



**Universidad de Buenos Aires**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

---

**Estudio de la mutación *PSEN1* (p.T119I), asociada a la  
Enfermedad de Alzheimer familiar, utilizando técnicas de  
edición genética y células madre pluripotentes inducidas  
humanas**

Tesis presentada para optar al título de doctor de la Universidad de  
Buenos Aires en el área de Química Biológica

**Luciana Isaja**

Director de tesis: Dr. Leonardo Romorini

Codirector de tesis: Dr. Ezequiel Surace

Consejera de Estudios: Dra. Flavia Saravia

Lugar de trabajo: Laboratorio de Investigación Aplicada a Neurociencias (LIAN) –  
Instituto de Neurociencias (INEU, Fleni-Conicet)

Buenos Aires, 2024

# RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología neurodegenerativa de gran relevancia en la actualidad, debido a su creciente prevalencia y su impacto socioeconómico. La EA está caracterizada por la degeneración progresiva de las células nerviosas, muchas veces de forma concurrente con la aparición de placas de beta-amiloide (A $\beta$ ) y ovillos neurofibrilares en el cerebro (ONF). A medida que la población envejece, la prevalencia de la EA continúa en aumento, lo que subraya la urgente necesidad de enfoques innovadores en la investigación y terapia de esta enfermedad neurodegenerativa.

La EA posee dos presentaciones: La EA esporádica (EAe) y la familiar (EAF). Esta última se caracteriza por la presencia de mutaciones genéticas específicas que se transmiten de generación en generación dentro de una familia. Estas mutaciones suelen estar alojadas en genes del procesamiento de la proteína precursora amiloide que genera los depósitos de amiloide; *APP*, *PSEN1* y *PSEN2*. A diferencia de la forma esporádica de la EA, que suele desarrollarse en la edad avanzada, la EA hereditaria puede manifestarse en personas de entre 30 y 50 años. Los síntomas iniciales y la progresión de la enfermedad varían, pero en general, esta forma hereditaria suele tener un inicio más temprano y un curso más rápido, con un deterioro cognitivo más pronunciado.

En ese sentido, las células madre pluripotentes inducidas humanas (CMPih) juegan un rol clave en el desarrollo de modelos de neurodegeneración que complementen los ya existentes por su potencialidad de generar modelos derivados de pacientes. Las CMPih son reprogramadas a partir de células adultas mediante la introducción de factores de transcripción específicos y, al ser obtenidas directamente del paciente a estudiar, mantienen casi intacto el contexto genético del mismo. Además, estas células poseen dos características fundamentales: la pluripotencia y la capacidad de autorrenovación. La pluripotencia se refiere a su capacidad para diferenciarse en una amplia gama de tipos celulares. Por otro lado, las CMPih pueden autorrenovarse indefinidamente en el laboratorio, lo que garantiza una fuente constante de células para investigaciones y aplicaciones terapéuticas.

Recientemente, en Fleni se reportó una mutación novedosa en el gen de *PSEN1* (c. C356T p. T119I) en un paciente con EA de origen temprano. Aún no existe información acerca del rol de esta mutación en la progresión del proceso neurodegenerativo. Nuestra hipótesis de trabajo es que la mutación en sí es causal de la EAF en esta familia. En este trabajo nos propusimos generar modelos para estudiar en profundidad el perfil patogénico causado por esta mutación utilizando CMPih. Para ello, en una primera

instancia generamos mediante edición génica utilizando la tecnología CRISPR/Cas9 células HEK293T *PSEN1 Knock-Out* (KO). Sobre estas células realizamos luego co-transfecciones transitorias con plásmidos de expresión que codifican para *APP wild-type* (WT) y *PSEN1* WT o mutantes (A246E y T119I) y cuantificamos mediante ensayos de ELISA específicos los niveles de  $A\beta_{40}$  y  $A\beta_{42}$  intracelulares. Este experimento dio como resultado que la mutación *PSEN1* p.T119I presentó un fenotipo intermedio (menor aumento de la relación  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ ) al compararlo con una mutación previamente reportada y validada (*PSEN1* p.A246E).

Luego generamos una línea de CMPih a partir de la reprogramación de fibroblastos dérmicos (FD) de un paciente portador de la mutación *PSEN1* c. C357T p. T119I. Con este propósito, primero transducimos los FD del paciente con el vector lentiviral STEMCCA que codifica para los factores de reprogramación de Yamanaka (*OCT-4*, *KLF4*, *SOX2* y *c-MYC*) y obtuvimos 3 clones, denominados FFAD1.1c1, FFAD1.2c4 y FFAD1.2c8, los cuales fueron posteriormente validados. Se estudiaron las siguientes características típicas de CMPih: formación de colonias multicelulares compactas con una alta relación núcleo/citoplasma y bordes de colonias marcados, alta actividad de Fosfatasa Alcalina (AP), expresión de marcadores asociados a la troncalidad y la pluripotencia, es decir la capacidad de diferenciarse a tipos celulares de las 3 capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo). Corroboramos además el silenciamiento del casete de expresión STEMCCA, y que se conserve el cariotipo parental de los FD. Además, mediante estudios de filiación por análisis de microsatélites, demostramos que las CMPih reprogramadas y los FD parentales tenían el mismo perfil genético.

Una vez seleccionado el clon para seguir trabajando, el FFAD1.2c4, renombrado FFAD1, a partir de ahora la línea de CMPih FFAD1, comenzamos a establecer modelos neuronales en 2 y 3 dimensiones para el estudio de la EA. A partir de este punto, además, se adicionaron 2 como control dos líneas de CMPih, OUWio03-A y UOWio02-A, las cuales fueron generadas desde FD de un paciente con EA portador de la mutación *PSEN1* p.A246E y un pariente cercano no portador de la variante y sin EA. Utilizando estas tres líneas se generaron 2 modelos neuronales en 2 dimensiones, uno de neuronas genéricas inmaduras y otro de neuronas corticales, los cuales fueron validados por inmunofluorescencia y RT-qPCR de marcadores neuronales (*PAX6*, *TUJ1*, *TBR1*, *TBR2*, entre otros). Para facilitar la observación de las placas amiloides, establecimos además un modelo neural en 3 dimensiones (también conocido como organoides cerebrales) el cual fue validado por inmunofluorescencia de marcadores neurales.

Luego, cuantificamos los niveles de los péptidos  $A\beta_{40}$  y  $A\beta_{42}$  y Tau fosforilado [pT231] por ELISA en precipitados y sobrenadantes neuronales. Observamos que la línea

FFAD1 exhibió un incremento estadísticamente significativo en los niveles de p-Tau [T231] en comparación con las neuronas generadas a partir de la línea OUWio02-A (*PSEN1* WT). También, evaluamos los depósitos de  $A\beta_{42}$  y P-tau [pT231] sobre cortes histológicos de los organoides cerebrales y medimos los niveles de  $A\beta_{42}$  y Tau fosforilado [pT231] por ELISA. Los cortes histológicos revelaron que los organoides cerebrales derivados de CMPih de ambas mutaciones en *PSEN1* (p.T119I y p. A246E) mostraron depósitos de placas de  $A\beta$  de forma generalizada como así también una disminución en los niveles de péptidos de  $A\beta_{42}$  en los sobrenadantes de los organoides derivados de las líneas de CMPih OUWio03-A (*PSEN1* A246E) y FFAD1 (*PSEN1* T119I) con respecto a los organoides derivados de la línea control OUWio02-A (*PSEN1* WT) y un aumento en la fosforilación en Tau para ambas líneas portadoras de variantes de EA.

Por último, realizamos un RNA-seq para encontrar los ARNm diferencialmente expresados en neuronas corticales de la línea de CMPih FFAD1 (*PSEN1* T119I) en comparación con las de la línea *PSEN1* WT (UOWoo2i.A). Se analizó el transcriptoma y se identificaron 85 genes diferencialmente expresados, con 34 regulados negativamente y 51 positivamente. Un análisis de ontología génica reveló un enriquecimiento en genes asociados al equilibrio homeostático celular, la membrana plasmática y funciones moleculares como el transporte de sustancias y la homeostasis del hierro. Se seleccionaron 13 genes para validar los resultados mediante RT-qPCR, confirmando las regulaciones observadas en el análisis por RNA-Seq. Al incluir la línea UOWoo3i-A (*PSEN1* A246E), se detectaron ciertos genes (*ACP5*, *NOS3*, *PROKR2*, *GPD1*, *TRPC6*, *THSD1* y *TUBA4A*) que compartían un modo de regulación similar con la línea FFAD1, por lo que podrían estar involucrados en mecanismos moleculares comunes asociados a la EA, convirtiéndolos en blancos terapéuticos potencialmente prometedores.

En conclusión, los hallazgos de este trabajo respaldan la hipótesis de que la variante *PSEN1* (c. C356T p. T119I) posee un rol patogénico en la Enfermedad de Alzheimer de herencia autosómica dominante.

**Palabras clave:** Enfermedad de Alzheimer genética, CMPih, neuronas, organoides, neurodegeneración, ovillos neurofibrilares, placas amiloides.



# ABSTRACT

## **Study of the *PSEN1* mutation (p.T119I), associated with familial Alzheimer's disease, using genetic editing techniques, and induced human pluripotent stem cells.**

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative pathology of great relevance today, due to its increasing prevalence and socioeconomic impact. AD is characterized by the progressive degeneration of neurons, often concurrently with the appearance of beta-amyloid plaques (A $\beta$ ) and neurofibrillary tangles (NFT) in the brain. As the population ages, the prevalence of AD continues to rise, emphasizing the urgent need for innovative approaches in the research and therapy of this neurodegenerative disease.

AD has two presentations: sporadic AD (sAD) and familial AD (fAD). The latter is characterized by the presence of specific genetic mutations that are transmitted from generation to generation within a family. These mutations are often located in genes involved in amyloid precursor protein processing that generate amyloid deposits; *APP*, *PSEN1*, and *PSEN2*. Unlike in sAD, which typically develops in old age, fAD can manifest in individuals aged between 30 and 50. The initial symptoms and progression of the disease vary, but in general, this hereditary form tends to have an earlier onset and a faster course, with more pronounced cognitive decline.

In this regard, human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) play a key role in the development of neurodegeneration models that complement existing ones due to their potential to generate patient-derived models. hiPSCs are reprogrammed from adult cells by introducing specific transcription factors and, by being obtained directly from the patient under study, they maintain almost intact the patient's genetic context. Additionally, these cells possess two fundamental characteristics: pluripotency and self-renewal capacity. Pluripotency refers to their ability to differentiate into a wide range of cell types. On the other hand, hiPSCs can self-renew indefinitely in the laboratory, ensuring a constant source of cells for research and therapeutic applications.

Recently, a novel mutation in the *PSEN1* gene (c. C356T p. T119I) was reported at Fleni in a patient with early-onset AD. There is still no information about the role of this mutation in the progression of the neurodegenerative process. Our working hypothesis is that the mutation itself is causative of fAD in this family. In this work, we aimed to generate models to study in depth the pathogenic profile caused by this mutation using hiPSCs. To do this, we first generated *PSEN1* Knock-Out (KO) HEK293T cells through genome editing using CRISPR/Cas9 technology. We then performed transient co-transfections on these cells with expression plasmids encoding for *APP* wild-

type (WT) and *PSEN1* WT or mutants (A246E and T119I) and quantified intracellular A $\beta_{40}$  and A $\beta_{42}$  levels using specific ELISA assays. This experiment resulted in the finding that the *PSEN1* p.T119I mutation exhibited an intermediate phenotype (lower increase in the A $\beta_{42}$ /A $\beta_{40}$  ratio) compared to a previously reported and validated mutation (*PSEN1* p.A246E).

Next, we generated a hiPSC line from the reprogramming of dermal fibroblasts (DF) from a patient carrying the *PSEN1* c. C357T p. T119I mutation. For this purpose, we first transduced the patient's DF with the STEMCCA lentiviral vector encoding the Yamanaka reprogramming factors (*OCT-4*, *KLF4*, *SOX2*, and *c-MYC*) and obtained 3 clones, named FFAD1.1c1, FFAD1.2c4, and FFAD1.2c8, which were subsequently validated. We studied the following typical characteristics of hiPSCs: formation of compact multicellular colonies with a high nucleus/cytoplasm ratio and marked colony edges, high alkaline phosphatase (AP) activity, expression of markers associated with stemness and pluripotency, i.e., the ability to differentiate into cell types of the 3 embryonic layers (ectoderm, mesoderm, and endoderm). We also confirmed the silencing of the STEMCCA expression cassette and the parental karyotype conservation of the DF. Additionally, through microsatellite analysis, we demonstrated that the reprogrammed hiPSCs and the parental DF had the same genetic profile.

Once the clone FFAD1.2c4, re named FFAD1, was selected to continue working with. We began to establish neural models in 2 and 3 dimensions for the study of AD. At this point, two control hiPSC lines, OUWio03-A and UOWio02-A, were also added, which were generated from DF of an AD patient carrying the *PSEN1* p.A246E mutation and a close relative without the variant and without AD. Using these three lines, we generated 2-dimensional neural models, one of immature generic neurons and another of cortical neurons, which were validated by immunofluorescence and RT-qPCR of neuronal markers (*PAX6*, *TUJ1*, *TBR1*, *TBR2*, among others). To facilitate the observation of amyloid plaques, we also established a 3-dimensional neural model (also known as cerebral organoids), which was validated by immunofluorescence of neural markers.

We then quantified the levels of A $\beta_{40}$  and A $\beta_{42}$  peptides and phosphorylated Tau [pT231] by ELISA in neuronal precipitates and supernatants. We observed that the FFAD1 line exhibited a statistically significant increase in p-Tau [T231] levels compared to neurons generated from the OUWio02-A line (*PSEN1* WT). Additionally, we evaluated the deposits of A $\beta_{42}$  and P-tau [pT231] on histological sections of the cerebral organoids and measured the levels of A $\beta_{42}$  and phosphorylated Tau [pT231] by ELISA. The histological sections revealed that the cerebral organoids derived from hiPSCs with both *PSEN1* mutations (p.T119I and p.A246E) showed widespread A $\beta$  plaque deposits as well

as a decrease in A $\beta$ <sub>42</sub> peptide levels in the supernatants of the organoids derived from the OUWio03-A (*PSEN1* A246E) and FFAD1 (*PSEN1* T119I) hiPSC lines compared to the organoids derived from the control line OUWio02-A (*PSEN1* WT) and an increase in Tau phosphorylation for both lines carrying AD variants.

Finally, we performed RNA-seq to identify differentially expressed mRNAs in cortical neurons from the FFAD1 hiPSC line (*PSEN1* T119I) compared to those from the *PSEN1* WT line (UOWoo2i.A). The transcriptome was analyzed, and 85 differentially expressed genes were identified, with 34 downregulated and 51 upregulated. Gene ontology analysis revealed an enrichment in genes associated with cellular homeostatic balance, the plasma membrane, and molecular functions such as substance transport and iron homeostasis. Thirteen genes were selected to validate the results by RT-qPCR, confirming the regulations observed in the RNA-Seq analysis. By including the UOWoo3i-A line (*PSEN1* A246E), certain genes (*NOS3*, *ICAM4*, *HSPA6*, *TMEM87B*, *PROKR2*, *GRIN2A*, *TRP6*, *THSD1*, and *ADAMTS15*) were detected to share a similar mode of regulation with the FFAD1 line, suggesting they could be involved in common molecular mechanisms associated with AD, making them potentially promising therapeutic targets.

In conclusion, the findings of this study support the hypothesis that the *PSEN1* variant (c. C356T p. T119I) has a pathogenic role in autosomal dominant inheritance Alzheimer's disease.

**Keywords:** Genetic Alzheimer's disease, hiPSCs, neurons, organoids, neurodegeneration, neurofibrillary tangles, amyloid plaques.

# AGRADECIMIENTOS

Una tesis doctoral no se hace ni se escribe sola y quiero aprovechar este momento para agradecer.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores, Leo y Eze, que me acompañaron y me guiaron a lo largo de este camino. A Eze, por bancar mi intensidad y responder a todas mis preguntas. A Leo, por soportar mis frustraciones y ayudarme a encauzarlas sabiamente, por enseñarme con una generosidad pocas veces vista. Les agradezco de corazón por esta oportunidad. Por darme las herramientas, la independencia y el conocimiento para afrontar lo que sigue.

A mi consejera de estudios, Flavia Saravia, por asistirme y guiarme en este proceso.

Quiero agradecer también a las instituciones que formaron parte de esta tesis. A la Facultad de Ciencias Exactas y naturales de la UBA, por brindarme un segundo hogar y una educación de excelencia. A CONICET, por proveerme el financiamiento sin el cual hoy no podría estar acá. Y a FLENI por abrirme sus puertas todos estos años, no solo del LIAN sino de sus otros laboratorios: Quiero agradecer al Laboratorio de Enfermedades Neurodegenerativas y al Laboratorio de Biología Molecular por ser mi pedacito de FLENI en Belgrano, por darme un espacio y contagiarme su buena onda. Al Laboratorio de Neuropatología por permitirme usar su criostato, responder a mis preguntas curiosas de temas que claramente no vi en mi vida con risas y cariño. Y... por las tortas de los viernes.

Al Dr. Gustavo Selever, por abrirme las puertas al LIAN y a FLENI y el continuo apoyo durante el doctorado.

A las Maries, Marie Scassa y Marie Marazita, por sus charlas de carrera, de vida y de experimentos fallidos. Por siempre empujarme a dar un poquito más.

A todo el increíble, maravilloso, fantástico y fabuloso grupo del LIAN. Por ser parte de mi vida por 6 años, por la buena predisposición, la ayuda, las salidas, las birritas post labo, los llantos y las risas. A becaries 2, por que Griffindor es la mejor casa y por esos abrazos de becaries en crisis que te hacen seguir adelante. Por compartir la ñoñez y la ciencia como así también todo eso que no lo es y que hace la vida maravillosa. Conseguir un buen ambiente de trabajo es indispensable y creo que hay pocos que sean tan buenos como este. Los voy a extrañar muchísimo.

A las becarias de neuro: Sole, Sofi, Mechi, Marian, Luisi, Oli y Mica (y a Lau y Giu, que tienen título honorífico, obvio). Por la buena onda, los mates, las reuniones, discusiones y risas. A Kira y Barbie, por pasar y dejar su huella. Mención especial a Sofita Julia Roberts, por enseñarme a ser Lulita Julia Roberts.

A Caro y a Shei, por los tatuajes de gatitos tomando vinito que nunca nos haremos (o si...). Por los lunes de Amores Tintos que cambiaron la semana y las reseñas de skincare. Por darme su cariño, franqueza y amistad todos estos años. Porque a medida que uno crece es más difícil hacer amigos y acá estamos, compartiendo pedacitos de vida. Las espero con un sillón y un vinito.

A Diego, por permitirme a ejercer la docencia desde el lado de la mesada y enseñarme mucho (probablemente más de lo que te enseñé yo a vos).

A mi familia, mis papás y mi hermano, por empujarme a ser eso que quiero ser y nunca decirme que no podía. Porque si estoy acá es en gran parte por todo el esfuerzo que uds hicieron... Porque me enseñaron a apuntar al cielo siempre.

A mis amigos de toda la vida, Cami, Sole, Lari, Pau, Maru, Juanchi, Javo Sabri y Flor, por acompañarme en cada paso que doy. Por las innumerables charlas, por compartir experiencias, por replantearme cosas, por seguir siendo esas personas a las que puedo volver, aunque pasen los años y nuestras vidas vayan cambiando.

A Hora, por tantos años de Betty Boop y ser mi compañía artística siempre. Por ser mi Zo Rita preferida. A Axel, porque no puedo creer que después de tantos años sigamos siendo amigos, por la indignación de comprar carne en el COTO y no en la carnicería del barrio. A ambos, porque por momentos me supieron entender mejor que nadie. Por ayudarme a conciliar la ciencia y el arte de una manera tan hermosa.

A Julián, gracias por elegirme y por elegirnos mutuamente cada día. Por ser mi sostén y mi compañero de vida. Gracias por ayudarme a bajar y contenerme cuando lo necesito, por hacerme reír todos los días. Gracias por aceptarme como soy y querer compartir el mundo conmigo, por decir que sí a mis ideas y después encargarte de hacer la lista de tareas para cumplirlo, porque yo claramente no lo voy a hacer. Por complementarnos. No soy lo suficientemente buena con las palabras como para expresar todo el agradecimiento que tengo de tenerte en mi vida.

# ABREVIATURAS

Apolipoproteína-E (Apo-E)  
células gliales radiales externas (GRe)  
células gliales radiales ventriculares (GRv)  
células madre humanas (CMh)  
células madre embrionarias humanas (CMEh)  
células madre neurales (CMN)  
células madre neuroepiteliales (CMNE)  
células madre pluripotentes humanas (CMPh)  
células madre pluripotentes inducidas humanas (CMPih)  
células progenitoras intermedias (CPI)  
cuerpos embrioides (EB)  
Deterioro Cognitivo Leve (DCL)  
Diferencialmente expresados (DE)  
Enfermedad de Alzheimer (EA)  
Enfermedad de Alzheimer de forma esporádica (EAe)  
Enfermedad de Alzheimer de forma familiar (EAf)  
Estudios de asociación de genoma completo (GWAS)  
especies reactivas de oxígeno (ROS)  
ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA)  
factor de crecimiento epidérmico (EGF)  
factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF)  
fibroblastos dérmicos humanos (FDh)  
fibroblastos embrionarios de ratón irradiados (MEFi)  
forma hiperfosforilada de Tau (p-Tau)  
*Green Fluorescent Protein (GFP)*  
guías de ARN (gARN)  
*knock-out (KO)*  
OCT-4, KLF4, SOX-2 y C-MYC (OKSM)  
organoides cerebrales (OCs)  
Ovillos neurofibrilares (ONF)  
Péptidos de amiloide-beta ( $A\beta$ )  
Presenilina 1 (PSEN1)  
Presenilina 2 (PSEN2)  
Proteína precursora del amiloide (APP)  
sistema nervioso (SN)  
sistema nervioso central (SNC)  
sistema nervioso periférico (SNP)  
Tomografía por emisión de positrones (PET)  
*wild-type (WT)*  
zona ventricular (ZV)  
zona subventricular (SVZ)

# Contenido

|   |           |
|---|-----------|
| <b>RESUMEN .....</b>  | <b>2</b>  |
| <b>ABSTRACT .....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>AGRADECIMIENTOS .....</b>  | <b>8</b>  |
| <b>ABREVIATURAS .....</b>   | <b>10</b> |
| <b>INTRODUCCIÓN .....</b>   | <b>15</b> |
| <b>1. La Enfermedad de Alzheimer .....</b>  | <b>15</b> |
| <b>2. Enfermedad de Alzheimer – Causas genéticas y factores de riesgo .</b>                                       | <b>20</b> |
| <b>3. PSEN1, complejo gamma secretasa y enfermedad de Alzheimer .....</b>   | <b>22</b> |
| <b>4. Etiología de la enfermedad de Alzheimer .....</b>   | <b>25</b> |
| 4.1 Hipótesis de la cascada amiloide .....  | 25        |
| 4.2 Hipótesis colinérgica .....   | 27        |
| 4.3 Hipótesis de la homeostasis del calcio .....  | 27        |
| 4.4 Hipótesis de la cascada mitocondrial .....  | 28        |
| 4.5 Hipótesis de la propagación de Tau .....  | 30        |
| <b>5. Células madre humanas: clasificación, obtención y potenciales usos.</b>                                     | <b>31</b> |
| <b>6. Modelos de diferenciación neural .....</b>  | <b>37</b> |
| <b>7. Modelos de enfermedad de Alzheimer. ....</b>  | <b>42</b> |
| 7.1 Modelos animales .....  | 43        |
| 7.2 Modelos de células madre humanas .....  | 44        |
| <b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>   | <b>47</b> |
| <b>Hipótesis del trabajo .....</b>  | <b>47</b> |
| <b>Objetivos generales y específicos.....</b>   | <b>47</b> |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>   | <b>49</b> |
| Células utilizadas .....  | 49        |
| Diseño de guías - CRISPR/Cas9.....  | 49        |
| Clonado de guías en el plásmido pSpCas9(BB)-2A-Puro-2A-GFP .....  | 51        |
| Colony- PCR .....   | 55        |
| Plásmidos de expresión en células de mamíferos .....  | 55        |
| Generación de bacterias competentes .....   | 57        |
| Transformación de bacterias competentes .....   | 58        |
| Extracción de ADN plasmídico (Midi prep y Mini prep) .....  | 58        |
| Diseño de oligonucleótidos “primers” para realizar mutagénesis dirigida del plásmido <i>PSEN1 wild-type</i> ..... | 60        |
| Ensayo de mutagénesis dirigida .....  | 60        |
| Cultivo de células HEK293T.....   | 61        |

|   |    |
|---|----|
| Transfección de células HEK293T .....   | 63 |
| Obtención de colonias HEK293T editadas mediante CRISPR/Cas9 por método de dilución límite.....  | 63 |
| Extracción de material genómico .....   | 65 |
| Recolección de sobrenadantes.....   | 65 |
| Preparación y cuantificación de extractos proteicos .....   | 65 |
| Western blot .....  | 66 |
| Análisis cuantitativo de proteínas mediante ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA) .....   | 67 |
| Aislamiento de fibroblastos dérmicos (FD) .....   | 68 |
| Amplificación y criopreservación de fibroblastos dérmicos humanos y fibroblastos embrionarios murinos.....  | 69 |
| Generación de partículas lentivirales- Empaquetado de casete STEMCCA .....  | 70 |
| Verificación del título viral por citometría de flujo .....   | 71 |
| Obtención de CMPih desde FDh por inserción del casete de reprogramación STEMCCA.....  | 72 |
| Co-cultivo con MEFi. Amplificación y criopreservación.....  | 73 |
| Cultivo y criopreservación de CMPih utilizando medios comerciales definidos (condición <i>feeder-free</i> ).....  | 74 |
| PCR a tiempo final.....   | 75 |
| Ensayo de fosfatasa alcalina .....  | 76 |
| Ensayo de diferenciación <i>in vitro</i> de CMPih basado en la formación de cuerpos embrioides generados en condiciones de cultivo <i>feeder-free</i> ..... | 76 |
| Inmunomarcaciones y microscopía de fluorescencia .....  | 77 |
| Extracción de ARN total .....   | 79 |
| Retrotranscripción de ARNm.....   | 80 |
| PCR cuantitativa (qPCR) .....   | 80 |
| Cosecha de células en metafase para citogenética .....  | 81 |
| Extracción de muestras para análisis de filiación por estudio de microsatélites .....   | 82 |
| Diferenciación de CMPih a células madre neurales (CMN) utilizando un método comercial .....   | 82 |
| Diferenciación de CMN a neuronas.....   | 83 |
| Diferenciación directa de CMPih a neuronas corticales .....   | 84 |
| Protocolo generación de organoides cerebrales .....   | 84 |
| Fijación de organoides cerebrales y corte en criostato.....   | 86 |
| Inmunomarcaciones de organoides cerebrales.....   | 86 |
| Cuantificación de depósitos de A $\beta$ por inmunotinción .....  | 87 |
| Secuenciación masiva del ARN (RNA-seq) .....  | 87 |



|  |            |
|--|------------|
| Análisis de secuenciación masiva de ARNm.....  | 88         |
| Análisis estadístico .....   | 91         |
| <b>RESULTADOS .....</b>  | <b>93</b>  |
| <b>Capítulo 1. Estudio de mutaciones en el gen <i>PSEN1</i> utilizando el modelo <i>in-vitro</i> de células HEK293T modificadas genéticamente. ....</b>                    | <b>93</b>  |
| 1.1 Generación de la línea HEK293T <i>PSEN1</i> Knock-Out (KO). ....   | 93         |
| 1.1.1 Elección del sitio blanco ( <i>target</i> ), diseño <i>in silico</i> y clonado de ARN guías para la edición génica. ....   | 94         |
| 1.1.2 Obtención de la línea HEK293T deficiente en <i>PSEN1</i> . ....  | 95         |
| 1.2 Obtención de plásmidos de expresión de <i>PSEN1</i> con mutaciones asociadas a EA p.T119I y p.A246E. ....  | 100        |
| 1.3 Estudio de marcadores de neurodegeneración en HEK293T <i>PSEN1</i> KO que expresan el gen <i>PSEN1</i> con las mutaciones p.T119I y p.A246E por ensayos de ELISA. .... | 103        |
| Resultados parciales de este capítulo.....   | 106        |
| <b>Capítulo 2. Generación de la línea celular pluripotente inducida humana FFAD1 (o FLENI-001A), portadora de la mutación <i>PSEN1</i> p.T119I.....</b>                    | <b>109</b> |
| 2.1 Reprogramación de fibroblastos dérmicos (FD) de paciente portador de la mutación en <i>PSEN1</i> (c.C356T; p. T119I).....  | 109        |
| 2.2 Validación de la troncalidad de los clones FFAD1.2c1, FFAD1.2c4 y FFAD1.2c8 .....  | 113        |
| 2.2.1 Secuenciación de Sanger: Presencia de la mutación <i>PSEN1</i> (NM_000021.4) c.356C>T .....  | 113        |
| 2.2.2 Morfología celular .....   | 116        |
| 2.2.3 Actividad de la enzima fosfatasa alcalina.....   | 118        |
| 2.2.4 Estudio de la expresión de marcadores de pluripotencia .....   | 119        |
| 2.2.5 Análisis citogenético .....  | 124        |
| 2.2.6 Análisis de silenciamiento del casete de reprogramación STEMCCA. ....  | 126        |
| 2.2.7 Diferenciación <i>in vitro</i> a células de las tres capas embrionarias mediante el método de formación cuerpos embrioides. ....                                     | 127        |
| 2.2.8 Ensayo de filiación por análisis de repeticiones en regiones microsatélite .....   | 130        |
| Resultados parciales de este capítulo.....   | 132        |
| <b>Capítulo 3. Generación y validación de modelos neuronales en 2 y 3 dimensiones.....</b>   | <b>135</b> |
| 3.1 Modelo de CMN y neuronas genéricas a partir de CMPih .....   | 136        |
| 3.2.1 Generación y validación de las CMN .....   | 137        |
| 3.2.2 Obtención de neuronas genéricas .....  | 142        |
| 3.3 Modelo de neuronas corticales a partir de CMPih .....  | 148        |

|  |            |
|--|------------|
| 3.3.2 Obtención y validación de neuronas corticales obtenidas a partir de CMPih  | 149        |
| 3.4 Diferenciación de CMPih a linaje neural en 3 dimensiones (Modelo de organoides cerebrales)   | 166        |
| 3.4.1 Generación del modelo de organoides cerebrales   | 166        |
| 3.4.3 Validación del modelo de organoides cerebrales   | 168        |
| Resultados parciales del capítulo  | 172        |
| <b>Capítulo 4. Estudio de patogenicidad de la mutación <i>PSEN1</i> p.T119I sobre el desarrollo de la EA en modelos en 2 y 3 dimensiones</b>                                     | <b>175</b> |
| 4.1 Análisis de marcadores neurodegenerativos por ensayos de ELISA utilizando neuronas corticales diferenciadas de CMPih derivadas de pacientes                                  | 175        |
| 4.2 Análisis de marcadores neurodegenerativos en organoide cerebrales  | 179        |
| Resultados parciales del capítulo  | 182        |
| <b>Capítulo 5. Secuenciación masiva de ARNm de neuronas corticales derivadas de CMPihs portadoras de la variante <i>PSEN1</i> p.T119I (FFAD1) y <i>PSEN1</i> WT (OUWi002-A).</b> | <b>184</b> |
| 5.1 Análisis bioinformático  | 184        |
| 5.2 Validación de los resultados obtenidos   | 195        |
| Resultados parciales del capítulo  | 200        |
| <b>DISCUSIÓN</b>   | <b>203</b> |
| Generación de CMPih derivadas de fibroblastos de pacientes de EA   | 211        |
| Estudio de variantes asociadas a la EA utilizando modelos neurales derivados de CMPih  | 214        |
| Regulación diferencial de genes en neuronas corticales derivadas de CMPih portadora de la variante <i>PSEN1</i> p.T119I  | 222        |
| <b>CONCLUSIONES</b>  | <b>233</b> |
| <b>REFERENCIAS</b>   | <b>236</b> |

# INTRODUCCIÓN

## 1. La Enfermedad de Alzheimer

En 1906, el psiquiatra y anatomopatólogo alemán Alois Alzheimer presentó ante sus colegas el caso de una de sus pacientes que había transitado una “peculiar y severa enfermedad de la corteza cerebral”. Auguste Deter, una mujer de solo 51 años había sido internada en el hospital psiquiátrico de Frankfurt por su marido en 1901 tras haber presentado síntomas de paranoia que fueron progresando durante su internación (sumando también desórdenes de sueño, pérdida de memoria, agresividad y confusión progresiva) hasta su posterior muerte en 1905. No solo la mujer presentaba síntomas de deterioro cognitivo típicos de la demencia, sino que, particularmente, tras el análisis anatómico del cerebro de dicha paciente, el Dr. Alzheimer descubrió la presencia de unos agregados proteicos extraños. Si bien el caso no llamó la atención de los psiquiatras presentes en dicha reunión, años después el diagnóstico de Auguste Deter se pasó a conocer como el primer caso reportado de demencia de tipo Alzheimer<sup>1</sup>.

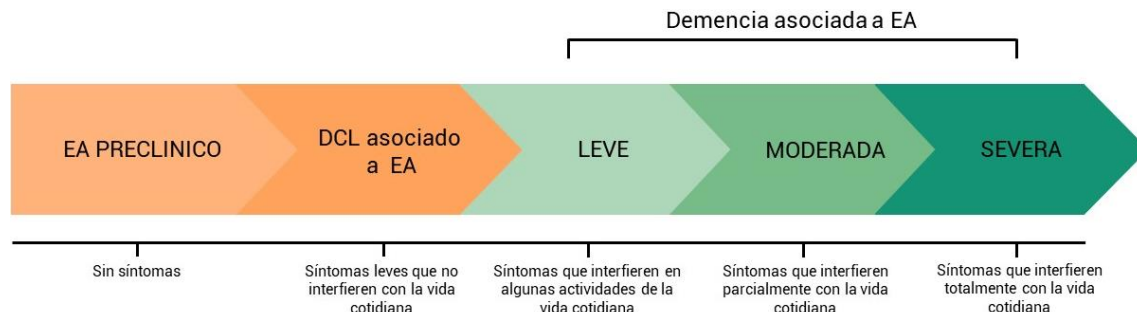
La demencia es un término general que abarca una serie de síntomas que se asocian al deterioro progresivo de las habilidades cognitivas (memoria, toma de decisiones, capacidad del habla, entre otras) del paciente afectado. Se estima que a nivel mundial existen aproximadamente 50 millones de personas que conviven con algún tipo de demencia y se prevé un incremento de este número a 152 millones para 2050<sup>2,3</sup>. En particular, la Enfermedad de Alzheimer (EA) es el tipo más común de demencia en personas adultas y no solo impacta sobre el paciente sino también sobre su familia, cuidadores y en las políticas de salud pública<sup>4-7</sup>.

La dificultad en el manejo clínico de esta patología radica en dos puntos particulares. Por un lado, la heterogeneidad presentada por los pacientes en cuanto a edad de inicio, severidad de la pérdida cognitiva, presentaciones clínicas diversas y la presencia de otras comorbilidades<sup>8,9</sup>. Por otro lado, la dificultad de diagnosticar la presencia de EA previo al inicio de los síntomas de forma tal de establecer estrategias de trabajo que mejoren el desempeño del paciente a lo largo de los años como así también preparar a las familias para afrontarlo<sup>3</sup>.

Como se puede observar en la figura 1, el inicio de los síntomas no coincide con los cambios cerebrales, los cuales comienzan a ocurrir muchos años antes de que el paciente sienta la necesidad de acudir a un centro médico<sup>10,11</sup>. Las manifestaciones más tempranas se reconocen clínicamente como Deterioro Cognitivo Leve (DCL) en el cual, uno o varios dominios cognitivos pueden verse afectados de forma leve, pero sin alterar

las capacidades funcionales de la persona<sup>12</sup>. Con el paso de los años y el avance de la enfermedad, los síntomas comienzan a agravarse y a interferir con la vida diaria del paciente, incapacitándolo. Ese cuadro se conoce como demencia por EA.

Es importante destacar que, si bien el aumento en la edad es un factor de riesgo para padecer EA y todos vemos nuestro desarrollo cognitivo afectado levemente, esta patología no es propia del curso normal de la vejez<sup>13,14</sup>.



**Figura 1. Progresión sintomatológica de la EA.** Se estima que los cambios biológicos que tienen lugar en el encéfalo comienzan años antes de que el paciente acuda a la clínica por sospecha de demencia. Modificado de <sup>3</sup>.

Hoy en día se asocia a la EA con un síndrome de origen biológico, de carácter neurodegenerativo que presenta particularidades propias que permiten distinguirla de otras patologías neurodegenerativas. Entre ellas se destacan y son considerados más predominantes:

- Presencia de depósitos oligoméricos extracelulares de péptidos amiloide-beta (A $\beta$ ) de distintas longitudes. Los mismos son derivados del clivaje de la proteína precursora del amiloide (APP, por sus siglas en inglés) y su acumulación se debe a un mayor clivaje y/o a una menor depuración de dichos péptidos.
- Presencia de inclusiones intracelulares de tau hiperfosforilado conocidas como ovillos neurofibrilares (ONF).

Es importante destacar que, si bien por muchos años la presencia de placas A $\beta$  como de ONF detectadas en cerebros *post-mortem* han sido las características diagnóstico/patológicas de esta enfermedad, el establecimiento de iniciativas que favorezcan un mejor diagnóstico en conjunto con los avances recientes en técnicas de imágenes y el desarrollo de biomarcadores en líquido cefalorraquídeo y sangre periférica han permitido establecer un nuevo panorama en relación con la progresión de esta enfermedad<sup>15</sup>.

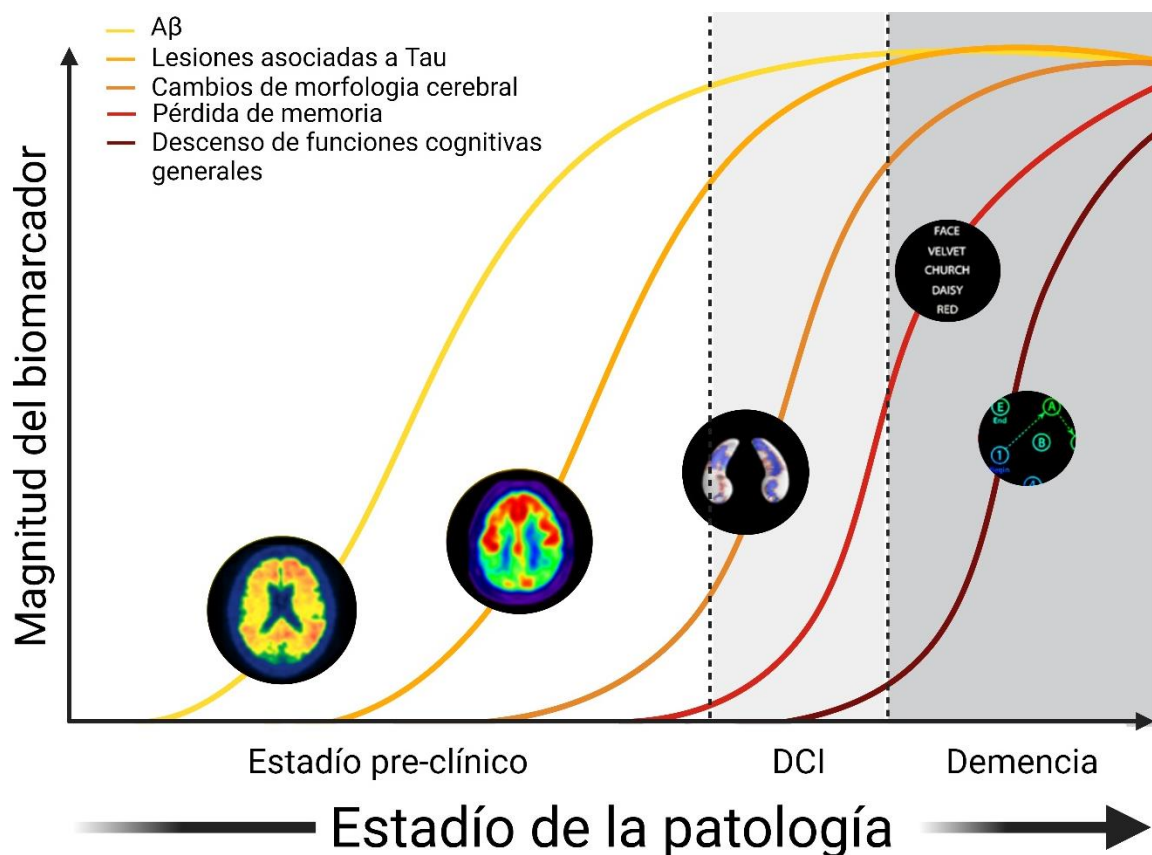
Como puede observarse en la figura 2, el desarrollo de la EA hacia un estadio clínico claro viene acompañado de la aparición temprana de cinco biomarcadores los

cuales pueden ser utilizados para realizar un diagnóstico temprano y establecer líneas de tratamiento tanto para el paciente como para la familia. Estos son:

1. Medición de  $\beta$ -amiloide en líquido cefalorraquídeo o por análisis de imágenes de tomografía por emisión de positrones de amiloide (PET scan por sus siglas en inglés, *positron emission tomography*)<sup>16,17</sup>.
2. Medición de proteína tau en líquido cefalorraquídeo y PET de Fluorodesoxiglucosa, indicadores de disfunción neuronal y sináptica<sup>18</sup>.
3. Medición de atrofia cerebral por resonancia magnética estructural<sup>19</sup>.

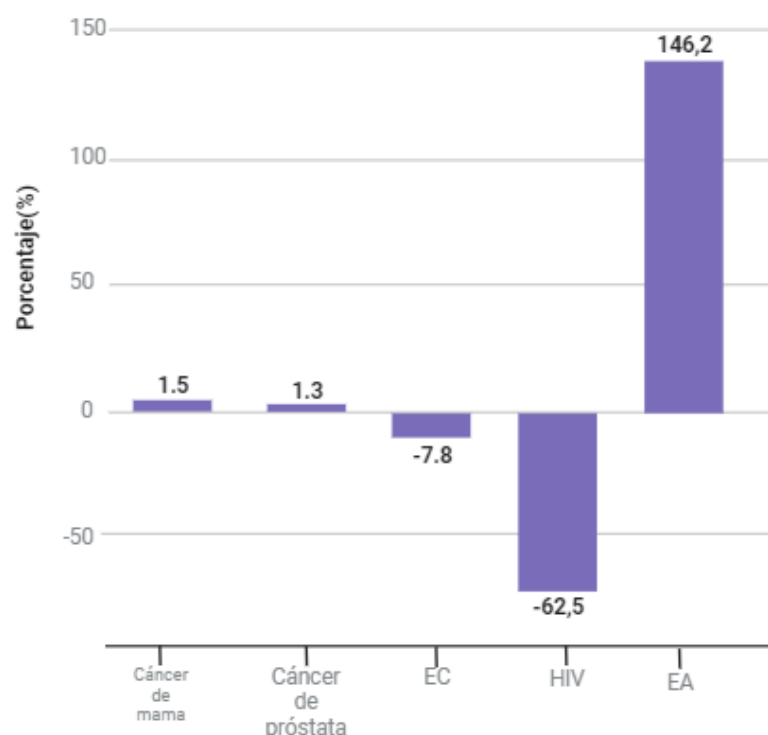
Posteriormente, una vez iniciada la fase clínica de la patología el diagnóstico se complementa con tests cognitivos:

4. Medición de pérdida de memoria.
5. Medición de habilidades cognitivas generales (orientación, lectura, memoria, etc).



**Figura 2. Cambios en los biomarcadores en la progresión de EA.** Se observa que las modificaciones a nivel biológico (deposición de placas A $\beta$  primero y ONF posteriormente) que producen muerte neuronal, inician 30 años antes que los síntomas cognitivos. Modificado de ADNI<sup>20</sup>.

En relación con la mortalidad, es difícil estimar el número total de fallecimientos asociados a EA puesto que muchas veces la causa de muerte registrada no indica la presencia de esta patología, sino que refiere a fallas en el funcionamiento de otros órganos. Es importante destacar que, en estadios avanzados de la EA, los pacientes presentan complicaciones asociadas a la movilidad y trastornos de deglución que llevan a un estado de malnutrición y deterioro corporal (revisado en <sup>3</sup>). Si consideramos que aquellas personas que presentan EA como patología subyacente, mueren efectivamente de esta enfermedad, en los últimos años se puede observar un aumento en el porcentaje de muertes asociadas a esta patología en comparación con otras enfermedades en Estados Unidos (Figura 3).

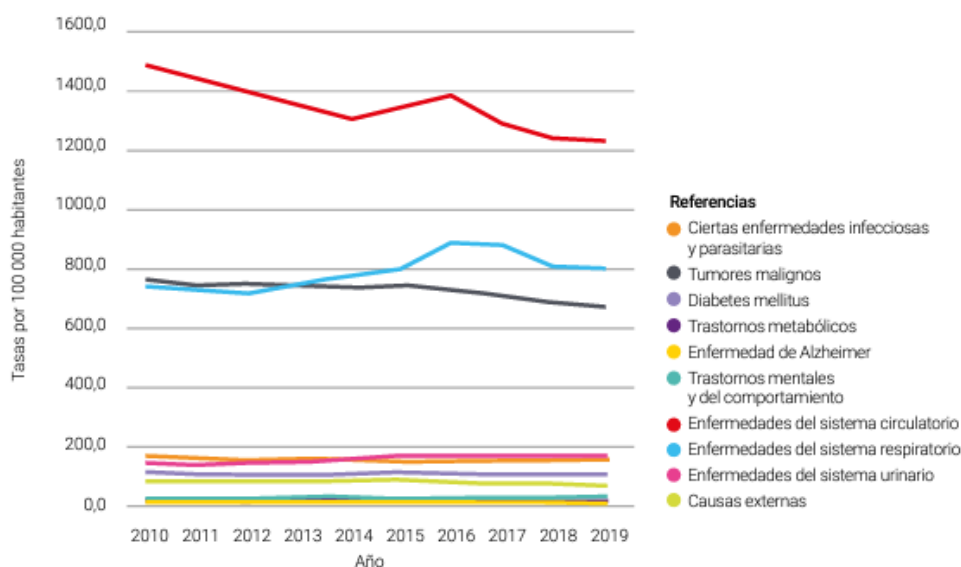


**Figura 3. Cambios en los porcentajes de causa de muerte entre 2000 y 2018.** El gráfico muestra la diferencia entre las muertes reportadas asociadas a patologías específicas entre el periodo 2000 y 2018 en estados unidos. EC: Enfermedades cardíacas. HIV: Virus de la inmunodeficiencia humano. EA: Enfermedad de Alzheimer. Adaptado de <sup>3</sup>.

Resulta imperioso subrayar que la mayoría de los datos poblacionales presentados hasta el momento se basan en estudios realizados en Estados Unidos y Europa. La situación en América Latina con respecto al diagnóstico y al tratamiento de EA es un poco más compleja debido a la falta de datos epidemiológicos y unificación de procesos diagnósticos entre otros<sup>21</sup>.

De acuerdo con datos provistos por el Ministerio de Salud de la Nación Argentina, en una cohorte compuesta por datos del 2010-2019, se estima que el 0,5% de las causas de muerte están registradas y asociadas con EA lo cual es un porcentaje bajo si se

compara con la mortalidad causada por enfermedades del sistema circulatorio y respiratorio o el cáncer (Figura 4). A pesar de estos datos, el mismo trabajo establece la importancia de mejorar el análisis y registro de causas asociadas a muertes por EA y encomienda una articulación con la dirección nacional de salud mental ya que reconoce la falta de claridad sobre este punto<sup>22</sup>.



**Figura 4. Tasa de mortalidad de por grupos de causas seleccionadas en personas de 60 años y más en Argentina, 2010-2019<sup>22</sup>.**

Con respecto a los tratamientos disponibles, en la mayoría de los casos se prescribe un tratamiento con inhibidores de la acetilcolinesterasa (como Donezepil o Rivastigmina) pues se ha visto una disminución en la activación del sistema colinérgico en EA<sup>23,24</sup>. También es común el uso de memantina, un antagonista no competitivo del receptor glutamatérgico de N-metil-D-aspartato (NMDA), como respuesta a la teoría de “neurotoxicidad” en la cual se establece que una activación excesiva de estos receptores promueve la muerte celular<sup>24,25</sup>. Estos tratamientos no frenan el avance de la enfermedad ni la revierten y, como se ha establecido anteriormente, el tratamiento sintomático se establece 30 años después del inicio de la EA.

En los últimos años han aparecido en el mercado anticuerpos monoclonales que prometen enlentecer la deposición de A $\beta$  como el Aducanumab o el Lecanemab, pero falta constatar que los mismos realmente generen un cambio en la progresión de la patología y un costo-beneficio con respecto a sus efectos adversos<sup>26</sup>.

## 2. Enfermedad de Alzheimer – Causas genéticas y factores de riesgo

En 2006 se cumplieron 100 años del primer caso reportado de EA. A pesar de haber pasado todo ese tiempo, aún no se conocen las causas exactas que desencadenan el inicio de esta patología en la mayoría de los casos, pero se considera que existen un número de factores de riesgo tanto ambientales como genéticos que podrían contribuir a ello.

La EA se destaca por poseer dos presentaciones: una forma esporádica (EAe) cuyo origen es multifactorial, de inicio posterior a los 65 años y que comprende aproximadamente al 95% de los pacientes y una forma hereditaria o familiar (EAF), generalmente de inicio temprano (< 65 años), con presencia de mutaciones en genes que participan del procesamiento de APP (*PSEN1* [MIM: 104311], *PSEN2* [MIM: 600759] y *APP* [MIM: 104760]), un patrón de herencia dominante y que representa al 5% restante de los pacientes<sup>27,28</sup>. Si bien las dos presentaciones de la enfermedad presentan características propias, ambas coinciden en la aparición de marcas neuropatológicas similares como así también en el impedimento cognitivo que son observables en los pacientes<sup>29</sup>.

El factor de riesgo más importante para la EAe es la edad, pero como se mencionó anteriormente, la EAe no forma parte del proceso normal del envejecimiento, sino que es considerado una presentación patológica del mismo. Por ello, es importante identificar qué factores podrían cumplir un rol predominante en su aparición. En la figura 5 se presentan variantes genéticas que han sido relacionadas con la aparición de esta enfermedad.

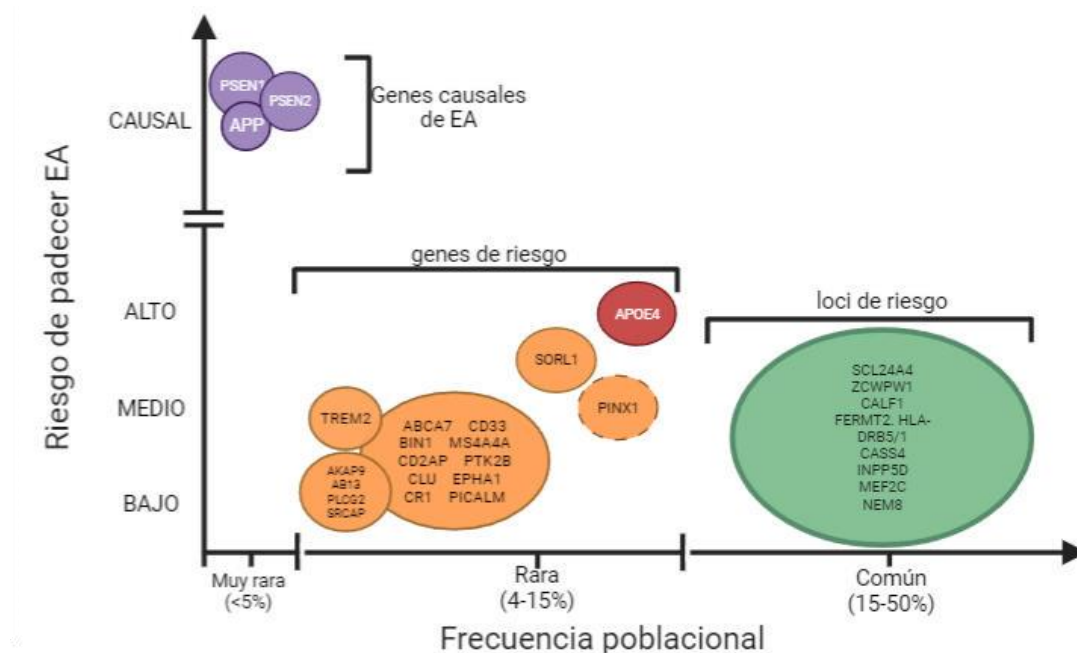
Uno de los factores de riesgo genéticos de EAe más conocidos es el gen *APOE*, el cual codifica para la proteína Apolipoproteína-E (Apo-E), involucrada en el transporte y metabolismo de lípidos<sup>30</sup>. *APOE* presenta 3 isoformas diferentes: *APOE* ε2, ε3 y ε4, con una frecuencia alélica de expresión de 8%, 77% y 15% respectivamente<sup>31</sup>.

Actualmente se considera que la presencia de la isoforma *APOE* ε4 genera una reducción en la capacidad de eliminar la proteína amiloide depositada y que esta podría ser la razón por la cual *APOE* ε4 es el factor de riesgo genético más importante para la aparición de EAe de inicio tardío. Se estima que tener una copia de *APOE* ε4 aumenta tres veces el riesgo de padecer la enfermedad, mientras que tenerla en homocigosis aumenta el riesgo entre ocho y doce veces<sup>32,33</sup>. Por otro lado, estudios poblacionales parecen indicar que *APOE*ε2 confiere protección contra la EA<sup>34</sup>. Es importante destacar que la presencia de uno o dos alelos de la variante ε4 no es condición *sine qua non* para que el individuo desarrolle EA, y que, a su vez, muchas personas que poseen la



enfermedad no presentan esta isoforma. Aunque *APOE*  $\epsilon 4$  es el factor genético de riesgo principal que contribuye al desarrollo de la EAe de inicio tardío, su efecto solo explica el 27,3% de la heredabilidad total de la enfermedad, la cual se estima en un 80%<sup>35</sup>.

En los últimos años, los estudios de asociación de genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés *Genome-wide association study*) han desempeñado un papel fundamental en la comprensión del análisis de la EA. Estos estudios implican el examen de variantes de secuencia en todo el genoma de individuos con y sin EA, con el objetivo de identificar variantes genéticas específicas asociadas con esta enfermedad. Mediante el análisis de conjuntos de datos compuestos por miles de participantes, los GWAS han identificado con éxito numerosos *loci* genéticos que contribuyen a la susceptibilidad de la EA<sup>36-38</sup>. Estos hallazgos han arrojado luz sobre las vías biológicas subyacentes involucradas en el desarrollo y la progresión de la enfermedad, resaltando genes clave y procesos biológicos implicados en la patogénesis de la EA (Figura 5).

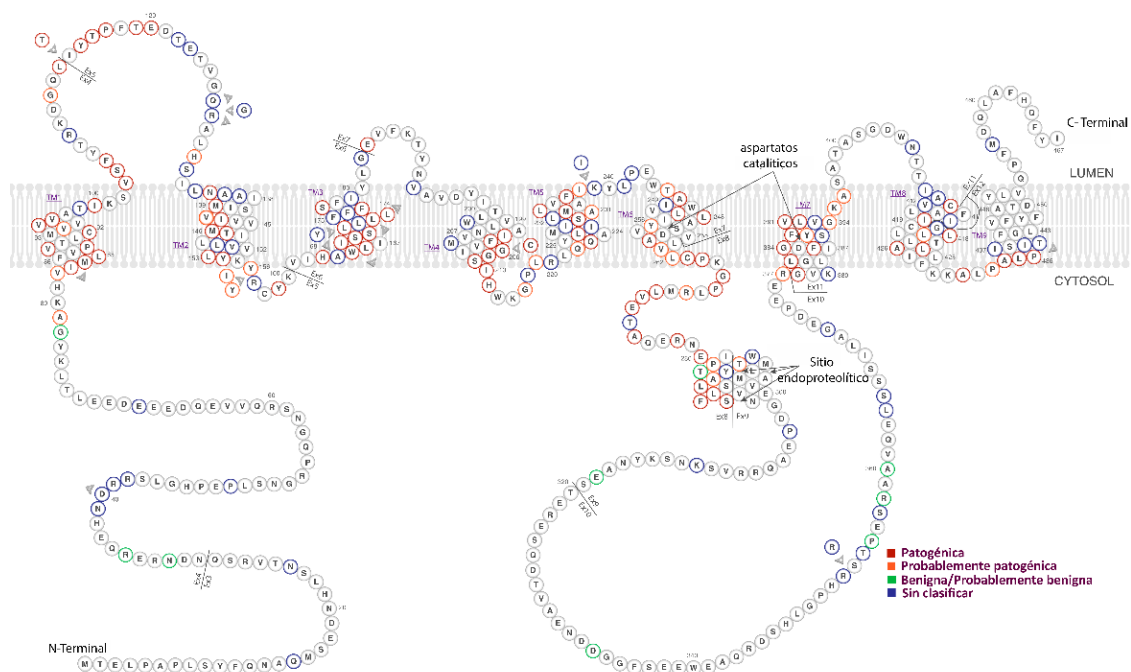


**Figura 5. Descripción general de los genes asociados a la aparición de la Enfermedad de Alzheimer, correlación entre frecuencia poblacional y riesgo de generar EA.** El riesgo de desarrollar EA (eje vertical) fue graficado contra la prevalencia de las variantes en la población general (eje horizontal) para genes descritos por ensayos genómicos. Los colores indican el o los procesos en los cuales están involucrados dichos genes. Adaptado de <sup>39,40</sup>

La figura 5 describe las componentes genéticas más notorias a tener en cuenta en la EA. La EAf sigue patrones genéticos mendelianos debido a mutaciones específicas en los genes *PSEN1*, *PSEN2* y *APP*. Por otro lado, en la EAe los factores genéticos juegan un papel menos claro y se manifiestan a través de loci de riesgo, siendo el gen *APOE* el principal contribuyente a este riesgo. Esta dualidad refleja la complejidad inherente de la enfermedad, con una interacción entre factores genéticos y ambientales que moldean

su curso y presentación clínica. Así, las mutaciones presentes en las proteínas Presenilina 1 (PSEN1), Presenilina 2 (PSEN2) y Proteína Precursora Amiloide (APP, por sus siglas en inglés) han sido implicadas en la aparición de la EAF.

Hasta el momento, se han encontrado 88 mutaciones en *PSEN2* y 114 en *APP* asociadas a la aparición de la EAF. En el caso de *PSEN1* se han reportado 360 mutaciones distribuidas a lo largo de toda la proteína [Figura 6. Base de datos actualizada de Alzhforum (consultada el 11/03/2024)]. En los siguientes apartados se presentará evidencia de cómo estas proteínas se relacionan entre sí, con la aparición de las placas amiloideas y cómo esto ha dado lugar a la teoría de la cascada amiloide, la teoría que hoy domina el campo de cómo se desencadena la EA.



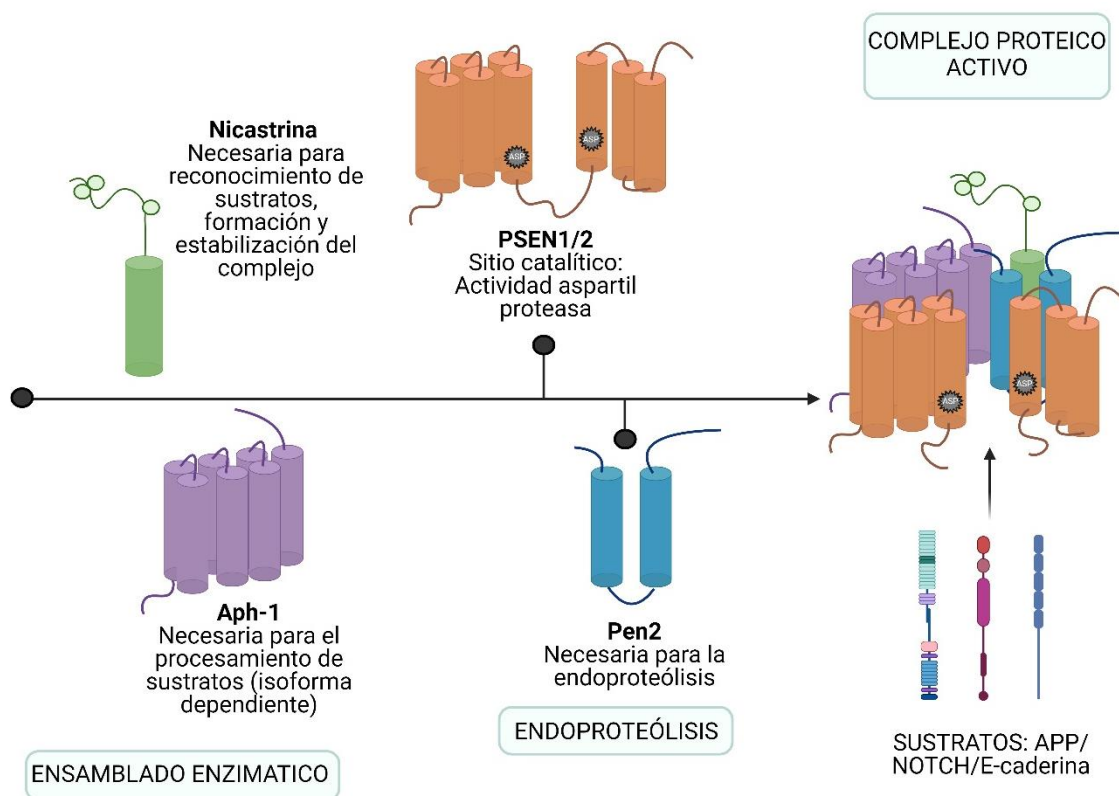
**Figura 6. Secuencia aminoacídica de la proteína Presenilina-1 con sus mutaciones asociadas.** Representación esquemática de PSEN1 mostrando sus 9 dominios transmembrana, las uniones de los exones codificantes, los sitios C-terminal y N-terminal de la proteína, los aspartatos catalíticos y el sitio de endoproteólisis. En rojo se muestran las mutaciones categorizadas como patogénicas, en naranja las probablemente patogénicas y en verde, las benignas. En azul, se presentan las mutaciones que aún no han sido clasificadas. Imagen extraída y modificada de Alzhforum.

### 3. PSEN1, complejo gamma secretasa y enfermedad de Alzheimer

Las primeras proteínas en ser asociadas al desarrollo de EA fueron las Presenilinas (PSENs). En la década de 1990, análisis de asociación realizados en varias familias que poseían EAF permitieron encontrar 2 *loci*, ubicados en los cromosomas 1 y 14, relacionados con la aparición de EAF<sup>41,42</sup>. Pocos años después, se conoció la secuencia

de dos genes homólogos: *PSEN1*, ubicado en cromosoma 14 y *PSEN2*, ubicado en el cromosoma 1<sup>43-45</sup>. Como se expuso anteriormente, dichos genes codifican para PSEN1 y PSEN2 respectivamente y a su vez, ambas forman el sitio catalítico de un complejo transmembrana llamado complejo gamma secretasa ( $\gamma$ -secretasa) el cual se estima que se encarga de procesar más de 90 proteínas transmembrana, entre ellas APP revisado en 46-48.

$\gamma$ -secretasa actúa como una aspartil-proteasa transmembrana y está compuesta por 4 subunidades esenciales: PSEN, que incluyen a PSEN1 y PSEN2, Nicastrina, APh-1 (del inglés *anterior pharynx defective 1*) y PEN-2 (del inglés, *presenilin enhancer 2*)<sup>49-51</sup>. Las mismas deben presentarse en proporciones iguales en el complejo<sup>51</sup> y, de faltar alguna de ellas, se ha visto la retención del resto en el retículo endoplasmático o su rápida degradación<sup>52-54</sup>. A su vez, es necesario que dichas proteínas se ensamblen en un orden específico para asegurar la funcionalidad del complejo (Figura 7).



**Figura 7. Estructura y ensamblaje del complejo gamma secretasa.** Primero, APh-1 (violeta) y Nicastrina (verde) se unen para formar el andamiaje enzimático. Luego, las presenilinas (naranja) son incorporadas. Por último, PEN-2 (azul) es reclutada y las presenilinas son clivadas endoproteolíticamente en presenilina-NTF/CTF, lo cual activa la capacidad proteolítica del complejo. EN negro se presentan los aspartatos catalíticos de las presenilinas. Adaptado de<sup>55</sup>.

Inicialmente, tanto Nicastrina como APh-1 deben unirse entre sí y acoplarse a la membrana plasmática para funcionar como andamiaje para la correcta disposición espacial del resto del complejo<sup>56</sup>.

Nicastrina es una proteína altamente glicosilada la cual, además, cumple funciones en la interacción y el anclaje de los sustratos al complejo activo<sup>57-59</sup>. Por su lado, APH-1 es una proteína que presenta 2 proteínas homólogas en humanos, APH-1a y APH-1b. A su vez, APH-1a posee al menos 2 variantes de *splicing*, APH-1aL y APH-1aS<sup>60</sup>. A pesar de esta complejidad, estudios recientes parecerían indicar que las diversas isoformas de APH-1 cumplen diferentes funciones y que en particular APH-1b parecería estar implicada en el procesamiento de APP<sup>61</sup>.

Una vez establecido el subcomplejo APH-1-Nicastrina, se une PSEN1 o PSEN2 por interacción del dominio C-terminal con el dominio transmembrana de Nicastrina<sup>62</sup>. Las PSENs son holoproteínas de aproximadamente 50 KDa con 9 pasos transmembrana<sup>63,64</sup>, las cuales se encuentran inactivas y rápidamente son removidas por degradación proteica a menos que sean clivadas endoproteolíticamente<sup>65,66</sup>. Las PSEN contienen dos residuos aspartatos altamente conservados en los dominios transmembrana 6 y 7 (D257/D263 y D385/D366 en PSEN1/PSEN2 respectivamente) los cuales son indispensables para procesar los sustratos del complejo<sup>67</sup>.

Finalmente, se incorpora PEN-2, la cual es necesaria para el clivado endoproteolítico de las PSEN<sup>68</sup>, como así también es indispensable para la actividad de  $\gamma$ -secretasa en sí<sup>69</sup>. La endoproteólisis de las PSEN, un requisito ineludible para lograr la activación del complejo genera la formación de fragmentos PSEN amino-terminal y carboxiterminal (PSEN-NT/CT), los cuales continúan asociados formando un heterodímero<sup>70</sup> (Figura 7).

Se ha postulado que este ensamblaje se realiza en el ER para luego dar paso a su localización en la membrana plasmática por la vía secretoria mediada por el complejo de Golgi<sup>71,72</sup>. También, parecería ser que, si bien se localiza en membrana, no se encuentra activo, sino que deben acoplarse ciertas proteínas conocidas como GSMPs (del inglés, *gamma-secretase modulatory proteins*) para promover su actividad<sup>73</sup>. Para sumar un mayor grado de complejidad, tras ensamblarse, el complejo  $\gamma$ -secretasa puede ser regulado por modificaciones post-traduccionales en PSEN1, PSEN2 y Nicastrina. En particular, modificaciones sobre las PSEN afectan la actividad del complejo directamente<sup>74,75</sup>.

Es importante resaltar que, si bien  $\gamma$ -secretasa puede presentar tanto PSEN1 como PSEN2 en su estructura (y no ambas al mismo tiempo), en la membrana plasmática de las células se observa la presencia de la PSEN1, mientras que en compartimentos intracelulares parecería presentarse PSEN2<sup>76</sup>. Además, en experimentos en roedores, la ablación total de la proteína PSEN1 resulta deletérea mientras que el *knock-out* (KO) de PSEN2 no, evidenciando un rol clave de PSEN1 en la embriogénesis y el desarrollo neural<sup>77-79</sup>. A su vez, la mayoría de las mutaciones asociadas a EAF se encuentran en

PSEN1, mostrando una fuerte relación entre PSEN1,  $\gamma$ -secretasa y el desarrollo de la enfermedad.

## 4. Etiología de la enfermedad de Alzheimer

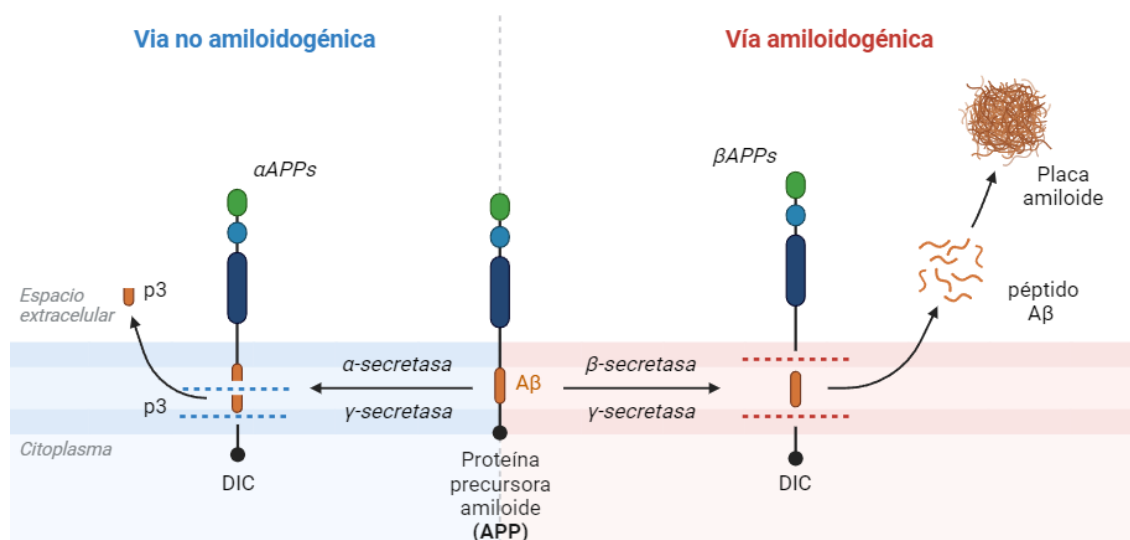
Existen varias teorías que intentan explicar el desarrollo de la EA. A continuación, detallaremos brevemente las más difundidas.

### 4.1 Hipótesis de la cascada amiloide

Como se mencionó anteriormente, la mayor cantidad de mutaciones asociadas a EAF se encuentra en el gen *PSEN1*, el cual codifica para la proteína PSEN1 que forma parte del sitio catalítico de  $\gamma$ -secretasa, enzima que procesa múltiples sustratos, entre ellos APP. Ahora bien, APP es susceptible de ser procesada por dos vías, comúnmente conocidas como, vías amiloidogénicas y no amiloidogénicas (Figura 8) y es en el desbalance entre estas dos vías en lo que se basa la teoría de la cascada amiloide.

En la vía no amiloidogénica, APP primero es reconocida por  $\alpha$ -secretasa, generando fragmentos solubles de APP ( $\alpha$ -APPs) y un fragmento C-terminal de 83 residuos (C83) que queda inserto en membrana y posteriormente es clivado por  $\gamma$ -secretasa, produciendo fragmentos no tóxicos conocidos como P3 y un dominio intracelular (DIC)<sup>80</sup>.

Por otro lado, en la vía amiloidogénica, APP es clivada primeramente por  $\beta$ -secretasa (también conocida como BACE) generando otros fragmentos solubles de APP ( $\beta$ -APPs) pero un fragmento C-terminal más largo, de 99 residuos, conocido como C99. C99, posteriormente es clivado por  $\gamma$ -secretasa generando nuevamente DIC como así también fragmentos de distinto largo de péptido A $\beta$  (A $\beta_{38-43}$ ). En particular se considera los monómeros A $\beta_{40}$  y A $\beta_{42}$  como los más involucrados en el desarrollo de la EA, siendo A $\beta_{42}$  el más proclive a oligomerizar. Las células normalmente procesan APP por ambas vías y los agregados oligoméricos de A $\beta$  son removidos por los procesos de remoción (“clearance”) convencionales<sup>80</sup>.



**Figura 8. Vías de procesamiento de APP.** En la vía amiloidogénica, APP se cliva primero por  $\beta$ -secretasa (BACE) para posteriormente ser clivada por  $\gamma$ -secretasa. Este clivaje secuencial genera monómeros de  $A\beta$  de tamaño variable  $A\beta_{37-49}$ . En particular la producción de los monómeros  $A\beta_{1-40/1-42}$  forman agregados de diferente peso molecular que terminan formando las placas amiloides típicas de la EA. En la vía no amiloidogénica, APP es clivado en primera instancia por  $\alpha$  dentro de las regiones que producirían  $A\beta$ , generando péptidos no oligomerizables. Adaptado de Biorender (Shreya Ramakrishnan y Eunice Huang)

Hardy y Higgins propusieron en 1992 su teoría de la cascada amiloide que aún hoy, aunque puesta en duda, sigue siendo la teoría que lidera el campo en cuanto a producción de fármacos para combatir la EA. Esta teoría plantea que es el aumento de depósitos  $A\beta$ , a causa de un procesamiento aberrante por parte de la  $\gamma$ -secretasa, el iniciador de la neurodegeneración observada en la EA<sup>81</sup>.

Existen varias evidencias que apoyan la teoría de la cascada amiloide:

- Por un lado, que el aumento de  $A\beta$  a nivel cerebral inicia varios años antes del inicio de la patología, como fue descrito por el proyecto ADNI<sup>82</sup>.
- Por otro, la variante APOE  $\epsilon_4$ , que disminuye la capacidad de las células de eliminar correctamente los péptidos  $A\beta$ , constituye el principal factor de riesgo genético de la EAe.
- A su vez, *APP* es un gen ubicado en el cromosoma 21. Llamativamente, las personas adultas con síndrome de Down, que poseen una trisomía de dicho cromosoma, presentan EA de inicio temprano, similar a la EAf<sup>83</sup>.
- Finalmente, muchas de las mutaciones en PSENs y APP generan cambios en el procesamiento de APP, aumentando así los niveles de los distintos monómeros de  $A\beta$ . En particular, disminuye la relación  $A\beta_{42/40}$ , la cual se usa como parámetro de diagnóstico clínico<sup>84</sup>.

Esta teoría plantea que el desbalance entre estas vías se da en ambas presentaciones de EA, aunque de forma levemente diferente. Mientras que en EAf la

balanza se inclina hacia la vía amiloidogénica por mutaciones puntuales que aumentan la producción de A $\beta$ <sup>85</sup>, en EAe se considera que fallas en la remoción de estos péptidos generan su acumulación<sup>86</sup>. Así, la acumulación de péptidos A $\beta$  se convierte en el puntapié inicial que desencadena el resto de los efectos neurodegenerativos.

Esta hipótesis ha sentado las bases para el desarrollo de múltiples fármacos. Hasta marzo de 2023, se han realizado 298 ensayos clínicos para EA, 76 de los cuales tienen como blanco terapéutico los péptidos A $\beta$  o las placas amiloides. Los mismos, buscan reducir la generación de A $\beta$ , aumentar su remoción, inhibir la agregación de los monómeros de A $\beta$  o neutralizar dichos monómeros solubles. De estos, se han interrumpido los ensayos de 38 por falta de efectividad o efectos adversos y solamente 2 drogas basadas en anticuerpos (Aducanumab y Lecanemab) han sido aprobadas por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) para su uso en pacientes en Estados Unidos <sup>revisado en 87</sup>. Sin embargo, Aducanumab ya ha sido rechazado como tratamiento por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) por presentar discrepancias en cuanto al beneficio presentado para los pacientes y ser considerado poco seguro para su administración<sup>88,89</sup>. Por todo esto, esta hipótesis, si bien sigue siendo la que lidera el campo, es considerada hoy en día insuficiente para explicar el desencadenamiento de la patología.

## 4.2 Hipótesis colinérgica

La hipótesis colinérgica fue propuesta por Peter Davies y A. J. F. Maloney en 1976 tras analizar la síntesis de diversos neurotransmisores en cerebros de pacientes con EA contra cerebros no afectados por esta enfermedad. En dicho estudio, observaron una reducción importante en la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (ChAT), encargada de la síntesis del neurotransmisor acetilcolina, en amígdala, hipocampo y corteza<sup>90-92</sup>. Estos hallazgos se vieron reforzados por otros estudios que caracterizaron la muerte de neuronas colinérgicas del núcleo basal de Meynert en EA y la existencia de una correlación entre la severidad del déficit cognitivo y la pérdida significativa de la función colinérgica<sup>91,93-95</sup>.

Esta primera hipótesis dio lugar a la generación de inhibidores de la acetilcolinesterasa<sup>96</sup>, los cuales, si bien no detienen el deterioro cognitivo, reducen moderadamente los síntomas presentados por los pacientes<sup>97</sup>.

## 4.3 Hipótesis de la homeostasis del calcio

Esta hipótesis también surgió en 1992 y plantea que, si bien el iniciador puede ser A $\beta$ , lo que resulta tóxico para las células y desemboca en muerte neuronal es la presencia

de niveles elevados de calcio intracelular. En su trabajo seminal, reportaron que, en cultivos hipocampales fetales, la presencia y cantidad de péptidos A $\beta$  en conjunto con niveles ascendentes de glutamato, aumentaban la muerte neuronal pero no generaban cambios en los astrocitos<sup>98</sup>. En EA, el hipocampo es una de las primeras áreas en mostrar signos de neurodegeneración<sup>99</sup>.

Glutamato es el neurotransmisor excitatorio por excelencia y su actividad está mediada por receptores inotrópicos catiónicos NMDA, AMPA y Kainato o metabotrópicos (mGluRs)<sup>100</sup>. Sumado a este trabajo, se ha observado que el glutamato también es capaz de inducir el ingreso de Ca<sup>2+</sup> en cultivos primarios de neuronas hipocampales de rata y humanas. A su vez, dicho aumento de Ca<sup>2+</sup> produjo la degeneración de un grupo específico de neuronas donde también se observó presencia de marcas propias de los ONF<sup>101</sup>. Además, se ha observado que las neuronas hipocampales que presentan ONF poseen alta expresión de la quinasa dependiente de Calcio/Calmodulina tipo II (CaMKII), una de las enzimas que fosforilan Tau en estados patogénicos<sup>102–104</sup> revisado en<sup>105</sup>.

En resumen, la aparición de placas A $\beta$  potenciaría los efectos neurotóxicos generados por el ingreso de Ca<sup>2+</sup> mediado por glutamato, llevando a un aumento de la actividad de la enzima CaMKII, lo que aceleraría la fosforilación patogénica de Tau y sensibilizaría a las neuronas con alta expresión de esta enzima, volviéndolas más proclives a la muerte.

Esta hipótesis, que también integra los ONF y las placas amiloides ha tenido como resultado la formulación de uno de los fármacos de uso más regular para el manejo de la EA, en conjunto con los inhibidores de acetilcolinesterasa: Memantina.

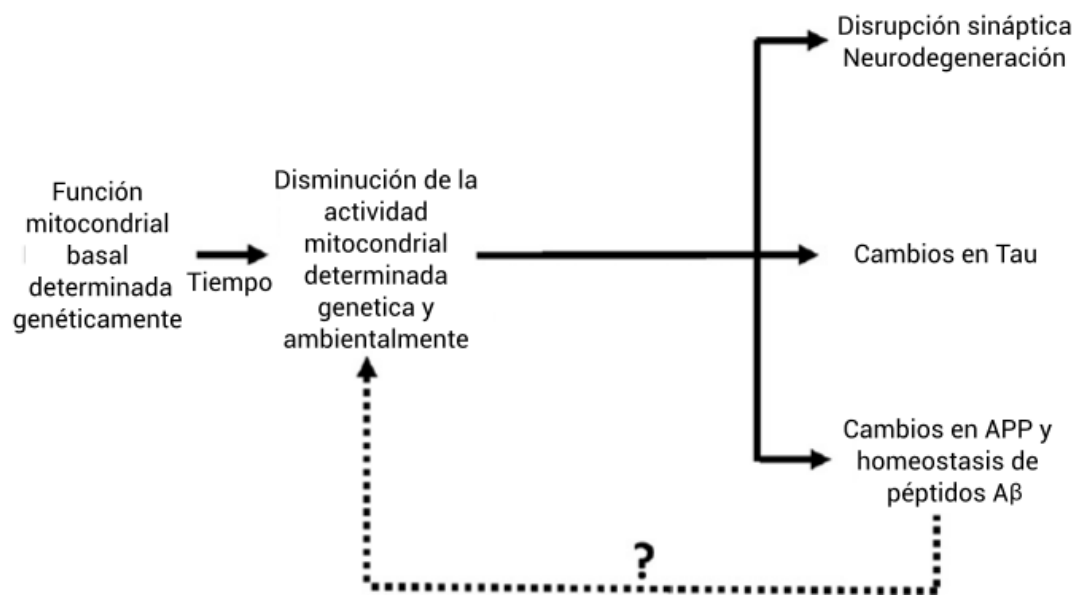
La Memantina es un antagonista no competitivo de baja afinidad de los receptores de NMDA (NMDAR). De esta manera, logra disminuir los efectos de excitotoxicidad observados en pacientes de EA, pero sin bloquear completamente estos receptores, necesarios para funciones como el aprendizaje y la memoria, entre otros. Nuevamente, como ya hemos mencionado anteriormente, si bien este tratamiento apunta a disminuir los síntomas presentados por los pacientes, no logra frenar el avance de la enfermedad<sup>106</sup>.

#### 4.4 Hipótesis de la cascada mitocondrial

Esta hipótesis fue introducida por primera vez en 2004<sup>107</sup>. El modelo propuesto, representado en la Figura 9, consta de tres componentes principales. En primer lugar, la hipótesis de la cascada mitocondrial sostiene que la función mitocondrial basal de un individuo está determinada por la herencia genética (en particular, mitocondrial)<sup>108</sup>. En



segundo lugar, factores heredados, en conjunto con los ambientales determinan la velocidad a la que se desarrollan y manifiestan los cambios mitocondriales asociados con la edad. De esta manera, la disminución de la función o eficiencia mitocondrial impulsarían los fenotipos asociados al envejecimiento. Así se plantea una relación proporcional entre la tasa de envejecimiento cerebral y la actividad mitocondrial. Un aumento en la disminución de la actividad mitocondrial se asociaría con un envejecimiento cerebral más rápido<sup>109–111</sup>. En tercer lugar, la función mitocondrial basal de un individuo y la tasa de cambio funcional influyen en la cronología de la EA<sup>112–116</sup>. Aquellos con una función basal baja y tasas rápidas de disminución mitocondrial, desarrollarían síntomas y cambios histológicos asociados a EA a edades más tempranas que aquellos con una función basal alta y tasas más lentas de disminución mitocondrial revisado en 117.



**Figura 9. Hipótesis de cascada mitocondrial.** De acuerdo con esta hipótesis, cada individuo posee una tasa de actividad mitocondrial basal que va disminuyendo por la interacción de componentes genéticos y ambientales. Si dicha disminución sobrepasa un umbral, desencadenaría los cambios histopatológicos propios de la EA, como las placas amiloides y los ONF. El signo de pregunta cuestiona si estos cambios histopatológicos podrían o no, a su vez, amplificar los cambios mitocondriales empeorando el fenotipo presentado por el paciente. Adaptado de<sup>117</sup>.

