Cell (Biorad) según las instrucciones del fabricante.

Las electroforesis 1-D se realiza según los protocolos descritos por Laemmli (9) para fabricar el gel y en las condiciones de migración descritas por Schagger y Von Jagow (10). El gel de concentración contiene acrilamida al 4% y el gel de separación usado contiene acrilamida al 16,5%. La migración se hace en tampón de Tris-Tricina. El programa de migración usado es el siguiente: 1 h a 30 V constante y después 16 h a 45 mA.

Se carga una cantidad equivalente de proteína en cada pocillo (aproximadamente 100 µg/pocillo).

Electroforesis 2-D

1ª Dimensión

La primera dimensión o focalización se hace con ayuda de bandas de gel precortadas llamadas IPG-Strip® que cubren un gradiente de pH 3-10, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El material usado para la isoelectrofocalización es el sistema IEF Protean Cell (Biorad)

ES 2 305 126 T3

Una cantidad de 250 μg de proteínas se complementa con un tampón de rehidratación IX (urea 7 M, tiourea 2 M, Triton X-100 al 4%; CHAPS al 0,5%; Pharmalytes® pH 3-10 al 0,2% (p/v); DTT 10 mM; naranja G al 0,01%) para tener 400 μl para depositar. Los 400 μl de muestras se depositan sobre las bandas puestas en el aparato. Se deja rehidratar de forma pasiva durante 1 h y después de forma activa 10 h a 50 V/banda, y después se inicia el programa de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de focalización, las bandas se usan o se conservan a -80°C .

2ª Dimensión

Antes de usarlas, las bandas se equilibran durante 30 minutos en un tampón para 1-D (Tris-HCl 50 mM pH 6,8; glicerol al 10% (v/v); β -mercaptoetanol al 2% (v/v); SDS al 2% (p/v), y azul de bromofenol al 0,05% (p/v) y después se depositan en la parte superior de un gel de separación para 1-D de acrilamida al 16,5%. Se recubre la banda con una solución de agarosa al 1% (p/v). Se sigue de forma idéntica a una electroforesis sencilla 1-D.

Transferencia sobre membrana e inmunotransferencia

Transferencia

La transferencia se lleva a cabo usando el sistema de transferencia semiseco Pharmacia LKB multiphor® siguiendo las instrucciones del fabricante (Amersham-Pharmacia Biotech). Las proteínas se transfieren a 0,8 mA/cm² sobre una membrana de nitrocelulosa Hybond® ECL (Pharmacia-Amersham).

Inmunotransferencia

La membrana se incuba 60 min en un tampón (Tris 15 mM pH 8,0; NaCl 150 mM; Tween®-20 al 0,5% (v/v)) que contiene 5% (p/v) de leche descremada y después se lava con el mismo tampón sin la leche, que contiene Tween®-20 al 0,1% en lugar de al 0,5%.

La membrana se incuba 2 h a temperatura ambiente o 1 noche a 4°C , con el anticuerpo APP-Cter-C17 diluido a 1/2000 (v/v) final en un tampón de incubación (Tris 15 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,1% (v/v) y leche descremada al 3% (p/v)).

La membrana se lava 3 veces durante 10 minutos en el tampón de incubación sin la leche.

La membrana después se incuba 1 h a temperatura ambiente con inmunoglobulina de cabra anticonejo acoplada con peroxidasa de rábano, con una dilución final de 1/4000 (v/v) en el tampón de incubación, sin la leche.

La membrana se lava 3 veces durante 10 minutos en el tampón de incubación sin la leche, y los polipéptidos inmunorreactivos se separan con ayuda de un kit de quimioluminiscencia ECL® (Pharmacia-Amersham Biotech) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Resultados

El análisis teórico de los cortes catabólicos y/o metabólicos de la APP se presenta en la figura 1A y la localización de los epítomos de los anticuerpos usados en la figura 1B.

Análisis 1-D del tejido cerebral humano

Se cargan y analizan muestras de tejido cerebral humano, preparadas como se ha descrito en la metodología para un análisis 1-D. La separación electroforética tiene lugar en condiciones de Tris-Tricina como se describe. Se depositan marcadores de pesos moleculares calibrados (Biorad) en paralelo con el fin de determinar la masa molecular de los fragmentos mediante el programa ImageMaster® 1-D Elite (Amersham-Pharmacia Biotech).

Se llevan a cabo una transferencia de las proteínas separadas por electroforesis y una inmunotransferencia con el anticuerpo APP-Cter-C17 como se ha descrito. Los resultados se representan en la figura 2, A1.

Análisis del tejido normal

En el tejido cerebral humano testigo se revelan mediante el anticuerpo policlonal APP-Cter-C17 cinco bandas llamadas A, B, C, D y E de masas moleculares aparentes A 14,5 kDa; B 13,5 kDa; C 12 kDa; D 10,5 kDa; E 9,5 kDa. Se detectan tanto en la biopsia del tejido cerebral humano como en el tejido cerebral *post mortem* de un sujeto testigo (figura 2, A2; pista 1: biopsia; pistas 2 y 3: autopsia). El retraso *post mortem* se indica en horas en cada una de las muestras. Se puede apreciar que el perfil de los fragmentos no se modifica en el transcurso del retraso *post mortem*. Por lo tanto los 5 fragmentos no resultan de una actividad enzimática catabólica que pueda producirse después de la muerte.

*Análisis de tejido de pacientes en diferentes etapas de la enfermedad de Alzheimer**A) Disminución de la cantidad de fragmentos APP-Cter en el curso del desarrollo del Alzheimer*

La figura 2B representa el análisis, en las mismas muestras y las mismas inmunotransferencias, de la patología tau según la clasificación de Delacourte y col., 1999 (figura 2, B1) y de fragmentos APP-Cter (figura 2, B2) en un sujeto testigo (pistas 1 y 2) y dos pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer (pistas 3 a 6). Se han estudiado dos regiones cerebrales: el hipocampo (Hip, pistas 1, 3 y 5) y la corteza occipital (Oc, pistas 2, 4 y 6). Se aprecia una disminución de los fragmentos APP-Cter en el transcurso de la enfermedad. Esta desaparición se correlaciona con la gravedad del alcance neurodegenerativo. Efectivamente, se puede apreciar que los fragmentos APP-Cter desaparecen (figura 2, B2) en las regiones tocadas por la patología tau, visualizado por la presencia del triplete de proteínas tau patológicas de 69, 64 y 60 kDa (figura 2, B1) (Delacourte y col. (6)).

Un estudio estadístico con un gran número de pacientes, muestra la excelente correlación entre el avance del proceso patológico, puesto de manifiesto por las etapas de la patología tau, y la disminución de la cantidad de fragmentos APP-Cter en las muestras de tejido cerebral estudiado.

Las cantidades de APP-Cter se han determinado en la corteza de 4 grupos de pacientes: grupo de testigos (Ctrl), grupo de infraclínicos (infraEA) que corresponden a pacientes sin demencia pero con las lesiones características de la enfermedad de Alzheimer, grupo de clínicos de enfermedad de Alzheimer (EA) y grupos familiares autosómicos dominantes de la enfermedad de Alzheimer (FAD.EA) (figura 2, C). El ensayo estadístico no paramétrico de Mann-Whitney indica una disminución significativa entre los grupos infraEA y EA en relación con los testigos Ctrl (infraEA: $p < 0,03$; EA $p < 0,002$). La disminución media de los APP-Cter es de 1,5 veces para el grupo infraEA y 1,7 veces para el grupo EA, en relación con el grupo testigo. La disminución de los APP-Cter en los grupos infraEA y EA no es significativamente diferente. Esto demuestra que esta disminución de APP-Cter es un suceso precoz de la fisiopatología del Alzheimer.

Se ha realizado el estudio estadístico de la relación entre los niveles de expresión de los APP-Cter en relación con las etapas de la patología tau en la corteza temporal de pacientes testigo y en diferentes etapas de la enfermedad de Alzheimer (figura 2, D). Se observa una relación significativa entre las cantidades de APP-Cter detectadas en la corteza de cada paciente estudiado y las diferentes etapas de la patología tau, tanto en la corteza temporal como en la corteza occipital.

Regresión lineal

	n	r	p
corteza temporal	26	0,614	0,0009
	n	r	p
Corteza occipital	22	0,457	0,0324

B) Transformación de los fragmentos APP-Cter en el curso del proceso de desarrollo del Alzheimer

Los fragmentos APP-Cter se extraen preferiblemente en dos fases: una solución tampón que contiene un detergente no iónico, Triton X-100 (Fracción F2), y una solución que contiene un detergente iónico, el dodecilsulfato sódico (SDS) (F3) (figura 3, A).

Se observan variaciones diferenciales de la solubilidad de los fragmentos APP-Cter en el curso del desarrollo del Alzheimer en el tejido cerebral (figura 3B). Se aprecia un aumento de la solubilidad de los fragmentos APP-Cter de masa molecular 9,5 (fragmento E) y 10,5 kDa (fragmento D) en la fracción F2 y un aumento de la insolubilidad de los fragmentos APP-Cter de masa molecular 13,5 (fragmento B) y 14,5 kDa (fragmento A) en la fracción F3.

Análisis 2-D del tejido cerebral humano normal y patológico

En la figura 4 (A a C) se presentan los resultados de 3 pacientes

- un paciente testigo, sin lesiones cerebrales de tipo Alzheimer (etapa 0 de Delacourte y col. (6)) (figura 4A)

- un paciente al principio de la fase clínica de la enfermedad de Alzheimer, en la etapa 6 de Delacourte y col. (6) (figura 4B)

Las flechas indican las manchas detectadas por el anticuerpo policlonal APP-Cter-C17. Sus masas moleculares son similares a las observadas en las inmunotransferencias 1-D. Los puntos isoeléctricos están comprendidos en el intervalo de pH de 4,5 a 7,5.

Se puede apreciar una modificación del reparto de las manchas en el curso del desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (figura 4, C). Los pacientes en una etapa más avanzada de la enfermedad de Alzheimer no se han podido estudiar mediante este enfoque, ya que los fragmentos ya no son detectables.

