



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

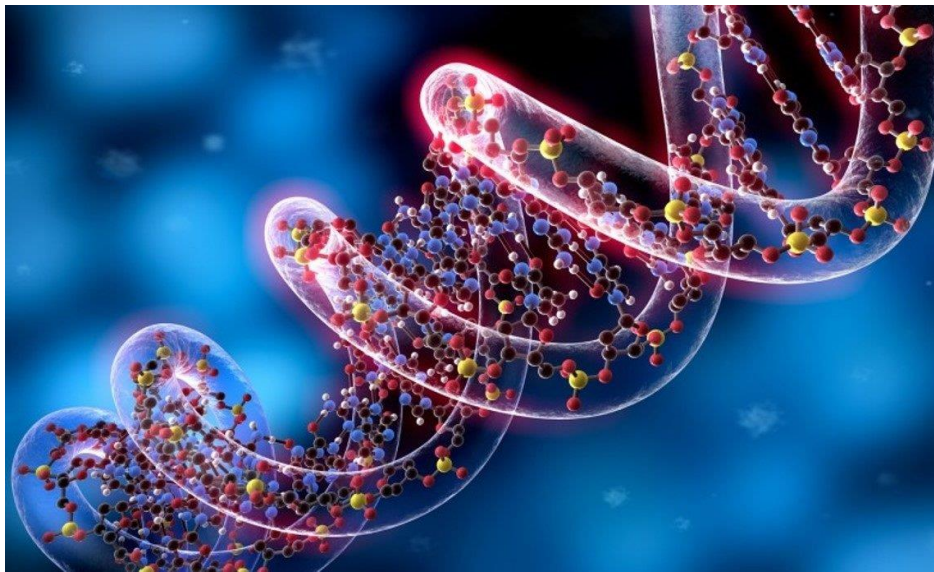


Institute for Bioengineering of Catalonia

**MECANISMOS EPIGENÉTICOS IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LA
EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA PRIÓNICA CELULAR DURANTE EL
DESARROLLO DEL ALZHEIMER**

Astrid Henrich Gutiérrez

TRABAJO FINAL DE GRADO BIOTECNOLOGÍA



Tutor académico: Javier Capilla Luque, Licenciado en Biología, Depto. de Ciencias Médicas Básicas de la universidad Rovira i Virgili, javier.capilla@urv.cat.

En cooperación con: Grupo de Neurobiotecnología Molecular y Celular – Instituto de Bioingeniería de Cataluña (IBEC)

Supervisor/es: Rosalina Gavin Marín, Doctora en Biología, Depto. de Biología celular, fisiología e Inmunología, Universidad de Barcelona, rgavin@ub.edu y rgavin@ibecbarcelona.eu.

Junio 2022

Yo, Astrid Henrich Gutiérrez, con DNI 53949936D, soy conocedora de la guía de prevención del plagio en la URV *Prevenió, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants* (aprobada en julio de 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) y afirmo que este TFG no constituye ninguna de las conductas consideradas como plagio para la URV.

Tarragona, 6 de junio de 2022.



Firma

ÍNDICE

1º DATOS DEL CENTRO	pág. 4
2º ABSTRACT Y PALABRAS CLAVE	pág. 4
3º INTRODUCCIÓN	pág. 6
3.1. El Alzheimer (AD): causas y sintomatología	pág. 7
3.2. Diagnóstico y tratamiento de la AD	pág. 11
3.3. La proteína priónica celular (PrP ^C)	pág. 13
3.4. Relación entre PrP ^C y AD	pág. 14
3.5. Mecanismos de regulación epigenética y conocimientos actuales en torno al ad y a la expresión de PrP ^C	pág. 16
3.5.1. Metilación del DNA	pág. 17
3.5.2. Acetilación de histonas (ChIP)	pág. 18
3.5.3. microRNAs	pág. 19
4º HIPÓTESIS	pág. 21
5º OBJETIVOS	pág. 22
6º METODOLOGÍA	pág. 22
6.1. Materiales	pág. 23
6.2. Muestras humanas	pág. 23
6.3. Extracción del DNA	pág. 24
6.4. Conversión por bisulfito	pág. 25
6.5. Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP)	pág. 26
6.6. PCR	pág. 27
6.7. RT-PCR	pág. 30
7º RESULTADOS	pág. 31
7.1. Análisis de la metilación del promotor de <i>PRNP</i> en AD	pág. 33
7.2. Análisis de la acetilación de las histonas del promotor de <i>PRNP</i> en AD	pág. 36
7.3. Análisis de la regulación postranscripcional de <i>PRNP</i> mediante miR519a-3p en AD	pág. 37
8º DISCUSIÓN	pág. 39
9º CONCLUSIONES	pág. 42
10º BIBLIOGRAFÍA	pág. 42
11º AUTOEVALUACIÓN	pág. 50

1. DATOS DEL CENTRO

El Trabajo Final de Grado fue realizado a partir de las practicas externas en el Instituto de Bioingeniería de Cataluña (IBEC) en el grupo de investigación *Molecular and Cellular Neurobiotechnology*, liderado por el Doctor José Antonio Del Río Fernández. Las prácticas fueron iniciadas en enero de 2022 y finalizadas en junio de 2022.

2. ABSTRACT Y PALABRAS CLAVE

The cellular prion protein (PrP^C) is a protein anchored to the cell membrane that, after misfolding, causes the scrapie form, the causative agent of transmissible spongiform encephalopathies (TSEs). On the other hand, PrP^C is also involved in the development of other neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease, where PrP^C modulates the levels of senile plaques and tau protein. In this disease, PrP^C is deregulated, with increased expression in the early stages of the disease and decreased expression in the later stages. For these reasons, the study sought to analyze the involvement of different epigenetic mechanisms: DNA methylation, histone acetylation and microRNAs (miRNA-519a); in the expression of this protein using *post mortem* human brain samples. The results reported a correlation between PrP^C expression levels and the level of DNA acetylation in early stages compared to control stages, such that an increase in DNA histone acetylation is observed. The results of the methylation analysis reported no differences between Braak and Braak stages. Finally, miRNA-519a shows elevated levels throughout the AD, which could explain the decrease in the expression pattern of PrP^C in late stages. All this suggests that PrP^C is regulated by various epigenetic mechanisms during the development of AD and confers possible new biomarkers or targets for treatment.

Keywords: PrP^C, Alzheimer, methylation, histone acetylation, microRNAs, miRNA-519a, transmissible spongiform encephalopathies.

RESUMEN

La proteína priónica celular (PrP^C) es una proteína anclada a la membrana celular que tras un mal plegamiento origina la forma scrapie, agente causal de las encefalopatías espongiiformes transmisibles (EET). Por otra parte, PrP^C también está involucrada en el

desarrollo de otras enfermedades neurodegenerativas, como podría ser la *Alzheimer's disease*, donde PrP^C modula los niveles de las placas seniles y la proteína tau. En esta enfermedad, PrP^C esta desregulada, donde en los primeros estadios de la enfermedad sufre un aumento de la expresión, y en los finales, un decrecimiento. Por estos motivos, el estudio busca analizar la implicación de diferentes mecanismos epigenéticos: metilación del DNA, acetilación de histonas y microRNAs (miRNA-519a); en la expresión de esta proteína usando muestras humanas cerebrales *post mortem*. Los resultados reportaron una correlación entre los niveles de expresión de PrP^C y el nivel de acetilación del DNA en estadios tempranos comparado con estadios controles, de forma que se observa un aumento en la acetilación de histonas del DNA. Los resultados del análisis de la metilación no reportaron diferencias entre los diferentes estadios de Braak y Braak. Finalmente, el miRNA-519a presenta unos niveles elevados en toda la AD, por lo que podría explicar el decrecimiento en el patrón de expresión de PrPC en estadios tardíos. Todo esto sugiere que PrPC está regulado por diversos mecanismos epigenéticos durante el desarrollo de la AD y confiere posibles nuevos biomarcadores o dianas de tratamientos.

Palabras clave: PrP^C, Alzheimer, metilación, acetilación de histonas, microRNAs, miRNA-519a, Encefalopatías espongiiformes transmisibles.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER. CAUSAS Y SINTOMATOLOGÍA

La enfermedad de Alzheimer (AD, del inglés *Alzheimer's Disease*) es una enfermedad neurodegenerativa y progresiva que conforma el tipo más común de demencia. Se caracteriza por la acumulación, tanto de placas amiloides extracelulares, enriquecidas en proteína beta-amiloide (A β) mal plegada; como de ovillos neurofibrilares intracelulares (NFT, del inglés *neurofibrillary tangles*), compuestos por la proteína tau hiperfosforilada. La acumulación tiene lugar en el hipocampo y el córtex temporal del cerebro mayoritariamente. Como consecuencia, se observa atrofia cerebral, desintegración sináptica y pérdida neuronal, afectando a la memoria, el comportamiento, la personalidad y las habilidades del individuo, incapacitándolo para desarrollar una vida de forma independiente (Lei et al., 2021).

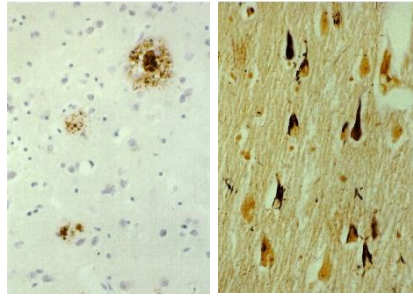


Figura 1. Placas seniles de la corteza temporal de un paciente de AD marcadas mediante inmunohistoquímica con anticuerpo A β 42 (izquierda) y ovillos neurofibrilares observados en una sección de hipocampo de un cerebro con AD mediante tinción mediante inmunodetección contra ubiquitina (derecha) (Cummings et al., 1998).

Por una parte, los depósitos de β -amiloide se forman debido a la escisión proteolítica secuencial de la proteína transmembrana precursora amiloide (APP), cuya longitud total es de 751 aminoácidos. La proteólisis es llevada a cabo por la β -secretasa BACE1 y el complejo transmembrana γ -secretasa. BACE1 reconoce la región extracelular de APP, generando dos fragmentos: el fragmento N-terminal (sAPP β) que es liberado al medio extracelular y el fragmento C-terminal que es la diana del complejo γ -secretasa. A través de la vía amiloidogénica, este complejo degrada el fragmento transmembrana, liberando el péptido A β . A β contiene regiones transmembrana, por lo que tiende a autoagregarse hasta llegar a conformar fibras beta (Breijyeh & Karaman, 2020; Castro et al., 2019) (figura 2).

Algunas de las causas por las que se cree que son tóxicas las placas seniles son debido al bloqueo de canales iónicos, y sus consecuentes desequilibrios homeostáticos, y el aumento del estrés oxidativo mitocondrial. Sin embargo, la causa sigue siendo sin ser resuelta del todo (Tiwari et al., 2019). Además, está ampliamente reportado que la forma más tóxica del A β son las formas oligoméricas previas a la fibrilación completa (Klein, 2002). Por su parte, se ha descrito que el péptido A β en forma monomérica no resulta tóxico. En contraposición, se ha descubierto que una concentración baja de A β favorece la neurotransmisión y la memoria (Šerý et al., 2013). De esta forma, el péptido A β será considerado como un compuesto tóxico cuando la ratio entre su producción y degradación sea elevada, lo que indicará un desequilibrio, como se puede observar en la AD.

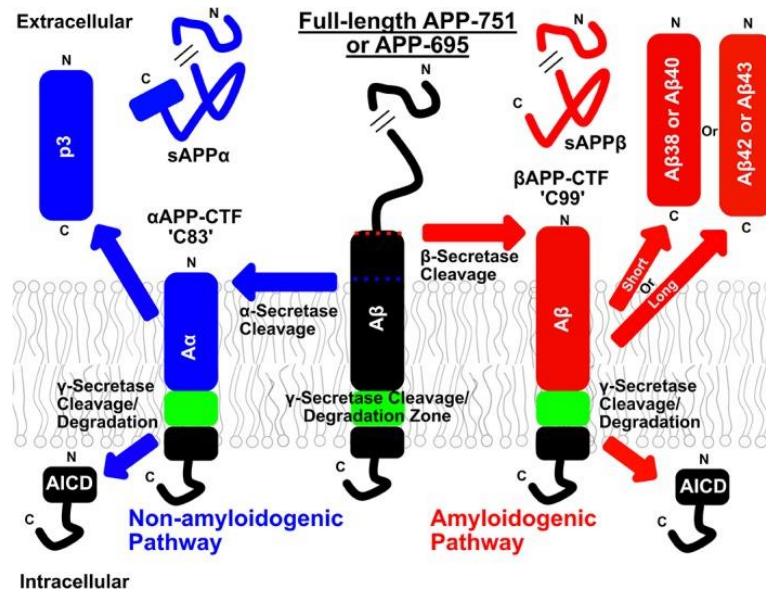


FIGURA 2. Procesamiento proteolítico secuencial de APP, representando la vía amiloidogénica, con la subsecuente formación de Aβ por la escisión de APP por la BACE1; y la vía no amiloidogénica, con la intervención de α-secretasa en lugar de BACE1. (Castro et al., 2019)

Cabe destacar, que el APP presenta otra vía por la cual puede ser procesado, la vía no amiloidogénica. En esta vía, no actúa la enzima BACE1. La degradación es llevada a cabo por una α-secretasa que dará lugar a la generación de un fragmento C-terminal menor de APP que carece del sitio de corte para la γ-secretasa, con la consecuente imposibilidad de producir péptido Aβ. A su vez se genera el fragmento APPsα, el cual está relacionado con la supervivencia de las neuronas, así como su correcto funcionamiento (Tiwari et al., 2019).

La polimerización de las placas seniles desencadena la liberación y activación de quinasas que desembocan en la hiperfosforilación de la proteína asociada a microtúbulos (MAP) tau. Los filamentos de tau hiperfosforilada inducen la autoagregación en filamentos helicoidales emparejados (PHF, del inglés *paired helical filaments*), los cuales se acumulan en el citoplasma. Es entonces cuando los filamentos de tau hiperfosforilada oligomerizan (Tiwari et al., 2019).

Tau posee un sitio de unión a microtúbulos, de forma que, permite el coensamblamiento de microtúbulos maduros. Sirve de puente de conexión entre los microtúbulos, además de estabilizar la red de microtúbulos con el citoesqueleto. Cuando la hiperfosforilación ha tenido lugar, tau pierde la capacidad de asociarse con los microtúbulos, las subunidades de los túbulos se van disociando y se pierde la estabilidad. Entonces, estas subunidades

se convierten en grandes filamentos de tau, los cuales, al agregarse, forman los NFTs. La inestabilidad generada entre los microtúbulos conlleva una disfunción del transporte axonal, que es dependiente de estos. Por consiguiente, estos NFTs provocan la pérdida o disminución de la comunicación entre neuronas, desencadenando finalmente la apoptosis neuronal (Breijyeh & Karaman, 2020; Šerý et al., 2013; Tiwari et al., 2019).