En este sentido, se ha observado que neuronas hipocampales y de la corteza de pacientes de EA han presentado una disminución en el número de mitocondrias en conjunto con localización de ADN y proteínas mitocondriales en vacuolas lisosomales asociadas a degradación<sup>118</sup>. También se ha observado un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y una disminución en los mecanismos antioxidantes, lo cual contribuye a un estado de estrés oxidativo<sup>119</sup>. Por último, se han realizado experimentos *in vitro* e *in vivo* que han logrado asociar este estado oxidativo anormal con el procesamiento de APP y la disfunción sináptica presente en EA<sup>120,121</sup>.

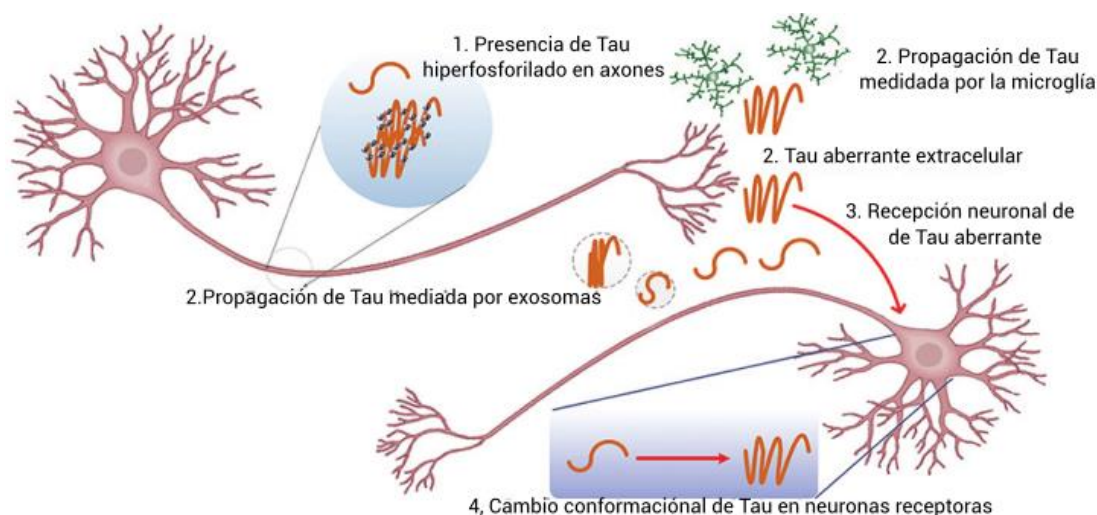
Estos mecanismos parecerían interrelacionarse con las hipótesis anteriores dando cuenta de la complejidad de la EA.

#### 4.5 Hipótesis de la propagación de Tau

La segunda proteína que se observa depositada en los cerebros de pacientes de EA es la forma hiperfosforilada de Tau (p-Tau), en los ONF<sup>122,123</sup>. Se ha visto que, en EA, el número de ONF en la corteza correlaciona positivamente con la severidad del deterioro cognitivo, y que esto no parecería ser igual para las placas amiloides<sup>124,125</sup>.

Tau es una proteína asociada a microtúbulos que permite su polimerización<sup>126,127</sup>. Los microtúbulos son esenciales para el crecimiento y transporte axonal de las neuronas y su hiperfosforilación genera su desacople de los microtúbulos, para luego empezar a agregarse<sup>128,129</sup>.

Un factor en común dentro de las taupatías es que las mismas inician en áreas específicas del cerebro para luego dispersarse a otras áreas. La hipótesis de la propagación de Tau, propuesta en 2009, establece que los agregados de Tau plegados erróneamente se propagan a otras regiones cerebrales como si se tratara de una enfermedad priónica<sup>130</sup>. Esto quiere decir, que los agregados fibrilares hiperfosforilados, viajan dentro y entre neuronas, induciendo la fosforilación de otras proteínas Tau y la despolimerización de microtúbulos, contribuyendo al mal funcionamiento neuronal (Figura 10).



**Figura 10. Hipótesis de la propagación transcelular de Tau.** De acuerdo con esta propuesta, inicialmente la hiperfosforilación de Tau, característica de los ONF, generaría cambios conformacionales en la proteína Tau de una neurona (1). Dichas formas aberrantes de Tau podrían propagarse por medio de exosomas y la microglía (2) y ser recibidas por neuronas no afectadas por endocitosis (3). Esto, induciría el plegamiento incorrecto de las proteínas Tau presentes en la neurona receptora, afectándola y propagando nuevamente las formas aberrantes (4).

Esta hipótesis es compatible con la ya mencionada hipótesis de la cascada amiloide ya que p-Tau parece ser necesaria para la neurotoxicidad mediada por A $\beta$  a

nivel sináptico al presentarse en las dendritas<sup>131</sup>. A su vez, la isoforma *APOE ε4*, asociada a fallas en la remoción de péptido Aβ, también ha sido asociada a un aumento de p-Tau en modelos murinos<sup>132</sup>. También, el agregado de p-Tau y su desacople de los microtúbulos impide el correcto transporte axonal<sup>133</sup>. Por último, se ha asociado la presencia de p-Tau a desregulaciones de los procesos de fisión y fusión mitocondrial, activando vías de respuesta a estrés mitocondrial<sup>134</sup>. Finalmente, APP y Tau parecen colaborar en la homeostasis del hierro<sup>135–137</sup>.

La presentación de esta hipótesis planteó una alternativa a la de la cascada amiloide, lo que desencadenó la generación de diversos medicamentos enfocados en inhibir la formación de Tau y su fosforilación aberrante, inhibidores de quinasas de Tau e inmunoterapias contra Tau <sup>138,139</sup>.

## 5. Células madre humanas: clasificación, obtención y potenciales usos.

Como ya fue establecido, la EA es una patología compleja que sigue sin tener una cura a pesar de haber sido descripta hace más de 100 años. Si bien se han propuesto muchos fármacos con potencialidad para combatirla, la mayoría no ha podido atravesar los ensayos clínicos correspondientes para asegurar su uso en la sociedad o garantizar un cambio sustancial en el desarrollo de la enfermedad<sup>139</sup>.

Una de las dificultades más grandes que se presenta a la hora de estudiar en profundidad esta patología es la dificultad para acceder a muestras representativas de pacientes en diversos estadios de la enfermedad.

En ese sentido, las células madre humanas (CMh), y en especial las células madre pluripotentes inducidas humanas (CMPih), se presentan como una herramienta clave para el estudio de las enfermedades neurológicas.

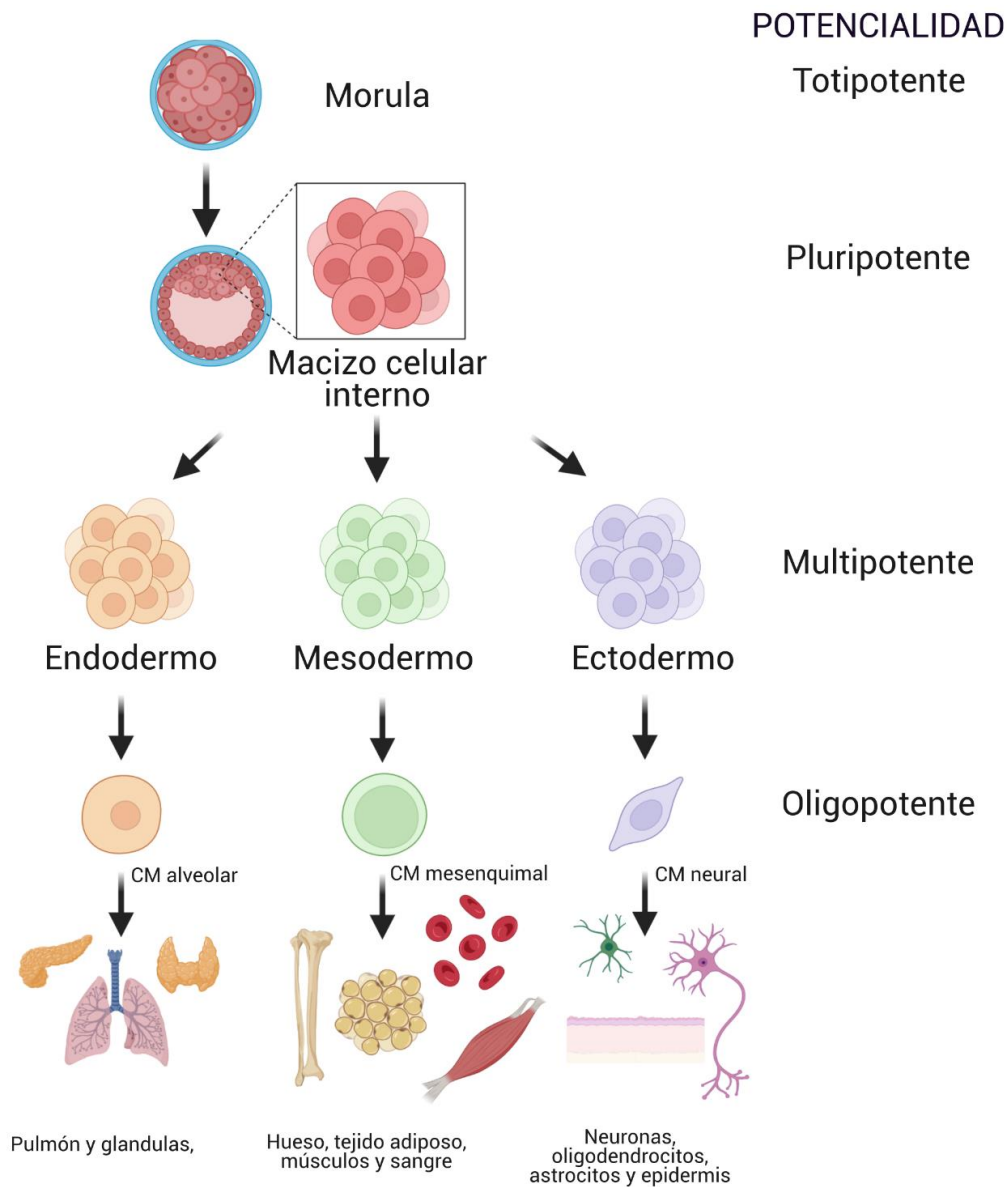
Las CMh están formadas por un grupo particular de células presentes en todos los estados de la vida, que poseen la habilidad de autorrenovarse y de diferenciarse a tipos celulares especializados. A su vez, pueden clasificarse según su capacidad de diferenciarse (totipotentes, pluripotentes, multipotentes, oligopotentes o unipotentes) o su origen (embrionarias, adultas o pluripotentes inducidas) <sup>revisado en 140</sup>.

Las CMh totipotentes tienen la capacidad de diferenciarse a las células que forman un organismo entero. Este es el caso del cigoto y hasta el estado de desarrollo de blastocisto, que está formado por un macizo celular interno [del cual se aíslan las llamadas células madre embrionarias humanas (CMEh)] y el trofoectodermo, el cual da lugar a la placenta<sup>141</sup>.

Las células madre pluripotentes humanas (CMPh), como su nombre lo indica, pueden formar todas las capas germinales, pero no las estructuras extraembrionarias. Dentro de estas se pueden encontrar las CMEh, las cuales se aíslan del macizo celular interno del blastocisto y se cultivan en condiciones que mantengan el estado indiferenciado<sup>142</sup>. A su vez, las CMPih se obtienen gracias a la exposición de células somáticas a factores de transcripción específicos (conocidos como los factores de Yamanaka) que reprograman la maquinaria transcripcional de la célula somática para devolverla a un estadio similar al de las CMEh. Y en particular, sin alteraciones genómicas importantes, un punto importante al considerar su uso para el estudio de enfermedades que pueden tener una carga genética significativa<sup>143</sup>.

Dada la importancia de las CMPih para el presente trabajo, más adelante se presentará una caracterización exhaustiva de las mismas, pero de momento continuaremos con la clasificación de las CMh.

Las células multipotentes presentan un potencial de diferenciación reducido con respecto a las CMPh ya que solo pueden diferenciarse a un grupo específico de linajes celulares. Un ejemplo son las CMh hematopoyéticas, las cuales pueden diferenciarse a los diversos tipos de células sanguíneas, pero no a otros tipos de tejidos. Estas se consideran CMh adultas ya que se encuentran presentes aún en un cuerpo completamente desarrollado. Por su lado, las CMh oligopotentes solo pueden diferenciarse a una cantidad reducida de células, como las CMh neurales y finalmente las unipotentes, solo pueden diferenciarse a un único tipo celular (Figura 11) <sup>revisado en 144</sup>.



**Figura 11. Capacidad de diferenciación de las células madre humanas (CMh).** Antes de la implantación, el cigoto tiene una capacidad totipotente, de generar todas las células necesarias para formar un organismo. El macizo celular interno, tiene capacidad pluripotente, es decir que puede diferenciarse a las tres capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo). Cada una de las capas germinales en sí misma, tiene capacidad multipotente, es decir, solo de generar los tipos celulares asociados a su linaje. Cada una de estas capas germinales puede diferenciarse a su vez a una serie de CM oligopotentes que darán como resultado las células somáticas. Así, el endodermo puede generar el tracto digestivo, células pulmonares y diversos tipos y glándulas. El mesodermo puede generar tejido adiposo, óseo, muscular, cardíaco y sanguíneo. Por último, el ectodermo puede diferenciarse a tejido neuronal y células epiteliales.

La figura 11 no solo ilustra la potencialidad que tienen las CMh de generar todo tipo de tejidos sino también el dilema ético que subyace al uso de CMEh en terapias regenerativas ya que su proceso de generación implica la utilización de embriones humanos<sup>145</sup>. Por su lado, las CMPih son un tipo particular de CMh ya que son generadas a partir de células somáticas (como por ejemplo fibroblastos o eritroblastos de sangre periférica) lo que las vuelve ideal para resolver este problema.

La primera descripción de la obtención de CMPih fue realizada en 2006 por el grupo del investigador japonés Shinya Yamanaka, trabajo por el cual 6 años después recibió el premio Nobel de fisiología y medicina. En este trabajo, demostraron que era posible obtener células madre pluripotentes a partir de la reversión del estado de diferenciación de células somáticas terminalmente diferenciadas (fibroblastos dérmicos de ratón) mediante la sobre-expresión de cuatro factores de transcripción (OCT-4, KLF4, SOX-2 y C-MYC, abreviados como OKSM)<sup>146</sup>. Un año más tarde, el mismo grupo de investigación logró similares resultados partiendo de fibroblastos humanos<sup>147</sup>, lo que generó multiplicidad de trabajos para la optimización de su obtención<sup>148</sup>.

Las CMPih se pueden obtener desde fibroblastos, a partir de una perforación cutánea (también conocido como *punch* de piel) o resección quirúrgica<sup>149</sup>. Pero también se han desarrollado métodos de obtención menos invasivos que parten desde células mononucleares de sangre periférica (del inglés PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*)<sup>150</sup> o de células recolectadas de la orina<sup>151</sup>. Estas fuentes de CMPih, cuya obtención es más sencilla y produce menos dolor, resultan especialmente valiosas en el caso de enfermedades genéticas que muchas veces involucran tomar muestra de niños y/o personas con deterioro cognitivo, como es el caso de EAf.

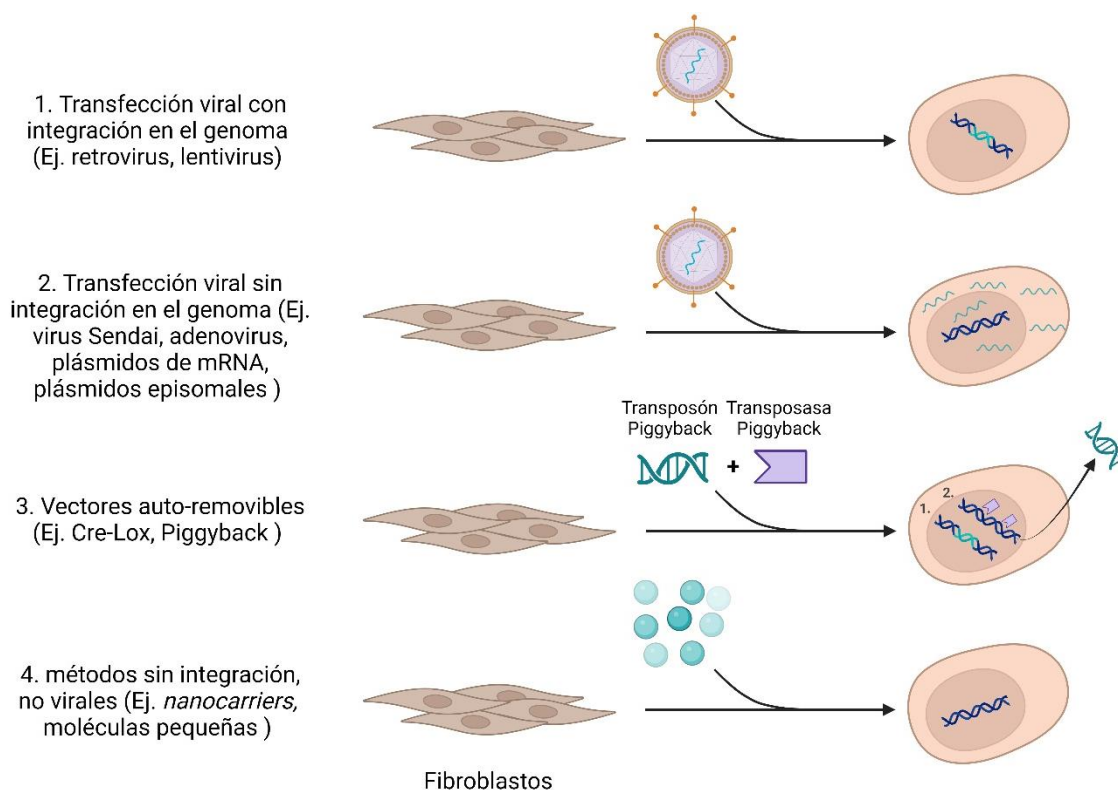
No solo se ha progresado en la fuente de células a reprogramar a CMPih, sino también en los métodos de reprogramación. En la figura 12, se presenta un resumen de los métodos de reprogramación más utilizados <sup>revisados en 148</sup>. En primer lugar, se encuentran los métodos basados en transducciones con vectores virales integrativos, como vectores basados en retrovirus o lentivirus. Estos vectores se integran en el genoma de las células somáticas y codifican para los cuatro factores de reprogramación (OKSM), los cuales al expresarse de forma estable facilitan la conversión a CMPih. Sin embargo, la integración de ADN viral en el genoma de las células somáticas podría implicar la disrupción de genes endógenos. Para solucionar estos problemas, se desarrollaron métodos de reprogramación basados en transducciones con vectores virales no integrativos, que incluyen el uso de adenovirus o el virus Sendai (uno de los más utilizados hoy en día), los cuales permiten la expresión transitoria de OKSM sin generar modificaciones genómicas permanentes.

En tercer lugar, se encuentran los vectores removibles o auto-removibles, los cuales combinan la eficiencia de los vectores integrables con la seguridad de los no integrables. Estos están diseñados para integrarse en el genoma de las células somáticas inicialmente, pero contiene elementos que permiten su remoción posterior gracias a mecanismos como la escisión por la recombinasa Cre (como es el caso del casete de reprogramación STEMCCA, utilizado en esta tesis doctoral) o el sistema transposasa PiggyBac. De esta manera, se retiran los genes exógenos luego de la reprogramación

minimizando el riesgo de inserciones no deseadas mientras se mantiene la expresión estable de los factores de reprogramación.

Por último, se desarrollaron métodos no virales, los cuales apuntan a ser más seguros y simples. Éstos utilizan varios sistemas de ingreso de los OKSM como ser: plásmidos de expresión episomales incorporados mediante nucleofección, ARNm, proteínas recombinantes o la utilización de inhibidores farmacológicos. Aunque estos métodos evitan los riesgos asociados al uso de vectores virales, sobre todo considerando su posterior utilización en humanos, muchas veces poseen muy baja eficiencia de reprogramación en comparación con los otros métodos antes mencionados.

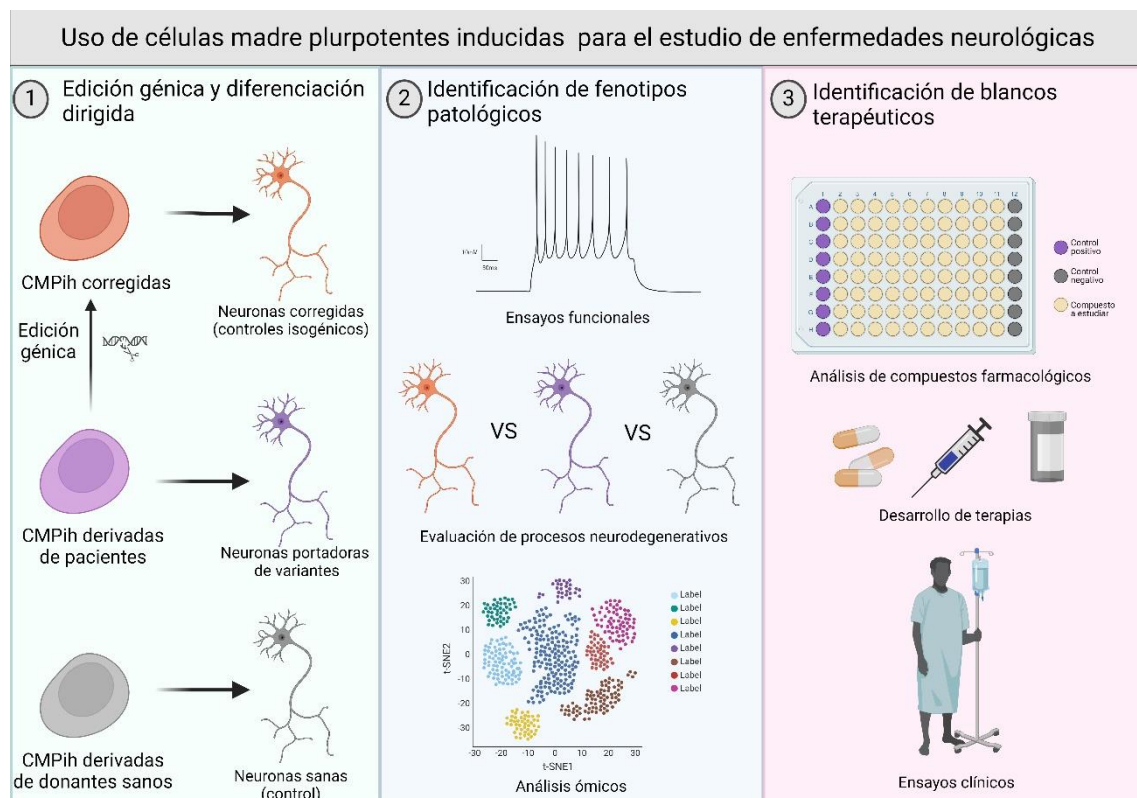
En resumen, los métodos basados en la integración viral son muy eficientes, pero pueden generar modificaciones genómicas mientras que los métodos no integrativos o no virales priorizan la seguridad a costa de por lo general una menor eficiencia de reprogramación. Hoy en día se siguen desarrollando estudios y protocolos nuevos que permiten mejorar la eficiencia, seguridad y escalado en la generación de CMPih para su aplicación en medicina regenerativa y modelado de enfermedades.



**Figura 12. Métodos de reprogramación.** Los cuatro métodos clave para incorporar a los factores de reprogramación OKSM a las células somáticas. Los sistemas virales integrativos (1) fueron los primeros en utilizarse para administrar factores de transcripción para obtener CMPih, pero tienen la desventaja de incorporar su material genético y contribuir a la formación de teratomas. Al evitar la integración, los métodos novedosos (vectores no integrativos, vectores auto-escindibles y vectores no virales no integrativos) (2, 3 y 4) representan mejoras iterativas con respecto a esta metodología inicial. Estos enfoques proporcionan avances significativos en la seguridad y eficacia de las CMPih, que luego pueden trasladarse a aplicaciones científicas y clínicas posteriores. Adaptado de <sup>148</sup>



Las CMPih no solo resuelven el conflicto ético del uso de embriones para su generación, sino que, al ser capaces de ser generadas a partir de células somáticas de los mismos pacientes, permiten la creación de modelos *in vitro* personalizados (lo que abre otro dilema ético acerca de la disponibilidad de estas técnicas para toda la población), que consideran las variaciones genéticas pertenecientes al paciente. Además, al autorreplicarse y ser pluripotentes, permiten la diferenciación de CMPih a tipos celulares específicos, como neuronas<sup>152</sup>, astrocitos<sup>153</sup> o microglia<sup>154</sup>, lo que permite recapitular las condiciones de una enfermedad en condiciones controladas. Asimismo, estos modelos pueden ser utilizados para probar la eficiencia y seguridad de compuestos terapéuticos en un contexto celular relevante, complementando los modelos animales. Por último, estas células pueden ser manipuladas genéticamente<sup>155</sup>, lo que las vuelve un modelo excelente para el estudio de enfermedades determinadas genéticamente, como así también abre la puerta a terapias génicas regenerativas basadas en CMPih (Figura 13).



**Figura 13. Uso de células madre pluripotentes inducidas humanas (CMPih) derivadas de pacientes para estudios neurológicos.** 1. Las CMPih son derivadas de pacientes y donantes sanos por alguno de los métodos de reprogramación celular explicados anteriormente. Además, utilizando técnicas de edición génica dirigida, es posible corregir mutaciones asociadas a una determinada enfermedad, de modo de generar líneas isogénicas *wild-type* (WT). Las CMPih son diferenciadas a tipos neurales relevantes para el estudio de la patología (neuronas, glía, etc.). 2. Las neuronas diferenciadas a partir de CMPih de son utilizadas para el estudio de fenotipos asociados a la patología a través de ensayos morfológicos, funcionales y moleculares. 3. Una vez encontrados fenotipos patológicos, las neuronas diferenciadas de CMPih de pacientes pueden ser utilizadas para hacer testeo de drogas y desarrollo de tratamientos. Modificado de <sup>156</sup>



A pesar de sus ventajas y potenciales usos, resulta imperioso mencionar, que se trata de tecnologías aún en desarrollo, que siguen en constante proceso de optimización, que no recapitulan a un organismo en su totalidad y que deben superar estrictos controles de calidad para ser utilizadas en humanos<sup>157</sup>. Hasta el momento, el caso más extendido de ensayos clínicos en humanos para el tratamiento de enfermedades neurológicas consiste en el trasplante de neuronas dopaminérgicas derivadas de CMPih para el tratamiento de Enfermedad de Parkinson<sup>158,159</sup>.

## 6. Modelos de diferenciación neural

La aparición de las técnicas para la obtención de CMEh y CMPih abrieron la posibilidad de generar terapias de reemplazo para la mayoría de los tejidos. En el área de enfermedades neurológicas las CMPih derivadas de pacientes han facilitado su comprensión, sirviendo como una plataforma ideal para el estudio de mecanismos moleculares del desarrollo de las patologías como así también para probar enfoques terapéuticos<sup>160–162</sup>.

Hasta la fecha, se han publicado múltiples protocolos para diferenciar CMPh en subpoblaciones celulares neurales específicas, incluyendo neuronas corticales, motoras, dopaminérgicas, GABAérgicas, colinérgicas y serotoninérgicas<sup>163–171</sup>. Además, se han establecido protocolos de diferenciación para células microgliales, astrocitos<sup>172–174</sup> y oligodendrocitos<sup>175–177</sup>.

Estos protocolos reproducen en 2 dimensiones (2D) algunos de los procesos observados durante el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) y recapitulan las poblaciones neurales presentes en el embrión humano. Si bien es posible realizar co-cultivos de los diversos tipos celulares para generar modelos más complejos<sup>178</sup>, los mismos no son capaces de recapitular un tejido completo.

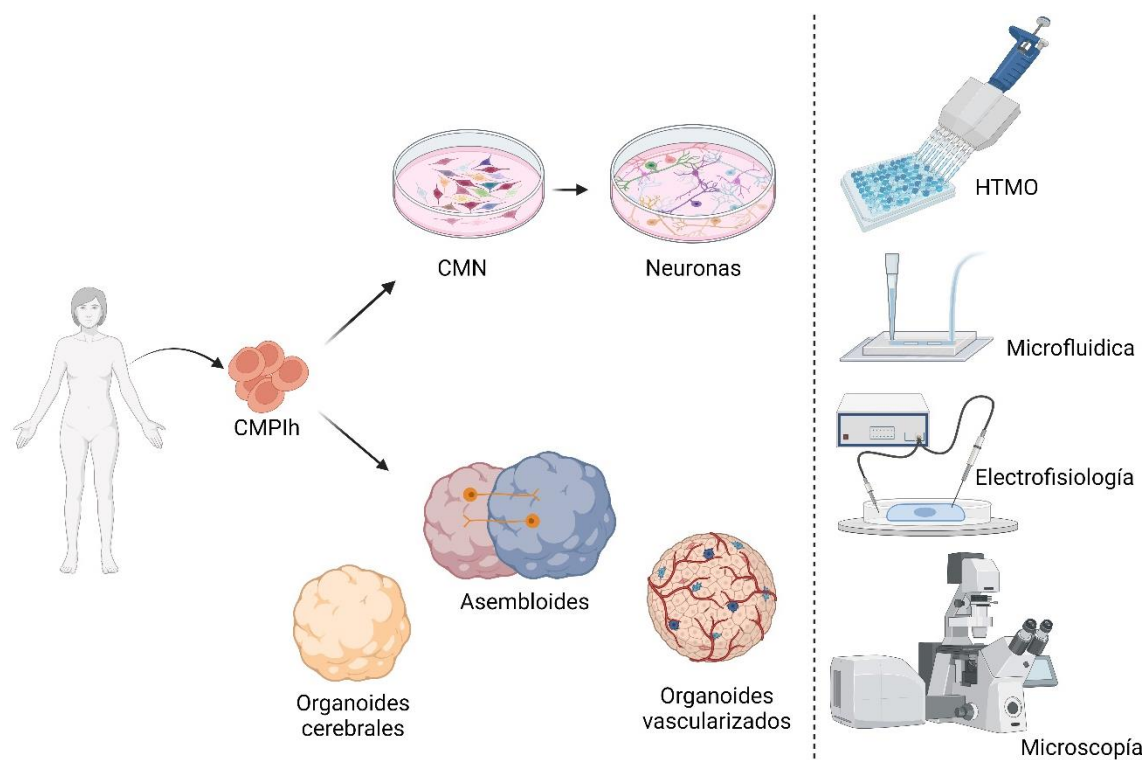
En ese sentido, la aparición de cultivos neurales en 3 dimensiones (3D), comúnmente llamados “organoides cerebrales” (OCs), permiten recapitular algunos aspectos generales del desarrollo tardío de un cerebro humano como la diversidad celular y la organización espacial de las células.

Utilizando las capacidades intrínsecas de las CMPih en conjunto con pulsos controlados de estímulos externos, que imitan los gradientes de morfógenos presentes en el embrión y el agregado de sustancias como el matrigel que permiten emular la matriz extracelular, es posible generar tanto OCs heterogéneos como así también dirigirlos para modelar regiones encefálicas específicas como corteza, hipocampo, tálamo, hipotálamo y cerebelo entre otras<sup>179–186</sup>.

Estos modelos generan OCs de linaje más bien embrionario, pero es posible mantenerlos en cultivo por varios meses, dando como resultado organoides que se asemejan un poco más a un cerebro humano<sup>180,187,188</sup>. Si bien esto es una ventaja al momento de modelar enfermedades que requieren un OC más maduro, todavía se están desarrollando técnicas que permitan perfundir los mismos para mantener niveles de oxígeno, nutrientes y factores de señalización a lo largo de todo el OC<sup>189–191</sup>. A su vez, recientemente se han generado protocolos para generar organoides de linaje mixto como así también protocolos para ensamblar organoides de linaje específico entre sí (también conocidos como “asembloides”)<sup>192</sup> lo que permite estudiar conectividad entre regiones.

Un tipo especial de modelado lo constituyen los llamados órganos en chip. Estos están formados por un dispositivo de cultivo celular que contiene micro canales capaces de ser perfundidos en continuo, donde habitan células. Son capaces de recapitular aspectos clave de tejidos u órganos al controlar el flujo de perfusión, el medio y los factores que irrigan las células y las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular <sup>revisado en189</sup>.

El avance en los protocolos de diferenciación en 2D y 3D, sumado a las técnicas de edición génica dirigida, constituyen herramientas clave para el análisis de estos modelos en contextos fisiológicos normales y patológicos (Figura 14).



**Figura 14. Aplicaciones de los modelos neurales derivados de CMPIh para el estudio de enfermedades neurológicas.** Las CMPIh pueden diferenciarse en cultivos *in vitro* en 2D (arriba) y 3D (abajo), los cuales pueden usarse para realizar múltiples ensayos. En el contexto de enfermedades neurológicas, se pueden utilizar técnicas multiómicas de alto rendimiento (HTMO, del inglés *high-throughput multi-omics*), ensayos electrofisiológicos, estudiar vulnerabilidad neuronal selectiva, análisis de

imágenes de microscopía y evaluación de fármacos, entre otros. Las CMPih se obtienen a partir de la reprogramación de células somáticas y pueden derivarse, siguiendo los protocolos adecuados, a las diversas células que conforman el SNC, como son microglía, astrocitos, neuronas post-mitóticas y oligodendrocitos. Estas, pueden ser utilizadas por separado o para realizar co-cultivos, estableciendo cantidades definidas de cada subtipo celular. A su vez, las CMPih pueden desarrollar modelos de organoides cerebrales complejos y no guiados o diferencialmente definidos que puedan ensamblarse entre sí (asembloides) y por último, los avances en microfluídica han permitido la generación de organoides en chip.

Los protocolos de diferenciación de CMPih a linajes específicos, ya sea en 2D o 3D, se desprenden de años de estudio del proceso natural de neurogénesis embrionaria. Este proceso inicia luego de la gastrulación, un proceso embrionario que consiste en la migración específica y controlada de células de la blástula y termina en la formación de las tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo. La regulación de este proceso está bajo la influencia de los factores BMP, WNT y Activina A/Nodal y sus inhibidores secretados por los tejidos circundantes. Estas interacciones también son influenciadas por señales mecánicas y la estructura física del tejido<sup>193</sup>.

Luego de este proceso ocurre lo que se conoce como neurulación (Figura 15 A), gracias al cual se termina formando el tubo neural que va a dar lugar a la formación del sistema nervioso (SN). Brevemente, ciertas regiones del ectodermo continúan diferenciándose para formar la placa neural y sus bordes, los cuales posteriormente se conocen como crestas neurales. En el tercer mes de gestación se observa el plegado de la placa neural hacia el interior del embrión, gracias al acercamiento de las crestas neurales entre sí hasta que se unen y terminan formando un tubo hueco: el tubo neural el cual se va cerrando progresivamente a lo largo de todo el organismo y va a dar lugar al sistema nervioso central (SNC). Asimismo, las células de la cresta neural se desprenden de ectodermo. Estas van a dar lugar a los ganglios y células neurales del sistema nervioso periférico (SNP)<sup>194</sup>.

A medida que el desarrollo progresa se comienza a observar la determinación de las diversas divisiones del encéfalo (el prosencéfalo -el cual luego se subdivide en telencéfalo y diencefalo-, el mesencéfalo y el rombencéfalo) y la médula espinal gracias a una serie de gradientes mediados por proteínas tales como *bone morphogenetic proteins* (BMP)- *sonic hedgehog* (SHH) y factores de la vía de WNT-Noggin que establecen los ejes dorsal-ventral y rostral-caudal, respectivamente <sup>revisado en 195</sup> (Figura 15 B). En particular, la corteza cerebral se deriva principalmente de la parte dorsal del telencéfalo.

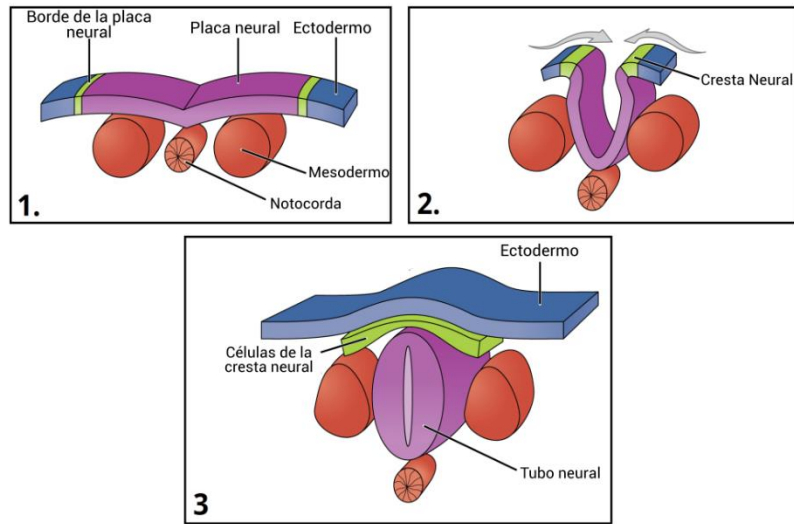
No es el punto de esta tesis discutir en profundidad el desarrollo y maduración de la corteza cerebral, zona muy afectada en la EA, ni de los nichos de neurogénesis presente en el cerebro adulto, pero, dada la naturaleza de los modelos en 2D y 3D que estaremos utilizando más adelante, resulta pertinente explicarlo, aunque sea brevemente.

Como se ha mencionado previamente, el tubo neural se origina a partir del neuroectodermo. Antes del inicio de la neurogénesis, definida como el proceso de

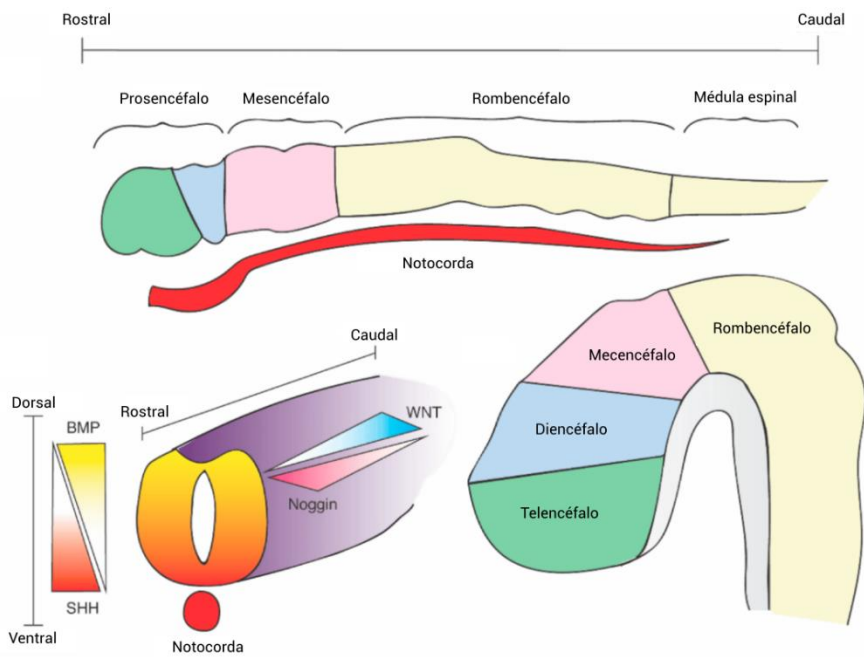
generación y maduración de neuronas desde el desarrollo prenatal hasta la adultez, el neuroepitelio está compuesto por células madre neuroepiteliales (CMNE). Estas células atraviesan divisiones simétricas que expanden la superficie del neuroepitelio y dan lugar a las células gliales radiales ventriculares (GRv), cuyos cuerpos celulares se localizan en la zona ventricular (ZV). En estas etapas tempranas, diversos gradientes de morfógenos, incluyendo el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) expresado por la cresta neural anterior, así como las señalizaciones de Wnt y BMP, entre otros, inducen la expresión de factores de transcripción en el neuroepitelio y las células GR. Estos factores, a su vez, regulan la expresión de factores de transcripción que ejecutan programas de diferenciación neuronal específicos de la región y controlan el destino celular de las neuronas nacidas en distintas regiones cerebrales. Mientras las células GRv proliferan para autorrenovarse también dan origen a otras células progenitoras, como las células gliales radiales externas (GRe, también conocidas en la literatura como glía radial basal) y las células progenitoras intermedias (CPI). Las células GRe externas y las CPI eventualmente forman la zona subventricular (SVZ). Estos subtipos celulares cambian su competencia temporal durante la corticogénesis y dan origen secuencialmente a diferentes neuronas y células gliales mediante divisiones asimétricas y migración neuronal. Las GRe primero producen neuronas de capa profunda (capa VI/V) y posteriormente neuronas de capa superficial (capa IV/III/II) principalmente a través de CPI. En etapas posteriores, las GR hacen la transición de la neurogénesis a la gliogénesis y dan origen a astrocitos, oligodendrocitos, interneuronas del bulbo olfatorio y células ependimarias. En la etapa postnatal, la mayoría de las GR están diferenciadas, y algunas de ellas permanecen como células madre neurales adultas (Figura 15 C)<sup>196</sup>.

Tanto los progenitores neurales como las neuronas pueden ser distinguidas entre sí por la presencia de ciertos marcadores. Los progenitores presentan marcadores como PAX6 y TBR2<sup>197</sup>. Por su parte, las neuronas de proyección que han sido descritas como neuronas excitatorias corticales se han clasificado en 3 grandes grupos: Las neuronas corticotalámicas, las cuales se encuentran en la capa VI y expresan el factor de transcripción TBR1, neuronas del tracto piramidal, las cuales poseen su soma en la capa V y expresan los factores de transcripción FEZF2 y BCL11B (también conocido como Ctip2)<sup>198</sup>. Y las neuronas intraencefálicas, que proyectan a diferentes áreas dentro del prosencéfalo, las cuales se localizan en las capas II–VI y se caracterizan por la expresión del marcador SATB2<sup>199</sup>.

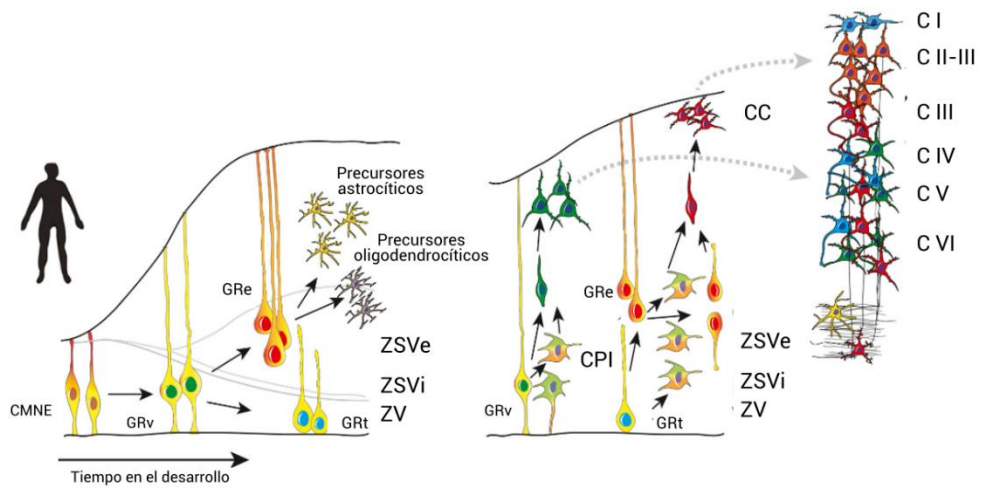
A



B



C



**Figura 15. A proceso de neurulación.** 1. La diferenciación de una región del ectodermo da origen a la placa neural y sus bordes. 2. El plegado de la placa neural hacia el interior del embrión ocurre gracias al acercamiento de las crestas neurales entre sí hasta fusionarse y formar un tubo hueco: el tubo neural. 3. Este tubo se cierra gradualmente a lo largo del cuerpo y eventualmente da lugar al SNC. Simultáneamente, las células de la cresta neural se desprenden del ectodermo, originando el SNP. **B. Esquema de la formación del tubo neural y establecimiento de la identidad de regiones del cerebro.** La liberación espacial y temporalmente definida de los factores SHH, BMP, WNT y Noggin establecen los ejes dorsoventral y rostrocaudal, respectivamente del tubo neural y definen las regiones del SNC y el cerebro embrionario. **C. Representación esquemática del desarrollo cortical.** Se muestran tres poblaciones diferentes de progenitores (células madre neuroepiteliales (CMNE), células gliales radiales (GRv y GRe) y células progenitoras intermedias (CPI)) y neuronas (tanto de capas profundas (verdes) como externas (rojas)). Los progenitores que residen dentro de la ZV llevan a cabo divisiones de auto-renovación para generar nuevos progenitores GRv así como divisiones para generar otros progenitores (GRe y CPI). A medida que avanza la corticogénesis, los progenitores inicialmente expanden su población, luego se desplazan hacia la producción de neuronas y progenitores intermedios. Los progenitores intermedios dentro de la ZSV también generan neuronas. Las neuronas migran a través de la ZVE hacia la CC para formar las capas de la corteza cerebral. CC, capas corticales; ZSV, zona subventricular; ZVE, zona ventricular externa, ZVI, zona ventricular interna. Adaptado de <sup>195,196</sup>

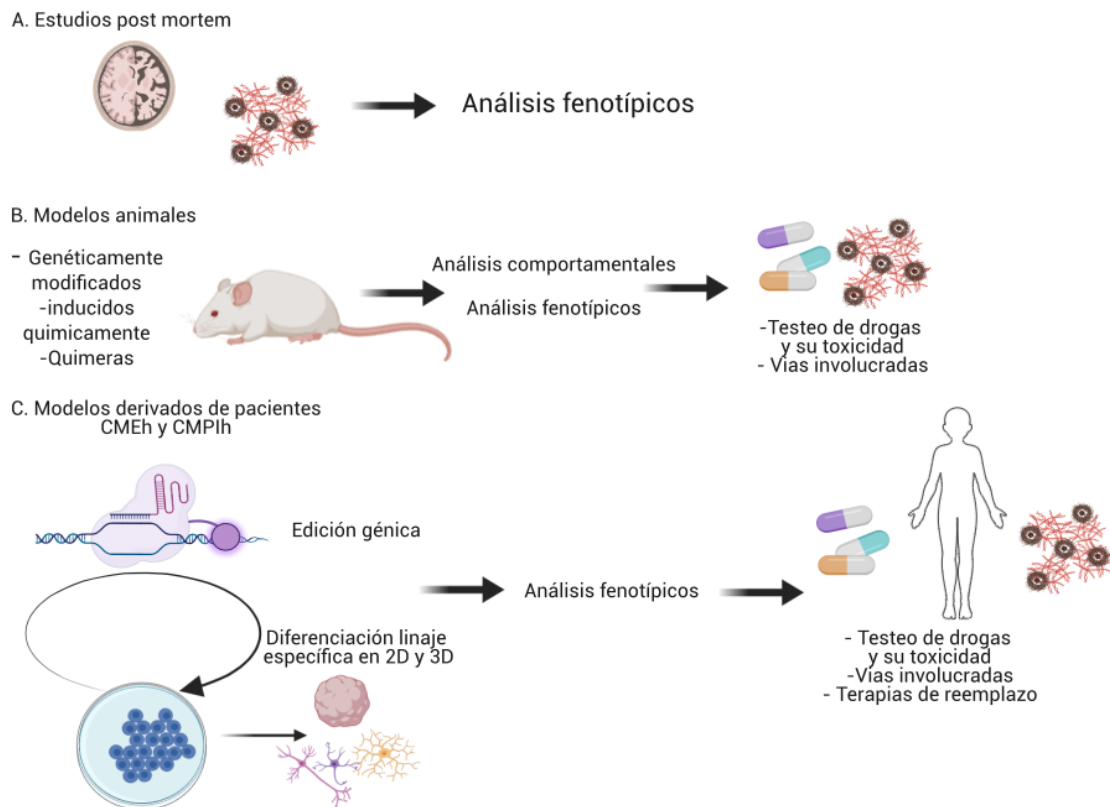
En resumen, los modelos neurales derivados de CMPih de pacientes representan modelos *in vitro* únicos para el estudio de enfermedades neurológicas. En primera instancia, constituyen una fuente inagotable de células obtenidas de pacientes, las cuales conservan el perfil genético del donante y posibilitan la investigación de los mecanismos relacionados con la enfermedad. A su vez, proporcionan un modelo humano para poner a prueba tratamientos innovadores, con el potencial de agilizar la implementación de enfoques terapéuticos novedosos al complementar los modelos ya existentes. Por último, representan una fuente renovable de células para estrategias de reemplazo celular en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos.

## 7. Modelos de enfermedad de Alzheimer.

Los primeros capítulos de esta introducción intentan explicar en parte la complejidad de esta patología y por qué la misma representa un desafío significativo para la salud pública en la actualidad. En el 5to y 6to capítulo, introducimos el concepto de CMPih y cómo estas son capaces de ser diferenciadas a linaje neural, volviéndolas una herramienta potente en el contexto de la medicina traslacional. En este último capítulo haremos un breve abordaje de los diversos modelos de estudio de la EA existentes hasta la fecha.

La figura 16 ilustra un resumen de estos modelos. El primer modelo, que permitió la descripción histopatológica de la enfermedad y que aún hoy en día sigue siendo vital

para realizar comparaciones con el resto de los modelos es el del tejido *post-mortem* de pacientes con EA. Las limitantes de este modelo a grandes rasgos son: que son finitos y escasos, que solamente muestran la faceta final de la enfermedad (y puede estar afectada por otras comorbilidades) y que no permiten realizar ensayos farmacológicos que puedan representar cambios en un fenotipo. Por eso, en los últimos años, se trabajó extensamente en la generación de diversos nuevos modelos de EA.



**Figura 16. Modelos de estudio de Enfermedad de Alzheimer.** **A.** Estudios de cortes histológicos de pacientes afectados con EA como donantes no afectados. Permiten realizar estudios de ciertos aspectos celulares y moleculares de la patología. **B.** Modelos animales (vertebrados e invertebrados). Gracias al avance de técnicas de imágenes, edición génica, test comportamentales y farmacológicos, permiten no solo describir vías metabólicas involucradas sino también probar tratamientos. **C.** Modelos humanos, derivados de CMPIh y CMEh.

## 7.1 Modelos animales

Existen modelos en *Drosophila Melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, rata, perro y primates no humanos, los cuales han servido para evaluar diversos aspectos de la EA <sup>revisado en200</sup>. Sin embargo, dentro de los modelos animales, los ratones han sido la piedra angular del estudio de la EA gracias a la cantidad de herramientas de manipulación génica disponibles y período de vida corto; como así también su cercanía y similitud evolutiva con los humanos<sup>201</sup>. A su vez, poseen análogos de la mayoría de las

regiones encefálicas como así también los sistemas de neurotransmisores humanos lo que permite estudiar la función neuronal y los circuitos involucrados y realizarles ensayos comportamentales que permitan estudiar su cognición.

La mayoría de estos modelos se basan en la sobre expresión de proteínas humanas portadores de mutaciones asociadas a EAf como es el caso del ratón 5xFAD el cual expresa APP con 3 mutaciones, Florida (I716V), London (V717I) y Swedish (K670N/M671L) bajo la regulación del promotor Thy1, en conjunto con 2 mutaciones en el gen de PSEN1 (L286V y M146L)<sup>202</sup>. De acuerdo con la base de datos de Alzhforum, hasta el momento existen 204 modelos de EA en ratones (<https://www.alzforum.org/research-models/alzheimers-disease>), donde la mayoría de ellos se basan en generar mutaciones sobre genes asociados a EA, ya sea para modelar EAf o EAe. Estos modelos, al estar basados en mutaciones en distintos genes en paralelo o de a uno, han permitido diseccionar el aporte de las distintas proteínas involucradas contribuyendo a generar y sostener las teorías presentadas en el capítulo 4. Estos modelos, capaces de recapitular el depósito de placas amiloides y la fosforilación y propagación de acúmulos de Tau, también son capaces de imitar otros fenotipos patológicos como son la disfunción sináptica, neurodegeneración y alteraciones en las células gliales, entre otros <sup>revisado en 203</sup>.

De todas formas y como sucede con todos los modelos de estudio, es necesario destacar las limitaciones que tienen los modelos basados en animales. Si bien los ratones resultan ser más similares evolutivamente a los humanos que la mayoría de los otros sistemas genéticos, los procesos celulares y las vías de señalización como así también los niveles de expresión de proteínas relevantes a la patología son diferentes de los encontrados en los humanos y muchas veces el fenotipo obtenido es dependiente del constructo genético utilizado<sup>204,205</sup>. Esto no quita que los modelos animales siguen siendo extremadamente útiles y necesarios para tratar de entender una enfermedad tan compleja como es la EA, en particular por su capacidad de recapitular el deterioro cognitivo, pero por otro lado es necesario ser conscientes de las limitaciones existentes.

Siguiendo con esta idea, los modelos de CMPih derivados de pacientes superan la barrera de la especie, pero no es posible realizar ensayos cognitivos, con lo cual es ideal utilizar en conjunto los diversos modelos existentes con el fin obtener resultados prometedores.

## 7.2 Modelos de células madre humanas

Como se mencionó en el capítulo anterior, los avances en el desarrollo de modelos neurales partiendo de CMPih sigue en constante crecimiento y ha logrado la generación



de modelos en 2D y 3D. El modelado de enfermedades utilizando CMPih comienza con la derivación de estas desde células somáticas portadoras de mutaciones causales de la enfermedad (o factores de riesgo como es el caso de la EAe) para luego diferenciarlas a los tipos celulares correspondientes.

En el contexto de EA se ha observado que las neuronas derivadas de CMPih de pacientes de EAe y EAf generalmente exhiben fenotipos asociados a la EA como un aumento en la producción de A $\beta$ , hiperfosforilación de Tau o cambios electrofisiológicos y activación de quinasas asociadas a EA<sup>206,207</sup>. Más aún, gracias al desarrollo de diversos protocolos de diferenciación se han logrado estudiar procesos involucrados en el desarrollo de la EAf y EAe no solo en el contexto neuronal sino también en el contexto de otros tipos celulares (Tabla 1).

| Mutación                                   | Tipos celulares analizados            | Fenotipos observados en cultivo  |
|--|---------------------------------------|--|
| <b>Alzheimer de tipo familiar</b>          |                                       |  |
| <i>PSEN1</i> (A246E), <i>PSEN2</i> (N141I) | Neuronas                              | Incremento en la secreción de A $\beta_{42}$   |
| <i>PSEN1</i> (A79V), <i>APP</i> (K724N)    | Neuronas                              | Incremento en la relación A $\beta_{42/40}$  |
| <i>PSEN1</i> ( $\Delta$ E9)                | Neuronas                              | Incremento en la relación A $\beta_{42/40}$ , reducción de la actividad de $\gamma$ -secretasa   |
| <i>PSEN1</i>                               | Neuronas                              | Incremento en la secreción de A $\beta_{42}$ , función autofágica dañada   |
| <i>PSEN1</i> (A246E, H163R o M146L)        | Neuronas                              | Incremento en la relación A $\beta_{42/40}$  |
| <i>PSEN1</i> (A246E)                       | Neuronas                              | Incremento en la relación A $\beta_{42/40}$ , expresión aumentada de <i>FOXG1</i> , <i>mGLUR1</i> y <i>SYT1</i>  |
| <i>APP</i> (V717I)                         | Neuronas prosencefálicas              | Incremento en la relación A $\beta_{42/40}$ , localización subcelular de APP modificada, niveles totales de Tau total y p-Tau  |
| <i>APP</i> (V717I)                         | Neuronas y glía                       | Aumento en A $\beta$ y APP $\alpha$ secretados por ambos tipos celulares   |
| <b>Alzheimer de tipo esporádico</b>        |                                       |  |
| desconocida                                | Neuronas                              | Interacción proteica observada entre APP y GSK3 $\beta$  |
| Variantes de <i>SOR1</i>                   | Neuronas                              | Expresión de <i>SOR1</i> y producción de péptido A $\beta$ alteradas   |
| <i>APOE</i> ( $\epsilon$ 3/ $\epsilon$ 4)  | Neuronas prosencefálicas colinérgicas | Incremento en la relación A $\beta_{42/40}$ , vulnerabilidad a la muerte mediada por glutamato, incremento de Ca <sup>2+</sup> intracelular tras la exposición a glutamato |

**Tabla 1 Modelado de la EA utilizando CMPih derivadas de pacientes.** Extraído de<sup>208</sup>

Una barrera del modelado de tipos celulares individuales en 2D es que, como se ha expuesto anteriormente, muchos tipos celulares están involucrados en la progresión de la EA. Por ello, la obtención de modelos neurales en 3D ha permitido un abordaje más integral de los mismos. Con los años, se han desarrollado múltiples protocolos tanto a corteza como a otros linajes celulares y qué además sean capaces de integrar otros tipos celulares derivados de las CMPih de pacientes. Además, los modelos neurales en 3D han

permitido observar los acúmulos de placas A $\beta$  amiloide y los ONF, algo que no se logra observar directamente en los modelos en 2D<sup>209-211</sup>.

Desde la obtención de las CMPih en 2007 ha explotado el campo de generación de protocolos de diferenciación a diversos tipos celulares en 2D y 3D que permiten el estudio de enfermedades tan complejas como la EA. Dada la extensión de esta tesis, no voy a realizar un repaso exhaustivo por los mismos, pero, de estar interesados dejo a disposición los siguientes artículos de revisión de interés<sup>212,213</sup>.

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## Hipótesis del trabajo

Nuestra hipótesis de trabajo es que la variante novedosa en *PSEN1* p.T119I está implicada en la patogénesis de la Enfermedad de Alzheimer de comienzo temprano.

## Objetivos generales y específicos

El objetivo general de esta tesis fue generar modelos de neurodegeneración en dos y tres dimensiones para el estudio de la EA utilizando células madre pluripotentes inducidas humanas (CMPih) derivadas de fibroblastos dérmicos de un paciente masculino portador de la mutación *PSEN1* T119I. Dicho paciente pertenece a una familia en la que se demostró herencia autosómica dominante de EA de comienzo temprano. La generación de estas CMPih y su posterior diferenciación constituye un modelo experimental valioso que permitió aportar datos sobre la patogenicidad de esta variante. Asimismo, estas células permitirán ser utilizadas en ensayos pre-clínicos de potenciales fármacos terapéuticos.

A partir de este objetivo general se desprenden los siguientes objetivos específicos:

**Objetivo específico 1:** Evaluar la producción de los péptidos amiloide-beta  $A\beta_{40}$  y  $A\beta_{42}$  a partir del procesamiento proteolítico de la proteína precursora de *amiloide* (APP), mediante inmunoensayos de tipo ELISA sobre los sobrenadantes y extractos proteicos de precipitados celulares, en ensayos de sobreexpresión de *APP* y *PSEN1* WT y las variantes *PSEN1* T119I y *PSEN1* A246E en células HEK293T *PSEN1* knock-out.

**Objetivo específico 2:** Generar y validar una línea de CMPih a partir de fibroblastos dérmicos humanos obtenidos de un paciente portador de la mutación c.356C>T en el exón 5 (T119I) del gen de *PSEN1*.

**Objetivo específico 3:** Establecer y validar modelos experimentales *in vitro* de diferenciación neural en dos y tres dimensiones a partir de CMPih.

**Objetivo específico 4:** Estudiar la presencia de marcadores de neurodegeneración característicos de la EA (producción de  $A\beta_{40}$ ,  $A\beta_{42}$  y P-Tau en sobrenadantes y extractos proteicos de precipitados celulares y detección de placas  $A\beta$

amiloides y ovillos neurofibrilares) en los modelos neuronales establecidos y comparar con líneas de CMPih control y derivada de un paciente portador de la mutación patogénica *PSEN1* A246E.

**Objetivo específico 5:** Identificar ARNm expresados diferencialmente en neuronas corticales derivadas de la línea de CMPih *PSEN1* T119I con respecto a aquellas derivadas de CMPih *PSEN1* WT mediante secuenciación masiva de ARNm.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Células utilizadas

En el presente trabajo se utilizaron cultivos primarios de fibroblastos dérmicos humanos (FDh) portadores de la variante en heterocigosis *PSEN1* p.T119I [Chr14:73640291 C>T (GRCh37/hg19)], a partir de los cuales se reprogramaron CMPih; fibroblastos embrionarios de ratón (MEF, de sus siglas en inglés) que sirvieron como soporte de las CMPih en los estadios más tempranos de su generación y células embrionarias de riñón humano que contienen el antígeno-T del Papovirus SV (HEK293T, de sus siglas en inglés), las cuales se utilizaron como empaquetadoras de partículas lentivirales como así también como modelos de expresión proteica transitoria.

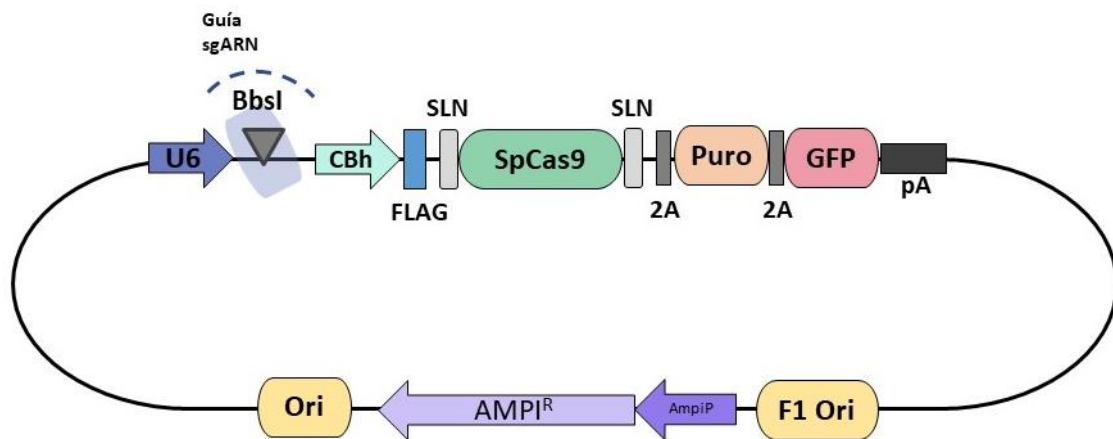
A su vez, se utilizaron las líneas de CMPih UOWi002-A, OUWio03-A (generosa donación de la Dra. Lezanne Ooi de la Universidad de Wollongong, Australia)<sup>214</sup> y la línea FLENI001-A<sup>149</sup>.

La línea OUWio03-A fue reprogramada a partir de FDh de un paciente con EAF portador de una variante en heterocigosis en *PSEN1* p.A246E [Chr14:73659540 C>A (GRCh37/hg19)]. La línea UOWi002-A fue reprogramada a partir de FDh de un pariente cercano no afectado por la EA y no portador de la variante<sup>214</sup>.

La línea FLENI001-A, portadora de la mutación en heterocigosis p.T119I en el gen de *PSEN1* fue generada como parte de este trabajo doctoral tal y como se describe en los siguientes apartados.

## Diseño de guías - CRISPR/Cas9

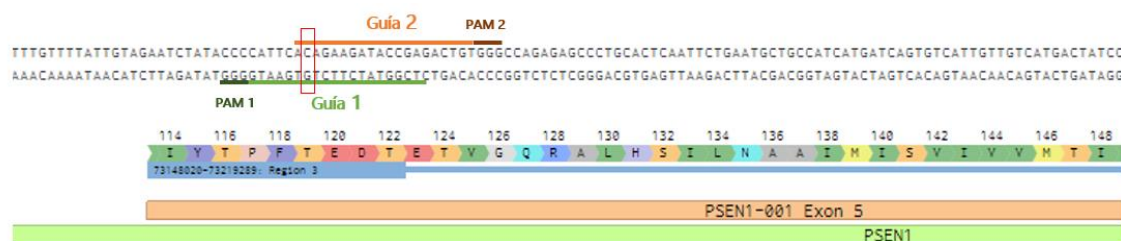
Para la obtención de células HEK293T editadas genéticamente se realizó el diseño de guías de ARN (gARN) que fueron clonados en el plásmido pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0<sup>215</sup>, el cual se modificó para insertarle la secuencia del gen *GFP* (del inglés, *Green Fluorescent Protein*) como segundo método de selección de células transfectadas, al cual llamaremos pSpCas9(BB)-2A-Puro-2A-GFP (Figura 17)<sup>216</sup>.



**Figura 17. Esquema del plásmido CRISPR/Cas9-Puro-GFP.** El plásmido pSpCas9(BB)-2A-Puro-2A-GFP se encuentra integrado por una secuencia de replicación bacteriana y eucariota (Ori. Amarillo) como así también por un casete de selección en bacterias de resistencia a ampicilina (AMPI. Violeta). A su vez, presenta una secuencia promotora U6 (Azul) que permite la expresión de la secuencia guía de la Cas9 hacia el sitio de corte deseado. También se encuentra presente un sitio de restricción tipo II para la enzima BbsI en donde se efectúa el clonado del ARN guía (sitio en azul pálido). A continuación, aparece la secuencia del promotor fuerte de mamíferos CBh (Verde claro), una secuencia FLAG y el gen de la proteína Cas9 (verde oscuro) de *Streptococcus pyogenes*, flanqueada por dos secuencias SLN (señal de localización nuclear. Gris claro) para que la proteína Cas9 se dirija al núcleo de la célula a editar. Asimismo, este plásmido codifica para un gen que confiere resistencia al antibiótico puromicina (PURO. naranja) flaqueado por dos secuencias del péptido de autoescisión 2A (gris oscuro) y la secuencia de expresión de la proteína fluorescente verde (GFP. Rosa) seguido por una secuencia poliA (negro).

El diseño de los guías fue realizado utilizando la herramienta bioinformática *Benchling Life Sciences R&D Cloud Software* (<http://www.benchling.com/>) tomando en consideración los siguientes puntos:

- Se importó la secuencia del gen de *PSEN1* desde la base de datos Ensembl (cod. ENSG00000080815), teniendo la consideración de que nosotros vamos a trabajar con una secuencia que se encuentra mutada en origen, aunque utilicemos una base de datos que presente datos de secuencia *wild-type*.
- Con el fin de evitar posibles sitios de iniciación de la traducción alternativos, se optó por descartar sitios de corte en los primeros exones.
- Dada la probabilidad de generación de mutaciones no deseadas en genes con zonas de reconocimiento de la Cas9 con cierto grado de homología con el guía clonado (*off target*), se seleccionaron aquellos guías que tuvieran puntajes estimados de sitios de corte *off target* bajos y que además no fueran genes esenciales para la supervivencia celular.
- Se corroboró la presencia de los mismos guías por softwares diferentes: CHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) y CRIPOR (<http://crispor.tefor.net/>).



**Figura 18. Secuencia parcial del exón 5 y alrededores del gen de *PSEN1* con guías diseñados.** Esquema del gen de Presenilina-1 (porción parcial del intrón 4-5 y porción parcial del exón 5) con secuencia genómica y aminoacídica asociada. En colores claros (verde y naranja), se detallan las secuencias de los guías 1 y 2, respectivamente. En colores oscuros (verde y naranja), sus PAMs asociados. En la caja roja se marca el sitio de interés en la hebra WT.

Una vez seleccionadas las secuencias, se buscaron sus secuencias complementarias y se solicitó su síntesis en la empresa MacroGen (<http://dna.macrogen.com/>). Al momento de realizar el pedido de síntesis, se hicieron las siguientes modificaciones sobre las secuencias:

- Como el plásmido de expresión del sistema guía de ARN se encuentra bajo regulación de promotor U6, se adicionó una base G (C en la complementaria) en el extremo 5' de la hebra forward (inmediatamente adyacente al inicio de la secuencia) para que la secuencia sea reconocida por dicho promotor.
- Además, con el objetivo de insertar este oligonucleótido en el plásmido mediante corte por la enzima BbsI, se agregaron las secuencias adaptadoras CACC y CAAA en la hebra *forward* y *reverse* respectivamente.

A continuación (Tabla 2), se presenta el listado de oligonucleótidos guía sintetizados:

| NOMBRE      | SECUENCIA DEL OLIGO<br>(5' a 3') | HEBRA | On-<br>target<br>Score | Off-<br>target<br>Score |
|-------------|----------------------------------|-------|------------------------|-------------------------|
| PSEN1_1 REV | aaacCATTACAGAAAGATACCGAGC        | -     | 65,5                   | 66,6                    |
| PSEN1_1 FWD | CACCGCTCGGTATCTTCTGTGAATG        |       |                        |                         |
| PSEN1_2 REV | aaacACAGTCTCGGTATCTTCTGTTC       | +     | 57,4                   | 81,5                    |
| PSEN1_2 FWD | CACCGACAGAAGATACCGAGACTGT        |       |                        |                         |

**Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la expresión de guías de ARN de corte por la enzima Cas9.** En rosa se destacan las modificaciones hechas para poder insertar correctamente los mismos en el casete de expresión plasmídico y su transcripción bajo la regulación del promotor U6.

## Clonado de guías en el plásmido pSpCas9(BB)-2A-Puro-2A-GFP

La inserción de las secuencias guía en el plásmido pSpCas9(BB)-2A-Puro-2A-GFP se realizó en paralelo, siguiendo el protocolo publicado por F. Ann Ran y colaboradores <sup>215</sup>.

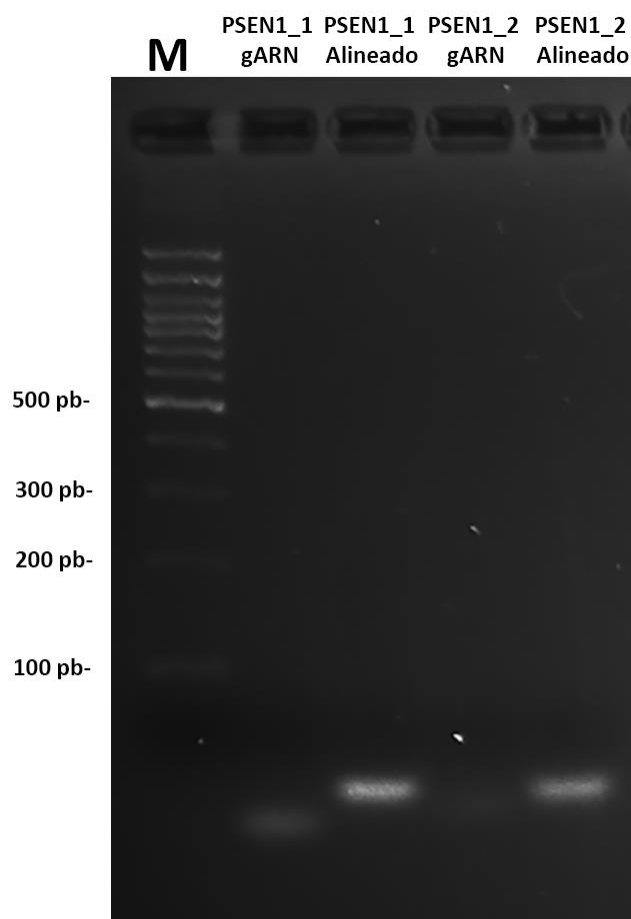
Con ese fin, se realizó un paso de fosforilación y apareamiento de secuencias. Para ello, se utilizó el enzima polinucleótido quinasa T4 (T4 PNK) la cual fosforila los sitios 5' de oligonucleótidos. La utilización de esta enzima, en conjunto con un *buffer* ligasa y un programa de ciclado adecuado promueve la fosforilación y apareamiento de las secuencias complementarias para dejarlas listas para su inserción en el plásmido de expresión.

Para realizar este protocolo se utilizó un equipo de ciclado térmico (Verity 96 well Fast Thermal Cycle. Applied Biosystems) el cual se configuró con los siguientes parámetros para promover, en primera instancia la fosforilación y posteriormente el apareamiento: 37 °C por 30 minutos, 95 °C por 5 minutos y descenso gradual de 1 °C/minuto hasta 25 °C.

Los reactivos, sgRNA Fw (10 µM), 1 sgRNA Rev (10 µM), 1 µl buffer ligasa T4, 10 U de enzima T4 PNK y H<sub>2</sub>O milli Q hasta llegar a volumen final indicado por el fabricante fueron colocados en tubos aptos para PCR de 0,2 ml de capacidad y sometidos al protocolo de ciclado previamente descrito. Al terminar, se realizó una dilución 1:200 en H<sub>2</sub>O milli Q y se guardaron a -20 °C para su posterior utilización.

Para corroborar el correcto apareamiento de las guías, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 4% comparando cada set apareado contra una mezcla de los oligonucleótidos diluidos previo al protocolo de la enzima T4 PNK (Figura 17).





**Figura 19. Evaluación del apareamiento de las secuencias guía.** Electroforesis en gel de agarosa 4% m/v, en la calle 1 se presenta el marcador de peso molecular (M) de 100 pb. Calles 1 y 2, guía PSEN1\_1 y PSEN1\_1 apareado. Calles 3 y 4 guía PSEN1\_2 y PSEN1\_2 apareado, Respectivamente.

Como se observa en la figura 19, la banda correspondiente a los oligos no apareados corre electroforéticamente el equivalente a una banda de menor peso molecular (presumiblemente la mitad) que su contraparte alineada. Además, ambos productos están por debajo de los 100 pb (lo cual es correcto considerando que cada guía posee 25 pb).

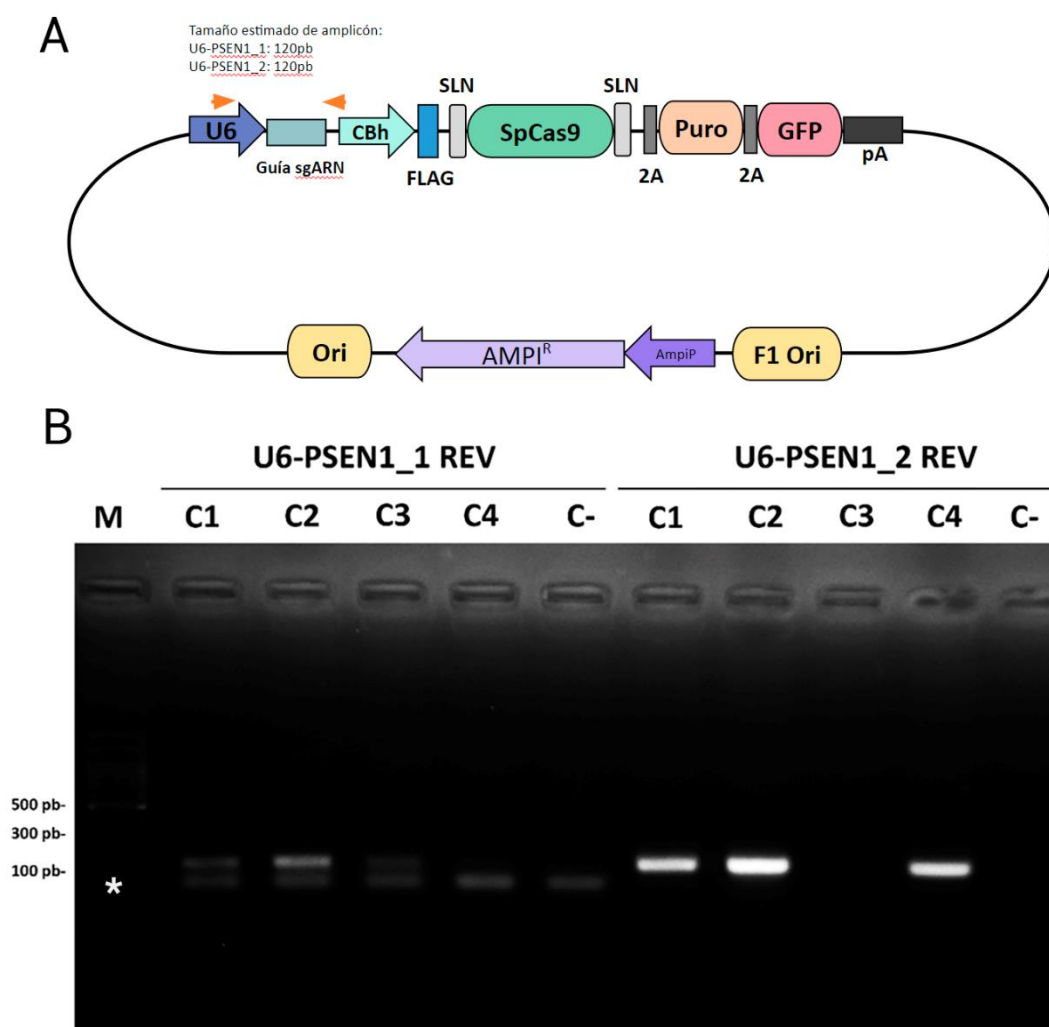
Posteriormente, se procedió al clonado de las mismas en el plásmido pSpCas9(BB)-2A-Puro-2A-GFP el cual previamente había sido amplificado y purificado por Midi prep.

En este caso, se utilizó una vez más el equipo de ciclado térmico (Verity 96 well Fast Thermal Cycle. Applied Biosystems) el cual se programó con los siguientes parámetros para promover, en primera instancia, el clivaje por la enzima BbsI y posteriormente el ligado por la enzima Ligasa T4: 6 ciclos de 37 °C por 50 minutos (Temperatura óptima de actividad de la enzima BbsI), 21 °C por 5 minutos (Temperatura óptima de actividad de la enzima T4 ligasa).

Los reactivos, 100 ng plásmido pSpCas9(BB)-2A-Puro-2A-GFP, 2 µl sgRNA alineados (dil 1:200), 2 µl buffer Tango (10x), 0.1 Unidad Weiss enzima T4 ligasa, 10 U enzima BbsI, 10 µM DTT, 10 µM ATP y H<sub>2</sub>O milli Q a volumen, fueron colocados en tubos

aptos para PCR de 0,2 ml de capacidad y sometidos al protocolo de ciclado previamente descrito.

Al finalizar, se procedió a realizar una transformación de bacterias competentes de la cepa *E. coli* STBL3, utilizando como antibiótico de selección ampicilina (100 µg/µl), y se realizó un *screening* de las colonias transformadas mediante *colony*-PCR utilizando los *primers* U6-Fw y PSEN1\_1REV y PSEN1\_2REV (figura 20).



**Figura 20. Evaluación de la inserción de los guías en el plásmido pSpCas9(BB)-2A-Puro-2A-GFP.** Electroforesis en gel de agarosa 1.5% m/v, en la calle 1 se presenta el marcador de peso molecular (M) de 100 pb. Calles 2-5, el amplicón obtenido con los primers U6 FW y PSEN1\_1 REV. Calles 8-10, el amplicón obtenido con los primers U6 FW y PSEN1\_2 REV. Calles 6 y 11, los respectivos controles sin ADN molde. Las flechas naranjas indican la zona amplificada. El tamaño estimado de ambos amplicones es 120pb. El \* indica una banda inespecífica de mayor movilidad electroforética.

Se seleccionaron las colonias 1 y 2 (C1 y C2) para cada uno de los guías, ya que presentaban una banda de amplificación para los *primers* utilizados, se purificó el producto de PCR utilizando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System de Promega (previo chequeo del producto de PCR mediante corrida electroforética en gel de agarosa 1,5%) y se corroboró la presencia de la secuencia guía mediante secuenciación de Sanger

(utilizamos el servicio de la empresa Macrogen, <https://dna.macrogen.com>). Finalmente, realizamos una Midi prep para amplificar el plásmido clonado.

### **Colony- PCR**

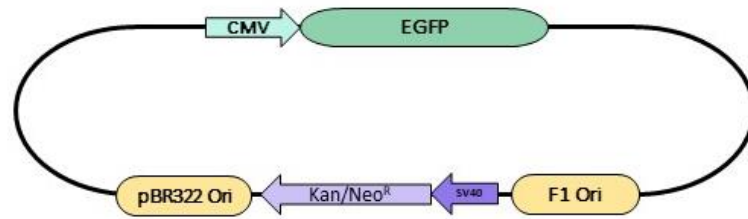
La *colony*-PCR es una técnica de alto rendimiento para determinar la presencia o ausencia de un inserto de ADN en construcciones de plásmidos. En este caso lo que se realiza es una PCR para cada guía y se utilizan como *primers* FW el oligonucleótido que contiene la secuencia promotora del guía (*primer* U6FW). De esta manera, se amplifica el guía si y solo si está inserto dentro del plásmido que contiene el promotor U6.

Partiendo de la placa de selección con ampicilina que se mencionó en el inciso anterior se picaron colonias de forma individual y se colocaron en tubos de 0,2 mL aptos para PCR en los cuales previamente se pipetearon los reactivos correspondientes a una PCR tiempo final (Ver sección PCR a tiempo final). El protocolo se realizó en el equipo de ciclado térmico (Verity 96 well Fast Thermal Cycle, Applied biosystems) el cual se programó con los siguientes parámetros: 10 minutos a 95 °C para promover el lisado celular, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos (desnaturalización), 60 °C por 20 segundos (apareamiento de los primers) y 72 °C por 2 minutos (elongación) y un periodo de elongación final de 72 °C por 5 minutos.