Las variantes de APP-Cter detectadas por análisis 2D se representan esquemáticamente (figura 4, C) en una cuadrícula calibrada en dos dimensiones, en la que el eje Y representa las masas moleculares y el eje X los puntos isoelectricos. El conjunto se ha referenciado con testigos internos de peso molecular y de punto isoelectrico. Los testigos de punto isoelectrico son la gamma-enolasa (47/4,94), alfa-actina (42/5,29) y alfa-enolasa (47/6,99). Los puntos isoelectricos a 5,54 y 8,05 son patrones internos del tejido cerebral.

El esquema de la figura 4, representa la superposición de los perfiles 2D de los fragmentos APP-Cter detectados con el anticuerpo APP-Cter-C17 en el tejido cerebral humano de un sujeto testigo y de pacientes de Alzheimer en la etapa infraclínica de la enfermedad y al principio de la etapa clínica de la enfermedad de Alzheimer. Las manchas, es decir, las diferentes variantes isoelectricas de 2-D observadas a la vez en el tejido sano y el patológico se representan por círculos blancos. Las manchas específicas del tejido sano se representan por círculos con el fondo rayado y las específicas del tejido con Alzheimer con fondo negro.

Los valores de las masas moleculares y de los puntos isoelectricos de las manchas modificadas en el curso de la patología del Alzheimer se dan en la tabla 1.

Análisis 1-D del tejido cerebral murino

Con el fin de caracterizar mejor la especificidad del catabolismo y/o el metabolismo de la APP humana, se han analizado los productos de la APP-Cter (de la misma forma que en el tejido cerebral humano) en una rata y en ratones no transgénicos y también en ratones transgénicos para el gen de la APP humana salvaje (APPwt) o que llevan la mutación sueca (APPsw). La figura 5A representa el inmunomarcado de los fragmentos APP-Cter de ratones testigo y transgénicos, comparado con el perfil del tejido cerebral humano (figura 5A, pista 4).

Se depositan depósitos de homogeneizados idénticos de tejido cerebral en cada pocillo electroforético. Los fragmentos APP-Cter se detectan con el anticuerpo policlonal APP-Cter-C17. La pista 1 de la figura 5 corresponde al análisis del ratón no transfectado (control negativo), la pista 2 corresponde al ratón con una sola copia del gen humano APPwt, la pista 3 corresponde al ratón transgénico con el gen mutado humano APPsw y la pista 4 corresponde al tejido cerebral humano testigo. Las flechas indican las masas moleculares de las bandas electroforéticas detectadas.

Se puede apreciar que los ratones testigo o con una sola copia del gen APPwt sintetizan esencialmente 4 fragmentos APP-Cter, mientras que el ratón con el gen APPsw y el tejido cerebral humano sintetizan 5 fragmentos APP-Cter, de masas moleculares 14,5; 13,5; 12; 10,5 y 9,5 kDa.

Estos resultados se han verificado en 5 ratones no transgénicos, 2 ratones transgénicos con el gel APP humano de tipo salvaje y 5 ratones transgénicos con el gen APPsw.

En la figura 5B, pistas 1 a 3, se dan los resultados de la inmunotransferencia con el anticuerpo APP-Cter-C17 en diferentes linajes de ratones transgénicos APPsw (fig. 5B, pistas 1 a 3) entre las que se encuentra el linaje APPsw (pista 3) de referencia descrita por Hsiao y col. (8). Los ratones transgénicos APPsw tienen un perfil sistemáticamente particular, como se describe en este documento.

Análisis 2-D de los fragmentos APP-Cter de tejido cerebral de ratón

Se trabaja como se ha descrito para el tejido cerebral humano (figura 4). De esta forma, se pueden caracterizar las diferentes variantes observadas en los ratones testigo (figura 6A), APPwt (figura 6B) y APPsw (figura 6C). Se puede apreciar el aumento de la expresión de las variantes para los ratones APPsw y una modificación del perfil para determinadas variantes (figura 6).

Los valores de masas moleculares y de punto isoelectrico se dan en la figura 7A y en la tabla 3.

Análisis 1-D de las modificaciones de la APP humana en modelos celulares

- Modelos neuronales

Se analizan células CHO (ovario de hámster chino) transfectadas de forma estable con el gen APP humano de tipo salvaje (APPwt) o el gen APPsw, de acuerdo con el protocolo descrito. Los resultados de la figura 8 muestran los fragmentos APP-Cter de las células CHO, de forma comparativa con el tejido cerebral de ratón transgénico con el gen APPwt o APPsw.

En las células CHO con APPwt (figura 8, pista 3) se detectan 6 bandas de masas moleculares aparentes de 16; 14,5; 13,5; 12; 10,5 y 9,5 kDa. Las bandas principales son las bandas a 16; 14,5; 13,5 y 9,5 kDa. En las células CHO APPsw (figura 8, pista 4), se observa una disminución de la señal global, sobre todo de los fragmentos de 16; 13,5 y 9,5 kDa.

La comparación con los homogeneizados de tejido cerebral de ratón transgénico APPwt (pista 1) y APPsw (pista 2), indica que las bandas detectadas en las CHO son comunes a las del tejido cerebral, excepto por la banda a 16 kDa.

Se apreciará que las cepas de células gliales CCF, U118 y T98 tienen un perfil con 6 bandas a 13,5, 12, 10,5, 9,5, 9 y 8,5 kDa, con una abundancia de 3 bandas a 9,5 y 8,5 kDa (figure 8B). Se observa un perfil similar en las cepas celulares Hela, COS y SY-5Y transfectadas con APPsw (figura 8B).

Además, la cepa celular epitelial HT-29 presenta un perfil de 5 bandas a 14,5, 13,5, 12, 10,5, 9,5 y 9 kDa (figura 8: HT-29). La banda a 9 kDa que es discreta en las células epiteliales HT-29 se hace más abundante después de tratamiento con bencil-O-GalNac que inhibe la glicosilación y la dirección de las proteínas glicosiladas. Esto demuestra que la glicosilación es una modificación postraduccional que regula la expresión y el perfil de las APP-Cter. Por lo tanto, esta modificación es un elemento importante a tener en cuenta en la investigación de las transformaciones patológicas moleculares de las APP-Cter en el curso del desarrollo del Alzheimer.

- Modelos neuronales

Se analizan células de neuroblastoma humano (SKNSH-SY5Y) transfectadas de forma estable, con los genes APPsw, APPwt, PSI mutado y Tau, en comparación con células no transfectadas. Los resultados se representan en la figura 9. En las células no transfectadas, la señal de APP-Cter corresponde a la banda de 10,5 kDa (figura 9: nativo). En contraposición, se pueden identificar perfectamente 6 fragmentos a 13,5, 12, 10,5, 9,5, 9 y 8,5 kDa en células SKNSH no diferenciadas, transfectadas con APPsw (figura 9: APPsw). Se encuentra igualmente el perfil de las 6 bandas con las células transfectadas con APPwt (figura 9: tipo salvaje). La transfección de las células SY5Y con el gen PSI mutado provoca un aumento de las 5 bandas, de la banda a 9,5 kDa que aquí es abundante, e igualmente del fragmento de 6,5 kDa, liberado por la actividad de la gamma-secretasa.

Otras líneas neuronales nativas tienen también perfiles de tipo SKNSH nativo, como las células Kelly, o, por otra parte, como las células SKNSH transfectadas con un gen mutado de la APP o PSI, como las células NT2 y hNT.

La diferenciación durante 14 días de células SY5Y provoca un cambio de perfil, con la aparición de la banda gamma a 6,5 kDa y una disminución de la banda a 10,5 kDa. En las mismas condiciones, en las células transfectadas con el gen tau 3R y no diferenciadas se ve aparecer la banda a 13,5 kDa, que corresponde a un aumento de la liberación de los fragmentos de la "beta-secretasa". En estas células diferenciadas se observa la desaparición de la banda gamma a 6,5 kDa.

Esto demuestra que hay genes que pueden modular la expresión y la proporción relativa de los fragmentos APP-Cter. Por lo tanto, estos modelos tienen el potencial de modelizar las modificaciones patológicas de fragmentos APP-Cter, como los que se observan en el tejido cerebral humano.

Análisis de los fragmentos APP-Cter de leucocitos humanos

Se preparan sedimentos de leucocitos humanos según un protocolo estándar usado en el laboratorio de análisis (médico u hospitalario). Estos sedimentos se tratan como se ha descrito y se analizan por inmunotransferencia con el anticuerpo APP-Cter-C17. Los resultados se dan en la figura 10A, en la que las pistas 1 a 5 corresponden a los testigos y las pistas 6 a 11 a muestras que proceden de pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer. Figuran el sexo y la edad (figura 10A: sexo.edad).

El anticuerpo APP-Cter-C17 detecta tres fragmentos de masas moleculares 10 kDa, 10,5 kDa y 9,5 kDa.

Un análisis 1-D comparativo entre los leucocitos de sujetos testigo y de pacientes a los que se ha diagnosticado la enfermedad de Alzheimer ha permitido poner de manifiesto (como en el estudio del tejido cerebral humano) una disminución de los fragmentos APP-Cter en los leucocitos de los enfermos (pistas 6 a 11) en relación a los leucocitos de testigos (pistas 1 a 5).

También se analizan las variantes de los fragmentos APP-Cter de los leucocitos en 2-D (figura 10B). Los valores de masa molecular y de punto isoeléctrico de cada mancha detectada se dan en la figura 7C y la tabla 2.

Caracterización de los fragmentos APP-Cter con diferentes sondas inmunológicas

Un anticuerpo dirigido contra el extremo N-terminal del péptido AR permite localizar el fragmento de corte de la beta-secretasa. Se trata del anticuerpo FCA18 (4). El fragmento de 14 kDa de los leucocitos es detectado por este anticuerpo, lo que indica que se trata del fragmento APP-Cter producido por la beta-secretasa (figura 11B). En el tejido cerebral, las dos bandas A (14,5 kDa) y B (13,5 Kda) son reconocidas por WO2, un anticuerpo monoclonal (Abeta, GMBH, Heidelberg, Alemania) dirigido contra la parte 5-11 del péptido A β , mientras que la banda 3 es detectada por FCA18, lo que indica que las bandas A y B son generadas por un corte situado a nivel de la región de la beta-secretasa (véase la figura 1). Además, el examen de las bases de datos (SwissProt, por ejemplo) indica que el fragmento APP-Cter de masa molecular de 9,5 kDa (figura 11) y de punto isoeléctrico 6,99, corresponde al fragmento de la alfa-secretasa, como se representa en la figura 1. Por lo tanto, se han identificado los dos fragmentos APP-Cter principales de los leucocitos que se modifican en el curso de la enfermedad de Alzheimer (figura 11, A y B).