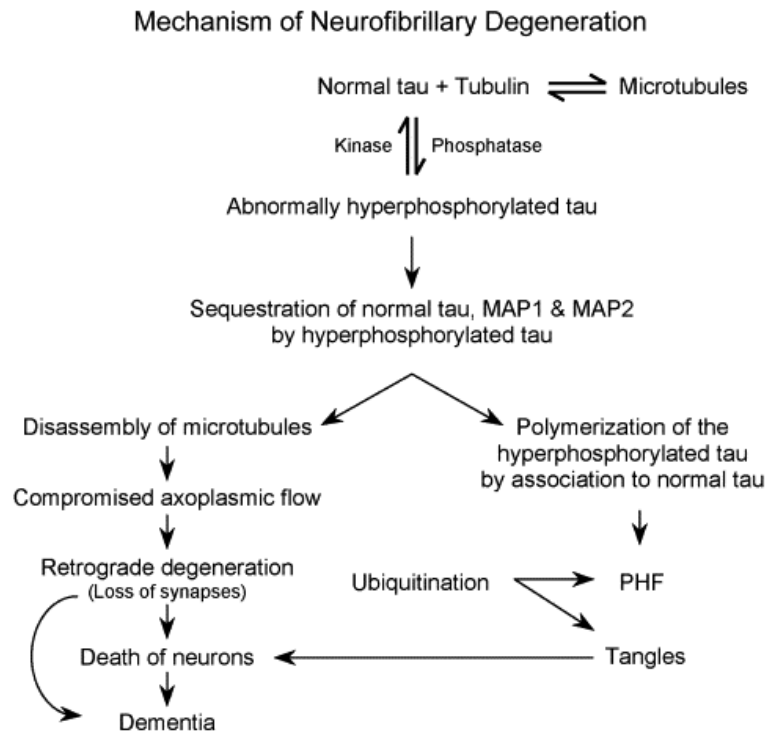


Figura 3. Esquema de la agregación de la proteína tau fosforilada que desencadena la demencia (Iqbal et al., 2005)

Esta cadena de reacciones, en la que cada producto promueve la formación del siguiente reactivo es lo que se conoce como la hipótesis de la cascada amiloide. Debido a la acumulación de $A\beta$, se produce un aumento en la producción de quinasas, creando un desequilibrio con las fosfatasa que desencadena la pérdida de estabilidad de los microtúbulos por la hiperfosforilación de la proteína tau. Como consecuencia de este procesamiento *downstream*, la neurodegeneración tiene lugar. Es la hipótesis más aceptada actualmente, sin embargo, no está aceptada completamente debido a que las placas seniles se encuentran también en personas sanas debido al envejecimiento natural. Las placas amiloides se han conseguido reducir mediante inmunoterapia contra la proteína $A\beta$, pero solo se veían afectados los niveles de $A\beta$ y no los de NFTs, de forma que la reducción de las placas amiloides no tiene por qué ser suficiente para frenar el avance de la enfermedad (Holmes et al., 2008; Tolar et al., 2020)

La hiperfosforilación de tau con su consiguiente agregación para formar los NFTs, se ha demostrado que puede regular directamente la disfunción cerebral, llegando a ser mucho más relevante en este suceso que los niveles de A β (Castillo-Carranza et al., 2015; Saha & Sen, 2019). No obstante, la presencia de los NFTs genera debate, ya que se cree que presentan una función neuroprotectora. Los NFTs podrían evitar la presencia de tau hiperfosforilada soluble, de forma que esta proteína no secuestrara otras MAP (Iqbal et al., 2005).

Lo que sí es sabido es que tanto los ovillos neurofibrilares como las placas amiloides siguen un patrón característico de extensión cerebral a medida que avanza la enfermedad. Podemos distinguir entre dos clasificaciones distintas del curso de la EA dependiendo de si nos basamos en A β (estadios A, B y C) o en NFT (estadios I-VI) tal como muestra la figura 4. Son estos últimos, descritos por Braak y Braak en 1991, los que se suelen utilizar para el estadiaje de la enfermedad en tejido cerebral *post mortem*: estadio I-II: etapas transentorrinales (hipocampo y neocórtex), casos clínicamente silenciosos; estadios III-IV: etapas límbicas, AD incipiente; estadios V-VI: etapas neocorticales: AD desarrollado (Braak & Braak, 1991).

Los depósitos de A β tienen origen mayoritariamente en los lóbulos temporal y frontal, existen pocos casos de EA donde el inicio tenga lugar en corteza parietal y occipital. Desde estas localizaciones van proliferando hacia las áreas asociativas llegando a toda la isocorteza. Mientras que los ovillos neurofibrilares clásicamente se forman en el hipocampo y corteza entorrinal en un inicio y se extienden progresivamente hacia zonas corticales (Masters et al., 2015).

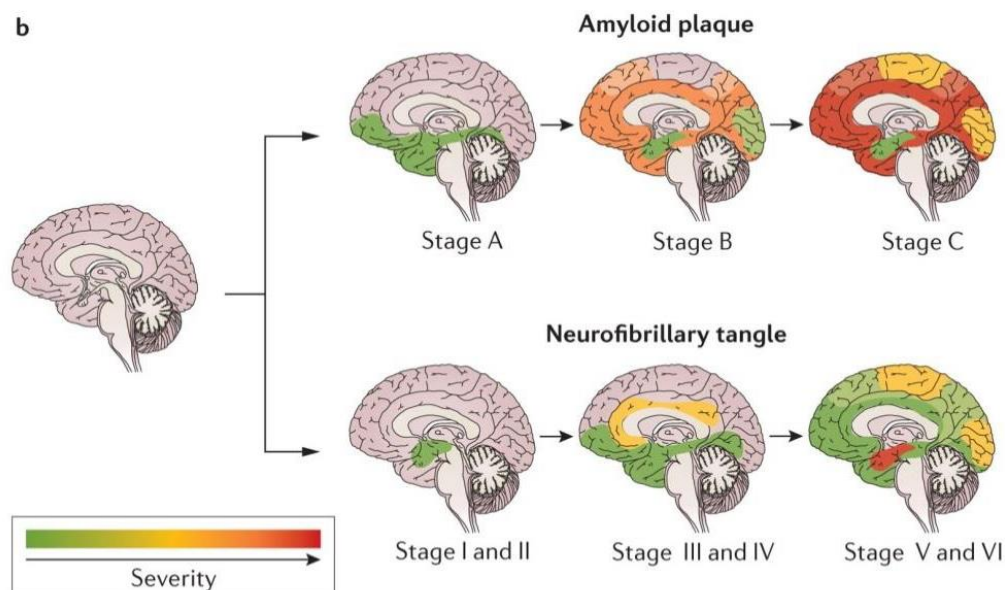


Figura 4: Esquema de los dos rasgos neuropatológicos que caracterizan la EA, placas amiloides y ovillos neurofibrilares, y su localización cerebral según el estadio de avance de la enfermedad (Masters et al., 2015).

Comúnmente, la AD suele aparecer a los 65 años, lo que es denominado como AD esporádica o de inicio tardío. No obstante, en el caso de que la enfermedad se desarrolle antes, se le conoce como AD familiar o de inicio precoz. Este último presenta más gravedad que el de aparición tardía, en el que la gravedad de la degradación del tejido neuronal varía entre pacientes. La probabilidad de que la causa de aparición de la AD sea genética es mayor en los casos de inicio temprano (Blennow & Zetterberg, 2018; Tellechea et al., 2018).

La AD ha sido considerado una enfermedad multifactorial asociado con muchos factores de riesgo. Entre los factores de riesgos genéticos, la presencia del alelo $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E (ApoE4) es el más relevante para la AD esporádico (van der Flier et al., 2011). Tanto si se encuentra de forma homocigótica como heterocigótica, la presencia de este alelo está relacionada con una manifestación de la enfermedad más temprana. No obstante, la presencia del alelo $\epsilon 2$ confiere protección (Tellechea et al., 2018). En adición, mutaciones autosómicas dominantes en los genes APP, PSEN1 y PSEN2, conducen al desarrollo de la AD familiar. Para el gen APP, se ha demostrado la existencia de 30 mutaciones distintas que en el 15% de los casos conducen a AD de inicio precoz. PSEN1 y PSEN2 conforman dos componentes del complejo de la α -secretasa. En el caso de PSEN1, el 80% de los casos de AD de inicio precoz están relacionados con mutaciones en este gen (Silva et al., 2019).

El factor de riesgo no genético más relevante es la edad. La mayoría de los casos se inician a edades tardías tal y como hemos avanzado, después de los 65 años. Este grupo está compuesto por el 95% de los pacientes de AD, sin embargo, es difícil distinguirlo del envejecimiento natural, ya que comparten muchos de los síntomas. En adición, la dieta, la inactividad física, problemas cardiovasculares, infecciones, diabetes...; son otros factores de riesgo a tener en cuenta (Breijyeh & Karaman, 2020; Silva et al., 2019).

3.2. DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LA AD

Actualmente, la AD solo puede ser diagnosticada de forma precisa mediante un análisis histopatológico *post mortem* por medio de la detección de la formación de las placas amiloides y los NFTs en el cerebro del paciente. Y a pesar de que el diagnóstico *ante*

mortem se puede realizar actualmente con una certeza razonable utilizando líquido cefalorraquídeo (LCR) o biomarcadores de imagen para tomografía por emisión de positrones (PET) que permiten la estimación de la deposición cerebral de A β y tau (Lowe et al., 2019; Tapiola et al., 2009), en la práctica médica está sobre todo basado en la confirmación de la pérdida de memoria y de dificultades cognitivas mediante test neurológicos como el *Mini-Mental State Examination* (MMSE) con puntuaciones de entre 0 a 30, donde una puntuación más baja significa un deterioro cognitivo mayor (Wattmo et al., 2016). Al basarse el diagnóstico en criterios clínicos y presencia o ausencia de síntomas, se suele estimar el diagnóstico en un 77% de los casos. Además, la detección temprana de la enfermedad sigue siendo complicada debido a que los síntomas de la enfermedad no se manifiestan hasta el estadio III y IV de la misma (Nikolac Perkovic et al., 2021), de forma que la patología cerebral comienza años antes de la aparición de síntomas, y puede ser irreversible en el momento del diagnóstico. De hecho, se estima que la patología pudo haber empezado en el cerebro de 15 a 20 años antes de la aparición de los síntomas clínicos. Cabe destacar, además, que existe heterogeneidad fisiopatológica entre la AD de inicio tardío y el de inicio temprano. La AD de inicio tardío no suelen tener una patología de AD pura, además de las placas seniles y de los NFTs, presentan también depósitos de α -sinucleína y cambios microvasculares. Como consecuencia, la patología de la AD tardía es variable, dificultando el diagnóstico (Blennow & Zetterberg, 2018).

Se han realizado muchos estudios para buscar biomarcadores, pero, a día de hoy, todavía no existen biomarcadores que puedan usarse para diagnosticar la AD con exactitud, además de diferenciarlo de otras neuropatologías causantes de demencia. Algunos pueden ayudar a evaluar el progreso de la AD, como sería el análisis de los niveles de A β en el líquido cefalorraquídeo (LCR), sin embargo, la toma de medidas en este caso implica una punción lumbar invasiva. Y, a pesar de que en los últimos años están emergiendo estudios longitudinales que relacionen los niveles de A β y tau hiperfosforilada en sangre con el avance de la enfermedad (revisado en (Leuzy et al., 2022a), aún estamos lejos de poder cribar a la población general para avanzarnos al diagnóstico. Es por lo tanto necesario seguir buscando métodos no invasivos que permitan un diagnóstico temprano de la enfermedad para evitar el deterioro cognitivo. En esta dirección, el estudio de las modificaciones epigenéticas está cobrando protagonismo (Nikolac Perkovic et al., 2021).

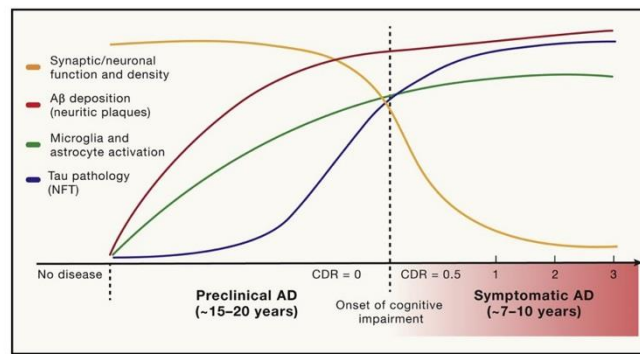


Figura 5. Principales eventos fisiopatológicos en relación con el curso clínico de la AD (Long & Holtzman, 2019).

En lo referente al tratamiento de la enfermedad, actualmente se centra en tratar los síntomas, como serían la acetilcolinesterasa y los antagonistas del N-metil d-aspartato (NMDA); pero no existe ninguno que cure o prevenga la AD (Breijyeh & Karaman, 2020). Muchos otros tratamientos fueron efectivos en animales, sin embargo, poseían serios efectos secundarios. En este sentido se ha estado estudiando un tratamiento basado en dos HDACi, las cuales son las encargadas de la desacetilación de histonas y donde se consiguió una restauración de la memoria y de la capacidad de aprendizaje. Sin embargo, estas proteínas no son específicas únicamente de las histonas, sino que también reconocen otras proteínas del citoplasma (Nikolac Perkovic et al., 2021). Esto ha provocado que en 11 años no hayan surgido nuevos tratamientos, lo que, sumado a la incapacidad de actuar en etapas tempranas para la prevención, supone un desafío que se debe considerar seriamente abordar.

3.3. LA PROTEÍNA PRIÓNICA CELULAR (PrP^C)

La proteína priónica celular es una glicoproteína endógena que está anclada a la membrana plasmática mediante un dominio glicosilfosfatidilinositol y juega un papel crucial en las enfermedades neurodegenerativas conocidas como prionopatías o encefalopatías espongiiformes transmisibles (EET). El gen *PRNP* es codificante de esta proteína, y se encuentra en el cromosoma 20 en humanos. El gen *PRNP* está compuesto por dos exones, de los cuales es el segundo el que codifica para la proteína (Lidón et al., 2020). La estructura terciaria final adoptada por PrP^C consiste en un extremo C-terminal globular que contiene 3 α -hélices, dos láminas β , y un extremo N-terminal flexible, el cual constituye el sitio principal de unión Cu^{2+} , además de permitirle interactuar con otras proteínas. PrP^C se expresa principalmente en el sistema nervioso central,

mayormente en las neuronas; pero, sin embargo, en niveles más reducidos se pueden encontrar en otros tejidos y tipos celulares (Castle & Gill, 2017). Se expresa de forma constitutiva en todo tipo de células, no obstante, la expresión se ve regulada según la etapa de desarrollo. La secuencia de este gen está altamente conservada en vertebrados, por lo que puede ser un indicativo de que presenta una función biológica esencial (Manni et al., 2020; Miranzadeh Mahabadi & Taghibiglou, 2020). En etapas tempranas del desarrollo, los niveles de PrP^C aumentan, se estabilizan en la adultez y con el envejecimiento disminuye (Mahal et al., 2001).

PrP^C puede plegarse de forma incorrecta, de forma que adquiere una estructura rica en láminas β en vez de α -hélices en el extremo C-terminal, originando una versión patológica denominada proteína priónica scrapie (PrP^{Sc}) (Miranzadeh Mahabadi & Taghibiglou, 2020). Es una proteína infecciosa cuya autopropagación es llevada a cabo mediante la unión a PrP^C, de forma que desencadena un cambio conformacional generando nuevas PrP^{Sc} (Manni et al., 2020). La proteína PrP^{Sc} es el agente causal de las EETs, como podrían ser enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), kuru e insomnio familiar fatal (FFI) (Sakudo & Onodera, 2015).

Sabemos que la región promotora del *PRNP* posee una isla CpG, además de sitios de unión putativos a diversos factores de transcripción, como serían los activadores transcripcionales Sp1, HSE, AP-1 y AP-2. Estos sitios de unión regulan la expresión de genes como respuesta a varios estímulos (ej.: tratamiento con insulina, factores de crecimiento) por lo que podría estar implicada en numerosos procesos celulares aún sin identificar (Lidón et al., 2021; Miranzadeh Mahabadi & Taghibiglou, 2020; Sakudo & Onodera, 2015). Se cree que dicha proteína posee un papel neuroprotector, roles anti apoptóticos durante el estrés oxidativo, evita demielización, aporta plasticidad sináptica, crecimiento de neuritas, modulación de especies de superóxido dismutasa (SOD), entre otras. Sin embargo, ciertos estreses aumentan la expresión de este gen: el estrés oxidativo, genotóxico o del retículo endoplasmático (Castle & Gill, 2017; Lidón et al., 2020) aumentando la neurotoxicidad, y por lo tanto la muerte celular.

3.4. RELACIÓN ENTRE PrP^C Y AD

En lo referente al AD, se ha demostrado que PrP^C está directamente asociada con los niveles de tau y de A β . Se ha demostrado en diversos estudios que la proteína PrP^C, por una parte, interacciona con los ligandos difusibles derivados de la proteína A β (ADDLs)

u oligómeros, las especies más tóxicas de las proteínas A β . En cambio, centrándose en la proteína tau, PrP^C regula negativamente su expresión. De esta forma, se conjetura que la proteína PrP^C puede tener un rol neuroprotector contra la AD, pero continúa existiendo controversia acerca de sus roles en el trastorno (Lidón et al., 2020, 2021).