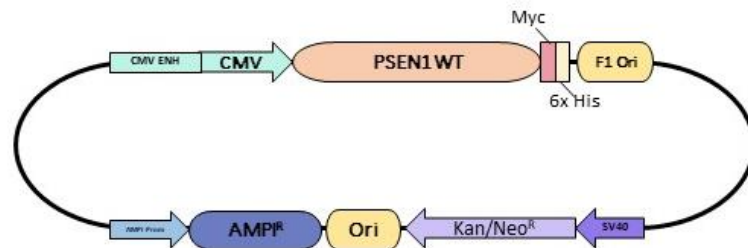
### **Plásmidos de expresión en células de mamíferos**

Además de la generación del sistema de corte guiado por el sgARN por la Cas9, se utilizaron 3 plásmidos de expresión en mamíferos para los ensayos realizados en células HEK293T *PSEN1* KO. A continuación, se presentan los esquemas de dichos plásmidos (Figura 21):

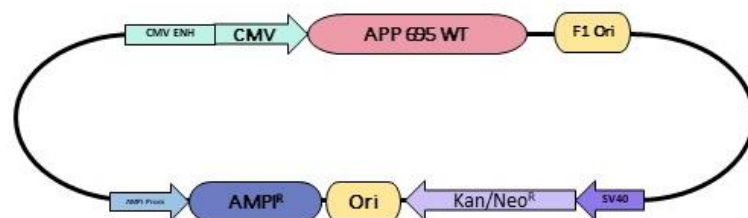
A. pEGFP-N1



B. pcDNA3.1 PSEN1 WT + VRSQ myc-his



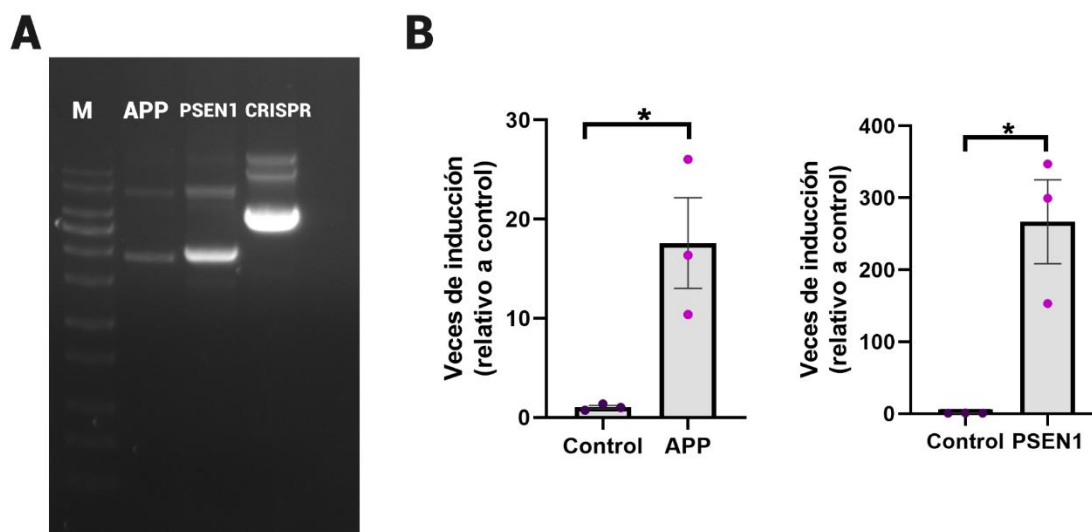
C. pCMV APP695\_WT



**Figura 21. Esquema de los plásmidos utilizados para el ensayo de sobreexpresión del sistema APP/PSEN1 en la línea HEK297 PSEN1 KO.** **A. pEGFP-N1.** El plásmido pEGFP-N1 se encuentra integrado por una secuencia de replicación bacteriana y eucariota (Ori. Amarillo) como así también por un casete de selección en bacterias y mamíferos de resistencia a kanamicina y neomicina (Kan/Neo. Violeta claro) bajo el control de la secuencia promotora del virus de simio 40 (SV40. Violeta oscuro). A su vez, presenta una secuencia promotora del citomegalovirus (CMV. Verde claro) que controla la expresión del gen de la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP. verde oscuro). **B. pcDNA3.1 PSEN1 WT + VRSQ myc-his.** El plásmido pcDNA3.1 PSEN1 WT + VRSQ myc-his se encuentra integrado por una secuencia de replicación bacteriana y eucariota (Ori. Amarillo) como así también por un casete de selección en bacterias y mamíferos de resistencia a kanamicina y neomicina (Kan/Neo. Violeta claro) bajo el control de la secuencia promotora del virus de simio 40 (SV40. Violeta oscuro). A su vez, presenta una secuencia promotora del citomegalovirus con su potenciador (CMV y CMV ENH. Verde claro) que controla la expresión del gen de presenilina1 *wild-type* (PSEN1 WT. Naranja) seguida de las secuencias tag Myc- 6x His (Rosa y amarillo) y un casete de selección por ampicilina (AMPI prom y AMPI<sup>R</sup> celeste y azul, respectivamente). **C. pCMV APP695\_WT.** El plásmido pCMV APP695\_WT se encuentra integrado por una secuencia de replicación bacteriana y eucariota (Ori. Amarillo) como así también por un casete de selección en bacterias y mamíferos de resistencia a kanamicina y neomicina (Kan/Neo. Violeta claro) bajo el control de la secuencia promotora del virus de simio 40 (SV40. Violeta oscuro). A su vez, presenta una secuencia promotora del citomegalovirus con su potenciador (CMV y CMV ENH. Verde claro) que controla la expresión de la isoforma 695 del gen de APP *wild-type* (APP 695 WT. rosa) y un casete de selección por ampicilina (AMPI prom y AMPI<sup>R</sup> celeste y azul, respectivamente).

El plásmido pEGFP-N1 ya se encontraba en el laboratorio mientras que los plásmidos pcDNA3.1 PSEN1 WT + VRSQ myc-his y pCMV APP695\_WT fueron una generosa donación de la Dra. Celeste Karch de la Washington University<sup>217</sup>. Los mismos fueron amplificados y purificados en bacterias *Escherichia coli* de la cepa Dh5α.

Evaluamos la integridad de los plásmidos a utilizar mediante una corrida electroforética en un gel de agarosa 0,8% (Figura 22 A) y realizamos un ensayo de sobreexpresión en células HEK293T *wild-type* para asegurarnos la correcta funcionalidad de los plásmidos de expresión (Figura 22 B).



**Figura 22. Evaluación de calidad de plásmidos utilizados.** A. Electroforesis en gel de agarosa 0,8% para evaluar la integridad de los plásmidos. Se observan las 3 bandas características correspondientes a las formas lineales, circularizadas y superenrolladas. M: marcador de peso molecular 1 Kb. APP: plásmido pCMV APP695\_WT PSEN1: plásmido pcDNA3.1 *PSEN1* WT + VRSQ MYC-HIS CRISPR: plásmido pSpCas9(BB)-2A-Puro -GFP- gRNA*PSEN1.1* B. Gráficos de expresión de ARNm en células HEK293T WT sin transfectar (control) y transfectadas con los plásmidos pCMV APP695\_WT (APP) y pcDNA3.1 *PSEN1* WT + VRSQ MYC-HIS (PSEN1). N=3. Se utilizó *RPL7* como gen de referencia para normalizar y los resultados se expresan como las veces de inducción en comparación con la condición control. Se realizó la prueba estadística de t-Student y los valores se consideraron significativamente diferentes cuando (\*)  $p < 0,05$  vs. control.

## Generación de bacterias competentes

Con el fin de amplificar los plásmidos utilizados durante esta tesis, generamos bacterias ultra competentes de las cepas de *Escherichia coli* Stbl3 y Dh5 $\alpha$ . Para ello, picamos una UFC (unidad formadora de colonia) por cepa, que generamos a partir de una estría bacteriana realizada en placa de LB agar e incubada en estufa de cultivo bacteriano ON a 37 °C. Dicha UFC fue transferida con un tip de 10  $\mu$ l a un Erlenmeyer que contenía 25 ml de medio SOB estéril (20 gr de peptona de carne, 5 gr de extracto de levadura, 0,5 gr de NaCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub> para un volumen final de 1 litro) y se cultivó en agitación a 300 rpm a 37 °C durante un lapso de 6-8 horas.

A continuación, se prepararon 3 erlenmeyer con 250 ml de medio SOB, se les agregaron 2, 6 y 10 ml del cultivo inicial de cada cepa y se mantuvieron a 18-22 °C ON con agitación moderada (200 rpm). Al día siguiente se midió la densidad óptica (DO) a 600 nm en un espectrofotómetro (DU 530. Beckman Coulter) hasta observar una DO de

0,55 para alguno de los 3 cultivos inoculados. Una vez obtenido el cultivo con la densidad óptica necesaria, lo colocamos en baño frío a 0 °C durante 10 minutos.

Posteriormente, se realizó una centrifugación a 2500 x g durante 10 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el *pellet* al aire por 5 minutos. Dicho *pellet* se resuspendió gentilmente en 80 ml de *buffer* Inoue (MnCl<sub>2</sub> 55 mM, CaCl<sub>2</sub> 15 mM, KCl 250 mM) a 0 °C y se centrifugó nuevamente a 2500 x g durante 10 minutos a 4 °C. Se descartó una vez más el sobrenadante y se resuspendió suavemente el *pellet* en 20 ml de *buffer* Inoue a 0 °C. Se agregaron 1,5 ml de DMSO a la resuspensión bacteriana, se homogeneizó de forma orbital y se incubó en hielo durante 10 minutos. Finalmente, se alicuotaron las bacterias competentes obtenidas de a 100 µl en tubos de 1,5 ml previamente enfriados en *freezer* y se conservaron a -80 °C. La eficiencia de transformación de dichas bacterias fue de aproximadamente 1x10<sup>9</sup> UFC/µg de ADN.

### **Transformación de bacterias competentes**

Si bien trabajamos con dos cepas distintas de acuerdo con el protocolo a realizar, en todos los casos se procedió de igual manera para poder introducir los plásmidos deseados a la cepa bacteriana correspondiente.

En frío, se colocaron 50 µl de bacterias competentes de la cepa de *Escherichia coli* requerida en un tubo eppendorf de 1,5 ml y se adicionaron 10 ng de plásmido. Luego, incubamos las bacterias y el plásmido durante 30 minutos en hielo y posteriormente se sometió la mezcla a 42 °C por 90 segundos (*Heat shock*). Se realizó una nueva incubación durante 5 minutos en hielo y se agregaron 500 µl de medio Luria Bertani (LB) (0,5% NaCl; 0,5% Extracto de levadura; 1% Peptona de caseína, pH=7,2) fresco al cultivo. A continuación, se realizó una incubación de 30 minutos en estufa a 37 °C. Al retirar de la estufa, se centrifugó a 300 x g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* bacteriano en 150 µl de medio LB, que luego fueron plaqueados en una placa de LB agar conteniendo el antibiótico de selección adecuado.

### **Extracción de ADN plasmídico (Midi prep y Mini prep)**

Para la obtención de ADN plasmídico se utilizó el kit Wizard Plus Midipreps DNA purification System de Promega con modificaciones de acuerdo con el equipamiento del laboratorio.

Brevemente, el día previo se realizó el cultivo de *E. coli* (cepa Stbl3 o DH5α según corresponda) previamente transformada con el plásmido de interés en 100 ml de medio

LB con el antibiótico de selección correspondiente. El mismo se cultivó ON en agitación a 37 °C. Al día siguiente se realizó una centrifugación a  $4000 \times g$  durante 20 minutos a 4 °C para precipitar las células, se descartó el sobrenadante y se colocaron las botellas sobre una servilleta de papel para absorber el exceso de líquido.

Posteriormente, se resuspendió completamente el precipitado en 3 ml de solución de resuspensión [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A] y se añadieron 3 ml de solución de lisis celular (0.2 M NaOH, 1% SDS). Se homogeneizó por inversión del tubo 4 veces y se dejó incubando por 4-5 minutos hasta observar el aclarado total o parcial de la suspensión celular. Finalmente, se añadieron 3 ml de solución de neutralización [1.32 M acetato de potasio (pH 4.8)] o 6 ml en caso de partir de un cultivo de la cepa Stbl3 la cual es EndA<sup>+</sup>. Se mezcló nuevamente por inversión 4 veces y se dejó incubando a TA por 10 minutos.

Tras lisar las células, se realizó una centrifugación a  $14000 \times g$  durante 20 minutos a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a un tubo de centrifugación limpio filtrando a través de una gasa estéril para evitar el pasaje del precipitado blanco, el cual se descarta. A continuación, se añadieron 10 ml de la resina de purificación de ADN al lisado y se trasvasó al reservorio de la columna provista por el kit (reservorio y midi columna) previamente acoplada a un equipo de generación de vacío. Se aplicó vacío y se empaquetó la resina por medio de aspiración. En caso de tratarse de un cultivo bacteriano de la cepa Stbl3, se agregaron 15 ml de una solución 40% isopropanol/4.2 M Guanidina-HCl y se dejó pasar por la columna por 30 segundos.

Luego, se realizaron 2 lavados consecutivos con 15 ml de solución de lavado [80 mM acetato de potasio, 8.3 mM Tris-HCl (pH 7.5), 40 µM EDTA] aplicando vacío tras el agregado de solución. Al finalizar el segundo lavado, se continuó con aspiración por 30 segundos para secar la columna y se separó la midi columna del reservorio para colocarla en un tubo de 1,5 ml estéril. Dicho acople de tubo y midi columna fue centrifugado por 2 minutos a TA a  $10000 \times g$  para retirar los restos de solución de lavado que quedaron en la midi columna.

Finalmente, se añadieron 100-200 µl de agua estéril libre de ARNasas y ADNasas previamente calentada a 70 °C, se esperó 1 minuto y se centrifugó a  $10000 \times g$  por 30 segundos. Se descartó la midi columna vacía, se centrifugó nuevamente a  $10000 \times g$  por 5 minutos y se traspasó el contenido líquido a un nuevo tubo de 1,5 ml estéril para remover residuos de resina de la midi columna que pudieran haber eluido con el plásmido. La cuantificación de la concentración de ADN plasmídico obtenido se realizó utilizando el equipo Nanodrop 2000.

También se realizó una extracción plasmídica en pequeña escala (Mini prep) partiendo de mini cultivos de 2 ml utilizando el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA

purification System (Promega). Este protocolo es similar al mencionado anteriormente, considerando que los volúmenes utilizados de los reactivos se adecuan al volumen de partida del cultivo inicial, salvo por la adición de 10 µl de solución de proteasa alcalina entre los pasos de adición de la solución de lisis y la solución de neutralización.

### Diseño de oligonucleótidos “primers” para realizar mutagénesis dirigida del plásmido *PSEN1 wild-type*

Para el diseño de los primers requeridos para realizar las mutaciones puntuales correspondientes (c.C356T y c.C737A, respectivamente) se utilizó la herramienta bioinformática NEBase Changer (<https://nebasechanger.neb.com/>). En la misma, se introdujo la secuencia completa del plásmido pcDNA3.1 PSEN1 WT + VRSQ myc-his<sup>217</sup> y se le indicó al programa el sitio donde se realizaría la sustitución como así también el cambio nucleotídico deseado.

En la tabla 3 se presentan los *primers* devueltos por el programa, como así también la temperatura de hibridación óptima para que ocurra la amplificación.

| NOMBRE                | SECUENCIA (5' a 3')   | TEMPERATURA DE HIBRIDACION |
|-----------------------|-----------------------|----------------------------|
| MD.PSEN1 p.T119I-Fw   | ACCCCATTCATAGAAGATACC | 60 °C                      |
| MD.PSEN1 p.T119I-Rev  | ATAGATTAGCTGCCCATC    | 60 °C                      |
| MD.PSEN1 p.A246E-Fw   | GAATGGACTGAGTGGCTCATC | 59 °C                      |
| MD. PSEN1 p.A246E-Rev | AGGGAGGTAAGTGGCTCATC  | 59 °C                      |

**Tabla 3. Secuencias y temperaturas de hibridación de los primers utilizados en el ensayo de mutagénesis dirigida.** En minúscula y rojo se presenta el sitio y nucleótido modificados.

### Ensayo de mutagénesis dirigida

La mutagénesis de sitio dirigida por PCR es una técnica ampliamente utilizada para introducir mutaciones en posiciones específicas dentro de una secuencia de ADN<sup>218</sup>. Para introducir las mutaciones c. C356T y c. C737A en sendos plásmidos pcDNA3.1 *PSEN1* WT + VRSQ myc-his, se utilizó el kit Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (New England BioLabs).

Brevemente, para cada ensayo se colocaron 15 ng de plásmido pcDNA3.1 *PSEN1* WT + VRSQ myc-his, 1, 25 µl de *primer forward* (10 µM), 1, 25 µl de *primer reverse* (10 µM), 12, 5 µl Master Mix Q5 Hot Start High-Fidelity (2x) y 9 µl de agua libre de nucleasas en tubos aptos para PCR de 0,2 ml de capacidad de forma tal de obtener un volumen final de 25 µl. Se utilizó el equipo de ciclado térmico (Verity 96 well Fast Thermal Cycle.



Applied biosystems) con el siguiente protocolo: 98 °C por 30 segundos para promover la desnaturalización inicial del plásmido, 25 ciclos de 98 °C por 10 segundos para desnaturalizar el ADN, 59-60 °C (temperatura de hibridación de acuerdo con el set de oligonucleótidos utilizados) por 20 segundos para permitir la hibridación de los primers al plásmido y 72 °C por 5 minutos para la elongación del plásmido modificado por la enzima Q5 Hot Start High-Fidelity y posteriormente una elongación final de 2 minutos a 72 °C.

Una vez obtenidos los productos de PCR, se confirmó la presencia del amplicón corriendo 5 µl de la mezcla resultante en un gel de agarosa 0,8%. Solo en caso de ver la banda correspondiente se procedió a realizar el tratamiento con el mix enzimático KLD por 5 minutos a TA. El mismo está compuesto por una combinación de enzimas quinasa, ligasa y *DpnI* en un buffer optimizado para el correcto funcionamiento de estas. De esta manera, se permite la fosforilación y circularización de los plásmidos modificados en paralelo a la eliminación del templado por la enzima *DpnI*. Esta enzima reconoce y cliva secuencias 5'-GATC-3' metiladas, solamente presentes en el molde y no en los productos de PCR modificados.

Posteriormente se procedió a realizar una transformación bacteriana de las bacterias NEB 5-alpha Competent *E.coli* de alta eficiencia provistas por el kit de forma similar a lo descrito en el apartado Transformación de bacterias competentes (solamente se reemplazó el LB por el medio SOB provisto por el fabricante). Es importante realizar este paso con las bacterias de alta eficiencia provistas ya que, si bien la eficiencia de la mutagénesis es del 80%, la eficiencia de transformación bacteriana es muy baja y no logramos obtener colonias con las bacterias obtenidas por el método INOUE explicado anteriormente.

Se cultivaron 5 colonias obtenidas por ensayo de mutagénesis y tras realizar una mini prep se procedió a corroborar la correcta inserción de la mutación por secuenciación de Sanger (Macrogen. <http://dna.macrogen.com/>). Se seleccionó 1 colonia por ensayo de mutagénesis para realizar un cultivo de mayor volumen y realizar una midi prep de los mismos para obtener el plásmido modificado purificado.

## **Cultivo de células HEK293T**

Las HEK293T son células humanas provenientes de tejido embrionario de riñón las cuales fueron inmortalizadas utilizando adenovirus. En particular, la HEK293T es una línea derivada que contiene el gen del antígeno SV40T y resistencia a neomicina.

El cultivo en estas células para su amplificación se realizó en adherencia en placas tratadas para cultivo celular, sin agregado de matrices extracelulares utilizando medio DMEM [Dulbecco's Modified Eagle Medium alta glucosa pH 7.2 (Gibco)] suplementado con 44 mM NaHCO<sub>3</sub>, 25 mM HEPES, 2 mM aminoácidos no esenciales, 50 U/ml de penicilina/estreptomicina (P/E), 2 mM L-Glutamina y 10% v/v SFB (Gibco). Las células se crecieron en incubadora de cultivo a 37°C con una atmósfera al 5% CO<sub>2</sub>.

El pasaje de esta línea celular para su amplificación o su criopreservación se realizó mediante el uso de la enzima peptidasa Tripsina. Brevemente, una vez alcanzada la confluencia en placa deseada, se retiró y descartó el medio de cultivo, se realizó un lavado suave con 500 µL de PBS en un pocillo de placa de 6 pocillos y se agregó 500 µl ml de solución 0,25% Tripsina-EDTA-rojo Fenol. Se realizó una incubación a 37 °C por 5 minutos hasta observar la disociación total de las células. Luego, se colocaron 4,5 ml de medio DMEM suplementado con 10% v/v SFB y se transfirieron los 5 ml de solución a un tubo de 15 ml apto para centrifuga y se realizó una centrifugación a 300 x g por 5 minutos a TA. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en volumen suficiente para pasar a nuevos pocillos donde se continuó su cultivo. Es crucial la adición de DMEM completo suplementado con 10% v/v SFB para neutralizar la acción de la tripsina y evitar que la misma siga fragmentando proteínas clave para la supervivencia celular.

Para la criopreservación de las HEK293T, las mismos se colocaron en 1 ml de DMEM suplementado con 20% v/v SFB y 10% v/v dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich). La suspensión celular suplementada con 10% SFB fue agregada en un criotubo de 1 ml e inmediatamente después se procedió al agregado del DMSO el cual se colocó lentamente y en gotas, de forma de disminuir la muerte celular. Los criotubos fueron rápidamente colocados en un recipiente apropiado para congelar las células, el cual contenía isopropanol y se colocó por 24 horas a -80 °C. De esta manera, se permitió un descenso controlado de la temperatura a razón de 1°C/minuto lo que aumenta la viabilidad celular. Pasadas las 24 horas, se guardaron los viales en un tanque de nitrógeno líquido para su almacenamiento a largo plazo.

Para descongelar las células, los viales fueron removidos del tanque de nitrógeno líquido y rápidamente calentados a 37 °C en un baño térmico hasta observarse líquido dentro del tubo. Inmediatamente se transfirió el contenido de cada criotubo a un tubo cónico con 10 ml de DMEM, se centrifugó la suspensión durante 5 minutos a 300 x g, se removió el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 5 ml de DMEM suplementado con 10% v/v SFB, y se sembró las células en los pocillos correspondientes.

## Transfección de células HEK293T

Para la transfección de células HEK293T, tanto para la generación de la línea *PSEN1* KO como para la expresión transitoria de los plásmidos de expresión de APP y *PSEN1* mutados y *wild-type* (WT), se utilizó el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del proveedor.

Brevemente, se resuspendieron las células utilizando 0,25% Tripsina-EDTA-rojo Fenol y se plaquearon  $2 \times 10^6$  células por pocillo de una placa multipocillo de 6 wells en medio DMEM + 10% SFB. Al día siguiente se realizó un lavado con 500  $\mu$ l de PBS 1x y se colocó con suavidad 1,7 ml de medio DMEM + 10% SFB sin antibiótico. Por otro lado, se colocaron en un tubo de microcentrífuga estéril 150  $\mu$ l de medio reducido en suero opti-MEM (Gibco) y 15  $\mu$ l de Lipofectamine 2000. En paralelo, se colocó en otro tubo de microcentrífuga estéril 150  $\mu$ l de medio opti-MEM y 2000-2500 ng del plásmido o set de plásmidos a transfectar (ver tabla 4). Se colocó el contenido del primer tubo en el segundo tubo y se incubó a TA por 10 minutos. Una vez finalizada la incubación, se retiraron las células de la estufa, se agregó a cada pocillo el contenido de cada tubo por goteo y se devolvieron nuevamente a la estufa.

24 horas post transfección se realizó un cambio de medio (DMEM + 10% SFB) y 48 horas post transfección se iniciaron los tratamientos correspondientes.

| ENSAYO                 | PLASMIDO                              | MAS UTILIZADA (ng) |
|------------------------|---------------------------------------|--------------------|
| Generación de línea KO | pSpCas9(BB)-2A-Puro -GFP-gRNAPSEN1    | 2000               |
| Expresión proteica     | pCS2-6MT APP695 WT                    | 1000               |
| Expresión proteica     | pcDNA3.1 PSEN1 WT + VRSQ myc-his      | 1000               |
| Expresión proteica     | pcDNA3.1 PSEN1 p.T199I + VRSQ myc-his | 1000               |
| Expresión proteica     | pcDNA3.1 PSEN1 p-A246E + VRSQ myc-his | 1000               |
| Expresión proteica     | pEGFP-N1                              | 500                |

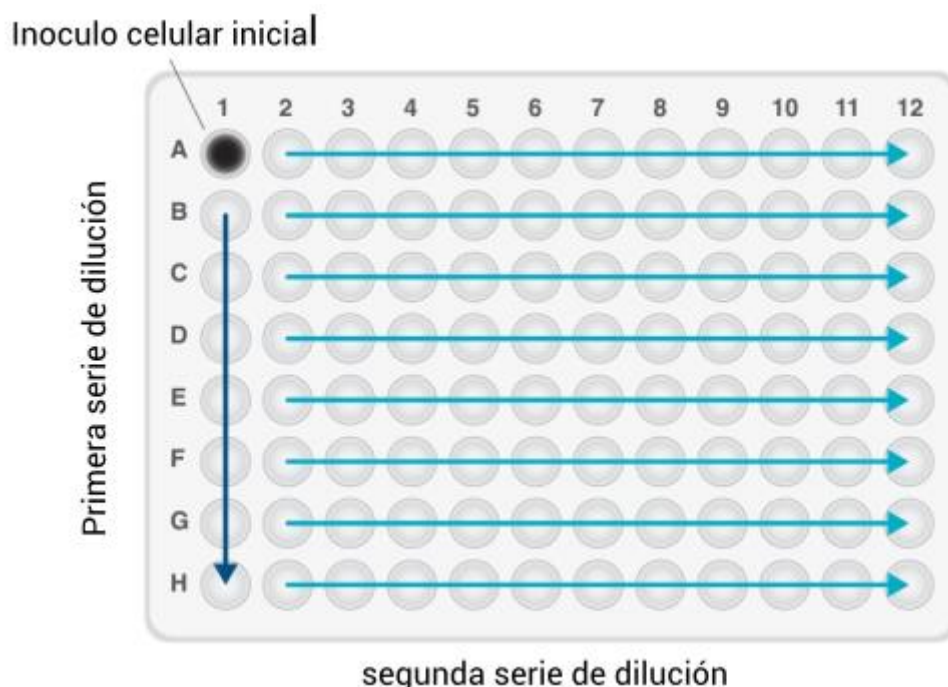
**Tabla 4. Plásmidos utilizados para los ensayos realizados en células HEK293T.**

## Obtención de colonias HEK293T editadas mediante CRISPR/Cas9 por método de dilución límite

Al realizar mutaciones en el genoma de cualquier línea celular, se deben obtener colonias puras, provenientes de un único evento de edición génica. Para obtener líneas que fueran clonales (es decir, que la colonia formada provenga de una única célula formadora inicial) optamos por realizar el método de dilución límite en placa multipocillo de 96.

Una vez pasadas 48 horas post transfección, se inició el tratamiento con puromicina (2 µg/ml) y tras 48 horas de tratamiento, al observar la supervivencia de solo aquellas células que hayan introducido por transfección el plásmido pSpCas9(BB)-2A-Puro -GFP-gRNAPSEN1 que les confiere resistencia al antibiótico, se procedió a levantar las células con 0,25% Tripsina-EDTA-rojo Fenol (Gibco) y por recuento celular con hemo citómetro, se diluyó la cantidad de células obtenidas hasta generar una solución que contuviera  $2 \times 10^4$  células/ml.

Luego, se colocaron 100 µl de medio DMEM + 10% SFB en todos los pocillos de la placa multipocillo salvo por la posición A1 (Figura 23). En esa posición se agregaron 200 µl de la suspensión celular y se procedió a realizar diluciones seriales al medio tal y como se presenta en la figura. Primero, una dilución al medio en cada pocillo de la columna 1 y posteriormente, diluciones seriales sobre cada una de las filas A a H, en sentido horizontal (Figura 23). Al terminar, se colocó la placa en la incubadora a 37 °C por 24 horas. Se tuvo cuidado de cambiar de tip al cambiar de hilera y no sobrepasar los 20 minutos por fuera de la estufa para evitar la muerte celular.



**Figura 23. Orden de sembrado de placa de MW96 por método de dilución serial.**

Se realizaron cambios de medio fresco día de por medio hasta comenzar a observar células en los pocillos, momento en que se pasó a cambiar el medio diariamente. Una vez que las células alcanzaran una confluencia total en el pocillo, se las disoció con Tripsina y se las pasó a 2 pocillos de placa de 24. Una vez obtenida confluencia nuevamente, uno de los pocillos se congeló para realizar stock y del otro se extrajo material genómico para secuenciar.

## **Extracción de material genómico**

Con el fin de corroborar la presencia de mutaciones en las líneas celulares por secuenciación de Sanger se disociaron  $2 \times 10^5$  células utilizando la enzima apropiada en cada paso, se realizó un lavado con PBS 1x y se las resuspendió en buffer de lisis (Tris-HCl pH=8,3 10 mM; KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 2 mM; 0,001% gelatina; 0,5% NP40; 0,5% Tween-20) homogenizando hasta obtener una suspensión unicelular homogénea. Posteriormente, se agregó 10 µg/µl de Proteinasa K (Thermo Fischer Scientific) y se incubó a 60 °C durante 1 h con agitación intermitente para el correcto lisado de las células. Al finalizar la incubación se agregaron 600 µl de isopropanol 100% y se incubó a -20 °C durante 30 minutos para luego centrifugar la muestra a velocidad máxima durante 30 minutos a 4 °C de forma tal de precipitar el ADN presente en la muestra. Una vez finalizada la centrifugación se descartó el sobrenadante, se lavó el pellet con etanol 70%, se volvió a centrifugar la muestra en frío durante 2 minutos, se descartó el sobrenadante nuevamente y se dejó secar el pellet al aire. Para terminar, se resuspendió el pellet en 50-100 µl de agua milli Q y se dejó rehidratando en baño seco a 65 °C durante 1 hora. El último paso consistió en cuantificar el ADN genómico por NanoDrop observando que las muestras presentaran una relación 260/280 y 260/230 mayor a 1,8. Se conservaron las muestras de ADN genómico a -20 °C hasta su posterior utilización.

## **Recolección de sobrenadantes**

Para la cuantificación de péptidos secretados por los cultivos de neuronas corticales en dos dimensiones (2D), HEK293T u organoides cerebrales, se realizó la recolección de sus sobrenadantes. Para ello, una vez terminados los protocolos (70 y 90 días de cultivo, respectivamente), se colocó el medio de cultivo (sin Matrigel ®, en caso de los organoides cerebrales) y se procedió a su recolección 48 horas después. Para ello, se pasaron los ml de medio condicionado a eppendorfs y se centrifugaron a 3000 x g por 10 minutos para su posterior transferencia a eppendorfs de a 200 µl, cuidando de no arrastrar el precipitado (desecho celular). Es necesario realizar alícuotas de a 200 µl para prevenir ciclos de congelado y descongelado, que pueden degradar las muestras a evaluar.

## **Preparación y cuantificación de extractos proteicos**

Para el análisis mediante Western Blot, las muestras de proteínas totales se extrajeron a partir de la lisis de los cultivos celulares incubando en hielo con *buffer* de

extracción de proteínas RIPA frío conteniendo cóctel de inhibidores de proteasas (EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, ROCHE) durante 10 minutos en agitación y centrifugando a 200 x g durante 5 minutos. Para la cuantificación de proteínas totales se utilizó el método del ácido bicinónico (BCA, del inglés *Bicinchoninic Acid Protein Assay*) (Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando albúmina de suero bovino (ASB) como patrón. Las muestras fueron leídas a 595 nm con un lector de placas. Para su utilización en los ensayos de ELISA, las muestras se extrajeron utilizando un buffer de lisis específico (10 mM Tris pH 7,4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NAF, 20 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 2 mM de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 % Triton X-100, 10 % glicerol, 0,1 % SDS y 0,5 % deoxicolato) con el agregado en el momento de inhibidores de proteasas (EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, ROCHE y PMSF 1mM), para posteriormente realizar 3 sesiones de 10 minutos de incubación en hielo más 30 segundos de agitación en vortex, antes de guardar a -80 °C para su posterior cuantificación y análisis. En este caso la cuantificación se realizó por el método de Bradford (Sigma Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando albúmina de suero bovino (ASB) como patrón. Las muestras fueron leídas a 595 nm con un lector de placas.

## Western blot

Las células HEK293T que fueron modificadas por la técnica de CRISPR/Cas9 fueron lisadas para la obtención de proteínas y cuantificadas, como se mencionó anteriormente. A 50 µg de proteínas totales se les agregó solución de siembra (Tris-HCl 40 mM pH=6,8, glicerol 6%, azul de bromofenol 0,006%, SDS 1% y  $\beta$ -Mercaptoetanol 0,1%) y se las calentó 5 minutos a 100 °C para completar el proceso de desnaturalización. Posteriormente, las proteínas se separaron electroforéticamente por SDS-PAGE en un gel de 12% de acrilamida durante 2:30 horas a 100 Volts en solución de corrida (Tris-HCl 25 mM pH=8,3, glicina 192 mM). Las muestras se electrotransfirieron a una membrana de PVDF (General Electric) durante 90 minutos a 150 Volts mediante transferencia húmeda (Tris-HCl 25 mM pH=8,3, glicina 192 mM, SDS 0,1%, Metanol 20%, PBS-Tween: Tween20 0,1% v/v en PBS.).

Finalizada la electrotransferencia, se bloqueó la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente en solución PBS-Tween conteniendo 5% m/v de leche descremada para disminuir el pegado inespecífico del anticuerpo primario sobre la membrana. La membrana se incubó durante toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios específicos, preparados en PBS-Tween más el agregado de 3% de leche. Luego se realizaron 3 lavados de 20 minutos PBS-Tween. Seguidamente se incubaron las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios

correspondientes (acoplado a la enzima peroxidasa) (Tabla 5). Por último, se realizaron 3 lavados de 20 minutos con PBS-Tween. El revelado de las proteínas se realizó mediante quimioluminiscencia utilizando el reactivo comercial Super Signal West Femto (Thermo Scientific), reacción que fue captada por un detector de quimioluminiscencia (ImageQuant LAS 4000mini).

| ANTICUERPO                  | MARCA                    | Nº CATALOGO | ESPECIE-TIPO      | DILUCION DE USO |
|-----------------------------|--------------------------|-------------|-------------------|-----------------|
| Presenilina 1 (D39D1)       | Cell Signaling Biology   | 5643S       | Conejo monoclonal | 1:1000          |
| GADPH (G-9)                 | Santa Cruz Biotechnology | Sc-365062   | Ratón monoclonal  | 1:10000         |
| $\alpha$ -IgG de conejo HRP | Santa Cruz Biotechnology | sc-2357     | Conejo monoclonal | 1:5000          |
| $\alpha$ -IgG de ratón HRP  | Abcam                    | ab205719    | Ratón monoclonal  | 1:5000          |

**Tabla 5. Listado de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en los ensayos de western blot**

### **Análisis cuantitativo de proteínas mediante ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA)**

Los ensayos de ELISA permiten cuantificar la cantidad de moléculas presentes en un medio líquido con alta sensibilidad, por esto, es uno de los métodos más utilizados para la cuantificación de los péptidos involucrados en la patogénesis de EA<sup>219</sup>.

A lo largo de esta tesis doctoral se utilizaron 4 kits de ELISA [ $A\beta_{42}$  (ab289832, Abcam),  $A\beta_{42}$  ultrasensible (KHB3544, Thermo Fisher Scientific),  $A\beta_{40}$  (ab193692, Abcam) y p-Tau [T231] (KHB8051, Thermo Fisher Scientific)]. Si bien es necesario realizar el ensayo de acuerdo con las especificaciones de cada fabricante, a continuación, se presenta un ensayo genérico.

Las muestras previamente extraídas (ya sean sobrenadantes o extractos proteicos) se dejaron descongelando lentamente a TA por 45 minutos antes de proceder a su utilización. Se procedió a realizar la curva de calibración con el patrón presentado por el kit y a diluir las muestras según una puesta a punto realizada previamente.

Luego y para cada ensayo realizado se colocaron 50-100  $\mu$ l (según especificaciones del kit) de curva patrón, blanco y muestras en los pocillos de las placas multipocillo de 96 provistas y se incubó por 1:30-3 horas en condiciones adecuadas (37 °C o a TA, sellado y resguardado de la luz). Una vez pasado ese tiempo se realizaron 4 lavados con el buffer de lavado, asegurándonos de retirar el líquido por golpeteo contra

una servilleta limpia. Incubamos luego por 1-2 horas con el anticuerpo primario correspondiente.

Posteriormente, se realizaron nuevamente 4 lavados y se añadió el anticuerpo secundario marcado a cada pocillo y se incubó por 1-2 horas en condiciones adecuadas (37 °C o a TA, sellado y resguardado de la luz). Finalizado ese tiempo se volvieron a realizar 4 lavados con la solución de lavado y se retiró el líquido excedente.

Para revelar, se agregaron 100 µl de solución de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) a cada pocillo y se incubó en oscuridad a TA o 37 °C durante 30 minutos. Pasado ese tiempo se detuvo la reacción con la solución de frenado (por ejemplo, ácido sulfúrico 2N). Inmediatamente se procedió a leer la absorbancia a 450 nm en un lector de placas.

### **Aislamiento de fibroblastos dérmicos (FD)**

Los FD fueron derivados a partir de tejido sano de un paciente varón de 72 años al momento de la donación, que había sido previamente diagnosticado con EAF siendo su edad de inicio 49 años y el cual, mediante un estudio de panel de secuenciación de los exones (y regiones intrónicas proximales) de los genes *PSEN1*, *PSEN2*, y *APP* se encontró presentaba una variante al momento no reportada en el aminoácido 119 (p.T119I) del gen de *PSEN1*<sup>220</sup>.

El paciente fue sometido a un procedimiento quirúrgico para extraer la muestra biológica, bajo el consentimiento informado del donante y aprobación del comité de ética institucional, y luego se procedió a su procesamiento y expansión. Brevemente, la porción (*punch*) de piel fue cortada en trozos pequeños, de aproximadamente 2 mm y colocada en una placa de cultivo de 100 mm de diámetro, la cual fue pre-tratada durante una hora a temperatura ambiente con una solución estéril de gelatina bovina 0,1% v/v en PBS (NaCl 8 mg, KCl 200 mg, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200 mg y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,14 mg, por litro de solución, pH 7,4). Los explantes fueron cultivados con medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium alta glucosa pH 7.2 suplementado con 44 mM NaHCO<sub>3</sub>, 25 mM HEPES, 2 mM aminoácidos no esenciales, 50 U/ml P/E y 2 mM L-Glutamina y 20% v/v SFB). Éstos se mantuvieron en incubadora de cultivo a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> hasta que los fibroblastos provenientes de la dermis alcanzaron un crecimiento exponencial y cubrieron en un 80% la superficie de la placa. Luego, dichos explantes fueron removidos y se procedió a la amplificación y/o criopreservación de los fibroblastos.



## **Amplificación y criopreservación de fibroblastos dérmicos humanos y fibroblastos embrionarios murinos**

Una vez obtenido el cultivo primario de FD, se procedió a la amplificación de los mismos para obtener un stock adecuado. Para ello, se crecieron las células en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (T25) en medio DMEM suplementado con 10% v/v SFB. Se realizaron cambios de medio cada 2 o 3 días, hasta llegar a confluencia máxima. El pasaje de estos para abrir a nuevas placas y seguir amplificando o su criopreservación se realizó mediante el uso de la enzima peptidasa Tripsina. Brevemente, una vez alcanzada la confluencia en placa deseada, se retiró y descartó el medio presente en la T25, se realizó un lavado suave con 2 ml de PBS y se agregó 1 ml de solución 0,25% Tripsina-EDTA-rojo Fenol. Se realizó una incubación a 37 °C durante 5 minutos hasta observar la disociación total de las células. Luego, se colocaron 9 ml de medio DMEM suplementado con 10% v/v SFB y se transfirieron los 10 ml de solución a un tubo de 15 ml apto para centrifuga y se realizó una centrifugación a 300 x g por 5 minutos a TA. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en volumen suficiente para pasar a nuevas T25 donde se continuó su cultivo. Es crucial la adición de DMEM completo suplementado con 10% v/v SFB, el cual contiene suero, para neutralizar la acción de la Tripsina y evitar que la misma siga fragmentando proteínas clave para la supervivencia celular.

Para la criopreservación de los FD, los mismos se colocaron en 1 ml de DMEM suplementado con 20% v/v SFB y 10% v/v dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich). La suspensión celular suplementada con 10% SFB fue agregada en un criotubo de 1 ml e inmediatamente después se procedió al agregado del DMSO el cual se colocó lentamente y en gotas, de forma de disminuir la muerte celular. Los criotubos fueron rápidamente colocados en un recipiente apropiado para congelar las células, el cual contenía isopropanol y se colocó por 24 horas a -80 °C. De esta manera, se permitió un descenso controlado de la temperatura a razón de 1 °C/minuto lo que aumenta la viabilidad celular. Pasadas las 24 horas, se almacenaron los viales en un tanque de nitrógeno líquido para su almacenamiento a largo plazo.

Para descongelar las células, los viales fueron removidos del tanque de nitrógeno líquido y rápidamente calentados a 37 °C en un baño térmico hasta observarse líquido dentro del tubo. Inmediatamente se transfirió el contenido de cada criotubo a un tubo cónico con 10 ml de DMEM, se centrifugó la suspensión durante 5 minutos a 300 x g, se removió el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 5 ml de DMEM suplementado con 10% v/v SFB, y se sembró las células en 2 T25.

Los procedimientos descriptos en los párrafos anteriores son los mismos que se utilizaron para amplificar y criopreservar fibroblastos embrionarios murinos (MEF).

## Generación de partículas lentivirales- Empaquetado de casete STEMMCA

El uso de vectores lentivirales fue de vital importancia para el desarrollo de esta tesis doctoral ya que tienen la capacidad de infectar tanto células que se encuentran en fase de división celular como células que no. En particular, nuestro objetivo era empaquetar el casete de reprogramación STEMMCA<sup>150,221</sup>, el cual codifica para los genes de reprogramación de Yamanaka (*OCT3/4*, *KLF-4*, *C-MYC* y *SOX-2*).

Para ello, adaptamos un protocolo de preparación de virus que evita el uso de ultracentrífuga<sup>222</sup> ya que no contamos con la misma en nuestra institución. Brevemente, se plaquearon  $6,17 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> HEK293T en 8 placas de cultivo p100 con medio DMEM + 10% SFB. A la mañana siguiente, se realizaron dos lavados con PBS 1x y se colocaron 10 ml de medio DMEM suplementado con 20% SFB y se incubaron a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> hasta el momento de la transfección. Por la tarde, se diluyó el reactivo de transfección X-tremeGene9 (Sigma-Aldrich) en DMEM sin P/S ni SFB en una relación 3:1 considerando 3 µl X-tremeGene9 cada 100 µl de DMEM. En un tubo eppendorf aparte, se mezcló el plásmido STEMCCA junto a los plásmidos empaquetadores (psPAX2 y pMD2.G) en una relación 4:3:1. Se agregó la mezcla de plásmidos a la del X-tremeGene9, se mezcló suavemente y se incubó durante 30 minutos a TA. Luego, se agregaron 750 µl de la mezcla por placa en forma de gotas, se movió la placa con suavidad para homogeneizar el medio y se colocaron nuevamente en la incubadora de cultivo. Al día siguiente, se realizó un cambio de medio de las placas descartando el medio colocado previamente y se agregaron 10 ml de medio DMEM suplementado con 10% SFB sin P/S por placa y se incubaron durante 48 horas. Puesto que la generación de partículas virales ya ha iniciado, se deben tener todas las consideraciones para el apropiado descarte de los reactivos y material utilizado. A las 48 horas, se recogieron los sobrenadantes (SN) en tubos falcon de 50 ml, se realizó una centrifugación a 3000 x g por 10 minutos y se filtró utilizando un filtro de jeringa de 0.45 µm. Luego, se vertieron 8 ml de buffer Sacarosa 10% (50 mM Tris-HCl pH7,4; 100 mM NaCl<sub>2</sub>; 0,5 mM EDTA) en tubos de precipitación para centrifugación y por encima se colocaron, descargando con lentitud e inclinando el tubo para dejar caer el sobrenadante por la pared interna del tubo, 32 ml del SN previamente filtrado. Reservamos el SN restante en heladera para su posterior utilización. Centrifugamos luego a 10000 x g por 4 horas a 4 °C. Finalizada la centrifugación, descartamos el SN y agregamos los 32 ml restantes de SN filtrado que había sido reservado. Centrifugamos nuevamente a 10000 x g por 4 horas a 4 °C. Al

finalizar, descartamos el sobrenadante, dejamos escurriendo la botella boca abajo por 3 minutos a TA y resuspendimos el pellet en 100 µl de DMEM con 20% SFB sin P/S. Dejamos la suspensión ON a 4 °C para finalmente preparar y guardar a -80 °C alícuotas de 10 µl.

## **Verificación del título viral por citometría de flujo**

Se plaquearon  $7,8 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> HEK293T en 6 pocillos de una placa multipocillo de 6 (MWx6) con medio DMEM suplementado con 10% SFB. Al día siguiente, se disgregaron las células de uno de los pocillos con tripsina (incubación a 37 °C por 3 minutos, dilución con medio DMEM con 10% SFB, centrifugación a 300 x g por 5 minutos y posterior resuspensión en 1 ml del mismo medio) y se procedió a contar por el número de células mediante tinción con el colorante vital azul de tripán (Número de células totales al momento de la infección).

A los pocillos restantes se les realizaron los siguientes tratamientos:

- Control. Solamente se renueva el medio.
- 2,5 µl virus STEMCCA (por duplicado). Se agregan 4 ml de medio DMEM + 10% SFB sin P/S + 5 ng/µl polybrene + virus STEMCCA
- 5 µl virus STEMCCA (por duplicado). Se agregan 4 ml de medio DMEM + 10% SFB sin P/S + 5 ng/µl polybrene + virus STEMCCA

El polybrene, o bromuro de hexadimetrina, es un reactivo que favorece el ingreso de vectores retro o lentivirales células de mamíferos dado que actúa como carrier.

A los dos días post-transducción viral se realiza el protocolo de inmunomarcación contra la proteína OCT-4 (codificada en el vector STEMCCA), lo que nos permitirá realizar la titulación del virus. Para ello, las HEK293T se disgregaron con Tripsina como fue explicado anteriormente y, luego de la centrifugación, fijadas en suspensión con formaldehído 4% (pH 7,20) en agua bidestilada a TA por 30 minutos. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS/BSA 0,1%, se permeabilizaron a TA por 45 minutos con una solución que contiene 1% BSA, 10% Suero Normal de Cabra (del inglés, NGS) y 0,1% Triton X-100 y se incubaron por 2 horas con el anticuerpo primario contra OCT-4 (1:50 en una solución conteniendo 1% BSA, 10% suero normal de cabra). Luego, se centrifugaron nuevamente las células y se las incubó por 45 minutos a TA, en oscuridad, con el anticuerpo secundario IgG Alexa Fluor 488-conjugado de cabra anti-ratón (1:400). Al terminar la segunda incubación, se realizaron 3 lavados con PBS/BSA 0,1%, se resuspendieron en la misma solución y se analizaron en un citómetro de flujo BD Accuri C6 (BD biosciences) utilizando IgG normal de ratón como control y el filtro FL-1.

Para una óptima reprogramación es deseable obtener un título viral de alrededor de  $1 \times 10^7$  viriones/ml.

Para el cálculo del título viral se utiliza la siguiente fórmula de acuerdo con el protocolo obtenido del laboratorio del Dr. Gustavo Mostoslavsky del CReM (Center for Regenerative Medicine. Boston University):

$$\text{número de células vivas} \times \% \text{ células OCT4}^+ = \frac{\text{num de viriones}}{\text{ul de virus utilizado}}$$

### **Obtención de CMPih desde FDh por inserción del casete de reprogramación STEMCCA**

Una vez obtenidas partículas lentivirales con un título adecuado para la reprogramación, estas fueron utilizadas para la infección de los FDh portadores de la mutación p.T119I en el gen de *PSEN1*. Para ello, los FDh fueron plaqueados en una densidad de  $8,6 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> en un pocillo de una placa MWx6 previamente tratada con una solución de gelatina 0,1% a TA por 1 hora. Al día siguiente se procedió a la infección realizando los cálculos para obtener una MOI de 1 considerando el título viral obtenido previamente. Para ello utilizamos la siguiente fórmula:

$$MOI = \frac{\text{Titulo viral} \times \text{volumen a utilizar}}{\text{Número de células a infectar}}$$

Se consideró que el número de células disponibles en el pocillo al momento de la infección fue de 100000 habiendo analizado previamente la tasa de división de los FDh y considerando la cantidad de células que habría luego de un día de crecimiento.

El día de la infección se renovó el medio DMEM + 10% SFB sin P/S y se adicionaron 5 ng/μl polybrene + virus STEMCCA. Se dejó incubando ON a 37 °C. Del día 2 a 5 post infección se cambió el medio diariamente, descartando el medio DMEM y pasando a cultivarlas con medio hES [DMEM/F12 (Gibco) suplementado con 20% Knock Out Serum replacement (KSR, Gibco), 2 mM aminoácidos no esenciales (Gibco), 2mM GlutaMAX (Gibco) 50U/mL P/S, 55 mM β-mercaptoetanol y 8 ng/ml factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF, por sus siglas en inglés)], el cual favorece el mantenimiento del estado indiferenciado propio de las CMPih. Al día 6 los FDh fueron levantados con Tripsina y re-plaqueados, en distintas diluciones, en placas de cultivo p100 previamente plaqueadas con MEFi (fibroblastos murinos embrionarios inactivados

mitóticamente) 24 horas antes de depositar los FDh infectados. Las MEFi son importantes como soporte y como capa nutricia y fueron preparadas siguiendo procedimientos estándar<sup>147</sup>. Se continuó cambiando el medio día de por medio con hES hasta empezar a observar potenciales colonias de CMPih (entre los días 10 y 15), momento en el cual se pasó a renovar el medio diariamente hasta el momento del aislamiento clonal (selección mecánica) de las mismas.

Tres de los clones asilados, aquellos de mejor morfología y mayor tasa de proliferación, fueron caracterizados mediante ensayos de fosfatasa alcalina (FA), el perfil de expresión génica de marcadores de pluripotencia (*OCT-4*, *NANOG* y *SOX2*), la evaluación de expresión de las proteínas OCT-4, NANOG, SSEA-3/4, TRA1-60 y TRA 1-81 por medio de ensayos de inmunofluorescencia, la evaluación de la capacidad pluripotente mediante ensayos de diferenciación *in vitro*. Se evaluó además el cariotipo y se analizaron los patrones de expresión de microsatélites para asegurar la correcta derivación de los clones obtenidos de la línea FDh parental (examen de filiación).

### **Co-cultivo con MEFi. Amplificación y criopreservación**

Como se mencionó anteriormente, los MEFi se utilizan como capa nutricia y, al co-cultivar las CMPh sobre ellos, son capaces de mantener las propiedades indiferenciadas de las mismas. Una vez establecida la línea de CMPih y con la finalidad de amplificar su cantidad para realizar un stock y/o ensayos, se deben realizar sucesivos pasajes. Los mismos se realizaron de la misma manera:

El día previo al pasaje (cuando las células están en un 50/60% de confluencia) realizamos el descongelado y plaqueo de los MEFi sobre placas de cultivo celular pre-tratadas durante una hora a temperatura ambiente con una solución estéril de gelatina bovina 0,1% v/v en PBS. Al momento de descongelar, colocamos el criotubo recientemente extraído del tanque de nitrógeno líquido en un baño térmico a 37 °C por unos segundos, hasta observar que solo se mantienen congelados pequeños fragmentos de medio, luego pasamos el contenido del criotubo a un tubo para centrifuga que previamente contenía 4 ml de PBS 1x a TA y centrifugamos a 300 x g por 5 minutos a TA. Al finalizar la centrifugación, descartamos el sobrenadante y resuspendimos el contenido del criotubo en DMEM suplementado con 20% SFB, extrajimos una alícuota para contar por hemocitómetro y resuspendimos las células restantes en volumen necesario para plaquear  $1,7 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. Colocamos inmediatamente las células en incubadora a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> hasta su posterior utilización.

Al día siguiente, si las células llegaron a la confluencia deseada para su pasaje (70/80 % de la placa cubierta) removimos el medio de cultivo (hES), realizamos un

lavado con PBS 1x e incubamos por 1 hora a 37 °C con la enzima Colagenasa (2 mg/ml). Al terminar la incubación, agregamos a la placa PBS 1x con pipeta serológica en cantidad suficiente como para levantar las colonias presentes en la placa. Pasamos luego la suspensión a un tubo de centrifuga y dejamos decantar por 5 minutos a TA. Con cuidado de no aspirar las colonias decantadas, retiramos el sobrenadante y resuspendimos en 1 ml de medio hES fresco, disgregando levemente las colonias con un tip p1000. Finalmente, llevamos a 5 ml con medio hES fresco/placa con 10  $\mu$ M Y-27632 y distribuimos los agregados celulares (clumps) en las placas con MEFi. Colocamos inmediatamente las células en incubadora a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> y cambiamos el medio de cultivo hES diariamente. Se ha demostrado que la adición de la molécula Y-27632, inhibidor de la vía de señalización de ROCK (Rho associated coiled coil protein kinase), promueve la supervivencia de las CMPH luego de su criopreservación y pasaje<sup>223,224</sup>.

En caso de querer criopreservar las CMPH, realizamos el disgregado de las colonias con Colagenasa como fue descripto previamente, pero luego de resuspender y disgregar suavemente las células en medio hES fresco procedimos a colocarlas en un criotubo junto con 20% SFB y 10% DMSO (depositado suavemente en gotas) y 10  $\mu$ M Y-27632. Una vez homogeneizado el contenido del criotubo, se colocó este en un recipiente con isopropanol y se dejó en un freezer -80 °C por 24 horas para luego ser pasado a una caja contenedora en un tanque de nitrógeno líquido para su almacenamiento definitivo.

### **Cultivo y criopreservación de CMPih utilizando medios comerciales definidos (condición *feeder-free*)**

Tradicionalmente, las CMPih se co-cultivaron sobre una capa nutricia de MEFi como fue descripto previamente. Sin embargo, el avance en el uso de estas con un enfoque terapéutico llevó al desarrollo de matrices y medios de cultivos comerciales definidos que presentaban ciertas ventajas con respecto al cultivo sobre MEFi, asociados a la reproducibilidad experimental y las buenas prácticas de manufactura<sup>225,226</sup>. Si bien las condiciones de cultivo no afectan las características de las CMPH<sup>225,227</sup>, se presentan diferencias en la metodología y el manejo de las células que se describirán a continuación.

Cuando las CMPih fueron cultivadas en condiciones “*feeder-free*” fueron crecidas sobre placas de cultivo de múltiples pocillos pre-tratadas por una hora a 37 °C con la matriz extracelular comercial Geltrex LDEV-free (Gibco) (1/100) utilizando medios de cultivo comerciales totalmente definidos como es el mTeSR1 (Stem Cell Technologies) en incubadora de cultivo a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Una vez alcanzada una confluencia del 70-80% se procedió al pasaje de las CMPih a un nuevo pocillo. Esto se puede realizar de varias maneras de acuerdo con el ensayo a realizar:

- Rutinariamente, para la amplificación o mantenimiento del cultivo, las CMPih se disgregaron incubándolas con 1 ml de una solución PBS-EDTA (Versene, Thermo Fisher Scientific) durante 4-5 minutos. Se aspiró luego el Versene y se resuspendieron las células en la cantidad de medio necesaria adicionado con 10  $\mu$ M Y-27632, y se repartieron en los nuevos pocillos previamente pre-tratados con Geltrex con pipeta serológica para mantener la integridad de los cúmulos de células.
- Cuando los experimentos requirieron plaquear las células de forma unicelular, realizamos un lavado con PBS 1x y se disgregamos las CMPih incubándolas con 1 ml de Acutasa 1x (Stemcell Technologies) por 4-7 minutos a 37 °C hasta observar el desprendimiento de las células de la placa de cultivo. Luego, se diluyeron las células en 4 ml de PBS 1x, realizamos una centrifugación a 200 x g por 5 minutos y las resuspendimos en 1 ml de medio mTeSR1. Contamos las células con hemocitómetro y una vez obtenida la cantidad total de células agregamos mTeSR1 suplementado con 10  $\mu$ M Y-27632 hasta el volumen necesario y plaqueamos el número deseado de CMPih en las placas multipocillo.

Por otro lado, para criopreservar las CMPih, las levantamos con el método de preferencia y realizamos una mezcla con 700  $\mu$ l de suspensión celular en medio mTeSR1, 20% SBF (200  $\mu$ l), 10% DMSO (100  $\mu$ l) y 10  $\mu$ M Y-27632. Al descongelar, luego de la centrifugación resuspendimos siempre las células en medio mTeSR1 suplementado con 10  $\mu$ M Y-27632 para mantener la viabilidad celular<sup>223,224,228</sup>.

## PCR a tiempo final

Para la PCR a punto final se preparó una reacción en un volumen final de 25  $\mu$ l, conteniendo 100 ng del ADN a testear, 0,2  $\mu$ M de los *primers* forward y reverse, 0,4 mM de dNTPs (mezcla equimolar de los cuatro desoxinucleótidos trifosfatados), 1x de *buffer* de PCR (Easy taq. Trans), 0,25 unidades de Taq ADN Polimerasa (Easy taq. Trans) y se llevó a volumen con agua milliQ filtrada.

Las condiciones de PCR fueron una desnaturalización inicial a 94 °C durante 30 segundos; luego una serie de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, *annealing* a 53-62 °C (dependiendo del set de oligonucleótidos o *primers* utilizados, Tabla 7), durante 30 segundos, elongación a 72 °C durante de 1 minuto por cada 1000 pb; finalizando en un ciclo único de elongación final de 72 °C durante 5 minutos.

| NOMBRE DEL PRIMER | SECUENCIA (5'a 3')   |
|-------------------|----------------------|
| PSEN1 EX 5-Fw     | GTGGTAATGTGGTTGGTGAT |

|                |                        |
|----------------|------------------------|
| PSEN1 EX 5-Rev | CCCAACCATAAGAAGAACAG   |
| PSEN1 EX 7-Fw  | GGGAGCCATCACATTATTC    |
| PSEN1 EX 7-Rev | CCTGTGACAAACAAATTATCAG |

**Tabla 6. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de la región genómica de *PSEN1*.**

## Ensayo de fosfatasa alcalina

Se ha demostrado que las CMPh, entre ellas las CMEh y las CMPih, presentan una alta tasa de actividad de la enzima fosfatasa alcalina (FA), la cual va disminuyendo a medida que las células cambian de un estado pluripotente hacia un linaje definido<sup>229</sup>. Para evaluar la actividad de la FA utilizamos el kit de Fosfatasa alcalina (86R-1KT. Sigma Aldrich) siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, una vez obtenidas colonias con morfología adecuada en condiciones *feeder-free* o en co-cultivo con MEFi, procedimos a realizar el ensayo como se describe a continuación.

Preparamos una solución de sal diazodium (nitrito de sodio, solico+on FRV provista por el fabricante en una relación 1:1) y dejamos incubar, post mezclar por inversión, por 2 minutos a TA. Una vez pasados los 2 minutos, se adicionaron 0,2 ml de esta sal a 4,5 ml de agua bidestilada, se agregaron 0,1 ml de solución AS-BL naphthol alcalino (provisto por el fabricante) y se mezcló por inversión (Solución de reacción).

Por otro lado, se realizó un lavado con PBS 1x a la placa que contiene las células y se fijaron las mismas por 30 segundos con una solución de fijación [solución citrato (provista por el fabricante) con acetona y formaldehído 37% en una relación 3,1:8,1:1]. Transcurridos los 30 segundos, realizamos un lavado con agua bidestilada por 45 segundos y luego incubamos por 15 minutos a TA en oscuridad con la solución de reacción. Luego de realizar un nuevo lavado con agua bidestilada por 2 minutos incubamos las células durante 2 minutos, en agitación, con 1 ml de solución Hematoxilina GIII No.3 (provista por el fabricante). Realizamos un último lavado con agua bidestilada, dejamos secar al aire y observamos al microscopio invertido.

## Ensayo de diferenciación *in vitro* de CMPih basado en la formación de cuerpos embrioides generados en condiciones de cultivo *feeder-free*

Para demostrar la pluripotencia de las CMPih se procedió a realizar un ensayo de diferenciación *in vitro* no dirigida, en suspensión, partiendo de condiciones libres de MEFi puesto a punto en nuestro laboratorio<sup>230</sup>.



Brevemente, se crecieron las células adheridas con medio mTeSR1 sobre Geltrex en un pocillo de placa de cultivo multipocillo de 6 hasta obtener una confluencia del 80%. En ese momento se realizó un lavado con PBS 1x y se incubó durante 3 minutos a 37 °C con 500 µl de Dispasa (0,5 mg/ml, Thermo Fisher Scientific). Al finalizar, se levantaron las células raspándolas con un raspador de células plástico estéril (*cell scraper*), dejándolas en agrupaciones de células (*cell clumps*), y se las pasó gentilmente a un tubo para centrifuga de 10 ml utilizando medio KSR-EB (DMEM/F12 suplementado con 200 mM GlutaMAX, 20% KSR, 10 mM aminoácidos no esenciales y 0,1 mM β-mercaptoetanol). Se realizó una centrifugación a 200 x g durante 5 minutos a TA y luego se resuspendieron las células gentilmente en medio KSR-EB con una pipeta serológica, de modo de no disgregar los grupos celulares, los cuales se colocaron en una placa no adherente de 60 mm y se incubaron a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. Los agregados celulares crecidos en suspensión generan estructuras en forma de esferas llamadas cuerpos embrioides o embryoid bodies (EB). El cambio de medio del cultivo de los EB se realizó cada 2 días y al llegar al día 4 se adhirieron los mismos a una placa de cultivo multipocillo completa de 24 pocillos pre-tratada por 1 hora a TA con gelatina bovina 0,1% v/v en PBS. Utilizamos medio KSR-EB suplementado con 20% SFB asegurándonos de colocar 1-2 cuerpos embrioides por pocillo. El cambio de medio se realizó día de por medio con 300 µl de medio KSR-EB + 20% SFB fresco hasta el día 21, momento en el cual los EB diferenciados se fijaron para realizar la posterior inmunomarcación de proteínas específicas de linaje (endodermo, ectodermo y mesodermo).

## **Inmunomarcaciones y microscopía de fluorescencia**

Para realizar inmunomarcaciones las células se cultivaron en placas de cultivo de 24 pocillos (Corning) pretratadas con Geltrex por 1 hora a 37 °C hasta llegar a la confluencia óptima. En ese momento, se retiró el medio de cultivo, se realizó un lavado con PBS 1x y se procedió a fijar las mismas colocando en cada pocillo 300 µl de formaldehído 4% (pH 7,20) en agua bidestilada, a TA por 30 minutos. Luego, se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS/BSA 0,1%, se permeabilizaron las células a TA por 45 minutos con una solución que contiene 1% BSA, 10% NGS y 0,1% Triton X-100 y se incubaron ON a 4 °C con el anticuerpo primario correspondiente (1:200/400 en una solución conteniendo 1% BSA, 10% suero normal de cabra) (Tabla 8). Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS/BSA 0,1%, y se las incubó por 45 min a TA, en oscuridad, con el anticuerpo secundario correspondiente (1:400) (Tabla 7). La tinción de los núcleos se realizó con 4-6-diamidino-2-fenil-indol (DAPI) (Sigma) a una concentración final de 200 ng/ml, incubado en simultaneidad con

los anticuerpos secundarios. Al terminar la segunda incubación, se realizaron 3 lavados con PBS/BSA 0,1%, se colocó volumen apropiado de PBS 1x y se guardó en oscuridad a 4 °C hasta el momento de observación y análisis.

El análisis de las imágenes se realizó con el microscopio invertido de fluorescencia con lámpara de mercurio (Nikon Eclipse TE2000-S). Las imágenes fueron obtenidas con una cámara Nikon DXN1200F acoplada al microscopio y controlada por el software EclipseNet versión 1.20.0 Build 61.

| ANTICUERPO  | ESPECIE-TIPO      | MARCA          | Nº CATALOGO | DILUCION DE USO       |
|---|-------------------|----------------|-------------|-----------------------|
| <b>Nanog</b>  | Conejo policlonal | Abcam          | ab21624     | 1:200                 |
| <b>Oct 3/4</b>  | Ratón monoclonal  | Santa Cruz     | sc-5279     | 1:400                 |
| <b>SSEA-4</b>   | Ratón monoclonal  | Santa Cruz     | sc-21704    | 1:400                 |
| <b>Tra 1-60</b>   | Ratón monoclonal  | Santa Cruz     | sc-21705    | 1:400                 |
| <b>Actina de músculo liso (<math>\alpha</math>-SMA)</b> | Conejo monoclonal | Abcam          | ab124964    | 1:400                 |
| <b><math>\beta</math>-tubulina III (TUBJ-1)</b>         | Ratón monoclonal  | Covance        | MMS-435P    | 1:1000                |
| <b>Alfafetoproteína (AFP)</b>                           | Ratón monoclonal  | Santa Cruz     | sc-166325   | 1:400                 |
| <b>Nestina</b>  | Ratón monoclonal  | Millipore      | MAB5326     | 1:400                 |
| <b>Sox2</b>   | Conejo policlonal | Abcam          | ab97959     | 1:400                 |
| <b>Sox1</b>   | Ratón monoclonal  | US biological  | S5364-01    | 1:400                 |
| <b>Pax6</b>   | Conejo policlonal | Abcam          | ab5790      | 1:400                 |
| <b>Map2</b>   | Ratón monoclonal  | Sigma          | M1406       | 1:400                 |
| <b>Map5 (MAP1B)</b>                                     | Ratón monoclonal  | Sigma          | M1406       | 1:200(O)-<br>1:400(C) |
| <b>TBR2</b>   | Conejo monoclonal | Abcam          | ab216870    | 1:200(O)-<br>1:400(C) |
| <b>TBR1</b>   | Conejo monoclonal | Invitrogen     | MA532564    | 1:200(O)-<br>1:400(C) |
| <b>CTIP2</b>  | Rata monoclonal   | Abcam          | ab18465     | 1:200(O)-<br>1:400(C) |
| <b>SATB2</b>  | Conejo monoclonal | Abcam          | ab92446     | 1:200(O)-<br>1:400(C) |
| <b>GFAP</b>   | Ratón monoclonal  | Cell signaling | 3670S       | 1:200(O)-<br>1:400(C) |
| <b>NeuN</b>   | Conejo monoclonal | Abcam          | ab209898    | 1:200(O)-<br>1:400(C) |
| <b>A<math>\beta</math>-42</b>                           | Conejo policlonal | Abcam          | ab12267     | 1:200(O)-<br>1:400(C) |
| <b><math>\alpha</math>-IgG de Ratón Alexa 488</b>       | Cabra policlonal  | Invitrogen     | A-11029     | 1:400                 |

|  |                  |            |         |       |
|--|------------------|------------|---------|-------|
| <b><math>\alpha</math>-IgM de Ratón<br/>Alexa 598</b>  | Cabra policlonal | Invitrogen | A-21042 | 1:400 |
| <b><math>\alpha</math>-IgG de Conejo<br/>Alexa 594</b> | Cabra policlonal | Invitrogen | A-11012 | 1:400 |
| <b><math>\alpha</math>-IgG de Conejo<br/>Alexa 488</b> | Cabra policlonal | Invitrogen | A-11008 | 1:400 |
| <b><math>\alpha</math>-IgG de Ratón<br/>Alexa 647</b>  | Cabra policlonal | Invitrogen | A-21235 | 1:400 |

**Tabla 7. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en las inmunomarcaciones por fluorescencia. (O) organoides cerebrales (C) Cultivos 2D.**

## Extracción de ARN total

Las muestras de ARN total se extrajeron utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Para ello, se removió el medio de cultivo celular, se realizó un lavado con PBS 1X a TA y se agregaron 800  $\mu$ l de TRIzol por muestra directamente en la placa para lisar las células. Se incubaron durante 5 minutos a TA con el fin de permitir la correcta disociación de los complejos núcleo-proteica, se homogeneizaron con micropipeta y se procedió a guardarlas a -20 °C o se continuó con su procesamiento.

La extracción de ARN se continuó agregando 200  $\mu$ l de cloroformo por cada 1 ml de TRIzol y homogeneizando las muestras por inversión durante al menos 10 segundos. Se procedió luego a realizar una incubación de 2-3 minutos a TA para luego centrifugar en frío a 4 °C durante 15 minutos a 12000 x g. Al culminar la centrifugación se observó la presencia de 3 fases (fase acuosa que contiene el ARN, interfase que contiene ADN y proteínas y fase orgánica que contiene proteínas) y se procedió a transferir cuidadosamente la fase acuosa superior transparente a un nuevo tubo eppendorf de 1,5 ml. Posteriormente, se agregaron 500  $\mu$ l de isopropanol 100% por cada 1 ml de TRIzol, se homogeneizó nuevamente por inversión y se realizó una incubación durante 10 minutos a TA para precipitar el ARN. Seguidamente, centrifugamos a 12000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Se removió el sobrenadante y se lavó el *pellet* con 1 ml de etanol 75% por cada 1 ml de TRIzol, se agitó con vortex brevemente para luego centrifugar los tubos a 7500 x g durante 5 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se secó el *pellet* durante 10 minutos. Finalmente, se resuspendió el ARN en 10-30  $\mu$ l de agua milliQ libre de ARNasas, se incubó en baño seco a 55 °C durante 15 minutos, para luego cuantificar su concentración (ng de ARN/ $\mu$ l de solución) utilizando un espectrómetro NanoDrop 1000 controlado por el software ND-1000. Verificamos también que la relación DO260/DO280 fuese de entre 1,7 y 2 para asegurarnos una elevada pureza del ARN obtenido. El ARN fue conservado a -80 °C hasta su utilización.

## Retrotranscripción de ARNm

El ADN copia (ADNc) se sintetizó utilizando la enzima transcriptasa reversa MMLV a una concentración de 200 U/μl (Promega). Se utilizaron 1000 ng de ARN total como templado de la retrotranscripción (RT), oligonucleótidos al azar (random primers, Invitrogen) a una concentración de 10 ng/μl y 0,4 mM de dNTPs (mezcla equimolar de los cuatro desoxinucleótidos trifosfatados). Se incubó la mezcla a 65 °C durante 3 minutos para desnaturalizar las moléculas de ARN y posteriormente se incubó en hielo durante 5 minutos para evitar la formación de estructuras secundarias. Luego, se agregaron 5 μl de mezcla conteniendo: 1 μl de transcriptasa reversa MMLV (200U, Promega) y 4 μl de buffer de MMLV 5X (Promega). La RT consistió en un ciclo de 25 °C durante 5 minutos, un ciclo de 37 °C durante una hora y un ciclo final de 70°C durante 15 minutos. Al finalizar la muestra se llevó a un volumen final de 100 μl (dilución 1/5), mediante el agregado de 80 μl de agua milliQ libre de ADNasas.

## PCR cuantitativa (qPCR)

Para los análisis de expresión de mensajeros por PCR cuantitativa, se colocaron 1,5 μl de la muestra previamente diluida de ADNc, 7,5 μl de Mastermix SYBR green 2X (ROCHE) y 1,5 μl de cada secuencia de oligonucleótidos (primers) 5 μM forward y reverse en un volumen final de 15 μl. Para los ciclos de temperatura se utilizó el termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems). Brevemente, tras un primer paso de activación de la enzima UDG (uracil-DNA glycosylase) a 50 °C durante 2 minutos para degradación de posibles amplicones contaminantes (que contienen uracilo), se procedió a realizar la desnaturalización inicial a 94 °C durante 10 minutos; y luego una serie de 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 15 segundos, *annealing* y extensión a 60 °C durante 1 minuto. Al final de cada uno de estos ciclos, el equipo realizó la lectura de los niveles de fluorescencia.

Para los análisis del capítulo 2, para cada uno de los ADNc analizados se realizaron curvas de temperatura de apareamiento para verificar la presencia de un único producto de amplificación, lo que fue corroborado luego mediante corridas en geles de agarosa (1,5%) teñidos con bromuro de etidio. Para la cuantificación se utilizó el software libre LinReg, para el cual se calcularon las eficiencias de cada par de “primers” en cada PCR realizada, calculando los niveles teóricos de ADNc iniciales en cada condición. Los

valores fueron normalizados utilizando la expresión del gen RPL7 (“housekeeping”) y cada experimento se realizó con al menos tres réplicas biológicas independientes.

En la Tabla 8 se listan los oligonucleótidos (primers) utilizados para amplificar y cuantificar por qPCR los niveles de expresión de ARNm de los genes estudiados.

| GEN                            | FORWARD (5'a 3')        | REVERSE (5'a 3')         |
|--------------------------------|-------------------------|--------------------------|
| <i>RPL7</i>                    | AATGGCGAGGATGGCAAG      | TGACGAAGGCGAAGAAGC       |
| <i>PSEN1</i>                   | GACGACCCCAGGGTAACTC     | ACTGACTTAATGGTAGCCACGA   |
| <i>APP</i>                     | TCTCGTTCTTGACAAGTGCAA   | GCAAGTTGGTACTCTTCTCACTG  |
| <i>NANOG</i>                   | AAAGAATCTTCACCTATGCC    | GAAGGAAGAGGAGAGACAGT     |
| <i>OCT-4</i>                   | CTGGGTTGATCCTCGGACCT    | CACAGAACTCATACGGCGGG     |
| <i>SOX2</i>                    | GGCAATAGCATGGCGAGC      | TTCATGTGCGCGTAACTGTC     |
| <i>OCT4-KLF4</i><br>(STEMCCA)  | CAACGAGAGGATTTTGAGGC    | ATCGTTGAACTCCTCGGTCTCTCT |
| <i>SOX2-c-MYC</i><br>(STEMCCA) | TTGGCTCCATGGGTTTCGGTG   | AAGGGTGTGACCGCAACGTAGG   |
| <i>AFP</i>                     | ACTATTGGCCTGTGGCGAGGGA  | AAGCATGGCCTCCTGTTGGC     |
| <i>SMA</i>                     | TTGAGAAGAGTTACGAGTTG    | GGACATTGTTAGCATAGAGG     |
| <i>NESTINA</i>                 | CAGCTGGCGCACCTCAAGATG   | AGGGAAGTTGGGCTCAGGACTGG  |
| <i>TUJ-1</i>                   | TGGGCGACTCGGACTTGC      | CCACTCTGACCAAAGATGAAATTG |
| <i>MAP2</i>                    | CTCAGCACCGCTAACAGAGG    | CATTGGCGCTTCGGACAAG      |
| <i>SATB2</i>                   | GCAGTTGGACGGCTCTCTT     | CACCTTCCCAGCTTGATTATTCC  |
| <i>CTIP2</i>                   | TCCAGCTACATTTGCACAACA   | GCTCCAGGTAGATGCGGAAG     |
| <i>TBR1</i>                    | CCGCCTACCAGAACACGGAT    | TCAGGCGGTCCATGTACAG      |
| <i>TBR2</i>                    | CGGGATCTTGCGGAGGACTGG   | AGTGGGCAGTGGGATTGAGTC    |
| <i>CUX1</i>                    | GAAGAACCAAGCCGAAACCAT   | AGGCTCTGAACCTTATGCTCA    |
| <i>ACP5</i>                    | GATCCACAGACCAATGTGTC    | CCAGCACGTAGTCCTCCCT      |
| <i>ICAM4</i>                   | GGTGGGCTACTTGGTGGTG     | GCAAACCTCGTAGGTCAAGGTCA  |
| <i>HSPA6</i>                   | CAAGGTGCGCGTATGCTAC     | GTCATTGATGATCCGCAACAC    |
| <i>NOS3</i>                    | TGATGGCGAAGCGAGTGAAG    | ACTCATCCATACACAGGACCC    |
| <i>TUBA4A</i>                  | CGGCTCTCTGTTGACTATGGC   | GGCGCTCGATGTCTAGGTT      |
| <i>OPRM1</i>                   | CAGTGCTCATCATTACCGTGT   | CTGGGATTGTAACCAAGGCTTTA  |
| <i>TMEM87B</i>                 | CTGCATCAGATTGGCCCCATA   | TCGCAGAAATCAACTCCGCAA    |
| <i>ADAMTS15</i>                | CCTGGACCCCTTACAAGCCG    | GGAACCTTGACCATTGACTCGTC  |
| <i>TRPC6</i>                   | GTGATCGCTCCACAAGCCTAT   | CTGCCAACTGTAGGGCATTCT    |
| <i>GRIN2A</i>                  | GACCCCAAGAGCCTCATCAC    | CTGGATGGACGCTCCAAACT     |
| <i>PROKR2</i>                  | GTCTGCGGCATCGGTAACCTT   | CCGTACCACGTAGTAGTCCAT    |
| <i>RGPD2</i>                   | CAGCTAACGTGGAACACTTGA   | GGAAGAAGGCTCTCTCTCTCA    |
| <i>GPD1</i>                    | CCAGGGACAACCTCTGAAAGA   | TTGGCGAAGGCTATCATCTCC    |
| <i>THSD1</i>                   | TGTGACTATGTTCTTGGAGAAGC | GTGTCCCATTAGCACCATCAAAA  |

**Tabla 8. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en qPCR.**

## Cosecha de células en metafase para citogenética

Para evaluar la presencia o ausencia de anomalías cromosómicas causadas por el proceso de reprogramación celular, preparamos las células para su posterior análisis de cariotipo, el cual fue realizado por la citogenetista María Ziembar en el Laboratorio de Citogenética Kromos (Ciudad de Buenos Aires, Argentina).

Para ello, se colocaron  $3 \times 10^5$  células en una placa de cultivo de 35 mm de diámetro previamente tratada con Geltrex (Gibco) y se realizaron cambios de medios diarios hasta alcanzar una confluencia de aproximadamente el 70%. Ese día, se agregaron 4 gotas de Colchicina ( $50 \mu\text{g/ml}$ ) utilizando una jeringa de 1 ml y se dejó incubar las células por 5 horas. Al finalizar, se retiró el medio y se levantaron las células utilizando Tripsina. Una vez levantadas, las células se recolectaron en un tubo estéril y se centrifugaron a  $300 \times g$  por 15 minutos a TA. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 5 ml de solución de citrato de sodio y se homogeneizó gentilmente para dejar incubando por 10 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Al finalizar, se agregaron 10 gotas de fijador Carnoy (3:1 partes de metanol: ac. Acético glacial) en campana y se homogeneizó por inversión. Se centrifugó una vez más a  $300 \times g$  por 15 minutos a TA y se descartó el sobrenadante. Para finalizar, se resuspendieron las células en 5 ml de fijador Carnoy y se mantuvieron a  $-20^\circ\text{C}$  hasta el momento del análisis citogenético.

### **Extracción de muestras para análisis de filiación por estudio de microsatélites**

Tanto las CMPih como los fibroblastos de los que se obtuvieron se cultivaron en 1 pocillo de placa multipocillo de 6 de acuerdo con cómo fue descripto anteriormente. Una vez obtenida una confluencia del 90-100%, las células fueron levantadas unicelulares utilizando la enzima Acutasa 1x y se realizó una centrifugación a velocidad máxima por 90 segundos. Se retiró el sobrenadante y se lavaron con PBS 1x a TA para volver a centrifugarlas a máxima velocidad por 90 segundos. Finalmente, se retiró el sobrenadante y se guardaron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su análisis. El análisis de filiación fue realizado por el servicio del Laboratorio de Huellas Digitales Genéticas (Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires).

### **Diferenciación de CMPih a células madre neurales (CMN) utilizando un método comercial**

La derivación a CMN a partir de las líneas de CMPih se realizó mediante la utilización del kit comercial PSC Neural Induction Medium (Núm. Cat. A1647801, Thermo Fisher Scientific), en dos etapas. Durante la primera etapa de inducción neural, se plaquearon CMPih previamente disgregadas con Versene 1x en un pocillo de una placa de cultivo de 6 pocillos previamente tratada con Geltrex en presencia del inhibidor de la vía de ROCK Y-27632 a una concentración final de  $10 \mu\text{M}$  y se dejaron crecer en mTeSR1 hasta alcanzar una confluencia del 50% de la placa. Se realizó luego un cambio a medio

de inducción neural (Neurobasal más el agregado de un 2% del suplemento de inducción neural provisto por el kit) y se renovó el medio día de por medio hasta que las células llegaran a una confluencia del 100% (Día 6), limpiando el cultivo de fenotipos celulares no deseados. Por los siguientes dos días, se procedió a cambiar el medio diariamente. En día 7, las células fueron disgregadas con Acutasa 1x y plaqueadas nuevamente en un pocillo de placa de 6 pocillos pre-tratadas con Geltrex a una densidad de  $2 \times 10^6$  células por pocillo agregando Y-27632 (5  $\mu$ M) al momento del pasaje. El cambio de medio se realizó día de por medio con medio de expansión neural [Neurobasal/DMEM-F12 (1:1) y 2% del suplemento del kit PSC Neural Induction Medium]. En este punto, las CMN obtenidas se amplificaron, validaron y criopreservaron en criotubos de 2 ml con 10% de DMSO (Sigma) y Y-27632 (5  $\mu$ M).

Una vez obtenidas, el mantenimiento de las CMN se realizó cultivándolas en placas de cultivo pre-tratadas con el sustrato comercial Geltrex utilizando el medio de cultivo para CMN [DMEM/F12, B27 1x, N2 1x, P/S 2 mM, GlutaMAX 2 mM, aminoácidos no esenciales 2 mM, factor de crecimiento epidérmico (EGF) 20 ng/ml y factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) 20 ng/ml (Gibco)] con cambio día de por medio. Al llegar a una confluencia máxima del 80% se procedió a su apertura con Acutasa 1x por 4 minutos a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>.

En el caso de observar la aparición de una segunda población celular no deseada adaptamos el protocolo de pasaje para priorizar la selección y supervivencia de CMN. Brevemente, se realizó un lavado con PBS 1x, se colocó Acutasa 1x por 1 minuto, se removieron las células que se levantaron y se volvió a incubar con Acutasa 1x por 4 minutos más. Las células que se recuperaron luego de la segunda incubación se mantuvieron para su posterior utilización.

## **Diferenciación de CMN a neuronas**

Para la obtención de neuronas a partir de CMN, disgregamos las CMN con Acutasa 1x, las sembramos a una confluencia del 30% en placas de cultivo adherentes pre-tratadas con Geltrex (1 hora a 37°C) y las cultivamos durante 30 días. El cambio de medio se realizó día de por medio utilizando un medio de diferenciación neuronal conteniendo Neurobasal, B27 1x, Ácido Ascórbico (35,2 ng/mL), GlutaMAX (2 mM), aminoácidos no esenciales (2 mM), P/S (2 mM), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) (20 ng/mL) y factor neurotrófico derivado de glía (GDNF) (20 ng/mL) (Gibco).

## Diferenciación directa de CMPih a neuronas corticales

La diferenciación de CMPih a células corticales se realizó siguiendo el protocolo descrito por Shi *et al*<sup>170</sup>, con algunas modificaciones<sup>231,232</sup>.

Se disociaron unicelularmente CMPih utilizando Acutasa 1x, se sembraron  $5 \times 10^5$  células en placas multipocillo de 12 pre-tratadas con Geltrex (1 hora a 37 °C) y se cultivaron con mTeSR1 suplementado con 10  $\mu$ M Y-27632. A la mañana siguiente, se observó la presencia de una monocapa, se renovó el medio mTeSR1 sin Y-27632 y por la tarde se inició la diferenciación neural.

El cambio de medio se realizó diariamente utilizando un medio de inducción neural conteniendo DMEM-F12 y Neurobasal (1:1), B27 0,5x, N2 0,5x, Insulina (5  $\mu$ g/mL), GlutaMAX (2 mM), aminoácidos no esenciales (2 mM), P/S (2 mM), 2-mercaptoetanol (100  $\mu$ M) de base y agregando los suplementos SB431542 (10  $\mu$ M) y LDN193189 (10 nM).

Al observar la aparición de neurorosetas definidas, se procedió a remover el medio, realizar un lavado con PBS 1x y a incubar con Acutasa 1x a 37 °C por 3 minutos. Luego, se levantaron las neurorosetas por *spray-off* de PBS 1x dirigido, levantándolas y pasándolas a un eppendorf estéril. Se realizó una centrifugación a 160 x g por 4 minutos a TA, se retiró el PBS y se resuspendió en el medio de inducción neural sin SB431542 ni LDN193189. Se disgregaron levemente las neurorosetas, se plaquearon en un pocillo de placa multipocillo de 6 pre-tratada con Geltrex y se colocaron en estufa de cultivo a 37 °C.

Iniciando al día siguiente y continuando por 4 días, se realizó un cambio de medio diario con el agregado de bFGF (20 ng/mL) para promover la expansión de las neurorosetas. Pasados esos 4 días, se procedió al cambio de medio día de por medio hasta finalizar el protocolo. Se procuró abrir las células como se explicó anteriormente una vez cada 10 días aproximadamente hasta llegar a día 50, momento en que se mantuvieron en el mismo pocillo hasta la finalización del protocolo (Día 70).

## Protocolo generación de organoides cerebrales

La diferenciación de CMPih a células corticales se realizó siguiendo los protocolos de Lancaster *et al.*, actualizados<sup>179,180</sup>.