Además, se pueden modificar de forma diferencial algunos sitios comunes a los 5 fragmentos A a C. Así pues, por ejemplo, un anticuerpo policlonal que reconoce específicamente la treonina 668 fosforilada reconoce preferiblemente las bandas A, C y D. El procedimiento descrito en este documento, permite caracterizar las modificaciones postraduccionales ligadas a los procesos degenerativos. De este hecho se deduce la posibilidad de elaborar nuevas herramientas inmunológicas que complementarán con ventaja el kit de diagnóstico de la transformación patológica de los fragmentos APP- Cter.

La fosforilación de los fragmentos APP-Cter es un elemento determinante de su transformación patológica

En la enfermedad de Alzheimer se produce una modificación del metabolismo y de la fosforilación de los APP-Cter. Se hacen inmunoprecipitar los APP-Cter del tejido cerebral de un sujeto testigo y de un paciente de Alzheimer con ayuda del anticuerpo APP-Cter-C17 y se revelan los 5 fragmentos de 14,5, 13,5, 12, 10,5 y 9,5 kDa (fragmentos A, B, C, D y E) después de electroforesis en gel de Tris-Tricina con el mismo anticuerpo (figura 13, pistas 1 y 2). Los fragmentos APP-Cter inmunoprecipitados se fosforilan con ayuda de la fosfatasa alcalina de intestino de ternero (figura 13, pistas 3 y 4) y después se revelan con el anticuerpo APP-Cter-C17 siguiendo el mismo protocolo. Se detectan tres fragmentos principales en el homogeneizado testigo a 13,5; 10,5 y 9,5 kDa. Estos tres fragmentos también se detectan en el homogeneizado de Alzheimer. Sin embargo, el fragmento a 13,5 kDa está en menor cantidad, mientras que los fragmentos a 10,5 y 9,5 kDa están en mayor cantidad. Este resultado muestra la acumulación de los fragmentos generados por el corte de la alfa-secretasa, y también su fosforilación más importante.

Las modificaciones del índice de fosforilación se demuestran en particular con los anticuerpos antitreonina 668 fosforilada (figura 13, pistas 5 y 6). Los fragmentos APP-Cter fosforilados en la treonina 668 se hacen inmunoprecipitar y se revelan con ayuda del anticuerpo APP-Cter-C17 después de electroforesis en gel de Tris-Tricina. Los fragmentos a 14,5; 12 y 10,5 se detectan en el homogeneizado testigo. En el homogeneizado de Alzheimer se detectan en gran cantidad esencialmente los fragmentos a 12,5 y 10,5 kDa. Este resultado confirma que los fragmentos APP-Cter C y D son fosforilados más y en mayor cantidad en la fase precoz de la enfermedad de Alzheimer, y que paralelamente el fragmento A es fosforilado poco o no es fosforilado en el sitio 668.

Resumen

En las tablas resumen (figuras 14 a 16) se describen variantes particularmente informativas para poner en práctica la invención. Estas diferentes variantes constituyen marcadores de gran interés para detectar las modificaciones patológicas de la APP, tanto en los tejidos neuronales como en los tejidos no neuronales, y en particular los linfocitos.

La fosforilación en las treoninas, serinas y tirosinas de los fragmentos APP-Cter (figura 1) contribuye al perfil general de las APP-Cter. En primer lugar, se observa una diferencia en el índice de fosforilación de estos diferentes fragmentos APP-Cter, como lo muestra en particular la treonina 668 fosforilada (figuras 11 y 13). Después, el perfil de los fragmentos APP-Cter desfosforilados se modifica, con la desaparición, en particular, de la banda de 14,5 kDa, y el nuevo perfil se parece al de los modelos celulares de SKNSH transfectados con APPsw (Figura 13).

La desfosforilación de los fragmentos APP-Cter pone de manifiesto además, un cambio en el perfil entre el tejido normal y el tejido de Alzheimer, con una acumulación particular de las bandas C, D, E de los fragmentos APP-Cter correspondientes a los productos de corte de la alfa-secretasa (figura 13). Por lo tanto, la fosforilación es un suceso postraducciona importante, y un marcador de la transformación patológica de los fragmentos APP-Cter.

Esta modificación se refleja igualmente en el fragmento de la gamma-secretasa, de 6,5 kDa, cuya expresión es modificada por los genes implicados en la enfermedad de Alzheimer, como muestran los modelos celulares (figura 9).

La detección de los fragmentos APP-Cter permite definir un índice de transformación patológica, aplicable al tejido humano neuronal (figura 12A: tejido cerebral humano) o no neuronal (figura 12B: linfocitos humanos), así como a los modelos experimentales animales (figura 12C: tejido cerebral de ratón transgénico APPsw y wt) o celulares, neuronales (figura 12D, células de neuroblastoma) o no neuronales (células CHO, COs, ...). Este índice varía de 0 (tejido sano) a 100% (tejido patológico con Alzheimer) (figura 12).

Referencias

1. De Strooper B., Konig G. (1999) Alzheimer's disease. A firm base for drug development [news] [comment]. *Nature*, 402, 471-2.
2. Sigurdsson EM., Permanne B., Soto C., Wisniewski T., Frangione B. (2000) *In vivo* reversal of amyloid-beta lesions in rat brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 59, 11-7.
3. Schenk D., Barbour R., Dunn W., Gordon G., Grajeda H., Guido T., Hu K., Huang J., Johnson-Wood K., Khan K., Kholodenko D., Lee M., Liao Z., Lieberburg I., Motter R., Mutter L., Soriano F., Shopp G., Vasquez N., Vandevert C., Walker S., Wogulis M., Yednock T., Games D., Seubert P. (1999) Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400:173-7.

4. **Ancolio K., Dumanchin C., Barelli H., Warter JM., Brice A., Campion D.**, y col. (1999) Unusual phenotypic alteration of beta amyloid precursor protein (betaAPP) maturation by a new Val-715 --> Met betaAPP-770 mutation responsible for probable early-onset Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 4119-24.

5. **Vaitukaitis J., Robbins JB., Nieschlag E., Ross GT.** (1971) A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 33, 988-91.

6. **Delacourte A., David JP., Sergeant N., Buee L., Wattez A., Vermersch P.**, y col. (1999) The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease, *Neurology*, 52, 1158-65.

7. **Duff K., Eckman C., Zehr C., Yu X., Prada CM., Pereztur J.**, y col. (1996) Increased amyloid-beta42 (43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature*, 383, 710-3.

8. **Hsiao K., Chapman P., Nilsen S., Eckman C., Harigaya Y., YOUNKIN S.**, y col. (1996) Correlative memory deficits, A beta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*, 274, 99-102.

9. **Laemmli UK.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.

10. **Schagger H., von Jagow G.** (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, 166, 368-79.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es sólo para la conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse posibles errores u omisiones y la OEP niega cualquier responsabilidad al respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 5234814 A [0014]
- W0 9407144 A [0014]

Documentos de patentes no citados en la descripción

• **DE STROOPER B; KONIG G.** Alzheimer's disease. A firm base for drug development. *Nature*, 1999, vol. 402, 471-2 [0120]

• **SIGURDSSON EM; PERMANNE B; SOTO C; WISNIEWSKI T; FRANGIONE B.** *In vivo* reversal of amyloid-beta lesions in rat brain. *J Neuropathol. Exp Neurol*, 2000, vol. 59, 11-7 [0120]

• **SCHENK D; BARBOUR R; DUNN W; GORDON G; GRAJEDA H; GUIDO T; HU K; HUANG J; JOHNSON-WOOD K; KHAN K.** Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*, 1999, vol. 400, 173-7 [0120]

• **ANCOLIO K; DUMANCHIN C; BARELLI H; WARTER JM; BRICE A; CAMPION D et al.** Unusual phenotypic alteration of beta amyloid precursor protein (betaAPP) maturation by a new Val-715 --> Met betaAPP-770 mutation responsible for probable early-onset Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, vol. 96, 4119-24 [0120]

• **VAITUKAITIS J; ROBBINS JB; NIESCHLAG E; ROSS GT.** A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *J Clin Endocrinol Metab*, 1971, vol. 33, 988-91 [0120]

• **DELACOURTE A; DAVID JP; SERGEANT N; BUEE L; WATTEZ A; VERMERSCH P et al.** The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology*, 1999, vol. 52, 1158-65 [0120]

• **DUFF K; ECKMAN C; ZEHR C; YU X; PRADA CM; PEREZ-TUR J et al.** Increased amyloid-beta42 (43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature*, 1996, vol. 383, 710-3 [0120]

• **HSIAO K; CHAPMAN P; NILSEN S; ECKMAN C; HARIGAYA Y; YOUNKIN S et al.** Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*, 1996, vol. 274, 99-102 [0120]

• **LAEMMLI UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, 680-5 [0120]

• **SCHAGGER H; JAGOW G.** Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, 1987, vol. 166, 368-79 [0120]