La asociación existente entre las A β y PrP^C se debe a que PrP^C es un receptor de estas. Reconoce a A β gracias al extremo N-terminal. Cuando los oligómeros de A β son reconocidos por un receptor celular, causan una supresión de la plasticidad sináptica, disfunción sináptica y deterioro cognitivo. Así pues, PrP^C constituye un mediador de la disfunción sináptica inducida por el oligómero A β (Laurén et al., 2009). Sin embargo, la ausencia de este receptor celular no previene la disfunción neuronal ni afecta a los niveles de A β (Calella et al., 2010).

A pesar de que no disminuye los niveles de A β de forma directa, algunos estudios determinan que podría regular su generación debido a que inhibe el funcionamiento de BACE1. Como consecuencia, APP no es procesado y por lo tanto los niveles de A β disminuyen (Fluharty et al., 2013). Asimismo, algunos autores han demostrado que la molécula AICD, generada del procesamiento de APP intracelular, regula al alza la expresión de *PRNP*. En consecuencia, se origina un *feedback* en bucle, el cual mantiene el equilibrio entre la degradación y la formación de A β (figura 2) (Kellett & Hooper, 2009). Este hecho está respaldado por la disminución de los niveles de PrP^C con el envejecimiento de forma que la inhibición de BACE1 no es tan fuerte y se genera más A β . Cabe destacar que la presencia de PrP^C soluble podría secuestrar los oligómeros de A β en el espacio extracelular y bloquear sus efectos sinaptotóxicos, impidiendo la formación de los NFTs (Kellett & Hooper, 2009).

La proteína tau por su parte, se ha demostrado que modifica el transcriptoma del cerebro de los pacientes de Alzheimer. Es, además, un regulador positivo de la expresión del gen *PRNP* mediante la unión a los factores transcripcionales AP-1 y Sp1 (Lidón et al., 2020). De la misma forma, PrP^C regula negativamente la expresión de tau, originando una regulación cruzada entre ambos componentes. Esto podría explicar en parte el hecho de encontrar mayores niveles de expresión de PrP^C en etapas iniciales de la AD, coincidiendo con el crecimiento exponencial de las formas solubles de tau (Vergara et al., 2015).

Aunque, tal y como puede apreciarse en la figura 6, la expresión de PrP^C cae con el avance de la enfermedad.

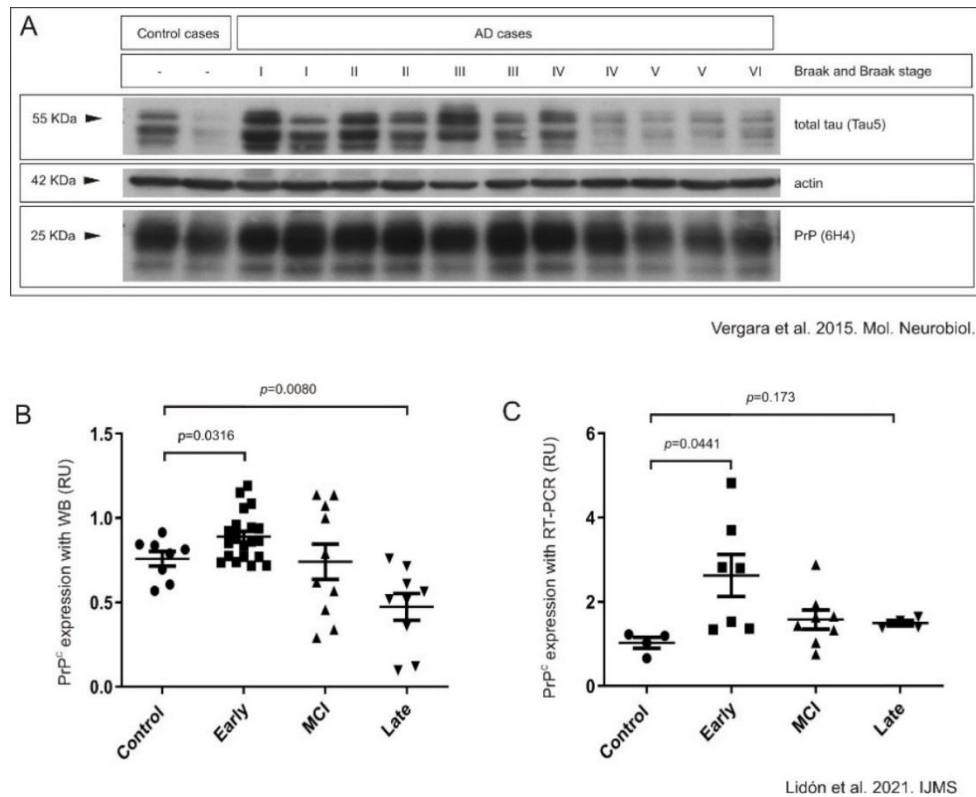


FIGURA 6. Sobreexpresión de PrP^C en el hipocampo de pacientes de AD post mortem en estadios iniciales (Braak I-II) comparado a pacientes sanos (C: controles). **A.** Western blot (WB) de la expresión total de PrP^C empleando anticuerpo anti-PrP^C (monoclonal 6H4). Como control de carga se utilizó la proteína actina (Vergara et al., 2015). **B-C.** Expresión de PrP^C en WB (B) y RT-PCR (C) en 13 cerebros sanos y 57 pacientes de AD agrupados como: Control (pacientes sanos), AD Inicial (Braak I-II), AD Intermedio (Braak III-IV) y AD Tardío (Braak V-VI) (Lidón et al., 2021).

3.5. MECANISMOS DE REGULACIÓN EPIGENÉTICA Y CONOCIMIENTOS ACTUALES EN TORNO AL AD Y A LA EXPRESIÓN DE PrP^C

La epigenética engloba aquellos mecanismos que conforman el fenotipo de forma reversible, sin cambios genotípicos. Algunos de estos métodos son la metilación del DNA, las modificaciones postranscripcionales de histonas (ya sean acetilaciones, metilaciones, fosforilaciones...) y los RNA no codificantes. En la AD, estos factores están alterados, y pueden contribuir a la expansión y desarrollo de la enfermedad. Las modificaciones epigenéticas tienen la capacidad de adaptarse rápidamente a los cambios originados en el medio debido a que son reversibles (Coppedè, 2021).

La primera prueba que apoyaba el papel de la metilación parcial del DNA en la patogénesis de la AD fue una metilación en menor grado en la región promotora del APP del lóbulo temporal de un paciente con AD. A partir de aquí, se han demostrado los diferentes papeles del aumento de la acetilación de histonas y de algunos microRNAs en la enfermedad (Coppedè, 2021).

3.5.1. METILACIÓN DEL DNA

La metilación del DNA está catalizada por una familia de DNA metiltransferasas. Estas enzimas transfieren un grupo metil de la molécula S-adenil metionina al quinto carbono perteneciente a un residuo de citosina (C) (Moore et al., 2013). El resto de las bases nitrogenadas se pueden metilar también, sin embargo, las Cs son los residuos en los que ocurre con más frecuencia. En aquellas Cs que se encuentren precediendo a una guanina, es decir, formando el dinucleótido CpG, la metilación es todavía más usual. Y estas CpG las encontramos en mayor frecuencia en las denominadas islas CpG. Sin embargo, la metilación se puede dar también en Cs que preceden a los nucleótidos adenina (A), C o timidina (T) en menor frecuencia. Aun así, en algunos tejidos, incluido el nervioso, estas metilaciones en lugares no CpG son más frecuentes de lo que se pensaba (Guo et al., 2014; Jang et al., 2017). Una isla CpG consiste en una secuencia de unas 1000 pb con un porcentaje de G y C elevado (Deaton & Bird, 2011). Estas sirven como sitios de unión para factores transcripcionales ya que se encuentran habitualmente en regiones regulatorias, de manera que en su forma no metilada es cuando se permite la unión, sino, en cambio, el gen es silenciado (Nikolac Perkovic et al., 2021). Normalmente, la mayoría las islas CpG del genoma de mamíferos están metilados (Moore et al., 2013) y el 70% se encuentran dentro de promotores (Moore et al., 2013). En los promotores de los genes *housekeeping*, muy habitualmente se encuentran islas CpG en su interior. Estas secuencias están altamente conservadas en los humanos, lo que nos indica que deben tener una función esencial (Moore et al., 2013).

Los patrones de metilación pueden ser estudiados por métodos como la inmunoprecipitación del DNA metilado, la conversión del DNA por bisulfito o ensayos basados en enzimas sensibles a la metilación (Moore et al., 2013).

PROMOTOR *PRNP*

Hoy por hoy, el patrón de metilación del promotor del gen *PRNP* y cómo afecta este a su expresión sigue siendo desconocido en humanos, a pesar de ser un gen de expresión constitutiva. Estudios del gen homólogo en ratones no afectado por la AD han sido realizados, de forma que el patrón de metilación y su correlación con la expresión del gen han sido descritos en diferentes tejidos de ratones (Dalai et al., 2017). Gracias al estudio, se ha determinado que la región promotora contiene una isla CpG desmetilada al tratarse de un gen *housekeeping*. La isla CpG se encuentra entre los nucleótidos -218 y +152 (unas 370pb). No obstante, se encontraron dinucleótidos CpG en la región 5' del promotor *PRNP* metiladas específicamente en función del tejido y del cultivo (Dalai et al., 2017). Paralelamente, se observó que la concentración de mRNA disminuía según el patrón de metilación de estas regiones.

Para determinar la correlación entre la metilación y la expresión de *PRNP*, se estudió la diferenciación neuronal de una línea celular de ratón perteneciente a un carcinoma embrionario, la línea P19C6. Se observó como aumentó la expresión del gen conforme la región 5' de la isla CpG se desmetilaba, lo que sucedía en las células diferenciadas (Dalai et al., 2017b). De esta forma, si se consigue caracterizar el patrón de metilación del promotor del gen *PRNP*, se puede determinar si hay diferencias entre diferentes estadios de Braak que se correlacionen con las variaciones en la expresión de PrP^C (figura 6), entre diferentes tejidos y saber que factores de transcripción están activos y contribuyen a la expresión en la enfermedad.

3.5.2. ACETILACIÓN DE HISTONAS

La acetilación de histonas supone un aumento en la expresión de un gen, ya que hace la cromatina más accesible. Mediante histonas acetiltransferasas (HAT), la carga positiva de la histona es neutralizada, por lo que la atracción entre el DNA (cargado negativamente) y la histona disminuye, y este se encuentra más libre y accesible para la unión de los factores transcripcionales. Por lo tanto, el grado de condensación de la cromatina, es el responsable de la regulación de la transcripción del gen. El mecanismo contrario, la desacetilación de histonas, aumenta la carga positiva de las histonas, por lo que la unión de estas con el DNA cromosómica aumenta, compactando más la cromatina (Nikolac Perkovic et al., 2021). Se puede estudiar el nivel de acetilación de histonas mediante la inmunoprecipitación de cromatina, seguida de una RT-PCR.

PROMOTOR *PRNP*

Este mecanismo epigenético afecta a la transcripción del gen *PRNP*. El estudio realizado por *Cabral et al.* (Cabral et al., 2002) ha demostrado que la inhibición de una histona-deacetilasa (HDAC) mediante el inhibidor tricostatina A (TSA) aumentaba la actividad del promotor, del mRNA y de la proteína PrP^C. Otros inhibidores que también se ha demostrado su eficacia son el cAMP y el éster del forbol. Ambos inhiben la desacetilación de las histonas, de forma que aumentan la expresión el gen. De este modo, se determina que la expresión del gen *PRNP* está regulada en gran medida por la conformación espacial de la cromatina, ya que la rotura de las fibras de la cromatina permite la unión de los factores de transcripción, así como activadores de la transcripción, como serían Sp-1, AP-1 y AP-2 (Mahal et al., 2001). Un incremento en la acetilación de histonas en estadios tempranos se podría correlacionar con el aumento de expresión en las primeras etapas de la AD de PrP^C.

3.5.3. MICRORNAs

Los microRNAs (miRNAs) son RNAs no codificantes de entre 19 y 25 bp. Inducen el silenciamiento génico postranscripcional al unirse a la región 3'-UTR (del inglés *untranslated regions*) de RNA mensajeros (mRNA) complementarios y provocar, o su degradación al formar un dsRNA (del inglés *double stranded DNA*), o la inhibición de la traducción (Walgrave et al., 2021). En el caso de que la hibridación con el mRNA sea completa, el transcrito será degradado, pero, en cambio, si la secuencia es reconocida parcialmente (unos 7 nucleótidos), la traducción será inhibida (Kim, 2005).

Los miRNA se originan mediante el procesamiento secuencial de un transcrito (*primary-miRNA*) cuya conformación corresponde con un '*hairpin*' que sufre una escisión por dos endonucleasas: Droscha (ocurre en el interior del núcleo) y Dicer (ocurre en el citoplasma), en ese orden respectivamente. Posteriormente pasa a formar parte de un complejo proteico denominado RISC con las proteínas argonautas (ARGO), cuya función es el silenciamiento de genes (Pushparaj et al., 2008) (figura 7).

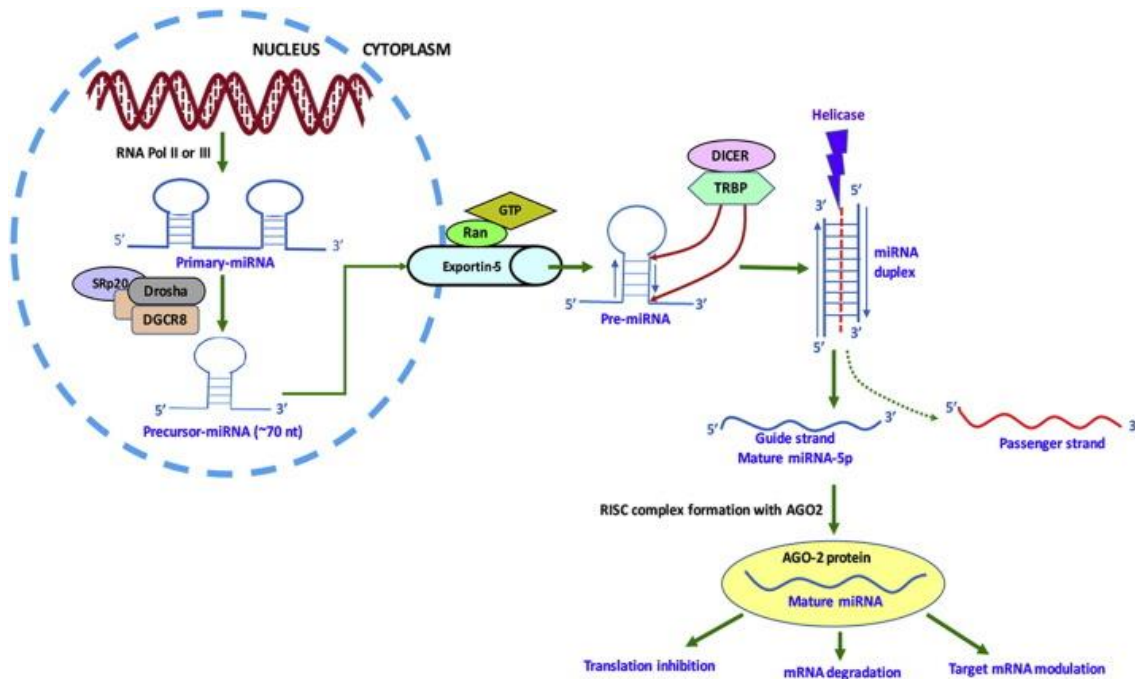


FIGURA 7. Biogénesis de miRNAs (Kumar & Reddy, 2016).