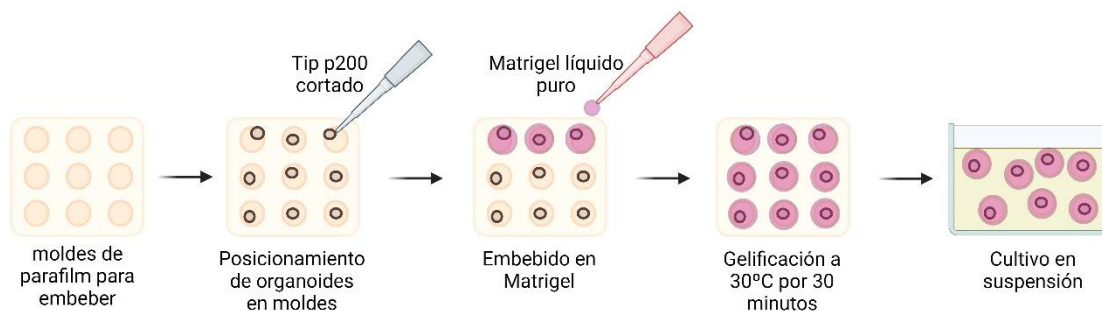
Se disociaron unicelularmente las CMPih utilizando Acutasa 1x y se sembraron  $2,1 \times 10^4$  células en placas multipocillo de 96 de ultra baja adherencia (Corning) en medio hES con bajo bFGF (4 ng/ml) y sin P/S, en conjunto con microfibrillas de hilo de sutura (Vicryl. Ethicon) generadas manualmente por raspado con bisturí en condiciones de



esterilidad. Se realizó un único cambio de medio a los 3 días del inicio del protocolo, inclinando la placa y renovando parcialmente el medio para evitar la pérdida de los cúmulos celulares asociados a las microfibrillas.

En el día 6, utilizando un tip de p200 cortado, estéril, se pasaron los cúmulos individualmente a placas de multipocillo de 24 pre-tratadas con una solución de anti-adherencia (StemCell Technologies) (45 minutos a 37 °C y posterior lavado con PBS 1x) que contenían 500 µL de solución de inducción neural [DMEM-F12, N2 1x, solución de heparina en DMEM-F12 (1 µg/ml), GlutaMAX (2 mM) y aminoácidos no esenciales (2 mM)] y se procedió a realizar cambios de medio día de por medio.

En el día 11, se embebieron los organoides en Matrigel (Corning) puro. Para eso, y considerando que los medios no contienen antibiótico hasta el día 13, se esterilizó un cuadrado de Parafilm (Sigma-Aldrich) del tamaño de una placa de 60 mm de diámetro con alcohol y UV y se la dispuso sobre una caja estéril de tips de p200 para generar un molde. En cada uno de los pocillos generados se colocó un único organoide utilizando un tip de p200 cortado y se retiró el líquido excedente con un tip p20 para evitar la dilución del Matrigel. Acto seguido, se colocó una gota de 30 µl en cada pocillo y se ubicó el organoide en el centro de la gota de Matrigel, utilizando un tip de p10. Se dejó polimerizar por 30 minutos a 37 °C y se colocó en una placa p100 con solución de inducción neural (Figura 24).



**Figura 24. Embebido de organoides en Matrigel.** El esquema muestra el proceso de embebido de los organoides cerebrales a día 11. Adaptado de <sup>233</sup>.

2-3 días después (día 13-14) se pasó a medio de diferenciación neural sin vitamina A [DMEM-F12, Neurobasal, N2 1x, B27 sin Vitamina A 2x, Insulina, 2-mercaptoetanol, P/S (2mM), GlutaMAX (2 mM) y aminoácidos no esenciales (2 mM)] suplementado con CHIR99021 (3 µM) por los primeros 3 días, para luego continuar con medio de diferenciación sin vitamina A hasta el día 25, cambiando el medio día de por medio. En día 18, las placas se colocaron sobre un agitador orbital resistente a altas concentraciones de CO<sub>2</sub> y humedad apto para uso continuo en incubadoras de cultivo (Thermo Fisher Scientific, modelo 88881102. Cat. Fisher # 88-881-102). En día 25, se cambió el medio a medio de diferenciación neural con Vitamina A [DMEM-F12, Neurobasal, N2 1x, B27 2x,

Insulina, HEPES (0,01M) 2-mercaptoetanol, ácido ascórbico (0,4mM), P/S (2mM), GlutaMAX (2 mM) y aminoácidos no esenciales (2 mM)]. A partir de este momento, el cambio de medio se realizó dos veces a la semana y a partir del día 40 se agregaron 100 µl de Matrigel puro cada 5 ml de medio hasta el fin del protocolo (día 90).

### **Fijación de organoides cerebrales y corte en criostato**

Al llegar al día 90, se seleccionaron 2/3 organoides por placa y se les realizó un lavado con PBS 1x y se los pasó con cuidado, utilizando un tip de p1000 cortado a un eppendorf estéril, donde se los dejó 24 horas en PFA 4%. Pasadas las 24 horas, se removió el PFA 4% y se los dejó ON en PBS 1x. Al finalizar, se realizó un pasaje gradual de sacarosa a medio de montaje (CRYOPLAST, Biopack) dejando embeber ON los organoides en las soluciones:

Sacarosa 15% → Sacarosa 30% → Sacarosa: CRYOPLAST → Armar taco con cryoplast.

Para el armado del taco, se tomó una pila de monedas de 50 centavos, las cual se recubrió parcialmente con papel aluminio de forma de generar una base. Sobre esta, se colocaron los organoides, se los recubrió con CRYOPLAST asegurándose de no generar burbujas y se los acomodó con una pinza de punta roma en el centro.

Seguidamente, se colocaron los tacos sobre un ladrillo de hielo seco de forma de congelarlos rápidamente y se los dejó mínimo 24 horas a -80 °C antes de proceder a su corte.

El corte se realizó utilizando un criostato Leica CM1860UV, con un grosor de corte de 17 µm y se colocaron sobre portaobjetos cargados positivamente (Biotraza). Rápidamente se incubaron a -20 °C por al menos 1 hora y luego se guardaron a -80 °C hasta el momento de realizar las inmunotinciones.

### **Inmunomarcaciones de organoides cerebrales**

Para la tinción de organoides cerebrales en portaobjeto, se retiraron los portaobjetos del -80 °C, se los colocó horizontalmente sobre una servilleta y se permitió que llegaran a TA por 10 minutos. Se marcó los alrededores de los cortes con una barrera hidrofóbica PAP-PEN (Merck) y se lo dejó secar durante 3-5 minutos. Una vez seca la tinta hidrofóbica, se cubrieron los organoides en PBS con el agregado de 0,1% Tween20 (PBS-T) a 37 °C por 10 minutos para retirar el medio de montaje de los organoides. Luego, se colocaron 1 hora en cámara húmeda con solución de bloqueo (NGS 5% en PBS-T), se aspiró la solución de bloqueo suavemente con tip de p200 y se colocaron los

anticuerpos preparados previamente en solución de anticuerpos (BSA 5% en PBS-T). Se incubó ON a TA en cámara húmeda.

Al día siguiente, se retiraron los anticuerpos primarios, se realizaron 3 lavados con PBS-T y se realizó la incubación de anticuerpos secundarios (preparados a la dilución adecuada en PBS-T) por 2 horas en cámara húmeda, en oscuridad. Inmediatamente, se colocó DAPI 1x por 30 minutos a TA en oscuridad para permitir la tinción de los núcleos y se realizaron 3 lavados con PBS-T, en oscuridad.

Para finalizar, se retiró el último lavado de PBS-T, se dejaron secar los organoides por 15 minutos a TA, se colocó medio de montaje (Vectashield, Vector Laboratories) y se colocó cuidadosamente el cubreobjeto, asegurándose de no generar burbujas y evitando estropear el tejido. Se dejó secar otros 15 minutos y se selló con esmalte transparente. En la Tabla 8, se encuentran listados los anticuerpos primarios y secundarios utilizados. Las fotos fueron sacadas utilizando un microscopio de fluorescencia invertido EVOS floyd (Thermo Fisher Scientific).

### **Cuantificación de depósitos de A $\beta$ por inmunotinción**

El procesamiento de las imágenes fue realizado utilizando *software* libre FIJI. Antes de comenzar con la cuantificación de estructuras neuronales, realizamos la calibración de las fotografías en  $\mu\text{m}$ , mediante la medición de cuadrantes fotografiados con los mismos aumentos de una cámara de Neubauer. A su vez, realizamos el mismo tratamiento de brillo y contraste para todas las imágenes para evitar artefactos de la medición. Además, la morfometría de los depósitos se realizó exclusivamente en zonas que tuvieran una expresión homogénea del marcador neuronal  $\beta$ -III Tubulina (TUJ-1).

Se realizaron 2 cuantificaciones:

- Por un lado, se contaron manualmente la cantidad de depósitos presentes en cada campo
- Por el otro, se midió el área de intensidad de fluorescencia media. Esto se hizo seleccionando la herramienta de selección polígono y seleccionando el contorno de la estructura manualmente. Desde la barra del menú de FIJI determinamos la configuración de las mediciones para que nos arroje los valores de *mean grey area*. Luego, seleccionamos nuevamente “medir” para cuantificar los valores del área de los acúmulos de A $\beta$  seleccionados.

### **Secuenciación masiva del ARN (RNA-seq)**

La secuenciación masiva (*High Throughput Sequencing*) del ARN total se realizó en la empresa MacroGen (Corea del Sur) utilizando una plataforma Illumina NovaSeq6000. La cantidad de lecturas (*reads*) totales por muestra fue mayor a 60 millones y en *single-end*. Cada condición experimental (línea *PSEN1* WT o portadora de la mutación *PSEN1* p.T119I) se analizó por triplicado, con muestras generadas de pasajes y diferenciaciones a 70 días independientes. El armado de las librerías fue realizado con una cantidad de 4 µg de muestra preparada con *TruSeq stranded* para ARN total con depleción del ARN ribosomal. El ARN extraído fue evaluado por su RIN (del inglés, *RNA integrity number*), que es un valor que estima la integridad del ARN presente en la muestra. Este valor oscila del 1 al 10, siendo 1 una muestra totalmente degradada y 10 una muestra en perfectas condiciones de integridad, se consideran como aceptables valores de RIN mayores a 7. Nuestras muestras obtuvieron valores de RIN mayores a 8.5 (Tabla 9), indicando que se encontraron en condiciones óptimas para su secuenciación.

| MUESTRA                             | RIN |
|-------------------------------------|-----|
| UOWi002-A 1 (WT)                    | 9.6 |
| UOWi002-A 2 (WT)                    | 9.2 |
| UOWi002-A 3 (WT)                    | 9   |
| FFAD1.2C4 ( <i>PSEN1</i> P.T119I) 1 | 8.7 |
| FFAD1.2C4 ( <i>PSEN1</i> P.T119I) 2 | 9.8 |
| FFAD1.2C4 ( <i>PSEN1</i> P.T119I) 3 | 9.7 |

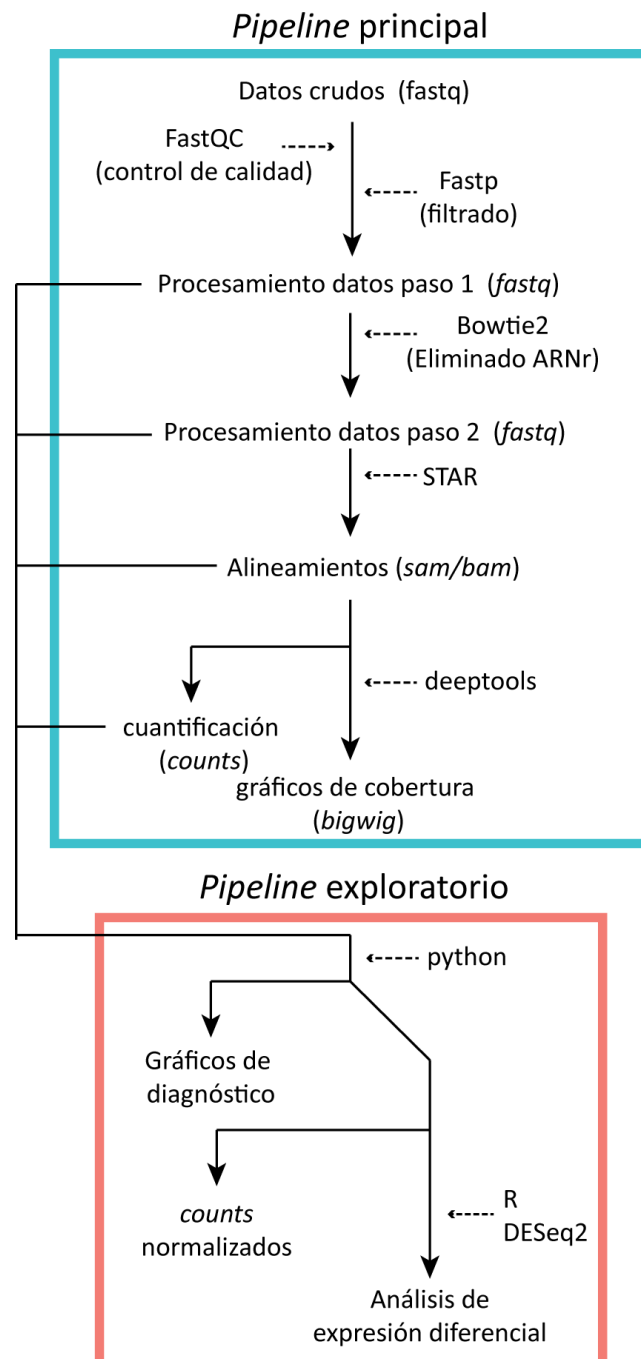
**Tabla 9. RIN para las muestras analizadas**

## Análisis de secuenciación masiva de ARNm

Las lecturas obtenidas se procesaron siguiendo el protocolo descrito en la figura 25. La calidad de las lecturas se evaluó utilizando FastQC v0.11.9<sup>234</sup>, y se controlaron posibles duplicaciones y artefactos generados por PCR en la preparación de las librerías. El procesamiento inicial de las lecturas se realizó con la herramienta Fastp v0.22.0<sup>235</sup> para eliminar secuencias adaptadoras residuales, lecturas de baja calidad o muy cortas, y lecturas no pareadas.

Dado que la preparación de las librerías involucra la eliminación de ARN ribosomal, se controló la abundancia de estos transcriptos en las muestras. Se utilizó la secuencia de ARN ribosomal humano disponible en las bases de datos NCBI y Silva como referencia, y se construyó un índice utilizando la herramienta bowtie2 v2.3.5 [140]. Las lecturas que no se alinearon con esta referencia se utilizaron en las etapas de análisis posteriores. El alineamiento al genoma humano de referencia (versión GRCh38) se llevó a cabo utilizando la herramienta STAR v2.6<sup>236</sup>, y solo se conservaron las lecturas que se alinearon de forma única con hasta dos errores de emparejamiento entre bases. Esta

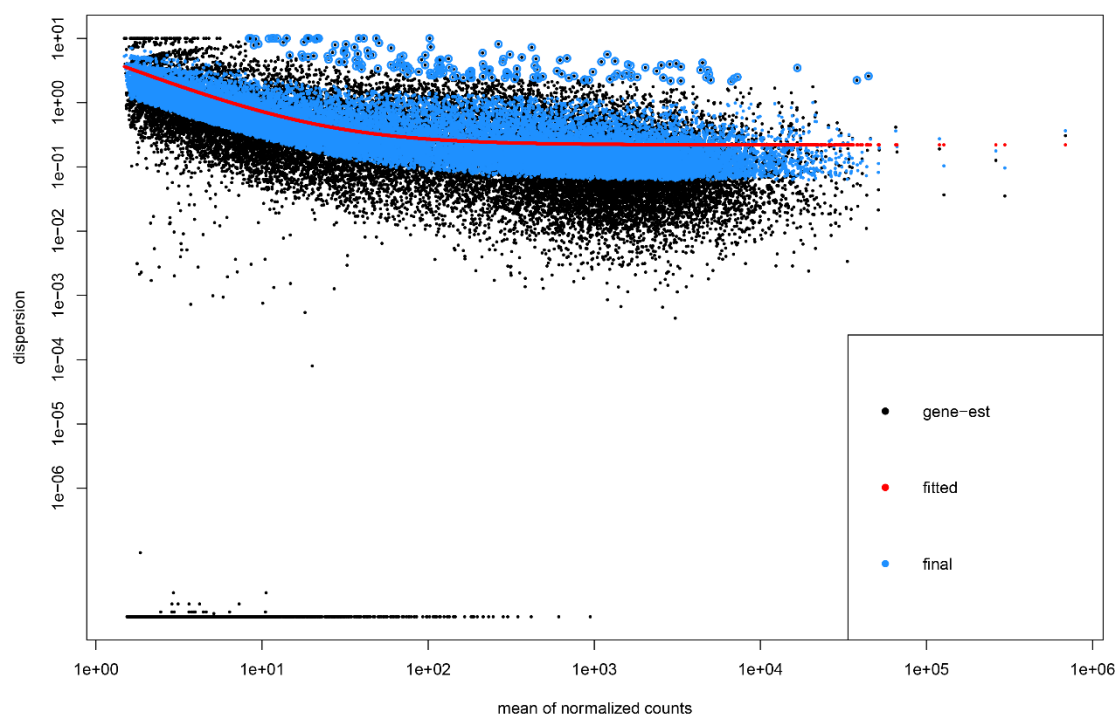
herramienta también incluye un módulo para ensamblar las lecturas en transcritos y cuantificar su abundancia a nivel de genes.



**Figura 25. Esquema del protocolo de análisis de datos de RNA-seq.** El procesamiento de los datos para el análisis del RNA-seq constó de dos grandes etapas: una primera parte de preparado y filtrado de los datos de la secuenciación y una segunda etapa exploratoria de los datos.

Se realizó un gráfico de dispersión como diagnóstico para confirmar que no se presentaran fallas en el análisis como consecuencia de falsos positivos causados por falta de datos de cada gen en particular. En la figura 26 observamos un gráfico de estimación de la dispersión genética de las muestras versus la media de los *counts*

normalizados (niveles de expresión del gen). Este gráfico nos permite conocer si la dispersión de los valores se ajusta al modelo utilizado en el análisis. Los valores de la estimación de la dispersión de cada gen al inicio se encuentran representados en color negro, luego se realiza un ajuste al modelo en donde se determina una media de los datos (en rojo) y en la segunda ronda, se analizan los datos respecto de la media ajustada, dando lugar a las estimaciones de la dispersión finales para cada dato que se corresponden con los puntos graficados en color azul. Aquellos puntos negros que se encuentran marcados con un círculo en azul son valores cuya dispersión es mayor a la esperada con el ajuste. De acuerdo con lo esperado, observamos que los valores finales (en azul), se encuentran comprimidos significativamente a lo largo de los valores ajustados respecto de su valor inicial (en negro).



**Figura 26. Gráfico de estimación de la dispersión de los datos del RNA-seq.** En negro se observa la estimación de los datos del RNA-seq por cada gen, en rojo el ajuste para los datos y en azul, los datos ajustados a la media de la dispersión calculada. Los puntos negros dentro del círculo azul son valores fuera de rango de la media ajustada.

La cuantificación sin modificar fue analizada en DESeq2 (Bioconductor versión 3.14) en el *software* Rstudio (versión 2022.02.1). La clasificación en genes inducidos, reprimidos o no regulados se hizo de acuerdo con el valor umbral definido por  $\log_2$  (veces de cambio) =  $\pm 1$  y el p-valor ajustado por el FDR (*false discovery rate*) menor a 0,1 (p-valor ajustado =  $q < 0,01$ ). La identificación de los términos ontológicos sobre-representados se realizó por medio del *software online* ShinyGO (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>).

## **Análisis estadístico**

Las comparaciones experimentales se realizaron utilizando la prueba t de Student en el caso de comparaciones de dos grupos o la prueba de análisis de varianza (ANOVA) unidireccional para comparaciones múltiples. Se consideró significativo un valor de  $p < 0,05$  entre las condiciones ensayadas. El análisis de datos se llevó a cabo con el software GraphPad Prism 8.





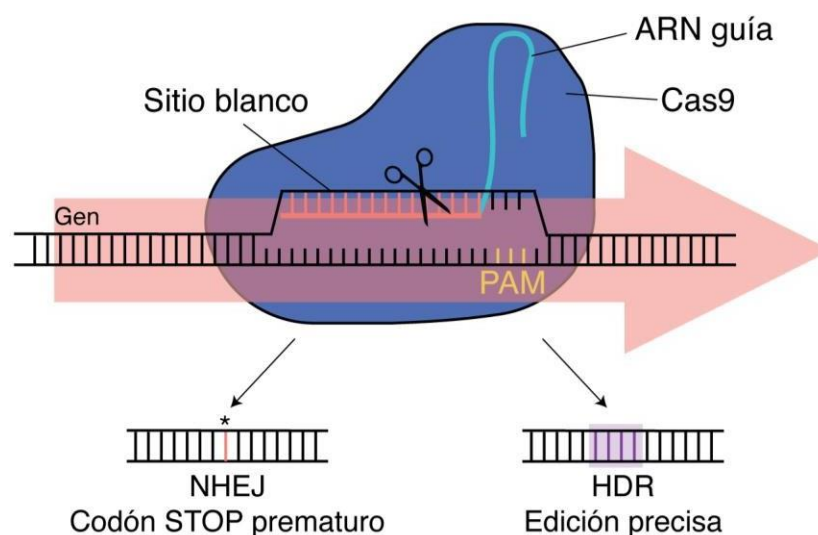
# RESULTADOS

## Capítulo 1. Estudio de mutaciones en el gen *PSEN1* utilizando el modelo *in-vitro* de células HEK293T modificadas genéticamente.

En primera instancia y ante la falta de una demostración experimental de la patogenicidad de la variante *PSEN1* c.C356T (NM\_000021.4) p. T119I, decidimos realizar una primera serie de experimentos exploratorios de sobreexpresión de plásmidos codificantes de mutaciones en *PSEN1* en la línea HEK293T. Si bien esta línea celular difiere del tipo celular ideal para realizar estos experimentos, siendo más apropiado el uso de neuronas o subtipos celulares neuronales, optamos por utilizarla de igual manera dada su alta tasa de crecimiento, alta reproducibilidad entre experimentos y su facilidad para ser transfectadas y expresar de forma rápida y robusta los plásmidos deseados.

### 1.1 Generación de la línea HEK293T *PSEN1* Knock-Out (KO).

Para evitar tener resultados que puedan verse afectados por la expresión endógena de *PSEN1* *wild-type* decidimos generar una línea HEK293T KO para dicho gen utilizando el sistema de edición génica CRISPR/Cas9, metodología que permite realizar ediciones en el ADN de forma precisa. El mecanismo de edición requiere un ARN guía sintético complementario al sitio a modificar en ADN y una nucleasa Cas9 (del inglés, *CRISPR-associated protein 9*). Para diseñar el ARN guía (ARNg) es necesaria la presencia de una secuencia PAM (del inglés, *Protospacer Adjacent Motif*) en la secuencia genómica a editar. La secuencia PAM es reconocida por el complejo ARNg-Cas9 y permite a la proteína Cas9 realizar un corte doble cadena en la secuencia blanco (Figura 27). La célula intentará reparar el corte en el ADN realizado por la proteína Cas9 mediante el mecanismo de reparación de unión de extremos no homólogos (NHEJ, del inglés *non homologous end joining*) o mediante recombinación homóloga (HDR, del inglés *homology directed repair*). La reparación mediante NHEJ es propensa a cometer errores, lo que genera sustituciones, remociones o inserciones de nucleótidos (conocidos como *indels*) en la secuencia de ADN. Este hecho provoca en ocasiones cambios en el marco de lectura y generación de codones STOP prematuros, lo que se termina traduciendo en proteínas no funcionales o truncadas.



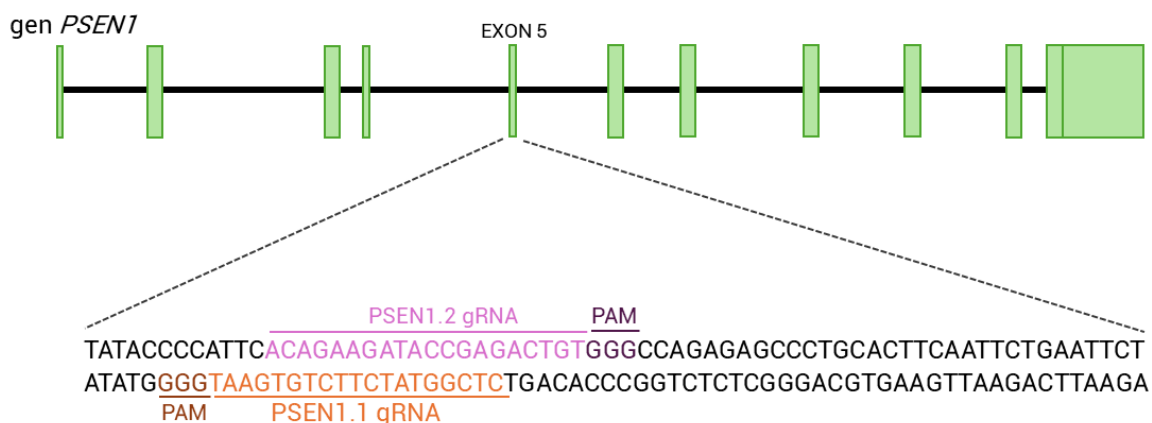
**Figura 27. Mecanismo de edición genética CRISPR/Cas9.** Los componentes importantes para la edición genética son la nucleasa Cas9 y el ARN guía (ARNg). La Cas9 actúa como una tijera molecular para cortar las cadenas de ADN. El ARNg permite guiar a la Cas9 para escindir el ADN en el sitio blanco. La reparación del ADN luego ocurre por las vías de NHEJ o HDR.

*PSEN1* es un gen que contiene 12 exones, cuyo transcripto primario codifica para una proteína de 467 aminoácidos y posee varias isoformas producto de *splicing* alternativo<sup>45,237,238</sup>. La secuencia codificante para esta proteína de 9 pasos transmembrana inicia en el exón 3, siendo los primeros dos exones transcriptos, no codificantes. Dada la presencia del exón 5 en todos los transcriptos codificantes de *PSEN1*<sup>238</sup>, la necesidad de evitar sitios de inicio de la transcripción alternativos, generalmente ubicados en los primeros exones y la alta tasa de mutaciones asociadas a estados patológicos de EA en el *loop* generado entre el exón 4 y exón 5 (Figura 6)<sup>239–242</sup>, consideramos que era razonable que, las inserciones o deleciones (Indels) producidas por el sistema CRISPR/Cas9 en el exón 5 serían capaces de inducir cambios en la secuencia proteica que la volverían no funcional (KO)<sup>243</sup>.

### 1.1.1 Elección del sitio blanco (*target*), diseño *in silico* y clonado de ARN guías para la edición genética.

Para el diseño de los ARNg *in silico* utilizamos la secuencia del gen de *PSEN1* presente en la base de datos NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5663>) del genoma de *Homo sapiens* de referencia GRCh37.p13 considerando el transcripto 1 (NM\_000021.4). Se utilizaron tres *softwares* gratuitos online: Benchling (<https://www.benchling.com/>), CHOP CHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) y CRIPOR (<http://crispor.tefor.net/>) para la elaboración y corroboración de estos. En la

figura 28, se presentan los ARNg utilizados. Las secuencias de estos son las siguientes: ARNg 1: *forward* PSEN1.1-gRNA-Fw 5'- CACCGCTCGGTATCTTCTGTGAATG -3' y *reverse* PSEN1.1- gRNA-Rev 5'-AAACCATTACACAGAAGATACCGAGC-3'; y ARNg 2: PSEN1.2-gRNA-Fw 5'- CACCGACAGAAGATACCGAGACTGT -3' y *reverse* PSEN1.2-gRNA-Rev 5'-AAACACAGTCTCGGTATCTTCTGTGTC -3'.

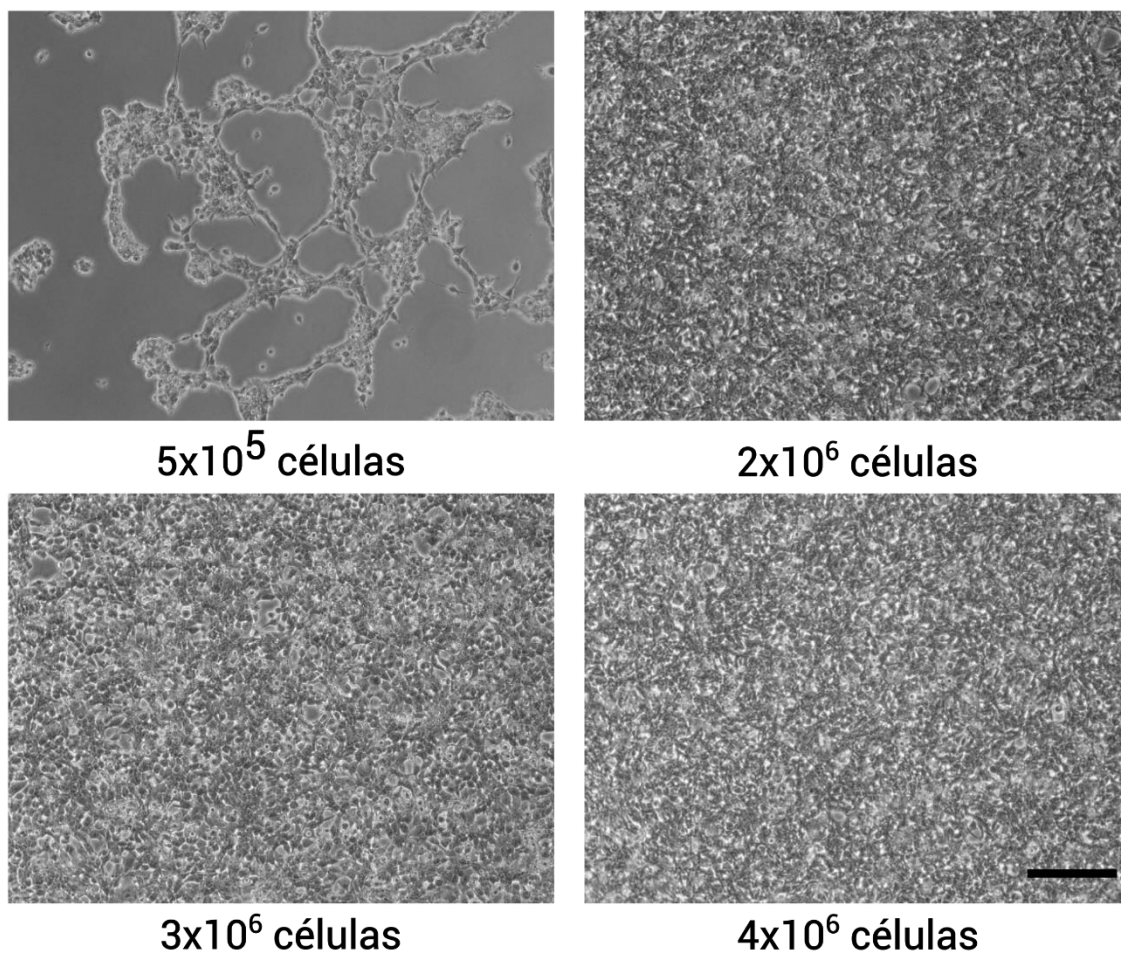


**Figura 28. Sitios blancos de los ARNg diseñados para el gen de *PSEN1*.** En la figura se encuentra esquematizado el gen de *PSEN1* conformado de sus exones (rectángulos verdes) e intrones. Los sitios elegidos para la edición génica se ubicaron en el quinto exón del gen. En naranja, se encuentra el PSEN1.1-gRNA y en violeta PSEN1.2-gRNA.

Los pares de guías se aparearon y se clonaron en el plásmido pSpCas9(BB)-2A-Puro-2A-GFP utilizando bacterias competentes *Escherichia coli* de la cepa Stbl3. Realizamos el screening de 4 colonias transformadas por guía mediante colony-PCR. Amplificamos por PCR un producto de 150 pb con los primers U6-Fw y PSEN1.1-gRNA-Rv y PSEN1.2-gRNA-Rv, respectivamente y corroboramos el correcto clonado de cada ARNg mediante secuenciación de Sanger (para más detalle ver materiales y métodos).

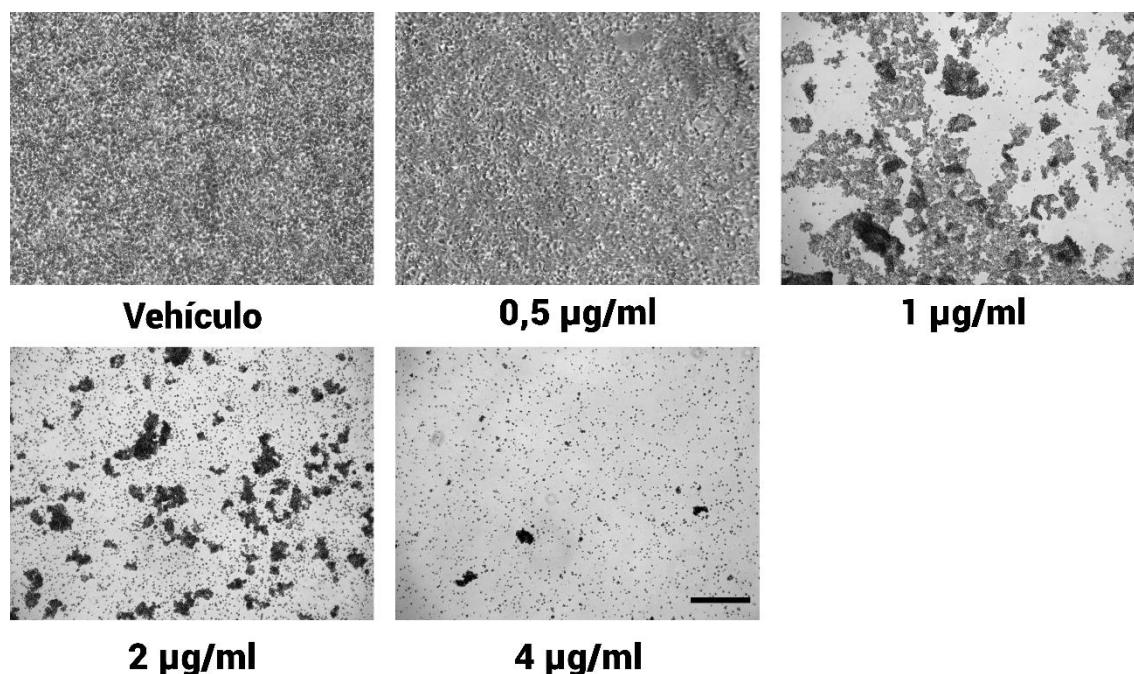
### 1.1.2 Obtención de la línea HEK293T deficiente en *PSEN1*.

En primera instancia, se evaluó la cantidad óptima de células HEK293T a plaquear para realizar la transfección a las 24 horas (Figura 29). Para ello, se levantaron las células con Tripsina y se plaquearon  $5 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$  y  $4 \times 10^6$  células/pocillo de placa multipocillo de 6 y se tomaron fotos a las 24 horas post plaqueo. Se optó por realizar el experimento con  $2 \times 10^6$  células/pocillo considerando la especificación de transfectar con un grado de confluencia del 70-90%.



**Figura 29. Puesta a punto de cantidad de células HEK293T a transfectar.** Microfotografías representativas en campo claro de  $5 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$  y  $4 \times 10^6$  células HEK293T plaqueadas en pocillos de placa de 6 pocillos visualizadas con microscopio óptico invertido a las 24 horas post-plaqueo. Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ .

El plásmido pSpCas9(BB)-2A-Puro-GFP-gRNAPSEN1.1 codifica para resistencia al antibiótico puromicina, por lo que realizamos a su vez una puesta a punto de la cantidad de puromicina necesaria para seleccionar las células que hayan incorporado el plásmido (Figura 30). En este caso, elegimos la concentración mínima (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) en la cual observamos cualitativamente la muerte de todas las células HEK293T no transfectadas.



**Figura 30. Curva de concentración de puromicina.** En la figura se observan imágenes representativas de campo claro obtenidas con un microscopio invertido de cultivos celulares de HEK293T luego de 48 horas de tratamiento con las concentraciones indicadas de puromicina: 0,5 µg/µl, 1 µg/µl, 2 µg/µl y 4 µg/µl. Vehículo: H<sub>2</sub>O<sub>mq</sub>. La escala representa 50 µm.

Una vez realizada la puesta a punto correspondiente se procedió a realizar el experimento de edición génica (*knock-out*) del gen *PSEN1*. Para ello, transfectamos de manera transitoria las HEK293T con el plásmido pSpCas9(BB)-2A-Puro-GFP con el guía gRNAPSEN1.1 con Lipofectamina 2000 (Thermo Fischer Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Realizamos, además, la transfección utilizando el guía gRNAPSEN1.2, pero observamos una elevada tasa de muerte celular aun utilizando bajas concentraciones del plásmido.

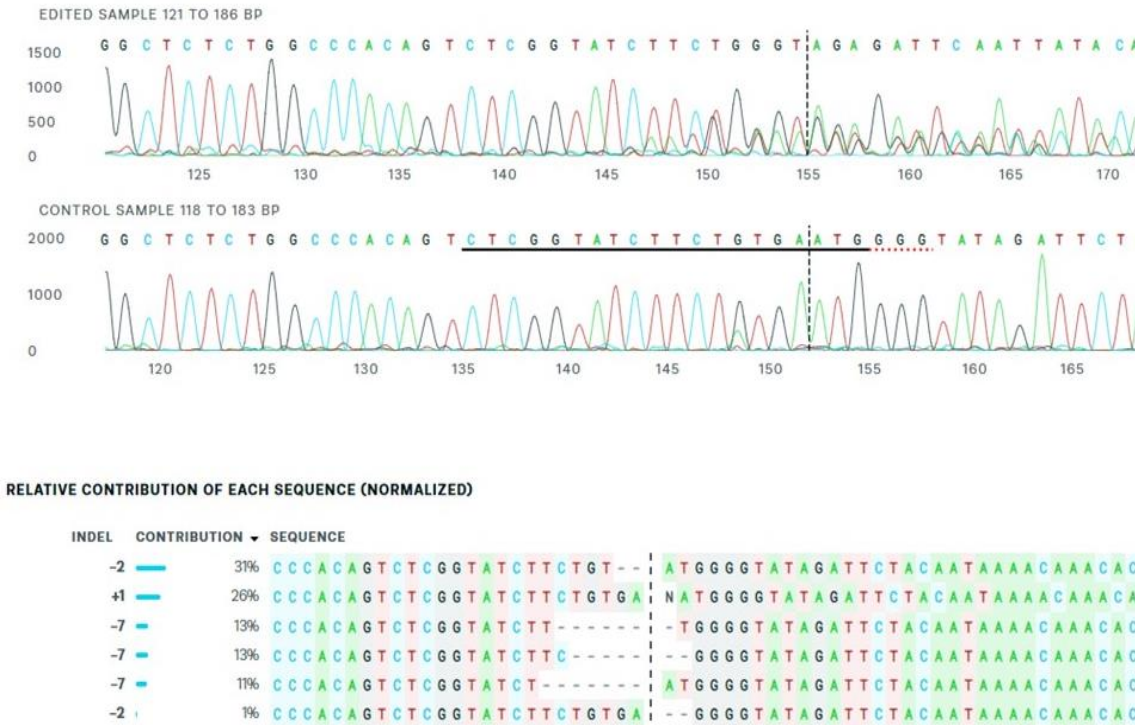
Brevemente, el día previo a la transfección plaqueamos  $2 \times 10^6$  células con medio DMEM+ 10% SFB en placa de cultivo de 6 pocillos. Utilizamos 2 pocillos por experimento, un pocillo lo transfectamos (utilizando medio DMEM sin antibiótico) con 2 µg del plásmido pSpCas9(BB)-2A-Puro-GFP-gRNAPSEN1.1 (utilizamos esta cantidad de plásmido basándonos en experimentos previos del laboratorio) y otro pocillo lo dejamos sin transfectar (control negativo). 24 horas posteriores a la transfección iniciamos un tratamiento con el antibiótico puromicina (1 µg/µl) para seleccionar a aquellas HEK293T que incorporaron el plásmido y mantuvimos el agente de selección hasta no observar células vivas en el control negativo (aproximadamente 48 horas).

En ese momento, se levantaron las células y se plaquearon en placas multipocillo de 96 por el método de dilución límite y se continuó su cultivo en medio DMEM + 10% SFB sin el agregado de puromicina. Crecimos las células transfectadas y procedimos a su expansión clonal como se describe en materiales y métodos. Amplificamos por PCR a



punto final el sitio de edición en el quinto exón del gen *PSEN1* utilizando los primers PSEN1 EX 5-Fw y PSEN1 EX 5-Rev, a partir de ADN genómico extraído de las 10 colonias seleccionadas y realizamos una secuenciación por Sanger de todos los amplicones obtenidos.

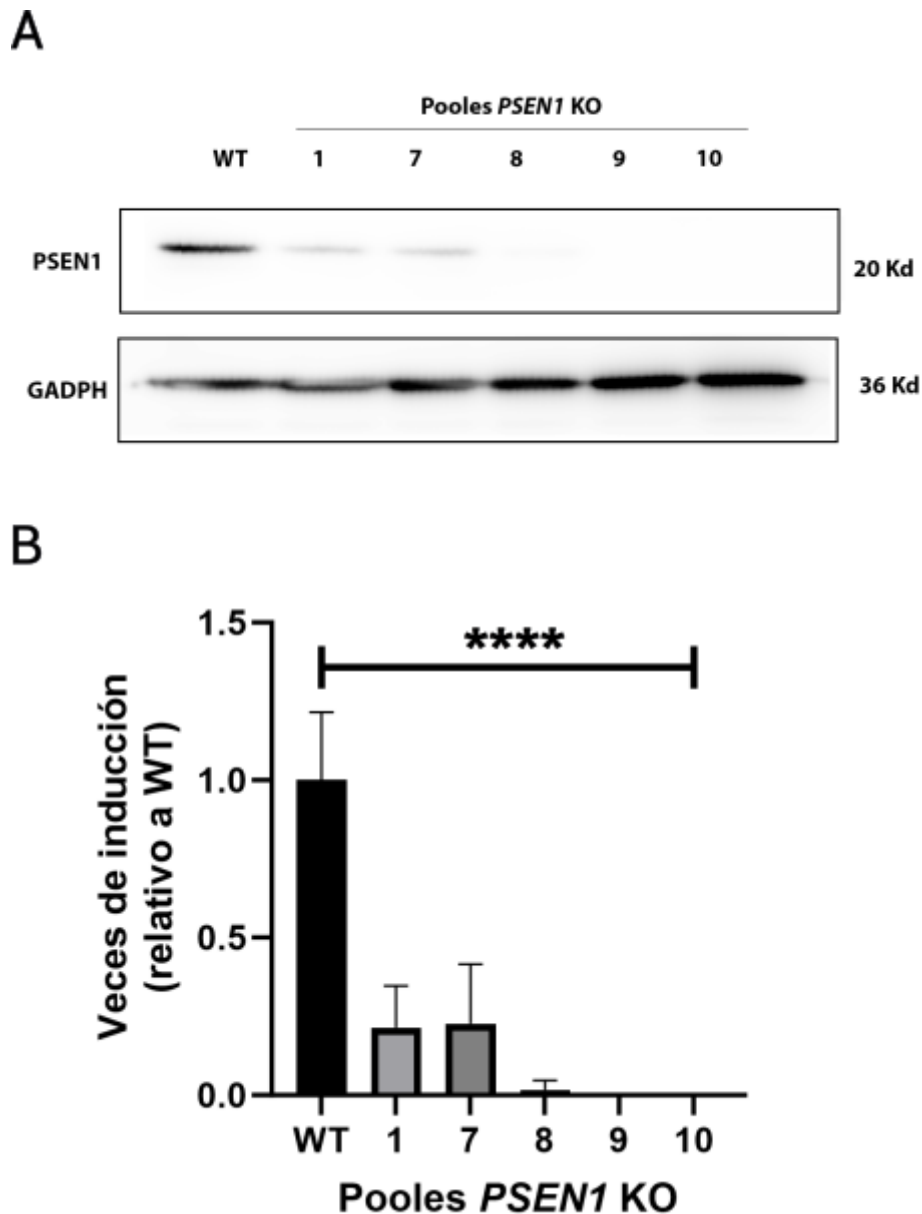
Comparamos luego las secuencias de los amplicones obtenidos con la secuencia control de nuestras líneas celulares. Para el análisis, utilizamos el software on-line ICE Analysis de Synthego (Figura 31). El software nos permitió observar si en la secuenciación se encontraban más de un tipo de modificación en el ADN genómico por muestra. Idealmente se deberían seleccionar aquellos clones en los que en la secuenciación se obtuviera un porcentaje mayor al 90% de un solo tipo de modificación génica, lo que indicaría que la línea editada es clonal y no una mezcla de poblaciones celulares. No tuvimos en cuenta aquellos porcentajes menores al 10% en los cambios en las secuencias de las líneas editadas, debido que esos datos pueden atribuirse al ruido de la técnica de secuenciación. Al analizar los resultados de la secuenciación, concluimos que las colonias obtenidas no eran clonales, sino que se habían formado luego del crecimiento de más de una célula en dicho pocillo.



**Figura 31. Análisis de secuencias editadas genéticamente.** En la figura se observan resultados representativos de las colonias analizadas por el software Synthego ICE (colonia 10). En el panel superior se observan las secuencias provistas por Sanger, con el guía subrayado por una línea negra y el PAM en línea punteada roja. En el panel de abajo se observa la proporción de los diversos *indels* para el pool estudiado.

Decidimos luego analizar los *pools* de células editados genéticamente aislados mediante ensayos de western blot (WB) para evaluar si en alguno de ellos se encontraba

un *knock-out* de la proteína PSEN1 o en su defecto una disminución de esta de forma tal de utilizarla en los subsecuentes ensayos de sobre expresión transitoria de APP y PSEN1, WT o sus formas mutadas (Figura 32).



**Figura 32. Cuantificación de la proteína PSEN1 en homogenatos de células HEK293T editadas genéticamente por CRISPR/Cas9. A.** Imágenes representativas de membranas de WB de las proteínas Presenilina 1 (PSEN1) y Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) **B.** Veces de inducción de expresión de la proteína Presenilina 1 normalizado al control de carga GAPDH. Se graficó el promedio de las veces de inducción relativas a las líneas wild type (WT)  $\pm$  error estándar de tres experimentos independientes. Se utilizaron los niveles de expresión de GAPDH para normalizar los datos. Se realizó la prueba estadística de ANOVA de un factor y los valores se consideraron significativamente diferentes cuando (\*\*\*\*)  $<0,0001$  vs. WT.

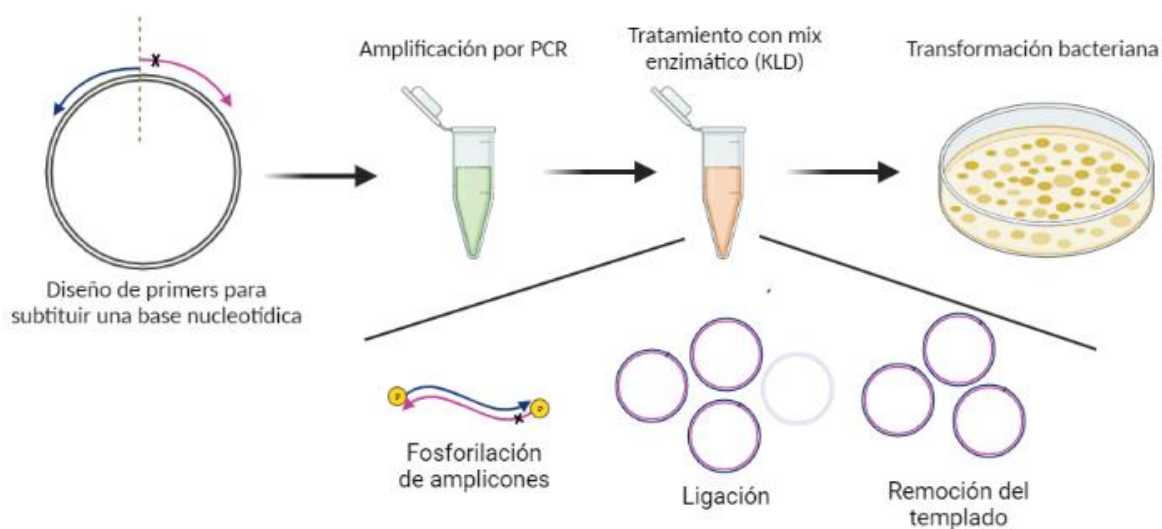
Como puede observarse en la figura 32, en los 5 *pooles* de células evaluados se observó una disminución de los niveles de expresión de la proteína PSEN1 endógena. Optamos por continuar los experimentos con la colonia 10 que presentó

consistentemente una ausencia total de expresión de la proteína PSEN1 y la cual, según el análisis realizado por Synthego, no presentaba secuencias WT.

## 1.2 Obtención de plásmidos de expresión de *PSEN1* con mutaciones asociadas a EA p.T119I y p.A246E.

Se realizó la mutagénesis dirigida (c. C356T p. T119I y c. C737A p. A246E) en un plásmido de expresión pcDNA3.1 *PSEN1* WT + VRSQ MYC-HIS que posee la secuencia salvaje (*wild-type*) del transcripto 1 de *PSEN1*<sup>244,245</sup>, generosa donación de la Dra. Celeste Karch (Washington University in St Louis). Decidimos además incorporar la variante en *PSEN1* A246E, de conocida patogenicidad (resumido en <https://www.alzforum.org/mutations/psen1-a246e>). También es posible referirse a la tabla 1 en el apartado Introducción), sobre la relación A $\beta$ <sub>42</sub>/A $\beta$ <sub>40</sub>, considerándola como un control de variante patogénica en nuestros experimentos.

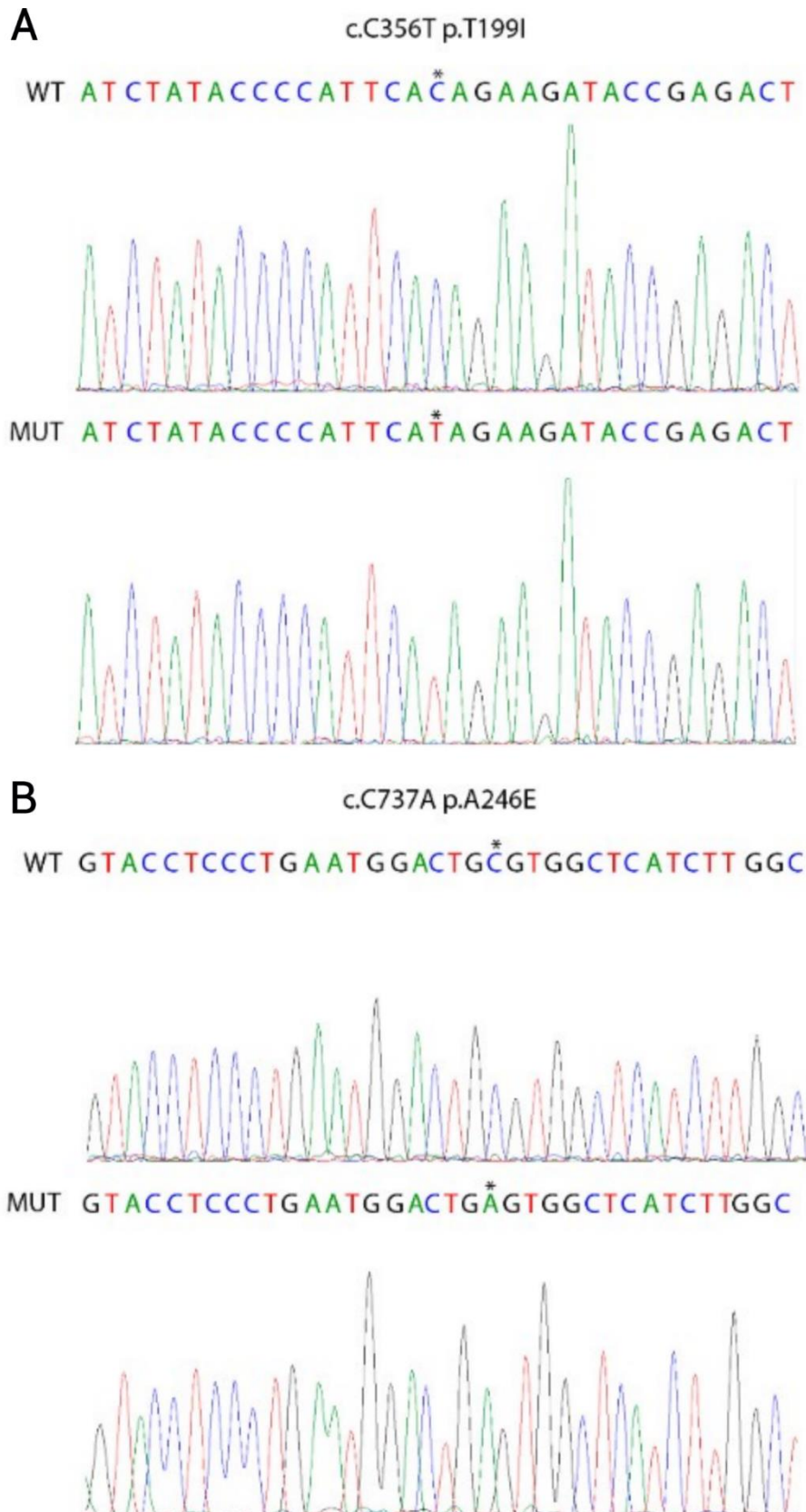
Nos propusimos generar las modificaciones deseadas sobre el plásmido pcDNA3.1 *PSEN1* WT + VRSQ MYC-HIS. Para realizar dichas modificaciones se utilizó el kit de mutagénesis dirigida Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs). Este kit permite realizar mutaciones puntuales en plásmidos de forma altamente eficiente (Explicado brevemente en la figura 33) utilizando sets de primers específicos generados con la herramienta bioinformática NEBase Changer (<https://nebasechanger.neb.com/> Para más detalle ver materiales y métodos).



**Figura 33. Diagrama de la mutagénesis sitio dirigida basada en amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** En este método, se realizó una reacción de PCR utilizando primers no superpuestos. El producto fue fosforilado y ligado y se removió el templado gracias a la acción de la enzima Dpn I en una reacción única. Posteriormente, se transformaron bacterias DH5 $\alpha$  ultracompetentes para amplificar los plásmidos obtenidos. El primer conteniendo la X indica la base modificada. Adaptado de New England Biolabs, Inc (NEB).



Tras obtener los plásmidos y transformar bacterias NEB 5-alpha Competent *E. coli* provistas por el kit, las cuales tiene una alta competencia y permiten obtener un alto número de colonias post transformación, se procedió a la purificación del material plasmídico por miniprep, amplificación de regiones colindantes a la zona modificada y análisis de la región por secuenciación de Sanger (Figura 34). Finalmente, se realizó una amplificación a mediana escala (Midiprep) de los plásmidos portadores de la variante para su posterior transfección.



**Figura 34. Secuenciación de plásmidos modificados por mutagénesis dirigida.** Resultado del fenograma emitido tras realizar secuenciación de Sanger. Para ambas mutaciones, en el panel superior se encuentra la secuencia original del plásmido y en el panel inferior la secuencia modificada. El asterisco marca el nucleótido modificado.

### 1.3 Estudio de marcadores de neurodegeneración en HEK293T *PSEN1* KO que expresan el gen *PSEN1* con las mutaciones p.T119I y p.A246E por ensayos de ELISA.

Como se comentó anteriormente en la introducción, se ha observado que las mutaciones en genes asociados al clivaje de la proteína APP, como son *APP*, *PSEN1* y *PSEN2*, producen cambios en la procesividad del complejo gamma secretasa sobre sus sustratos, generando así un aumento de la isoforma  $A\beta_{42}$  y un aumento en el cociente  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ , considerados marcadores de las placas amiloides característicos de EA<sup>42-45,47,80</sup>. Por este motivo y con el fin de estudiar si la variante en *PSEN1* p. T119I es capaz de generar, *in vitro* en células HEK293T, modificaciones en la producción de las isoformas de  $A\beta$ , decidimos realizar ensayos de ELISA de las isoformas  $A\beta_{42}$  y  $A\beta_{40}$  en los sobrenadantes y extractos proteicos de células HEK293T *PSEN1* KO que expresan plásmidos portadores de las mutantes antes generadas.

Una vez obtenidas las células y plásmidos a utilizar se procedió a realizar los ensayos de co-transfección transitoria con plásmidos de expresión de *APP* y *PSEN1* WT o bien con plásmidos de expresión de *APP* WT y las variantes de *PSEN1* que generamos mediante mutagénesis dirigida: p. T119I y A246E (control positivo). El plásmido pCMV APP695\_WT también fue donado por la Dra. Karch. Se agregó además en todos los casos un plásmido de expresión de la proteína fluorescente GFP (pGFP-N1), que se utilizó para calcular la eficiencia de transfección. En la tabla 9 se muestran las condiciones de transfección.

| Condición                        | Plásmidos                         | cantidades                          |
|----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| Control negativo de transfección | -                                 | -                                   |
| WT                               | GFP-N1 + APP-695 WT + PSEN1 WT    | 0,5 $\mu$ g : 1 $\mu$ g : 1 $\mu$ g |
| p. A246E                         | GFP-N1 + APP-695 WT + PSEN1 A246E | 0,5 $\mu$ g : 1 $\mu$ g : 1 $\mu$ g |
| p. T119I                         | GFP-N1 + APP-695 WT + PSEN1 T119I | 0,5 $\mu$ g : 1 $\mu$ g : 1 $\mu$ g |

**Tabla 9. Ensayos de transfección en líneas HEK293T *PSEN1* KO.**

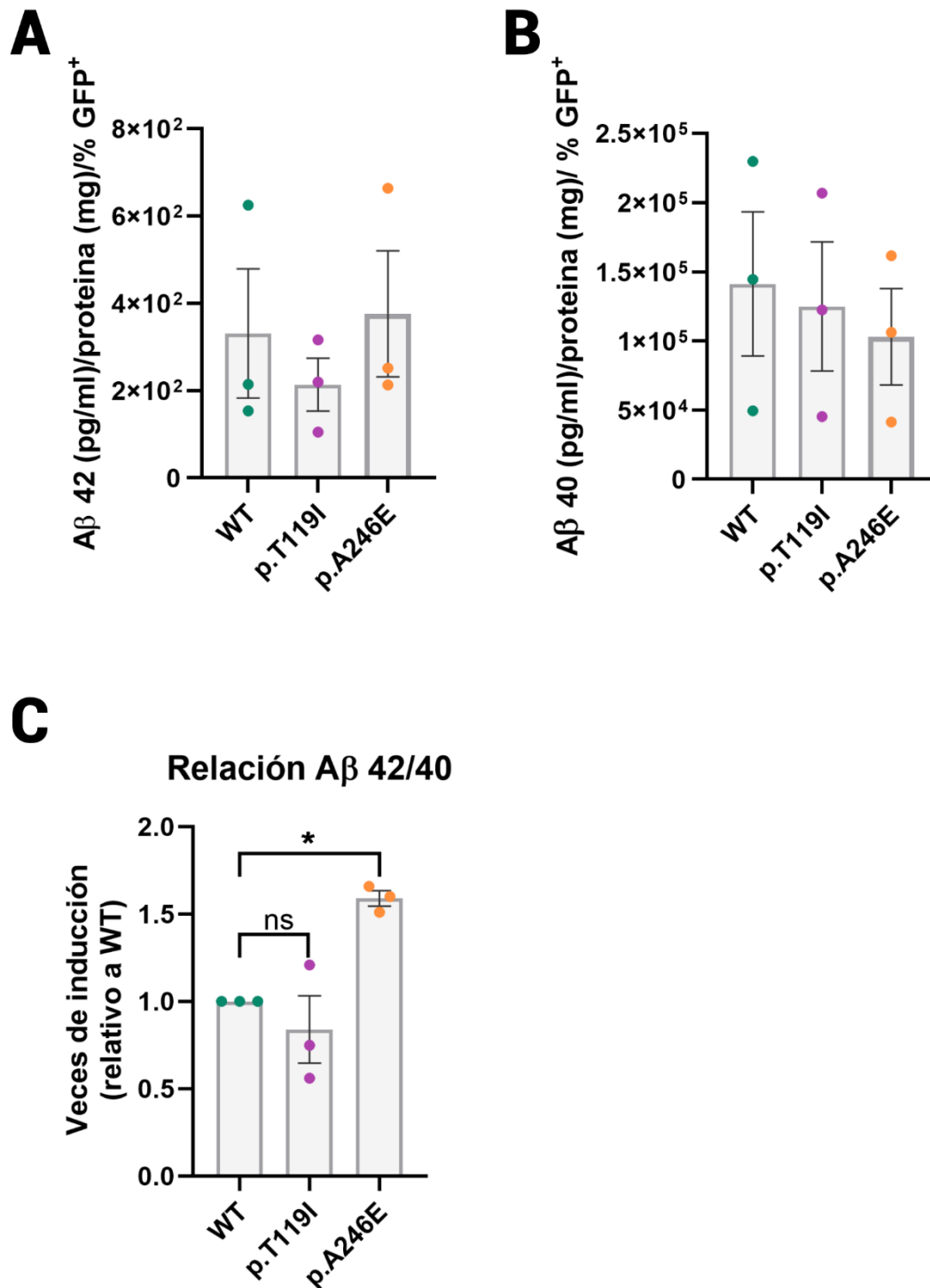
Brevemente, se sembraron 4 pocillos de placa de cultivo de 6 pocillos con  $2 \times 10^6$  células HEK293T *PSEN1* KO por condición en medio DMEM + 10% SFB. Al día siguiente, se procedió a la co-transfección de estas utilizando 2,5  $\mu$ g totales de plásmido (GFP-N1 + APP-695 WT + PSEN1 correspondiente, siguiendo las indicaciones de la tabla 10) utilizando Lipofectamina 2000 (Thermo Fischer Scientific) de forma análoga a lo explicado en el apartado 1.1.2.

24 horas post-transfección se renovó 1 ml de medio DMEM + 10% SFB sin antibióticos, sin agregado de plásmidos ni Lipofectamina y 48 horas post-transfección, se recolectó el sobrenadante luego de centrifugarlo a 3000 x g durante 10 minutos. Asimismo, se tomaron muestras para evaluar el porcentaje de células eficientemente transfectadas por citometría de flujo. Para ello, el cultivo celular se disoció utilizando Tripsina, se centrifugó y se resuspendió en 1 ml de PBS 1x. 50 µl de esa suspensión celular fueron pasados rápidamente por un citómetro de flujo BD Accuri C6 (BD biosciences) con el fin de establecer que el porcentaje de células transfectadas era suficientes (> 60 % células GFP+) para realizar los ensayos de ELISA. Los 950 µl restantes se centrifugaron nuevamente a alta velocidad y se resuspendieron en 200 µl de buffer de extracción de proteínas totales como se describe en la sección de materiales y métodos.

Dado que la cantidad de plásmido GFP-N1 co-transfectado era la mitad que de los dos plásmidos de interés se deduce que, como mínimo, deberían haberse transfectado de igual manera los plásmidos de interés.

Posteriormente cuantificamos los péptidos Aβ<sub>42</sub> y Aβ<sub>40</sub> en los extractos proteicos (niveles intracelulares) y en los sobrenadantes mediante ensayos de ELISA utilizando kits de Abcam (ver materiales y métodos). Analizamos en primera instancia los niveles de Aβ<sub>42</sub> y Aβ<sub>40</sub> en los sobrenadantes. Lamentablemente, los valores obtenidos dieron por debajo del límite detectable por los kits y optamos entonces por medir los valores presentes en los extractos proteicos. En el caso de las muestras analizadas con el kit de ELISA para Aβ<sub>42</sub> se diluyeron los lisados proteicos 1/5 utilizando el buffer provisto por el kit. En cambio, en el caso del kit de ELISA para Aβ<sub>40</sub>, las muestras se diluyeron 1/8 utilizando también el buffer provisto por el kit. En ambos casos, se realizaron puestas a punto previas que nos permitieron conocer el índice de dilución apropiado.

Como puede observarse en la Figura 35, la presencia de la variante en *PSEN1* p.A246E parecería inducir un aumento en los niveles de producción de Aβ<sub>42</sub> y una tendencia a la disminución de la isoforma Aβ<sub>40</sub>, generando así un aumento en la relación Aβ<sub>42</sub>/Aβ<sub>40</sub> intracelular, tal y como se describe en la bibliografía<sup>246</sup>. Este aumento se puede observar mejor al analizar las veces de inducción de la relación Aβ<sub>42</sub>/Aβ<sub>40</sub> con respecto al control *PSEN1* WT. Por otro lado, en el caso de la variante en *PSEN1* p.T119I no observamos cambios significativos en la relación Aβ<sub>42</sub>/Aβ<sub>40</sub>.



**Figura 35. Estudio del clivaje de la proteína precursora amiloide (APP) y generación de isoformas de  $A\beta$ .** Concentración de  $A\beta_{42}$  (A) y  $A\beta_{40}$  (B) en los *pellets* celulares proteicos. El valor obtenido fue normalizado a la cantidad total de proteína derivada de cada ensayo y a la eficiencia de transfección (%GFP<sup>+</sup>) C. Veces de inducción relativo a la condición control (en este caso *PSEN1* WT) de la relación del cociente de la concentración obtenida de los péptidos  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ . Análisis estadístico, ANOVA de un factor comparando con el WT \**p*-valor <0.05.

## Resultados parciales de este capítulo

En este primer capítulo pudimos generar un modelo *in vitro* humano basado en células HEK293T que nos permitió estudiar, en lisados celulares, la presencia de los péptidos asociados a la producción de placas amiloides, A $\beta$ <sub>40</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub>.

En primer lugar, diseñamos una estrategia de edición génica por CRISPR/Cas9, utilizando como blanco el exón 5 del gen de *PSEN1* y pudimos obtener *pooles* de células *PSEN1*<sup>-/-</sup>.

Luego, realizamos ensayos de mutagénesis dirigida sobre el plásmido pcDNA3.1 *PSEN1* WT + VRSQ MYC-HIS para introducir, de manera independiente, las mutaciones *PSEN1* p.T119I (c. C356T) y *PSEN1* p. A246E (c. C737A). A su vez, se realizaron las puestas a punto correspondientes para los ensayos de co-expresión de los plásmidos pcDNA3.1 *PSEN1*, ya sea en su versión WT o con las respectivas mutaciones, en conjunto con un plásmido pCMV APP695\_WT, de forma de emular el procesamiento de APP que ocurre naturalmente en los pacientes portadores de estas mutaciones.

Posteriormente, se realizó la co-transfección transitoria de los plásmidos y se tomó muestra de sobrenadante para ser analizados por ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA). De acuerdo con la bibliografía pre-existente, el procesamiento de APP genera la liberación de los péptidos A $\beta$ <sub>40</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub> al espacio extracelular (ver introducción, capítulos 3 y 4).

Lamentablemente, los kits utilizados [A $\beta$ <sub>42</sub> (ab289832, Abcam) y A $\beta$ <sub>40</sub> (ab193692, Abcam)] no nos permitieron cuantificar los niveles de los péptidos en los sobrenadantes, a pesar de estar validados para ensayos de cultivo celular, según especificaciones del fabricante. Por este motivo, optamos por medir las cantidades de A $\beta$ <sub>42</sub> y A $\beta$ <sub>40</sub> presentes únicamente en los lisados celulares.

Se pudo observar que la variante *PSEN1* p.A246E tiende a un aumento en la relación A $\beta$ <sub>42</sub>/A $\beta$ <sub>40</sub> en cultivo celular graficado como las veces de inducción comparado con la transfección realizada con el plásmido WT, como se espera por bibliografía. Con respecto a la variante de estudio *PSEN1* p.T119I, la misma no parecería producir diferencias significativas con respecto a *PSEN1* WT. A su vez, como puede observarse en la figura 33, ambas mutaciones tienen a presentar una disminución del péptido A $\beta$ <sub>40</sub> y esta disminución se hace más evidente para la variante *PSEN1* p.A246E.

Si bien los resultados obtenidos para la variante *PSEN1* p.A246E van de la mano de lo esperado por la bibliografía, el uso de células epiteliales inmortalizadas, derivadas de riñón embrionario y transformadas (HEK293T), no es un modelo tan fidedigno para estudiar la patología de EA. Por ese motivo, y en vista de la disponibilidad de fibroblastos portadores de la variante *PSEN1* T119I decidimos generar una línea de CMPih derivada

de este paciente y diferenciarla posteriormente a células neurales para modelizar la EA y estudiar la posible patogenicidad de la variante en un modelo más adecuado.





## Capítulo 2. Generación de la línea celular pluripotente inducida humana FFAD1 (o FLENI-001A), portadora de la mutación *PSEN1* p.T119I

El estudio de cualquier fenómeno natural en el laboratorio se ve limitado por la similitud que puedan tener las técnicas utilizadas para modelar el fenotipo a estudiar, una restricción que se extiende a todos los ámbitos de la investigación científica. En particular, es en el estudio de las enfermedades neurodegenerativas, como la EA, donde esta limitación se vuelve especialmente evidente. Esto se debe a la compleja naturaleza de estas patologías y a las dificultades inherentes a la hora de obtener muestras de pacientes en etapas tempranas de la enfermedad. A su vez, es común encontrar que las muestras disponibles tienden a representar la fase final de la enfermedad.

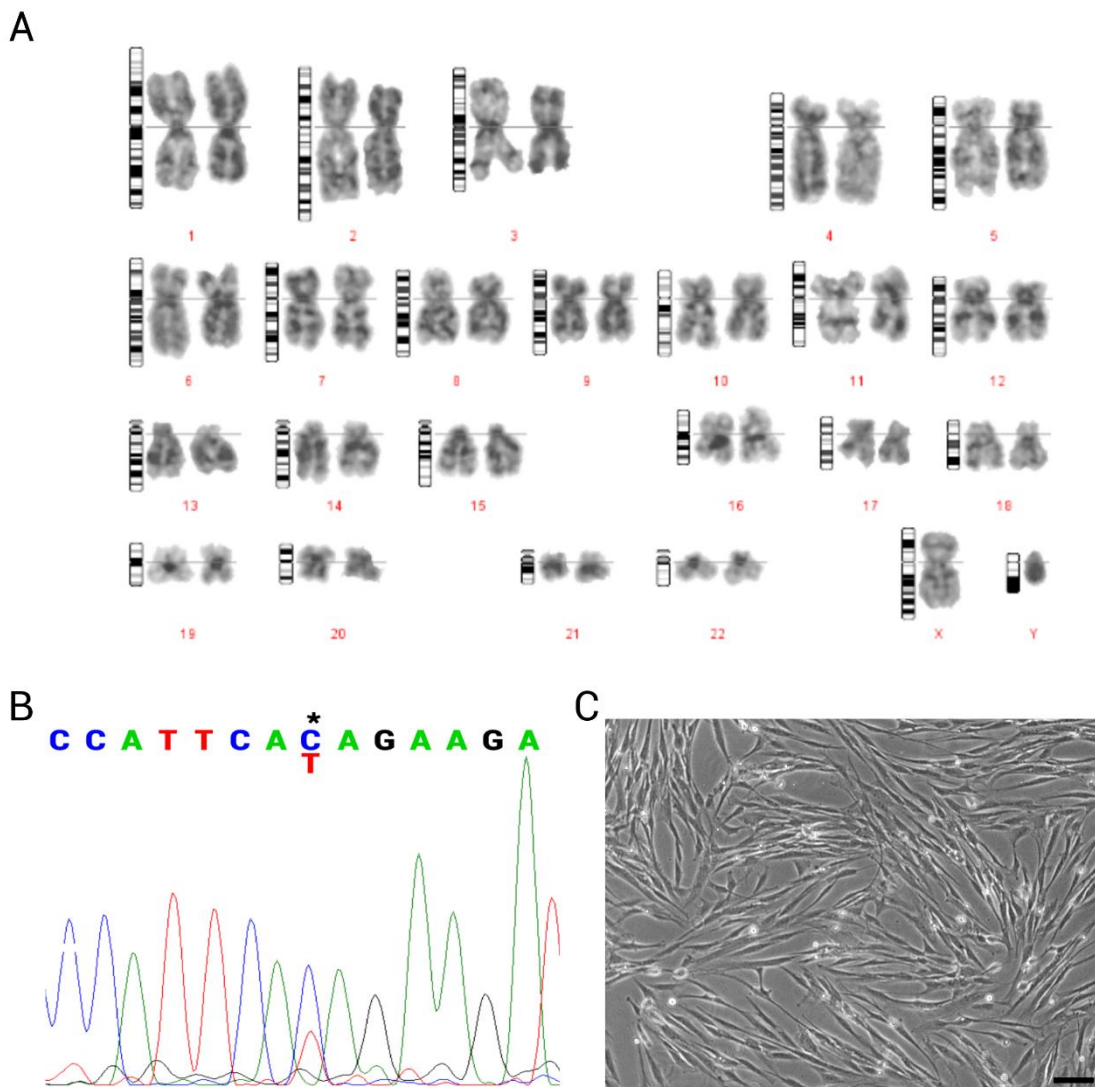
En este contexto, el desarrollo del proceso de reprogramación celular<sup>146,147</sup> y la rápida expansión del campo de la diferenciación de las CMPih a diversos tejidos nos permite obtener modelos en 2 y 3 dimensiones provenientes de pacientes afectados que complementen los modelos ya descritos<sup>247-249</sup>.

Como se mencionó en la introducción las CMPih se obtienen a partir de células somáticas adultas diversas como fibroblastos o células mononucleares de sangre periférica y pueden ser reprogramadas por medio de la transducción *in vitro* de partículas virales que portan secuencias codificantes para *OCT-4*, *SOX-2*, *KLF-4* y *c-MYC*, factores de transcripción cruciales para el mantenimiento del estado indiferenciado (también conocidos como factores de Yamanaka). Así, las CMPih obtenidas presentan patrones de expresión génica y proteica muy similares a las CMEh; se autorenievan y tienen la capacidad de diferenciarse a las tres capas germinales. De esta manera, las CMPih derivadas de pacientes portadores de mutaciones resultan una herramienta potente a la hora de estudiar estas enfermedades.

### 2.1 Reprogramación de fibroblastos dérmicos (FD) de paciente portador de la mutación en *PSEN1* (c.C356T; p. T119I)

Considerando las limitantes observadas en el capítulo 1 y ante la disponibilidad de muestras biológicas, nos resultó pertinente generar una línea de células madre pluripotentes inducidas humanas (CMPih) a partir de fibroblastos dérmicos (FD) del paciente caso índice en el cual se descubrió dicha mutación con el fin de mejorar el modelado de la patología. Los mismos fueron derivados a partir de tejido sano del paciente extraído tras un procedimiento quirúrgico, bajo el consentimiento informado del donante y siguiendo los lineamientos del comité de ética de la institución.

Una vez obtenidos, amplificados y congelado un stock de los FD, se procedió a analizar que los mismos mantuvieran la mutación de interés como así también realizar un análisis citogenético para detectar posibles anomalías cromosómicas que pudieran haberse generado durante el establecimiento del cultivo primario. Es común encontrar variaciones cromosómicas producidas por el proceso de reprogramación celular <sup>250-252</sup>, por eso es clave determinar *a priori* si el paciente contaba, además de la mutación reportada, con algún tipo de variación citogenética para poder comparar con las líneas generadas.

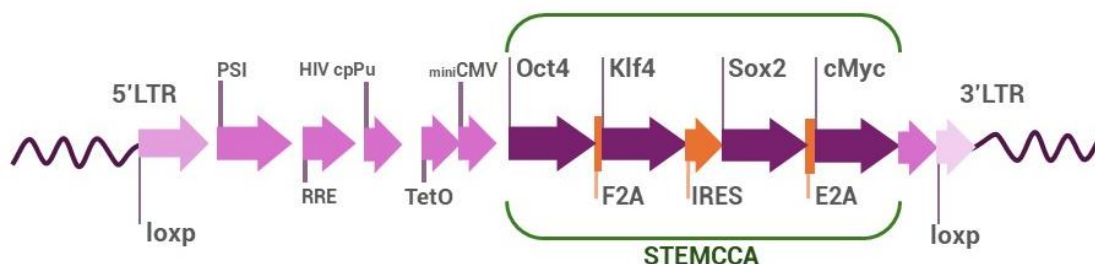


**Figura 36. Análisis de los FD del paciente portador de la mutación en *PSEN1* p.T119I. A.** Análisis del cariotipo de 50 metafases de los fibroblastos portadores. Resultado: cariotipo normal, masculino (46, XY) Método de análisis: convencional, bandas WTG **B.** Secuencia mutada en heterocigosis (C>T) en el exón 5 del gen de *PSEN1* **C.** Foto en campo claro de fibroblastos dérmicos cultivados en placa en medio DMEM + 10% SFB. Barra de escala = 20 μm.

Como puede observarse en la figura 36A, el análisis del cariotipo reveló que los FD presentaron un cariotipo masculino (46, XY) sin ningún tipo de anomalía

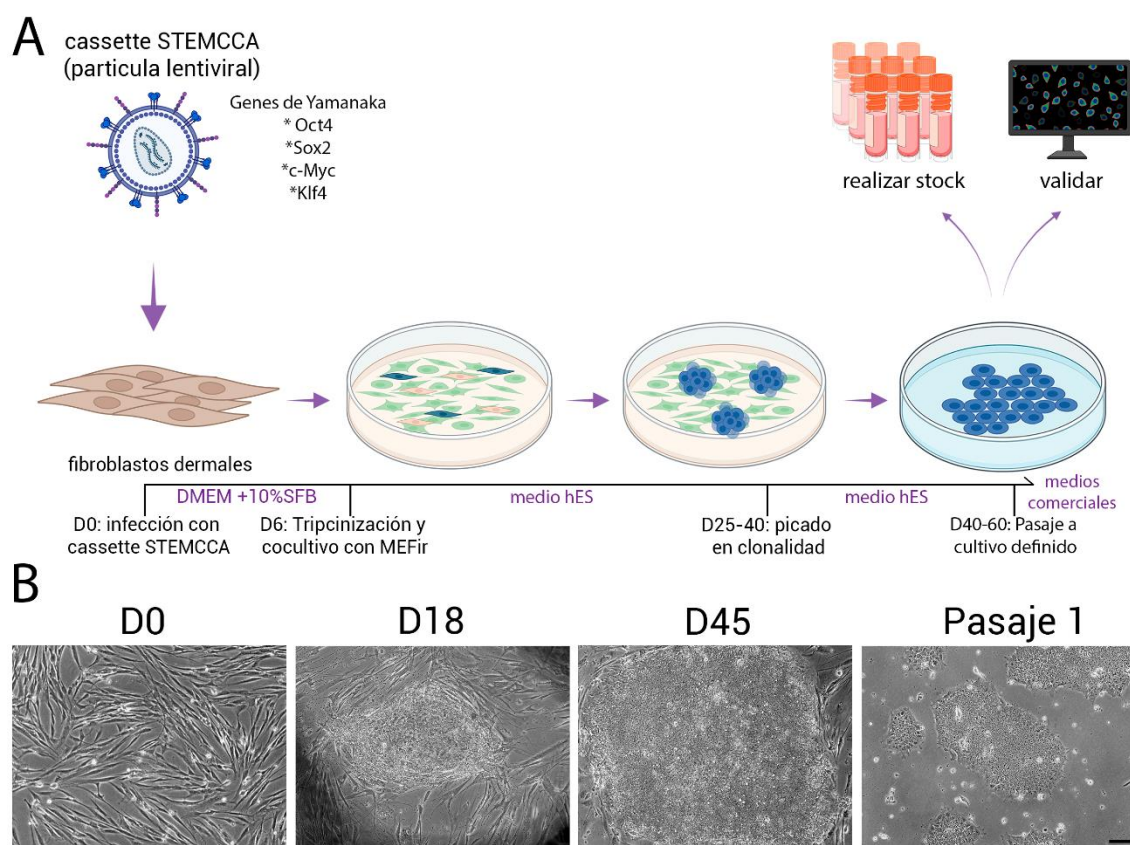
cromosómica. A su vez, la muestra de material genético obtenida por el paciente y analizada por secuenciación de Sanger, presentó la variante nucleotídica c.356C>T, en heterocigosis, en el exón 5 del gen *PSEN1* (NM\_000021.4) (Figura 36B). Además, el cultivo primario tenía un fenotipo ahusado, típico de células fibroblásticas (Figura 36C). Estos resultados nos indicaron que los FD mantenían las características propias del paciente del cual se extrajeron y decidimos iniciar con el proceso de reprogramación celular, para el cual realizamos la transducción de los FD con partículas lentivirales que contenían el casete de reprogramación STEMCCA (ver materiales y métodos).

El casete STEMCCA (Figura 37) posee un promotor mínimo CMV (mini CMV) río arriba de la secuencia de los genes *OCT-4* y *KLF4* con una secuencia de autoescisión peptídica (F2A) que permite su co-expresión. A su vez, posee una secuencia IRES que permite el inicio de la traducción de los otros 2 genes de Yamanaka (*SOX-2* y *c-MYC*, respectivamente) intercalados por la secuencia de autoclivaje peptídico E2A. Adicionalmente, este casete presenta el agregado de otras secuencias (PSI, RRE, HIV cp pu, TetO y WPRE) que permiten que la expresión de estos genes sea la adecuada. Finalmente, el casete de expresión está rodeado por las secuencias *loxP* que permiten escindir el mismo del genoma al expresar exógenamente la proteína recombinasa CRE. Dado que el método de reprogramación con el que se realizó este trabajo se basó en el uso de partículas lentivirales las cuales modifican células quiescentes por integración en el genoma del huésped, es importante destacar la posibilidad posterior de eliminar la construcción insertada en el genoma mediante el sistema Cre-lox, especialmente si consideramos la potencialidad de las CMPih en el contexto de las terapias regenerativas. Dado que no era el eje central de este trabajo plantear un enfoque terapéutico para el paciente una vez obtenidas las CMPih, decidimos continuar trabajando con el casete integrado en el genoma.



**Figura 37. Casete de reprogramación STEMCCA.** Esquema de las secuencias que componen el plásmido que se utilizó para realizar las reprogramaciones de FD. En rosa claro se encuentran las secuencias 5' y 3' LTR con sus respectivos sitios LoxP. En lila, las secuencias regulatorias. En violeta los genes que codifican para los factores de transcripción inductores de la reprogramación conocidos como “genes de Yamanaka” y en naranja, las secuencias de autoclivaje (F2A y E2A) y de reinicio de la traducción proteica (IRES). En verde se representa el grupo de secuencias que van a ser transcritas y traducidas comúnmente conocidas como STEMCCA.

El proceso de reprogramación está explicado en detalle en la sección “Materiales y Métodos”. Brevemente, se transdujeron FD y luego se procedieron a realizar los cambios de medio correspondientes. En el día 6, los FD fueron tripsinizados y plaqueados en placas de cultivo de 100 mm con MEFi. Se cambió el medio regularmente hasta empezar a observar la aparición de colonias compactas, con bordes definidos con células que presentan una relación núcleo/citoplasma elevado. En ese momento se marcaron las potenciales colonias y se mantuvo el cambio de medio diario hasta obtener colonias lo suficientemente grandes para poder ser pasadas de forma clonal y amplificarlas para criopreservarlas y comenzar su validación. Para evitar el co-cultivo con MEFi decidimos pasar rápidamente a cultivar las CMPih en condiciones “*feeder free*”, sin MEFi, sobre una matriz extracelular comercial (Geltrex) y utilizando medios de cultivos totalmente definidos (mTeSR1) (Figura 38).