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para detectar en una muestra para analizar, modificaciones patológicas de la proteína APP endógena, **caracterizado** porque se determina una disminución de la cantidad de marcadores y/o una diferencia de solubilidad de los marcadores, estando constituidos dichos marcadores por fragmentos catabólicos y/o metabólicos de la parte carboxi terminal de la APP, fragmentos APP-Cter, específicamente modificados en las situaciones neurodegenerativas en cuya etiología participa la APP.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque comprende el uso, como marcadores de la disfunción de la APP, de 1 a 7 fragmentos elegidos entre los de 14,5; 13,5; 12; 10,5; 9,5; 9 y 6,5 kDa y las isovariantes de isoelectrofocalización que constituyen estos fragmentos.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque comprende el uso, como marcadores de la disfunción de la APP, de 1 a 8 fragmentos elegidos entre los de 14,5; 13,5; 12; 10,5; 9,5; 9; 8,5 y 6,5 kDa y las isovariantes de isoelectrofocalización que constituyen estos fragmentos.
4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque se usa una disminución de la cantidad de marcadores.
5. Procedimiento según la reivindicación 4, **caracterizado** porque comprende el uso como marcadores de la disfunción de la APP, de 5 fragmentos de 14,5; 13,5; 12; 10,5 y 9,5 kDa y las isovariantes de isoelectrofocalización que constituyen estos fragmentos, en particular las que son modificados en el curso de situaciones patológicas en el hombre y en los modelos experimentales.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, **caracterizado** porque comprende el uso adicional de un fragmento de 6,5 kDa y de las isovariantes de isoelectrofocalización que constituyen este fragmento, en particular las que son modificadas en el curso de situaciones patológicas en el hombre y en los modelos experimentales.
7. Procedimiento según la reivindicación 5, **caracterizado** porque comprende el uso adicional de un fragmento de 9 kDa y de las isovariantes de isoelectrofocalización que constituyen este fragmento, en particular las que son modificadas en el curso de situaciones patológicas en el hombre y en los modelos experimentales.
8. Procedimiento según la reivindicación 4, **caracterizado** porque comprende el uso, como marcadores de la disfunción de la APP, de 8 fragmentos de 14,5; 13,5; 12; 10,5; 9,5; 9; 8,5 y 6,5 kDa y de las isovariantes de isoelectrofocalización que constituyen estos fragmentos, en particular las que son modificadas en el curso de las situaciones patológicas en el hombre y en los modelos experimentales.
9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque se usa una diferencia de solubilidad.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado** porque la solubilidad de los fragmentos de 14,5 y/o de 13,5 disminuye.
11. Procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado** porque la solubilidad de los fragmentos de 10,5 y/o de 9,5 aumenta.
12. Procedimiento para detectar, en una muestra para analizar, las modificaciones patológicas de la proteína APP endógena, **caracterizado** porque se usa una diferencia de carga o de punto isoelectrónico de los marcadores, estando constituidos dichos marcadores por fragmentos catabólicos y/o metabólicos de la parte carboxi-terminal de la APP, fragmentos APP-Cter, específicamente modificados en las situaciones neurodegenerativas, en cuya etiología participa la APP, correspondiendo la diferencia de carga o de punto isoelectrónico a una disminución de la fosforilación de los fragmentos APP-Cter β (bandas A, B), y opcionalmente, un aumento de la fosforilación de los fragmentos APP-Cter α (bandas C, D y E).
13. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado** porque las muestras para analizar comprenden tejidos o células neuronales, o tejidos o células no neuronales, por ejemplo líquidos biológicos como el líquido cefalorraquídeo, sangre y todos o parte de los elementos que los componen tales como los leucocitos.
14. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado** porque se usa un anticuerpo policlonal y/o monoclonal dirigido contra la parte carboxi terminal de la APP.
15. Procedimiento según la reivindicación 14, **caracterizado** porque se usa adicionalmente un conjunto de anticuerpos policlonales y/o monoclonales que revelan las modificaciones postraduccionales de la transformación patológica de los fragmentos APP-Cter, en particular una modificación de tipo fosforilación y/o metilación y/o acetilación y/o glicosilación.

ES 2 305 126 T3

16. Procedimiento según la reivindicación 15, **caracterizado** porque el conjunto de anticuerpos policlonales y/o monoclonales usado permite revelar las fosforilaciones y la variación de la expresión de los fragmentos de 14,5; 12 y 10,5 kDa.

5 17. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, **caracterizado** porque se evalúa el grado de la patología asignando un índice a los fragmentos identificados en la muestra estudiada, atribuyéndose este índice en relación con una referencia en la que el índice 0 (cero) corresponde a la detección en el tejido sano y el índice 100 (cien), en el tejido patológico.

10 18. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, **caracterizado** porque se usa para el diagnóstico y el seguimiento de un proceso neurodegenerativo, la puesta a punto de modelos animales y el cribado de medicamentos eficaces contra las patologías de la APP.

15 19. Procedimiento según la reivindicación 18, **caracterizado** porque se usa para detectar el proceso de Alzheimer o para el diagnóstico diferencial de patologías neurodegenerativas cercanas a la enfermedad de Alzheimer, como la demencia con cuerpos de Lewy o las angiopatías amiloides.

20 20. Aplicación del procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, para validar los modelos experimentales, células o modelos animales, de la enfermedad de Alzheimer.

21. Aplicación del procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en el diagnóstico de patologías degenerativas de tipo Alzheimer en el tejido humano y en modelos experimentales.

25 22. Aplicación del procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, para seguir el efecto y/o para corregir un tratamiento terapéutico basado en el catabolismo y el metabolismo de la APP.