En lo referente al AD, varios estudios han demostrado la implicación de miRNAs en esta enfermedad y su potencial como biomarcadores o dianas terapéuticas. Estudios previos han demostrado que un gran número de miRNAs se encuentran desregulados en pacientes de AD, por lo que pueden estar implicados en el desarrollo de la enfermedad (Jia & Liu, 2016; Kumar & Reddy, 2016, 2019). Los miRNAs se pueden encontrar tanto en tejidos como en fluidos circulatorios, como el plasma, la sangre, la saliva, la orina y el LCR. En comparación con los mRNA, los miRNA son bastante estables en diferentes fluidos biológicos (Kumar & Reddy, 2016; Nikolac Perkovic et al., 2021). Estas características provocan que los miRNAs puedan constituir biomarcadores fiables, sensibles y no invasivos. Se ha demostrado que miRNA-101 modula negativamente la expresión del APP en cultivos de células humanas, de forma que puede modular la acumulación de A β . En pacientes de AD se observó que está regulado negativamente, disminuyendo conforme la enfermedad avanza. Por consiguiente, la acumulación de A β en estadios finales puede que se incremente por la disminución de miRNA-101 (Jia & Liu, 2016; Long & Lahiri, 2011). Por otra parte, se ha observado un decrecimiento en los niveles sanguíneos de miRNA-223, con una correlación positiva fuerte con valores de MMSE (ver más arriba), de forma que se especula que pueda ser un marcador de AD severo según las puntuaciones de MMSE (Jia & Liu, 2016).

PROMOTOR *PRNP*

Otro de los miRNAs que se identificó como asociado al AD fue el miRNA-519, el cual está regulado positivamente (Jia & Liu, 2016) y según un estudio *in silico* de nuestro grupo en colaboración de la Dra. Eulàlia Martí, miRNA-519a-3p tiene como secuencia diana la región 3'-UTR del promotor de *PRNP*, la cual tiene una longitud de 1608bp. Además, ya se ha demostrado la degradación del mRNA de PRNP por los miRNA-519b-3p y miRNA-519d-3p, pertenecientes a la misma familia (Pease et al., 2019).

En AD, se ha demostrado su incremento en sangre (Zhao et al., 2019) y suero sin mostrar correlación con MMSE (Jia & Liu, 2016), en LCR (46) y en *frontal cortex* (FC) (Lau et al., 2013). Sabemos que el patrón de expresión de PrP^C, como se observa en la figura 6, está regulado negativamente en los estadios finales de la enfermedad, por lo que miRNA-519a-3p puede ser uno de los responsables de la inhibición que sufre el gen. En Lau et al 2013 (Lau et al., 2013), se determina su patrón de expresión por estadios de Braak de miRNA-519a-3p, de forma que se puede observar que tienen una correlación inversa con PrP^C al inicio de la enfermedad.

Es importante mencionar que la expresión de este mismo microRNA se encuentra reducida en la enfermedad de Parkinson en células madre pluripotentes inducidas (iPSC). Este hecho le confiere potencial a miRNA-519a-3p como biomarcador ya que podría llegar a ser un biomarcador fiable si permite discernir entre la AD y otras enfermedades con cuadros de demencia y degeneración cognitiva (Tolosa et al., 2018).

Cabe destacar que la mayoría de los estudios realizados en torno a las modificaciones epigenéticas acaecidas en la AD han sido realizados con una cantidad de muestras limitadas. Además, debido a la dificultad que presenta el diagnóstico de los estadios iniciales las muestras son todavía más escasas. Así pues, nuestra línea de investigación principal se ha focalizado en los estadios iniciales del trastorno para entender los mecanismos de funcionamiento y así poder diagnosticar y tratar de forma más efectiva y temprana la AD.

4. HIPÓTESIS

Sabiendo que la expresión de la proteína PrP^C, asociada al AD, varía según el estadio de Braak y Braak de la enfermedad, creemos que diversos mecanismos epigenéticos pueden estar implicados. Así, cambios epigenéticos que afectan a la transcripción, como serían

la metilación y la acetilación de histonas del promotor, podrían inducir el incremento en estadios tempranos, mientras que los que afectan al mRNA, como serían los miRNA, estarían vinculados con la reducción de expresión en etapas avanzadas. Poder determinar los mecanismos implicados nos serviría como biomarcadores para un diagnóstico más preciso y un tratamiento contra el desarrollo de la enfermedad.

5. OBJETIVOS

La expresión de la proteína PrP^C está afectada por mecanismos epigenéticos, como se ha podido observar en ratones (ver introducción) y sabemos que aumenta en los estadios iniciales de la enfermedad, y posteriormente disminuye. Por ello, el objetivo principal de este trabajo es estudiar los mecanismos epigenéticos que afectan a la expresión de la proteína PrP^C en los diferentes estadios de Braak y Braak de la enfermedad de la AD. Para ello, nos hemos propuesto los siguientes objetivos específicos:

- 1º Análisis de la regulación transcripcional del promotor del gen *PRNP* en AD mediada por la **metilación** del promotor y la **acetilación** de las histonas asociadas al promotor.
- 2º Análisis de la regulación postranscripcional del gen *PRNP* en AD mediada por el miRNA, **miR519a-3p**.

6. METODOLOGÍA

6.1. MATERIALES

- BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems; Warrington, Reino Unido)
- 5x Sequencing Buffer v3.1 (Applied Biosystem, Warrington, Reino Unido)
- Placa de 96 pocillos (Applied Biosystem, Singapur, Singapur)
- 2x SYBR Green Master Mix (Qiagen, EEUU)
- 2x miRCURY SYBR Green Master Mix (Qiagen, EEUU)
- ROX reference Dye (Qiagen, EEUU)
- 50mM Tris-HCL pH=8
- 100mM EDTA Ph=8
- 1% SDS
- Proteinasa K
- RNAasa
- Etanol 70% y 95%
- H₂O *nuclease free* (Ambion,USA)
- BamHI (New England BioLabs,)
- Taq AccuPrime (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA)
- 10x Buffer II Taq AccuPrime (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA)

- Bisulfito de sodio (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU)
- Hidroquinona (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU)
- GeneJet Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit (Thermo Scientific, Vilnius, Lituania)
- 3N NaOH
- Qiagen PCR purification Kit
- 50mM HEPES-KOH pH 7,6
- 500mM LiCl
- 1mM EDTA
- Agarosa (Conda-Pronadisa, Madrid, España)
- Formaldehido 1%
- 50 mM HEPES-KOH pH 7,5
- 1mM EDTA
- 0,5mM EGTA.
- Glicogeno 2 µg/µl
- 10M acetate de amonio pH = 7,8
- H3K9ac; Abcam
- *ChromPure Rabbit IgG* (Jackson Immuno Research)
- 1% Igepal
- 0,7% Na-Deoxicolat
- Dynabeads-proteína G (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific)
- 100mM NaCl

6.2. MUESTRAS HUMANAS:

El grupo de investigación posee muestras de cerebros humanos *post mortem* de pacientes sanos (C1-C13), así como de pacientes en diferentes estadios de la AD (AD1-AD50). Las muestras pertenecen al biobanco de Tejidos Neurológicos de IBIDELL-Hospital Universitario de Bellvitge y Universidad de Barcelona.

Tabla 1. Pacientes control y AD, categorizados por estadios de Braak y Braak del I al VI usados en este estudio.

Case number	Braak and Braak stage	Gender	Age	Post-mortem delay	Analysis	Tissue	RIN
C1	-	M	39	9h 15min	miRNA	FC	7.00
C2	-	M	85	N.A.	miRNA	FC	6.00
C3	-	M	78	N.A.	miRNA	FC	6.10
C4	-	M	59	N.A.	miRNA	FC	7.60
C5	-	M	43	4h 35min	miRNA	HIPO	N.A.
C6	-	M	70	N.A.	miRNA	FC	2.60
C7	-	M	51	3h 30 min	Met	HIPO	N.A.
C8	-	F	86	4h	ChIP/miRNA	FC	6.80
C9	-	F	46	9h 35min	miRNA	HIPO	N.A.
C10	-	M	70	13h	ChIP/Met/miRNA	HIPO	6.60
C11	-	F	82	11h	Met/miRNA	HIPO/FC	6.00
C12	-	F	46	20h	ChIP/Met	HIPO	2.90
C13	-	M	61	2h 45 min	Met	HIPO	5.10
AD1	I	F	64	2h 15min	Met	HIPO	N.A.
AD2	I	M	53	6h 15 min	ChIP/Met	HIPO	8.50
AD3	I	M	74	4h	Met	HIPO	N.A.
AD4	I	F	79	3h 35min	Met	HIPO	6.50
AD5	I	M	61	5h 35min	miRNA	FC	6.60
AD6	I	M	67	14h 40min	ChIP/mRNA	HIPO/FC	4.40
AD7	I	F	73	15h 45min	ChIP/miRNA	HIPO/FC	4.90
AD8	I	M	70	5h	miRNA	FC	6.50

AD9	II	M	65	5h	ChIP/Met	HIPO	N.A.
AD10	II	F	86	15h	Met	HIPO	4.00
AD11	II	F	75	4h 55min	miRNA	HIPO	N.A.
AD12	II	F	86	4h 15min	miRNA	HIPO	N.A.
AD13	II	M	55	9h 45min	miRNA	HIPO	N.A.
AD14	II	F	57	4h 30min	miRNA	HIPO	N.A.
AD15	II	M	69	3h 45min	miRNA	FC	3.70
AD16	II	M	74	5h 30min	ChIP/miRNA	HIPO/FC	6.00
AD17	III	M	77	11h 15min	Met	HIPO	5.00
AD18	III	F	71	7h 15min	ChIP/Met/miRNA	HIPO/FC	5.40
AD19	III	F	77	11h 30min	ChIP/Met	HIPO	N.A.
AD20	III	F	79	3h 35min	Met	HIPO	N.A.
AD21	III	M	84	20h 45min	Met	HIPO	6.40
AD22	III	F	83	2h 30min	miRNA	HIPO	N.A.
AD23	III	M	87	3h 30min	miRNA	HIPO	N.A.
AD24	III	F	82	4h 50min	miRNA	HIPO	N.A.
AD25	III	M	64	6h	miRNA	FC	N.A.
AD27	IV	F	81	12h	Met	HIPO	2.70
AD30	IV	M	83	7h 25min	ChIP/miRNA	HIPO	2.60
AD31	IV	F	90	10h	miRNA	FC	4.50
AD32	IV	F	81	5h	miRNA	HIPO	N.A.
AD33	V	M	87	7h 5min	ChIP/Met/miRNA	HIPO/FC	3.90
AD34	V	M	75	11h 30min	Met	HIPO	N.A.
AD35	V	M	82	3h 45min	ChIP/Met	HIPO	7.00
AD36	V	M	88	4h 45min	Met	HIPO	N.A.
AD37	V	F	82	1h 45min	miRNA	FC	4.80
AD38	V	F	75	4h 15min	miRNA	FC	4.70
AD39	V	M	93	3h	Met/miRNA	HIPO	N.A.
AD40	V	M	91	5h	ChIP	FC	N.A.
AD41	V	F	88	9h	Met	FC	N.A.
AD42	V	M	92	7h 45min	miRNA	FC	7.40
AD43	V	F	87	3h	miRNA	FC	6.20
AD44	VI	M	67	8h	Met	HIPO	6.70
AD45	VI	F	56	7h	miRNA	FC	2.70
AD46	VI	F	71	5h	miRNA	FC	3.10
AD47	VI	F	77	6h 15min	miRNA	FC	4.50
AD48	VI	M	82	5h	miRNA	FC	7.10
AD49	VI	F	95	5h	miRNA	FC	5.30
AD50	VI	M	85	4h 30min	miRNA	FC	5.90

F: female; M: male; FC: Frontal cortex; HIPO: Hippocampus N. A.: not available

6.3. EXTRACCIÓN DE DNA

Inicialmente, se corta un fragmento de cerebro de uno 30mg tanto de muestras control como de muestras de estadios avanzados de AD. El fragmento de cerebro es resuspendido en un tampón de lisis que contiene: 100mM NaCl, 50mM Tris-HCL pH=8, 100mM EDTA Ph=8, 1% SDS y proteinasa K. La solución es incubada *over-night* (O/N) a 56°C en agitación. Al día siguiente, se añade RNAasa y se vuelve a incubar durante 30 min a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se introduce NaCl para neutralizar la carga negativa de los fosfatos. Finalmente, se procede a purificar el DNA por precipitación, de forma que, tras una primera precipitación, se traspasa el sobrenadante a otro *ependorf*, el cual contiene isopropanol para precipitar el DNA mediante una segunda precipitación. En esta segunda precipitación, el sobrenadante es descartado y el pellet es lavado con etanol al 70% para terminar de eliminar proteínas residuales, sales y azúcares.

El sobrenadante es descartado y el pellet se deja secar para posteriormente resuspenderlo en 30 μ L de H₂O *nuclease free*. Finalmente, se cuantifican las muestras con el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000, con el programa ND-1000 V3.8.1.

6.4. CONVERSIÓN POR BISULFITO

Una vez extraído el DNA de las diferentes muestras cerebrales, este fue bisulfitado mediante el protocolo (Pappas et al., 2013). En el paso inicial de este método se utilizó la enzima *BamHI* debido a que no presentaba dianas de restricción en los amplicones. Se utilizan 2 μ L de esta enzima para digerir 1 μ g de DNA. Se incubó O/N a 37°C y posteriormente se limpia y purifica mediante el kit “Thermo Scientific GeneJet Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit”.

A continuación, comienza la conversión del DNA de cadena simple por bisulfito. Esta técnica resulta en la deaminación de las Cs no metiladas a uracilos. Se desnaturaliza el DNA con NaOH 3N durante 15 min a 37°C y posteriormente se purifica el DNA de igual manera que el paso anterior. Paralelamente, se prepara una solución de bisulfito de sodio-hidroquinona, la cual debe ser preparada el mismo día de su uso. Esta solución se prepara diluyendo el bisulfito de sodio en H₂O MQ, el pH ha de ser 5 y finalmente se añade 1 mL de una solución de hidroquinona (tiene 2 meses de caducidad). Esta solución se utiliza para sulfonar las Cs no metiladas del ssDNA, cuyo proceso se realiza en el Termociclador Mastercycler® EP, EPPENDORF. Tras la incubación, se obtienen las Cs sulfonadas en el carbono 6. A continuación, se procede a desaminar las citosinas-6-sulfonato a uracilo-6-sulfonato con NaOH 3N. Los uracilos-6-sulfonados se convierten a uracilo mediante una desulfonación, y para ello se mezcla (en hielo) el DNA con glicógeno 2 μ g/ μ L, 10M acetato de amonio pH 7,8 y etanol 95% *ice cold* (en ese orden) y se deja en hielo 10 min. Se procede a centrifugar a 4°C para retirar la solución y quedarnos con el pellet, el cual se debe lavar con etanol al 70% *ice cold* y posteriormente centrifugar a 4°C. Finalmente, se deja secar el DNA convertido y precipitado.

Por consiguiente, los residuos de Cs metiladas no serán modificados ya que los iones de bisulfito empleados para la conversión no reaccionan con ellas. Gracias a esta técnica, y tras una posterior amplificación por PCR y secuenciación del amplicón resultante, se pueden determinar las Cs metiladas. Aquellas que aparezcan como C en los resultados de la secuenciación, corresponderán a Cs metiladas. Algunas de las timinas resultantes, en

cambio, corresponderán con Cs no metiladas que han sufrido la conversión a uracilo (Pappas et al., 2013) (figura 8).

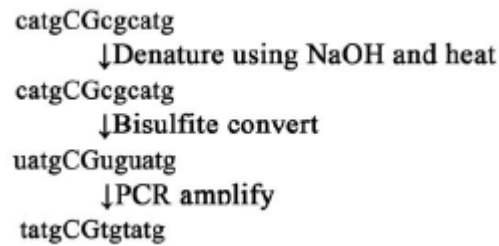


FIGURA 8. Representación del cambio de base en la secuencia de DNA con la conversión por bisulfito (Pappas et al., 2013).

6.5. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP)

Partiendo de 130mg de tejido cerebral de pacientes de AD en diferentes estadios de Braak y Braak, tanto de hipocampo como de FC, se disgregan las muestras mecánicamente con un embolo y se fijan con una solución de 1% de formaldehido, 50 mM Hepes-KOH pH 7,5, 100mM NaCl, 1mM EDTA y 0,5mM EGTA durante 15 min a 4°C. Tras la fijación, se lavan las muestras con PBS y se centrifugan a 4°C con tampón salino (composición en la tabla siguiente), de lo que se obtienen los extractos celulares.