**Figura 38. Protocolo de reprogramación celular.** A. Esquema del protocolo de reprogramación celular, adaptado de <sup>222</sup> para obtener CMPih a partir de FD portadores de la mutación c.356C>T p.T119I en el gen de *PSEN1*. B. Imágenes representativas de campo claro de las diferentes etapas del proceso de reprogramación. D0: FD previo a la infección D18: Colonias pequeñas, rodeadas de MEFi D45: Colonia grande que presenta características morfológicas propias de CMPih, rodeada de MEFi Pasaje 1: Colonia pasada a condiciones *feeder-free* (cultivo definido, libre de MEFi) sobre una matriz extracelular comercial (Geltrex) y medio de cultivo mTeSR1. La escala representa 20 μm.

Realizamos dos veces el protocolo ejemplificado en la figura 38. De los mismos, picamos 31 colonias las cuales inicialmente mantuvimos en medio hES sobre MEFi hasta poder pasarlas exitosamente a medios definidos [matriz celular de Geltrex (Thermo

Fischer Scientific) y medio de cultivo mTSeR1 (StemCell Technologies)]. Es importante destacar que este es un proceso laborioso y que no todas las colonias (Figura 38B. D45) sobreviven los sucesivos pasajes y se adaptan a las condiciones de cultivo *feeder-free* (Figura 38B. pasaje 1). Esto se debe a que gran parte de las reprogramaciones son parciales y las células de muchas de las colonias terminan muriendo, diferenciándose o bien perdiendo adherencia al sustrato.

De las 31 colonias iniciales únicamente pudimos amplificar, criopreservar y validar a 3 clones a los cuales llamamos FFAD1.1c1, FFAD1.2c4 y FFAD1.2c8.

## 2.2 Validación de la troncalidad de los clones FFAD1.2c1, FFAD1.2c4 y FFAD1.2c8

Las células madre pluripotentes inducidas poseen propiedades similares a las de las CMEh<sup>142,146,147</sup>, como son su capacidad de auto renovación y de diferenciación a los tres linajes celulares, entre otras (Tabla 10). La validación de algunas de estas propiedades en las colonias obtenidas se mostrará en los siguientes apartados.

| Propiedad   | CMEh                         | CMPIh             |
|---|------------------------------|-------------------|
| Origen  | Macizo celular (blastocisto) | Células somáticas |
| Relación núcleo/citoplasma  | Alta                         | Alta              |
| Formación de cuerpos embrioides, diferenciación a las tres capas germinales | Si                           | Si                |
| Formación de teratomas en ratones <i>nude</i>                               | Si                           | Si                |
| Actividad de fosfatasa alcalina   | +                            | +                 |
| Expresión de SSEA3/4, OCT4, NANOG, SOX2, TRA 1-60                           | +                            | +                 |
| Capacidad de crecimiento independiente de una capa nutricia                 | Si                           | Si                |
| Actividad de Telomerasa   | Si                           | Si                |
| Cariotipo estable, idéntico al de las células parentales                    | Si                           | Si                |

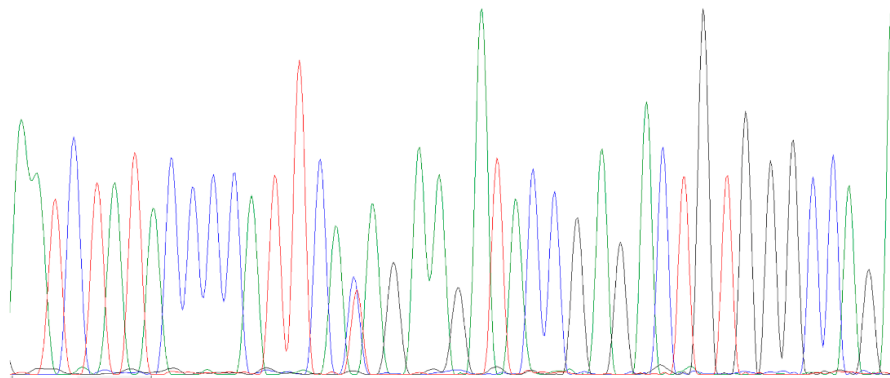
**Tabla 10: Características compartidas entre las CMEh y las CMPIh.**

### 2.2.1 Secuenciación de Sanger: Presencia de la mutación *PSEN1* (NM\_000021.4) c.356C>T

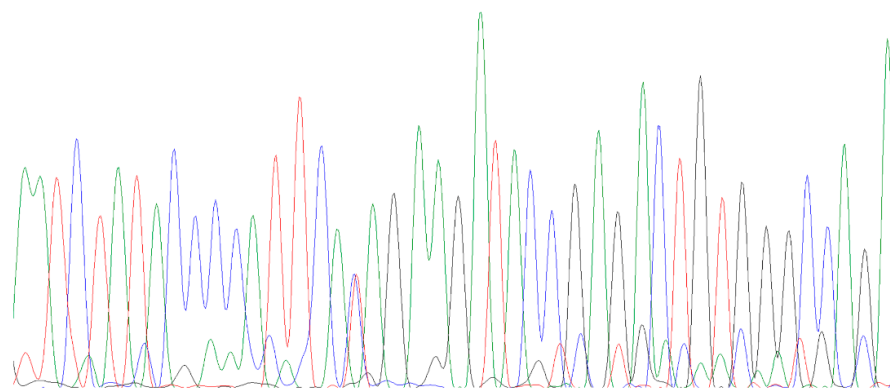
En primer lugar, nos aseguramos haber realizado el proceso de reprogramación de los fibroblastos correctos, garantizando el no haber cometido errores metodológicos ni que, por el procedimiento de reprogramación, se haya perdido o modificado la mutación. Para ello, se extrajo muestra de material genómico completo de cada una de las líneas obtenidas, se amplificó la región que contiene el exón 5 (PSEN1 EX 5-Fw y PSEN1 EX 5-Rev. Materiales y métodos, sección PCR a tiempo final) y alrededores y se realizó una secuenciación por el método de Sanger (Figura 39).

**A****FFAD1.1c1**

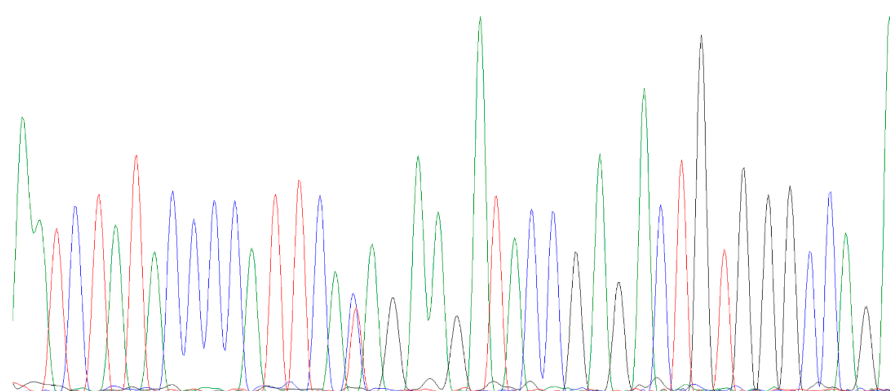
AATCTATACCCCATTTCA<sup>\*</sup>**C**AGAAGATACCGAGACTGTGGGCCAGA

**B****FFAD1.2c4**

AATCTATACCCCATTTCA<sup>\*</sup>**C**AGAAGATACCGAGACTGTGGGCCAGA

**C****FFAD1.2c8**

AATCTATACCCCATTTCA<sup>\*</sup>**C**AGAAGATACCGAGACTGTGGGCCAGA



**Figura 39. Análisis de la secuencia de la región de la mutación en el exón 5 en las líneas CMPih generadas.** Secuencias mutadas en heterocigosis (C>T) en el exón 5 del gen de PSEN1 para las líneas FFAD1.1c1(A), FFAD1.2c4 (B) y FFAD1.2c8(C). El asterisco marca la base que se encuentra modificada.

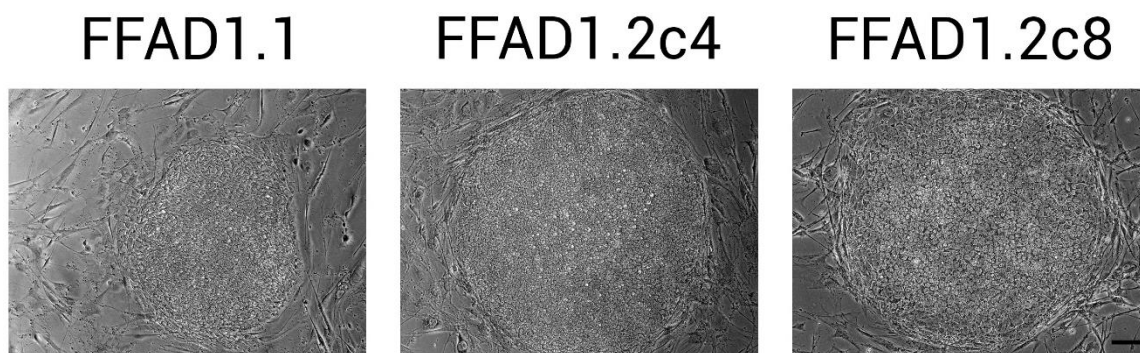


Como puede observarse en la figura 39, los tres clones mantuvieron la mutación c.356C>T en el exón 5 del gen de *PSEN1*, lo que nos permitió avanzar con el resto del análisis.

### 2.2.2 Morfología celular

Una de las maneras de cultivar *in vitro* CMPih es en co-cultivo con fibroblastos murinos embrionarios irradiados (MEFi por sus siglas en inglés. *Irradiated Murine Embryonic Fibroblasts*). En estos casos, se observa que las CMPih se agrupan formando colonias de forma redondeada y bordes definidos y que, a nivel celular, las CMPih presenten una relación núcleo/citoplasma.

Como puede observarse en la figura 40, cuando fueron cultivados en una placa con MEFi, los clones se observaron como colonias compactas, redondeadas, de bordes definidos, que fueron rodeadas por MEFi las cuales soportan y mantienen el estado indiferenciado de las CMPih.



**Figura 40. Morfología de las colonias de los clones en co-cultivo sobre MEFi.** Se muestran imágenes representativas de campo claro de las colonias de los diferentes clones obtenidos, cultivados sobre una capa nutricia de MEFi con medio hES. La línea de escala representa 20  $\mu$ m.

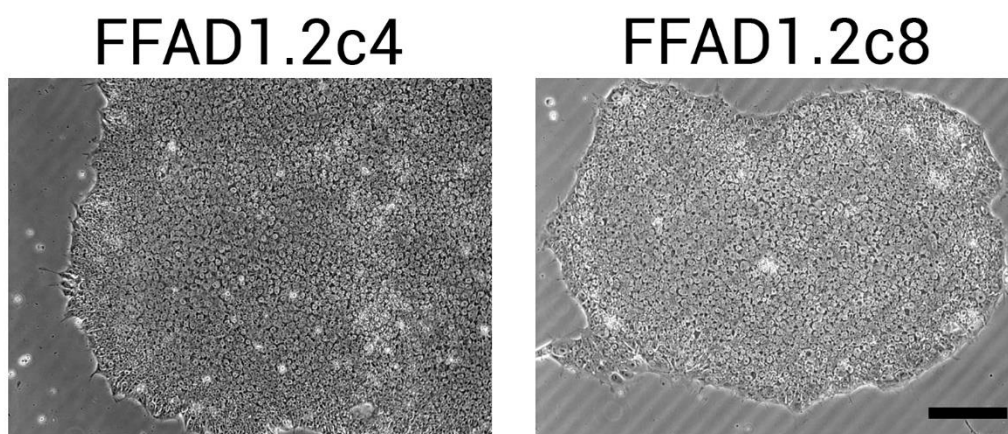
El cultivo *in vitro* de células madre pluripotentes, tanto de CMEh como CMPih, debe ser cuidadoso y preciso ya que, por su capacidad pluripotente, la presencia de morfógenos específicos o cambios en las condiciones de cultivo (como pueden ser el porcentaje de CO<sub>2</sub> utilizado o la temperatura de cultivo) son capaces de inducir la diferenciación de estas células.

A su vez, considerando su potencial uso en medicina regenerativa, el cultivo de las CMPih en condiciones *feeder free*, es decir sin el co-cultivo sobre la capa nutricia de origen murino, es importante para evitar el rechazo por parte de los pacientes en terapias de reemplazo y para evitar la posible contaminación con patógenos de origen animal. En los últimos años se han desarrollado múltiples medios de cultivo totalmente definidos que permiten sostener el estado indiferenciado de la CMPih<sup>253</sup>. En este proyecto se utilizó como medio de cultivo el medio mTSeR1, el cual está formulado con componentes



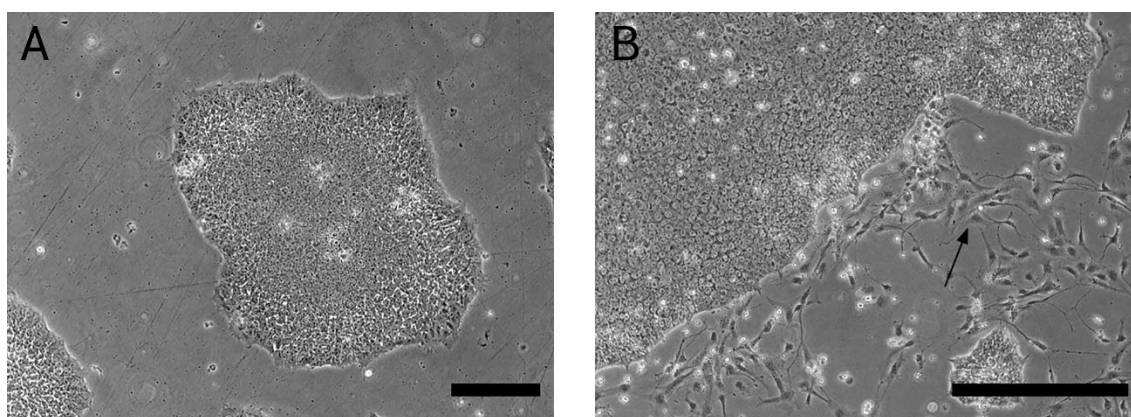
proteicos derivados de fuentes recombinantes o materia prima humana, de forma de generar condiciones *xeno-free*<sup>254</sup>.

En dicho sentido, observamos una morfología y disposición de colonia similar al realizar el pasaje a cultivo *feeder free*, utilizando matrices extracelulares comerciales (Geltrex) y medio de cultivo definido (mTeSR1) en el caso de los clones FFAD1.2c4 y FFAD1.2c8 (Figura 41). Al final del capítulo se discutirá la omisión del pasaje a medios definidos de la línea FFAD1.2c1 (ver resultados parciales del capítulo 2).



**Figura 41. Morfología de las colonias de los clones en condiciones de cultivo *feeder-free*.** Se muestran imágenes representativas de campo claro de las colonias de los diferentes clones cultivadas sobre una matriz extracelular comercial (Geltrex) con medio mTeSR1. La escala representa 20  $\mu$ m.

Finalmente, es importante destacar que, a lo largo de los pasajes en medios definidos, tanto la morfología de las colonias como la elevada relación núcleo/citoplasma se mantuvieron (Figura 42A). En algunos casos, se presentaron ocasionales zonas de diferenciación, distinguibles por un cambio morfológico de las células (figura 42B), demostrando la pluripotencia de las colonias. Como se mencionó en materiales y métodos, antes de realizar protocolos de diferenciación dirigidos y para mantener el estado indiferenciado general, se procedió a retirar las áreas diferenciadas por aspiración.

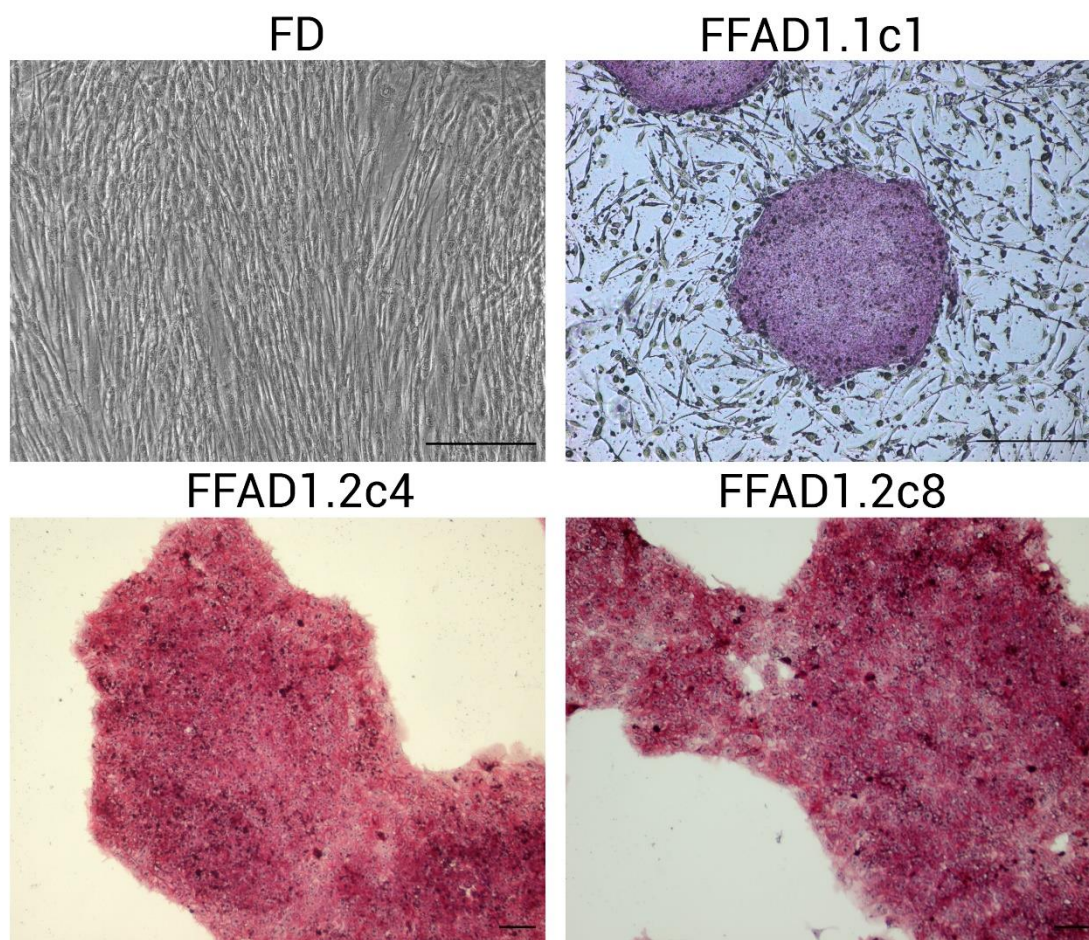


**Figura 42. Morfología de colonias, estado indiferenciado y diferenciado.** Se muestran imágenes representativas de campo claro de las colonias de los diferentes clones cultivados sobre una matriz de Geltrex con medio mTSeR1. **A.** Colonia compacta sin signos de diferenciación. **B.** Borde de una colonia de CMPih que presenta signos de diferenciación. La flecha indica las células que han iniciado un proceso de diferenciación. La escala representa 20  $\mu$ m.

### 2.2.3 Actividad de la enzima fosfatasa alcalina

Una de las características propias de las CMPih es su capacidad intrínseca de desfosforilar múltiples sustratos debido a la alta expresión de un subgrupo de fosfatasas alcalinas que se encuentran activas en el estado indiferenciado de las CMEh como así también de las CMPih<sup>142,147</sup>.

Evaluamos la actividad de fosfatasa alcalina utilizando un kit comercial (Sigma Aldrich) y como se muestra en la figura 43, en los tres clones observamos elevada actividad enzimática. A su vez, los FD parentales no presentaron actividad de dicha enzima. Esta propiedad es intrínseca de las CMPih generadas y no del método de cultivo ya que se observó tanto en co-cultivo sobre MEFi como en condiciones *feeder-free*.



**Figura 43. Ensayo de actividad de fosfatasa alcalina.** Se muestran imágenes representativas de campo claro de los fibroblastos dérmicos parentales (FD) y los diferentes clones en condiciones de co-cultivo sobre MEFi (FFAD1.1c1) o cultivadas en condiciones *feeder-free* (FFAD1.2c4 y FFAD1.2c8) tras realizar el

ensayo de actividad de fosfatasa alcalina. Como se puede observar, ni en lo FD ni en los fibroblastos murinos se observó actividad de fosfatasa alcalina. La escala representa 20  $\mu\text{m}$ .

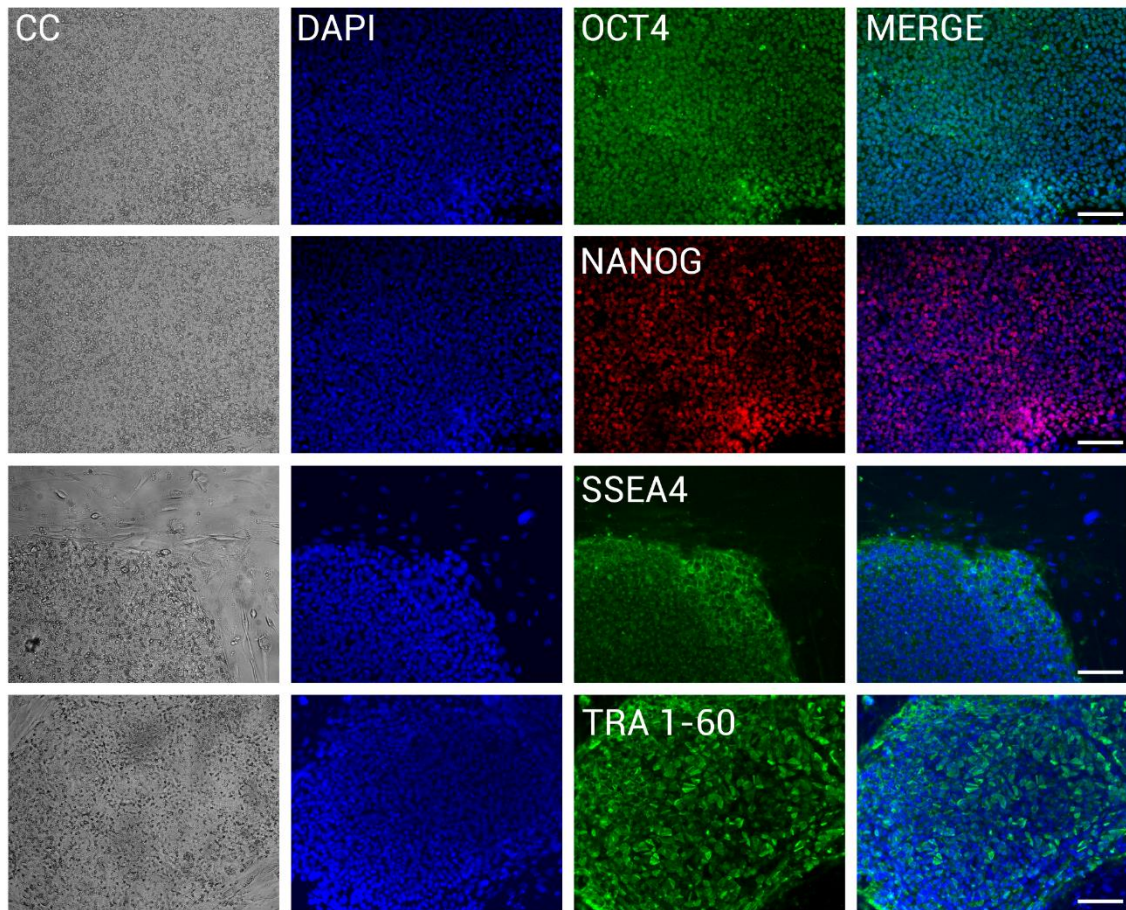
#### **2.2.4 Estudio de la expresión de marcadores de pluripotencia**

Dentro de las características principales de las CMPih se destaca la expresión de marcadores clave en la manutención del estado indiferenciado como son los factores de transcripción *NANOG* y *OCT4*, y las proteínas de membrana SSEA-4 y TRA1-60. La meticulosa evaluación de estos marcadores es crucial para garantizar la pureza y calidad de las CMPih.

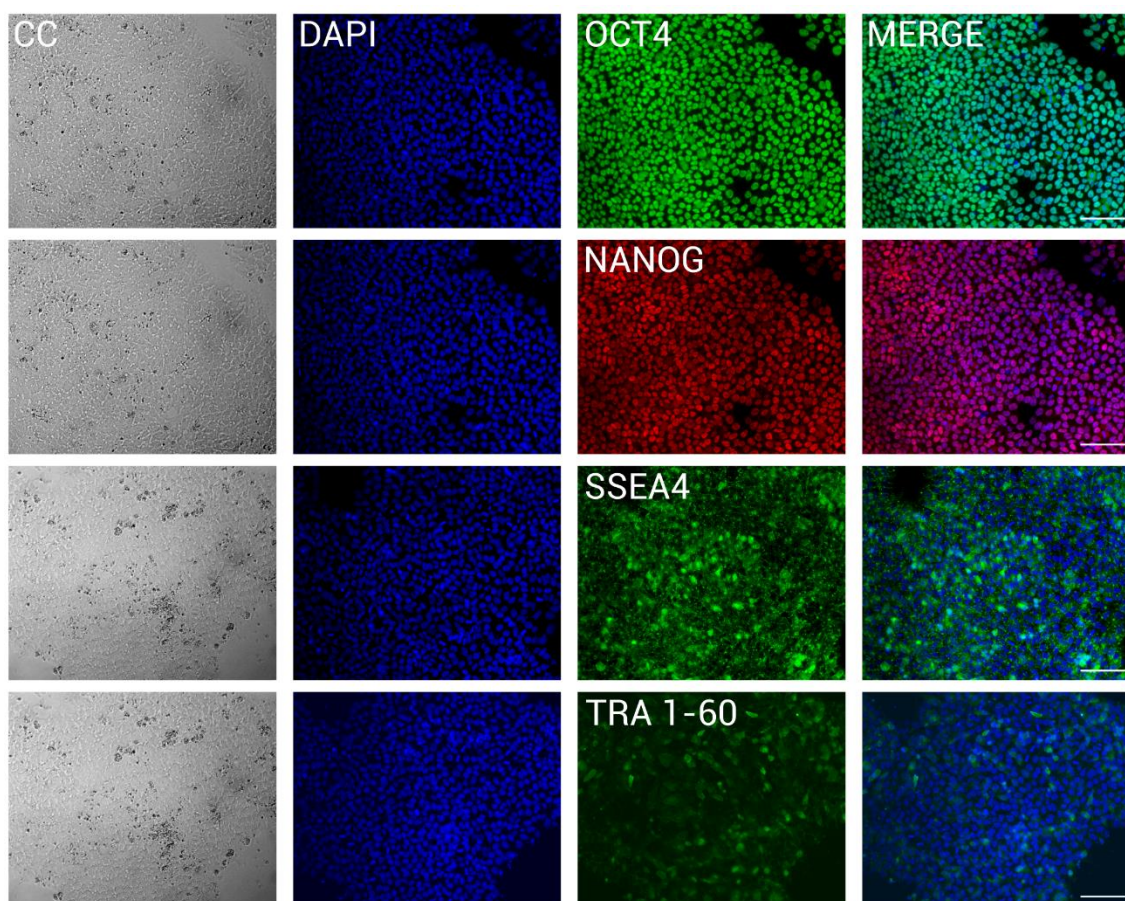
En particular, la expresión regulada de *NANOG* y *OCT4* ha sido muy estudiada en el campo de la embriología ya que juegan un rol central en el mantenimiento de la naturaleza pluripotente de las CMPih<sup>255</sup>. Estos factores de transcripción activan genes asociados al estado indiferenciado, mientras que reprimen genes asociados a la determinación de linajes celulares<sup>256</sup>. Por su parte, se ha demostrado que TRA1-60 y SSEA 4 son marcadores de linaje de CMEh y CMPih<sup>257</sup>.

Analizamos entonces los niveles de expresión de los transcritos y de las proteínas mencionadas anteriormente por RT-qPCR e inmunomarcación con anticuerpos específicos (Figuras 44 a 46).



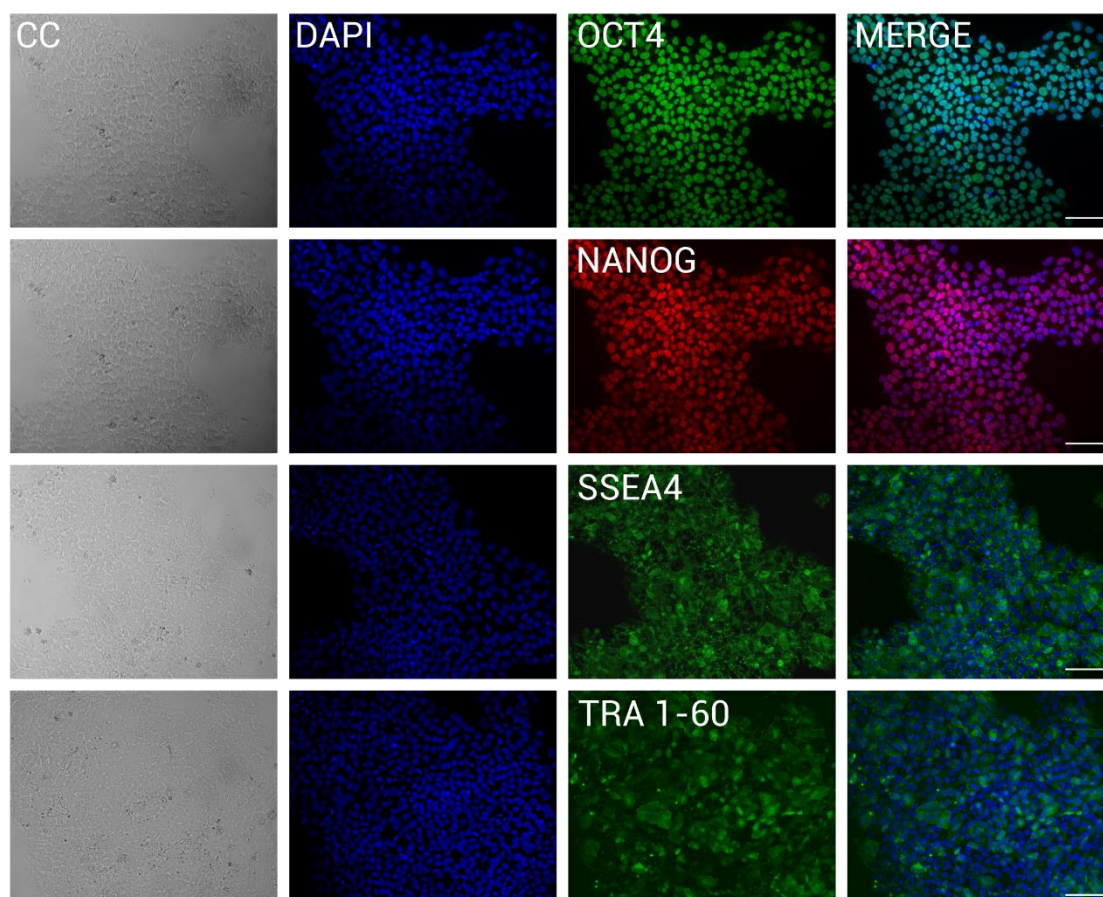


**Figura 44. Detección de marcadores de pluripotencia en el clon FFAD1.1c1.** Detección por inmunofluorescencia indirecta de los marcadores de pluripotencia OCT-4, NANOG, SSEA4, y TRA-1-60. Las células fueron cultivadas sobre Geltrex con medio definido mTeSR1. Los núcleos celulares fueron teñidos con el intercalante DAPI. La escala representa 20  $\mu$ m.



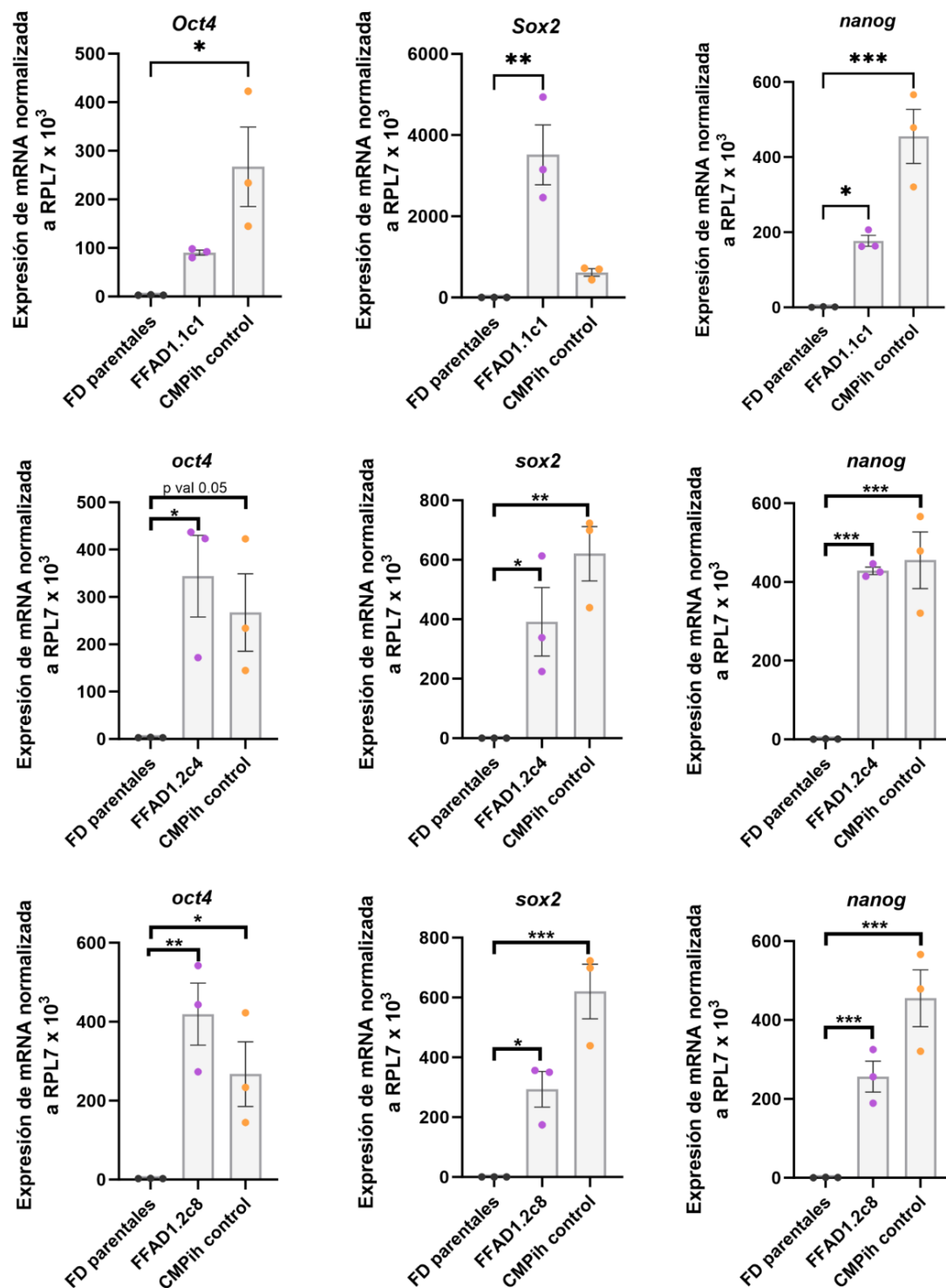
**Figura 45. Detección de marcadores de pluripotencia en el clon FFAD1.2c4.** Detección por inmunofluorescencia indirecta de los marcadores de pluripotencia OCT-4, NANOG, SSEA4, y TRA-1- 60. Las células fueron cultivadas sobre Geltrex con medio definido mTeSR1. Los núcleos celulares fueron teñidos con el intercalante DAPI. La escala representa 20  $\mu$ m.





**Figura 46. Detección de marcadores de pluripotencia en el clon FFAD1.2c8.** Detección por inmunofluorescencia indirecta de los marcadores de pluripotencia OCT-4, NANOG, SSEA4, y TRA-1-60. Las células fueron cultivadas sobre Geltrex con medio definido mTeSR1. Los núcleos celulares fueron teñidos con el intercalante DAPI. La escala representa 20  $\mu$ m.

Como puede observarse en las figuras 44 a 46, en los tres clones visualizamos la expresión de las cuatro proteínas estudiadas, de forma homogénea a lo largo de la colonias. Para continuar con la confirmación del estado indiferenciado, realizamos mediciones de niveles de ARNm por RT-qPCR comparando con los valores expresados en los fibroblastos parentales como así también con unas CMPih previamente reprogramadas en nuestro laboratorio (FN2.1) como control positivo. En esta caso agregamos a nuestro análisis los niveles de expresión de ARNm de *SOX-2*, factor de transcripción también asociado al estado pluripotente. En la figura 47 se muestra como todos los clones presentaron una expresión elevada de todos los marcadores estudiados, comparada con los FD parentales.

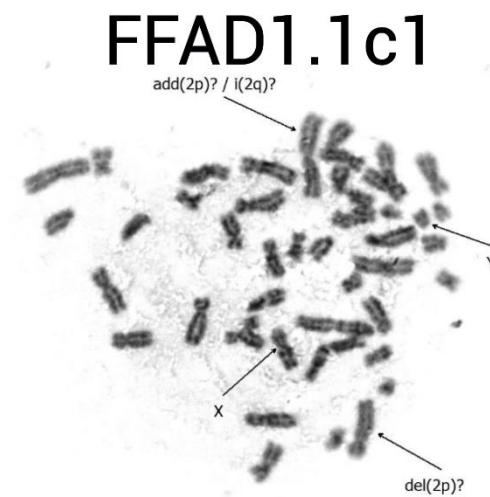


**Figura 47. Análisis de los niveles de expresión de los ARNm de genes endógenos de pluripotencia.** Análisis por RT-qPCR de los niveles de expresión de ARNm de los genes endógenos *OCT4*, *SOX2* y *NANOG* en los clones FFAD1.1c1 (arriba), FFAD1.2c4 (medio) y FFAD1.2c8 (abajo). Se utilizó la expresión de RPL7 para normalizar los datos. n = 3. Se realizó la prueba estadística de ANOVA de una cola para el general de las muestras considerando diferencias significativas cuando (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$  y (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

### **2.2.5 Análisis citogenético**

Como se mencionó anteriormente, es común encontrar modificaciones genéticas provocadas por el proceso de reprogramación celular <sup>252</sup>. Por ese motivo, analizamos el estado de los cromosomas de las clones obtenidos con el fin de establecer si los mismos mantenían el cariotipo observado en los FD parentales (Figura 36A). Las células fueron procesadas con colchicina y solución isotónica (ver detalle en materiales y métodos) y posteriormente fueron analizadas por la genetista Maria Ziembar de laboratorio citogenético Kromos.





**Figura 48. Cariotipo de los clones de obtenidos.** Imágenes de análisis de bandeo G cromosómico de los clones obtenidos. Se analizaron 50 metafases por clon, con una resolución cromosómica de 440.

Como puede observarse en la figura 48, tanto los clones FFAD1.2c4 como FFAD1.2c8 presentaron un cariotipo humano normal, masculino XY. Sin embargo, en el clon FFAD1.1c1 observamos las siguientes modificaciones comosómicas:

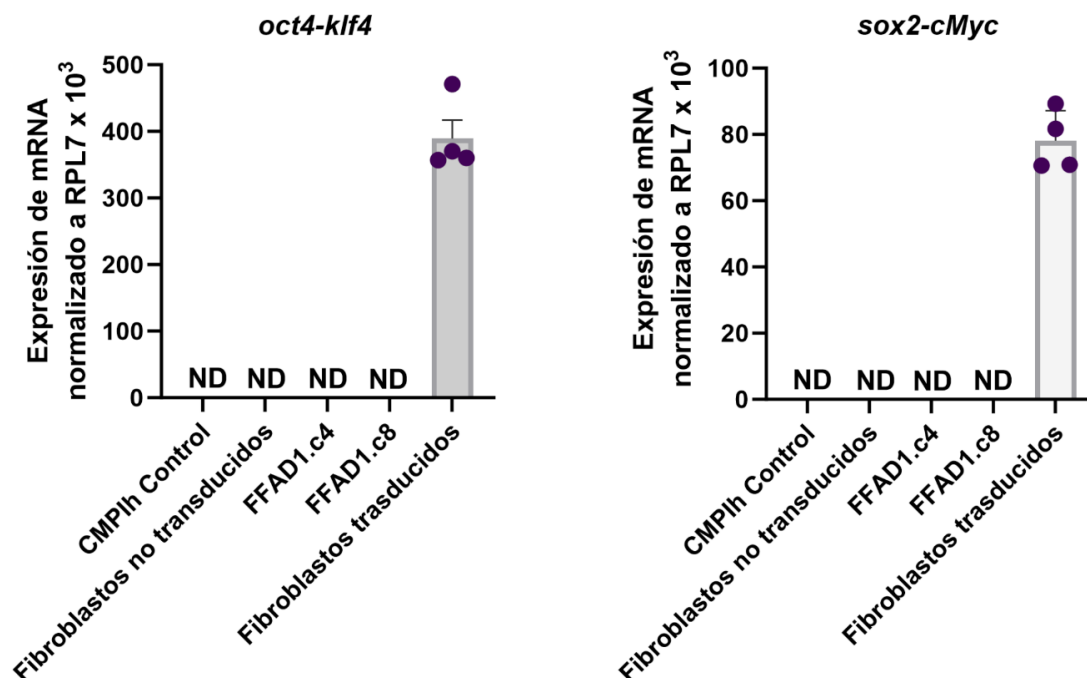
- Falta de ambos cromosomas del par 2.
- Presencia de dos cromosomas adicionales que podrían corresponder a un cromosoma 2 con delección del brazo corto u otro cromosoma 2 con material adicional en el en brazo corto que podría ser parte de una traslocación entre ambos cromosomas del par 2 o un isocromosoma de brazo largo.

Ante la falta de un cariotipo conservado el clon FFAD1.1c1 optamos por descartarlo y continuar con el análisis y validación de los clones restantes.

### **2.2.6 Análisis de silenciamiento del casete de reprogramación STEMCCA.**

El método por el cual nosotros indujimos la reprogramación de los DF depende de la expresión exógena de los genes de pluripotencia de Yamanaka (Figura 38). Sin embargo, si bien la expresión de los mismos es necesaria para reprogramación de los FD y el establecimiento de las CMPih, su posterior expresión genera que las células se mantengan en un estado indiferenciado e impide la correcta diferenciación de las mismas. Por ese motivo es importante asegurarse que, con los pasajes, el casete de expresión de los genes de Yamanaka se silencie.

Con ese objetivo, es decir para verificar que la expresión exógena de los genes de Yamanaka se haya silenciado, cuantificamos los niveles de expresión de los mismos utilizando primers que amplifican exclusivamente los mensajeros exógenos ya que reconocen las secuencias 5' al primero y 3' a segundo de los pares genes (*SOX2-cMYC* y *OCT-4-KLF4* respectivamente). Es decir primers que únicamente pueden generar un amplicón en el contexto de expresión del casete STEMCCA. El análisis de expresión se realizó por RT-qPCR y se utilizaron FD sin transducir como control negativo y una línea celular de CMPih generada y validada previamente en el laboratorio, llamada FN2.1, como control de expresión de una línea de CMPih en dónde el casete ya se encuentra silenciado. Además, se infectaron los FD del paciente y se extrajo muestra de ARNm luego de 3 días de la misma para comparar con los niveles de expresión de una línea en dónde la expresión exógena a partir del casete STEMCCA sigue activa (control positivo) (Figura 49).



**Figura 49. Análisis de los niveles de expresión de los ARNm de los genes presentes en el casete de reprogramación STEMCCA.** Análisis por RT-qPCR de los niveles de expresión de ARNm de los sets de genes exógenos expresados por el plásmido STEMCCA. Se utilizó la expresión de *RPL7* para normalizar los datos.  $n = 4$ . Al no presentarse expresión en ninguna de las líneas de CMPih o fibroblastos sin transducir, no se realizó análisis estadístico.

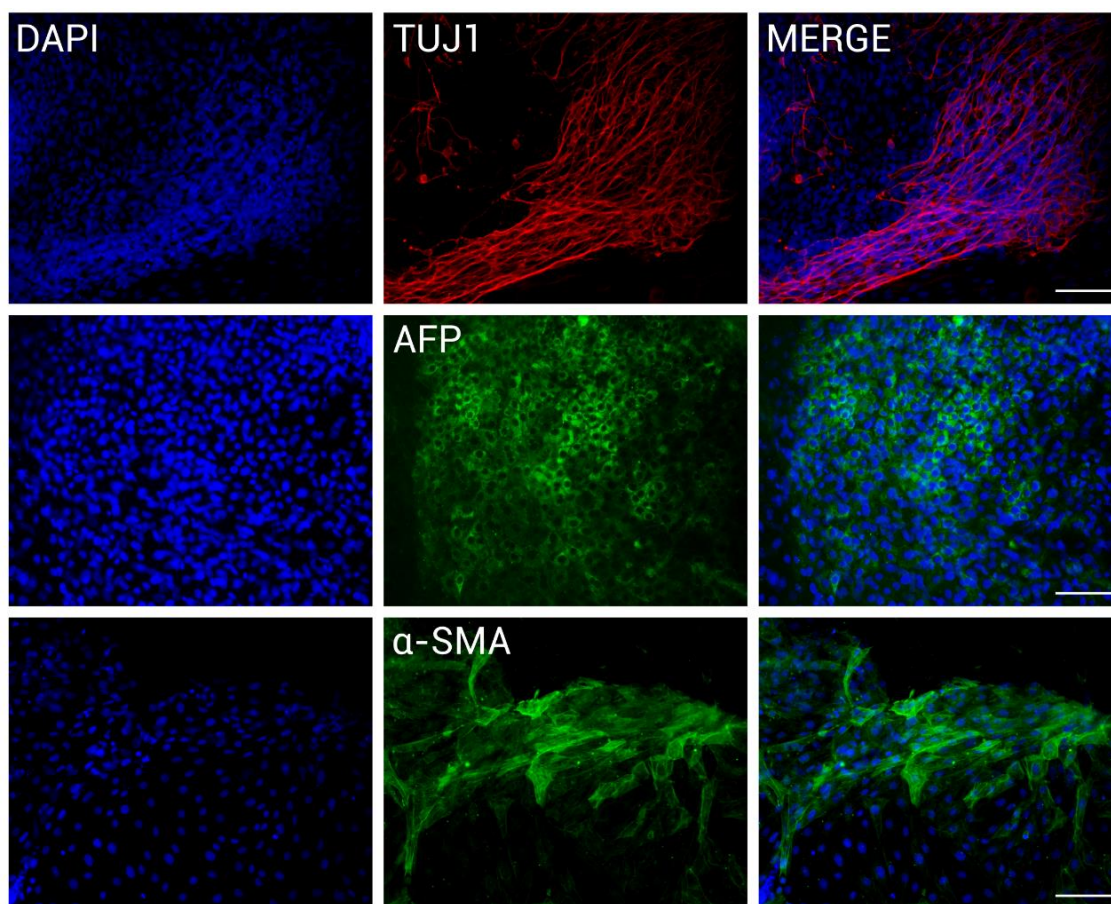
Como se muestra en la figura 49, en los FD infectados con el casete STEMCCA se detectó expresión exógena de los genes de Yamanaka a los 3 días post-transducción. No se observó, por otro lado, expresión de los mensajeros exógenos de los genes *SOX2*, *cMYC*, *OCT4* Y *KLF4* en los FD no transducidos, ni en la línea FN2.1 ni en clones FFAD1.2c4 y FFAD1.2c8. En resultado indica que en ambos clones obtenidos el casete STEMCCA se encontraba silenciado.

### 2.2.7 Diferenciación *in vitro* a células de las tres capas embrionarias mediante el método de formación cuerpos embrioides.

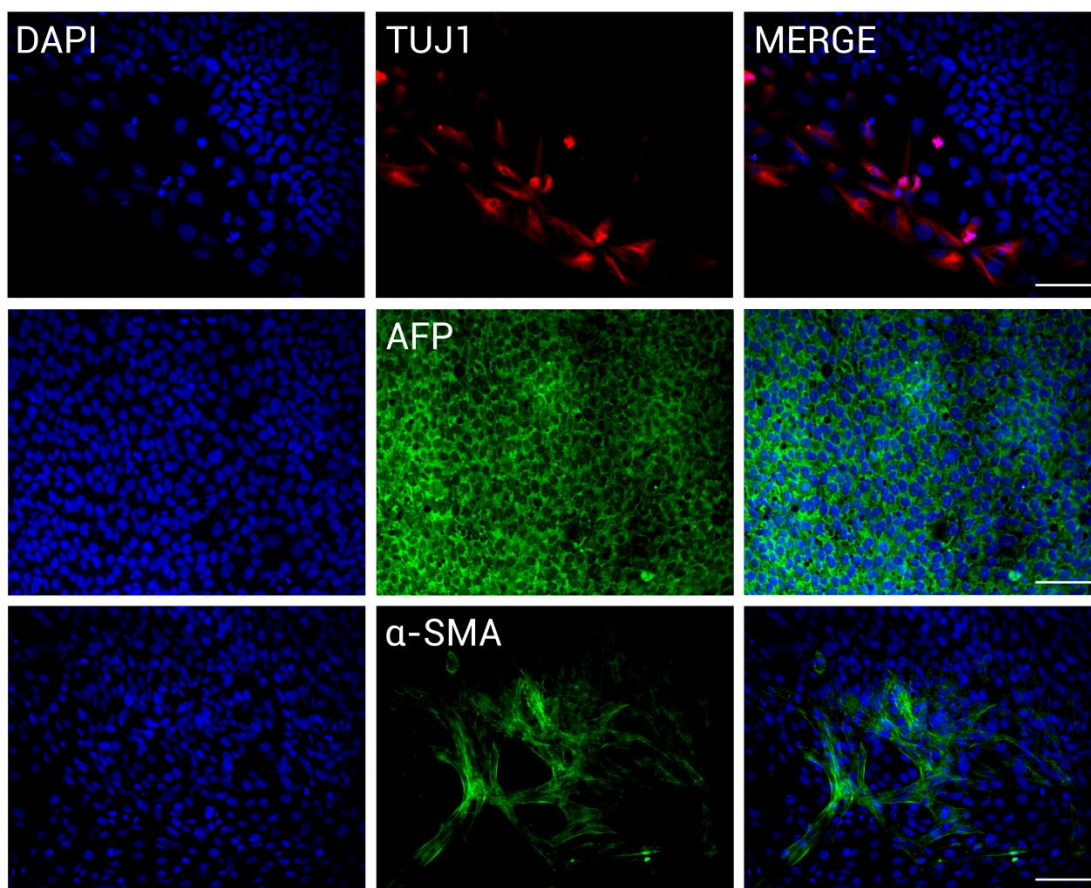
Una de las características principales de las CMPih es su capacidad de diferenciarse a los 3 linajes embrionarios (endodermo, mesodermo y ectodermo). Por ese motivo sometimos a los clones obtenidos a un protocolo de diferenciación no dirigido (utilizando 20% de SFB) basado en la formación de cuerpos embrioides (CE) partiendo de condiciones *feeder-free*. El mismo fue puesto a punto durante este trabajo y ha sido publicado<sup>230</sup>.

Una vez obtenidos los CE de 21 días de diferenciación de cada uno de los clones, evaluamos la expresión por inmunofluorescencia indirecta de  $\beta$ -III tubulina (TUJ1,

marcador de ectodermo), Alfafetoproteína (AFP, marcador de endodermo) y  $\alpha$ -actina de músculo liso (SMA, marcador de mesodermo) (Figuras 50 y 51).



**Figura 50. Detección de marcadores de ectodermo, endodermo y mesodermo luego de la diferenciación *in vitro* del clon FFAD1.2c4.** Imágenes representativas de detección por inmunofluorescencia indirecta de cuerpos embrioides fijados a día 21 de diferenciación no dirigida contra los marcadores de neuroectodermo (TUJ-1), endodermo ( $\alpha$ -SMA) y mesodermo (AFP). Los núcleos celulares fueron teñidos con el intercalante DAPI. n = 3. La escala representa 20  $\mu$ m.



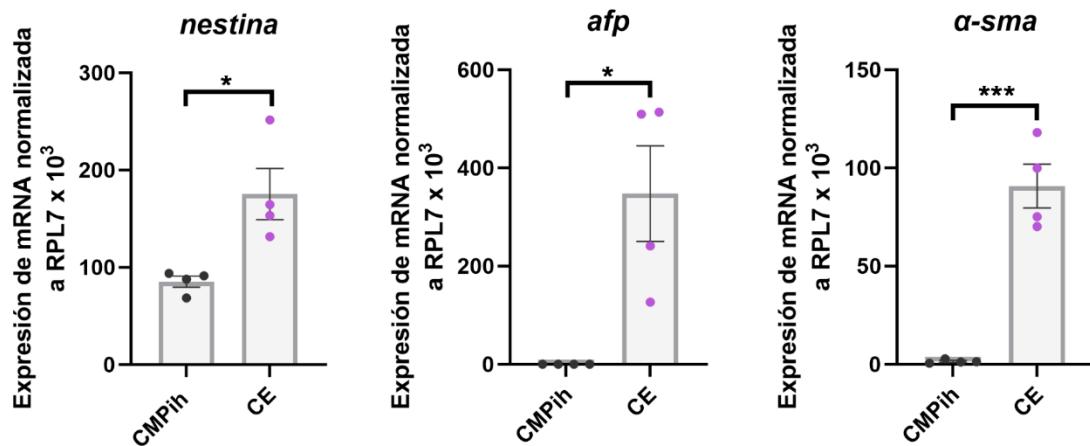
**Figura 51. Detección de marcadores de ectodermo, endodermo y mesodermo luego de la diferenciación in vitro del clon FFAD1.2c8.** Imágenes representativas de detección por inmunofluorescencia indirecta de cuerpos embrioides fijados a día 21 de diferenciación no dirigida contra los marcadores de neuroectodermo (TUJ-1), endodermo ( $\alpha$ -SMA) y mesodermo (AFP). Los núcleos celulares fueron teñidos con el intercalante DAPI. n = 3. La escala representa 20  $\mu$ m.

Como se muestra en las figuras 50 y 51, al finalizar el protocolo de diferenciación basado en la formación de CE de los clones FFAD1.2c4 y FFAD1.2c8, pudimos observar regiones morfológicamente compatibles con la formación de neuroectodermo, endodermo y mesodermo que resultaron positivas, por medio de inmunofluorescencia indirecta, para los marcadores de linaje TUJ-1,  $\alpha$ -SMA y AFP, respectivamente.

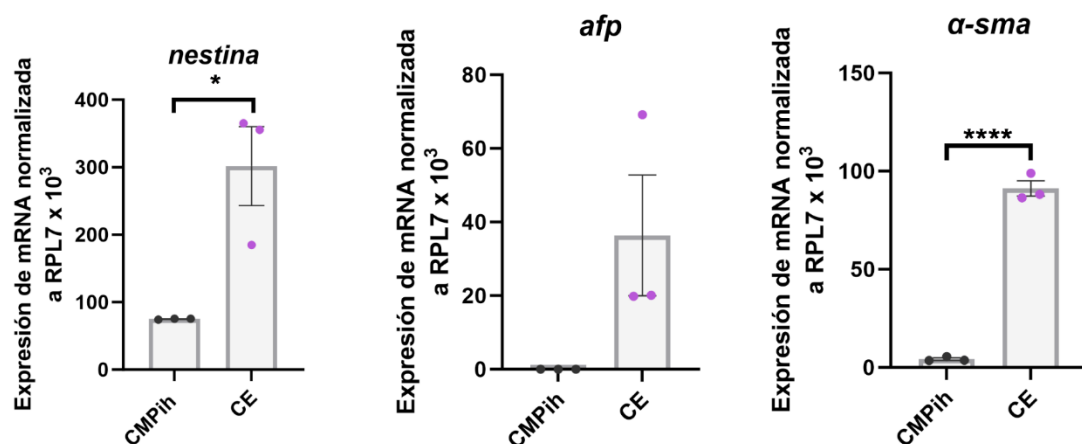
Decidimos además respaldar estos resultados mediante el análisis, por RT-qPCR, de los niveles de expresión de mensajeros de los tres linajes (Nestina,  $\alpha$ -SMA y AFP). Como puede verse en la figura 52 A y B, en ambos clones observamos un aumento en los niveles de expresión de los marcadores de diferenciación de los tres linajes en los CE con respecto a su contraparte indiferenciada.



## A. FFAD1.2c4



## B. FFAD1.2c8



**Figura 52. Análisis de los niveles de expresión de los ARNm de genes de capas embrionarias.** Análisis por RT-qPCR de los niveles de expresión de ARNm de los genes asociados a las capas embrionarias: ectodermo (*NESTINA*), mesodermo (*AFP*) y endodermo ( $\alpha$ -*SMA*). En el gráfico se presentan los niveles basales medidos en CMPih y luego de la realización de realizar los ensayos de diferenciación no dirigida en cuerpos embrioides (CE) para el respectivo clon. **A.** FFAD1.2c4 **B.** FFAD1.2c8. Se utilizó la expresión de RPL7 para normalizar los datos y se graficaron al menos tres experimentos independientes. Se realizó la prueba estadística de t-student para comparar cada gen en las condiciones antes mencionadas, considerando diferencias significativas cuando (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*\*)  $p < 0,01$  y (\*\*\*\*)  $p < 0,001$ .

### 2.2.8 Ensayo de filiación por análisis de repeticiones en regiones microsatélite

Una vez finalizadas las validaciones correspondientes realizamos un análisis de 26 regiones de repeticiones cortas en tándem (STR por sus siglas en inglés, *short tandem repetitions*). Los STR para cada loci son altamente polimórficos en humanos, lo que permite identificar con gran certeza muestras idénticas o altamente emparentadas, motivo por el cual son ampliamente utilizados en medicina forense y filiaciones<sup>258</sup>. El mismo fue realizado por el Laboratorio de Huellas Digitales Genéticas (Facultad de

Farmacia y Bioquímica, UBA, Buenos Aires, Argentina) y nos permitió cerciorarnos de que el clon FFAD1.2c4 y la línea de FD parentales (GS1) poseen un único e idéntico perfil genético masculino. En la tabla 11 se presentan los perfiles genéticos obtenidos para ambas líneas.

| Sistema            | B4533-GSI | B4534-FFAD |
|--------------------|-----------|------------|
| <b>Amelogenina</b> | XY        | XY         |
| <b>D3S1358</b>     | 15-16     | 15-16      |
| <b>D1S1656</b>     | 16        | 16         |
| <b>D2S441</b>      | 11        | 11         |
| <b>D10S1248</b>    | 13-14     | 13-14      |
| <b>D13S317</b>     | 8-13      | 8-13       |
| <b>PENTA E</b>     | 12-14     | 12-14      |
| <b>D16S539</b>     | 11-12     | 11-12      |
| <b>D18S51</b>      | 15-17     | 15-17      |
| <b>D2S1338</b>     | 25-27     | 25-27      |
| <b>CSF1PO</b>      | 10-12     | 10-12      |
| <b>PENTA D</b>     | 10-12     | 10-12      |
| <b>TH01</b>        | 6-9       | 6-9        |
| <b>VWA</b>         | 16-19     | 16-19      |
| <b>D21S11</b>      | 32.2-33.2 | 32.2-33.2  |
| <b>D7S820</b>      | 10-11     | 10-11      |
| <b>D5S818</b>      | 11-12     | 11-12      |
| <b>TPOX</b>        | 8-12      | 8-12       |
| <b>D8S1179</b>     | 10-13     | 10-13      |
| <b>D12S391</b>     | 18-20     | 18-20      |
| <b>D19S433</b>     | 12        | 12         |
| <b>SE33</b>        | 26.2-28.2 | 26.2-28.2  |
| <b>D22S1045</b>    | 15        | 15         |
| <b>FGA</b>         | 22-23.2   | 22-23.2    |
| <b>DYS391</b>      | 11        | 11         |
| <b>DYS576</b>      | 18        | 18         |
| <b>DYS570</b>      | 18        | 18         |

**Tabla 11. Perfiles genéticos de marcadores autosómicos para el clon FFAD1.2c4 y la línea de FD parentales (GS1).**

El análisis de STR es indispensable ya que, como se ha expuesto a lo largo de este capítulo, la generación de líneas de CMPiH involucra el manejo intensivo de diversas líneas celulares en paralelo y es importante poder realizar un análisis que constate de manera rotunda la identidad de las líneas generadas y evitar problemas de contaminación cruzada.

Decidimos realizar este análisis en el clon FFAD1.2c4 ya que el clon FFAD1.2c8, aunque presentaba todos los marcadores esperados para una CMPih, tenía una mayor propensión a diferenciarse, haciendo más difícil su cultivo.

Este resultado, además, nos permitió realizar la publicación de del clon FFAD1.2c4 como la línea de CMPih *PSEN1* T119I FFAD1 o FLENI-A<sup>149</sup>.

## Resultados parciales de este capítulo

En este segundo capítulo nos focalizamos en la generación de una línea de CMPih derivada de FD de un paciente masculino, portador de la mutación *PSEN1* p.T119I, con el fin de generar modelos neurales a partir de ellas.

Para obtener las CMPih produjimos partículas lentivirales, que contenían un plásmido comúnmente conocido como STEMCCA, el cual codifica para los 4 genes de Yamanaka (*OCT4*, *KLF4*, *SOX2* Y *cMYC*; OKSM), y realizamos la transducción de los FD. Esta metodología permite que células somáticas como los fibroblastos expresen estos cuatro factores de forma robusta de manera exógena, permitiendo su reprogramación. Se realizaron 2 eventos de reprogramación independientes, entre los cuales se obtuvieron 31 potenciales clones potenciales de CMPih de las cuales únicamente 3 (FFAD1.1c1, FFAD1.2c4 y FFAD1.2c8) lograron mantenerse en cultivo de forma estable por varios pasajes (mínimo 4), momento al cual decidimos proceder a su validación.

En primera instancia, se realizaron análisis de secuenciación genómica del exón 5, que nos permitieron ver que los tres clones mantuvieron la mutación a lo largo del proceso de diferenciación.

A su vez, analizamos la actividad de la enzima fosfatasa alcalina, la cual se encuentra activa en CMh, tanto CMEh como CMPih, pero no en fibroblastos y observamos que los tres clones presentaron alta actividad de esta enzima, mientras que no hubo actividad medible en los FD parentales.

La expresión de los OKSM exógenos produce la reestructuración del patrón de expresión génica celular, lo que genera el aumento en la expresión de genes asociados al estado indiferenciado como son los factores de transcripción *SOX2*, *NANOG* y *OCT4* y los marcadores de superficie *TRA 1-60* y *SSEA4*. Por inmunomarcación indirecta con anticuerpos específicos, determinamos que los 3 clones expresaban las proteínas nucleares *OCT4* y *NANOG* y *TRA 1-60* y *SSEA4* en la superficie celular, tal y como era de esperar. Confirmamos este resultado analizando la expresión de ARNm de *SOX2*, *NANOG* y *OCT4* y observamos que los tres clones, a su vez, presentaban un aumento



estadísticamente significativo de los niveles de expresión con respecto a los FD parentales de las cuales se derivaron.

Estos dos resultados nos dieron la pauta de que efectivamente las células de los 3 clones presentaban un estado indiferenciado. Luego, procedimos a realizar un análisis del cariotipo de los 3 clones potenciales de CMPih, ya que es conocido que 1 de cada 3 colonias puede presentar aberraciones cromosómicas producto del proceso de reprogramación y, observamos que el clon FFAD1.1c1 presentaba un cariotipo anormal, con ausencia del cromosoma 2 y presencia de cromosomas extra. Esto nos llevó a descartar dicho clon y continuar con la validación únicamente de los dos restantes.

Para la reprogramación celular utilizamos un vector lentiviral de segunda generación en el cual se encontraban codificados los cuatro genes de Yamanaka. Si bien la construcción se inserta en el genoma, se puede escindir utilizando el sistema LoxP-Cre. Sin embargo, como no fue el fin último de esta tesis realizar terapia génica, decidimos no escindirlo, pero sí nos aseguramos de que el casete de expresión se hubiera silenciado luego de 7-10 pasajes.

Posteriormente utilizamos un protocolo de diferenciación *in vitro* no dirigida a los tres linajes embrionarios mediante la formación de cuerpos embrioides desde condiciones libres de MEFi, para evaluar si los 2 clones restantes eran pluripotentes. Estos análisis se realizaron por inmunomarcación indirecta con anticuerpos específicos contra  $\beta$ III Tubulina (marcador de ectodermo),  $\alpha$ -Actina de músculo liso (marcador de mesodermo) y Alfafetoproteína (marcador de endodermo). Ambas clones presentaron expresión de estos marcadores. Confirmamos este resultado analizando la expresión de ARNm de *TUJ1*, *SMA* Y *AFP* en CE de 21 días de diferenciación.

Comprobamos entonces que ambos clones obtenidos, FFAD1.2c4 y FFAD1.2c8, presentaron todas las características propias de una CMPih. Sin embargo, debido a la mayor supervivencia de sus células al ser descongeladas desde su almacenamiento en nitrógeno líquido y a su menor propensión a diferenciarse en ausencia de morfógenos, seleccionamos al clon FFAD1.2c4 como la línea de CMPih *PSEN1* T119I. Los resultados de este capítulo derivaron en la publicación de la línea llamada FFAD1 (FLENIi-A001 en la literatura) y en un capítulo del libro de protocolos Embryonic Stem Cell Protocols (Springer Protocols).

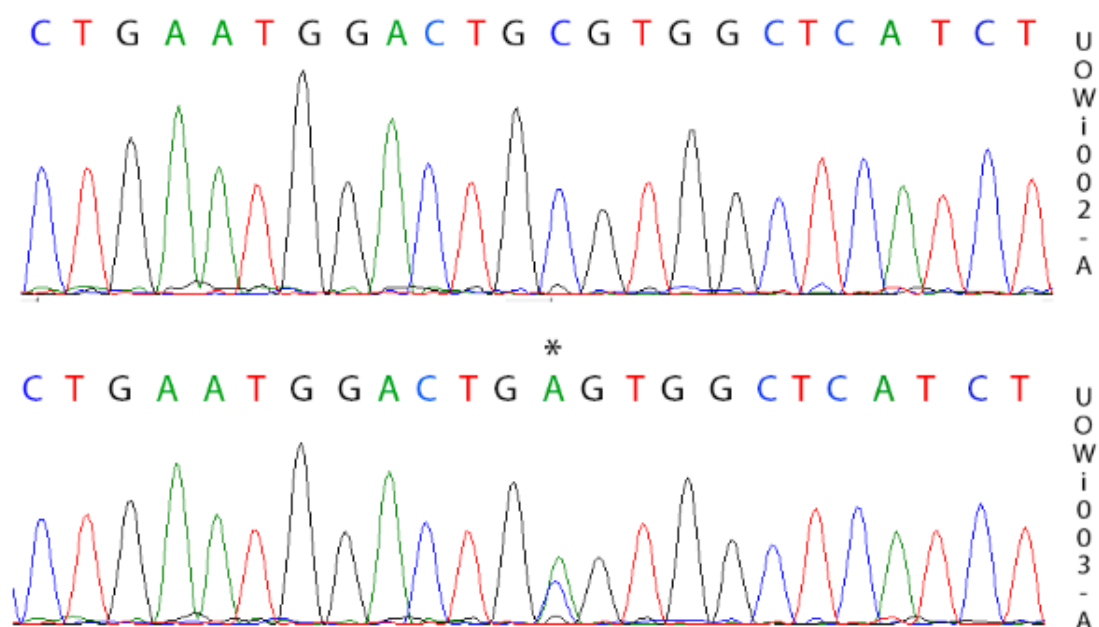


## Capítulo 3. Generación y validación de modelos neuronales en 2 y 3 dimensiones

Como ya se mencionó anteriormente, las CMPih constituyen una herramienta de gran utilidad para modelar patologías donde la obtención del material de estudio resulta complicada. Debido a su capacidad de autorenovación y su potencial de diferenciarse a casi la totalidad de los tipos celulares, las CMPih obtenidas a partir de la reprogramación de células de pacientes son capaces de proveer gran cantidad de células diferenciadas que conservan el perfil genético del paciente.

La obtención de los diversos tipos celulares (como por ejemplo neuronas) se logra gracias a la exposición cuidadosamente regulada, en términos de tiempo y cantidad, de las CMPih a una combinación de medios de cultivo y factores de crecimiento específicos. En particular, la implementación de protocolos de diferenciación neural simplifica la investigación de enfermedades neurodegenerativas complejas, como la enfermedad de Alzheimer, al generar poblaciones celulares relativamente puras que posibilitan la realización de análisis detallados.

Así, en este capítulo buscamos generar modelos neuronales en 2 y 3 dimensiones a partir de la línea de CMPih FFAD1 *PSEN1* p. T199I previamente reprogramada. Además, decidimos agregar al estudio otras dos líneas de CMPih (OUWio03-A y UOWio02-A), las cuales fueron generadas desde FD de un paciente con EA portador de la mutación *PSEN1* p. A246E y un pariente cercano no portador de la mutación y sin EA, respectivamente. Estas células fueron gentilmente donadas por el laboratorio de la Dra. Lezzane Ooi de la Universidad de Wollongong, Australia. Como puede observarse en la figura 53, la línea OUWio03-A donada mantenía la mutación Chr14:73659540 C>A en el exón 7 de *PSEN1* al momento del inicio de los experimentos. Se fueron realizando chequeos subsecuentes, por secuenciación, a lo largo de toda la tesis para asegurarnos el correcto manejo de las líneas y evitar la contaminación cruzada entre las mismas.



**Figura 53. Análisis de la secuencia genética de las líneas CMPih donadas.** Secuencias mutadas en heterocigosis (C>A) en el exón 7 del gen de *PSEN1* para las líneas OUWio02-A y UOWio03-A (*PSEN1* p.A246E). El asterisco marca la base que se encuentra modificada.

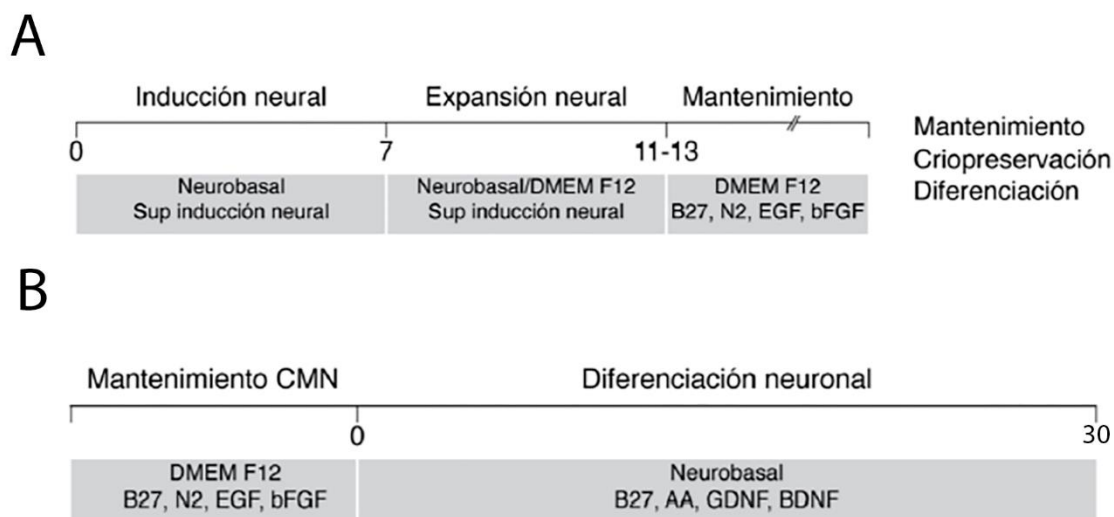
### 3.1 Modelo de CMN y neuronas genéricas a partir de CMPih

Con el fin de modelar la patología de la EA, decidimos diferenciar las CMPih a células con fenotipo neuronal. Decidimos en primera instancia utilizar un kit de inducción neural (PSC Neural Induction Medium) comercializado por la empresa Invitrogen<sup>259</sup>, el cual ya ha sido utilizado en nuestro laboratorio. Siguiendo el protocolo sugerido en el kit, las CMPih pasan por un paso intermedio de generación de células madre neurales (CMN) para luego ser diferenciadas a neuronas genéricas (Figura 54 A y B). En particular, en lugar de los 14 días sugeridos por el kit, la diferenciación neuronal la extendimos hasta el día 30 debido a que demostramos previamente que recién en ese momento las neuronas genéricas obtenidas presentaban actividad eléctrica.

Dado que el kit es comercial no contamos con datos precisos de su composición, pero, según indicaciones del proveedor, tiene como componentes importantes, entre otros, CHIR-99021, un inhibidor de la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3 $\beta$ ), y progesterona [Thermo Fischer Scientific. Hoja de seguridad para el producto A1647701 Neural induction supplement, (consultado el 13/03/2024)].

La inhibición de GSK3 genera la activación de la vía de señalización de Wnt, implicada en la pluripotencia de las CM<sup>259</sup>. Se ha visto *in vitro* que CHIR-99021, en conjunto con otros sustratos, promueve la generación y expansión de CMN<sup>260,261</sup>. Por su

parte, la progesterona se ha visto asociada a la capacidad de derivar neuronas motoras a partir de CM<sup>262</sup>.



**Figura 54. Esquema del protocolo de obtención de CMN y neuronas desde CMPih utilizando el kit comercial PSC Neural Induction Medium. A. Obtención de CMN.** El protocolo consta de 2 etapas: la primera comprende los días 0 a 7, en la cual se obtienen CMN primitivas. En la segunda etapa, de días 7 a 11-13, las CMN obtenidas se expanden. Al finalizar estas etapas, las células se amplifican o criopreservan utilizando un medio de mantenimiento. **B. Diferenciación neuronal.** Las CMN obtenidas en el protocolo anterior, que se encuentran en medio de mantenimiento, se diferencian a neuronas genéricas (durante 30 días) utilizando medio de diferenciación neural (medio Neurobasal suplementado con B27, ácido ascórbico o AA, BDNF y GDNF).

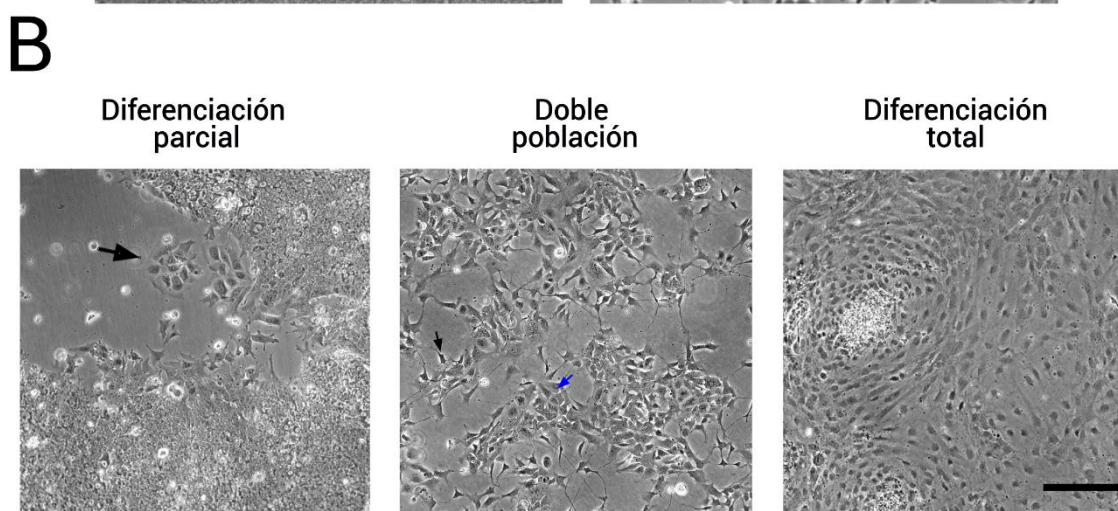
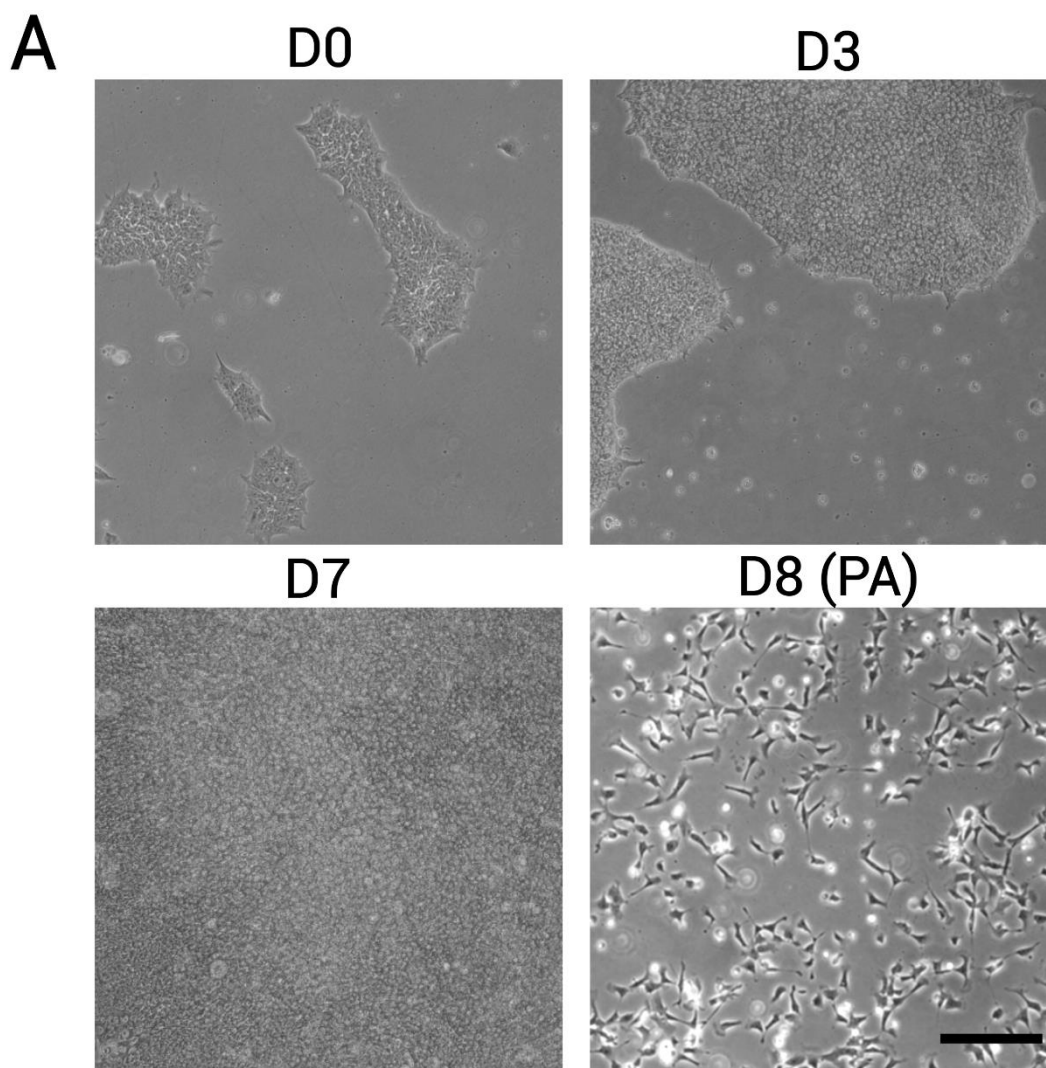
### 3.2.1 Generación y validación de las CMN

Dos o tres días previos al inicio del proceso de obtención de CMN, se plaquearon CMPih agrupadas (*clusters*), obtenidas por disociación con una solución de EDTA, en placas de cultivo MWx6 pre-tratadas previamente la matriz extracelular comercial Geltrex (Thermo Fischer Scientific). Las células se cultivaron utilizando el medio de cultivo definido mTeSR1 hasta que las colonias ocuparan el 25-30% de la placa (Figura 55A Do), momento en el que se inició el protocolo de diferenciación.

El protocolo de generación de CMN se realizó en dos etapas que se encuentran detalladas en la figura 54 A. La primera etapa consistió en la inducción neural, en donde durante 7 días las células se crecieron en adherencia utilizando placas de cultivo pre-tratadas (*coating*) con Geltrex y medio Neurobasal conteniendo un 2% del suplemento de inducción neural provisto por el kit. En este periodo, se realizó un análisis diario del cambio morfológico de las células (Figura 55A).

Al finalizar la etapa de inducción neural, se prosiguió a la etapa de expansión neural. Para ello, se re-plaquearon las CMN primitivas ( $1 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>) con Acutasa 1x en una nueva placa de cultivo pre-tratada con Geltrex y se cambió a medio de cultivo de expansión neural (49% de Neurobasal, 49% DMEM-F12 y 2% del suplemento de

inducción neural). A partir del pasaje 2 (entre días 11 y 13 del protocolo de diferenciación) las CMN fueron expandidas y criopreservadas en medio de mantenimiento (DMEM/F12, B27, N2, EGF y bFGF).



**Figura 55. Cultivos celulares durante el protocolo de inducción neural.** **A** Las imágenes muestran microfotografías de campo claro por microscopía óptica invertida a los días 0, 3, 7 y 8 post apertura (PA) del protocolo de obtención de CMN a partir de CMPih. **B** En algunos casos, entre los días 3 a 6 se presentaron casos de diferenciación incorrecta parcial (flecha negra). En la etapa de mantenimiento, a veces se observó una segunda población más plana (flecha negra) con respecto a las CMN (flecha azul). En otros casos, se presentaron casos en los cuales el cultivo se volvió diferenció totalmente a un fenotipo indeseado, y por ese motivo se los descartó. La escala representa 20  $\mu$ m

Como puede observarse en la figura 55 A, nos aseguramos de que las células fueran manteniendo un fenotipo homogéneo a lo largo de los 7 días de inducción neural hasta obtener una monocapa cuyas células se encontraban mucho más compactas que en lo esperado en un cultivo de CMPih regular. Tras re-plaquear las células en el día 7, observamos un fenotipo celular homogéneo caracterizado por un núcleo menos definido en comparación con las CMPih y una morfología más estrellada [Figura 55 A. D8(PA)].

El control de calidad morfológico fue esencial a lo largo de la realización de este protocolo ya que nos permitió identificar rápidamente áreas de diferenciación parcial que son susceptibles a ser removidas o pocillos completamente diferenciados a linajes no neuronales (Figura 55 B).