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

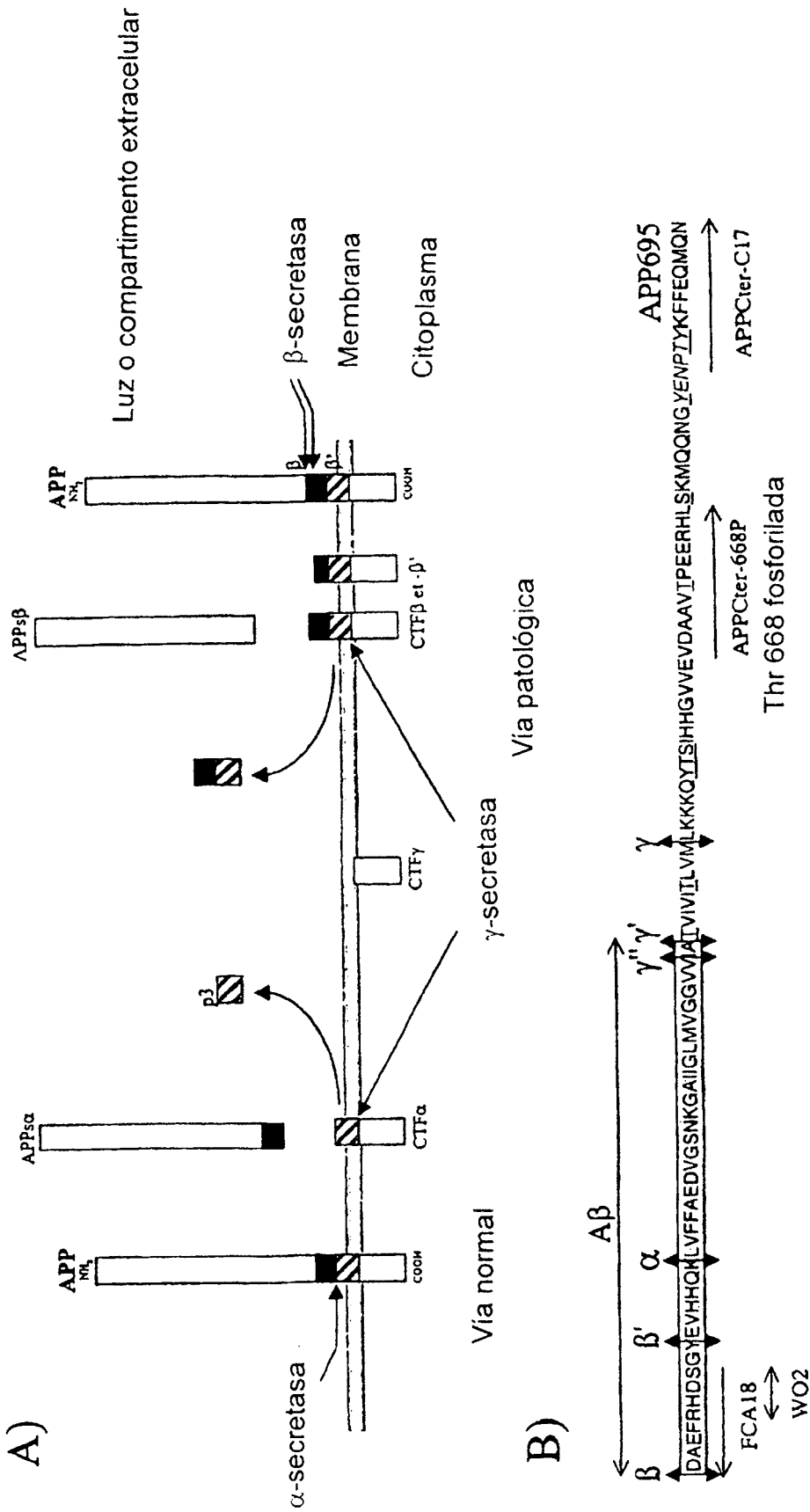


FIGURA 2

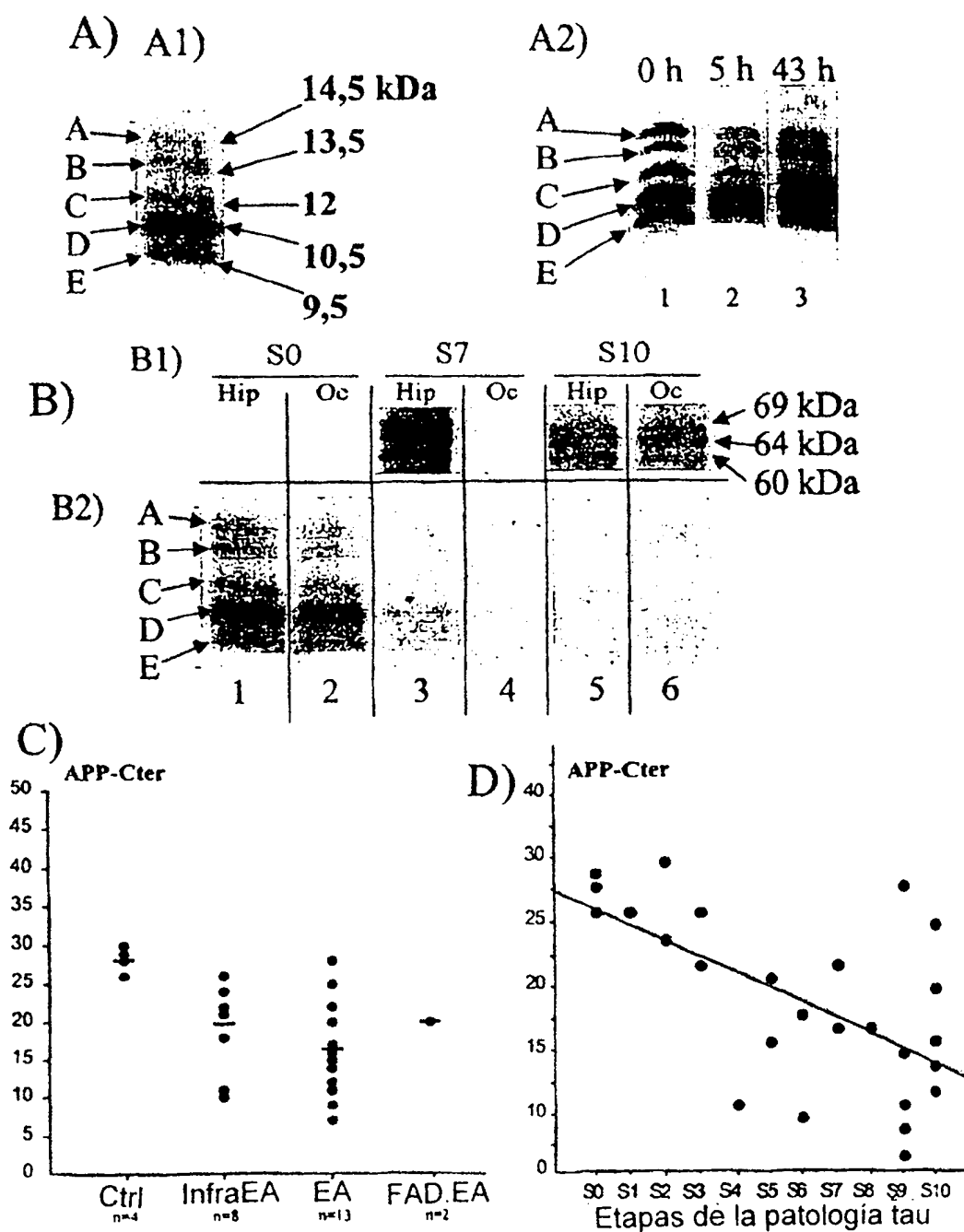


FIGURA 3

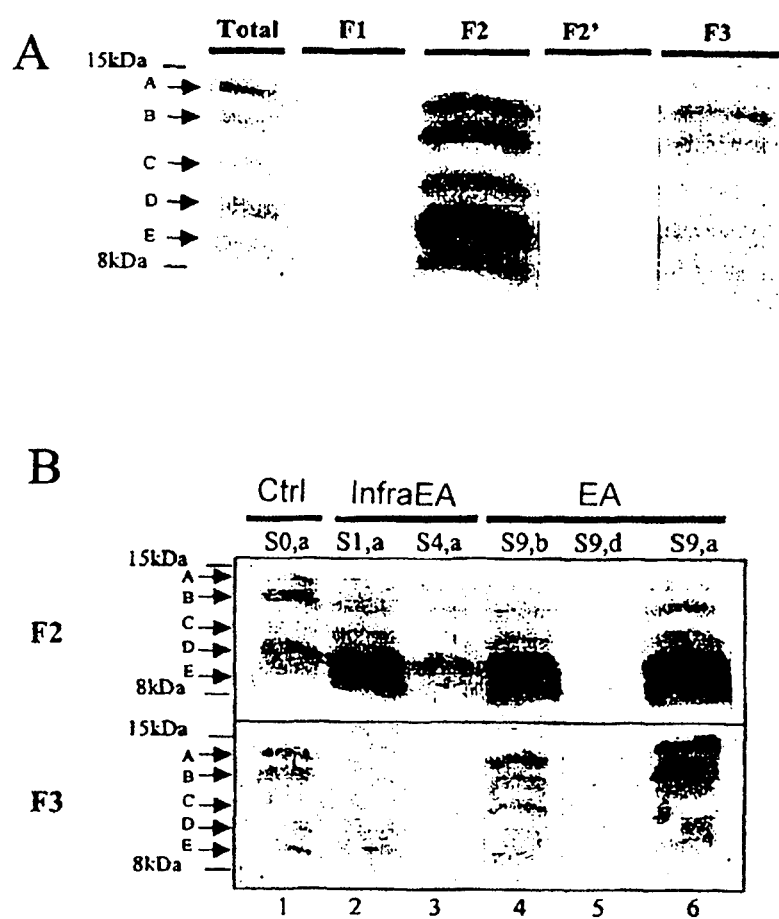
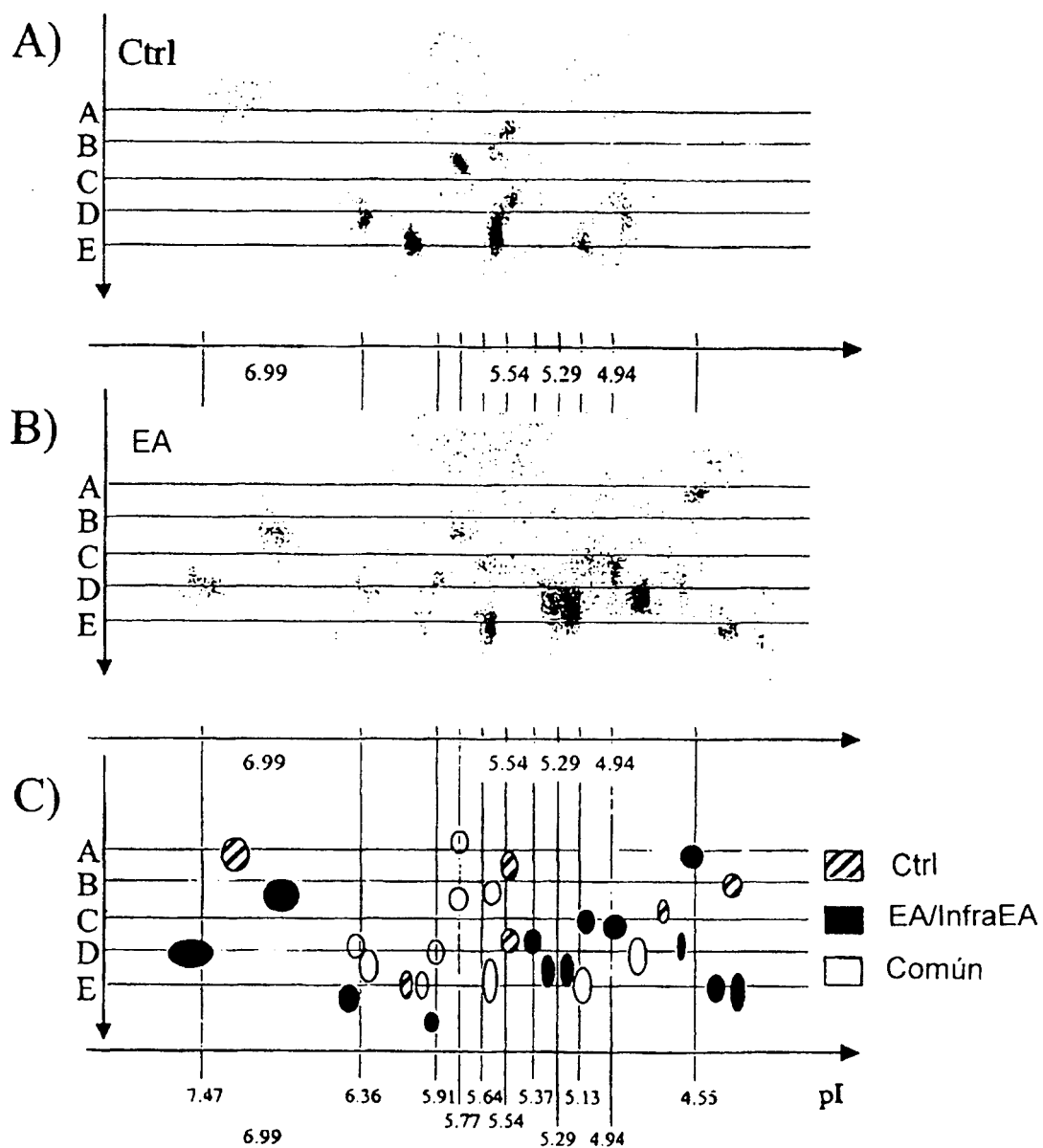