Tabla 2. Composición de los tampones de lisis empleados en el protocolo de la ChIP.

Tampón de lisis de membrana celular	50mM Hepes-KOH Ph 7,5, 140 mM NaCl, 1mM EDTA, 10% glicerol, 0,5% Igepal, Triton X-100
Tampón de eliminación de detergente	200 mM NaCl, 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl pH 8, 0,5mM EGTA
Tampón de disrupción del núcleo	100 mM NaCl, 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl pH 8, 0,5mM EGTA, 0,1% Na-Deoxicolato, 0,5% N-Lauroilsarcosina

Estos se sometieron a 10 ciclos de sonicación de 8s con un pulso del 50% y una potencia de 72%, utilizando la *Ultrasonic Processor VP50H*. De este lisado celular crudo, se guarda un 5%, el cual conformará el *input*, el resto se bloquea con PBS al 0,5% de albumina sérica bovina (BSA) y a continuación se hace un prelavado con *Protein G Dynabeads* sin anticuerpos. Es entonces cuando se realiza la inmunoprecipitación, la

mitad de la muestra se incuba con *Protein G Dynabeads* conjugados con el anticuerpo anti-histona 3 acetilada en la lisina 9 (H3K9ac), la cual se correlaciona con una transcripción activa, O/N a 4°C, y la otra mitad se utilizará como control negativo y se incuba con el anticuerpo *ChromPure Rabbit IgG*.

Finalmente, el DNA inmunoprecipitado se lava con tampón de lavado (50mM Hepes-KOH pH 7,6, 500mM LiCl, 1mM EDTA, 1% Igepal, 0,7% Na-Deoxicolat) y se eluye con 50mM Tris pH 8, 10mM EDTA y 1% SDS.

Para revertir las uniones con los anticuerpos, las muestras se incuban a 65°C O/N. Finalmente el DNA se trata con RNAasa A y Proteinasa K, y se purifica utilizando el kit “Qiagen PCR purification Kit”. Es entonces cuando se analizará el DNA por PCR o RT-PCR para cuantificar la acetilación de la histona.

6.6. PCR

Los primers utilizados fueron diseñados mediante el software de Methyl Primer Express v.1.0 para los necesarios en el análisis de la metilación y el programa Primer3Web (<https://primer3.ut.ee/>) para los destinados al análisis de la ChIP, los cuales corresponden con la pareja de primers Me2.

Para el análisis de metilación, los primers se diseñaron de forma específica para la isla CpG teniendo en cuenta la desaminación del DNA. Así pues, se diseñaron dos tipos de primers: los BSPs (BSP1) y los MSP (nMeB4 y Me5). Los BSPs están dirigidos a regiones de la isla CpG que no poseen Cs, por lo que estos primers deberían tener facilidad a la hora de hibridar con el DNA bisulfitado debido a que la secuencia no ha cambiado. Sin embargo, la región contiene muchas Cs, por lo que es complicado diseñar un primer libre de ellas. Por otra parte, los MSP corresponden con dos parejas de primers que están dirigidos a la misma región, pero, sin embargo, uno posee las Cs convertidas (nMe) y el otro las mantiene como si estuvieran todas metiladas (Me) y por lo tanto no se convirtieran a timina. En este caso, solo están reflejadas las parejas de primers de las que se obtuvo amplificación.

Tabla 3. Primer diseñados para los análisis de metilación y acetilación de histonas.

	PRIMER (5'-3')	T _m (°C)	LONGITUD	ANÁLISIS
Me2- <i>PRNP</i> -F	GCCTGGTTTACGCCCATTTTC	62	200 bp	ChIP
Me2- <i>PRNP</i> -R	CGCTCCGTTTAAAAACCCGT	62	200 bp	ChIP
nMeB4- <i>PRNP</i> -F	GTTAGGGAGTGATGGTATTT	54	135 bp	Met
nMeB4- <i>PRNP</i> -R	CAACCAACCAAATTTAAATT	54	135 bp	Met
BSP1- <i>PRNP</i> -F	TTTGTTTAAAATAAGGAGTAGAAAG	56	292 bp	Met
BSP1- <i>PRNP</i> -R	AACTCATTA ACTATAAAAATCATCT	56	292 bp	Met
MeB5- <i>PRNP</i> -F	GGGGGTATAGAGTGTGCGTC	-	203 bp	Met
MeB5- <i>PRNP</i> -R	CGAACGTTTACCTACCTCGAT	-	203 bp	Met
nMeB5- <i>PRNP</i> -F	GGGGGTATAGAGTGTGTGTT	-	203 bp	Met
nMeB5- <i>PRNP</i> -R	CCCAAACATTTACCTACCTCAA	-	203 bp	Met

Para el estudio de la metilación del promotor de *PRNP* se establecieron las condiciones descritas en las tablas 4 y 5. Pero, en primer lugar, se determinó la temperatura de hibridación específica para cada pareja de primers realizando PCRs con gradiente de temperatura, de forma que se establecieron las T_m (*melting temperature*) de la tabla 3. La temperatura de elongación viene determinada por la temperatura óptima de la DNA polimerasa. En este caso, se utiliza la Taq AccuPrime de Invitrogen.

Tabla 4. Componentes de la reacción de PCR

REACTIVOS	VOLUMEN
10x Buffer II Taq AccuPrimer (sin MgSO ₄)	2,5 µL
Extra MgSO ₄ 50mM	1 µL
Primer <i>forward</i> (10 µM)	1 µL
Primer <i>reverse</i> (10 µM)	1 µL
Polimerasa Taq AccuPrime	0,2 µL
DNA	10-25 ng
H ₂ Odd (<i>nuclease free</i>)	Hasta 25 µL

Tabla 5. Programa de la reacción de PCR.

	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	CICLOS
Iniciación	94	2 MIN	X1
Desnaturalización	94	30 S	X40
Hibridación	TM	30S	
Elongación	68	30S	
Elongación final	68	10 MIN	X1
Almacenaje	4	∞	X1

Una vez hemos obtenido el producto de la PCR, para aumentar la especificidad y la concentración de amplicón, se llevaron a cabo PCR nested de cada producto de PCR. En estas reacciones, se utilizan 2 µL del producto directo de la PCR inicial, y el resto de reactivos en las mismas cantidades que en la PCR directa, además de usar los mismos parámetros en el termociclador (Tabla 4 y 5)

El producto de las PCR nesteds, en un principio se separaba el amplicón en un gel de agarosa de entre el 0,7% y el 1,5%, y con bromuro de etidio se detectaba el DNA en el GelDoc™ XR + (BioRad) con Image Lab™ Software. El gel se corrió a 100V durante aproximadamente 1h. Posteriormente se extraía la banda y se purificaba con el kit “Thermo Scientific GeneJet Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit”, sin embargo, el DNA fue eluido en 10 µL de H₂Odd en lugar de utilizar el *elution buffer*. Al final se acabó directamente limpiando el producto de la PCR sin pasar por el gel de agarosa con

el mismo kit porque el DNA bisulfitado es delicado y se perdía mucho material durante el proceso. Las muestras se cuantificaron en el NanoDrop ND-1000, con el programa ND-1000 V3.8.1, y finalmente se preparó la reacción de secuenciación.

La reacción de secuenciación se lleva a cabo utilizando el kit de secuenciación BigDye Terminator v3.1 con los mismos primers empleados en la amplificación. Una vez terminada la reacción, los análisis de la secuencia fueron realizados por el servicio de genómica de la UB (CCiTUB). Las cantidades del resto de reactivos y los parámetros del termociclador son los expuestos en las tablas 6 y 7 respectivamente.

Tabla 6. Componente de la reacción de PCR de secuenciación.

REACTIVOS	VOLUMEN
5x Sequencing Buffer v3.1	1 μ L
Polimerasa BigDye	1 μ L
Primer <i>forward</i> o <i>reverse</i> (3,2 μ M)	1 μ L
DNA	10-25 ng
H ₂ Odd (<i>nuclease free</i>)	Hasta 10 μ L

Tabla 7. Programa de la reacción de PCR de secuenciación.

TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	CICLOS
96	1 min	x1
96	10 s	x25
T ^a de hibridación	5s	
60	4 min	
4	∞	x1

6.7. RT-PCR

La RT-PCR para la cuantificación de la cromatina inmunoprecipitada se lleva a cabo con “SYBR Green Master Mix” de Roche (Bergkällavägen, Suecia), mientras que en el caso de la cuantificación de miRNA se lleva a cabo con el kit “miRCURY LNATM SYBR Green PCR Kit” de Qiagen (Maryland, EEUU), producido en Estados Unidos. Se ejecuta

en StepOne Plus (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) y la cuantificación de fluorescencia y análisis de datos se establece calculando valores de T_m y C_t .

En el caso del análisis de la ChIP, cada muestra de DNA dispone de 3 soluciones distintas, que son el producto de la inmunoprecipitación. Cada muestra contiene las soluciones de Input (control basal), IgG (control negativo) y α H3K9 (histona H3 (acetil K9) anticuerpo). En este caso, la relativización de la PCR se hace contra el input.

Las diluciones se realizan normalmente 1/60. Una vez tenemos las diluciones, en una placa de 96 pocillos introducimos 3,5 μ L del DNA diluido correspondiente en cada pocillo, y posteriormente 6,5 μ L de la mix preparada con los reactivos, correspondiente a la tabla 7.

Tabla 8. Componentes de la reacción de PCR para el estudio de acetilación.

REACTIVOS	VOLUMEN
2x SYBR Green Master Mix	10 μ L
10 μ M 3'-primer Me2-PRNP-F (0,3 μ M concentración final)	0,6 μ L
10 μ M 5'-primer Me2-PRNP-R (0,3 μ M concentración final)	0,6 μ L
H ₂ Odd (<i>nuclease free</i>)	5,3 μ L
$V_t = 20 \mu$ L	

Los *ependorfs* donde se prepare la mix deben estar protegidos de la luz mediante papel de aluminio. El programa utilizado para la RT-PCR StepOne Plus son los reflejados en la tabla 9.

Tabla 9. Programa de la reacción de PCR para el estudio de acetilación.

TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	CICLOS
95	10 min	x1
95	15 s] — x40
62	1 min	
95	15s	
62	1 min	x1
95	15s	x1

En lo referente al análisis postranscripcional de los miRNA, haciendo uso de las herramientas bioinformáticas TargetScan, miRWalk, RNA22 y SUM se han podido determinar *in silico* los miRNAs que tienen una diana en el promotor de PRNP. El miRNA hsa-miR-519a-3p fue uno de los resultados obtenidos en todos los programas y

se sabía que este estaba *up-regulated* en AD, por lo que podía explicar la caída de expresión de PrP^C. La secuencia de este miRNA es 5'-AAAGUGCAUCCUUUUAGAGUGU-3'.

En un primer lugar, debe realizarse una retrotranscripción a las muestras de RNA, que se encuentran almacenadas a -80°C. Previamente, es necesario diluir los RNA *templates* con H₂Odd *nuclease free* para trabajar con él a 5ng/μL. El cDNA se debe obtener con el kit de Qiagen (Maryland, EEUU) “miRCURY LNA RT Kit”. Para la retrotranscripción las proporciones necesarias son las siguientes:

Tabla 10. Componentes de la reacción de retrotranscripción de las muestras para el estudio postranscripcional.

REACTIVOS	VOLUMEN
<i>5x Reaction buffer</i>	2 μL
<i>Enzyme mix</i>	1 μL
RNA (5ng/ μL)	2 μL
H ₂ Odd (<i>nuclease free</i>)	5 μL
V _t = 10 μL	

También hay que realizar la retrotranscripción del control interno en el caso de que se vaya a utilizar para los miRNAs. El control interno es UniSp6 y la reacción se prepara con 0,5 μL de RNA y el 1,5 μL de diferencia con las muestras es agua (6,5 μL):

Las soluciones se dejan incubando durante 1h a 42°C y una vez ha transcurrido la hora, se inactiva la reacción subiendo la temperatura a 95°C durante 5 min. Finalmente se cuantifica el cDNA en el NanoDrop ND-1000 con el programa ND-1000 V3.8.1. Gracias a la cuantificación, las muestras se pueden estandarizar y así realizar las diluciones de las muestras con concentraciones similares.

Inicialmente, las diluciones se realizaban a 1/60 también, sin embargo, no se obtenían resultados. De esta forma, se estableció utilizar una dilución 1/20 y aumentar 5 ciclos más la elongación para obtener amplificación. En este caso, se debe realizar también la dilución del control interno UniSp6 Spike-in template, para así poder comprobar la eficacia de la síntesis de cDNA y la PCR. Cada pocillo de la placa de 96 contiene 3 μL del cDNA correspondiente y 7 μL de mix, reflejada en la tabla 11. Por otra parte, se realiza también un control negativo, donde en vez de cDNA se introduce H₂Odd.

Tabla 11. Componentes de la reacción de RT-PCR para el estudio postranscripcional.

REACTIVOS	VOLUMEN
2x miRCURY SYBR Green Master Mix	5 μ L
ROX reference Dye	0,5 μ L
Primer miRNA	1 μ L
H ₂ Odd (<i>nuclease free</i>)	0,5 μ L
	V _t = 7 μ L

El primer que se utiliza de referencia es hsa-miR-103a-3p, el cual es de expresión estable, y el miRNA cuya expresión se quiere estudiar es el hsa-miR-519a-3p. Los parámetros de RT-PCR StepOne Plus son los reflejados en la tabla 12.

Tabla 12. Programas de la reacción de RT-PCR para el estudio postranscripcional.

TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	CICLOS
95	2 min	x1
95	10 s]— x40
56	1 min	
95	15s	
60	1 min	x1
95	15s	x1

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. ESTUDIO DE METILACIÓN DEL PROMOTOR DE *PRNP*

Para poder estudiar el estado de metilación de la isla CpG del promotor de *PRNP* en los diferentes estadios de la AD, es necesario convertir el DNA extraído por bisulfito, posteriormente realizar una amplificación y finalmente secuenciar el amplicón. Las Cs que obtengamos en la secuenciación corresponderán con Cs metiladas.

En un inicio, de gran parte de las muestras el grupo de investigación ya había extraído el DNA previamente, por lo que solo faltaban algunas muestras de FC por extraer. Se realizaron varias rondas de conversión por bisulfito del DNA y finalmente las muestras podían ser amplificadas mediante la PCR.

Los diferentes primers diseñados están dirigidos a las regiones que especifica las figuras 9 y 10. Con el primer BSP1 se consiguieron secuenciar tan solo un par de muestras, la primera de AD-I y la segunda de AD-III, ambas de hipocampo. En la secuencia obtenida, todas las Cs estaban conservadas de la secuencia original, lo que quiere decir que dicha

region esta hipermetilada en los estadios estudiados, destacando que no solo las Cs pertenecientes a dinucleótidos CpG se encontraba metiladas.