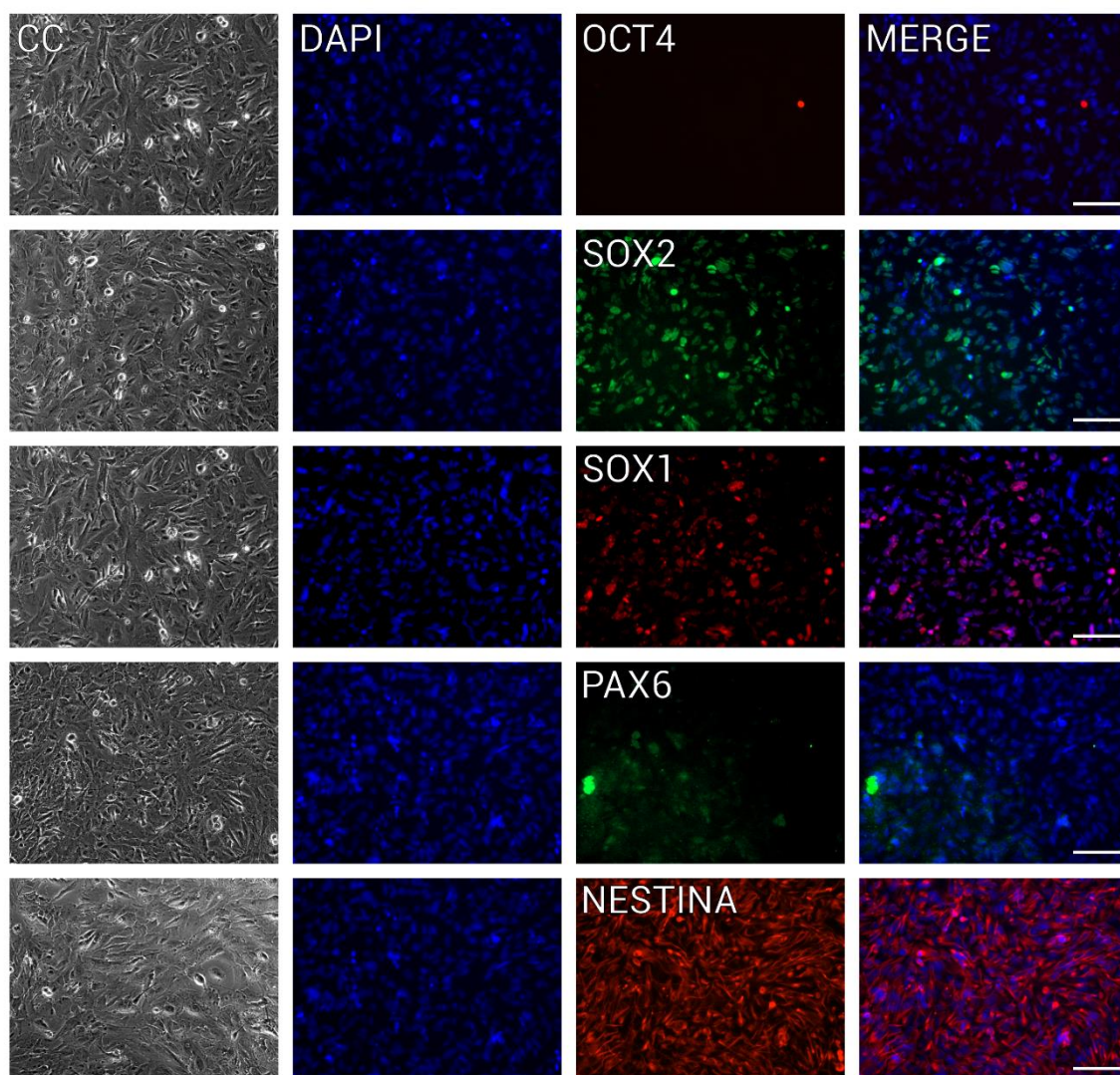
En algunos casos, en los sucesivos pasajes, nos encontramos con una segunda población celular que presentaba un fenotipo no neural (Figura 55 B, panel Doble población, flecha negra). Esta segunda población se encuentra reportada la ficha de datos del kit utilizado. Es necesario remover esta población realizando un proceso de selección por doble disociación con Acutasa 1x (ver en detalle en materiales y métodos). Llamativamente, observamos mayor proporción de esta segunda población en la diferenciación a CMN de la línea FFAD1. Este fenómeno se discutirá al final del capítulo.

Una vez obtenidas CMN con la morfología deseada procedimos a su validación mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos primarios específicos para el factor de transcripción de pluripotencia OCT-4 y los marcadores de CMN NESTINA, SOX-1, SOX-2 y PAX6 (Figuras 56 a 58).

La proteína NESTINA se caracteriza por ser un componente de filamento intermedio de clase VI que se expresa en las células madre del SNC, pero no en neuronas maduras<sup>263</sup>. Por otro lado, el factor de transcripción SOX-1 (del inglés SRY-related HMG box 1) pertenece a la familia SRY. Su función consiste en mantener a las células neurales en un estado indiferenciado, siendo el marcador neural más temprano en el desarrollo embrionario<sup>264</sup>. Formando parte de la misma familia de factores de transcripción encontramos a SOX-2 (del inglés SRY-related HMG box 2) que posee un rol importante en el mantenimiento de las células madre en el sistema nervioso y sus alteraciones generan defectos en la maduración neuronal<sup>265</sup>. Por último, el factor de transcripción PAX6 (del inglés Paired type homeobox 6) es esencial en la neurogénesis y se ha

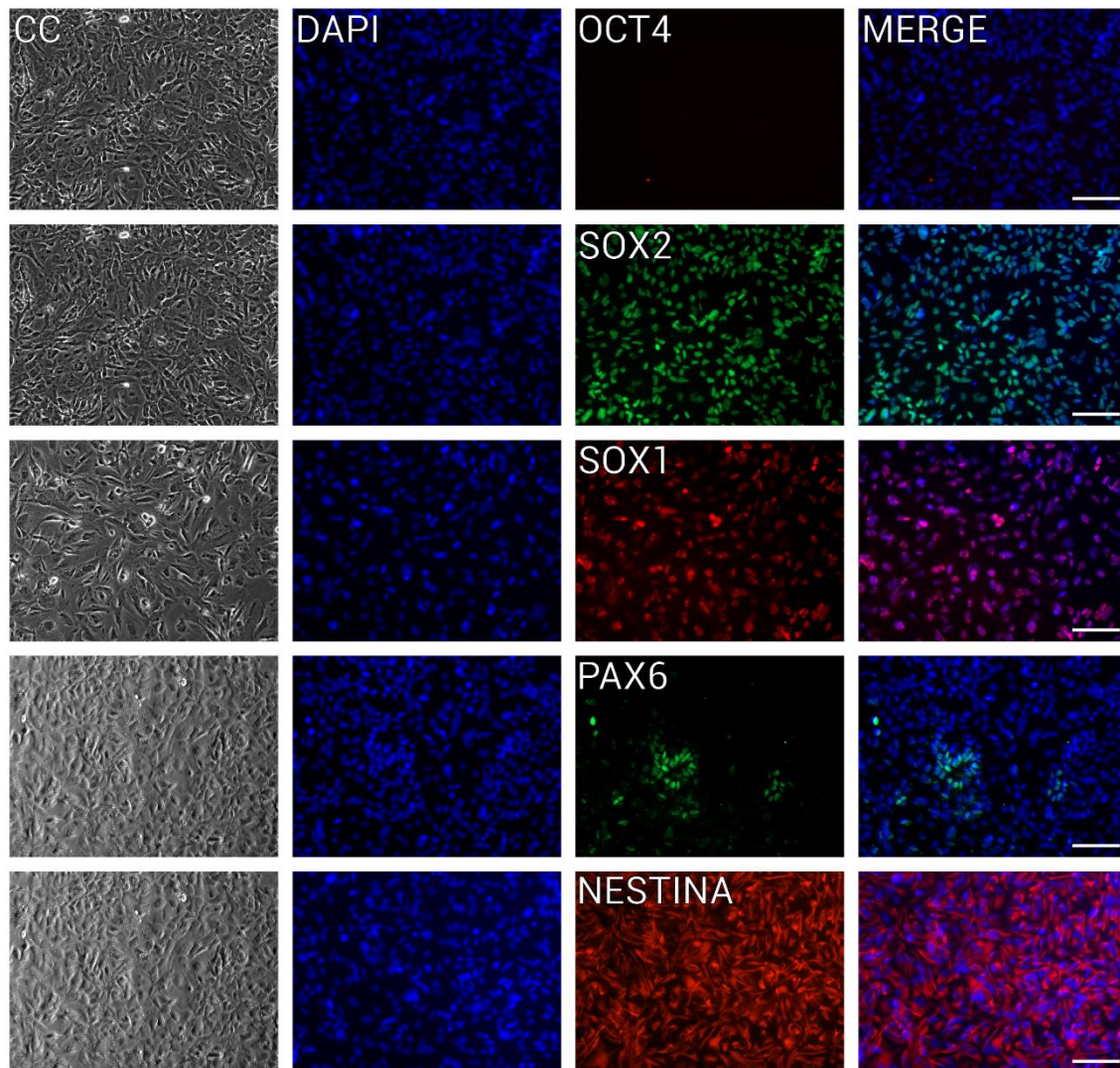


observado su expresión en las células progenitoras neuronales dorsales, ubicadas en la zona ventricular de la corteza embrionaria<sup>266,267</sup>.

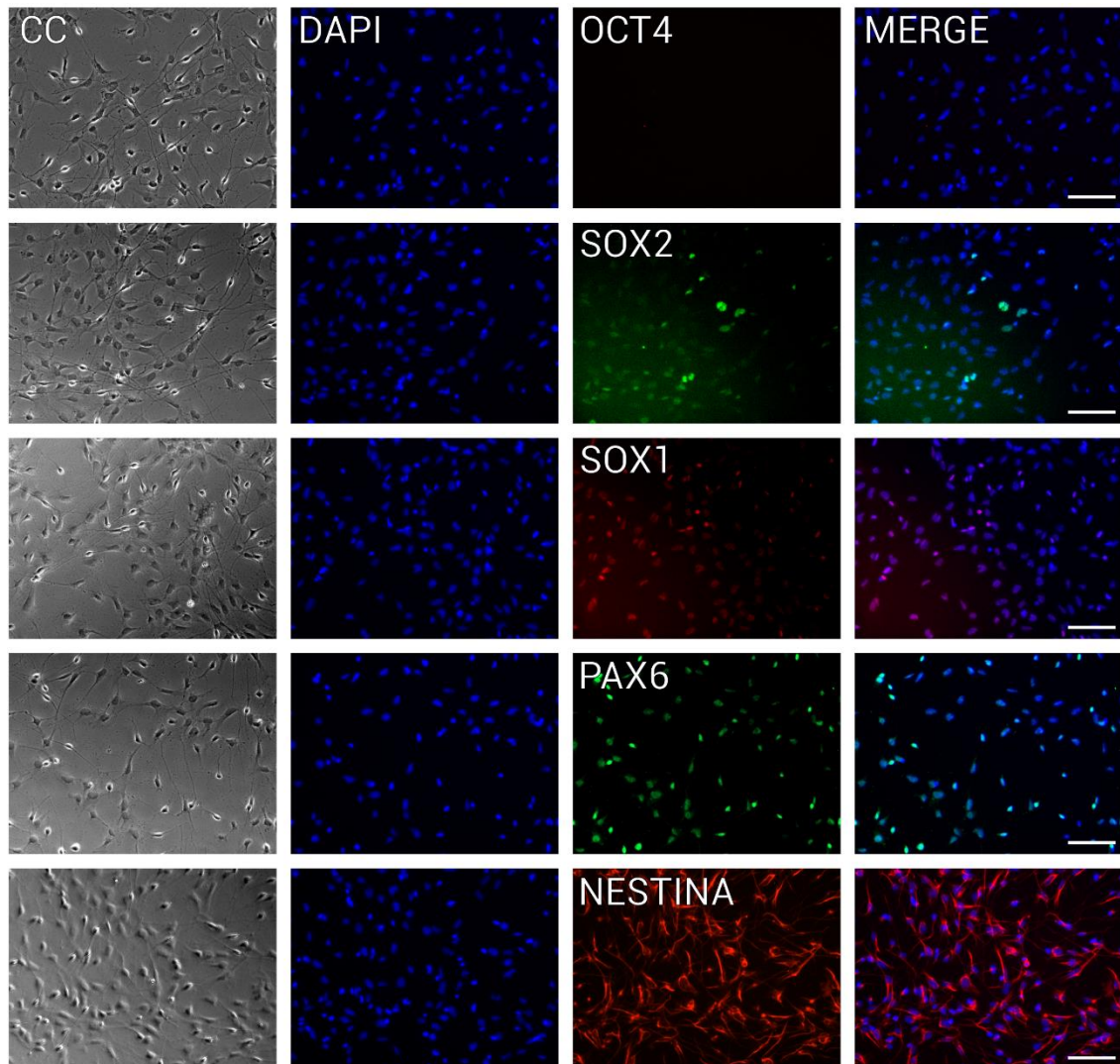


**Figura 56. Marcadores de progenitores neurales en CMN obtenidas a partir de CMPih OUWioo3-A (*PSEN1* p.A246E).** Detección por inmunofluorescencia indirecta del marcador de pluripotencia OCT-4 y de los marcadores de progenitores neurales SOX-1, SOX-2, NESTINA y PAX6. Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI. La escala representa 50  $\mu$ m.





**Figura 57. Marcadores de progenitores neurales en CMN obtenidas a partir de CMPih OUWioo2-A (*PSEN1* WT).** Detección por inmunofluorescencia indirecta del marcador de pluripotencia OCT-4 y de los marcadores de progenitores neurales SOX-1, SOX-2, NESTINA y PAX6. Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI. La escala representa 50  $\mu$ m.



**Figura 58. Marcadores de progenitores neurales en CMN obtenidas a partir de CMPih FFAD1 (*PSEN1* p.T119I).** Detección por inmunofluorescencia indirecta del marcador de pluripotencia OCT-4 y de marcadores de progenitores neurales SOX-1, SOX-2, NESTINA y PAX6. Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI. La escala representa 50  $\mu$ m.

En las figuras 56 a 58 no observamos marca para el factor de transcripción de pluripotencia OCT-4. Este resultado nos indica que las CMN generadas ya no presentaban el fenotipo indiferenciado que caracteriza a los cultivos de CMPih. A su vez, detectamos marca positiva para los marcadores de progenitores neurales NESTINA, SOX-1, SOX-2 y PAX6, validándose el fenotipo de las CMN obtenidas.

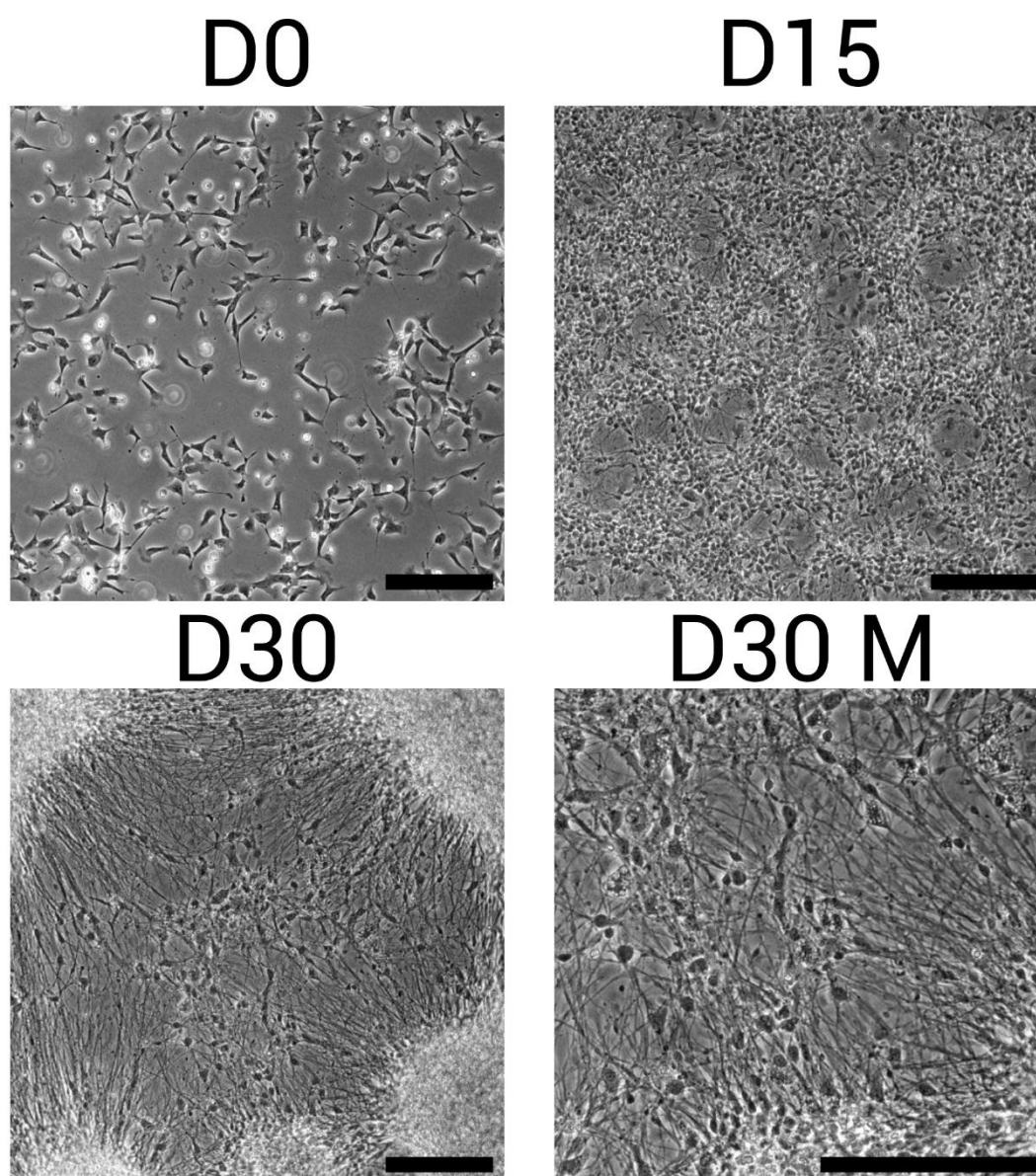
### 3.2.2 Obtención de neuronas genéricas

Procedimos luego a diferenciar las CMN obtenidas a neuronas genéricas. Como se ilustra en la Figura 54B, las CMN se diferenciaron durante un período de 30 días en un medio de diferenciación neuronal compuesto por medio de cultivo Neurobasal suplementado con B27, ácido ascórbico, aminoácidos no esenciales, glutamina,

penicilina/estreptomicina, factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF) y factor de crecimiento derivado de la glía (GDNF). El suplemento B27 proporciona una variedad de componentes, como vitaminas, insulina, corticosterona, T3 y progesterona, los cuales en conjunto con el medio Neurobasal promueven la supervivencia <sup>268</sup>. Por otro lado, GDNF y BDNF son dos factores neurotróficos de gran relevancia tanto para la homeostasis neuronal como para el desarrollo de estructuras neuronales. Por último, no debemos pasar por alto el papel del ácido ascórbico, que desempeña un papel crucial en la promoción de la diferenciación neuronal.

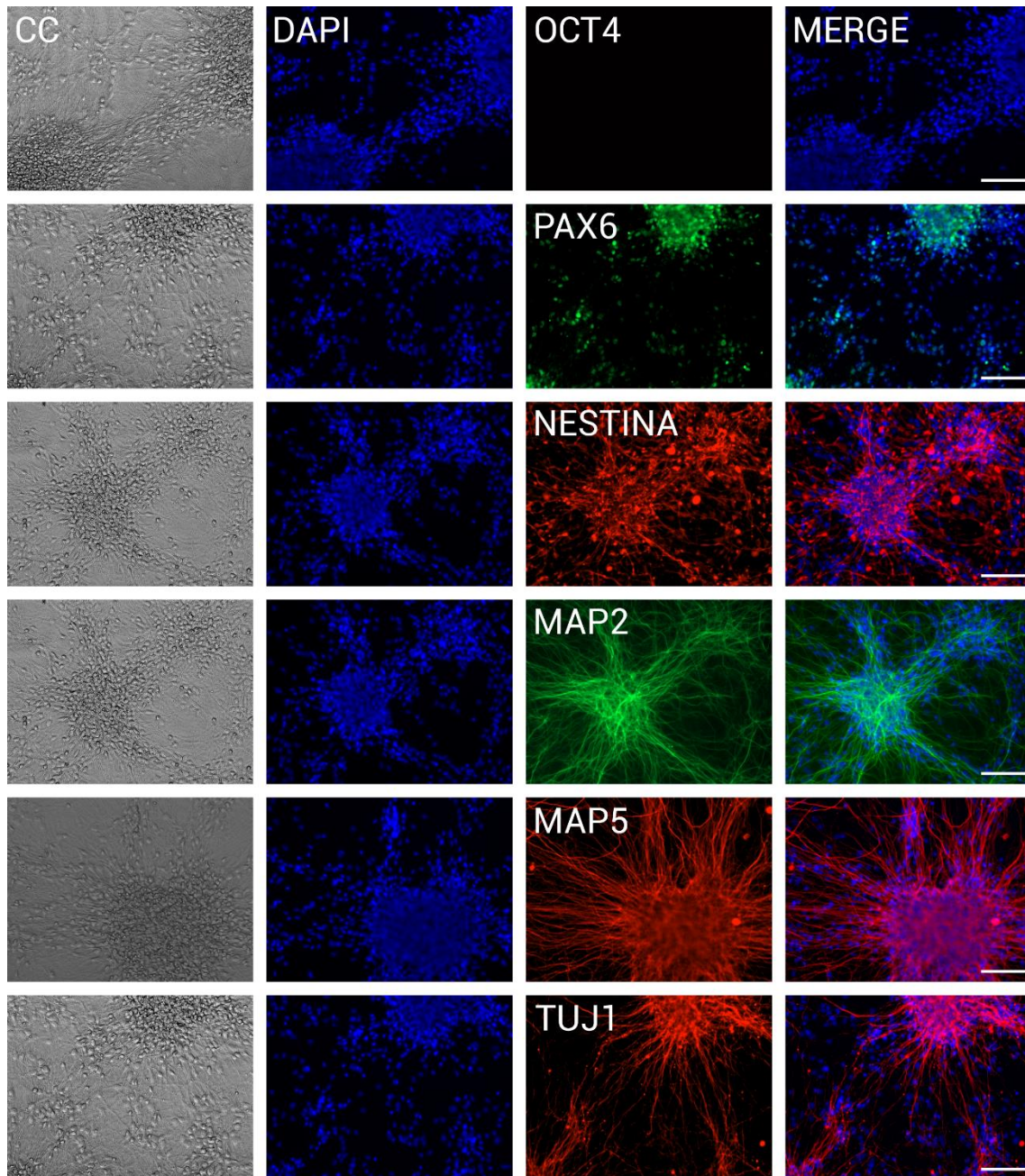
Una vez más, hicimos un seguimiento riguroso del cambio morfológico de las células a lo largo del protocolo de diferenciación. Observamos que mientras que las CMN presentaban un soma triangular con prolongaciones cortas en sus extremidades, las neuronas presentaban un soma aún más pequeño y definido, con prolongaciones largas (neuritas principales) que, con el paso del tiempo, si se prolongaba la diferenciación durante 30 días, tendían a unirse entre sí (Figura 59).





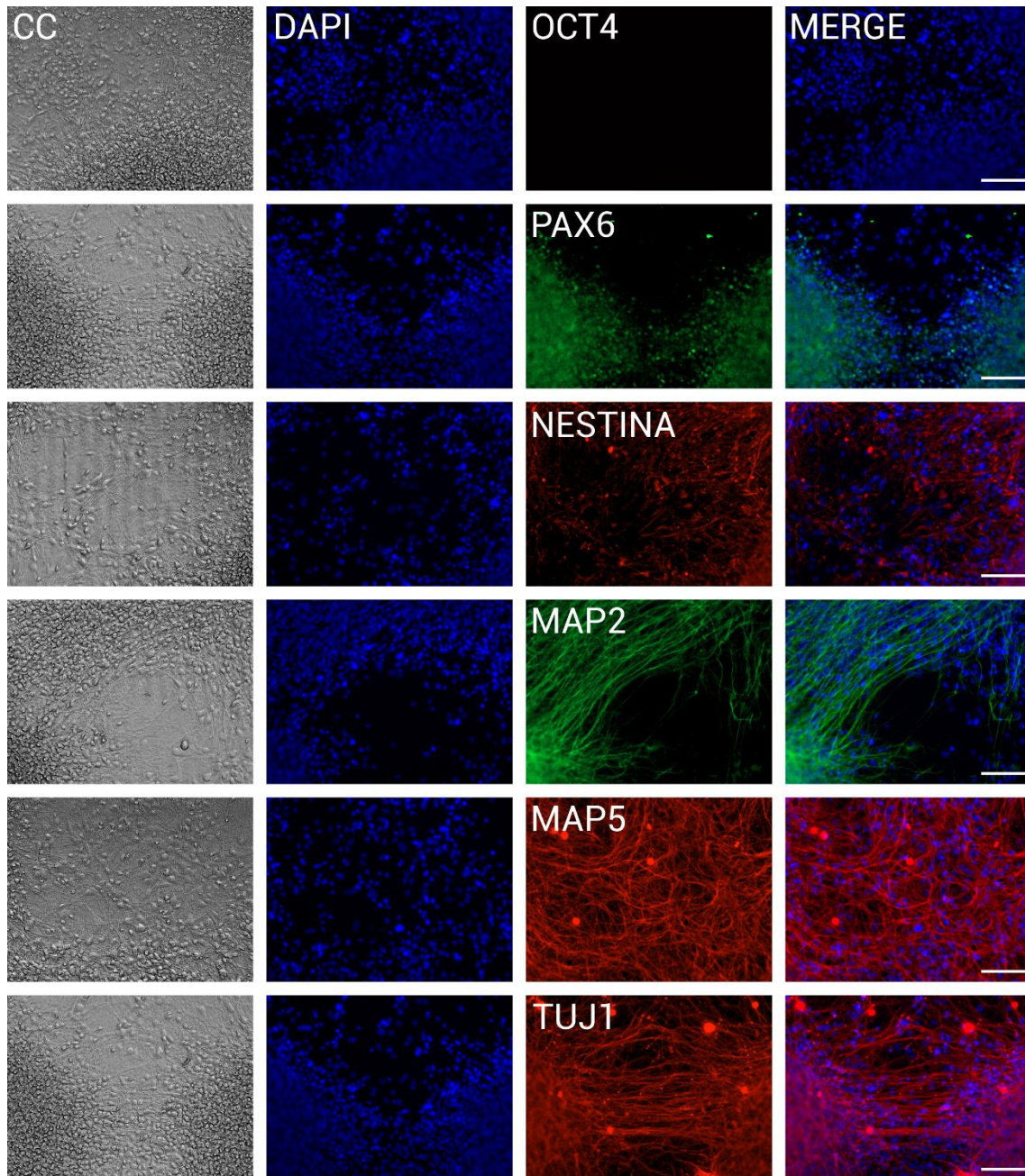
**Figura 59. Cultivos celulares durante el protocolo de diferenciación neuronal de la línea UOWi002-A.** Las imágenes muestran microfotografías de campo claro por microscopía óptica invertida a los días 0, 14 y 30 del protocolo de obtención de neuronas a partir de CMN. La escala representa 20  $\mu\text{m}$ .

Una vez obtenidas las neuronas genéricas, decidimos caracterizarlas por inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos primarios específicos para el factor de transcripción de pluripotencia OCT-4, los marcadores de progenitores neurales NESTINA y PAX6 y las proteínas neuronales TUJ-1, MAP2 y MAP5 (figuras 60 a 62).

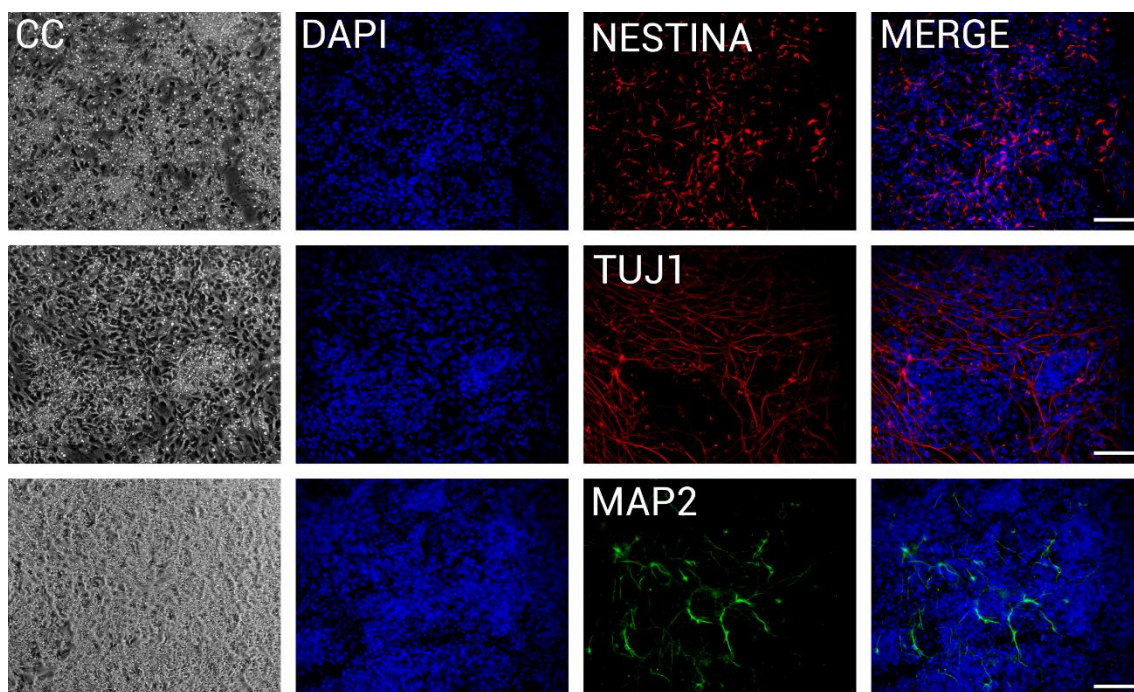


**Figura 60. Marcadores de neuronas en células con fenotipo neuronal diferenciadas durante 30 días desde CMN obtenidas a partir de CMPih de la línea OUWio03-A (*PSEN1* WT).** Detección por inmunofluorescencia indirecta del marcador de pluripotencia OCT-4, marcadores de progenitores neurales NESTINA y PAX6 y marcadores neuronales específicos TUJ1, MAP2 y MAP5. Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI. La escala representa 50  $\mu$ m.





**Figura 61. Marcadores de neuronas en células con fenotipo neuronal diferenciadas durante 30 días desde CMN obtenidas a partir de CMPih de la línea OUWio03-A (*PSEN1* p.A246E).** Detección por inmunofluorescencia indirecta del marcador de pluripotencia OCT-4, marcadores de progenitores neurales NESTINA y PAX6 y marcadores neuronales específicos TUJ1, MAP2 y MAP5. Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI. La escala representa 50  $\mu$ m.



**Figura 62. Marcadores de neuronas en células con fenotipo neuronal diferenciadas durante 30 días desde CMN obtenidas a partir de CMPih de la línea FFAD1 (PSEN1 p. T119I).** Detección por inmunofluorescencia indirecta del marcador de progenitores neurales NESTINA y marcadores neuronales específicos TUJ1 y MAP2. Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI. La escala representa 20  $\mu$ m.

Es importante destacar que se realizaron 7 procesos de inducción a CMN de la línea FFAD1, pero solo 1 de ellas logró ser diferenciada correctamente a neuronas que presentaron algunos de los marcadores esperados (Figura 62). Dada la baja pureza, cantidad celular y dificultad de diferenciación, no pudimos realizar el análisis de la misma cantidad de marcadores de linaje que para las neuronas genéricas obtenidas a partir de las CMN generadas de las otras dos líneas de CMPih (Figuras 60 y 61).

La dificultad de la diferenciación radicó en que los cultivos de las CMN de la línea FFAD1 resultaban muy inestables en comparación con las otras líneas evaluadas, dando paso a una mayor proporción de la segunda población celular, las cuales no eran propensas a generar células neuronales específicas.

El protocolo de diferenciación basado en el kit comercial PSC Neural Induction tampoco nos permitió obtener neuronas que expresaran marcadores de células corticales, las cuales se encuentran especialmente afectadas por la EA (Lic. Sofía Ferriol-Laffouillere, comunicación personal).



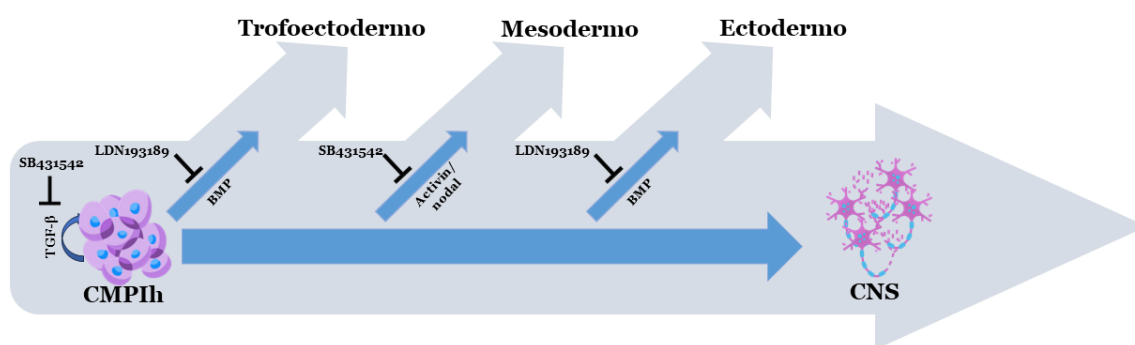
### 3.3 Modelo de neuronas corticales a partir de CMPih

Frente a la dificultad de obtener un cultivo puro y reproducible de neuronas de la línea de CMPih a estudiar (FFAD1) con el protocolo de diferenciación que ya estaba en funcionamiento en nuestro laboratorio, nos sumamos en una búsqueda bibliográfica para encontrar otro protocolo de diferenciación neuronal que nos permitiera estudiar el fenómeno neurodegenerativo propio de la enfermedad de Alzheimer.

Existen múltiples protocolos de diferenciación específicos de CMPih a diversos tipos de neuronas o células gliales. Dentro de ellos, uno de los que se destaca es el protocolo de diferenciación a neuronas corticales basado en la doble inhibición de SMADs<sup>269,270</sup>.

La doble inhibición de la vía de SMAD induce la diferenciación neural al interferir con la vía de señalización de TGF- $\beta$  (del inglés Transforming Growth Factor-beta). La pluripotencia de las CMPih se mantiene gracias a la red transcripcional compuesta por OCT4, SOX2 y NANOG, factores de transcripción que forman un *loop* de retroalimentación positiva que activa genes de pluripotencia e inhibe la expresión de genes asociados a la diferenciación. En ese sentido, la cascada de señalización de TGF- $\beta$ /Activin/Nodal es esencial para el mantenimiento de la pluripotencia y autorenovación propia de las CMPih<sup>271</sup>. A su vez, se ha descrito que la activación de la vía de Nodal/Activin y BMP promueven la diferenciación de las CMPih hacia mesodermo y endodermo/trofoectodermo, respectivamente.

En este protocolo, se propone la utilización de dos inhibidores de las SMADs para promover el desarrollo neuronal. SB431542 inhibe la vía de TGF- $\beta$ /Nodal/Activin, afectando el *loop* OCT4/SOX2/NANOG y sacando a las células de su estado pluripotente como así también impidiendo su diferenciación hacia mesodermo. Por su parte, el análogo de Dorsomorfina, LDN193289 inhibe a BMP, impidiendo la diferenciación a endodermo (Figura 63).



**Figura 63. Esquema de los efectos de la doble inhibición de la vía de SMAD por SB431542 y LDN193289** El estado indiferenciado de las CMPih se mantiene gracias a la expresión de factores de transcripción como NANOG, OCT4 o SOX2, los cuales se mantienen expresados gracias a TGF- $\beta$ . A su vez, BMP favorece la diferenciación. Se considera que la inhibición de SMAD mediada por SB431542 interfiere



con la señalización de TGF- $\beta$ , inhibiendo los factores de transcripción antes mencionados y favoreciendo la diferenciación. Una vez establecida la salida del estado indiferenciado, SB431542 en conjunto con LDN193289 promueven por la supresión de destinos celulares alternativos, inhibiendo las vías de Activin/nodal y BMP, y derivando en la formación de neuroectodermo primitivo. Adaptado de Chambers et al., 2009.

### 3.3.2 Obtención y validación de neuronas corticales obtenidas a partir de CMPih

En la figura 64 se muestra un esquema del protocolo de diferenciación que se utilizó para obtener neuronas corticales. Las CMPih se cultivaron en medio mTeSR-1 hasta llegar a confluencia (Figura 65 Do). Ese día, se inició el tratamiento con medio de inducción neural compuesto por Neurobasal y DMEM-F12 (1:1), suplemento B27, suplemento N2, insulina humana, aminoácidos no esenciales, glutamina y penicilina/estreptomicina y los inhibidores LDN193189 y SB431542.

Como se mencionó anteriormente, los medios suplementados con B27 y N2 son necesarios para la fomentar el desarrollo y mantenimiento de poblaciones neuronales. La insulina, además, se ha demostrado que interviene en procesos diversos de la formación neuronal y el establecimiento de redes sinápticas <sup>272,273</sup>.



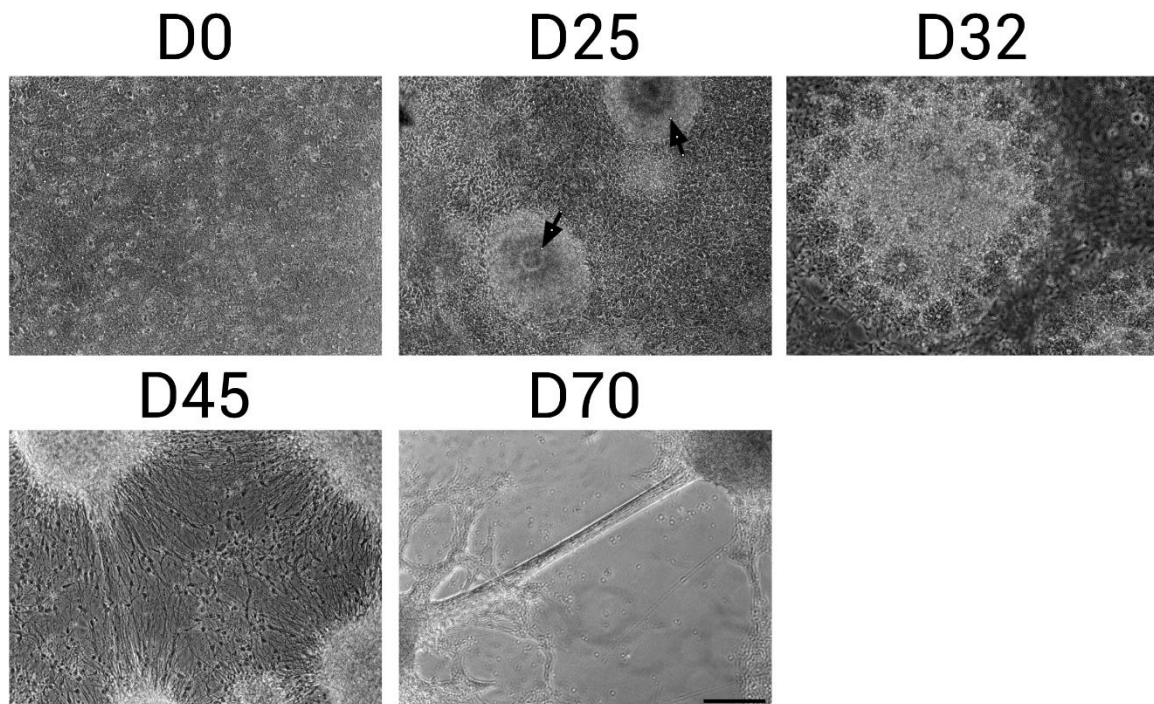
**Figura 64. Esquema del protocolo de obtención de neuronas corticales desde CMPih.** El protocolo inicia cuando las células se encuentran en monocapa (Día 0). Se les cambia el medio diariamente agregando los inhibidores de la vía de SMADs SB431542 y LDN193289. Alrededor del día 25, se observan neurorosetas, momento en el que se levantan las células y pasan a cultivarse en medio de mantenimiento neuronal con el agregado diario de bFGF (20 ng/ml) por 4 días. Luego de eso, se mantienen hasta día 70, abriéndolas periódicamente, en medio de mantenimiento neural sin agregado de ningún suplemento.

A medida que van pasando los días la capa de células fue cambiando su morfología y en ciertas zonas empezaron a generarse unas estructuras redondeadas, concéntricas, típicas de la diferenciación a tejido neural, conocidas como neurorosetas (Figura 65 día 25). Alrededor del día 25 (esto depende de la línea celular) seleccionamos las neurosetas por disgregado con Acutasa 1x, procurando levantar la mayor cantidad de neurorosetas posibles.

Una vez replaquetadas, tratamos durante 4 días con bFGF (20 ng/ml), lo que permitió la expansión de las neurorosetas (Figura 65 día 32). Pasados los 4 días se mantuvo el cultivo en el medio base (al cual ahora denominamos medio de mantenimiento neuronal) y se fue abriendo 2 veces hasta llegar a día 70.

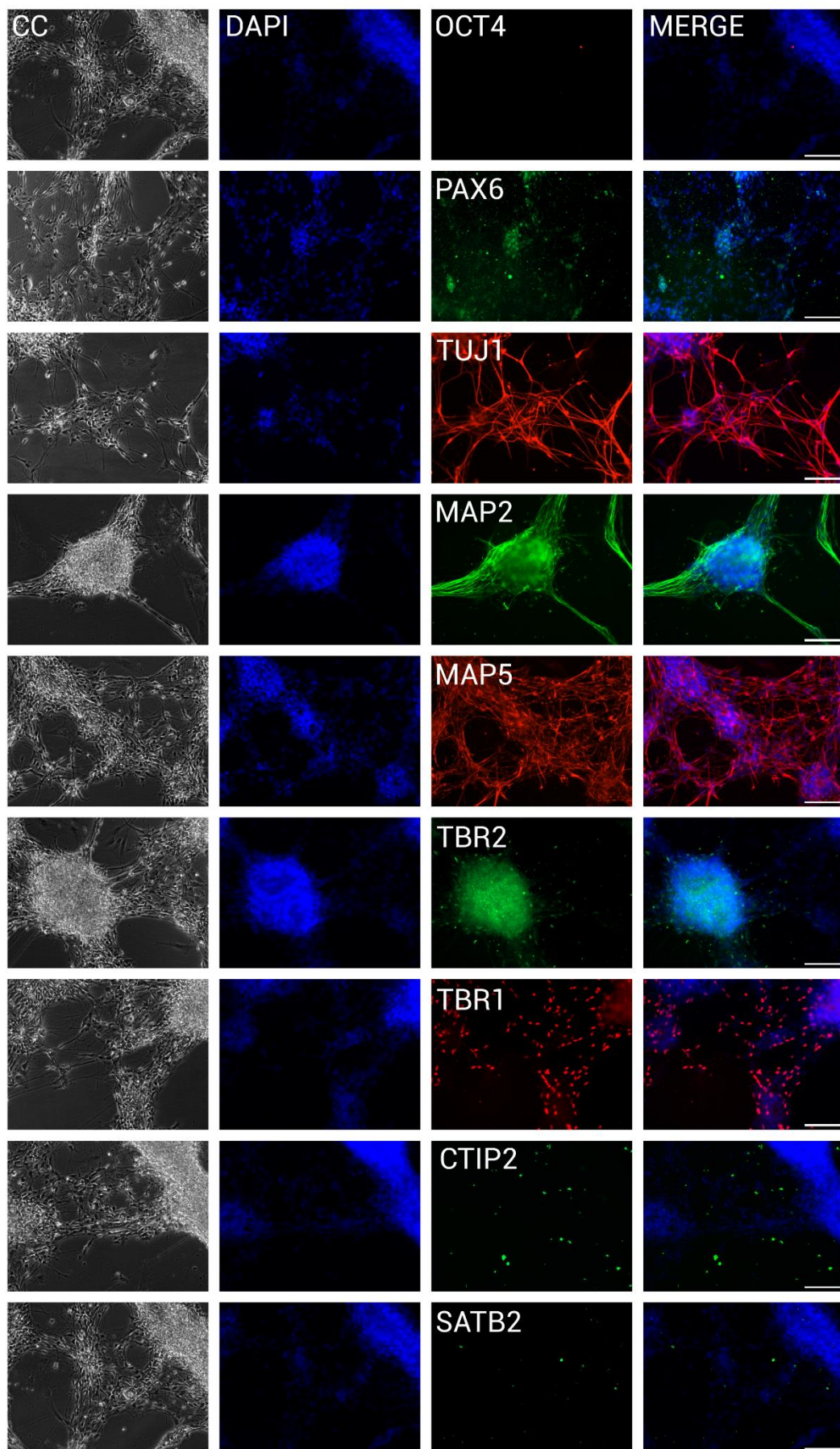
Como puede observarse en la figura 65, pasada la etapa de cultivo con bFGF, las células comenzaron progresivamente a mostrar un fenotipo más neuronal, con presencia

de prolongaciones (neuritas) cada vez más largas que terminaban en proyecciones que se acomodaban en cordones (Figura 65 días 45 y 70).



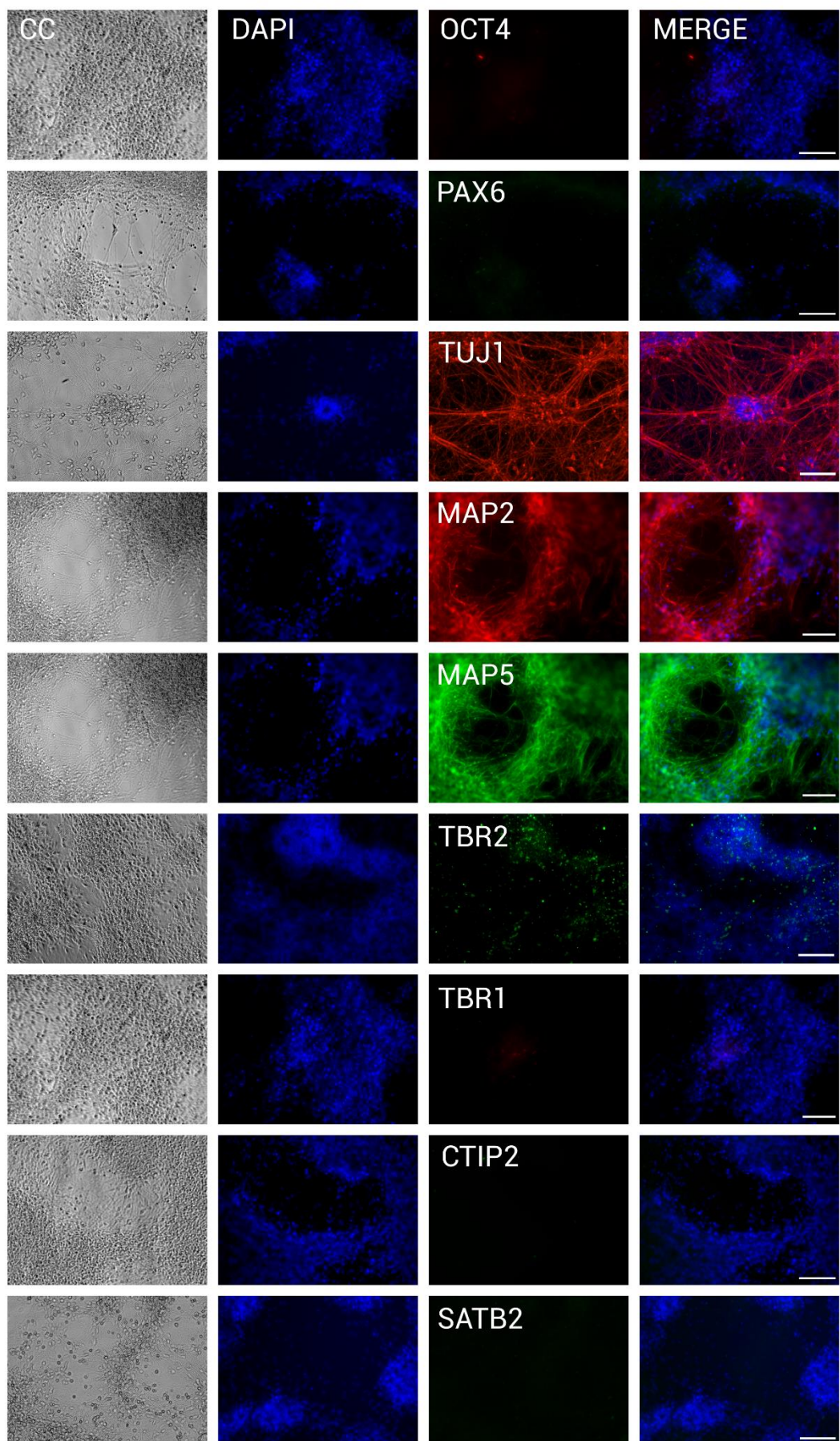
**Figura 65. Cultivos celulares durante el protocolo de diferenciación a neuronas corticales.** Las imágenes muestran microfotografías representativas de campo claro obtenidas por microscopía óptica invertida a los días 0, 25, 32, 45 y 70 del protocolo de diferenciación de neuronas corticales a partir de CMPih. Las flechas indican la presencia de neurorosetas. La escala representa 20  $\mu$ m.

Una vez obtenidas las neuronas, decidimos caracterizarlas por inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos primarios específicos para el factor de transcripción de pluripotencia OCT-4, el marcador de progenitores neurales PAX6, las proteínas neuronales TUJ-1, MAP2 y MAP5 y los marcadores corticales CTIP2, SATB2, TBR1 y TBR2 a los días 45 (Figuras 66 a 68) y 70 (Figuras 69 a 71).



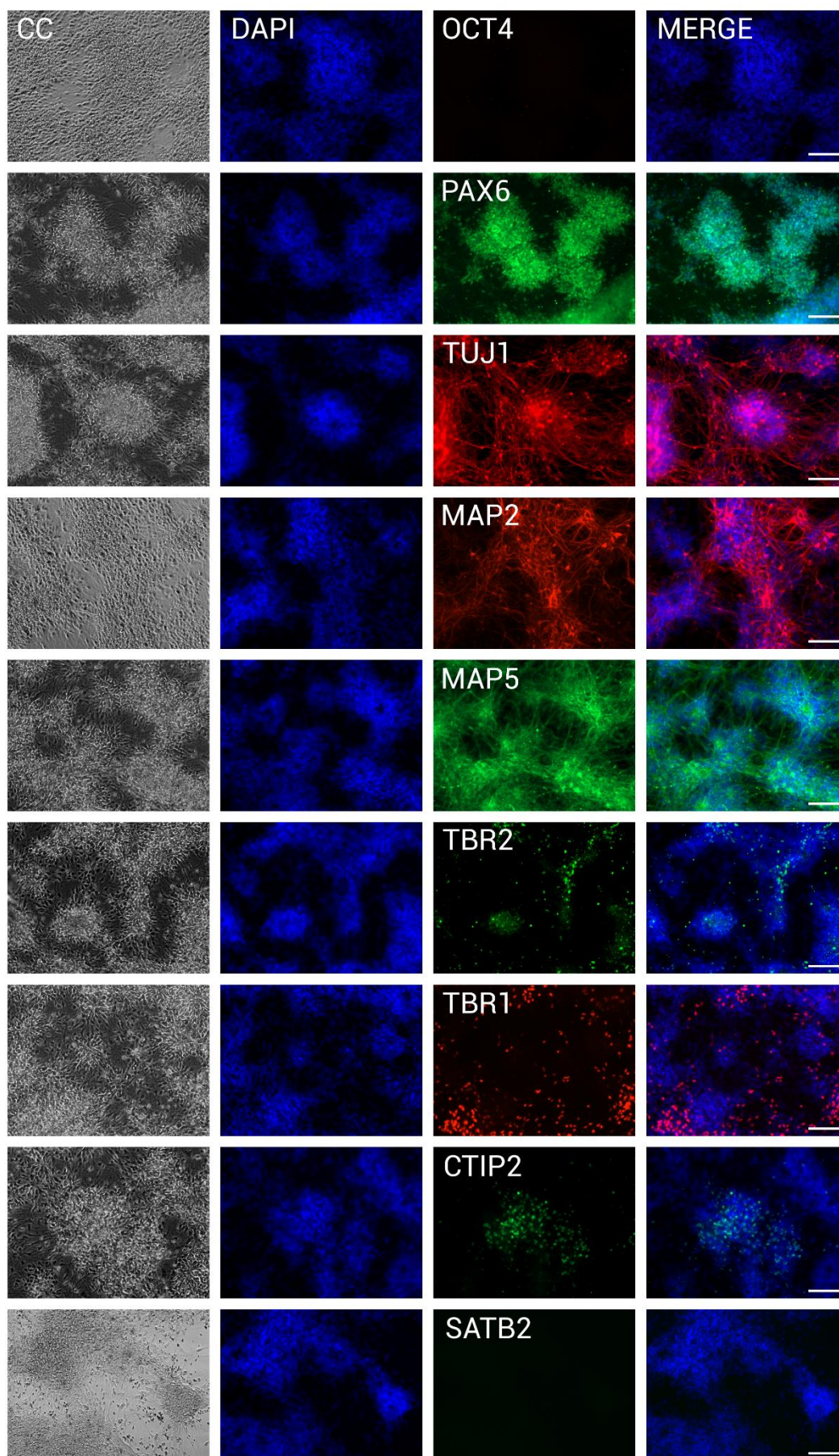
**Figura 66. Marcadores de neuronas corticales en células con fenotipo neuronal obtenidas a partir de la diferenciación de CMPih OUWioo2-A (*PSEN1* WT) a día 45.** Detección por inmunofluorescencia indirecta del marcador de pluripotencia OCT-4, marcador del linaje neural PAX6, marcadores neuronales TUJ1, MAP2 y MAP5 y marcadores corticales específicos CTIP2, SATB2, TBR1 y TBR2. Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI. La escala representa 100  $\mu$ m.





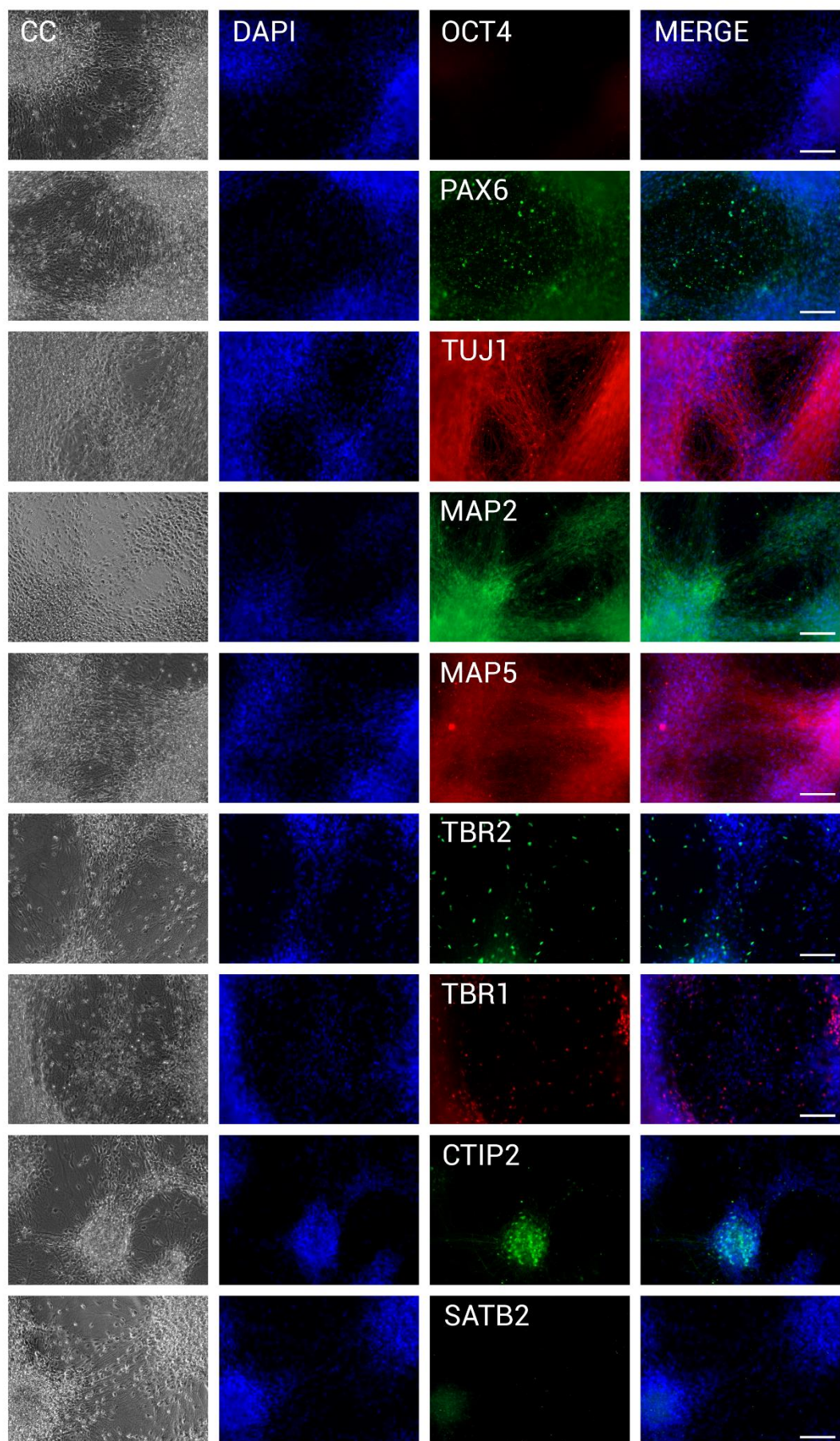
**Figura 67. Marcadores de neuronas corticales en células con fenotipo neuronal obtenidas a partir de la diferenciación de CMPih OUWioo3-A (*PSEN1* p.A246E) a día 45.** Detección por inmunofluorescencia indirecta del marcador de pluripotencia OCT-4, marcador del linaje neural PAX6, marcadores neuronales TUJ1, MAP2 y MAP5 y marcadores corticales específicos CTIP2, SATB2, TBR1 y TBR2. Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI. La escala representa 100  $\mu$ m.





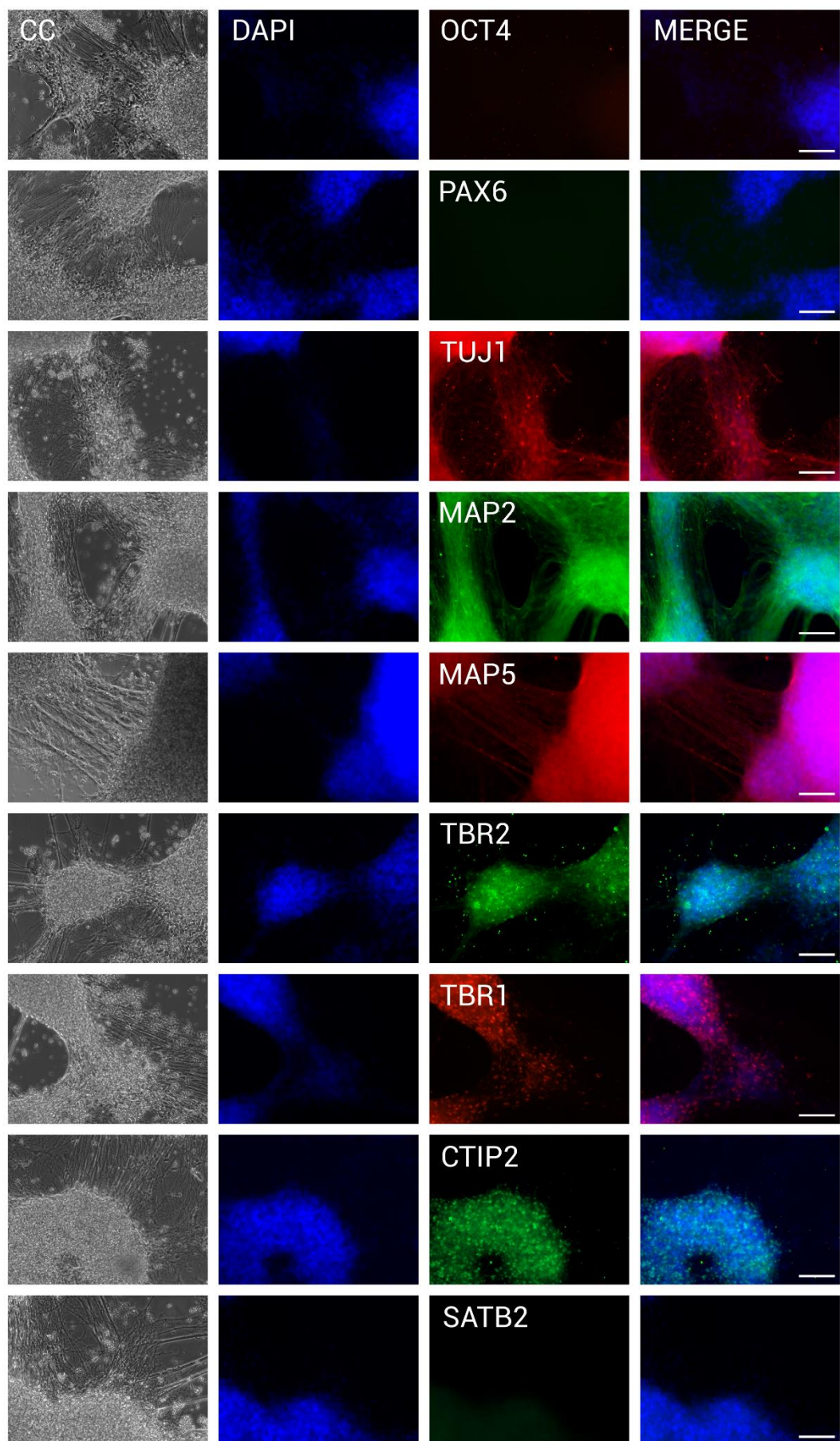
**Figura 68. Marcadores de neuronas corticales en células con fenotipo neuronal obtenidas a partir de la diferenciación de CMPih FFAD1 (*PSEN1* p.T119I) a día 45.** Detección por inmunofluorescencia indirecta del marcador de pluripotencia OCT-4, marcador del linaje neural PAX6, marcadores neuronales TUJ1, MAP2 y MAP5 y marcadores corticales específicos CTIP2, SATB2, TBR1 y TBR2. Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI. La escala representa 100  $\mu$ m.





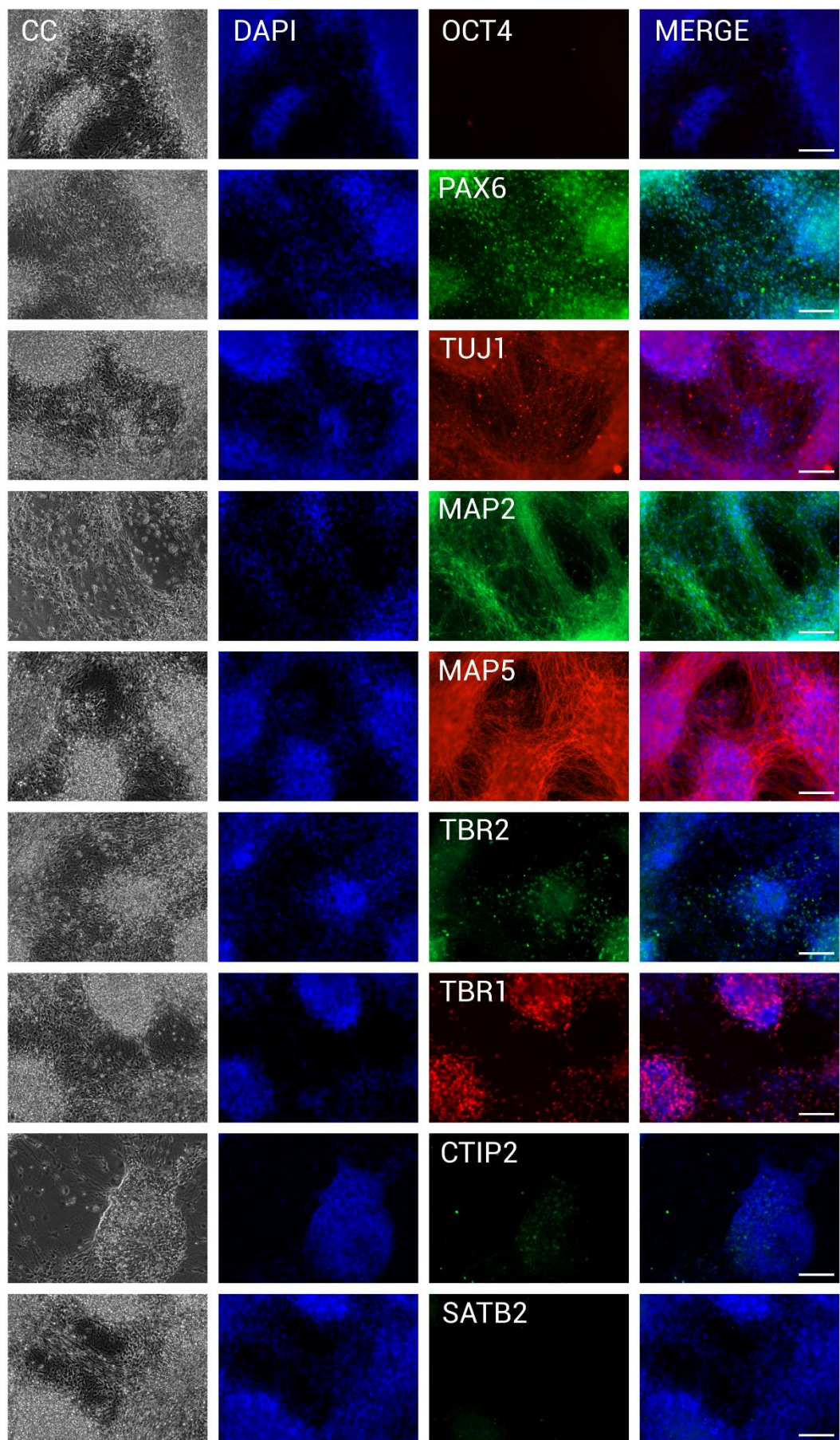
**Figura 69. Marcadores de neuronas corticales en células con fenotipo neuronal obtenidas a partir de la diferenciación de CMPih OUWioo2-A (*PSEN1* WT) a día 70.** Detección por inmunofluorescencia indirecta del marcador de pluripotencia OCT-4, marcador del linaje neural PAX6, marcadores neuronales TUJ1, MAP2 y MAP5 y marcadores corticales específicos CTIP2, SATB2, TBR1 y TBR2. Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI. La escala representa 100  $\mu$ m.





**Figura 70. Marcadores de neuronas corticales en células con fenotipo neuronal obtenidas a partir de la diferenciación de CMPih OUWioo3-A (*PSEN1* p.A246E) a día 70.** Detección por inmunofluorescencia indirecta del marcador de pluripotencia OCT-4, marcador del linaje neural PAX6, marcadores neuronales TUJ1, MAP2 y MAP5 y marcadores corticales específicos CTIP2, SATB2, TBR1 y TBR2. Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI. La escala representa 100  $\mu$ m.





**Figura 71. Marcadores de neuronas corticales en células con fenotipo neuronal obtenidas a partir de la diferenciación de CMPih FFAD1 (*PSEN1* p.T119I) a día 70.** Detección por inmunofluorescencia indirecta del marcador de pluripotencia OCT-4, marcador del linaje neural PAX6, marcadores neuronales TUJ1, MAP2 y MAP5 y marcadores corticales específicos CTIP2, SATB2, TBR1 y TBR2. Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI. La escala representa 100  $\mu$ m.

Como puede verse en las figuras 66 a 71, a partir de día 45, no observamos expresión de la proteína OCT4, indicando la salida de las células de su estado indiferenciado. Con respecto al marcador de progenitores neuronales PAX6, observamos aún expresión en las líneas UOWi002-A (*PSEN1* WT) y FFAD1 (*PSEN1* T119I) pero no en la línea UOWi003-A (*PSEN1* A246E) a día 45, y esta marca se mantuvo a día 70 en ambas líneas, aunque un poco más difusa en UOWi002-A. Con respecto a los marcadores de linaje neuronales TUJ1, MAP2 y MAP5, las 3 líneas presentaron una expresión robusta de los mismos tanto a día 45 como a día 70.

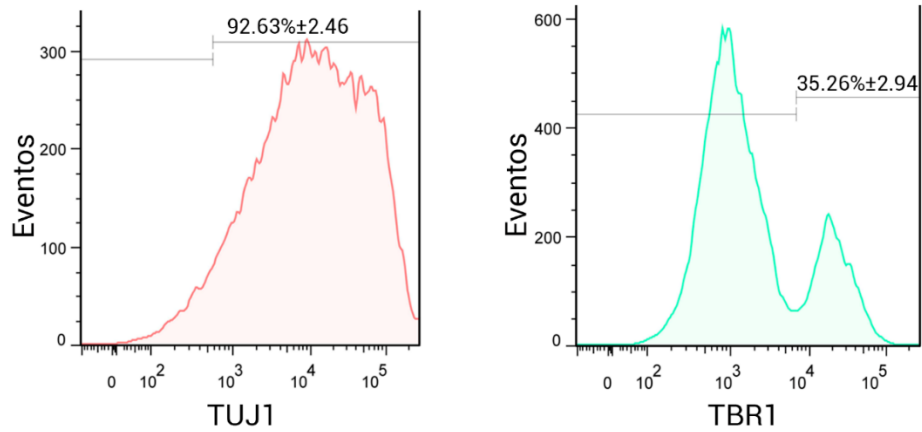
En lo que respecta a los marcadores de capas corticales TBR1 y TBR2, se observó expresión de ambos en las 3 líneas. En particular, TBR1, marcador de la capa VI, aumentó su expresión en neuronas de día 70. Cabe destacar que TBR1 se expresa temporalmente luego que TBR2 durante el desarrollo cortical en mamíferos.

Finalmente, si consideramos los marcadores corticales presentes en las capas más externas, CTIP2 y SATB2, a día 45 sólo se observó marca de CTIP2 en la línea FFAD1 (*PSEN1* T119I). Para ese mismo marcador, a día 70 detectamos expresión en las neuronas diferenciadas de las tres líneas. Con respecto a SATB2, marcador de la capa II/III, no se observó marcación específica en ninguno de los tiempos estudiados para ninguna de las líneas.

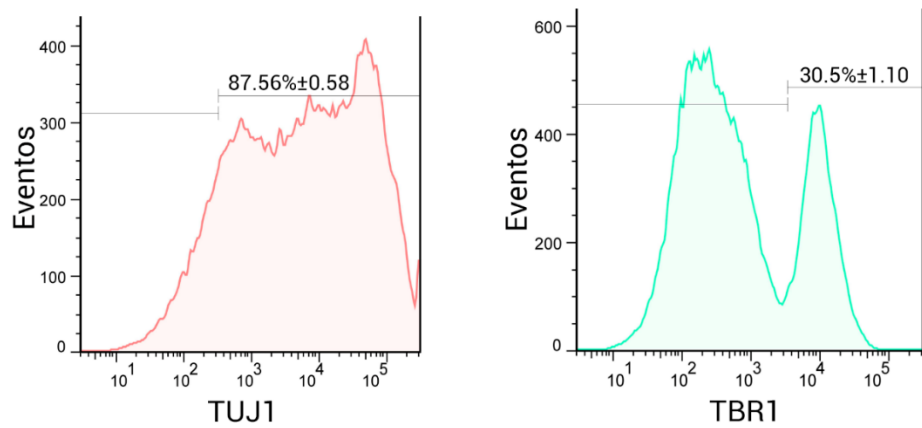
Esto nos indicaría una correcta diferenciación dirigida a linaje neural y en particular cortical, aunque la recapitulación cortical no fue completa.

Tras validarlas por inmunofluorescencia indirecta decidimos a su vez realizar luego una cuantificación de la proporción de neuronas y particularmente de neuronas corticales obtenidas. Para ello, realizamos un ensayo a día 70 del protocolo de diferenciación de inmunomarcación y posterior análisis por citometría de flujo utilizando anticuerpos primarios específicos para TUJ-1 y TBR1 respectivamente (Figura 72).

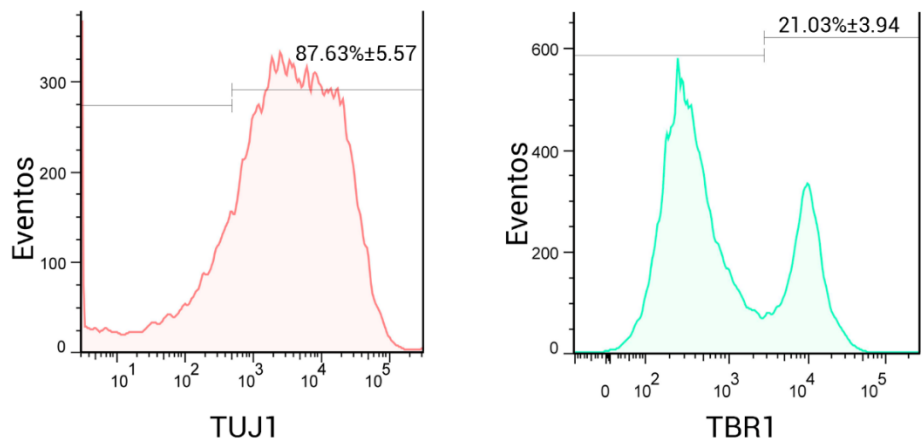
### A. UOW002i-A(*PSEN1* WT)



### B. FFAD1 (*PSEN1* p.T119I)



### C. UOW003i-A (*PSEN1* p.A246E)



**Figura 72. Eficiencia de diferenciación a neuronas corticales.** Análisis por citometría de flujo mediante marcación indirecta del marcador neuronal TUJ-1 y del marcador de neuronas corticales TBR-1 en células con fenotipo neuronal al día 70 de la diferenciación de las CMPih **(A)** OUW002-A (*PSEN1* WT), **(B)** FFAD1 (*PSEN1* p.T119I) y **(C)** OUW003-A (*PSEN1* p.A246E). El histograma rojo representa las células marcadas con TUJ-1, mientras que el verde representa las células marcadas con TBR-1. Las barras delimitan el porcentaje de células positivas y negativas para la marcación establecida.  $n = 3$ . Los valores se representan como el promedio de las muestras con marcación positiva  $\pm$  SEM.

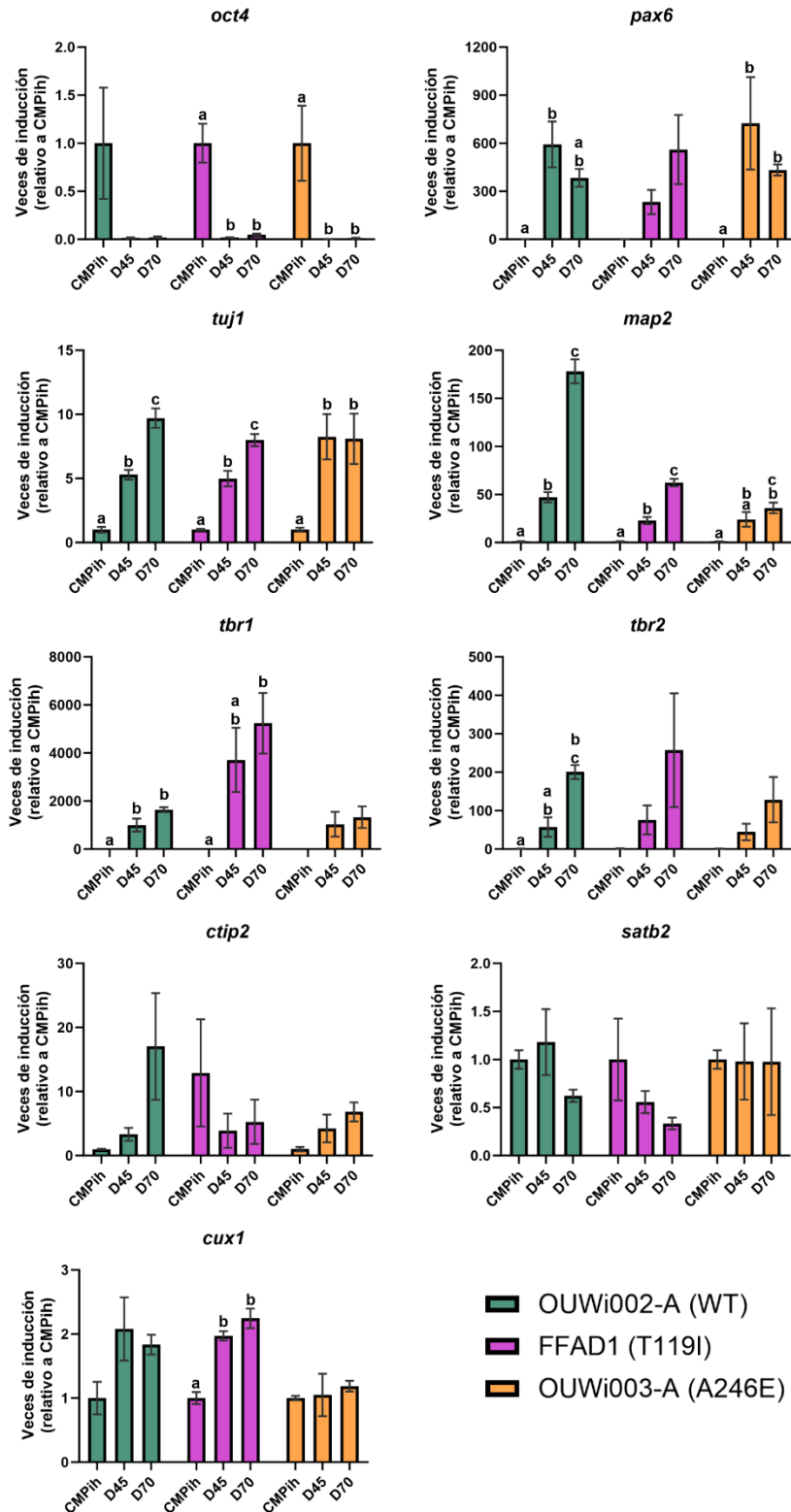
La figura 72 nos indica que a día 70 más del 87 % de las células obtenidas para las 3 líneas expresaban el marcador neuronal genérico TUJ1 y que más del 20% expresaban el marcador cortical TBR1. Esto no solo nos indica que la pureza del cultivo a linaje neuronal es alta, sino que también al menos un 20% del total de células estaría presentando un linaje cortical. Además, nos habla de la heterogeneidad del cultivo con respecto al tipo de neuronas obtenidas a día 70 ya que, como se observó en las figuras 67 a 69, no sólo expresan TBR1, sino también TBR2 y CTIP2. Recapitulando así, varias regiones espaciales corticales en 2 dimensiones.

Finalmente, decidimos sumar a nuestra validación el análisis, mediante RT-qPCR, de los niveles de expresión temporales de los transcritos de los marcadores estudiados previamente por inmunomarcación indirecta (Figura 73). Como era de esperarse y en concordancia con lo observado previamente, se detectó una disminución del marcador de pluripotencia *OCT4* para las 3 líneas. Por su parte, la expresión de ARNm del marcador de progenitores neuronales *PAX6* aumentó a día 45 para luego disminuir a día 70, lo que indicaría una transición de un estadio más temprano a uno más maduro. Llamativamente, en la línea FFAD1 (*PSEN1* T119I) la expresión del gen *PAX6* pareció aumentar a medida que pasó el tiempo en cultivo, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Para los marcadores neuronales típicos, *TUJ1* y *MAP2*, el patrón de expresión de ambos genes aumentó conforme pasaron los días en cultivo, mostrando una correcta diferenciación a linaje neuronal. Esta tendencia al aumento en la expresión a medida que progresa el protocolo también se observó para los niveles de expresión de los marcadores corticales *TBR1* y *TBR2*.

Con respecto a la expresión del gen del marcador *CTIP2*, observamos una tendencia no significativa al aumento de los niveles de expresión únicamente para la línea UOWio02-A (*PSEN1* WT). Una vez más, no encontramos diferencias en los niveles de expresión de ARNm del marcador *SATB2*, coincidente con lo observado por inmunomarcación indirecta. Ante la falta de un anticuerpo para un marcador cortical de capa externa, utilizamos primers contra *CUX1*, también presente en la capa II/III de la corteza y observamos una tendencia no significativa al aumento de los niveles de expresión en neuronas diferenciadas a partir de las líneas de CMPih UOWio02-A (*PSEN1* WT) y FFAD1 (*PSEN1* T119I).





**Figura 73. Niveles de expresión de ARN mensajeros de genes neuronales y corticales a día 45 y 70 del protocolo de diferenciación de CMPih a neuronas corticales.** Análisis por RT-qPCR de los transcritos del marcador de pluripotencia *OCT-4*, del marcador de progenitores neurales *PAX-6*, de los marcadores neuronales *TUJ-1*, *MAP2* y *MAP5* y de capas corticales *SATB2*, *CTIP2*, *TBR1*, *TBR2* y *CUX1*. Se utilizaron los niveles de expresión de *RPL7* para normalizar los datos. Se graficaron las veces de inducción relativas a las CMPih control (OUWi002.A). Se muestran el promedio  $\pm$  error estándar de tres experimentos independientes. Se realizó la prueba estadística de Anova a una cola y los valores se consideraron significativamente diferentes cuando (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,005$  y (\*\*\*\*)  $p < 0,001$ .

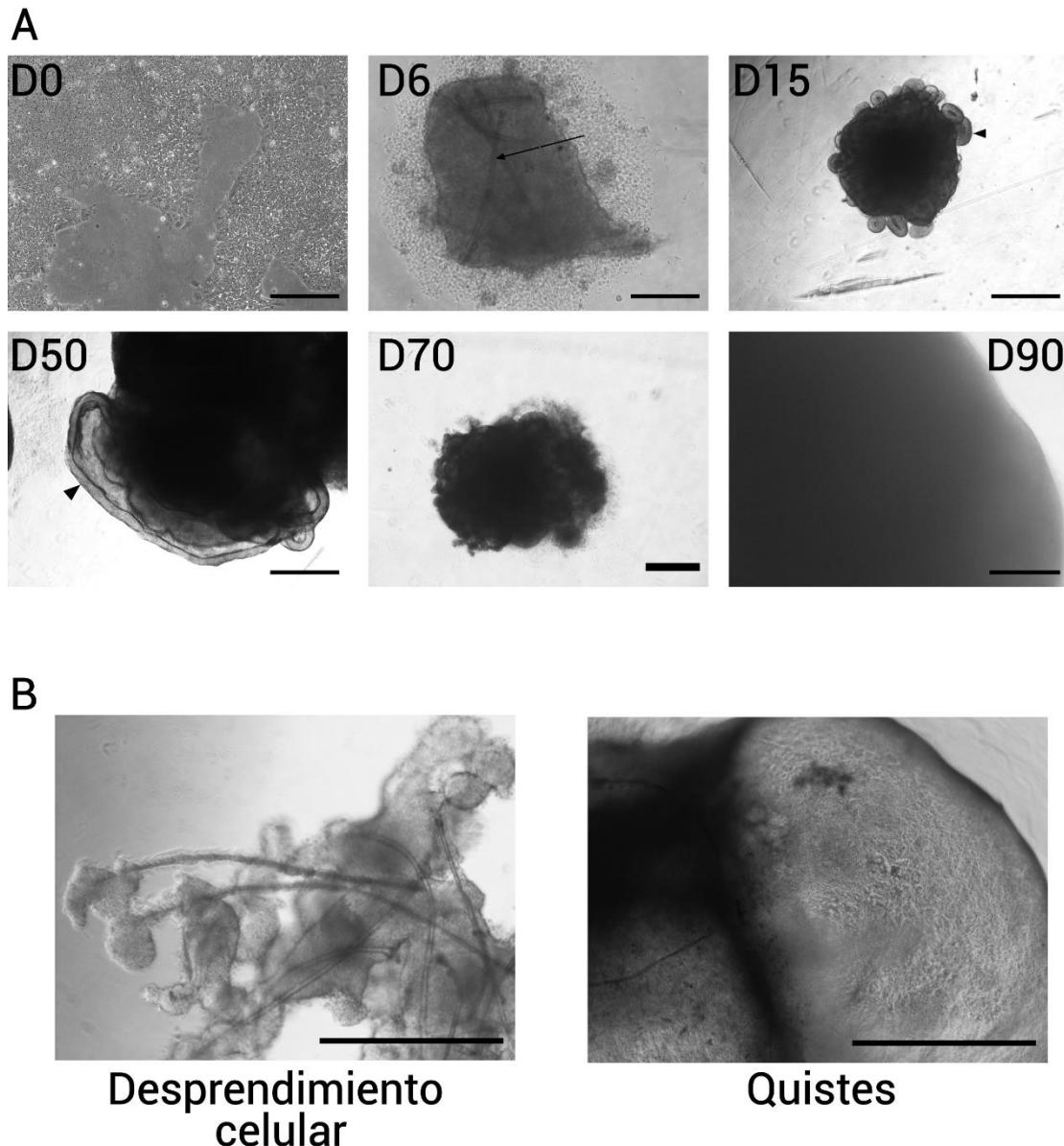
### 3.4 Diferenciación de CMPih a linaje neural en 3 dimensiones (Modelo de organoides cerebrales)

Ante las limitantes espaciales de recapitular la deposición de ONF y placas A $\beta$  que se presentan en los modelos en 2 dimensiones y con el objetivo de aumentar la cantidad de modelos paciente-específico disponibles para el estudio de una enfermedad tan compleja como es la EA, decidimos poner a punto un protocolo de diferenciación a tejido neural en 3 dimensiones comúnmente denominado “organoide cerebral”.