FIGURA 4



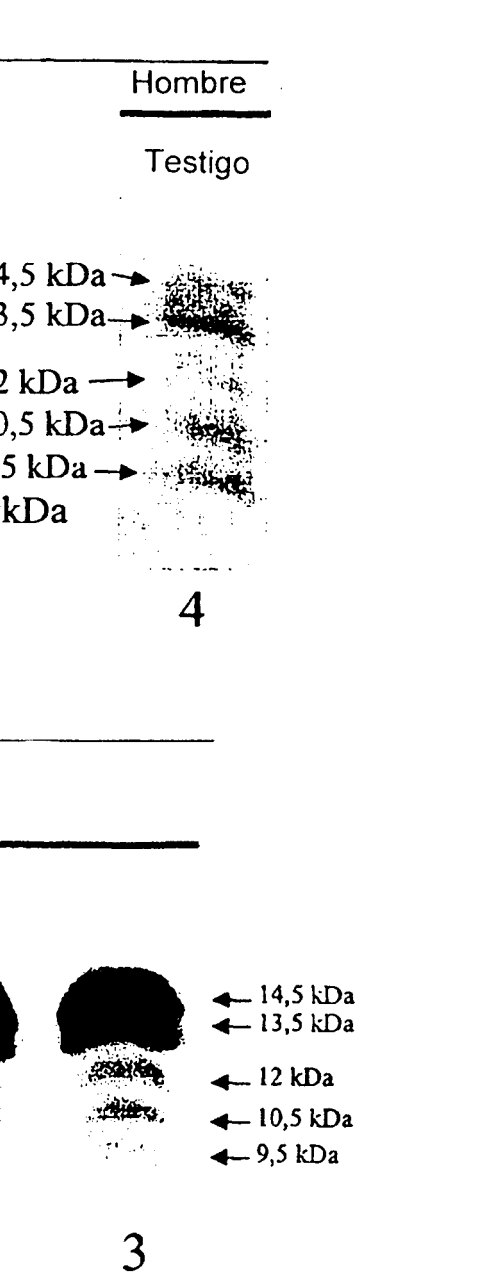


FIGURA 6

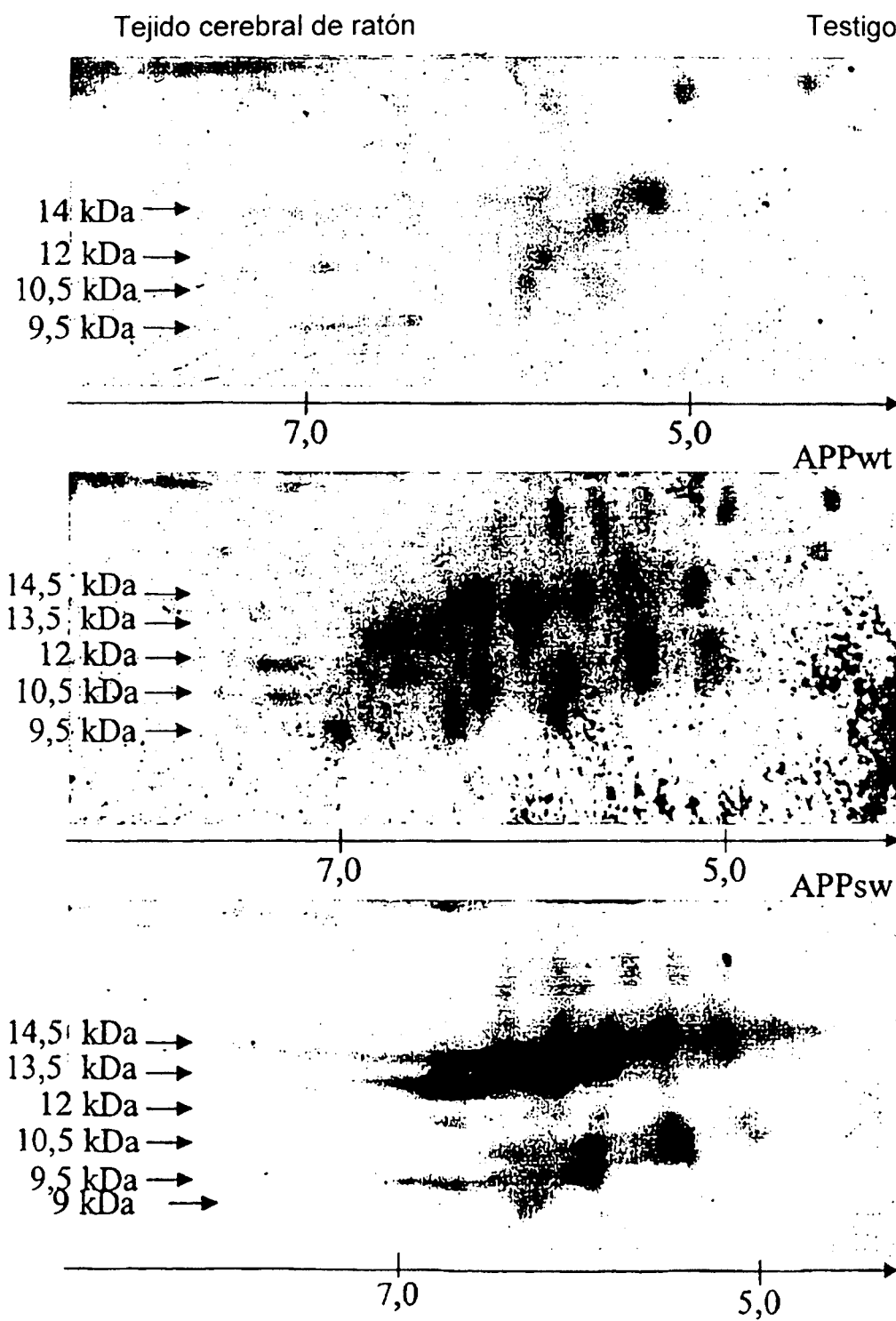


FIGURA 7

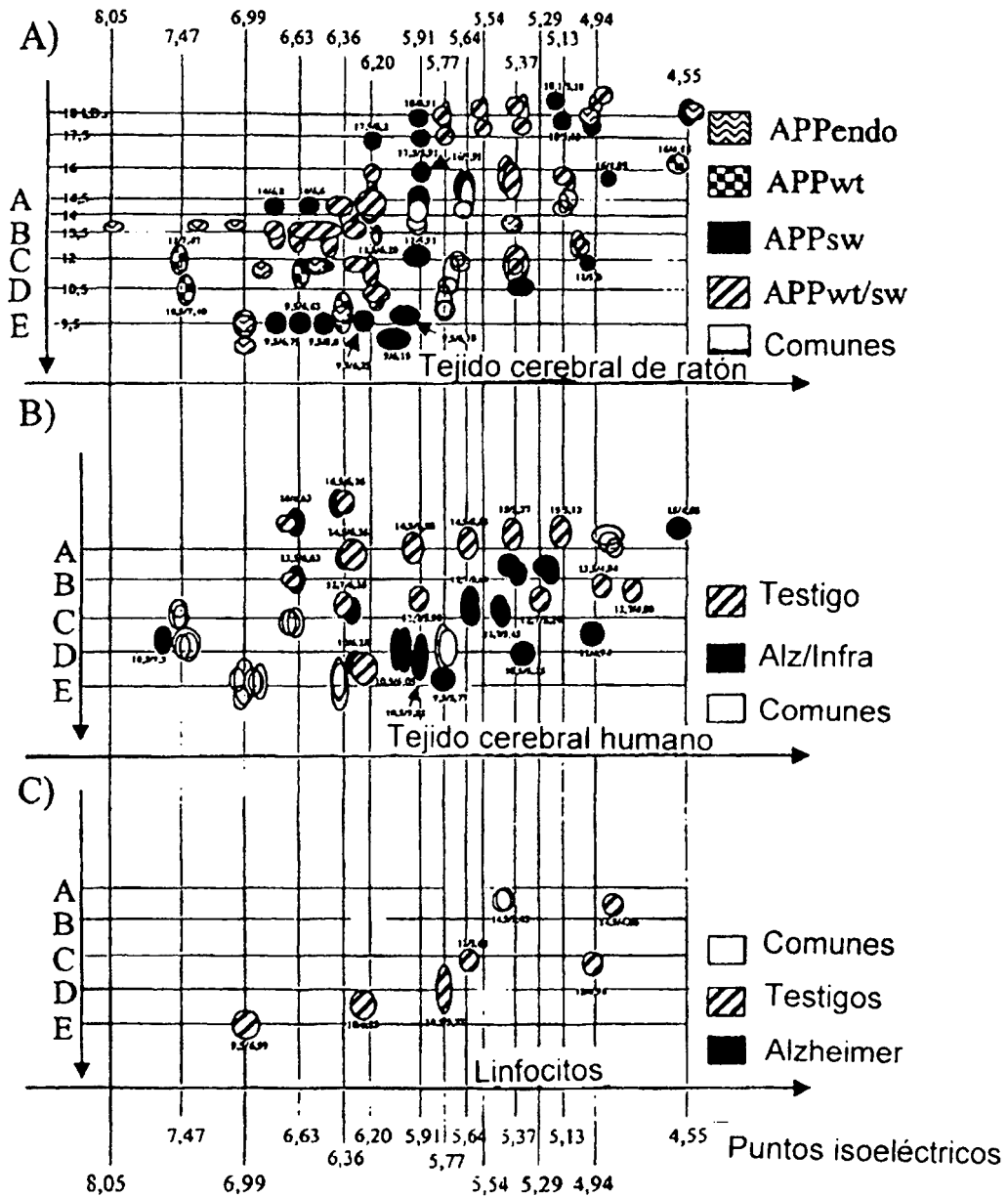


FIGURA 8

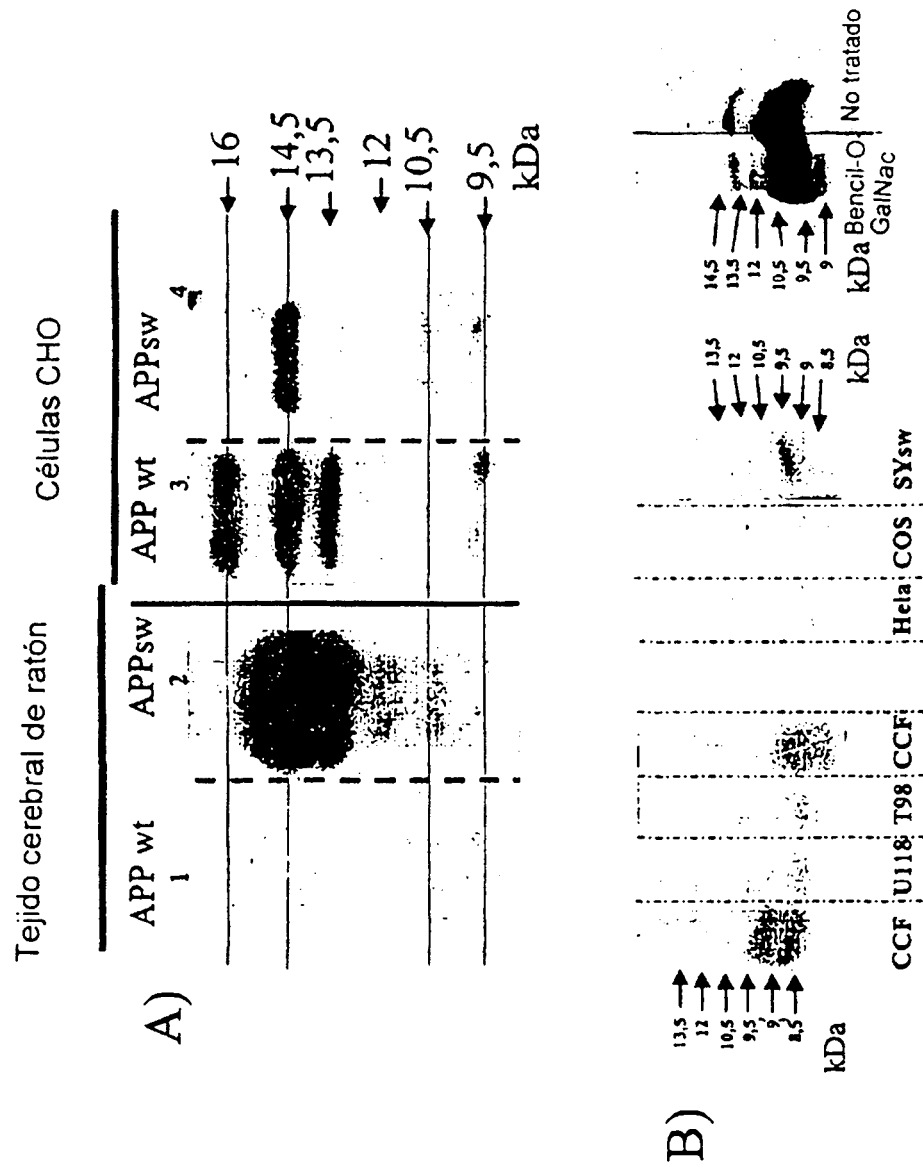