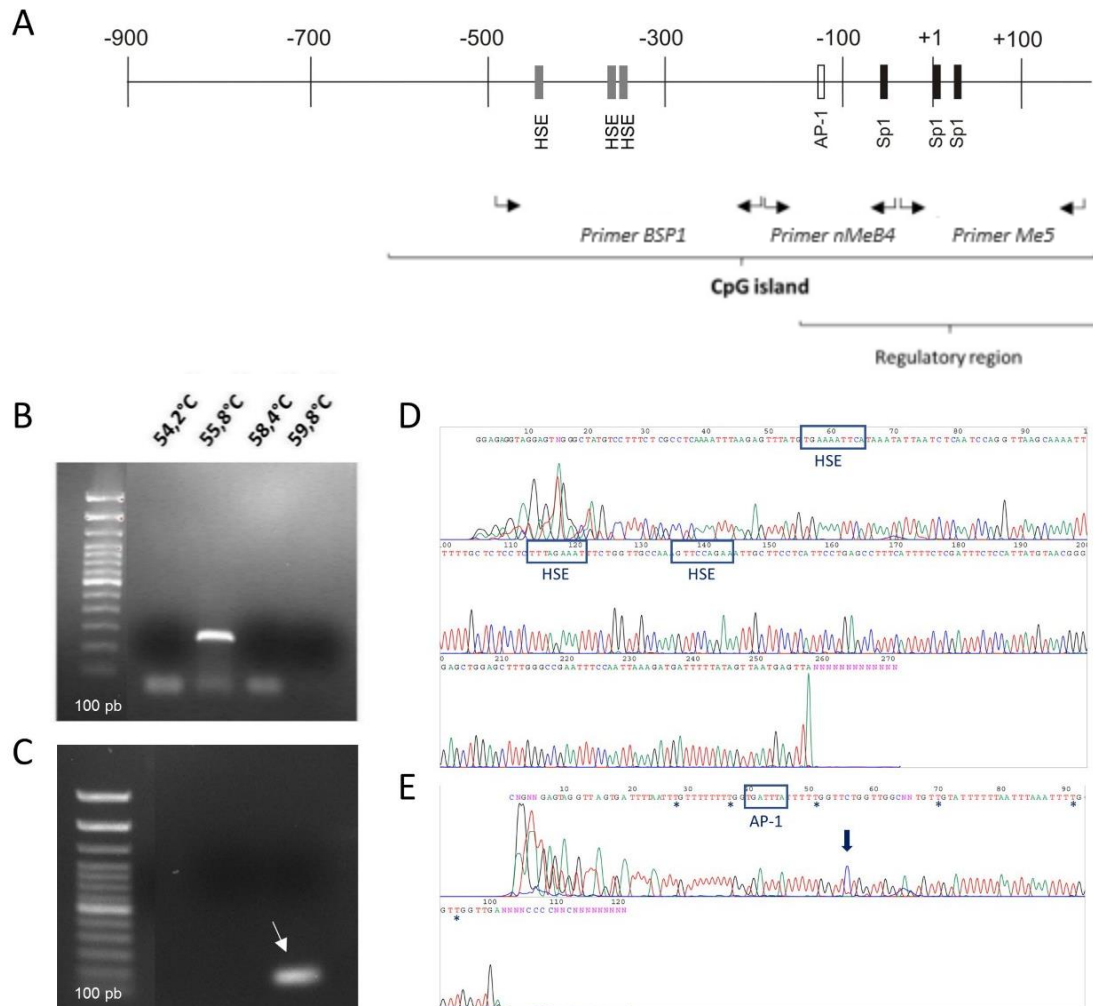


Figura 9. Análisis metilación del promotor de *PRNP*. **A.** Esquema de la región 5' flanqueante del promotor *PRNP* que contiene la isla CpG y marcados los sitios de unión de los factores de transcripción, que son objeto de análisis en este estudio. Además, se observan las regiones de hibridación de los primers diseñados marcados con flechas. **B-C.** Geles de agarosa al 0,7%. **B.** Muestra gradiente de los amplicones de BSP1 para determinar la T_m para los primers, donde la única banda observable es a 56°C **C.** Amplificación representativa mediante los primers nMeB4 de una de las muestras. Véase el carril vacío a la izquierda del amplicón (señalado con una flecha blanca) en el que se usaron los primers MeB4. **D-E.** Cromatograma representativo de secuenciación por Sanger de los amplicones generados por BSP1 (**D**) y nMeB4 (**E**) con los respectivos sitios de unión a factores transcripcionales marcados. La secuenciación se realizó con los primers *forward*.

```

56281 t|ttgcctaa aa|caaggagt agaaagt|gaa tgaagg|aagg aa|caggtgat ggt|cagtgtc
56341 ctttctacgc ctcaaa|attt aagagt|ttat gtgaaa|attc ataaat|atta atct|caatcc
56401 aggttaagca aaattt|tttg ctctc|ctctt tagaa|attc tggttg|ccaa agtt|ccagaa
56461 attgcttctt cattc|ctgag ccttc|attt tctcg|attc tccatt|atgt aacg|gggagc
56521 tggagctttg gccc|gaattt ccaatt|aaag atgatt|ttta cagt|caatga gtt|cgtcag
56581 gggagcgatg cacc|cgagg cggta|tcaac tga|tcaagt gttt|aagtga attt|taattt
56641 gttttttttg gtgatt|tatt tttgg|ttctg gttgg|tagtg ttgt|attttt taatt|taaat
56701 tttggttggt t|gccc|cccg ggcac|acag tatc|gcccg gccg|ccggc aattg|ctcc
56761 cgcgccgacc t|ccg|ccc|cg agcgc|cccg ctcc|cttcc ccgccc|ccg tccct|cccc
56821 tcggcccccg gcgt|cgctg tctcc|cagc ca|tcgctga cagcc|cggc gccg|cgagct
56881 tctctctctc tcacg|accga ggcag|ataa ccccc|gggt

```

Figura 10. Fragmento del promotor estudiado. Las regiones negras son las que se han conseguido secuenciar en nuestro estudio y las grises las que todavía no se han conseguido. Los nucleótidos marcados de verde son Cs modificadas (no metiladas), mientras que los azules se han conservado (metiladas). Las flechas violetas marcan las secuencias diana del primer BSP1, y en su interior marcados con cuadros azules encontramos el factor de transcripción HSE. Las flechas azules marcan la región amplificada por los primers nMeB4, y en su interior marcado con un cuadro azul claro se puede observar el factor de transcripción AP-1. Las flechas rojas marcan los lugares de hibridación de los primer Me5, con el factor de transcripción SP-1 marcado en recuadros naranjas, aunque como se observa, no recoge los tres sitios de unión.

Por otra parte, para el primer nMeB4 se consiguieron secuenciar todas las muestras disponibles, tanto de hipocampo como de FC. En este caso, solo se observó una C que no se encontraba modificada, y que por lo tanto estaba metilada. Esta misma C se obtuvo en todas las secuencias de todas las muestras, como se puede observar en la figura 11, encontrándose a pocos nucleótidos después del lugar de unión al factor de transcripción AP-1. Por otra parte, para el primer Me5, no se consiguió poner a punto la PCR por lo que no se consiguió amplificar dicha zona del promotor.

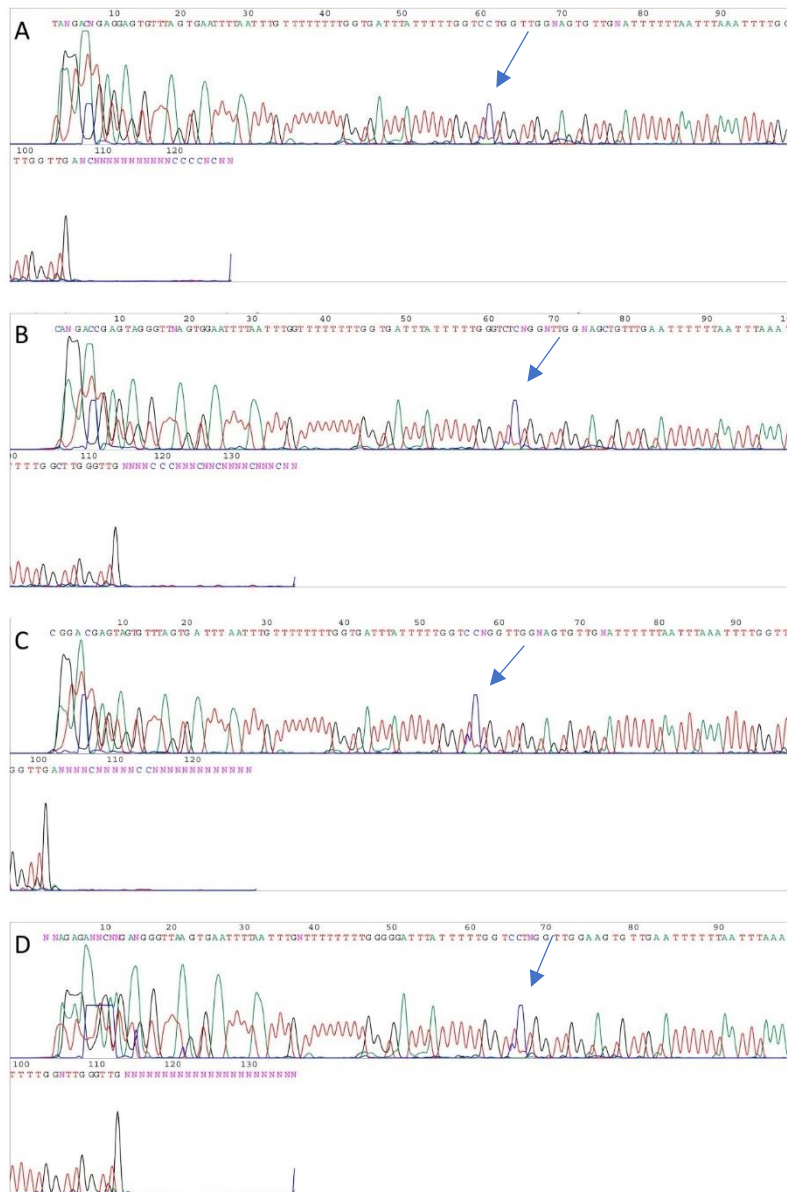
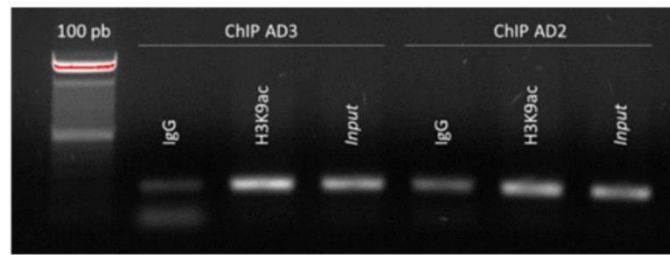


Figura 11. Cromatogramas ejemplos de secuencias del promotor de PRNP amplificado con los primers nMeB4 y secuenciado con nMeB4-PrnP-F, en los diferentes estadios de Braak y Braak: control (A) AD-I (B), AD-III (C) y AD-V (D). La flecha indica la citosina no metilada encontrada en las secuencias.

7.2. ESTUDIO DE ACETILACIÓN DE LAS HISTONAS ASOCIADAS AL PROMOTOR DE PRNP

Al inicio del estudio, el grupo contaba con inmunoprecipitaciones preliminares de 16 muestras de hipocampo y 4 de FC, con sus respectivas muestras de input, IgG y α H3K9. Partiendo de este punto, se procedió a realizar PCR y RT-PCR para cuantificar la cantidad de promotor de PRNP inmunoprecipitado.

A



B

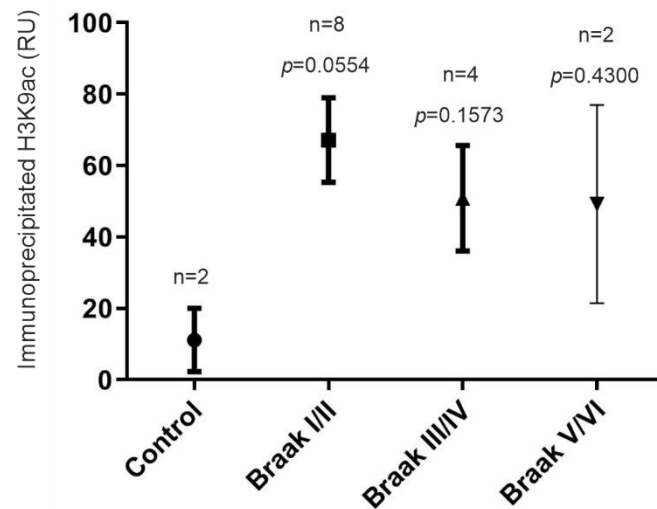


FIGURA 12. A. Ejemplo de electroforesis de los productos de la PCR con los primers Me2-*PRNP*-F/R de dos muestras en estadios distintos de AD (estadios II y III). B. Cuantificación obtenida de los resultados de RT-PCR de las muestras de hipocampo de pacientes de AD.

En la figura 12, tanto en la 12a como 12b, se puede observar como aumenta la acetilación en los estadios I-II de la enfermedad bruscamente, aunque sin significancia estadística, respecto a los individuos controles, y gracias a la gráfica 13b podemos observar una tendencia a la bajada de acetilación en los estadios más tardíos de la enfermedad. Las muestras de FC correlacionan estos mismos resultados (datos no mostrados), pero al tener un número de muestras tan pequeño, se ha de aumentar la “n” para poder determinar si en ambos tejidos el resultado es el mismo.

7.3. ANÁLISIS DE LA REGULACIÓN POSTRANSCRIPCIONAL DE *PRNP*

Para analizar la regulación por microRNAs, se procede a analizar por RT-PCR. Se realizó un control cualitativo y cuantitativo del RNA extraído de todas las muestras, previamente extraído por el grupo, mediante Bioanalyzer, del servicio de genómica de la UB

(CCiTUB) para obtener el *RNA Integrity Number* (RIN), donde se observó que hay valores muy dispares entre muestras (tabla 1), muchas de ellas posean valores inferiores a 7, lo que indica una calidad baja del RNA almacenado.

Tras la retrotranscripción, y posterior cuantificación del cDNA, se procede a realizar la RT-PCR utilizando los primers hsa-miR-519a-3p (Exiqon, Skelstedet, Dinamarca), y como referencia se utiliza el microRNA endógeno hsa-miR-103a-3p.

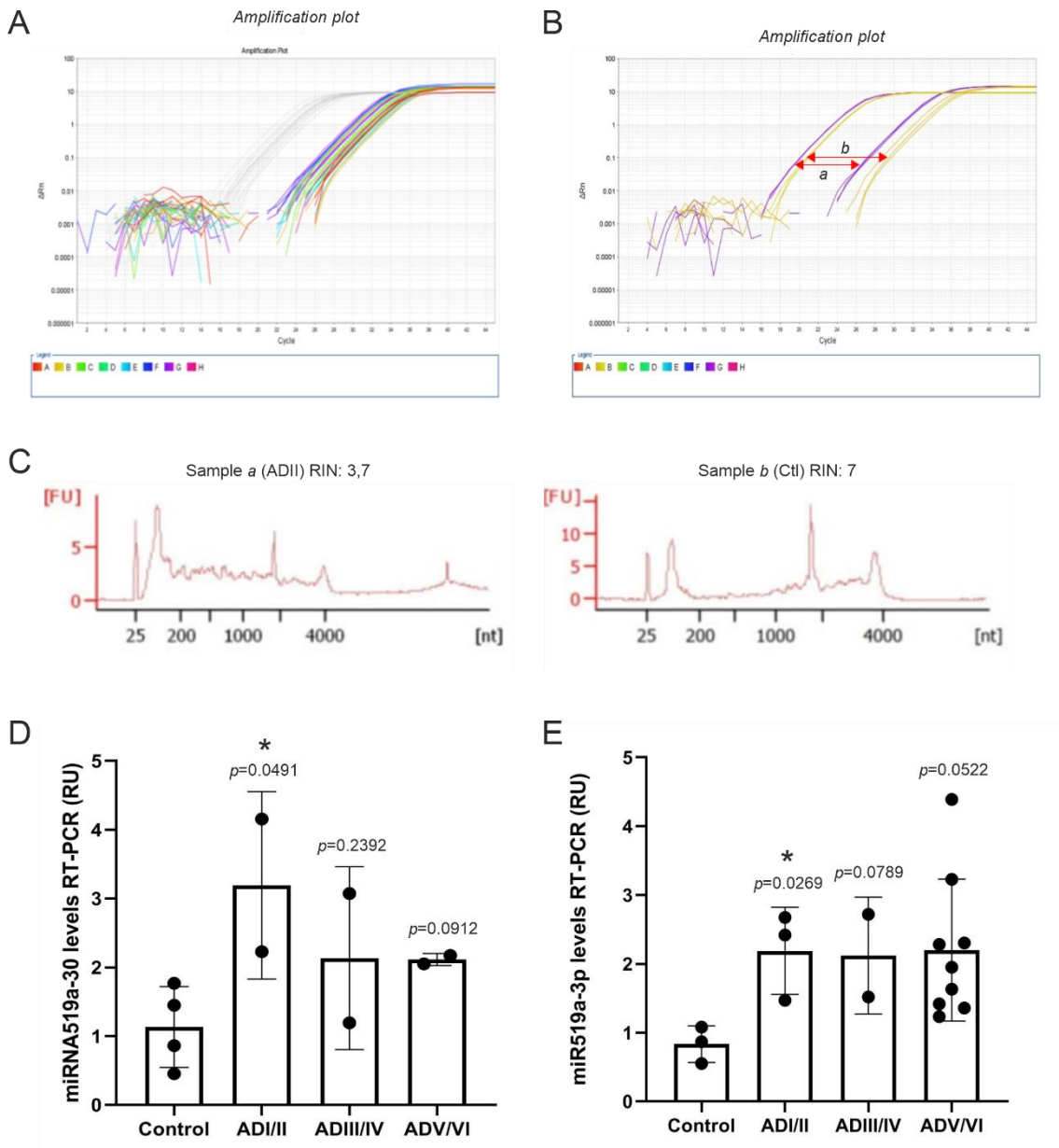


Figura 13. A-B. Ejemplos de curvas de amplificación para hsa-miR-519a-3p (A), y dos ejemplos concretos de un control y un AD-II de FC entre el miRNA-519a-3p y el miRNA-103a-3p (B). C-D. RINs de las muestras correspondientes con la gráfica 9B. D-E. Expresión relativa de miRNA-519a-3p en hipocampo (D) y en FC (E).