#### 3.4.1 Generación del modelo de organoides cerebrales

Para cumplir con este objetivo, realizamos una búsqueda bibliográfica de los protocolos de organoides publicados hasta inicios del 2019, momento en el que comenzó esta parte del proyecto (revisados en <sup>274,275</sup>), analizamos la complejidad de estos y la posibilidad de compra de los insumos disponibles y elegimos protocolo de Lancaster y Knoblich, con modificaciones de publicaciones posteriores <sup>179,180</sup>.

El mismo se basa en explotar la capacidad intrínseca de las CMPih de diferenciarse a ectodermo, la capa germinal que posteriormente forma el tejido neural, cultivándolas en suspensión en un medio definido para cultivo de células madre (hES) con bajo contenido de FGF2 (que luego es removido totalmente), acompañadas de microandamios fibrosos de confección propia (Figura 74 A D6).



**Figura 74. Línea temporal de la diferenciación de CMPih a linaje neural en 3 dimensiones (modelo de organoide cerebral humano).** **A** Imágenes de campo claro representativas del desarrollo de los organoides cerebrales a días 0 (CMPih indiferenciadas), 6, 15, 50, 70 y 95 respectivamente. La flecha indica la presencia de fibras y las células asociadas a su alrededor. Las cabezas de flechas muestran la formación de brotes de neuroectodermo que se forman luego de ser los mismos embebidos en Matrigel, los cuales luego devienen en la formación de estructuras lobulares corticales. **B** Imágenes de campo claro representativas de la diferenciación anormal de organoides cerebrales. A la izquierda se observa la falta de adhesión de las CMPih a las fibras en los primeros días del protocolo. A la derecha se observa la formación de quistes, la cual ocurre generalmente a partir del día 20. La barra indica 50  $\mu\text{m}$ .

En estas condiciones, las células formaron cuerpos embrioides los cuales fueron embebidos en gotas de Matrigel, matriz extracelular comercial derivada de células de sarcoma murino de Engelbreth-Holm-Swarm (para más detalle ver materiales y métodos), las cuales le sirvieron de andamiaje para mejorar la producción de brotes de neuroectodermo (figura 74 A D15) y la disposición basal-apical propia del tejido cortical.

Una vez embebidos, los organoides cerebrales fueron cultivados en condiciones de agitación continua, en un medio que contiene insulina, la cual se ha demostrado que

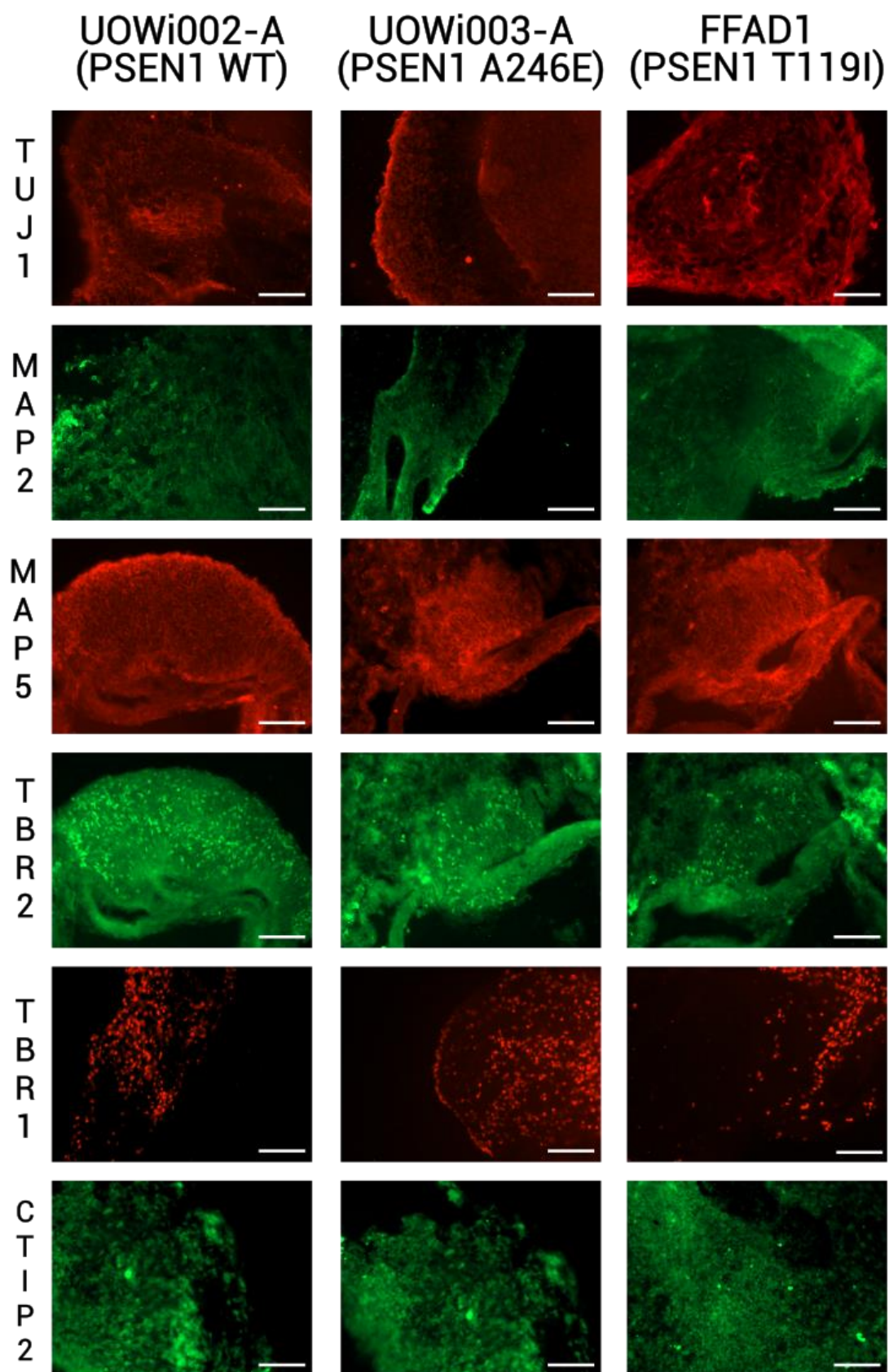
interviene en procesos diversos de la formación neuronal y el establecimiento de redes sinápticas (<sup>272,273</sup>, revisado en <sup>276</sup>) y un gradiente en incremento de vitamina A (cuyo principio activo es el ácido retinoico) con el objetivo de promover la diferenciación neuronal y el *patterning* tisular<sup>277</sup>. Además, se realizó un pulso de 3 días de CHIR99021, un activador de la vía de WNT, el cual se ha demostrado que, en bajas concentraciones, promueve la diferenciación a linaje neural<sup>278–281</sup>. Con el paso de los días, se comenzaron a observar estructuras similares a lóbulos corticales cada vez más complejos (Figura 74 A D50) y entre los días 70 y 90 se volvieron difíciles de observar al microscopio dada la cantidad de células que los componen (Figura 74 A D90).

A día 90 se fijaron algunos organoides para realizar cortes e inmunotinción de marcadores neurales, corticales y de neurodegeneración y se recuperó el sobrenadante para realizar cuantificaciones de péptidos A $\beta$  mediante ensayos de ELISA (ver capítulo 4).

Durante la realización de estos protocolos, se realizó un seguimiento estricto de la morfología de los organoides y los mismos fueron descartados al presentar anomalías en su correcto proceso de diferenciación como son el desprendimiento de las fibras a días tempranos o bien la generación de quistes, de contenido desconocido que comenzaban a abarcar más de la mitad de los organoides (Figura 74 B).

### 3.4.3 Validación del modelo de organoides cerebrales

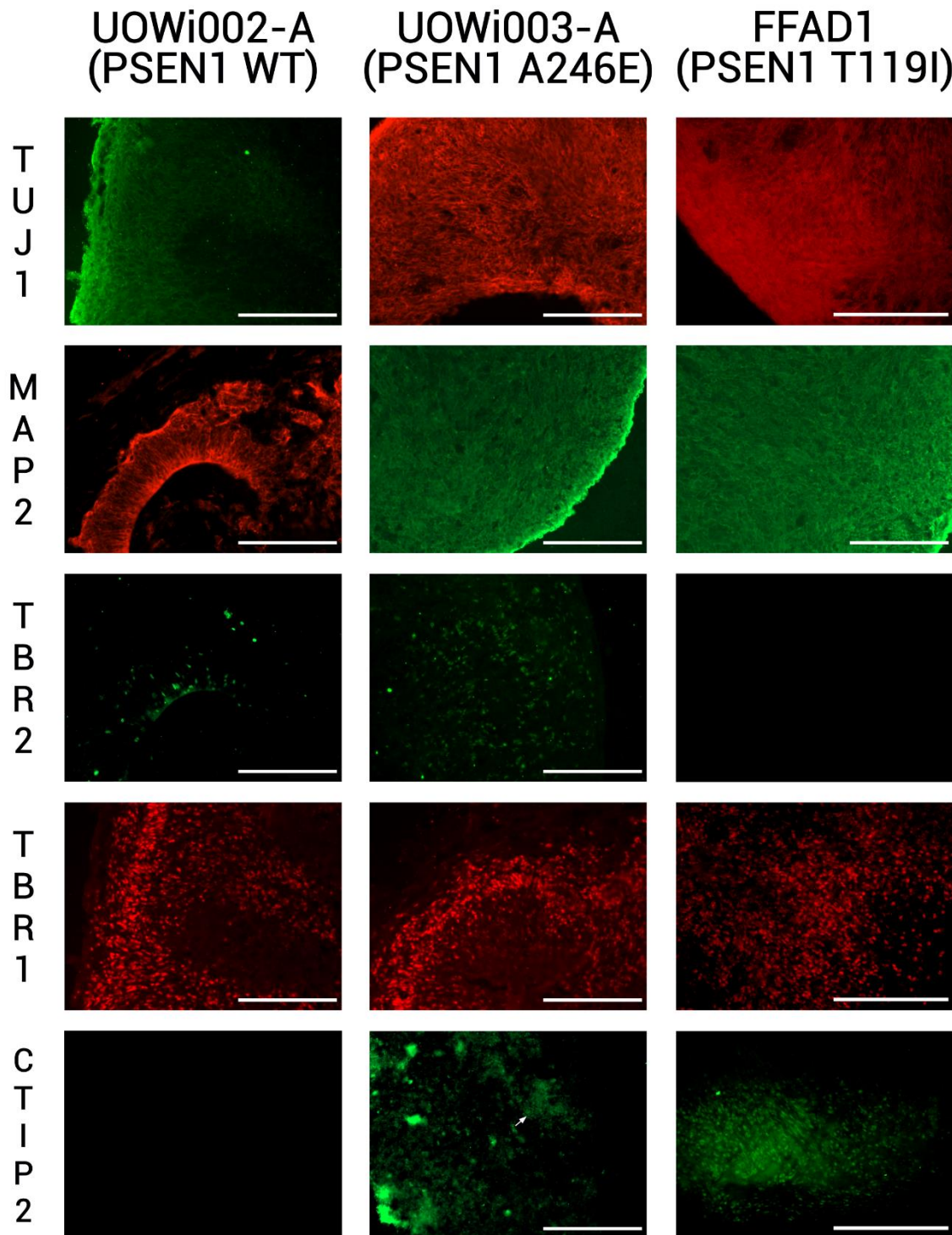
Una vez generados los organoides cerebrales, decidimos caracterizarlos por inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos primarios específicos para las proteínas neuronales TUJ-1, MAP2 y MAP5 y los marcadores corticales TBR2, TBR1 y CTIP2 a días 60 (Figura 75) y 90 de diferenciación (Figura 76). Los organoides fijados en paraformaldehído 4% y criopreservados, fueron cortados con un criostato a un grosor de 20  $\mu$ m. Una vez realizados los cortes, se montaron sobre portaobjetos cargados, se realizó la inmunotinción indirecta sobre los mismos vidrios y se procedió a su observación en un microscopio de fluorescencia directo.



**Figura 75. Marcadores de diferenciación a linaje neuronal a día 60 del protocolo de diferenciación en 3 dimensiones (organoides cerebrales).** Inmunomarcación contra los marcadores de neuronas TUJ1, MAP2 y MAP5 y los marcadores de neuronas corticales TBR2, TBR1 y CTIP2. La barra indica 50  $\mu$ m.



Como puede verse en la figura 75, a día 60 de diferenciación los organoides ya presentan expresión de los marcadores previamente mencionados.

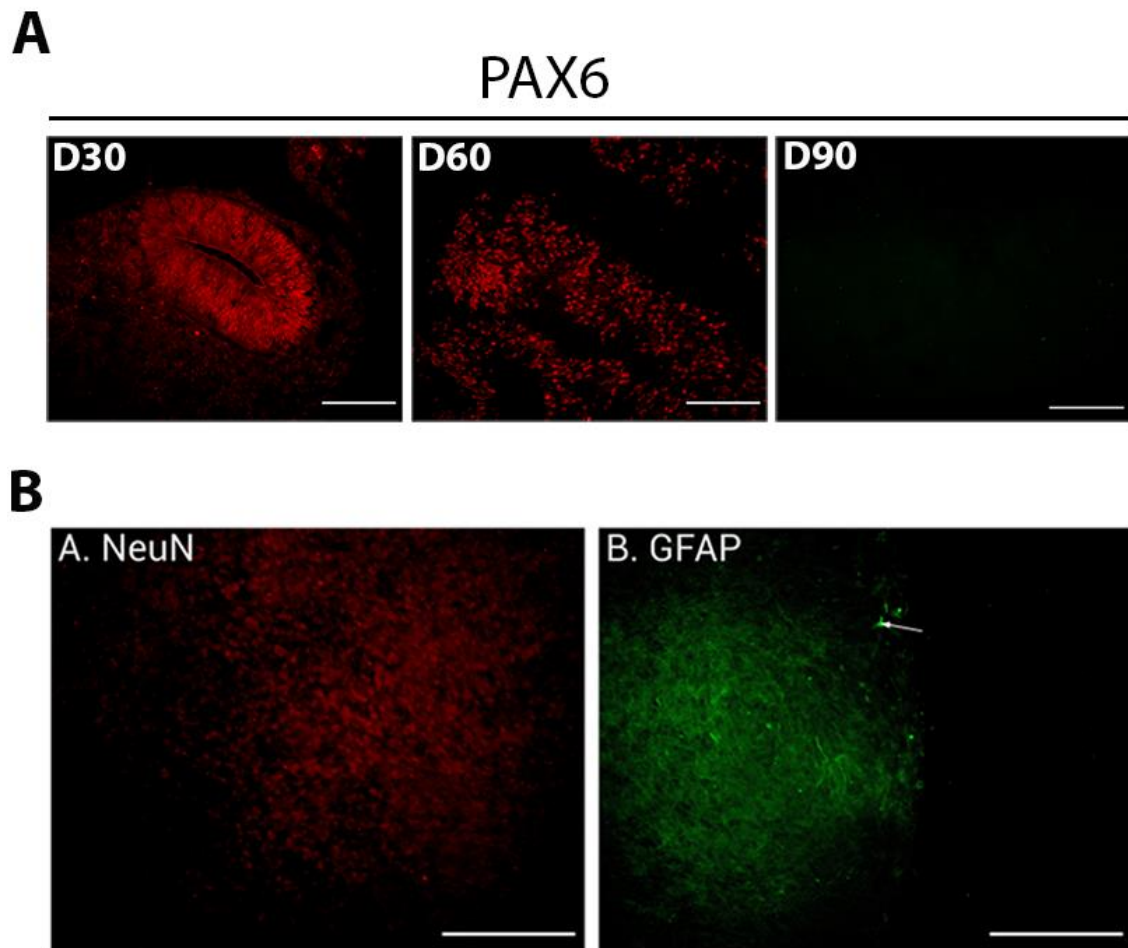


**Figura 76. Marcadores de diferenciación a linaje neuronal a día 90 del protocolo de diferenciación en 3 dimensiones (organoides cerebrales).** Inmunomarcación contra los marcadores de neuronas TUJ1, MAP2 y MAP5 y los marcadores de neuronas corticales TBR2, TBR1 y CTIP2. La barra indica 50  $\mu$ m.

Como puede observarse en la figura 76, a día 90, las tres líneas presentaron expresión de los marcadores neuronales TUJ1 y MAP2. Pudimos detectar, además, señal

del marcador cortical temprano TBR2 solo en las líneas OUWioo2-A (*PSEN1* WT) y FFAD1 (*PSEN1* T119I), a pesar de esto, las 3 líneas presentaron expresión robusta del marcador cortical más tardío, TBR1. Por su parte, observamos marca clara del marcador cortical CTIP2 en la línea FFAD1 (*PSEN1* T119I) y en algunas regiones (Figura 74, flecha) de los organoides derivados de la línea OUWioo3-A (*PSEN1* A246E).

Es interesante destacar que, en los organoides obtenidos, pudimos observar la presencia de células de la glía, como astrocitos, identificados por tinción positiva de GFAP, y la presencia de neuronas post-mitóticas, identificadas por tinción como NeuN. Además, pudimos identificar la presencia del marcador de CMN PAX6, el cual también es considerado marcador de linaje hacia procenséfalo<sup>282</sup> (Figura 77).



**Figura 77. Marcadores de diferenciación a astrocitos y a neuronas post-mitóticas a día 90 del protocolo de diferenciación en 3 dimensiones (organoides cerebrales) de la línea FFAD1 (*PSEN1* p.T199I).** A Inmunomarcación contra el marcador de procenséfalo inmaduro PAX6 a 30, 60 y 90 días de maduración B (A) Inmunomarcación contra el marcador de neuronas post-mitóticas NeuN. (B) Inmunomarcación contra el marcador de astrocitos GFAP. La flecha indica el sitio de marca específica. La barra indica 30  $\mu$ m.

Estos resultados nos indican que los organoides cerebrales efectivamente adquirieron un fenotipo neural cortical, aunque no se trató de un tipo de cultivo particularmente homogéneo.



## Resultados parciales del capítulo

A lo largo de este capítulo, nos enfocamos en la puesta a punto de 3 modelos de diferenciación a tejido neural, dos en 2 dimensiones y uno en 3 dimensiones, utilizando 3 líneas de CMPih diferentes: UOWi002-A (*PSEN1* WT), UOWi002-A (*PSEN1* A246E) y FFAD1 (*PSEN1* T119I).

El primero de ellos fue un protocolo de diferenciación en 2 dimensiones a neuronas genéricas el cual realizamos utilizando un kit comercializado por Gibco. Este protocolo, que cuenta con dos partes, consistió inicialmente en la generación de NSC a partir de las CMPih de cada línea, un proceso que lleva 15 días aproximadamente, para luego realizar una diferenciación de 30 días a neuronas genéricas. Si bien se trata de un protocolo relativamente corto ya que permite obtener neuronas en 45 días, se descartó debido a que no logramos generar neuronas a partir de la línea FFAD1. Además, las neuronas generadas presentaron un fenotipo genérico muy inmaduro, el cual dista mucho de la población celular similar afectada en la EA. Este contratiempo condujo a una reevaluación meticulosa de nuestras estrategias, llevándonos a enfocarnos en alternativas que nos permitieran realizar un mejor modelado de la patología.

Realizar luego la puesta a punto de un protocolo de diferenciación a neuronas corticales, también en 2 dimensiones, basado en la doble inhibición de la vía de SMAD, que ya había sido utilizado en bibliografía para modelizar la EA *in vitro*. Este protocolo, si bien más largo (70 días), nos permitió la generación robusta de neuronas que expresaron marcadores corticales. Realizamos una caracterización de la expresión de estos por 2 métodos: presencia de proteínas por inmunomarcación indirecta y análisis de expresión de ARNm mediante RT-qPCR. Por ambos métodos observamos una disminución de los niveles de expresión del marcador de pluripotencia *OCT4*, presencia del marcador *PAX6*, como así también de los marcadores neuronales *TUJ1*, *MAP2* y *MAP5* y de los marcadores corticales *TBR2*, *TBR1* y *CTIP2*. No detectamos a la proteína *SATB2* ni un aumento en los niveles de expresión de su mensajero por RT-qPCR. Como se mencionó anteriormente *SATB2* es un marcador de la capa II/III de la corteza cerebral, y la falta de expresión de este marcador nos podría dar un indicio de que a los tiempos ensayados este protocolo no recapitula la totalidad de los marcadores corticales. Sin embargo, observamos una tendencia al aumento del mensajero de *CUX1*, en las líneas UOWi002-A (*PSEN1* WT) y FFAD1 (*PSEN1* T119I). Por último, decidimos evaluar la pureza del cultivo obtenido para asegurarnos que estábamos obteniendo un cultivo neuronal homogéneo. Para ello, realizamos una citometría de flujo contra los marcadores

TUJ1 y TBR1 para evaluar el porcentaje de células que habrían adquirido un fenotipo neuronal y cuantos de estos serían propios de la capa VI de la corteza. Encontramos que alrededor del 90% de las células presentaban el marcador TUJ1 y que aproximadamente un 30% del total llegaron al linaje específico de capa VI. Así, este protocolo de diferenciación demostró su capacidad para generar un cultivo neuronal puro, destacándose por la presencia de diversos marcadores corticales.

Para complementar los resultados obtenidos con los cultivos en dos dimensiones, decidimos optimizar un modelo de diferenciación en tres dimensiones a 90 días, conocido como organoides celulares, ya que, si bien es más laborioso y largo, permitiría observar las placas A $\beta$  de forma análoga a lo encontrado en los pacientes, realizando así un mejor modelado de la EA.

Analizamos la expresión de marcadores neuronales y corticales a días 60 y 90 del protocolo de diferenciación en 3 dimensiones. En nuestros análisis, detectamos la presencia de los marcadores neuronales y corticales TUJ1, MAP2, MAP5, TBR1, TBR2 y CTIP2 a partir del día 60 y de PAX6 a día 30 y 60. A su vez, a día 90, se observó la presencia de neuronas post-mitóticas (evidenciadas por la expresión del marcador NeuN) y astrocitos (evidenciadas por la expresión de GFAP). Lo que nos llevó a concluir que la diferenciación a linaje neural había sido exitosa.

Es importante destacar que logramos obtener neuronas corticales a partir de las tres líneas de CMPih tanto utilizando el modelo de diferenciación a neuronas corticales mediante la inhibición de la vía de SMAD como el de organoides cerebrales. Y por ello decidimos continuar con el siguiente objetivo, es decir evaluar marcadores de neurodegeneración propios de la EA con las 3 líneas utilizando ambos protocolos.



## Capítulo 4. Estudio de patogenicidad de la mutación *PSEN1* p.T119I sobre el desarrollo de la EA en modelos en 2 y 3 dimensiones

La Enfermedad de Alzheimer, una patología neurodegenerativa progresiva, se caracteriza por la acumulación anormal de dos marcadores distintivos: los ovillos neurofibrilares (ON) y las placas beta amiloides ( $A\beta$ ).

Los ON son agregados proteicos constituidos principalmente por la proteína Tau, la cual, en la EA, se encuentra hiperfosforilada. Este fenómeno desencadena la formación de ovillos que interfieren con la función normal de las células nerviosas, promoviendo la degeneración sináptica y, en última instancia, la neurodegeneración, lo que contribuye significativamente a la progresión de la enfermedad.

Por otro lado, las placas  $A\beta$  consisten en acumulaciones de péptidos beta amiloides que se depositan entre las neuronas. Se estima que estos depósitos interfieren con la comunicación neuronal y desencadenan una respuesta inflamatoria que contribuye al deterioro cognitivo.

Por este motivo, y con el objetivo de establecer si la mutación *PSEN1* p.T119I es patogénica decidimos realizar diversos ensayos sobre los modelos previamente generados para estudiar la presencia de ON y placas amiloides ( $A\beta$ ).

### 4.1 Análisis de marcadores neurodegenerativos por ensayos de ELISA utilizando neuronas corticales diferenciadas de CMPih derivadas de pacientes

Como se ha mencionado anteriormente, la proteína precursora amiloide (APP) es una proteína que es clivada por el complejo gamma secretasa dando dos péptidos que se depositan en cerebros de personas con EA por fallas en su eliminación y/o aumento de su producción:  $A\beta_{42}$  y  $A\beta_{40}$ . Estas denominaciones hacen referencia a las longitudes específicas de las cadenas de aminoácidos en las moléculas de  $\beta$ -amiloide.  $A\beta_{42}$  es más propensa a formar agregados y placas en el cerebro, lo que se asocia con el desarrollo de la EA. La relación entre  $A\beta_{42}$  y  $A\beta_{40}$  es crucial para comprender la patogénesis de la EA, ya que desequilibrios en estas formas de  $\beta$ -amiloide pueden desencadenar eventos patológicos que contribuyen al deterioro cognitivo característico de esta enfermedad.

En particular, la relación  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$  en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con EA se ha convertido en un marcador crucial en la investigación y diagnóstico de esta patología neurodegenerativa. Esta proporción refleja un desequilibrio en la producción y deposición de proteínas  $\beta$ -amiloide en el cerebro, donde ocurre la acumulación de

placas amiloides. Así, se ha observado que una disminución en el valor de la relación entre  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$  coincide con un aumento en el deterioro cognitivo y una peor prognosis para el paciente<sup>283</sup>. En cultivo celular en 2D, por su parte, como no se forman las placas de  $A\beta$  amiloide, sino que los péptidos son secretados al espacio extracelular, lo que se observa es un aumento de la de relación entre  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ .

Por otro lado, en los pacientes con EA también se observa la deposición de ON conformados principalmente por la proteína Tau en un estado de hiperfosforilación. Tau es una proteína estructural de los microtúbulos que conforman las neuronas, en el estado patológico presentado en la EA, esta proteína sufre múltiples fosforilaciones lo que produce su aglomeración intracelular.

En este contexto, nos propusimos cuantificar los niveles de los péptidos  $A\beta_{42}$ ,  $A\beta_{40}$  y la fosforilación de la proteína Tau en Treonina 213 como marcadores de neurodegeneración en el modelo de neuronas corticales (2D) desarrollado en el capítulo 3.

En primera instancia, cultivamos las líneas OUW1002-A (*PSEN1* WT), FFAD1 (*PSEN1* p.T119I) y OUW1003-A (*PSEN1* p.A246E) por 70 días siguiendo el protocolo de diferenciación cortical por doble inhibición de SMADs presentado en el capítulo 3. Al cumplirse el día 70 de diferenciación, se renovó 1 ml de medio fresco y se cultivó durante 48 horas con el fin de recolectar el medio condicionado generado por las neuronas. Al finalizar ese período (día 72) se recolectó el sobrenadante y se extrajeron las proteínas totales de los precipitados celulares para su posterior cuantificación (para más detalles ver materiales y métodos).

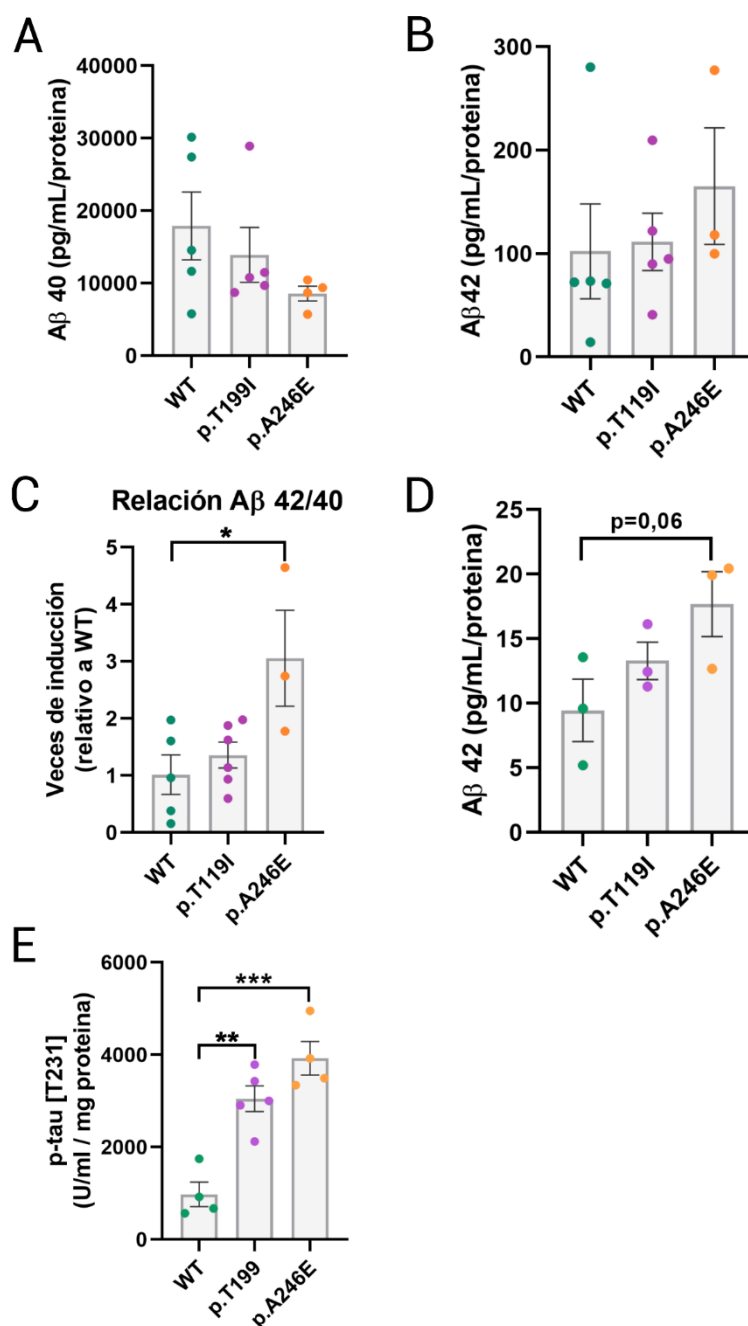
En los extractos proteicos, cuantificamos los niveles intracelulares de los péptidos  $A\beta_{42}$  y  $A\beta_{40}$  mediante la técnica de ELISA utilizando kits comerciales de la empresa Abcam (ver en Materiales y métodos). Como se muestra en la figura 78 A, tanto para la variante *PSEN1* p.A246E como para *PSEN1* p.T119I observamos una tendencia a la disminución de los niveles intracelulares del péptido  $A\beta_{40}$ , siendo este descenso mayor para la variante *PSEN1* p.A246E. A su vez, esta misma variante presentó una tendencia al aumento en los niveles intracelulares de  $A\beta_{42}$ , lo que arrojó como resultado un aumento estadísticamente significativo en la relación  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ , tal como era esperado según la literatura (Figura 78 B y C). Con respecto a la variante *PSEN1* p.T119I, si bien no observamos un aumento en los niveles de  $A\beta_{42}$  intracelulares con respecto a los de neuronas corticales derivadas de CMPih *PSEN1* WT, al relativizar los valores a los niveles de  $A\beta_{40}$  observamos una tendencia, aunque no significativa, al aumento de la relación  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$  (Figura 78 B y C).

En la Figura 78 D se observan los resultados de la cuantificación de  $A\beta_{42}$  en sobrenadantes. En este caso, se detectó una tendencia al aumento en los niveles de  $A\beta_{42}$

en neuronas corticales obtenidas a partir de ambas CMPih portadoras de variantes asociadas a EA (*PSEN1* p.A246E y *PSEN1* p.T119I) con respecto a los niveles observados en neuronas corticales derivadas de CMPih *PSEN1* WT. Este aumento resultó, nuevamente, más pronunciado para la línea *PSEN1* p.A246E que para nuestra variante de interés *PSEN1* p.T119I.

Por último, en los extractos proteicos, cuantificamos por ELISA los niveles de Tau fosforilada en treonin213 [T231], ya que la fosforilación de Tau en sitios específicos se ha visto elevada en la EA<sup>284</sup>. Al analizar los valores obtenidos para la fosforilación de Tau pT231 (Figura 78 E), observamos que neuronas corticales derivadas de CMPih *PSEN1* p.T119I y *PSEN1* p.A246E presentaron niveles de fosforilación significativamente mayores que los detectados en neuronas corticales derivadas de CMPih *PSEN1* WT.

Los resultados obtenidos para los péptidos A $\beta$  son similares a los observados mediante la sobreexpresión de plásmidos en HEK293T *PSEN1* KO (Capítulo 1), en el cual determinamos que la presencia de la mutación en *PSEN1* p.T119I parecería inducir un fenotipo intermedio entre el control de variante patogénica validado (p.A246E) y su contraparte *wild-type*. Notoriamente, este fenotipo intermedio, si bien más marcado y estadísticamente significativo con respecto al control, también se presenta al analizar los resultados obtenidos para los ELISA de la fosforilación en Treonina 231 de Tau (Figura 78E).



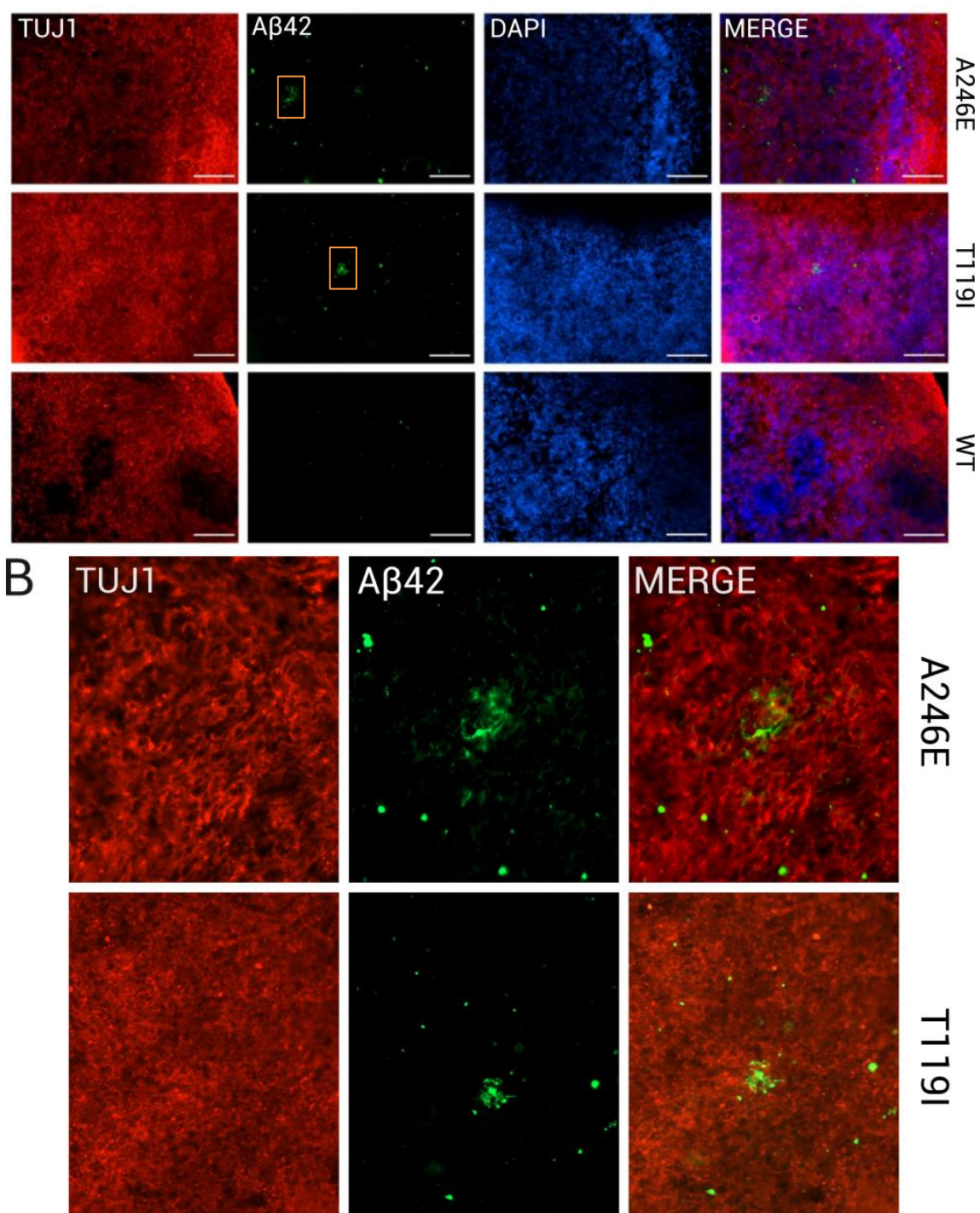
**Figura 78. Ensayos de ELISA de niveles de péptidos A $\beta$ <sub>42</sub>, A $\beta$ <sub>40</sub> y p-Tau [T231] en neuronas corticales (día 70 de diferenciación) derivadas de CMPih.** **A.** Niveles de A $\beta$ <sub>42</sub> cuantificados en los lisados intracelulares de los cultivos celulares utilizando kit de ELISA comercializado por la empresa Abcam. **B.** Niveles de A $\beta$ <sub>40</sub> cuantificados en los lisados intracelulares de los cultivos celulares utilizando kit de ELISA comercializado por la empresa Abcam. **C.** Veces de inducción de la relación A $\beta$ <sub>42</sub>/A $\beta$ <sub>40</sub> intracelular relativo a las neuronas corticales derivadas de CMPih *PSEN1* WT. **D.** Niveles de A $\beta$ <sub>42</sub> cuantificados en los sobrenadantes de los cultivos celulares utilizando kit de ELISA ultrasensible comercializado por la empresa Thermo Fisher Scientific. **E.** Niveles de la fosforilación de tal p-Tau [T231] en lisados intracelulares de los cultivos celulares. Los valores obtenidos fueron normalizados por la cantidad de proteínas totales derivadas de cada ensayo. Todos los datos se presentan como la media + SEM de al menos 3 experimentos independientes. La significancia estadística fue determinada por ANOVA a una cola, con ensayo de comparaciones múltiples y los valores se consideraron significativamente diferentes cuando (\*)  $p < 0.05$ , (\*\*)  $p < 0.01$ , y (\*\*\*)  $p < 0.001$  al comparar con neuronas corticales derivadas de la línea de CMPih UOWio02-A (*PSEN1* WT).



## 4.2 Análisis de marcadores neurodegenerativos en organoide cerebrales

Para complementar los resultados obtenidos en cultivos en dos dimensiones, realizamos el análisis de depósito de A $\beta$  y p-Tau en organoides cerebrales, los cuales, como se demostró en el capítulo anterior, expresan marcadores neuronales (TUJ1, MAP2, MAP5 y NEUN), marcadores de las distintas capas que conforman la corteza (CTIP2, TBR1 y TBR2) y marcadores de astrocitos (GFAP).

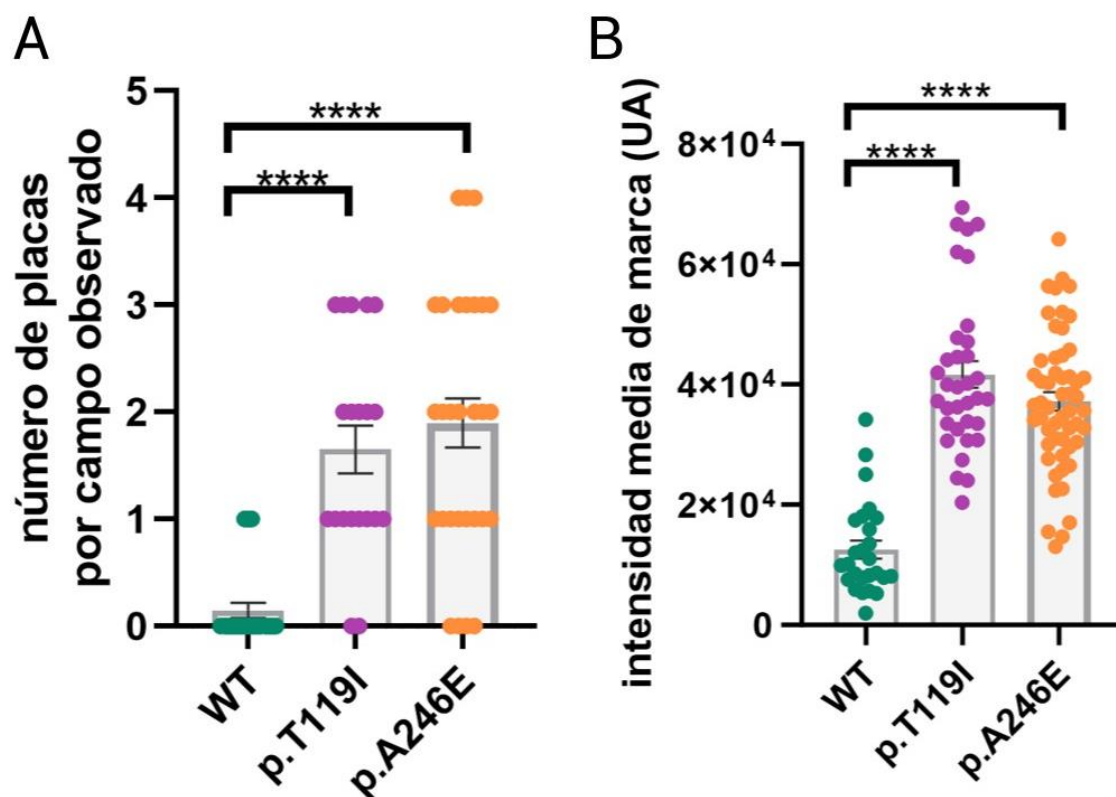
Por ello, decidimos realizar cortes histológicos e inmunomarcación indirecta con anticuerpos específicos para A $\beta_{42}$  de los organoides cerebrales de 90 días de diferenciación. Realizamos una co-marcación contra el marcador neuronal TUJ-1 con el fin de asegurarnos que las zonas que estuviéramos observando realmente presentaran un fenotipo neuronal y evitar de esa manera artificios de la técnica (Figura 79). Esto es porque los organoides exhiben una variabilidad inherente. Aunque la mayor parte de su desarrollo se orienta hacia el linaje neuronal, algunas áreas mantienen su plasticidad y pueden diferenciarse en otros tipos celulares. Por consiguiente, nos aseguramos de enfocar nuestras mediciones en las regiones donde se expresa el marcador neuronal TUJ-1, lo que nos garantiza que estamos evaluando específicamente las zonas que albergan neuronas. Este enfoque nos permite obtener mediciones más precisas y relevantes para nuestros análisis.



**Figura 79. Inmunomarcación de  $A\beta_{42}$  en organoides cerebrales humano de 90 días de diferenciación.** Inmunomarcaciones contra  $A\beta_{42}$  (verde) y contra el marcador de neuronas TUJ1 (rojo) en organoides de 90 de diferenciación de las líneas OUWio03-A (*PSEN1* A246E), FFAD1 (*PSEN1* T119I) y OUWio02-A (*PSEN1* WT). Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI. En el recuadro naranja se indica la amplificación observada en B. La escala representa 50  $\mu$ m. **B.** Amplificación de la marcación con los anticuerpos contra TUJ1 y de  $A\beta_{42}$  de los depósitos observados en la línea OUWio03-A (*PSEN1* A246E) y FFAD1(*PSEN1* T119I). En el 3er rectángulo (MERGE) se presenta la superposición de ambos canales.

Como puede observarse en la figura 79, los organoides derivados de ambas líneas de CMPih portadoras de variantes (OUWio03-A y FFAD1) presentaron marcas (“depósitos, cúmulos o placas de  $A\beta$ ”) de  $A\beta_{42}$ , pero dichas marcas se detectaron con

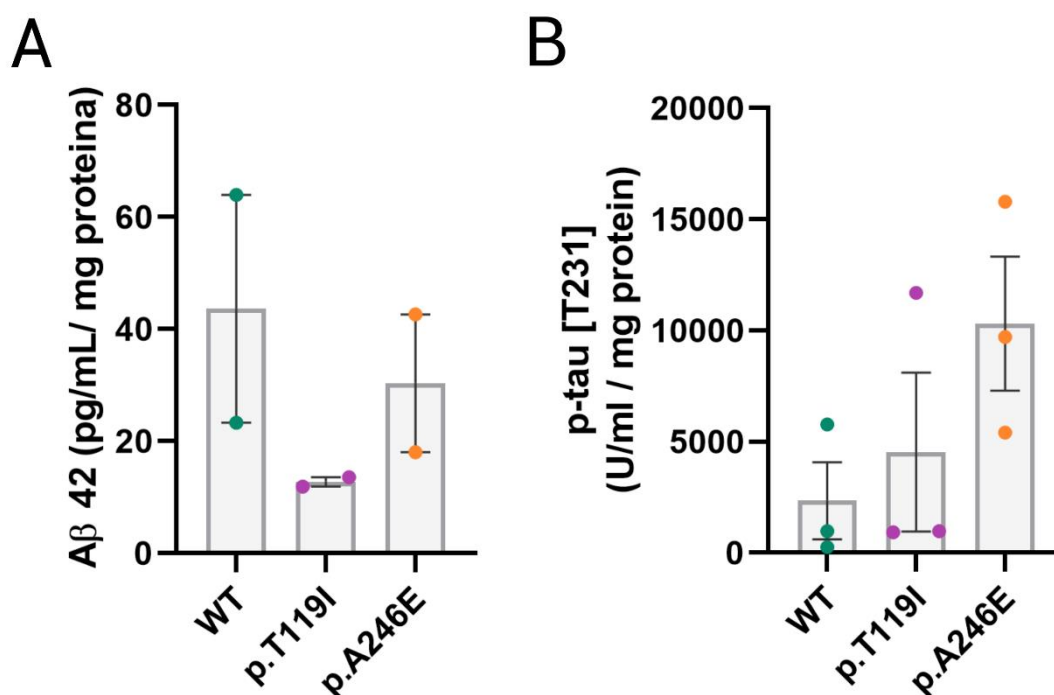
mucha menor frecuencia en los organoides de la línea OUWioo2-A (*PSEN1* WT). De hecho, en únicamente 3 de todos los 27 cortes observados para la línea OUWioo2-A observamos una marcación de cúmulos A $\beta$ , aunque de menor tamaño. Ante esta observación preliminar decidimos utilizar el software ImageJ para realizar una cuantificación de las imágenes. Para ello, medimos la cantidad de placas por corte como así también la intensidad media de señal fluorescente presente en cada una de esas placas (Figura 8o).



**Figura 8o. Cuantificación de depósitos extracelulares de A $\beta$ <sub>42</sub> en organoides cerebrales humanos (90 días de diferenciación).** **A.** Cuantificación del número de placas observadas por imagen analizada para las líneas OUWioo2-A (*PSEN1* WT), FFAD1 (*PSEN1* T119I) y OUWioo3-A (*PSEN1* A246E). **B.** Intensidad media de marca observada (*mean grey value*) para cada depósito analizado para las líneas OUWioo2-A (*PSEN1* WT), FFAD1 (*PSEN1* T119I) y OUWioo3-A (*PSEN1* A246E). Los valores se expresan como media + SEM. La significancia estadística fue determinada por ANOVA no paramétrico Kruskal-Wallis y los valores se consideraron significativamente diferentes cuando (\*\*\*\*)  $p < 0,001$ .

Como se muestra en la figura 8o A, tanto en organoides derivados de la línea de CMPih OUWioo3-A (*PSEN1* A246E) como de la línea de CMPih FFAD1 (*PSEN1* T119I) se observó mayor cantidad de depósitos con tinción específica para A $\beta$ <sub>42</sub> (número de placas por imagen) que en organoides derivados de la línea de CMPih OUWioo2-A (*PSEN1* WT), la cual solo presentó algún depósito en 3 de los cortes analizados. A su vez, la intensidad media de la marca fue similar entre los organoides derivados de OUWioo3-A y FFAD1 y mayor que la de los organoides derivados de OUWioo2-A (Figura 8oB). Que la intensidad media de marca sea mayor significa que existe una mayor marca de A $\beta$ <sub>42</sub> reconocida por el anticuerpo específico.

Por último, analizamos los niveles de péptido A $\beta$ <sub>42</sub> presente en los sobrenadantes de los organoides y los niveles de fosforilación de Tau [T231] en extractos proteicos de organoides utilizando los kits de ELISA antes mencionados (Figura 81).



**Figura 81. Ensayos de ELISA de niveles de péptidos A $\beta$ <sub>42</sub> y p-Tau [T231] en organoides (día 90 de diferenciación) derivados de CMPih. A.** Niveles de A $\beta$ <sub>42</sub> cuantificados en los sobrenadantes de los organoides utilizando kit de ELISA ultrasensible comercializado por la empresa Thermo Fisher Scientific **B.** Niveles de la fosforilación de tal p-Tau [T231] en lisados intracelulares de los organoides. Los valores obtenidos fueron normalizados por la cantidad de proteínas totales derivadas de cada ensayo. Todos los datos se presentan como la media + SEM de al menos 2 experimentos independientes.

A partir de los resultados presentados en la figura 81 observamos una tendencia, no significativa debido a la falta de réplicas experimentales, a una disminución en los niveles de A $\beta$ <sub>42</sub> presentes en los sobrenadantes de los organoides generados a partir de ambas líneas de CMPih portadoras de variantes asociadas a EA (*PSEN1* p.T119I y *PSEN1* p.A246E) (Figura 81A) como así un aumento en la fosforilación de Tau en Treonina 231 presente en los lisados intracelulares (Figura 81B) con respecto a los organoides generados a partir de la línea de CMPih *PSEN1* WT.

## Resultados parciales del capítulo

A lo largo de este capítulo nos enfocamos en la utilización de los modelos previamente desarrollados para estudiar la presencia o ausencia de marcadores neurodegenerativos típicos de la EA en neuronas corticales u organoides cerebrales derivados de las 3 líneas de CMPih de estudio: OUWioo2-A (*PSEN1* WT), OUWioo3-A (*PSEN1* A246E) y FFAD1 (*PSEN1* T119I). En particular, cuantificamos los niveles de A $\beta$ <sub>42</sub>,

A $\beta_{40}$  y p-Tau [T231] presentes en sobrenadantes y lisados celulares de organoides cerebrales y neuronas corticales mediante la técnica de ELISA. A su vez, observamos por inmunotinción indirecta la presencia de depósitos extracelulares de A $\beta_{42}$  en regiones de los organoides cerebrales TUJ1<sup>+</sup>.

Los resultados de nuestro estudio revelan que la variante en *PSEN1* p.T119I, en neuronas corticales en 2D, exhibió un incremento estadísticamente significativo en los niveles de p-Tau [T231] en comparación con las neuronas generadas a partir de la línea OUWioo2-A (*PSEN1* WT), según lo determinado por el ensayo de ELISA.

Con respecto a las mediciones de A $\beta_{40}$  y A $\beta_{42}$  solo pudimos encontrar un aumento estadísticamente significativo de la relación A $\beta_{42}$ / A $\beta_{40}$ , en la línea OUWioo3-A (*PSEN1* A246E). Nuestra línea de interés, FFAD1 (*PSEN1* p.T119I), también pareció presentar la misma tendencia a un aumento en la relación A $\beta_{42}$ / A $\beta_{40}$  y una disminución de A $\beta_{40}$  en lisados intracelulares como así también un aumento en A $\beta_{42}$  en los sobrenadantes celulares.

Con respecto a los resultados obtenidos por inmunotinción de A $\beta_{42}$  en organoides cerebrales, la diferenciación en 3 dimensiones de CMPih de ambas mutaciones en *PSEN1* (p.T119I y p. A246E) mostraron depósitos de placas de A $\beta$  de forma generalizada. Solamente en 3 cortes de la línea OUWioo2-A (*PSEN1* WT) se encontraron depósitos, pero de menor tamaño.

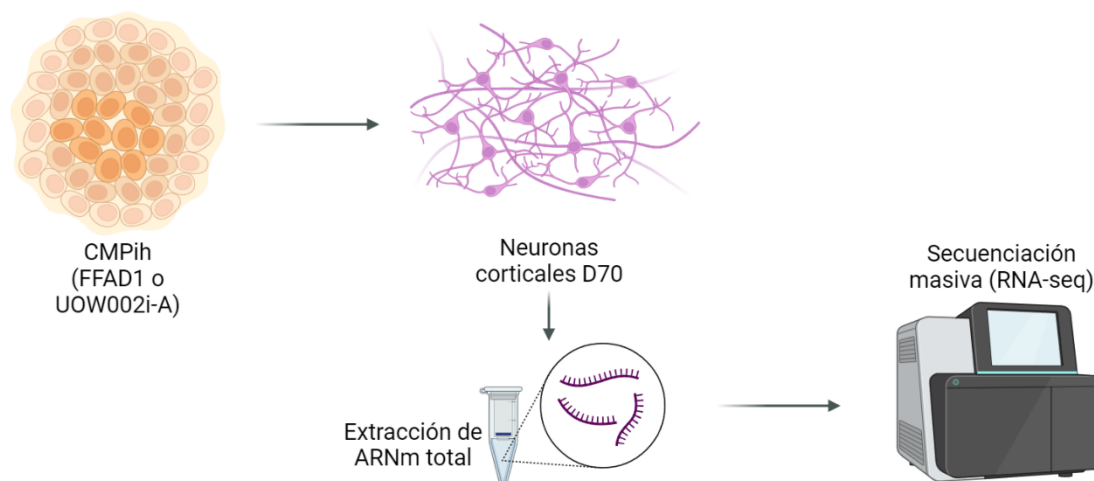
Evidenciamos, además, también por ELISA, una disminución en los niveles de péptidos de A $\beta_{42}$  en los organoides derivados de las líneas de CMPih OUWioo3-A (*PSEN1* A246E) y FFAD1 (*PSEN1* T119I) con respecto a los organoides derivados de la línea control OUWioo2-A (*PSEN1* WT), así como un aumento en la fosforilación en Tau, otro marcador clave de la enfermedad.

Estos hallazgos aportan datos adicionales importantes sobre la patogenicidad de la variante novel *PSEN1* p.T119I en la secreción de A $\beta_{42}$  y en la fosforilación de Tau en serina 231.

## Capítulo 5. Secuenciación masiva de ARNm de neuronas corticales derivadas de CMPihs portadoras de la variante *PSEN1* p.T119I (FFAD1) y *PSEN1* WT (OUWioo2-A).

En los últimos años, se han logrado importantes avances en el entendimiento de la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. El estudio de mutaciones en genes implicados en casos hereditarios ha permitido dilucidar mecanismos patológicos comunes a los casos esporádicos. En particular, mutaciones en distintos genes o incluso en distintos dominios de una misma proteína poseen efectos moleculares y celulares diferentes y la interacción con otros “loci” modulan aspectos fenotípicos de la EA<sup>37,39,40</sup>.

Para ahondar en el conocimiento de las alteraciones moleculares causadas por la variante en *PSEN1* p.T119I, realizamos secuenciación masiva de ARNm (RNA-Seq) de neuronas corticales de 70 días de maduración a partir de las CMPih OUWioo2-A (*PSEN1* WT) y FFAD1 (*PSEN1* p.T119I) (protocolo de diferenciación en 2D) (Figura 82). La secuenciación se realizó en las instalaciones de secuenciación de High Throughput Sequencing de la empresa Macrogen, Corea del Sur (<http://foreign.macrogen.co.kr>) y se enviaron 3 muestras independientes por condición.



**Figura 82. Esquema del protocolo de trabajo para la secuenciación de ARNm totales.** Se realizaron tres diferenciaciones independientes de 70 días de duración a neuronas corticales (Neuronas corticales D70) partiendo de CMPih de las líneas OUWioo2-A (*PSEN1* WT) y FFAD1 (*PSEN1* p.T119I). Se realizó una extracción del ARNm total utilizando el kit mirVana y se secuenciaron utilizando un equipo Illumina NovaSeq6000.

### 5.1 Análisis bioinformático

En la tabla 12 se resumen los parámetros más importantes de la información generada provista por la empresa Macrogen. Uno de los primeros análisis realizados es el de calidad de Phred (presentados en la tabla como *Q scores*: Q20 y Q30). Este análisis

permite estimar el posible error en los datos generados por el secuenciador al identificar una base nucleotídica incorrecta o, dicho de otra manera, representan cuan confiable es el secuenciador al asignar una base nucleotídica a cada lectura.

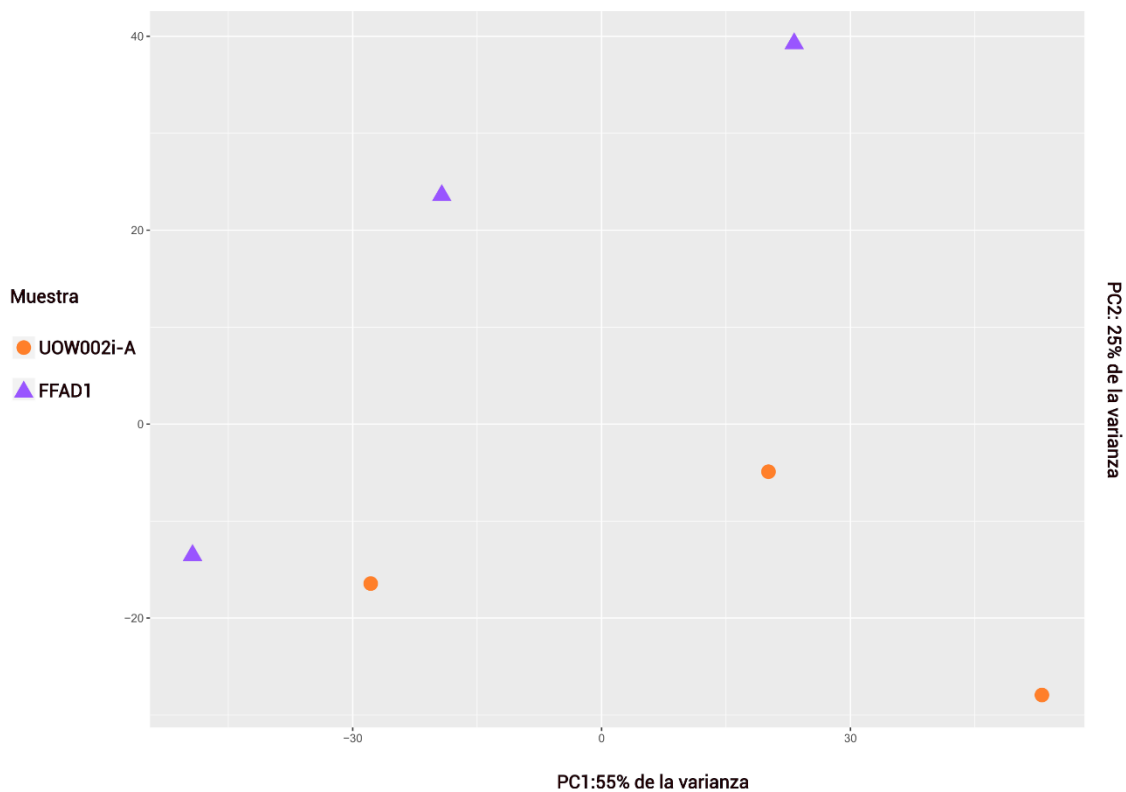
El parámetro Q20 determina una probabilidad de base identificada incorrectamente de 1 cada 100, mientras que el parámetro Q30 determina una probabilidad de identificación incorrecta de base nucleotídica de 1 en 1000. Mientras más altos sean los porcentajes tanto de Q20 como de Q30, menor será la posibilidad de que haya un error en la identificación de las bases y, por ende, disminuye la probabilidad de un falso positivo. En nuestras muestras obtuvimos un porcentaje mayor al 98,9% para el parámetro Q20 y mayor a 96,7% para Q30, lo que nos garantizó comenzar el análisis bioinformático con datos generados de buena calidad.

| MUESTRA                             | Bases totales (Gpb) | Número de reads (M) | Q20(%) | Q30(%) | Contenido GC (%) |
|-------------------------------------|---------------------|---------------------|--------|--------|------------------|
| UOWi002-A 1 (WT)                    | 8.8                 | 87.5                | 99.0   | 96.9   | 46.7             |
| UOWi002-A 2 (WT)                    | 9.0                 | 89.2                | 98.9   | 96.7   | 47.0             |
| UOWi002-A 3 (WT)                    | 8.9                 | 88.6                | 99.0   | 96.9   | 46.4             |
| FFAD1.2C4 ( <i>PSEN1</i> P.T119I) 1 | 8.7                 | 86.6                | 98.9   | 96.7   | 44.8             |
| FFAD1.2C4 ( <i>PSEN1</i> P.T119I) 2 | 8.9                 | 88.6                | 99.0   | 96.9   | 47.5             |
| FFAD1.2C4 ( <i>PSEN1</i> P.T119I) 3 | 8.8                 | 87.6                | 99.0   | 96.9   | 45.3             |

**Tabla 12. Calidad de datos de secuenciación por muestra**

A su vez, realizamos un análisis de las componentes principales (PCA, del inglés *Principal Component Analysis*) de los datos obtenidos. Este análisis nos brinda la oportunidad de identificar las componentes principales que ocasionan la variación entre distintas poblaciones o tratamientos y replicas biológicas. En la figura 82 se presenta el gráfico de PCA compuesto por dos ejes asignados en donde se graficaron las dos componentes principales que permiten observar la variación de datos entre las diferentes muestras analizadas.





**Figura 82. Análisis de componentes principales.** En el gráfico se representa como se agrupan las poblaciones de neuronas corticales derivadas de las CMPih OUWioo2-A (*PSEN1* WT) y FFAD1 (*PSEN1* p.T119I) y sus respectivas réplicas.

Al analizar la figura 82 observamos que la distribución de las muestras no parecería seguir una distribución ordenada, lo que podría deberse a que las diferencias entre ambas líneas son pequeñas. Con distribución ordenada nos referimos a que cada tratamiento y sus réplicas se encuentren agrupadas entre sí y separadas las de las del tratamiento a comparar. En nuestro caso vemos una leve separación, pero las muestras UOW002i-A y FFAD1 ubicadas en el margen inferior izquierdo parecerían estar agrupándose entre sí y no con sus respectivas muestras.

Utilizando un FDR (del inglés, *False Discovery Rate*) de 0,1 encontramos que había 99 genes diferencialmente expresados (DE) pero, considerando que se trataban de líneas celulares de sexos diferentes, extrajimos del análisis aquellos genes asociados a los cromosomas sexuales. Así logramos obtener 85 genes diferencialmente expresados (DE) entre ambas poblaciones celulares y decidimos profundizar en su estudio.

En primera instancia y ante el resultado obtenido en la figura 82, quisimos determinar el perfil de expresión de los 85 genes DE en ambas condiciones y sus réplicas biológicas y, para ello, realizamos un mapa de calor (*Heatmap*) de los mismos mediante el paquete pheatmap en el software libre RStudio (Figura 83). Este heatmap permite

agrupar los DE que presentaron una expresión similar por medio de un “hard clustering”, en donde cada valor pertenece a un clúster definido.

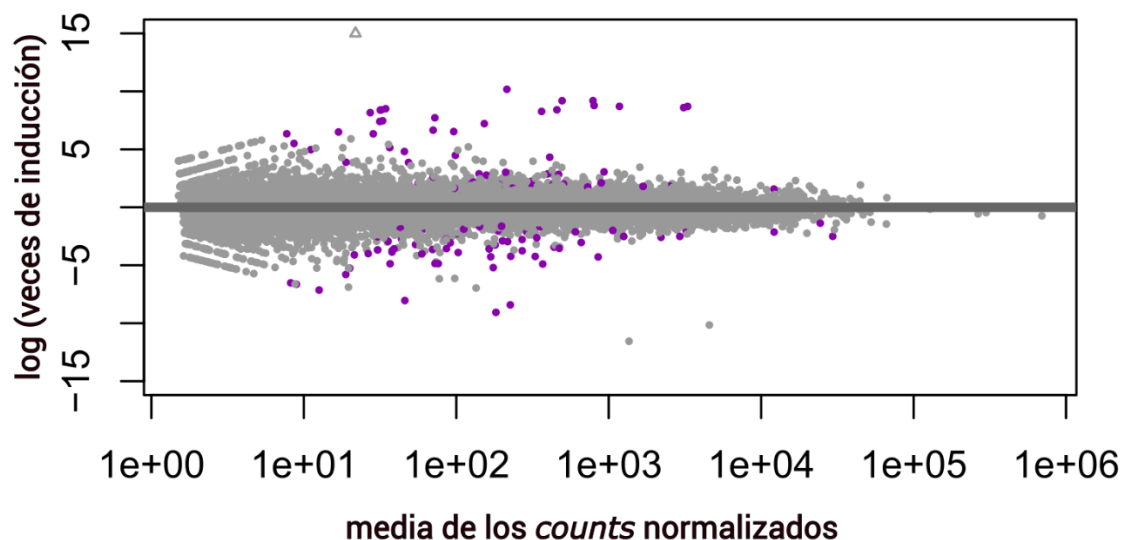
En el mismo, corroboramos que las réplicas tenían perfiles de expresión similares entre sí y que diferían de las muestras presentadas para el otro grupo de estudio.



**Figura 83. Niveles de expresión de los ARNm diferencialmente expresados en neuronas de 70 días derivadas de las CMPih UOW002i-A (*PSEN1* WT) y FFAD1 (*PSEN1* T119I).** En el *heatmap* se pueden observar los niveles de expresión de los ARNm diferencialmente expresados en ambas líneas celulares: *PSEN1* WT (indicadas como UOW002iA n1 a n3) y *PSEN1* T119I (indicadas como FFAD1 n1 a n3). En verde se expresan los niveles de expresión alto y en naranja los niveles de expresión bajo. Cada columna

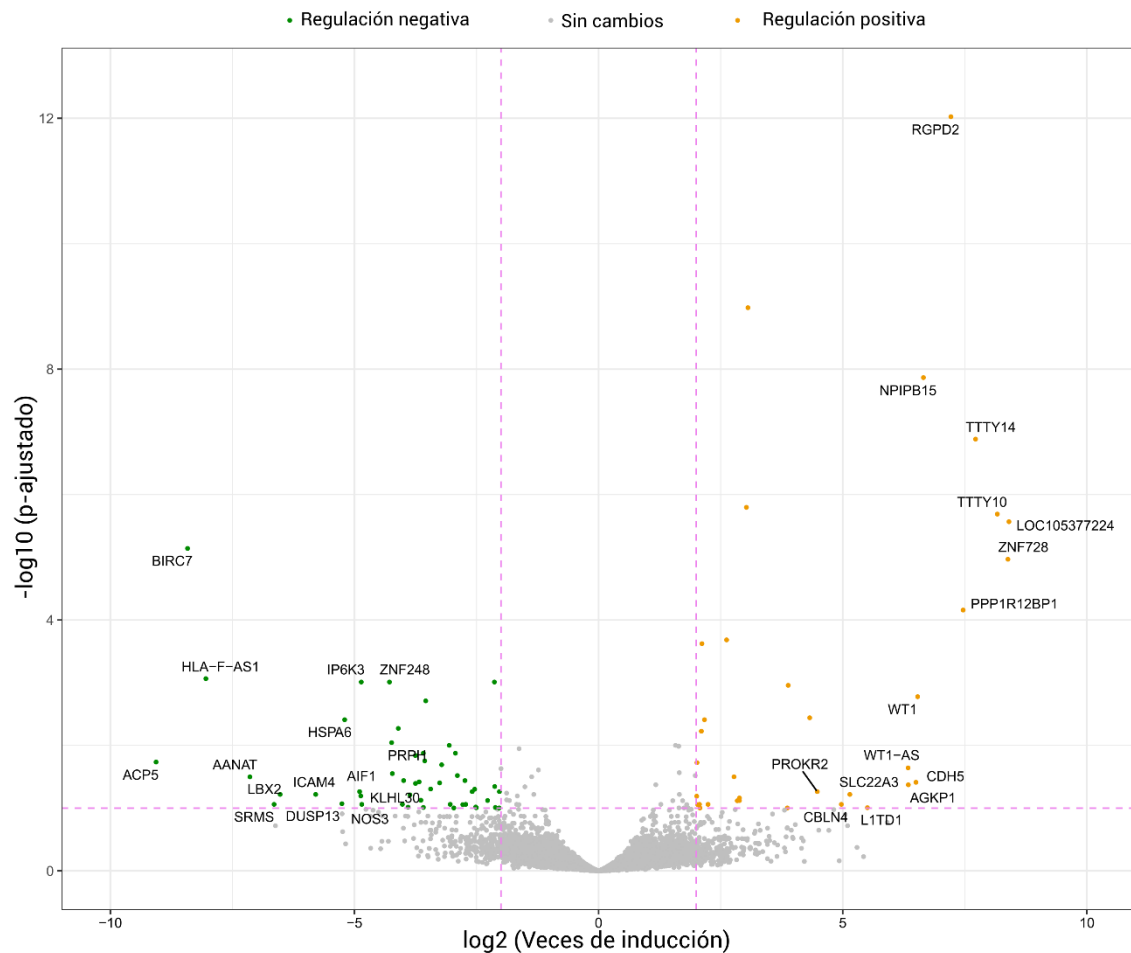
del *heatmap* corresponde a una réplica biológica de las células UOW002i-A (*PSEN1* WT) y FFAD1 (*PSEN1* T119I).

Luego, realizamos un MA-plot. El mismo es un *scatter plot* en 2D que permite visualizar la expresión génica entre grupos de datos. Aquellos valores ubicados por debajo del 0 se corresponden con genes que están regulados negativamente y aquellos que se ubiquen por sobre el mismo se corresponden con genes que están regulados positivamente. Los puntos en violeta son los valores que presentaron una variación estadísticamente significativa respecto del control con un p-valor ajustado menor a 0,1. En el gráfico observamos cómo la mayoría de los datos se concentran en torno al valor 0 del eje Y, demostrando que la gran mayoría de los ARNm no poseen una variación entre las condiciones estudiadas. Aquellos que si presentaron una variación se encuentran graficados en color violeta.



**Figura 84. MA-plot de los cambios de expresión génica en neuronas corticales derivadas de CMPih de la línea FFAD1 versus la línea UOW002i-A.** El MA-plot muestra la comparación, en el eje y, del log2 de las veces de cambio entre las neuronas corticales derivadas de la línea FFAD1 versus UOW002i-A y el promedio de los conteos normalizados por el factor tamaño en el eje x. Cada transcripto se encuentra representado por un punto. En violeta están graficados los valores que variaron significativamente respecto del control con un p-valor ajustado menor a 0,1.

Finalmente, realizamos un Volcano plot para poder observar la cantidad de genes que se encontraban DE, ya sea negativamente regulados o positivamente regulados, fijando las veces de cambio (fold change) en 2. En la figura 85 y Tabla 13 podemos observar que existen 34 genes que se encontraban regulados negativamente (verde) y 51 genes regulados positivamente (naranja).



**Figura 85. Análisis de la expresión diferencial.** En el Volcano-plot se observan los transcritos de genes expresados diferencialmente entre las neuronas corticales diferenciadas por 70 días derivadas de las CMPih OUWioo2-A (*PSEN1* WT) y FFAD1 (*PSEN1* p.T119I). En verde se observan los transcritos regulados negativamente, mientras que en naranja se encuentran graficados aquellos transcritos regulados positivamente respecto de las condiciones control. Las líneas punteadas corresponden a un  $\log_2$  fold change de 2/-2 y un  $-\log_{10}$  p-ajustado de 1/-1, que corresponde a un p-valor de 0,1. Las leyendas indican los genes que están más positiva y negativamente regulados.

| Gen       | Log2 (veces de inducción) | p-ajustado  | Regulación |
|-----------|---------------------------|-------------|------------|
| ACP5      | -9,06317762               | 0,018401456 | Negativa   |
| BIRC7     | -8,41792269               | 7,22E-06    | Negativa   |
| HLA-F-AS1 | -8,043410363              | 0,000861564 | Negativa   |
| AANAT     | -7,141326935              | 0,031730845 | Negativa   |
| SRMS      | -6,646341451              | 0,086964065 | Negativa   |
| LBX2      | -6,521764387              | 0,060381205 | Negativa   |
| ICAM4     | -5,794179783              | 0,060381205 | Negativa   |
| DUSP13    | -5,256605845              | 0,084974014 | Negativa   |
| HSPA6     | -5,200870008              | 0,003894066 | Negativa   |
| AIF1      | -4,894751334              | 0,054545309 | Negativa   |
| KLHL30    | -4,870779765              | 0,063779582 | Negativa   |
| IP6K3     | -4,860556223              | 0,000975217 | Negativa   |
| NOS3      | -4,850110137              | 0,086964065 | Negativa   |

|           |              |             |          |
|-----------|--------------|-------------|----------|
| ZNF248    | -4,283014438 | 0,000975217 | Negativa |
| PRPH      | -4,238934331 | 0,009023152 | Negativa |
| RHCE      | -4,224220256 | 0,028085359 | Negativa |
| GPR149    | -4,103035952 | 0,005347842 | Negativa |
| HTRA3     | -4,01826187  | 0,086964065 | Negativa |
| GP5       | -3,993059299 | 0,036277599 | Negativa |
| LRRC8E    | -3,902289688 | 0,096382261 | Negativa |
| SULT1C2   | -3,863192174 | 0,06144528  | Negativa |
| SNORA63D  | -3,75178311  | 0,014482278 | Negativa |
| UAP1L1    | -3,750229409 | 0,04037012  | Negativa |
| RNVU1-22  | -3,675902259 | 0,038096322 | Negativa |
| G0S2      | -3,639242349 | 0,074787534 | Negativa |
| PMEL      | -3,58974447  | 0,013310481 | Negativa |
| SDR42E2   | -3,588756474 | 0,097430555 | Negativa |
| SPP1      | -3,560247041 | 0,017634132 | Negativa |
| TUBA4A    | -3,43995984  | 0,049500581 | Negativa |
| OPRM1     | -3,255069158 | 0,039554491 | Negativa |
| PTPRH     | -3,214043994 | 0,020341574 | Negativa |
| LDHD      | -3,058641506 | 0,009979424 | Negativa |
| ALMS1-IT1 | -3,038786936 | 0,086964065 | Negativa |
| PWRN1     | -2,96488075  | 0,099358874 | Negativa |
| RNU5E-4P  | -2,932747444 | 0,013310481 | Negativa |
| GUSBP9    | -2,89193085  | 0,030209142 | Negativa |
| DERL3     | -2,780907063 | 0,087745909 | Negativa |
| HIPK1-AS1 | -2,737310444 | 0,036277599 | Negativa |
| ANKRD18B  | -2,721357302 | 0,086964065 | Negativa |
| VTRNA1-3  | -2,627466065 | 0,003295239 | Negativa |
| TMEM87B   | -2,58916865  | 0,054545309 | Negativa |
| ANKRD7    | -2,537874046 | 0,049932372 | Negativa |
| HLA-B     | -2,516445287 | 0,095855641 | Negativa |
| NEU1      | -2,511652981 | 0,097581585 | Negativa |
| FTL       | -2,504683268 | 0,09830025  | Negativa |
| LRRIQ3    | -2,273704581 | 0,075475104 | Negativa |
| ARRDC3    | -2,133896979 | 0,000975217 | Negativa |
| NCEH1     | -2,126986646 | 0,045219737 | Negativa |
| MICA      | -2,114849216 | 0,097430555 | Negativa |
| HM13      | -2,037176008 | 0,099358874 | Negativa |
| GJD2      | -2,030871857 | 0,054545309 | Negativa |
| MICA      | -2,114849216 | 0,097430555 | Negativa |
| ADAMTS15  | 2,009763968  | 0,064483614 | Positiva |
| TSPAN2    | 2,014441884  | 0,018816818 | Positiva |
| HCN1      | 2,029748623  | 0,087623057 | Positiva |
| SLC6A11   | 2,065490502  | 0,086964065 | Positiva |

|              |             |             |          |
|--------------|-------------|-------------|----------|
| YWHAH-AS1    | 2,075841496 | 0,099358874 | Positiva |
| KIAA1614     | 2,104974827 | 0,005927647 | Positiva |
| POTEF        | 2,116421931 | 0,000238469 | Positiva |
| ACVR1C       | 2,168395336 | 0,003894066 | Positiva |
| THSD1        | 2,241381199 | 0,086964065 | Positiva |
| POTEE        | 2,62103951  | 0,000207679 | Positiva |
| AVIL         | 2,773245036 | 0,031642251 | Positiva |
| PRDM8        | 2,839795128 | 0,076171014 | Positiva |
| GPD1         | 2,884001038 | 0,075605662 | Positiva |
| TRPC6        | 2,884696184 | 0,068869427 | Positiva |
| FAR2P1       | 3,027040614 | 1,60E-06    | Positiva |
| GRIN2A       | 3,058211811 | 1,05E-09    | Positiva |
| C6           | 3,865065936 | 0,099358874 | Positiva |
| CYP2D6       | 3,882770483 | 0,001099961 | Positiva |
| CRYM         | 4,32313939  | 0,003622051 | Positiva |
| PROKR2       | 4,478059032 | 0,054545309 | Positiva |
| CBLN4        | 4,971570776 | 0,086964065 | Positiva |
| SLC22A3      | 5,145574216 | 0,060381205 | Positiva |
| L1TD1        | 5,505300297 | 0,09830025  | Positiva |
| WT1-AS       | 6,338509951 | 0,022792805 | Positiva |
| AGKP1        | 6,343582387 | 0,042408192 | Positiva |
| CDH5         | 6,499059409 | 0,038702458 | Positiva |
| WT1          | 6,534031215 | 0,001669603 | Positiva |
| NPIPB15      | 6,65233861  | 1,36E-08    | Positiva |
| RGPD2        | 7,215146528 | 9,45E-13    | Positiva |
| PPP1R12BP1   | 7,465654868 | 6,94E-05    | Positiva |
| TTY14        | 7,719930398 | 1,31E-07    | Positiva |
| TTY10        | 8,166102961 | 2,05E-06    | Positiva |
| ZNF728       | 8,38347605  | 1,07E-05    | Positiva |
| LOC105377224 | 8,404008489 | 2,71E-06    | Positiva |

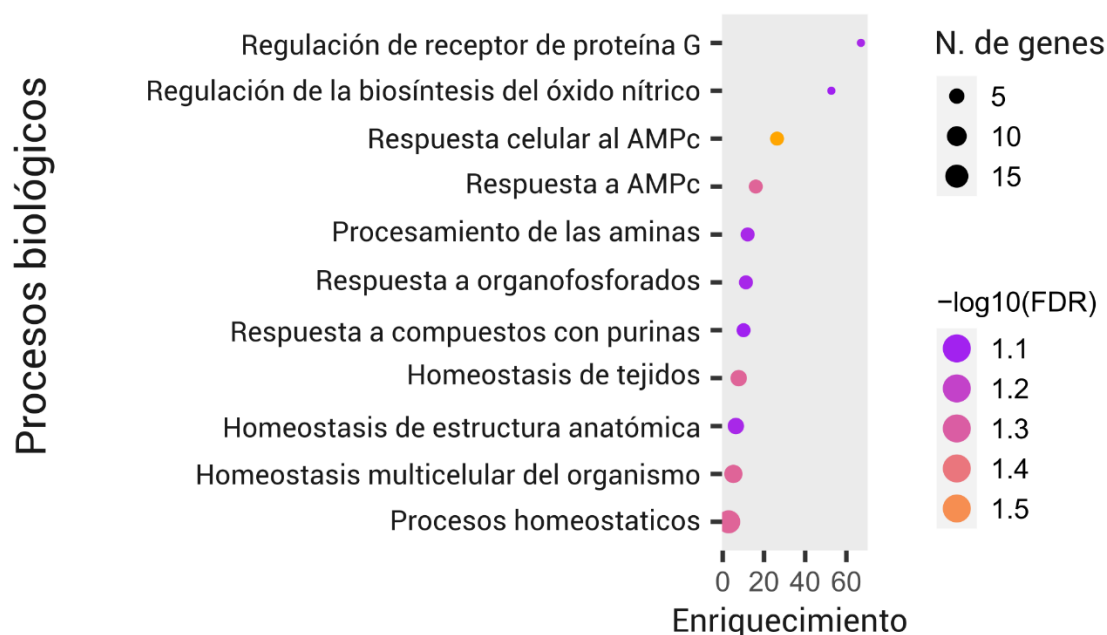
**Tabla 13. Expresión diferencial de genes en neuronas corticales (día 70) derivadas de la línea FFAD1 (*PSEN1* p.T119I)**

Posteriormente, realizamos un análisis de ontología génica de los genes DE utilizando el software on-line ShinyGO (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>) para establecer en qué procesos biológicos se encuentran enriquecidos nuestro listado de genes. Existen 3 análisis posibles a realizar: función molecular, componentes celulares y procesos biológicos.

En la figura 86, se presentan los gráficos de puntos para los 10 procesos biológicos más relevantes involucrados del listado de DE seleccionados. El tamaño del punto se correlacionó con la cantidad de genes implicados para esa vía y el color del punto varía



según el  $-\log_{10}$  del FDR (False Discovery Rate). Para este análisis seleccionamos la especie humana y elegimos nuevamente un corte de FDR menores o iguales a 0,1.