FIGURA 9

Modelos celulares neuronales: Neuroblastomas

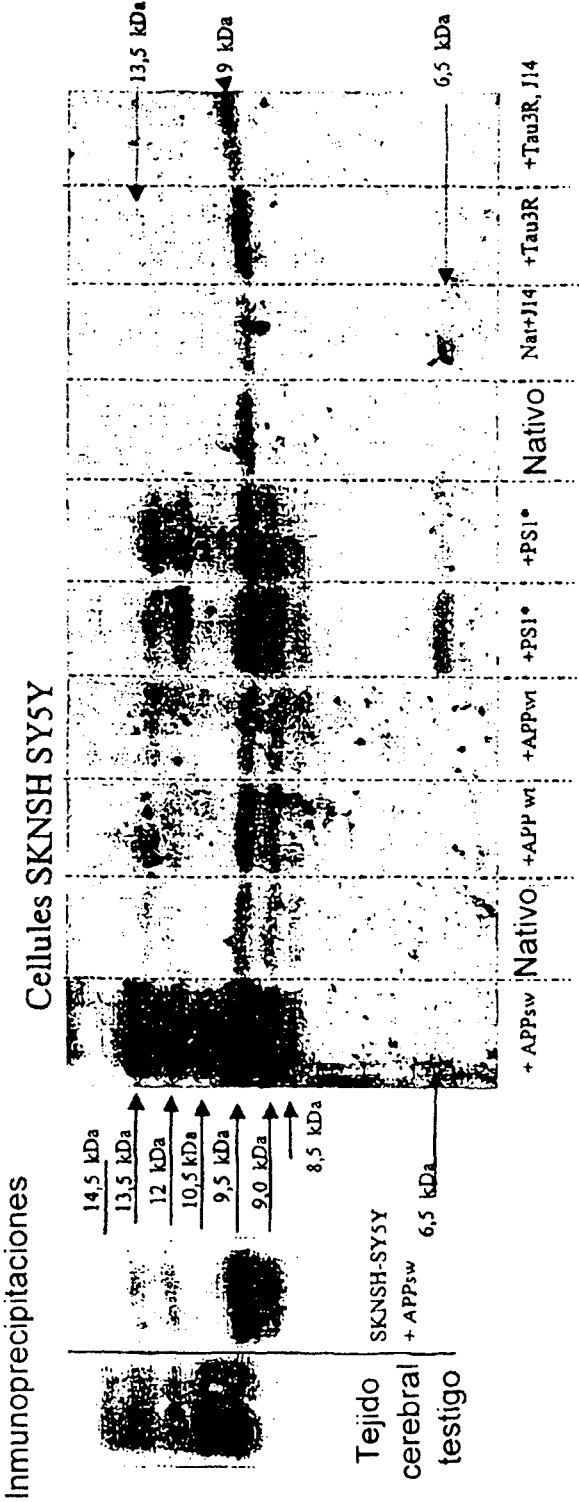


FIGURA 10

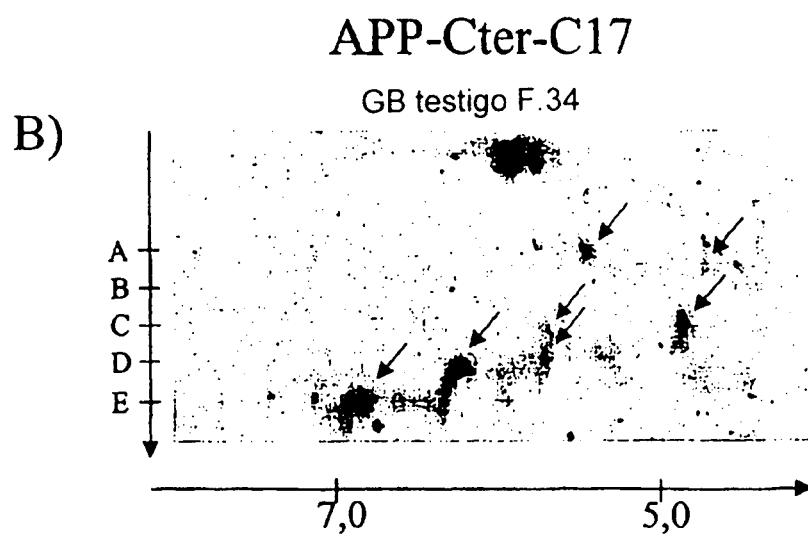
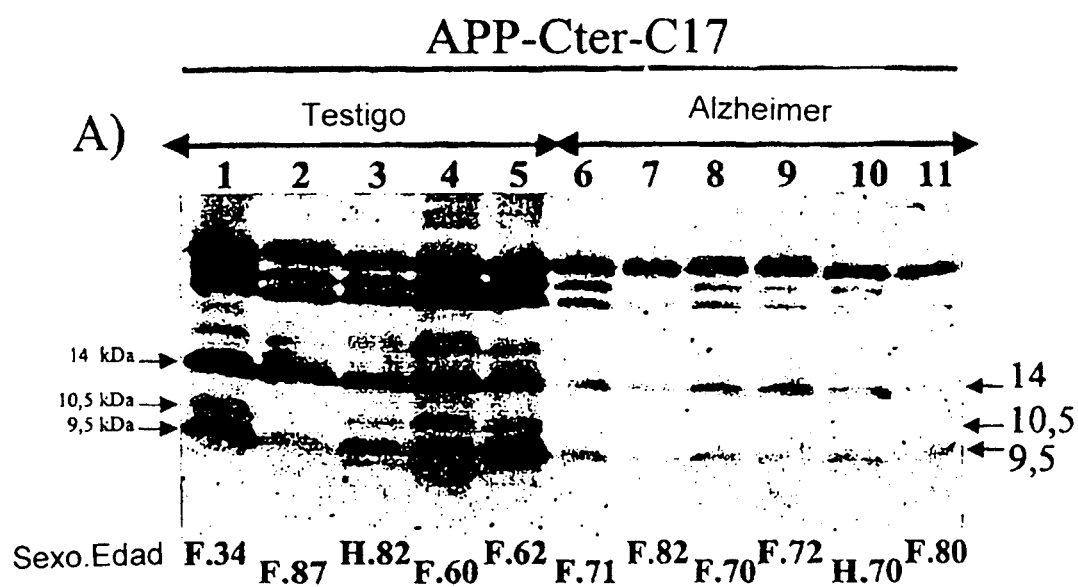