Tras las RT-PCR, se observa un aumento en la concentración de miRNA-519a-3p en relación con los controles, tanto en hipocampo como en FC, de pacientes con AD desde etapas asintomáticas con significancia estadística en estos estadios tempranos a pesar del bajo número de muestras. En lo referente al RIN, se observa que se da amplificación tanto a RINs bajos como a altos (Figura 13B, 13C y 13D), y eso es debido a que los microRNAs están compuestos por secuencias muy cortas, de unas 22bp, de forma que a pesar de que el RNA esté muy fragmentado, es bastante probable que la rotura no se haya producido justo en la diana del microRNA.

8. DISCUSIÓN

En este estudio, los objetivos se centraban en el análisis de la regulación de la expresión de la proteína PrP^C desde un punto de vista epigenético durante el transcurso de la AD. De esta forma, se ha analizado la metilación del promotor de *PRNP*, la acetilación de histonas del promotor y finalmente un miRNA que podía silenciar este gen de forma postranscripcional, y así estudiar si existía correlación con el patrón de expresión de PrP^C en la enfermedad (Lidón et al., 2020). Se ha estudiado tanto en muestras de hipocampo como de FC en todos los estadios de Braak y Braak.

En lo referente al análisis de metilación, hasta ahora hemos podido caracterizar las regiones que incluyen los lugares de unión a los factores transcripcionales HSE y AP-1, correspondiendo con una zona hipermetilada e hipometilada del promotor respectivamente y las cuales se encuentran adyacentes una de la otra. Se observa que en la región hipermetilada, no solo las Cs pertenecientes a CGs se encuentran metiladas, sino que en esta región todas están metiladas, lo que suele ser habitual en el sistema nervioso central (Cheng et al., 2015). Por otra parte, no se han encontrado diferencias en los patrones de metilación entre los diferentes estadios de Braak que pueda servir como biomarcador en estadios asintomáticos de la enfermedad ya que los patrones de metilación eran los mismos entre todas las muestras (figura 11), tanto en hipocampo como en FC.

Por lo que se refiere al análisis del grado de acetilación de las histonas asociadas al promotor de *PRNP*, se ha observado un aumento en estadios iniciales de la enfermedad, Braak I y II, y posteriormente una tendencia al descenso en estadios más tardíos, Braak

III-VI en adelante. Este aumento en la acetilación se puede correlacionar con el patrón de expresión de PrP^C, ya que esta también aumenta al inicio de la enfermedad y posteriormente disminuye (figura 6) (Mahal et al., 2001; Vergara et al., 2015). Esto es un indicador de que el promotor de *PRNP* está regulado por la acetilación de las histonas asociadas al promotor, ya que este mecanismo provoca la descondensación parcial de la cromatina y hace más accesible el DNA para la maquinaria transcripcional. Esto sugiere que el promotor está más activo en los estadios de Braak-I y II, coincidiendo con el incremento en la expresión de la proteína. Por ello, y sabiendo que la posibilidad de realizar ChIP en muestras de sangre ya ha sido reportada (Sadeh et al., 2021), sería necesario aumentar el número de muestras analizadas y corroborar la tendencia observada. Además de analizar la correspondencia en muestras de sangre y cerebro para poder incluirlo en la batería de biomarcadores no invasivos que se conocen hasta el momento (de Rojas et al., 2018; Leuzy et al., 2022b; Risacher et al., 2019).

Con todo lo indicado, pensamos que el incremento de la expresión de PrP^C en el inicio de la AD puede responder por un lado a factores genéticos además de a factores epigenéticos. En el primer caso, se sabe que el incremento de la expresión de la proteína tau incide directamente en el promotor de *PRNP* mediante la activación de AP-1 y Sp-1 (Lidón et al., 2021). Y tras nuestros resultados, y a pesar de no observar cambios en la metilación de C en las secuencias analizadas, sí que los hemos podido observar en el grado de condensación de la cromatina.

Muchos estudios determinan que el patrón de expresión de algunos miRNAs está desregulado en pacientes de AD (Lau et al., 2013; Zhao et al., 2019), pero hasta día de hoy, ninguno se ha correlacionado con el patrón de expresión de PrP^C. El miRNA-519a-3p fue seleccionado por nuestro grupo con el fin de intentar explicar la bajada de expresión de PrP^C en los estadios tardíos de la enfermedad, y para su detección en nuestras muestras se realizaron las RT-PCR. Gracias a este método, se pudo comprobar que este microRNA está incrementado tanto en FC como en hipocampo desde estadios asintomáticos de la AD, lo que se corrobora con la bibliografía existente (Jia & Liu, 2016; Lau et al., 2013). Otros estudios demuestran también su incremento en sangre (Zhao et al., 2019), plasma y LCR sin correlación con MMSE (Lusardi et al., 2016). Cabe destacar que la mayoría de los estudios no se ha centrado en estudiar la expresión del microRNA por estadios de Braak y Braak, solo un estudio se centró en la modulación por estadios, el (Lau et al., 2013). En nuestro caso, a pesar del bajo número de muestras, se obtuvo el

patrón de expresión incrementado esperado de miRNA-519a-3p, además de encontrar significancia estadística en los primeros estadios de Braak (AD-I/II), lo que nos sugiere el posible papel de biomarcador que posee. Otros microRNAs de esta misma familia, la miRNA-519, se ha demostrado que se unen a la región 3'UTR de *PRNP* y presuntamente degradan el mRNA de PrP^C, estos son miRNA-519d-3p y miRNA-519b-3p (Pease et al., 2019). De esta forma, miRNA-519a-3p podría tener la misma función y disminuir la concentración de PrP^C en los estadios más avanzados de la enfermedad, donde su perfil de expresión decae.

Es importante destacar que a pesar de que el promotor pueda estar hiperactivo desde etapas tempranas de la enfermedad, una constante elevación del miRNA519a-3p, también desde el inicio, explicaría que los niveles de PrP^C no puedan mantenerse.

El siguiente paso a realizar sería engrosar el tamaño muestral y, como en la ChIP, analizarlo en sangre y así poder utilizarlo como biomarcador no invasivo. Los miRNAs se expresan de forma ubicua por todo el cuerpo y además pueden atravesar la barrera hematoencefálica, de forma que pueden cuantificarse en los tejidos circulantes del cuerpo, como sangre, plasma o LCR, con correlación con los órganos de origen, lo que es una característica importante ya que esto les confiere potencial como biomarcador no invasivo (Hanna et al., 2019). Por otro lado, y tal y como hemos explicado anteriormente, el hecho de poder detectarlos en muestras de baja integridad de RNA (bajo RIN) es también una ventaja a la hora de señalarlo para su uso en clínica (Hall et al., 2012; Jung et al., 2010). De hecho, hemos podido demostrar su detección e incluso mayor concentración en muestras de nuestra colección de muy bajo RIN.

Hasta ahora, los niveles de A β , tau total y tau fosforilada en LCR y en sangre han surgido como biomarcadores en relación con el avance de la enfermedad, sin embargo, todavía se necesita trabajo para poder caracterizar a la población y poder detectar la AD de forma temprana, ya que la enfermedad puede empezar entre 15 y 20 años antes de la aparición de los síntomas, impidiendo un seguimiento de los primeros estadios. El surgimiento de estudios longitudinales, por su parte, puede suponer un avance en el diagnóstico permitiendo un análisis de potenciales pacientes (Leuzy et al., 2022a). Por otra parte, sería interesante realizar estudios con mimics para poder observar la relación entre la expresión de PrP^C y miRNA-519a-3p, como se realizó en el estudio (Pease et al., 2019).

9. CONCLUSIONES

La expresión de PrP^C es multifactorial, viéndose regulada en este estudio por diversos factores epigenéticos. De entre los estudiados, a nivel pretranscripcional, el patrón de metilación en una región del promotor ha sido caracterizado, pero no se han encontrado diferencias entre estadios de AD que expliquen el aumento de la expresión e PrP^C en estadios de Braak I y II, así como tampoco la disminución en los estadios más tardíos de Braak (V y VI). Por parte de la acetilación de la histona H3K9 asociada al promotor se ha determinado que aumenta en los estadios asintomáticos de la enfermedad respecto a los individuos sanos, lo que se puede correlacionar con el incremento en la expresión inicial de PrP^C. De esta forma, la acetilación de histonas puede regular la expresión de PrP^C durante todo el desarrollo de la AD. Finalmente, a nivel postranscripcional, el miRNA-519a-3p ha demostrado estar regulado positivamente durante todo el desarrollo de la AD, con significancia en estadios asintomáticos. Puede ser la causa de la caída de expresión en los estadios de Braak V y VI de PrP^C, pero sería necesario aumentar el número de muestras y posteriormente realizar mimics para caracterizar la relación de este microRNA con la expresión de PrP^C.

Por consiguiente, el número limitado de muestras ha sido un factor limitante a la hora de desarrollar unas conclusiones robustas sobre la regulación epigenética de PrP^C, pero a pesar de eso, se ha determinado que la acetilación de la histona H3K9 y el microRNA-519a son posibles biomarcadores no invasivos y tempranos de la enfermedad que, con un análisis más exhaustivos sobre la relación con PrP^C y en otros tejidos, pueden ayudar a obtener un diagnóstico temprano de la enfermedad, permitiendo discernir entre otras enfermedades con cuadro clínico de demencia y la AD, así como abriendo nuevas líneas de investigación para posibles tratamientos.

10. BIBLIOGRAFÍA

Blennow, K., & Zetterberg, H. (2018). Biomarkers for Alzheimer's disease: current status and prospects for the future. *Journal of Internal Medicine*, 284(6), 643–663. <https://doi.org/10.1111/joim.12816>

- Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*, 82(4), 239–259.
<https://doi.org/10.1007/BF00308809>
- Brejijeh, Z., & Karaman, R. (2020). Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules*, 25(24), 5789.
<https://doi.org/10.3390/molecules25245789>
- Cabral, A. L. B., Lee, K. S., & Martins, V. R. (2002). Regulation of the Cellular Prion Protein Gene Expression Depends on Chromatin Conformation. *Journal of Biological Chemistry*, 277(7), 5675–5682.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M104815200>
- Callella, A. M., Farinelli, M., Nuvolone, M., Mirante, O., Moos, R., Falsig, J., Mansuy, I. M., & Aguzzi, A. (2010). Prion protein and A β -related synaptic toxicity impairment. *EMBO Molecular Medicine*, 2(8), 306–314.
<https://doi.org/10.1002/emmm.201000082>
- Castillo-Carranza, D. L., Guerrero-Munoz, M. J., Sengupta, U., Hernandez, C., Barrett, A. D. T., Dineley, K., & Kayed, R. (2015). Tau Immunotherapy Modulates Both Pathological Tau and Upstream Amyloid Pathology in an Alzheimer's Disease Mouse Model. *Journal of Neuroscience*, 35(12), 4857–4868.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4989-14.2015>
- Castle, A. R., & Gill, A. C. (2017). Physiological Functions of the Cellular Prion Protein. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 4.
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00019>
- Castro, M. A., Hadziselimovic, A., & Sanders, C. R. (2019). The vexing complexity of the amyloidogenic pathway. *Protein Science*, 28(7), 1177–1193.
<https://doi.org/10.1002/pro.3606>
- Cheng, Y., Bernstein, A., Chen, D., & Jin, P. (2015). 5-Hydroxymethylcytosine: A new player in brain disorders? *Experimental Neurology*, 268, 3–9.
<https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2014.05.008>

- Coppedè, F. (2021). Epigenetic regulation in Alzheimer's disease: is it a potential therapeutic target? *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 25(4), 283–298. <https://doi.org/10.1080/14728222.2021.1916469>
- Cummings, J. L., Vinters, H. v., Cole, G. M., & Khachaturian, Z. S. (1998). Alzheimer's disease: Etiologies, pathophysiology, cognitive reserve, and treatment opportunities. *Neurology*, 51(Issue 1, Supplement 1), S2–S17. https://doi.org/10.1212/WNL.51.1_Suppl_1.S2
- Dalai, W., Matsuo, E., Takeyama, N., Kawano, J., & Saeki, K. (2017a). CpG site DNA methylation patterns reveal a novel regulatory element in the mouse prion protein gene. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 79(1), 100–107. <https://doi.org/10.1292/jvms.16-0390>
- Dalai, W., Matsuo, E., Takeyama, N., Kawano, J., & Saeki, K. (2017b). Increased expression of prion protein gene is accompanied by demethylation of CpG sites in a mouse embryonal carcinoma cell line, P19C6. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 79(3), 644–648. <https://doi.org/10.1292/jvms.16-0554>
- de Rojas, I., Romero, J., Rodríguez-Gomez, O., Pesini, P., Sanabria, A., Pérez-Cordon, A., Abdelnour, C., Hernández, I., Rosende-Roca, M., Mauleón, A., Vargas, L., Alegret, M., Espinosa, A., Ortega, G., Gil, S., Guitart, M., Gailhajanet, A., Santos-Santos, M. A., Moreno-Grau, S., ... Boada, M. (2018). Correlations between plasma and PET beta-amyloid levels in individuals with subjective cognitive decline: the Fundació ACE Healthy Brain Initiative (FACEHBI). *Alzheimer's Research & Therapy*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/S13195-018-0444-1>
- Deaton, A. M., & Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & Development*, 25(10), 1010–1022. <https://doi.org/10.1101/gad.2037511>
- Fluharty, B. R., Biasini, E., Stravalaci, M., Sclip, A., Diomede, L., Balducci, C., la Vitola, P., Messa, M., Colombo, L., Forloni, G., Borsello, T., Gobbi, M., & Harris, D. A. (2013). An N-terminal Fragment of the Prion Protein Binds to Amyloid- β Oligomers and Inhibits Their Neurotoxicity in Vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 288(11), 7857–7866. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.423954>
- Guo, J. U., Su, Y., Shin, J. H., Shin, J., Li, H., Xie, B., Zhong, C., Hu, S., Le, T., Fan, G., Zhu, H., Chang, Q., Gao, Y., Ming, G. L., & Song, H. (2014). Distribution,