FIGURA 11

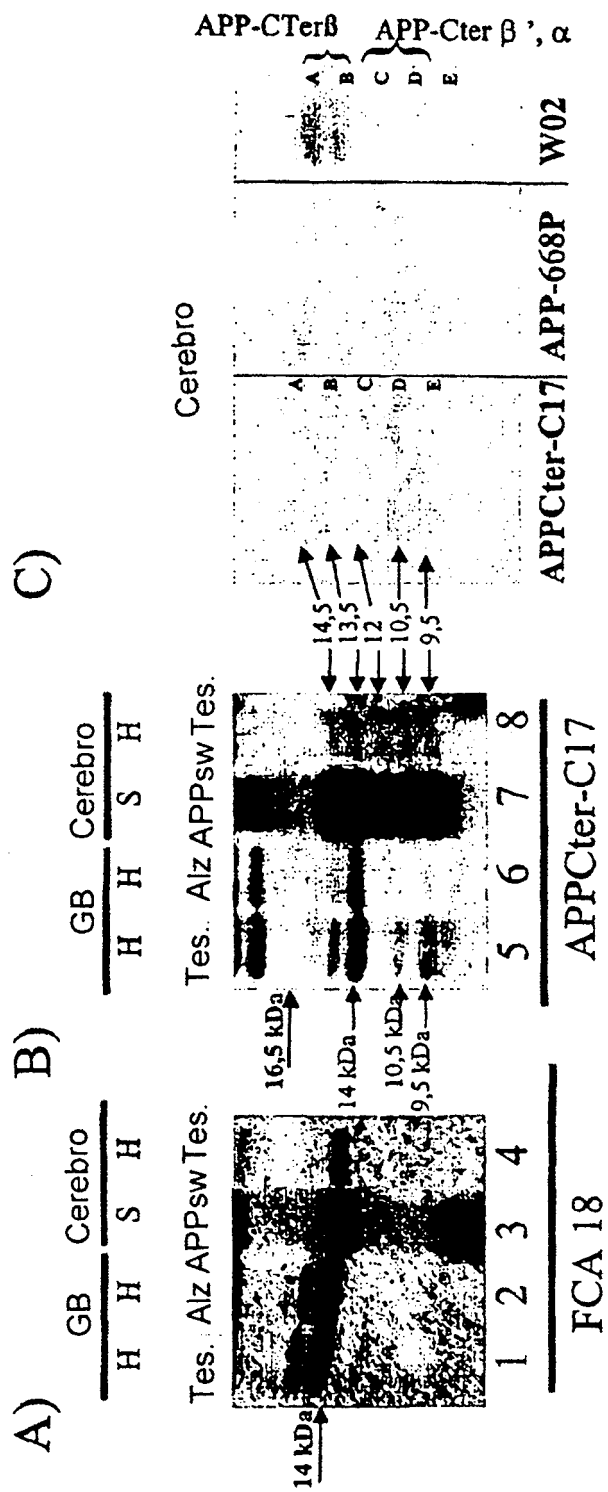


FIGURA 12

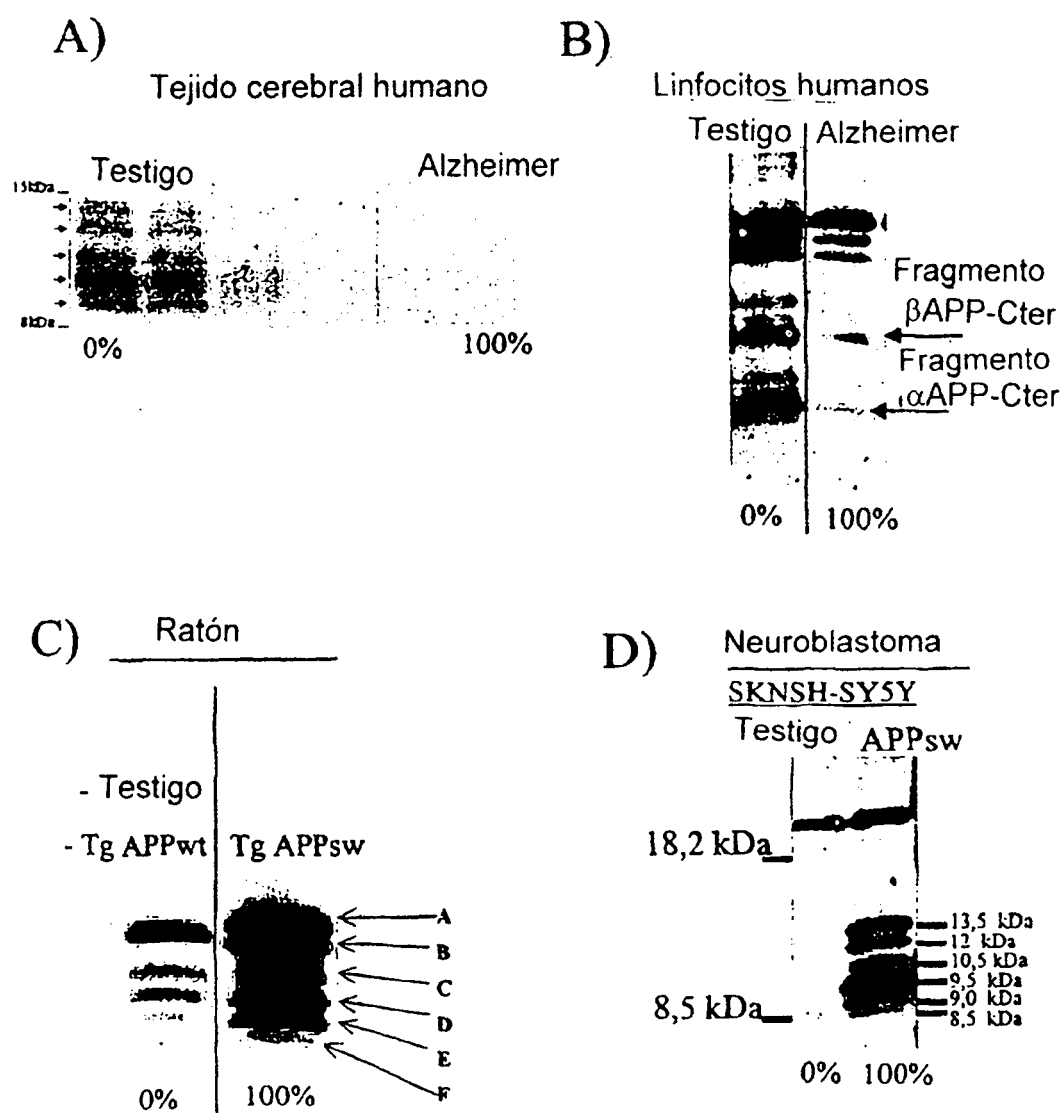


FIGURA 13

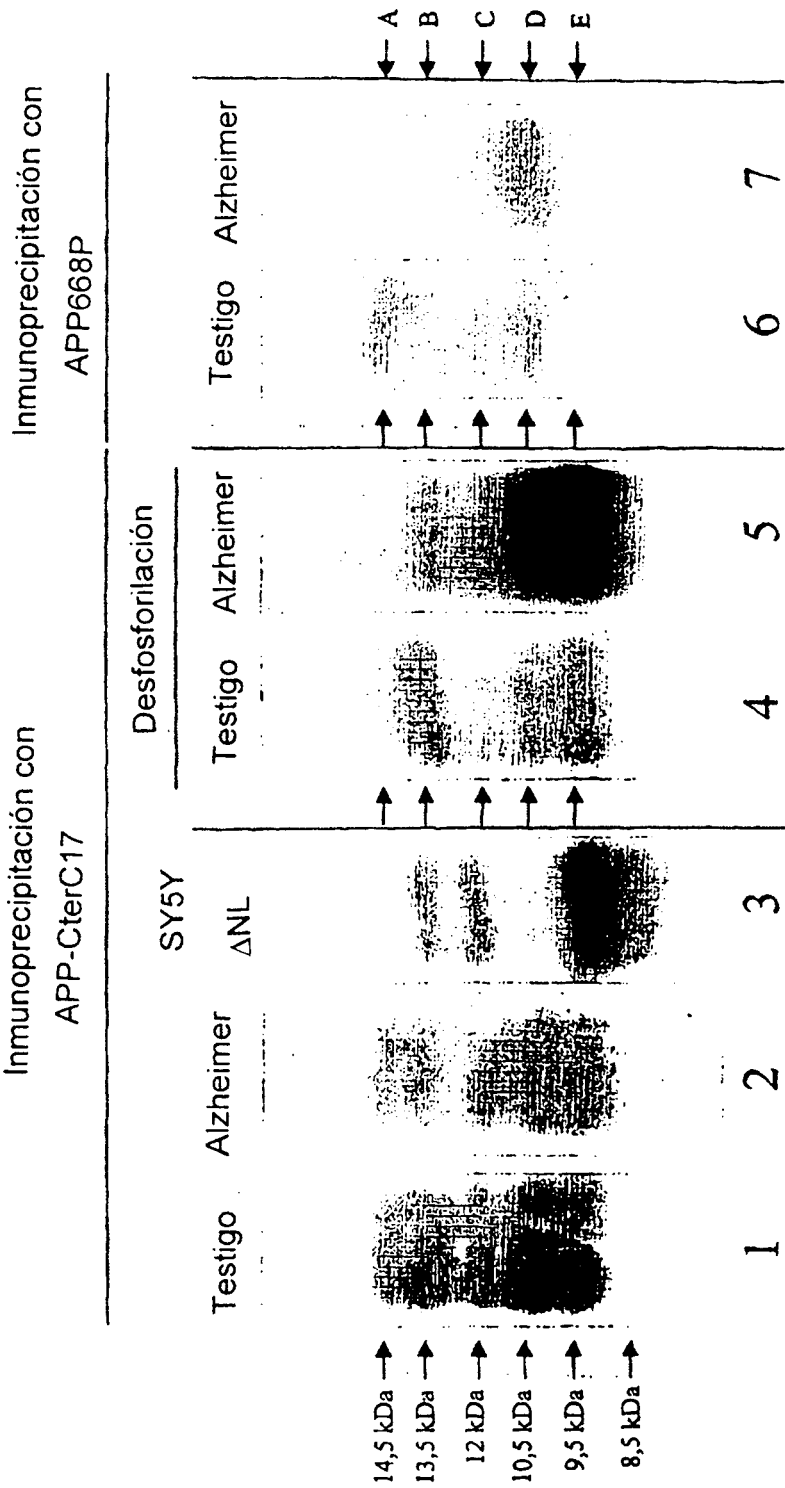


FIGURA 14

Fragmentos APP-Cter que desaparecen en el Alzheimer							
		Puntos isoeléctricos					
APP-Cter	Masa molecular						
A	15,0 kDa			5,37	5,13		
	14,5 kDa	5,95	5,64				
B	13,5 kDa			4,94	4,80		
	12,7 kDa	5,90	5,29				
Fragmentos APP-Cter específicos del Alzheimer							
		Puntos isoeléctricos					
APP-Cter	Masa molecular						
D	11,0 kDa				4,94		
	10,5 kDa	7,5		5,35			
E	9,5 kDa		5,77				
Fragmentos APP-Cter comunes ;							
con las formas preclínicas del Alzheimer							
		Puntos isoeléctricos					
APP-Cter	Masa molecular						
A	15 kDa				4,55		
B	14,0 kDa			5,37	5,2		
C	12,7 kDa		5,64	5,45			
D	10,5 kDa	6,05	5,91				

FIGURA 16

Fragmentos APP-Cter de ratones transgénicos y diferentes de los fragmentos APP-Cter endógenos							
		Puntos isoeléctricos					
APP-Cter	Masa molecular						
A	18 kDa	5,91	5,77	5,54	5,37	5,20	5,13
	17,5 kDa	6,20	5,91				
	16 kDa	6,20	5,91	5,64	5,37	5,13	4,55
	14,5 kDa		6,80	6,60	6,36	6,20	5,91
B	13,5 kDa					6,36	6,20
	13,0 kDa	6,70	6,63	6,40	6,27	6,15	5,10
C	12,0 kDa		7,50	6,20	5,91	5,37	5,00
D	10,5 kDa					7,40	5,37
E	9,5 kDa	6,75	6,63	6,50	6,25	6,15	6,00