- recognition and regulation of non-CpG methylation in the adult mammalian brain. *Nature Neuroscience*, 17(2), 215–222. <https://doi.org/10.1038/NN.3607>
- Hall, J. S., Taylor, J., Valentine, H. R., Irlam, J. J., Eustace, A., Hoskin, P. J., Miller, C. J., & West, C. M. L. (2012). Enhanced stability of microRNA expression facilitates classification of FFPE tumour samples exhibiting near total mRNA degradation. *British Journal of Cancer*, 107(4), 684–694. <https://doi.org/10.1038/BJC.2012.294>
- Hanna, J., Hossain, G. S., & Kocerha, J. (2019). The Potential for microRNA Therapeutics and Clinical Research. *Frontiers in Genetics*, 10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00478>
- Holmes, C., Boche, D., Wilkinson, D., Yadegarfar, G., Hopkins, V., Bayer, A., Jones, R. W., Bullock, R., Love, S., Neal, J. W., Zotova, E., & Nicoll, J. A. (2008). Long-term effects of A β 42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *The Lancet*, 372(9634), 216–223. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61075-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61075-2)
- Iqbal, K., del C. Alonso, A., Chen, S., Chohan, M. O., El-Akkad, E., Gong, C.-X., Khatoon, S., Li, B., Liu, F., Rahman, A., Tanimukai, H., & Grundke-Iqbal, I. (2005). Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1739(2–3), 198–210. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.09.008>
- Jang, H. S., Shin, W. J., Lee, J. E., & Do, J. T. (2017). CpG and Non-CpG Methylation in Epigenetic Gene Regulation and Brain Function. *Genes*, 8(6), 2–20. <https://doi.org/10.3390/GENES8060148>
- Jia, L. H., & Liu, Y. N. (2016). Downregulated serum miR-223 serves as biomarker in Alzheimer's disease. *Cell Biochemistry and Function*, 34(4), 233–237. <https://doi.org/10.1002/CBF.3184>
- Jung, M., Schaefer, A., Steiner, I., Kempkensteffen, C., Stephan, C., Erbersdobler, A., & Jung, K. (2010). Robust microRNA stability in degraded RNA preparations from human tissue and cell samples. *Clinical Chemistry*, 56(6), 998–1006. <https://doi.org/10.1373/CLINCHEM.2009.141580>

- Kellett, K. A. B., & Hooper, N. M. (2009). Prion protein and Alzheimer disease. *Prion*, 3(4), 190–194. <https://doi.org/10.4161/pri.3.4.9980>
- Kim, V. N. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(5), 376–385. <https://doi.org/10.1038/nrm1644>
- Klein, W. L. (2002). A β toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochemistry International*, 41(5), 345–352. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(02\)00050-5](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(02)00050-5)
- Kumar, S., & Reddy, P. H. (2016). Are circulating microRNAs peripheral biomarkers for Alzheimer's disease? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1862(9), 1617–1627. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.06.001>
- Kumar, S., & Reddy, P. H. (2019). A New Discovery of MicroRNA-455-3p in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 72(s1), S117–S130. <https://doi.org/10.3233/JAD-190583>
- Lau, P., Bossers, K., Janky, R., Salta, E., Frigerio, C. S., Barbash, S., Rothman, R., Sierksma, A. S. R., Thathiah, A., Greenberg, D., Papadopoulou, A. S., Achsel, T., Ayoubi, T., Soreq, H., Verhaagen, J., Swaab, D. F., Aerts, S., & de Strooper, B. (2013). Alteration of the micro <scp>RNA</scp> network during the progression of Alzheimer's disease. *EMBO Molecular Medicine*, 5(10), 1613–1634. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201974>
- Laurén, J., Gimbel, D. A., Nygaard, H. B., Gilbert, J. W., & Strittmatter, S. M. (2009). Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid- β oligomers. *Nature*, 457(7233), 1128–1132. <https://doi.org/10.1038/nature07761>
- Lei, P., Ayton, S., & Bush, A. I. (2021). The essential elements of Alzheimer's disease. *Journal of Biological Chemistry*, 296. <https://doi.org/10.1074/JBC.REV120.008207>
- Leuzy, A., Mattsson-Carlgren, N., Palmqvist, S., Janelidze, S., Dage, J. L., & Hansson, O. (2022a). Blood-based biomarkers for Alzheimer's disease. *EMBO Molecular Medicine*, 14(1). <https://doi.org/10.15252/EMMM.202114408>

- Leuzy, A., Mattsson-Carlgrén, N., Palmqvist, S., Janelidze, S., Dage, J. L., & Hansson, O. (2022b). Blood-based biomarkers for Alzheimer's disease. *EMBO Molecular Medicine*, 14(1). <https://doi.org/10.15252/EMMM.202114408>
- Lidón, L., Llaó-Hierro, L., Nuvolone, M., Aguzzi, A., Ávila, J., Ferrer, I., del Río, J. A., & Gavín, R. (2021). Tau Exon 10 Inclusion by PrPC through Downregulating GSK3 β Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(10), 5370. <https://doi.org/10.3390/ijms22105370>
- Lidón, L., Vergara, C., Ferrer, I., Hernández, F., Ávila, J., del Río, J. A., & Gavín, R. (2020). Tau Protein as a New Regulator of Cellular Prion Protein Transcription. *Molecular Neurobiology*, 57(10), 4170–4186. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02025-x>
- Long, J. M., & Holtzman, D. M. (2019). Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell*, 179(2), 312–339. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2019.09.001>
- Long, J. M., & Lahiri, D. K. (2011). MicroRNA-101 downregulates Alzheimer's amyloid- β precursor protein levels in human cell cultures and is differentially expressed. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 404(4), 889–895. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.12.053>
- Lowe, V. J., Lundt, E. S., Albertson, S. M., Przybelski, S. A., Senjem, M. L., Parisi, J. E., Kantarci, K., Boeve, B., Jones, D. T., Knopman, D., Jack, C. R., Dickson, D. W., Petersen, R. C., & Murray, M. E. (2019). Neuroimaging correlates with neuropathologic schemes in neurodegenerative disease. *Alzheimer's & Dementia : The Journal of the Alzheimer's Association*, 15(7), 927–939. <https://doi.org/10.1016/J.JALZ.2019.03.016>
- Lusardi, T. A., Phillips, J. I., Wiedrick, J. T., Harrington, C. A., Lind, B., Lapidus, J. A., Quinn, J. F., & Saugstad, J. A. (2016). MicroRNAs in Human Cerebrospinal Fluid as Biomarkers for Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 55(3), 1223–1233. <https://doi.org/10.3233/JAD-160835>
- Mahal, S. P., Asante, E. A., Antoniou, M., & Collinge, J. (2001). Isolation and functional characterisation of the promoter region of the human prion protein gene. *Gene*, 268(1–2), 105–114. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00424-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00424-3)

- Manni, G., Lewis, V., Senesi, M., Spagnolli, G., Fallarino, F., Collins, S. J., Mouillet-Richard, S., & Biasini, E. (2020). The cellular prion protein beyond prion diseases. *Swiss Medical Weekly*. <https://doi.org/10.4414/smw.2020.20222>
- Masters, C. L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C. C., Sperling, R. A., & Cummings, J. L. (2015). Alzheimer's disease. *Nature Reviews. Disease Primers*, 1. <https://doi.org/10.1038/NRDP.2015.56>
- Miranzadeh Mahabadi, H., & Taghibiglou, C. (2020). Cellular Prion Protein (PrP^c): Putative Interacting Partners and Consequences of the Interaction. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 7058. <https://doi.org/10.3390/ijms21197058>
- Moore, L. D., Le, T., & Fan, G. (2013). DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology*, 38(1), 23–38. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>
- Nikolac Perkovic, M., Videtic Paska, A., Konjevod, M., Kouter, K., Svob Strac, D., Nedic Erjavec, G., & Pivac, N. (2021). Epigenetics of Alzheimer's Disease. *Biomolecules*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/biom11020195>
- Pappas, J. J., Toulouse, A., & Bradley, W. E. C. (2013). The bisulfite genomic sequencing protocol. *Advances in Lung Cancer*, 02(01), 21–25. <https://doi.org/10.4236/alc.2013.21004>
- Pease, D., Scheckel, C., Schaper, E., Eckhardt, V., Emmenegger, M., Xenarios, I., & Aguzzi, A. (2019). Genome-wide identification of microRNAs regulating the human prion protein. *Brain Pathology*, 29(2), 232–244. <https://doi.org/10.1111/bpa.12679>
- Pushparaj, P. N., Aarthi, J. J., Manikandan, J., & Kumar, S. D. (2008). siRNA, miRNA, and shRNA: *in vivo* Applications. *Journal of Dental Research*, 87(11), 992–1003. <https://doi.org/10.1177/154405910808701109>
- Risacher, S. L., Fandos, N., Romero, J., Sherriff, I., Pesini, P., Saykin, A. J., & Apostolova, L. G. (2019). Plasma amyloid beta levels are associated with cerebral amyloid and tau deposition. *Alzheimer's & Dementia (Amsterdam, Netherlands)*, 11, 510–519. <https://doi.org/10.1016/J.DADM.2019.05.007>

- Sadeh, R., Sharkia, I., Fialkoff, G., Rahat, A., Gutin, J., Chappleboim, A., Nitzan, M., Fox-Fisher, I., Neiman, D., Meler, G., Kamari, Z., Yaish, D., Peretz, T., Hubert, A., Cohen, J. E., Salah, A., Temper, M., Grinshpun, A., Maoz, M., ... Friedman, N. (2021). ChIP-seq of plasma cell-free nucleosomes identifies gene expression programs of the cells of origin. *Nature Biotechnology*, *39*(5), 586–598.
<https://doi.org/10.1038/S41587-020-00775-6>
- Saha, P., & Sen, N. (2019). Tauopathy: A common mechanism for neurodegeneration and brain aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, *178*, 72–79.
<https://doi.org/10.1016/j.mad.2019.01.007>
- Sakudo, A., & Onodera, T. (2015). Prion protein (PrP) gene-knockout cell lines: insight into functions of the PrP. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *2*.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2014.00075>
- Šerý, O., Povová, J., Míšek, I., Pešák, L., & Janout, V. (2013). Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: a review. *Folia Neuropathologica*, *1*, 1–9. <https://doi.org/10.5114/fn.2013.34190>
- Silva, M. V. F., Loures, C. de M. G., Alves, L. C. V., de Souza, L. C., Borges, K. B. G., & Carvalho, M. das G. (2019). Alzheimer's disease: risk factors and potentially protective measures. *Journal of Biomedical Science*, *26*(1), 33.
<https://doi.org/10.1186/s12929-019-0524-y>
- Tapiola, T., Alafuzoff, I., Herukka, S. K., Parkkinen, L., Hartikainen, P., Soininen, H., & Pirttilä, T. (2009). Cerebrospinal fluid {beta}-amyloid 42 and tau proteins as biomarkers of Alzheimer-type pathologic changes in the brain. *Archives of Neurology*, *66*(3), 382–389. <https://doi.org/10.1001/ARCHNEUROL.2008.596>
- Tellechea, P., Pujol, N., Esteve-Belloch, P., Echeveste, B., García-Eulate, M. R., Arbizu, J., & Riverol, M. (2018). Enfermedad de Alzheimer de inicio precoz y de inicio tardío: ¿son la misma entidad? *Neurología*, *33*(4), 244–253.
<https://doi.org/10.1016/j.nrl.2015.08.002>
- Tiwari, S., Atluri, V., Kaushik, A., Yndart, A., & Nair, M. (2019). Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *International Journal of Nanomedicine*, *Volume 14*, 5541–5554. <https://doi.org/10.2147/IJN.S200490>

- Tolar, M., Abushakra, S., & Sabbagh, M. (2020). The path forward in Alzheimer's disease therapeutics: Reevaluating the amyloid cascade hypothesis. *Alzheimer's & Dementia*, *16*(11), 1553–1560. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.09.075>
- Tolosa, E., Botta-Orfila, T., Morató, X., Calatayud, C., Ferrer-Lorente, R., Martí, M.-J., Fernández, M., Gaig, C., Raya, Á., Consiglio, A., Ezquerra, M., & Fernández-Santiago, R. (2018). MicroRNA alterations in iPSC-derived dopaminergic neurons from Parkinson disease patients. *Neurobiology of Aging*, *69*, 283–291. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.05.032>
- van der Flier, W. M., Pijnenburg, Y. al, Fox, N. C., & Scheltens, P. (2011). Early-onset versus late-onset Alzheimer's disease: the case of the missing APOE ε4 allele. *The Lancet Neurology*, *10*(3), 280–288. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70306-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70306-9)
- Vergara, C., Ordóñez-Gutiérrez, L., Wandosell, F., Ferrer, I., del Río, J. A., & Gavín, R. (2015). Role of PrPC Expression in Tau Protein Levels and Phosphorylation in Alzheimer's Disease Evolution. *Molecular Neurobiology*, *51*(3), 1206–1220. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8793-7>
- Walgrave, H., Zhou, L., de Strooper, B., & Salta, E. (2021). The promise of microRNA-based therapies in Alzheimer's disease: challenges and perspectives. *Molecular Neurodegeneration*, *16*(1), 76. <https://doi.org/10.1186/s13024-021-00496-7>
- Wattmo, C., Minthon, L., & Wallin, Å. K. (2016). Mild versus moderate stages of Alzheimer's disease: three-year outcomes in a routine clinical setting of cholinesterase inhibitor therapy. *Alzheimer's Research & Therapy*, *8*(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s13195-016-0174-1>
- Zhao, Y., Zhang, Y., Zhang, L., Dong, Y., Ji, H., & Shen, L. (2019). The Potential Markers of Circulating microRNAs and long non-coding RNAs in Alzheimer's Disease. *Aging and Disease*, *10*(6), 1293. <https://doi.org/10.14336/AD.2018.1105>

11. AUTOEVALUACIÓN

La búsqueda de biomarcadores tempranos para la AD es uno de los objetivos principales de este TFG e investigación, la cual conlleva la creación de una nueva herramienta a la hora de diagnosticar y tratar la AD. Los diferentes mecanismos epigenéticos estudiados presentan posibles dianas que permitan detectar la AD de forma temprana, precisa y poco invasiva, en contraposición con el método actual de detección de la AD, el cual está basado en la clasificación de los síntomas. En este estudio, las expectativas no se han podido alcanzar debido a que el tamaño muestral es reducido, sobre todo teniendo en cuenta la poca accesibilidad a muestras de estadios asintomáticos (AD-I/II). Sin embargo, hemos allanado el camino en la búsqueda de nuevos biomarcadores epigenéticos al caracterizar una región del promotor PRNP y encontrar posibles correlaciones entre los patrones de expresión de PrPC y la acetilación de histonas o el miRNA-19a.

Debido a la elección de este tema de gran interés, he podido entender mejor la complejidad detrás de la investigación de la AD debido a la poca batería de muestras de estadios asintomáticos y la dificultad de la toma de muestras ante mortem. Aprender a realizar todo tipo de PCRs y tratamientos del DNA me ha permitido entender en profundidad la delicadeza de los procedimientos moleculares, así como los fundamentos de una RT-PCR. Por otra parte, la manipulación de muestras me ha permitido adentrarme en el mundo de la investigación y conocer el trabajo real de un laboratorio, los diferentes equipos de protección individual (EPI), el trabajo conjunto con compañeros de laboratorio, así como la organización óptima en el laboratorio y protocolos de desechos biológicos.

Por otra parte, tratar el tema de la AD me ha posibilitado la comprensión de la evolución del conocimiento sobre la enfermedad y la colaboración internacional por un objetivo común. Me sorprendió corroborar como de importante es estar actualizado en el tema ya que de un año para otro puede suponer una gran diferencia de información en la que se base un artículo. A nivel personal, este estudio me ha permitido acercarme en profundidad al mundo de la biomedicina, así como al mundo de la investigación, afianzando mi meta como profesional. Por tanto, puedo decir que estoy contenta con el trabajo realizado, así como con el conocimiento aprendido y la ayuda recibida por parte de mi tutor académico y mi supervisora de las prácticas.

ANNEX 2

FITXA DE SEGUIMENT DEL TUTOR/A del TFG

Nom i Cognoms de l'Alumne/a: _____ Astrid Henrich Gutiérrez _____

Nom i Cognoms del Tutor/a: _____ Javier Capilla Luque _____

Data de la entrevista amb l'alumne: 28/04/2022

Recomanacions durant el seguiment: Recomanacions en quant a l'estructuració del treball i contingut dels apartats/subapartats. Es recomana incrementar la secció introducció per tal d'introduir al lector en la temàtica tractada.

Observacions: L'alumna té una bona disposició i capacitat crítica per introduir els canvis suggerits _____

Observacions Darrera revisió:

El treball està ben estructurat i desenvolupat. Cal ampliar algun apartat (especialment metodologia i resultats). Es recomanen petits canvis en la redacció, especialment evitar frases massa curtes que es presten a diferents interpretacions ja que la idea exposada no es troba prou desenvolupada. Es requereix una altra revisió posterior.

Signatura del Tutor/a



Signatura del Alumne/a



Tarragona a 25 de mayo 2022