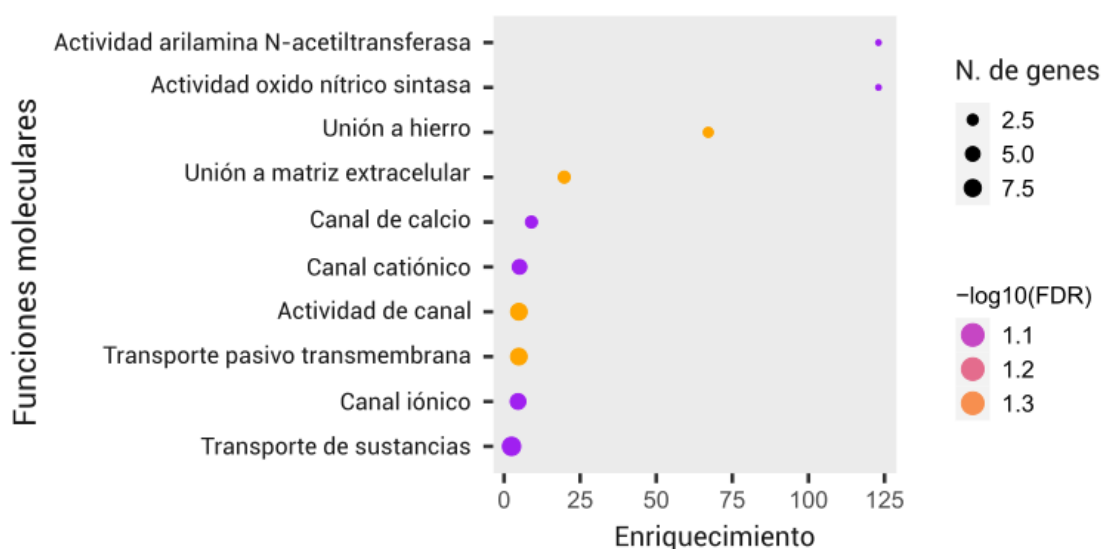


**Figura 86. Análisis de ontología génica de procesos biológicos.** Gráfico de puntos donde se muestran los términos de ontología génica para procesos biológicos. Estos procesos se relacionaron con el listado de DE obtenido para neuronas corticales derivadas de CMPih FFAD1 versus la línea UOWoo2i-A. El gráfico es en función del número de genes relacionados con cada término y los respectivos p-valores (en escala  $-\log_{10}$ ). El análisis de enriquecimiento de GO se realizó mediante el programa ShinyGO, con un FDR de 0,1.

Dentro de los procesos con la mayor cantidad de genes asociados estuvieron aquellos relacionados con la modificación de mecanismos de respuesta a segundos mensajeros o a estímulos. Estos procesos son la regulación del receptor acoplado a proteína G, regulación de la biosíntesis del óxido nítrico, respuesta al Adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y la respuesta y procesamiento de aminas, compuestos organofosforados y purinas. También, los análisis mostraron un enriquecimiento en procesos biológicos asociados a los procesos de homeostasis celular.

Nuestros resultados demostraron que la presencia de la mutación *PSEN1* T119I afecta el transcriptoma de procesos implicados en la respuesta a estímulos como así también la homeostasis celular.

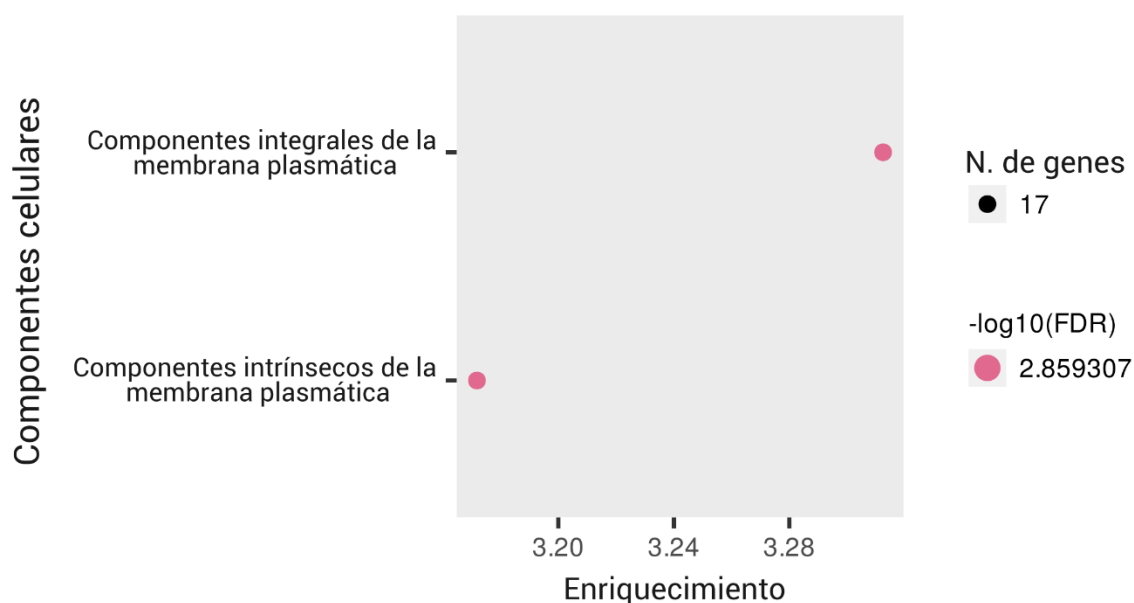
Utilizando el mismo software, decidimos analizar también qué procesos moleculares estaban viéndose modificados en las condiciones estudiadas (Figura 87). Mientras que el análisis de procesos biológicos permite analizar procesos celulares complejos, producidos por la actividad de múltiples componentes moleculares, este segundo análisis permite hilar más fino, analizando las actividades específicas que se ven enriquecidas a nivel molecular.



**Figura 87. Análisis de ontología génica de las funciones moleculares.** Gráfico de puntos donde se muestran los términos de ontología génica para las funciones moleculares. Estos procesos se relacionaron con el listado de DE obtenido para neuronas corticales derivadas de CMPih FFAD1 versus la línea UW002i-A. El gráfico es en función del número de genes relacionados con cada término y los respectivos p-valores (en escala  $-\log_{10}$ ). El análisis de enriquecimiento de GO se realizó mediante el programa ShinyGO, con un FDR de 0,1.

Al realizar este nuevo análisis, se puede observar en profundidad que procesos homeostáticos, como la generación de NADP+ y óxido nítrico por la enzima óxido nítrico sintasa o la producción de CoA + una N-acetilarilamina, se vieron modificados. As su vez, se observó un enriquecimiento en genes asociados al metabolismo del hierro como así también de unión a matriz extracelular. Por último, la presencia de la mutación *PSEN1* T119I pareció afectar también las funciones asociadas al transporte de sustancias a través de membrana, incluyendo cationes como el  $\text{Ca}^{2+}$ .

Finalmente, decidimos realizar el análisis de ontología génica de componentes celulares, el cual nos indica la localización subcelular en los que ocurrieron los procesos celulares enriquecidos. Como puede observarse en la figura 88, dicha ubicación fue la membrana plasmática de las neuronas a día 70.

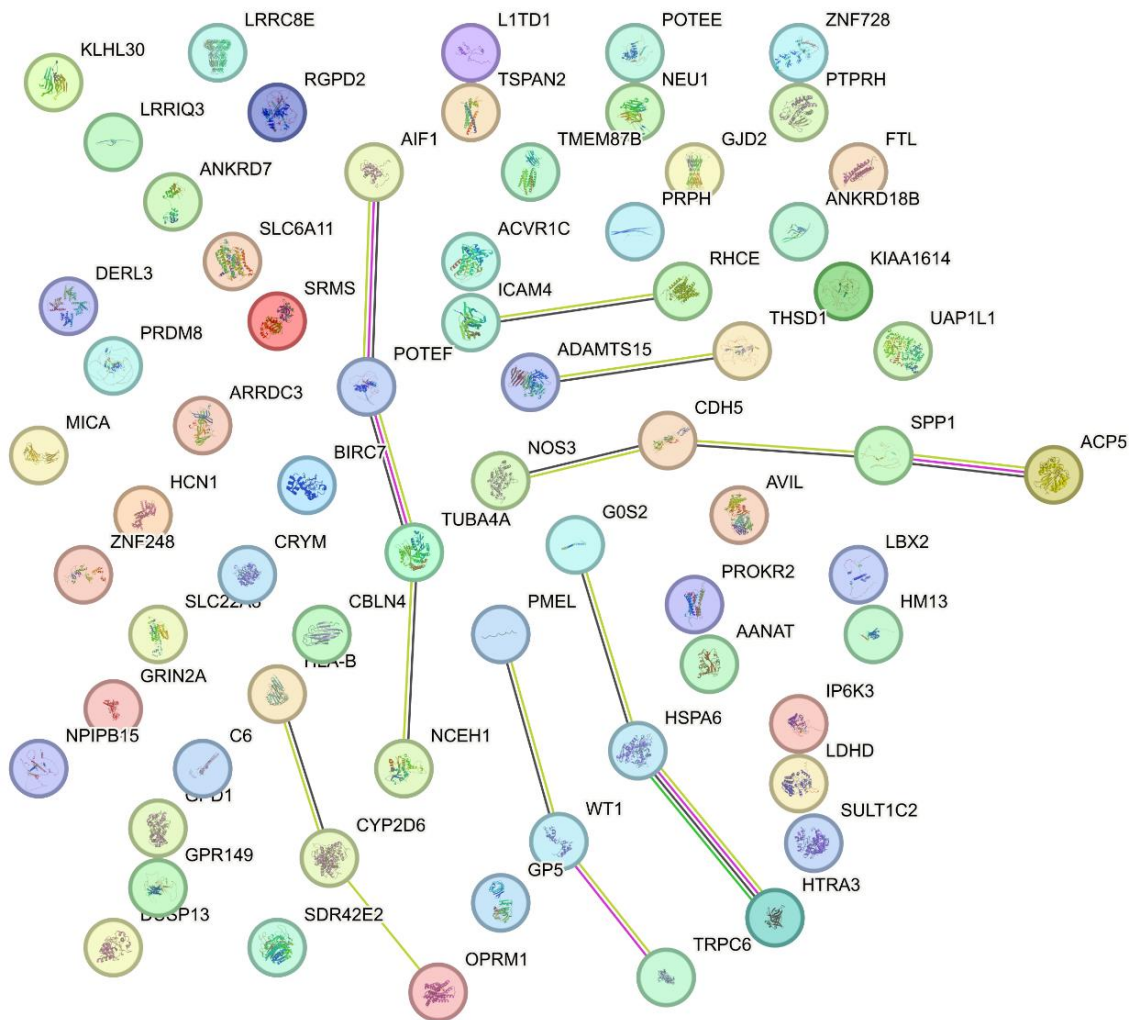


**Figura 88 Análisis de ontología génica de los componentes celulares.** Gráfico de puntos donde se muestran los términos de ontología génica para los componentes celulares. Estos procesos se relacionaron con el listado de DE obtenido para neuronas corticales derivadas de CMPih FFAD1 versus la línea UOWoo2i-A. El gráfico es en función del número de genes relacionados con cada término y los respectivos p-valores (en escala  $-\log_{10}$ ). El análisis de enriquecimiento de GO se realizó mediante el programa ShinyGO, con un FDR de 0,1.

## 5.2 Validación de los resultados obtenidos

Por último, quisimos estudiar si, y de qué manera, las proteínas codificadas por los genes DE interactúan entre sí. Para ello utilizamos la base de datos STRING en su versión 12.0 (<https://string-db.org/>), que contiene información de interacciones proteína-proteína conocidas como así también predichas. Las relaciones se construyen en base a asociaciones físicas, funcionales, predicciones computacionales y otras bases de datos primarias. String se desarrolló gracias a un consorcio establecido entre el *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL), el *Swiss Institute of Bioinformatics* (SIB) y el *Novo Nordisk Foundation Center for Protein Research* (CPR) y las interacciones presentadas surgen de bases de datos pre-existentes, *textmining* de trabajos experimentales, experimentos de co-expresión y de secuenciación en profundidad (*High-throughput*) y predicciones de contexto genómico. En la figura 86 se presentan los resultados obtenidos.

Para realizar una selección de genes candidatos para profundizar nuestro estudio, colocamos el listado de genes DE en la base de datos STRING y analizamos minuciosamente sus funciones y la interrelación de estos genes hasta el momento en publicaciones y experimentos. Observamos atentamente aquellos nodos que permanecen aislados por falta de relación entre las proteínas en bases de datos y bibliografía.



**Figura 89. Relación de los DE en base de datos de STRING.** Las uniones entre nodos indican proteínas relacionadas entre sí en bases de datos. En línea rosa, proteínas relacionadas por trabajos experimentales; en línea celeste, proteínas relacionadas según bases de datos curadas; en línea verde, proteínas cuyos genes son vecinos; en línea azul, las proteínas con genes en co-ocurrencia; en línea violeta, las proteínas que son homólogas; en negro, proteínas co-expresadas y en amarillo, proteínas que han sido mencionadas en una misma fuente de información. Aquellos nodos de proteínas sin conectar no tienen relación en ninguno de los apartados descriptos previamente hasta el momento.

Nuestro criterio de selección se basó en un primer lugar en aquellos genes que tuvieran alguna relación con los procesos biológicos y las funciones moleculares descriptas previamente. En segundo lugar, elegimos los genes según los niveles de expresión del transcripto, es decir, la cantidad de lecturas (*reads*) detectadas por el secuenciador. La secuenciación masiva de ARNm es una técnica muy sensible que permite detectar niveles de expresión muy bajos, en ocasiones difíciles de cuantificar mediante RT-qPCR. Los genes seleccionados se encuentran listados en la tabla 12.

## Genes candidatos

### **NOS3 (Nitric Oxide Synthase 3) *Ensembl: ENSG00000164867***

La óxido nítrico sintasa 3 sintetiza óxido nítrico, este es un radical libre reactivo que actúa como mediador biológico en varios procesos, incluyendo la neurotransmisión y actividades antimicrobianas y antitumorales.

### **TUBA4A (Tubulin Alpha 4A) *Ensembl: ENSG00000127824***

Esta proteína pertenece a la super-familia de las tubulinas (conformada por las familias alfa, beta y gamma), específicamente a la familia de las tubulinas alfa. Las tubulinas alfa y beta representan los principales componentes de los microtúbulos, mientras que la tubulina gamma desempeña un papel crítico en la nucleación de la formación de los microtúbulos. Esta proteína ha sido asociada al desarrollo de esclerosis lateral amiotrófica

### **ACP5 (Acid phosphatase 5) *Ensembl: ENSG00000102575***

Este gen codifica una glicoproteína que contiene hierro y cataliza la conversión de monoésteres ortofosfóricos a alcohol y ortofosfato. Es la forma más básica de las fosfatasas ácidas y es la única forma que no es inhibida por L(+)-tartrato.

### **TMEM87B (Transmembrane protein 87B) *Ensembl: ENSG00000153214***

Este gen codifica una proteína que puede interactuar con el oncogén E6 del virus del papiloma humano tipo 18. También es probable que la proteína esté involucrada en el transporte retrogrado desde el endosoma al trans-Golgi. El gen se expresa en tejidos adultos y fetales, incluyendo el cerebro y el corazón.

### **GPD1 (Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase 1)**

#### ***Ensembl: ENSG00000167588***

Este gen codifica un miembro de la familia de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD. La proteína codificada desempeña un papel crítico en el metabolismo de carbohidratos y lípidos al catalizar la conversión reversible de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y dinucleótido de adenina de nicotinamida reducido (NADH) a glicerol-3-fosfato (G3P) y NAD<sup>+</sup>. La proteína citosólica codificada y la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial también forman un transbordador de fosfato de glicerol que facilita la transferencia de equivalentes reductores del citosol a las mitocondrias.

### **PROKR2 (Prokineticin Receptor 2) *Ensembl: ENSG00000101292***

La proteína codificada por este gen es una proteína de membrana integral y un receptor acoplado a proteína G para las prokineticinas que ha sido asociado a procesos de angiogénesis.

### **GRIN2A (Glutamate Ionotropic Receptor NMDA Type Subunit 2A)**

#### ***Ensembl: ENSG00000183454***

Este gen codifica un miembro de la familia de proteínas de canales iónicos activados por glutamato. La proteína codificada es una subunidad del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA). Los receptores NMDA son tanto ligando-gatillados como dependientes del voltaje, y están involucrados en la potenciación a largo plazo, un aumento dependiente de la actividad en la eficiencia de la transmisión sináptica que se cree subyace en ciertos tipos de memoria y aprendizaje. Estos receptores son permeables a los iones de calcio, y la activación resulta en un flujo de calcio hacia las células postsinápticas, lo que provoca la activación de varias cascadas de señalización. La interrupción de este gen se asocia con epilepsia focal y trastorno del habla con o sin discapacidad cognitiva. El empalme alternativo da lugar a múltiples variantes de transcripción.

### **ICAM4 (Intercellular Adhesion Molecule 4 (Landsteiner-Wiener Blood Group) *Ensembl: ENSG00000105371***

Este gen codifica el antígeno o antígenos del grupo sanguíneo Landsteiner-Wiener (LW), que pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas (Ig) y comparte similitud con la familia de proteínas de moléculas de adhesión intercelular (ICAM). Esta proteína ICAM contiene 2 dominios tipo C2 similares a Ig y se une a la proteína de adhesión leucocitaria LFA-1.

---

**ADAMTS15 (A Disintegrin And Metalloproteinase With Thrombospondin Motifs 15) Ensembl: ENSG00000166106**

Este gen codifica un miembro de la familia de proteínas ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs). Los miembros de la familia ADAMTS comparten varios módulos proteicos distintos, incluyendo una región de propeptido, un dominio metaloproteasa, un dominio similar a disintegrina y un motivo de tipo 1 de trombospondina (TS). La preproteína codificada es procesada proteolíticamente para generar la enzima madura, que puede desempeñar un papel en el procesamiento de las matrices celulares de versicano durante el desarrollo del músculo esquelético. Este gen puede funcionar como un supresor tumoral en cánceres de colon y mama.

---

**HSPA6 (Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 6) Ensembl: ENSG00000173110**

Este gen codifica para una chaperona molecular implicada en una amplia variedad de procesos celulares, incluida la protección del proteoma contra el estrés, el plegamiento y transporte de polipéptidos recién sintetizados, la activación de la proteólisis de proteínas mal plegadas y la formación y disociación de complejos proteicos. Juega un papel fundamental en el sistema de control de calidad de las proteínas, garantizando el plegamiento correcto de las proteínas, el replegamiento de proteínas mal plegadas y controlando la orientación de las proteínas para su posterior degradación.

---

**RGPD2 (RANBP2 Like And GRIP Domain Containing 2) Ensembl: ENSG00000185304**

Este gen codifica para una proteína que está predicho que contribuye a la actividad de activador de GTPasa, involucrada en la importación de proteínas portadoras de NLS al núcleo, que forma parte del poro nuclear y que está activa en el citoplasma.

---

**THSD1 (Thrombospondin Type 1 Domain Containing 1) Ensembl: ENSG00000136114**

La proteína codificada por este gen contiene un dominio tipo 1 de trombospondina, que se encuentra en varias proteínas involucradas en la vía del complemento, así como en proteínas de la matriz extracelular. Entre sus vías relacionadas se encuentran la O-glicosilación de mucinas y el metabolismo de proteínas.

---

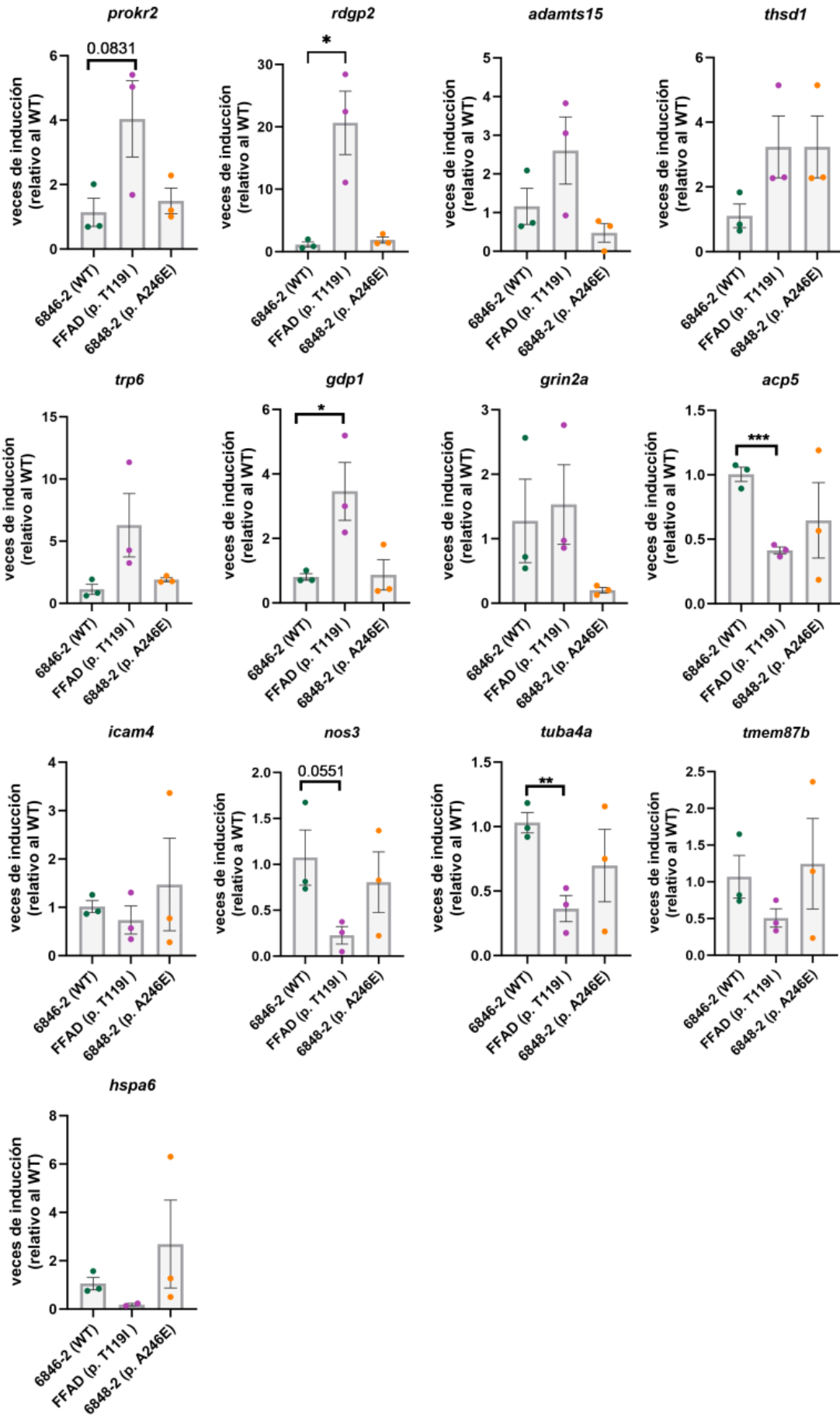
**TRPC6 (Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily C Member 6) Ensembl: ENSG00000137672**

La proteína codificada por este gen forma un canal de calcio activado por receptor en la membrana celular. El canal es activado por diacilglicerol y se piensa que está bajo el control de un sistema de mensajeros secundarios de fosfatidilinositol. La activación de este canal ocurre de forma independiente de la proteína quinasa C y no es desencadenada por niveles bajos de calcio intracelular.

---

**Tabla 12. Genes elegidos como candidatos para la validación del patrón obtenido por RNAseq.** Las descripciones se corresponden con las entradas otorgadas por la base de datos GeneCard del Instituto de Ciencias Weizmann (<https://www.genecards.org/>).

Una vez seleccionados los 13 genes candidatos para realizar la validación por RT-qPCR se diseñaron y seleccionaron primers específicos para los transcritos escogidos (ver materiales y métodos) y se realizaron RT-qPCR a partir de ARN total purificado de diferenciaciones independientes a las que se enviaron a secuenciar. Además, decidimos incluir al análisis muestras de ARN de neuronas corticales diferenciadas a día 70 de la línea UOW003i-A (*PSEN1* A246E) para evaluar si el patrón de expresión génica era similar entre ambas líneas celulares (Figura 90).





**Figura 90. Validación de resultados del RNA-seq mediante RT-qPCR.** Análisis por RT-qPCR de los niveles de expresión de ARNm de genes seleccionados del listado de genes DE. En verde neuronas corticales (día 70) derivadas de la línea UOW002i-A (*PSEN1* WT), en violeta neuronas corticales derivadas de la línea FFAD1 (*PSEN1* T119I) y en naranja neuronas corticales derivadas de la línea UOW003i-A (*PSEN1* A246E). Se utilizó la expresión de *RPL7* para normalizar los datos. Los gráficos muestran las veces de inducción relativizadas a los valores de la línea UOW002i-A (*PSEN1* WT). Se muestran el promedio  $\pm$  error estándar de tres experimentos independientes. Se realizó la prueba estadística de t de Student pareada de dos colas y los valores se consideraron significativamente diferentes cuando (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$  y (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

Como puede observarse en la figura 87, las regulaciones positivas y negativas de los niveles de expresión de los transcritos observadas en el análisis *in silico* (RNA-Seq) pudo ser verificada a través de la técnica de RT-qPCR a partir de ARNm aislados de neuronas corticales a día 70 de las líneas FFAD1 (*PSEN1* T119I) y UOW002i-A (*PSEN1* WT). En la figura 90 se muestran cambios significativos en los niveles de expresión de los ARNm de *PROKR2*, *RGDP2*, *ADAMTS15*, *THSD1*, *TRPC6*, *GPD1* Y *GRIN2A* (aumento) y de *ACP5*, *ICAM4*, *NOS3*, *TUBA4A*, *TMEM87B* y *HSPA6* (disminución) en neuronas corticales derivadas de la línea FFAD1 al compararlas con UOW002i-A. Si bien no resultan estadísticamente significativos, los genes *NOS3*, *ICAM4*, *HSPA6* y *TMEM87B* (disminución) y *PROKR2*, *GRIN2A*, *TRP6*, *THSD1* y *ADAMTS15* (aumento) poseen la misma tendencia observada en el análisis *in silico*. Llamativamente, si bien algunas de las tendencias al aumento o la disminución resultan similares entre las líneas FFAD1 (*PSEN1* T119I) y UOW003i-A (*PSEN1* A246E), existen algunas que no siguen ese mismo patrón (en particular, *GRIN2A*, *ICAM4*, *HSPA6*, *TMEM87B* y *ADAMTS15*).

## Resultados parciales del capítulo

En este capítulo nos propusimos identificar los ARNm diferencialmente expresados en neuronas corticales derivadas de la línea de CMPih FFAD1 (*PSEN1* T119I) con respecto a los de neuronas corticales diferenciadas de una línea *PSEN1* WT (UOW002i.A). Para ello decidimos realizar un experimento de secuenciación masiva para analizar el transcriptoma de las neuronas corticales diferenciadas por 70 días utilizando el protocolo de doble inhibición de SMAD y las líneas de CMPih FFAD1 (*PSEN1* T119I) y UOW002i-A (*PSEN1* WT).

En base a los resultados del análisis determinamos que el perfil de expresión diferencial de ambas poblaciones no era muy marcado y logramos obtener 85 genes DE, de los cuales 34 genes que se encontraron regulados negativamente y 51 genes regulados positivamente.

Luego, realizamos un análisis de ontología génica de dichos genes para estudiar los procesos que podrían estar modificados en ambas condiciones. A nivel de procesos biológicos, observamos un enriquecimiento marcado de genes DE asociados al equilibrio

homeostático de las células. Al hacer un análisis un poco más profundo, mirando los sitios de localización subcelular vimos un enriquecimiento en genes ubicados en la membrana plasmática de la célula. A su vez, al analizar las funciones moleculares, observamos un enriquecimiento en genes asociados al transporte de sustancias y la homeostasis del hierro.

Posteriormente, realizamos una selección de 13 genes con los cuales validar el experimento *in silico* y pudimos verificar las regulaciones positivas y negativas de los niveles de expresión de los transcritos observadas en el análisis por RNA-Seq mediante RT-qPCR. En particular se observó una disminución en los niveles de expresión de los ARNm de *ACP5*, *ICAM4*, *NOS3*, *TUBA4A*, *TMEM87B* y *HSPA6* y un aumento en la expresión de *PROKR2*, *RGDP2*, *ADAMTS15*, *THSD1*, *TRP6*, *GPD1* Y *GRIN2A*.

Al agregar al análisis por RT-qPCR los transcritos de la línea UOW003i-A (*PSEN1* A246E), vimos que algunos genes seguían el patrón observado con la línea FFAD1, pero otros no (*GRIN2A*, *ICAM4*, *HSPA6*, *TMEM87B* y *ADAMTS15*). Estas similitudes y diferencias serán discutidas en el siguiente apartado en profundidad.



# DISCUSIÓN

Desde el 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reconocido a las demencias dentro de las grandes prioridades de la salud pública y, según censos del 2019 se encuentra séptima entre las causas de muerte a nivel mundial. En particular, reconoce a la EA como la causante del 60-70% de los casos de demencia y se considera que, globalmente, hoy en día 55,2 millones de personas viven con demencia, aunque estos datos solamente comprenden los 62 países involucrados con el estudio de la OMS (<https://www.who.int/data/gho/data/themes/global-dementia-observatory-gdo>. Última fecha de acceso: 30/03/2024). Considerando estos datos, se puede estimar que más de 30 millones de personas se encuentran viviendo hoy en día con EA.

La EA es una condición que puede presentarse de forma esporádica (en la cual existen múltiples factores ambientales y de riesgo genético) y de forma hereditaria (causadas por variantes patogénicas en genes asociados al metabolismo de la proteína precursora del amiloide). La hipótesis de la cascada amiloide ha servido como uno de los marcos conceptuales para el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas contra el depósito de beta-amiloide y de Tau.

Si bien la gran mayoría de los estudios preclínicos para estas drogas se han realizado en modelos animales y celulares genéricos, la posibilidad de contar con células derivadas de pacientes ha abierto una nueva posibilidad en el campo.

Como se mencionó anteriormente, se sabe que en el 3-5% de los casos de EA, la causa es clara y conocida: la presencia de mutaciones en genes específicos como *PSEN1* (MIM: 104311), *PSEN2* (MIM: 600759) y *APP* (MIM: 104760) y un patrón de herencia autosómica dominante del fenotipo (aunque se han reportados algunos casos con herencia recesiva<sup>285</sup>), motivo por el cual se la conoce como EAF o de presentación familiar. Si bien el desarrollo de la patología no es idéntico al de la EAE, los síntomas son similares y se presentan tempranamente.

En ese sentido, las células madre pluripotentes inducidas (CMPIh) derivadas de pacientes han surgido como un sistema novedoso para estudiar los mecanismos moleculares subyacentes a las enfermedades neurodegenerativas, dada su gran versatilidad de diferenciación a distintos linajes celulares relevantes como neuronas corticales y microglía.

El DIAN (por sus siglas en inglés, *Dominantly Inherited Alzheimer Network*, <https://dian.wustl.edu/>) es un consorcio internacional que tiene como objetivos principales el estudio clínico y neuropsicológico de familias con EA de herencia autosómica dominante, la caracterización de variantes patogénicas en genes causales de

EA, el estudio de biomarcadores imagenológicos y bioquímicos de EA y el desarrollo de ensayos clínicos con distintas drogas. Además, han generado un banco de células de pacientes portadores de variantes causales de EA para el estudio de mecanismos patogénicos y como modelos preclínicos de ensayo de potenciales drogas terapéuticas. Según un informe del 2018, en ese momento contaban con un total de 98 líneas de fibroblastos que correspondían con 51 líneas portadoras de mutaciones en *APP*, *PSEN1* o *PSEN2* y 47 líneas de fibroblastos no portadores, pertenecientes a miembros de 42 familias que padecen EAf. Sin embargo, solo 6 de esas líneas de fibroblastos (2 para *APP*, 3 para *PSEN1* y 1 para *PSEN2*) fueron efectivamente reprogramadas a CMPih hasta el momento de la publicación. Al revisar otros repositorios celulares, como Coriell encontramos que si bien este contiene 193 líneas de fibroblastos asociadas a EA (incluyendo personas afectadas como no afectadas por la patología), solo poseen 13 líneas de CMPih derivadas de pacientes (<https://www.coriell.org/Search?Grid=o&q=ALZHEIMER>). Última fecha de acceso 30/03/2024).

En 2019, el Laboratorio de Enfermedades Neurodegenerativas (LEN) del departamento de Neuropatología y Biología Molecular, en conjunto con otros departamentos de la fundación Fleni, describieron una variante en heterocigosis (transición C>T) en la posición c.356 del gen de *PSEN1* (NM\_000021.4), que codifica para una sustitución de treonina por isoleucina en el codón 119 de la proteína (p.T119I), ubicado en el primer *loop* extracelular, en una familia argentina de ascendencia italiana<sup>220</sup>. Hasta ese momento, dicha mutación no se encontraba reportada en Alzhforum aunque un poster presentado en el congreso de la *Alzheimer's Association International Conference* la había mencionado en 2016 y en 2020 el mismo grupo la publicó, en conjunto con estudios clínicos y de imágenes en 2 pacientes coreanos. Ese mismo año, otro grupo reportó la aparición de la misma variante en una familia china<sup>286,287</sup>.

En el caso argentino, reportado en Itzcovich et al, la edad de inicio en la cohorte varió entre 49 años y 71, con una edad media de inicio de los síntomas de 56 años. Por su parte, en la cohorte china se observó un inicio tardío de la sintomatología, entre los 60 y 70 años. Por último, los casos presentados en pacientes coreanos presentaron un inicio por debajo de los 60 años. Al día de la fecha, la variante se encuentra clasificada como patogénica de acuerdo con los lineamientos del *American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)* y la *Association for Molecular Pathology (AMP)* los cuales establecen una guía para la anotación e interpretación de variantes de secuencia. De acuerdo con esta guía, se siguieron los siguientes criterios para clasificarla como patogénica:

- **PS4-M:** La prevalencia de la variante en individuos afectados está significativamente aumentada en comparación con la prevalencia en controles. T119I: La variante fue reportada en 3 o más pacientes no relacionados, con el mismo fenotipo, y está ausente en controles.
- **PM1-S:** Ubicado en un punto caliente de mutación (*Hot spot*) y/o en un dominio funcional crítico y bien establecido (por ejemplo, sitio activo de una enzima) sin variación benigna. T119I: La variante se encuentra en un punto caliente de mutación y los datos de criomicroscopía electrónica sugieren que el residuo es de importancia funcional.
- **PM2-M:** Ausente en controles (o en una frecuencia extremadamente baja si es recesiva) en el Proyecto de Secuenciación del Exoma, Proyecto 1000 Genomas o Consorcio de Agregación del Exoma. \*Alzforum utiliza la base de datos de variantes gnomAD.

Como puede observarse, dicha categorización se refiere al análisis de datos poblacionales, pero hasta el momento no se habían realizado ensayos funcionales que apoyen o refuten dicha clasificación. A su vez, tampoco se habían presentado modelos animales ni humanos que modelicen dicha variante.

Dada la poca disponibilidad de líneas CMPih derivadas de pacientes con EAf y que aún se desconocen los mecanismos moleculares por los cuales la mutación en *PSEN1* p.T119I estaría participando en el desencadenamiento de la EAf en los pacientes, el objetivo principal de la presente tesis fue realizar estudios funcionales *in vitro* de los efectos de la variante *PSEN1* p.T119I utilizando ensayos de sobreexpresión de plásmidos en células HEK293T y reprogramando y posteriormente diferenciando a células neuronales CMPih a partir de fibroblastos de un paciente masculino portador de la mutación p.T119I en heterocigosis. A su vez, nos propusimos encontrar genes modulados en EA mediante la utilización de líneas de CMPih derivadas de pacientes portadores de mutaciones patogénicas y líneas control de parientes no afectados.

Como ya se mencionó en la introducción, *PSEN1* es una proteína compleja, compuesta por 9 pasos transmembrana y 2 *loops* tanto intra como extracelulares (Figura 91A) que forman el *core* catalítico del complejo  $\gamma$ -secretasa en membrana plasmática. Gracias a su capacidad de procesar múltiples sustratos resulta crítica en la señalización de Notch, el balance de calcio mediado por beta-cateninas y la supervivencia celular, entre otros procesos celulares<sup>48</sup>.

Lo que es extremadamente interesante de esta proteína y sus variantes asociadas a la EA es que no todas las mutaciones resultan en un único fenotipo en los pacientes y que también, ciertas mutaciones presentan fenotipos diversos. Por ejemplo, la mutación *PSEN1* p.M146V, identificada en varias familias a nivel mundial presentó inicialmente

casos de EAf, pero luego fue asociada en otros pacientes, a un fenotipo de demencia frontotemporal e incluso, alteraciones del movimiento (<https://www.alzforum.org/mutations/psen1-m146v>. Ultima fecha de revisión: 31/03/2024).

Siguiendo en esta línea, estudios recientes resaltaron la particularidad de que, si bien las mutaciones en *PSEN1* asociadas a EAf son mutaciones de alta penetrancia, se ha observado variabilidad en la tasa de deterioro cognitivo y la presencia de biomarcadores entre individuos. En un estudio observacional, investigadores de diversos institutos a nivel mundial clasificaron pacientes y voluntarios de acuerdo con si presentaban mutaciones en algún sitio transmembrana de la proteína, en el 2do *loop* (citoplasmático) o si no portaban mutaciones asociadas a EA. En dicho estudio, evaluaron análisis clínicos y cognitivos, imágenes (resonancia magnética y PET scan de A $\beta$ ) y biomarcadores presentes en líquido cefalorraquídeo con el objetivo de determinar similitudes y diferencias entre los distintos grupos de estudio. Si bien encontraron similitudes en los grupos de mutaciones ubicadas en sitios transmembrana y el *loop* citoplasmático en cuanto a los niveles elevados de A $\beta$ , lograron distinguirlos entre sí ya que los pacientes que presentaban mutaciones en las regiones transmembrana de la proteína *PSEN1* presentaban un deterioro cognitivo mayor, una disminución del volumen hipocampal y niveles elevados de Tau fosforilado<sup>288</sup>. Sin embargo, en ese trabajo no se estudiaron mutaciones asociadas al 1er *loop* (luminal) donde se encuentra ubicada nuestra variante de interés (Figura 91B), el cual, dado que se trata de una zona rica en mutaciones clasificadas como patogénicas, resulta clave para el correcto funcionamiento del complejo  $\gamma$ -secretasa.

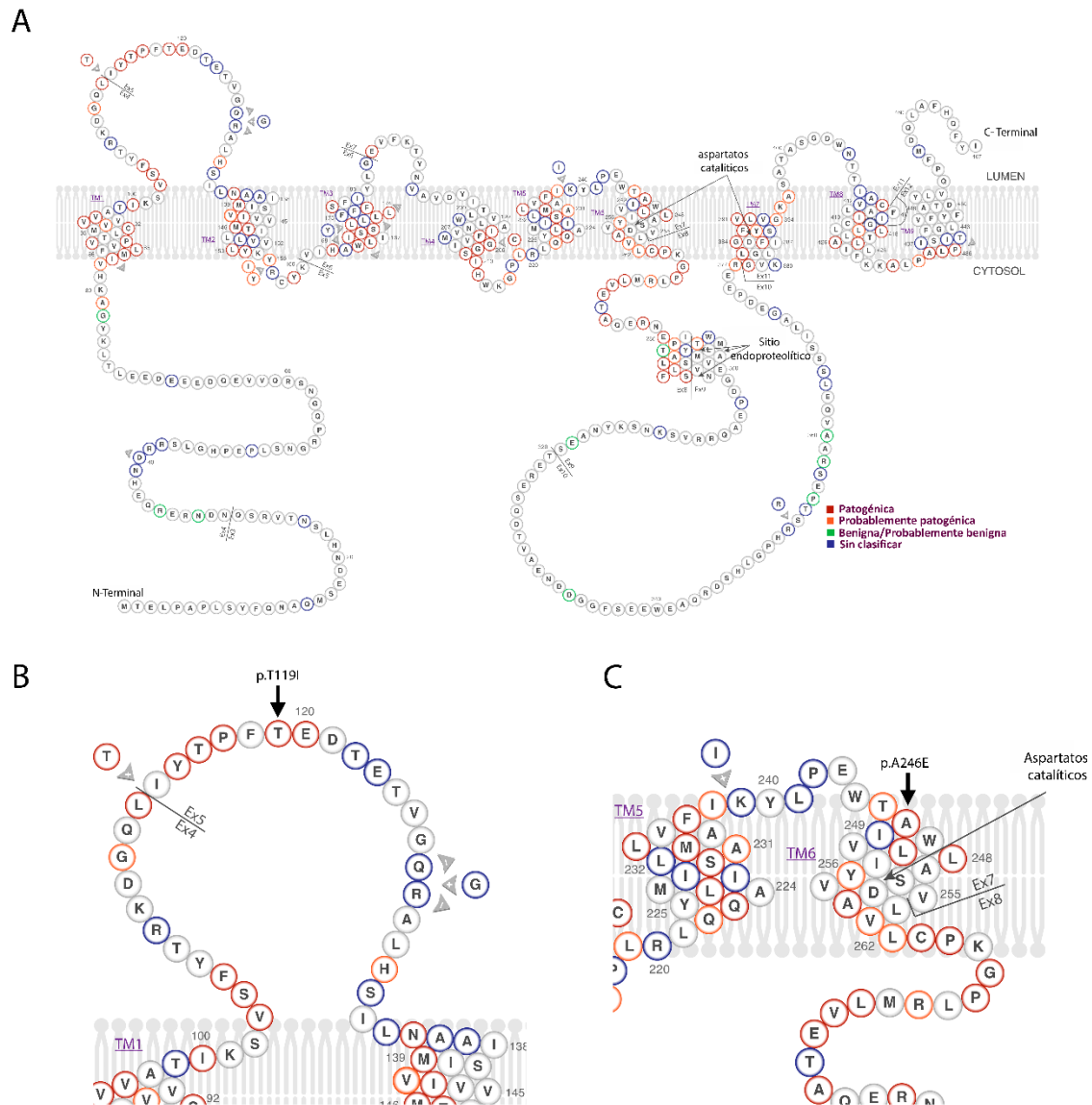
Un trabajo de 2021 estableció que el primer *loop* hidrofílico, ubicado en la región luminal de *PSEN1* es necesario para la procesividad del complejo  $\gamma$ -secretasa (es decir, el procesamiento selectivo y correcto de los sustratos) como así también su regulación por proteínas moduladoras (GSMPs, para más detalle, volver a Introducción. *PSEN1*, complejo gamma secretasa y enfermedad de Alzheimer)<sup>289</sup>. Interesantemente, el mismo trabajo reportó que modificaciones en los sitios de clivado del complejo  $\gamma$ -secretasa que modulan los cambios en las relaciones presentadas entre los péptidos amiloides difieren entre las diversas mutaciones en *PSEN1* estudiadas, sumando aún más a este concepto de diversidad fenotípica a causa de la ubicación y característica de la variante.

Una vez más, por la novedad de la variante en *PSEN1* p.T119I, la misma no se encontró dentro de las variantes estudiadas, pero sí un codón adyacente a ella que presentaba 3 variantes posibles (E120D, E120K y E120G) y otro a 2 aminoácidos de distancia (117L, 117R y 117S). En ambos casos, la relación A $\beta_{42}$ /A $\beta_{40}$  resultó elevada con respecto al control, aunque las mutaciones en la posición 117 presentaron un perfil más



marcado que los ubicados en la posición 120. Por lo que la posición en la que se encuentra la sustitución resultaría importante en el fenotipo presentado con respecto al procesamiento de A $\beta$ .

Considerando los estudios mencionados anteriormente y con el objetivo no sólo de estudiar la variante de interés sino también de encontrar mecanismos que pudieran ser comunes a todas variantes asociadas a EA, tomamos la decisión de sumar a nuestro estudio la variante *PSEN1* p.A246E (Chr14:73659540 C>A). Esta variante está ubicada en el exón 7 del transcrito primario del gen de *PSEN1* y a nivel aminoacídico forma parte no sólo de uno de los pasos transmembrana, sino también muy cerca de la región catalítica de la proteína (Figura 89B). Además, es una variante clasificada como patogénica desde el punto de vista de estudios poblacionales y por ensayos funcionales. Particularmente, en precursores neurales y neuronas derivadas de CMPih de pacientes portadores de esta mutación se observó una secreción elevada de los péptidos A $\beta_{42}$  y A $\beta_{43}$ , considerados más propensos a oligomerizar que sus contrapartes de menor tamaño. También se observó un aumento en la relación de A $\beta_{42}$ /A $\beta_{40}$ , la formación de agregados de A $\beta$  y la hiperfosforilación de la proteína Tau<sup>290–292</sup>, por lo que la consideramos un buen control de variante patogénica para los estudios a realizar.



**Figura 91. Secuencia aminoacídica de la proteína Presenilina-1 con sus mutaciones asociadas. A.** Representación esquemática de PSEN1 mostrando sus 9 dominios transmembrana, las uniones de los exones codificantes y los sitios C-terminal y N-terminal de a proteína. **B.** Ampliación de la región de interés donde se ubica la mutación p.T119I en la región luminal de la membrana plasmática. **C.** Ampliación de la región de interés donde se ubica la mutación p.A246E, cerca de los sitios catalíticos de la proteína. Los aminoácidos considerados patogénicos se muestran en rojo, los probablemente patogénicos en naranja, los benignos o probablemente benignos en verde y aquellos de patogenicidad no asignada, en azul.

## Análisis de patogenicidad de la mutación *PSEN1* p.T119I utilizando un modelo de sobreexpresión de plásmidos en líneas HEK293T *PSEN1* KO

Los mecanismos por los cuales la proteína PSEN1 podrían estar ejerciendo su rol pro-neurodegenerativo no están del todo dilucidados. Una de las teorías más relevantes de los últimos años ha sido la de la cascada amiloide que propone que las variantes patogénicas alterarían la procesividad y/o afinidad de la  $\gamma$ - secretada por sus sustratos, alterando así la proporción de péptidos A $\beta$  de distinta longitud generados. Asimismo,

estas mutaciones podrían alterar el clivaje de otros sustratos, contribuyendo a la patogénesis de la EA<sup>107,117</sup>. Otra teoría indicaría que la pérdida de funcionalidad de PSEN1, causada por las variantes patogénicas, sería lo que induciría el procesamiento aberrante de múltiples sustratos.

En la familia en estudio con la variante *PSEN1* p.T119I, el caso índice, con edad de inicio a los 49 años, solo presentó niveles patológicos A $\beta$ <sub>42</sub>, pero su primo/a (cuyo género fue extraído del análisis del pedigree por motivos de confidencialidad) solamente presentó niveles patológicos elevados de Tau fosforilado. Ambas mediciones fueron tomadas en líquido cefalorraquídeo de los pacientes<sup>220</sup>. Por este motivo, resulta de suma importancia generar diversos modelos humanos basados en mutaciones diferentes, con el fin de poder abarcar y descubrir *targets* comunes en estos procesos neurodegenerativos. Además, los hallazgos obtenidos en esta cohorte plantean que la misma variante puede tener diversos efectos.

Con ese fin, nos propusimos realizar un primer diseño experimental, utilizando células HEK293T, ya que son fáciles de cultivar y manipular genéticamente, en las cuales sobre-expresamos de manera transitoria APP-695 (isoforma WT) o PSEN1 (WT o las variantes asociadas a EA: *PSEN1* pT119I y p.A246E) para cuantificar luego en los sobrenadantes, mediante ELISA, los niveles de A $\beta$ <sub>42</sub> y A $\beta$ <sub>40</sub> y la relación entre ellos. En particular, se ha visto una asociación entre el aumento en la relación A $\beta$ <sub>42</sub>/A $\beta$ <sub>40</sub> y la EA, motivo por el cual se lo considera un marcador de esta enfermedad neurodegenerativa.

En primera instancia generamos una línea *knock-out* (KO) mediante edición génica (CRISPR/Cas9) para el gen *PSEN1* en células HEK293T, para reducir los niveles de A $\beta$ <sub>42</sub> y A $\beta$ <sub>40</sub> endógenos que pudieran enmascarar los resultados asociados pura y exclusivamente a las variantes estudiadas. Luego, utilizamos la técnica de mutagénesis dirigida basada en PCR para obtener plásmidos de expresión de las mutaciones *PSEN1* p.A246E y *PSEN1* p.T119I. Por último, transfectamos de forma transitoria las células HEK293T *PSEN1* KO y medimos los valores de A $\beta$ <sub>42</sub> y A $\beta$ <sub>40</sub> y la relación A $\beta$ <sub>42</sub>/A $\beta$ <sub>40</sub> en los extractos celulares transfectados. En concordancia con la bibliografía, la relación A $\beta$ <sub>42</sub>/A $\beta$ <sub>40</sub> producto de las transfecciones transitorias con el plásmido *PSEN1* p.A246E aumentó significativamente, como consecuencia de un aumento en los niveles de producción de A $\beta$ <sub>42</sub> y una tendencia a la disminución de la isoforma A $\beta$ <sub>40</sub>. Por su parte, la mutación en *PSEN1* p. T119I no presentó diferencias significativas con respecto al control al analizar la relación A $\beta$ <sub>42</sub>/A $\beta$ <sub>40</sub>, aunque sí observamos una tendencia a la disminución de los niveles de A $\beta$ <sub>40</sub>.

Dadas las dificultades técnicas encontradas, no pudimos analizar los valores de A $\beta$ <sub>42</sub> ni A $\beta$ <sub>40</sub> en los sobrenadantes de las células HEK293T *PSEN1* KO transfectadas ya que los niveles de los péptidos A $\beta$  no pudieron ser detectados con los kits que poseíamos.

Incluso utilizando el kit de mayor sensibilidad, no pudimos medir niveles de A $\beta$ <sub>42</sub> en los ensayos de transfección de *PSEN1* WT ni *PSEN1* p.A246E y por eso optamos por medir únicamente en lisados intracelulares.

Especulamos que esto podría deberse a una glicosilación inefficiente de APP en células HEK293T, que afecta el tráfico intracelular de esta proteína y la producción de los péptidos A $\beta$ . Se sabe que la proteína APP debe sufrir modificaciones post-traduccionales las cuales permiten que lleguen a la membrana celular, sitio donde es procesada. En particular, APP tiene 2 sitios de N-glicosilación en Asparagina (Asn), Asn 467 y Asn496. En células de ovario de hámster chino (CHO) se observó que la delección de dichas N-glicosilaciones resultan en una disminución en la secreción y localización de APP, indicando el efecto que estas modificaciones tienen sobre el transporte intracelular de esta proteína<sup>293</sup>.

Una variación en el procesamiento de APP en las células HEK293T puede ocasionar una reducción en la secreción de péptidos A $\beta$  detectables en el medio de cultivo. Para abordar esta situación, se podría considerar el incremento en la cantidad de células utilizadas en la transfección, lo que podría potencialmente aumentar la producción de los péptidos de interés. Posteriormente, se podría emplear una técnica de concentración de sobrenadantes para recuperar y aumentar la concentración de los péptidos en el medio de cultivo, permitiendo así una detección más sensible y precisa de los mismos. Este enfoque podría mejorar la eficiencia del proceso y facilitar la investigación relacionada con los péptidos A $\beta$ .

Por otro lado, en humanos, se sabe que existen variantes de *splicing* alternativo de APP que se expresan diferencialmente entre tejidos, APP695, APP751, y APP770. Y qué, en particular las neuronas expresan APP695, mientras que otros tipos celulares, como las células vasculares endoteliales en el cerebro expresan APP770<sup>294</sup>. En un trabajo publicado en 2023, se observó que, en neuronas APP695 que presentaba N-glicosilaciones y O-glicosilaciones se transferían a la superficie celular mientras que, en células endoteliales APP770, el cual atraviesa un proceso diferente de glicosilación conocido como hipo-O-glicosilación primero llega a la membrana plasmática pero luego es internalizado y transportado al aparato de Golgi donde es O-glicosilado y recién ahí es puesto en membrana. Además, observaron que los patrones de O-glicosilación estarían afectando el procesamiento de APP y la generación de A $\beta$ <sub>42</sub> y A $\beta$ <sub>40</sub><sup>295</sup>.

Existe la posibilidad que, dada la diferencia existente a nivel transcripcional entre neuronas y las células HEK293T, provenientes de riñón embrionario, estén afectando el patrón de glicosilaciones y por eso no hayamos podido realizar las mediciones correspondientes. Otro trabajo que respalda esta hipótesis es el de Hsu y colaboradores en los cuales utilizaron un plásmido APP-695WT, *PSEN1* WT y *PSEN2* WT sobre los

cuales utilizaron la técnica de mutagénesis dirigida para introducir mutaciones asociadas a EA de forma tal de hacer un análisis sistemático de las mismas<sup>244</sup>. Los investigadores siguieron un protocolo de transfecciones transitorias similar al nuestro, pero utilizando células N2A (del inglés, *mouse neuroblastoma cells*). Éstas, al ser de neuroblastoma, podrían tener un patrón de glicosilación y de procesamiento de APP similar al neuronal, aunque los investigadores no realizaron este análisis. Llamativamente, con esta metodología generaron un algoritmo para recategorizar ciertas mutantes de que habían sido consideradas patogénicas por softwares bioinformáticos como Polyphen como benignas ya que no encontraron modificaciones en la relación  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ , como *PSEN1* I439V. A su vez, recategorizaron 19 mutaciones de significancia incierta como posiblemente patogénicas. Sería interesante ver, los resultados obtenidos para ensayos similares en neuronas de pacientes o en neuronas diferenciadas a partir de CMPih de pacientes para ver si efectivamente se mantienen los resultados obtenidos por los investigadores. Por su parte, la mutación de estudio *PSEN1* p.T119I no se analizó con lo cual aún hoy en día no se conocen datos funcionales acerca de la patogenicidad de esta.

A su vez, el caso índice presentaba el polimorfismo APOE  $\epsilon 4$  en heterocigosis, la cual aporta mayor riesgo de EAe, en nuestros estudios usando la línea HEK293T *PSEN1* KO no realizamos un análisis ni modificamos genéticamente estas células para, además realizar un estudio de los polimorfismos APOE  $\epsilon 2$ , APOE  $\epsilon 3$  y APOE  $\epsilon 4$ . Sería interesante estudiar los mismos.

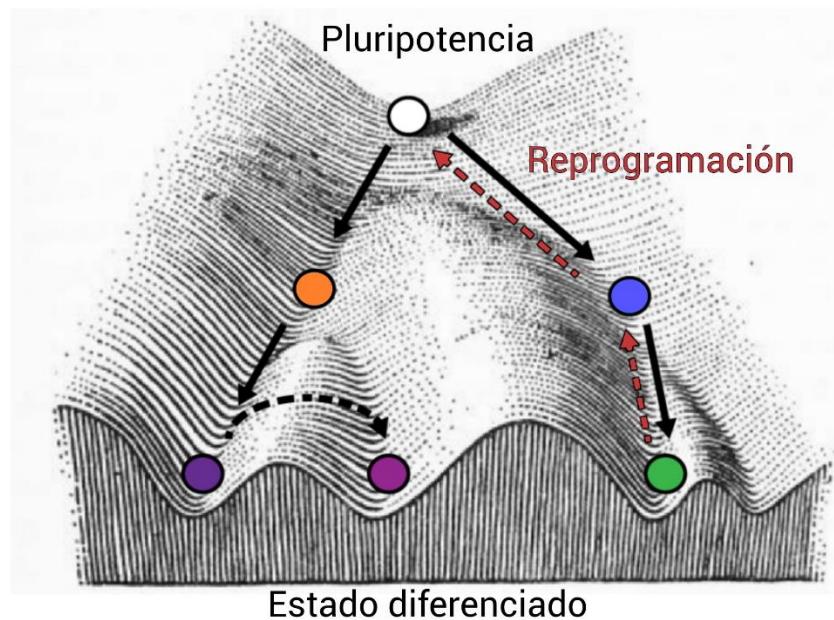
## Generación de CMPih derivadas de fibroblastos de pacientes de EA

La correcta elección del modelo de estudio es crucial para el estudio de patologías tan complejas como la EA. Los experimentos de sobreexpresión en células HEK293T, en dónde únicamente se pudieron medir los niveles de  $A\beta_{42}$  y  $A\beta_{40}$  intracelulares, no aportaron datos que avalen la hipótesis de nuestro trabajo en lo que respecta a la patogenicidad de la variante *PSEN1* p.T119I. Dada la disponibilidad de fibroblastos del paciente portador (caso índice) de la variante *PSEN1* p.T119I decidimos pasar a un nuevo modelo de estudio, y estudiar los efectos de dicha variante en neuronas derivadas de CMPih obtenidas mediante reprogramación celular de esos fibroblastos.

Para ello realizamos la transducción de los fibroblastos con partículas lentivirales que contenían el plásmido STEMCCA, el cual codifica para los 4 genes de Yamanaka (*OCT4*, *KLF4*, *SOX2* Y *cMYC*; OKSM). El proceso de reprogramación produce el reinicio de los marcadores epigenéticos establecidos durante el proceso de diferenciación a un tipo celular específico, devolviendo las células a un programa “tipo embrionario”,

indiferenciado y con capacidad pluripotente<sup>296</sup>. En términos de la metáfora del paisaje epigenético de Waddington (Figura 92), una célula indiferenciada o pluripotente va especificándose hacia un tipo celular determinado gracias a la presencia de factores de transcripción, interacciones con las células circundantes y el establecimiento de marcas epigenéticas que van determinando la identidad celular. Una vez que la identidad celular está establecida, la presencia de estas modificaciones epigenéticas específicas, que determinan el grado de enrollamiento de la cromatina y por ende el patrón de expresión génica para dicha célula somática, aseguran que ésta se mantenga en el tiempo y a lo largo de las divisiones celulares.

La expresión de los OKSM desata una serie de procesos celulares y moleculares definidos temporalmente que se que pueden clasificar en 3 grandes “olas” de reprogramación: iniciación, maduración y estabilización. Estos procesos involucran, entre otros; cambios morfológicos, cambios en el patrón de ciclo celular, reactivación de la actividad telomerasa, reducción de la expresión de genes somáticos y finalmente la pérdida de la memoria epigenética, dando como resultado la generación de una línea de CMPih<sup>297</sup>.



**Figura 92. Metáfora del paisaje epigenético considerando el proceso de reprogramación celular.** La imagen muestra una adaptación del 'Paisaje Epigenético' propuesto por Waddington (1940). Representa un paisaje inclinado, donde la célula no diferenciada es una bola (blanca) que rueda por la pendiente y está sujeta a bifurcaciones y puntos de ramificación en su camino de desarrollo (bolas naranjas y azules), alcanzando finalmente un destino diferenciado en la parte inferior (Bolas violeta y verde). En el proceso de reprogramación celular (líneas rojas), las células diferenciadas vuelven a un estado similar al que se encontraban al inicio del camino.

En el capítulo 2 describimos la generación y validación de CMPih a partir de los fibroblastos dérmicos humanos portadores de la mutación *PSEN1* p. T119. En particular, se obtuvieron 31 clones de CMPih de los cuales solo 3 (FFAD1.1c1, FFAD1.2c4 y

FFAD1.2c8) lograron llegar al estado estabilizado. Se descartó el clon FFAD1.1c1 por la presencia de aberraciones cromosómicas generadas a raíz del proceso de reprogramación. Los otros dos clones cumplieron todos los requisitos para ser considerados CMPih de acuerdo con las validaciones realizadas, como ser la expresión de marcadores endógenos de pluripotencia, alta actividad de fosfatasa alcalina y la capacidad de dar origen a derivados de las tres capas embrionarias. Sin embargo, decidimos continuar los experimentos con el clon FFAD1.2c4, al cual renombramos línea FFAD1, ya que el mismo presentaba mayor tasa de proliferación y se recuperaba más fácilmente luego de descongelado que el clon FFAD1.2c8, lo que representó una clara ventaja operativa. Las CM poseen un ciclo celular que difiere del de las células somáticas ya que poseen fases G1 y G2 cortas mientras que la fase S (replicación del ADN) constituye la mayoría del ciclo celular. Ante una fase G1 acotada las CMPh mantienen su estado indiferenciado mientras que, al inhibir su progresión, se comprometen a un linaje celular específico<sup>298</sup>.

La capacidad de generar CMPih a partir de células somáticas y en particular de pacientes, permite a los investigadores acceder a una fuente abundante y renovable de células madre que pueden diferenciarse en diversos tipos celulares, incluidas las neuronas. Esto abre la puerta a estudios detallados sobre el desarrollo neuronal y la función y la disfunción del sistema nervioso en un entorno controlado de laboratorio.

Es importante recordar que existen diversas metodologías de generación de las CMPih (Figura 12). En particular el método que nosotros utilizamos es el de vectores lentirivales integrativos auto-removibles, ya que el casete STEMCCA cuenta con 2 sitios *Loxp* (Figura 35) que permiten su remoción del genoma tras la utilización de una recombinasa CRE. Este proceso no fue realizado durante esta tesis doctoral ya que no pensamos en la utilización de las CMPih generadas con un fin terapéutico a esta altura. Sin embargo, es necesario considerar que esta inserción es al azar y puede generar dificultades a la hora de diferenciar las células a linajes específicos. Por este motivo, fue importante corroborar tanto que la expresión del casete STEMCCA se encontrara silenciada como que la línea FFAD1 fuera capaz de diferenciarse a todos los linajes celulares.

Otro punto para destacar es que sería altamente beneficioso poder reprogramar las células de un familiar no portador de la mutación, lo que permitiría establecer un grupo de control más sólido para evaluar los efectos de dichas variantes. Asimismo, la reprogramación de las células de otros familiares portadores sería invaluable para realizar comparaciones exhaustivas y comprender mejor los resultados obtenidos en el contexto de la variabilidad genética dentro de la familia.



## Estudio de variantes asociadas a la EA utilizando modelos neurales derivados de CMPih

La utilización de un modelo humano *in vitro* de neuronas derivadas a partir de CMPih ofrece numerosas ventajas para la investigación en neurociencia. Al utilizar esta herramienta, se pueden estudiar aspectos clave del desarrollo y diferenciación celular, como así también modelar diversas patologías del sistema nervioso sin depender exclusivamente de cultivos primarios o muestras *post mortem*, que son recursos limitados y difíciles de obtener. Además, por su capacidad de pluripotencia, las CMPih son capaces de diferenciarse a todos los diferentes linajes celulares que componen el sistema nervioso, utilizando los protocolos correspondientes. Así, la generación de neuronas humanas y otros subtipos celulares *in vitro* a partir de CMPih, representa una herramienta poderosa para la investigación en neurociencia, ya que proporciona un modelo flexible y escalable que puede utilizarse para estudiar una amplia gama de procesos biológicos y enfermedades del sistema nervioso.

Una vez más la elección del protocolo de diferenciación a utilizar representa una estrategia importante a la hora de generar resultados confiables. En la actualidad, la obtención de neuronas derivadas de CMPih puede realizarse a partir de diferentes protocolos, algunos de ellos complejos, laboriosos y de larga duración como otros más simples. En nuestro laboratorio las Dras. Soledad Rodríguez Varela y Sofia Mucci han puesto a punto un protocolo de diferenciación en 2 dimensiones a CMN y posteriormente a neuronas basado en la utilización de un kit comercializado por Thermo Fisher Scientific (GIBCO, *PSC Neural Induction*). Inicialmente validamos exitosamente CMN obtenidas a partir de las CMPih FFAD1 (*PSEN1* p.T119I), UOWoo2i-A (*PSEN1* WT) y UOWoo3i-A (*PSEN1* p.A246E), mediante la evaluación de la expresión de los marcadores de linaje neural SOX-1, SOX-2, NESTINA y PAX6. Posteriormente, diferenciamos dichas neuronas por 30 días en un medio basado en el uso de Neurobasal suplementado con B27, ácido ascórbico, y los factores neurotróficos BDNF y GDNF. Si bien obtuvimos neuronas de las líneas UOWoo2i-A (*PSEN1* WT) y UOWoo3i-A (*PSEN1* p.A246E), evidenciado por la presencia de los marcadores neuronales TUJ1, MAP2 y MAP5 además de los marcadores de progenitores neurales NESTINA y PAX6, no logramos obtener una correcta diferenciación neuronal a partir de la línea FFAD1 (*PSEN1* p.T119I).

Las neuronas obtenidas mediante la realización de este protocolo son de tipo genéricas, aunque ha sido demostrado que las CMN obtenidas conservan la identidad regional y la capacidad de diferenciarse en diferentes neuronas específicas de las diversas regiones del cerebro, como las neuronas GABAérgicas del prosencéfalo, las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo y las neuronas motoras del rombencéfalo a día 14<sup>259</sup>.

Esto nos llevó a pensar que quizás esta dificultad en la generación de las neuronas podría deberse a la mutación en sí y a que la presencia de esta genera alteraciones del correcto desarrollo neuronal como ha sido descrito en algunos trabajos, aunque esa característica podría ser más por cambios en el procesamiento de otros blancos del complejo  $\gamma$ -secretasa (como es NOTCH) más que a causa de un procesamiento aberrante de APP<sup>299,300</sup>. Sin embargo, para probar eso definitivamente, hubiera sido ideal generar una línea isogénica que permitiera corregir la mutación a su estado WT, teniendo así dos líneas genéticamente idénticas, salvo por la presencia o ausencia de la variante de estudio. Con este fin, buscamos utilizar la tecnología CRISPR/Cas9 que, como se explicó en el capítulo 1 de resultados permite realizar cortes precisos en el genoma y, acoplado a una secuencia molde, permite generar sustituciones nucleotídicas dirigidas por el mecanismo de reparación del ADN por recombinación homóloga (Figura 27). Para ello, logramos exitosamente clonar guías que cortan a 2 pb de distancia del sitio de nuestra mutación de interés dentro del plásmido pSpCas9(BB)-2A-Puro-2A-GFP y diseñar un oligo molde (ssODN, del inglés *single-stranded oligodeoxynucleotides*) que permita revertir la mutación en la línea FFAD1 como así también introducir la variante c.C356T p. T119I en células *PSEN1* WT.

Si bien logramos validar el correcto corte de la Cas9 en el sitio deseado, dada la baja tasa de éxito de las sustituciones de un único nucleótido (la cual se estima menor al 0,2%) hasta el momento no nos fue posible conseguir un clon que presentara la corrección. Sin embargo, nos encontramos haciendo experimentos de optimización de las condiciones<sup>301</sup> (que incluyen un shock térmico al momento de la transfección y la utilización de inhibidores de la vía de reparación no homóloga) que nos permitirán aumentar la probabilidad de obtención de la modificación deseada.

Ante la imposibilidad de obtener neuronas de manera consistente a partir de la línea de CMPih FFAD1 (*PSEN1* T119I) utilizando el kit comercial de PSC Neural Induction, decidimos poner a punto un nuevo protocolo de diferenciación neuronal. Nos basamos en el trabajo de Yichen Shi y colaboradores publicado en 2012. Este protocolo se basa en la inhibición de las vías de señalización no ectodérmicas por medio de la utilización de dos inhibidores de las vías de SMAD (SB431542 y LDN193289) y su puesta a punto nos permitió obtener neuronas con fenotipo cortical, población celular afectada en EA, a partir de todas las líneas de CMPih, incluyendo la FFAD1.

Validamos la obtención de neuronas corticales estudiando la expresión de marcadores de linaje neural embrionario como PAX6, neuronales como MAP2, MAP5 y TUJ-1 y los marcadores corticales TBR2, TBR1, CTIP2 y SATB2 a día 45 y 70 de la diferenciación. Los cuales, salvo por el marcador SATB2, se encontraron expresados en las 3 líneas celulares. Como así también se observó un aumento en los niveles de

expresión cuantificados por RT-qPCR, tiempo de maduración dependiente, de todos estos marcadores salvo CTIP2 y SATB2. A pesar de la falta de marca de SATB2, si pudimos medir un aumento en la expresión de CUX1 en neuronas derivadas de las líneas UOW002i-A y FFAD1. Por otro lado, si bien no pudimos medir los marcadores OTX1 y FOXG1 por inmunomarcación como se presenta en el trabajo original, los mismos se encontraron presentes (y no se observó una expresión diferencial de los mismos entre las líneas) en neuronas derivadas de las líneas FFAD1 y UOW002i-A en el análisis realizado por RNA-seq.

A su vez, obtuvimos neuronas con alta eficiencia (% de células positivas para el marcador neuronal TUJ-1 mayor a 87%) y observamos que alrededor del 20-30% de las células presentaban marca para TBR1. Hubiera sido interesante estudiar el resto de los marcadores por citometría de flujo, aunque esto nos estaría hablando de una heterogeneidad representativa de las varias capas de la corteza en un único cultivo. Nos encontramos, además, en proceso de realizar mediciones electrofisiológicas para evaluar la capacidad eléctrica de las mismas, de modo de confirmar la correcta diferenciación neuronal.

De acuerdo con el protocolo utilizado se espera la presencia de marcadores tempranos corticales (como TBR1 y CTIP2) a partir del día 20. Luego, a día 70 de la diferenciación las neuronas deberían expresar marcadores corticales de desarrollo más tardío, como ser la expresión de SATB2, o CUX1, y la ausencia de expresión de TBR1 and CTIP2. Sin embargo, nosotros no logramos obtener neuronas corticales con el mismo grado de maduración a día 70 con ninguna de las líneas de CMPih ensayadas. En este sentido, los protocolos de diferenciación celular a menudo están condicionados por las características específicas de las líneas celulares empleadas, y es plausible que nuestras líneas particulares demanden un periodo de diferenciación más prolongado en comparación con otras. Sería interesante el agregado de nuevas líneas celulares, no solo de variantes sino también controles para estudiar las diferencias que pudieran existir entre estas.

Además, surge el interrogante acerca de si las mutaciones presentes en *PSEN1* podrían incidir en la alteración o el retraso del proceso de diferenciación en estas líneas celulares. Varios trabajos asociados a variantes en *PSEN1*, tanto en roedores como en CMN derivadas de CMPih, han demostrado cambios no solo en los niveles de fosforilaciones de Tau o en los niveles de A $\beta$ , sino también en la proliferación y supervivencia de CMN y en el proceso de neurogénesis en regiones como el giro dentado e hipocampo<sup>302</sup>. En ese sentido sería extremadamente interesante utilizar los modelos generados en esta tesis para estudiar la regulación del ciclo celular a distintos estadios de diferenciación, evaluar si existen diferencias en el proteasoma de nuestras líneas

portadoras de variantes frente a la línea control y a su vez estudiar el estado de otros sustratos asociados al desarrollo neural, como Notch, Sindecano 3 y N-cadherina<sup>303</sup>.

Por otro lado, es necesario mencionar que, debido a limitaciones presupuestarias, nos vimos obligados a sustituir la laminina para el pre-tratamiento de las placas de cultivo, utilizada en el protocolo original, por la matriz extracelular comercial Geltrex (en cuya composición al menos el 60% corresponde a laminina) para la diferenciación celular. Aunque ambos sustratos tienen propiedades de soporte para la diferenciación celular, la señalización inducida por Geltrex podría diferir sustancialmente de la que se genera con laminina, lo que podría impactar de manera significativa en los tiempos y el proceso de diferenciación celular.

Por consiguiente, es fundamental reconocer que la elección de sustratos y la naturaleza de las líneas celulares empleadas pueden tener consecuencias significativas en la diferenciación celular. La sustitución de laminina por Geltrex por razones económicas subraya la importancia de considerar no solo la viabilidad técnica, sino también los posibles efectos en la señalización celular y los tiempos de diferenciación.

Al cuantificar por ELISA los niveles intracelulares de los péptidos  $A\beta_{42}$  y  $A\beta_{40}$  en neuronas corticales derivadas de las líneas de CMPih UOWoo2i-A, FFAD1 y UOWoo3i-A se observó un incremento significativo en la relación  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$  para la variante *PSEN1* p.A246E. Aunque para la variante *PSEN1* p.T119I no se encontró un aumento significativo en los niveles de  $A\beta_{42}$  intracelulares, se detectó una tendencia al aumento de la relación  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ . En lo que respecta a los niveles de los péptidos  $A\beta$  presentes en los sobrenadantes neuronales se detectó una tendencia al aumento en los niveles de  $A\beta_{42}$  en neuronas corticales obtenidas a partir de ambas CMPih portadoras de variantes asociadas a EA (*PSEN1* p.A246E y *PSEN1* p.T119I) con respecto a los niveles observados en neuronas corticales derivadas de CMPih *PSEN1* WT.

Además, se observaron niveles significativamente elevados de fosforilación de Tau en las neuronas corticales derivadas de ambas líneas de CMPih portadoras de variantes (FFAD1 y UOWoo3i-A) en comparación con las neuronas derivadas de CMPih UOWoo2i-A. Estos resultados sugieren que las variantes estudiadas podrían tener un impacto en la producción y fosforilación de péptidos asociados a la patogénesis de la EA.

Aunque estamos al tanto de que la medición óptima de péptidos  $A\beta$  mediante ELISA se debería realizar en medios condicionados, diversos estudios han evidenciado una conexión entre la acumulación intraneuronal de  $A\beta$  y procesos relacionados con la enfermedad de Alzheimer, como la disfunción mitocondrial, la disfunción sináptica y la apoptosis<sup>304-307</sup>.

Como se mencionó en la introducción, en la EA se ha observado la degeneración de neuronas catecolaminérgicas como así también una reducción a nivel

hipocampal<sup>90,93,288</sup>, y en pacientes de EAF, se ha encontrado presencia de depósitos de A $\beta$  a nivel estriatal<sup>220</sup>, con lo cual sería interesante explorar la posibilidad de generar cultivos en 2D de estos linajes para estudiar posibles alteraciones tipo neuronal específicas.

El modelo neuronal en 2D utilizado no nos permitió hacer una recapitulación fidedigna del proceso de agregación proteica que ocurre en la EA, y que es el marcador por excelencia de la patología desde un punto de vista biológico. Por ese motivo, decidimos además realizar un protocolo de diferenciación en 3 dimensiones (3D), conocido como organoides cerebrales. Este protocolo se basa en cultivar las células en medios aptos para neuronas, valiéndose de la capacidad intrínseca de las CMPIh de diferenciarse *por default* a neuroectodermo y el agregado de la matriz extracelular comercial Matrigel. Validamos los organoides cerebrales generados mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos específicos para proteínas neuronales y marcadores corticales a los días 60 y 90 de diferenciación. Nuestros resultados indican una correcta diferenciación a linaje cortical. En el paper original del protocolo en el cual nos basamos los investigadores muestran la expresión de marcadores neuronales y corticales (TUJ1, MAP2, CTIP2, TBR1, TBR2 y SATB2) a partir del día 30 de diferenciación. Nosotros observamos la expresión de los mismos marcadores, pero recién a día 60, que es el primer momento en el que pudimos hacer mediciones, principalmente por el tamaño y fragilidad de los organoides obtenidos. El mismo grupo reportó posteriormente un protocolo para prolongar el tiempo en cultivo y, en organoides de 280 días de cultivo, observaron que seguían expresando MAP2 y SATB2 por inmunomarcación<sup>180</sup>. Es interesante destacar que únicamente muestran resultados obtenidos con la línea de CM embrionarias H9 y una única línea de CMPIh cultivada en condiciones *feeder-free* (Systems Bioscience, cat. no. SC101A-1). Existe la posibilidad de que las diferencias encontradas entre sus resultados y los nuestros puedan deberse a diferencias entre las líneas utilizadas. Sin embargo, siguiendo un protocolo similar, Karminian, Holubiec y colaboradores<sup>233</sup>, reportaron la expresión de MAP2, TUJ1, GFAP y NEUN recién a día 90 de diferenciación, utilizando líneas de CMPIh control y una línea portadora de la variante Swedish en APP. Estos resultados coinciden con los que observamos en nuestro modelo.

Por otro lado, otros laboratorios proponen generar protocolos de cultivo prolongado (9 meses y más) que permitirían la obtención de organoides con células más maduras, aunque luego de los 9 meses también aumentan los niveles de apoptosis, por lo cual el cultivo de estos organoides se vuelve dificultoso<sup>282</sup>. En un trabajo realizado por el grupo de Paula Arlotta en el cual se basan en el protocolo original de Lancaster y col. pero diferencian y miden expresión a nivel célula única (DROP-seq) de marcadores neurales a 3, 6 y 9 meses, los autores observaron que las células que tenían una supuesta

identidad de neuronas con proyección corticofugal estaban presentes tanto en los organoides de tres como de seis meses de edad. A su vez, observaron un enriquecimiento claro de genes involucrados en la maduración neuronal a los seis meses, pero no a los tres meses. Este mismo trabajo muestra como a 3 meses de diferenciación, los organoides cerebrales de cerebro completo muestran por inmunomarcación una robusta expresión del marcador MAP2 y zonas de expresión de GFAP (como sucede en nuestro modelo). Interesantemente, los autores también observaron una diferenciación temprana (1 mes) a progenitores del prosencéfalo (PAX6 y NKX2.1), mesencéfalo (OTX2) y rombencéfalo (GBX2). Hasta el momento solo hicimos tinciones con PAX6, que encontramos muy expresado en organoides de día 30, pero no los otros marcadores. Sería interesante estudiar la expresión de estos marcadores en nuestros organoides a distintos días de diferenciación. Por último, en este protocolo, los autores describieron la presencia de los marcadores CTIP2 y SATB2 en protocolos de 6 meses de cultivo. En nuestro caso, encontramos marca del primero, pero no del segundo, en cultivos de 3 meses. Es probable que no observemos el marcador SATB2 en nuestros cultivos a causa de los tiempos cortos de cultivo. Una discusión que siempre se plantea con respecto a los modelos de organoides cerebrales es cuan bien recapitulan las estructuras corticales. El modelo que decidimos utilizar es un modelo de diferenciación no guiado de “cerebro completo”, lo que implica que no se diferencia a estructuras específicas, sino que apunta más bien a intentar generar la mayor cantidad de estructuras posibles. En ese sentido, sería interesante realizar ensayos de RNA-seq de célula única para poder determinar específicamente las estructuras obtenidas como así también perturbaciones a nivel transcripcional. En el laboratorio contamos con un kit de disgregado de organoides (Neural Tissue Dissociation Kit Papain, Miltenyi Biotec) con el cual estamos trabajando para tratar de separar las células y realizar análisis más profundos. A su vez, podríamos realizar diferenciaciones a distintas subregiones encefálicas con el fin de detectar vulnerabilidades región específica, intentando así, ver similitudes y diferencias entre los observado por estudios imagenológicos y los modelos basados en CMPih.

En ese sentido, existen trabajos que describen la generación de organoides cerebrales dirigidos a regiones encefálicas específicas. Uno de ellos es el de Pasca y colaboradores en el cual, con el uso de 2 inhibidores de la vía de SMAD (dorsomorfina y SB431542), producen esferoides corticales. En este protocolo observaron la presencia de los marcadores TBR2, CTIP2 y NEUN a partir del día 52. En este protocolo, SATB2 parecería aumentar a día 76, pero su pico se presentó a día 137 de diferenciación, con lo cual nuevamente existe la posibilidad de que nosotros no estemos observando este marcador por el tiempo en el que realizamos las mediciones.

Un trabajo del 2019 estudió las similitudes entre protocolos de organoides de cerebro completo (o no guiados), protocolos guiados a prosencéfalo dorsal (que luego dan lugar a la corteza cerebral), esferoides dorsales y ventrales guiados y corteza cerebral humana<sup>308</sup>. En ese trabajo observaron que todos los organoides guiados con patrón dorsal y los organoides de cerebro completo mostraron una correlación igualmente alta con las células humanas lo que indicaría que el uso de señales exógenas en los modelos no compromete la fidelidad de los tipos celulares generados. Es importante destacar que los principales tipos celulares presentes en los organoides a los tres meses son tan similares a las células embrionarias humanas correspondientes como aquellas presentes a los seis meses, lo que sugiere que los organoides recapitulan fielmente lo que ocurre en el desarrollo humano.

Si bien existen discrepancias en la utilización de modelos de organoides cerebrales para el estudio de enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento ya que estos recapitulan un fenotipo embrionario, varios trabajos han demostrado que los mismos son capaces de recapitular los fenotipos de agregado proteico y disfunción sináptica asociados a la EA. En particular, en un trabajo del 2020, investigadores utilizaron el kit comercial STEMdiff™ Cerebral Organoid Kit (StemCell Technologies) para estudiar el rol de las variantes de *APOE* ( $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$ ) en EA. El STEMdiff™ Cerebral Organoid Kit deriva del protocolo utilizado por nosotros y, según el grupo que lo publicó inicialmente, no se observaron diferencias entre la utilización del kit y el armado de las soluciones como lo indica su protocolo. El trabajo de Zhao y colaboradores observaron que los organoides derivados de líneas que presentaban el polimorfismo *APOE*  $\epsilon 4$  presentaban una mayor actividad de Caspasa3 clivada, indicativo de un aumento en el proceso apoptótico. A su vez, observaron una disminución en la presencia de proteínas asociadas a sinapsis como la Sinaptofisina y PSD95. A su vez, demostraron que los organoides derivados de líneas que presentaban *APOE*  $\epsilon 4$  presentaban un aumento de los niveles de fosforilación de Tau y que los niveles de  $A\beta$  aumentaban de forma independiente al genotipo de *APOE*<sup>309</sup>. En nuestro caso, los resultados de la inmunotinción de  $A\beta_{42}$  en organoides cerebrales derivados de CMPih con mutaciones en *PSEN1* (p.T119I y p.A246E) revelaron una deposición generalizada de placas de  $A\beta$ , con depósitos de menor tamaño observados solo en tres cortes de la línea de control *PSEN1* WT. Por su parte, por ELISA, se encontró una disminución en los niveles de péptidos de  $A\beta_{42}$  en el medio condicionado de organoides derivados de las líneas con mutaciones, junto con un aumento en la fosforilación de Tau en serina 231. Existe la posibilidad de que la disminución observada en los niveles de  $A\beta_{42}$  medidos por ELISA se deba a que los mismos se encuentran depositados dentro de los organoides,



mimetizando lo que ocurre en la EA. De forma similar, en los pacientes se observa que  $A\beta_{42}$  se ve reducido al realizar mediciones en líquido cefalorraquídeo<sup>310</sup>.

En el trabajo de Karminian, Holubiec y colaboradores, los investigadores observaron como la presencia de la mutación *Sweedish* indujo un aumento de la marca de p-Tau T231 por western blot, análogo a lo observado por nosotros. Ellos, a su vez, también encontraron un aumento en los niveles de p-Tau S396/404. Por su parte, en el trabajo de Zhao y colaboradores, observaron un aumento de tau fosforilado pS396 en los orgánoides derivados de líneas que poseían el polimorfismo *APOE* $\epsilon$ 4. p-Tau 231 ha sido reconocido como un marcador de EA, pero sería también interesante realizar mediciones por ELISA o WB de otros sitios de fosforilación como p-Tau S396 y p-Tau S217, ya que este parecería asociarse mejor con el fenotipo presentado por los pacientes de EA<sup>311</sup>.

Estos hallazgos en conjunto con los observados en cultivos en 2D sugieren un rol patogénico de la variante *PSEN1* p.T119I en la secreción de  $A\beta_{42}$  y la fosforilación de Tau, respaldando su rol en los procesos patológicos asociados con la EA.

Un aspecto clave de este trabajo de tesis doctoral radica no sólo en sumar una línea de CMPIh con una variante en *PSEN1* a la escasa oferta de líneas similares disponible para la comunidad científica nacional e internacional, sino también en aumentar el conocimiento sobre la patogenicidad de las distintas regiones de la proteína *PSEN1*. En el trabajo de Schultz y colaboradores, no realizan estudios sobre las variantes ubicadas en el primer *loop* hidrofílico de la proteína (donde se encuentra la variante *PSEN1* p.T119I) sino en aquellas ubicadas en los pasos transmembrana y en el segundo *loop* hidrofílico citosólico<sup>288</sup>. Nuestros descubrimientos respaldan un papel patogénico de la variante y también contribuyen a llenar vacíos en el conocimiento generado en estudios previos. Por su parte, en el trabajo de Liu y colaboradores, si bien establecen claramente la importancia del primer *loop* hidrofóbico luminal, no solo en la procesividad del complejo sobre la proteína APP sino también por su rol modulador, no hacen ensayos sobre el aminoácido 119<sup>289</sup>. Si bien no logramos demostrar cambios en la relación  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$  en los sobrenadantes de los cultivos neuronales en 2D, debido a que no pudimos cuantificar los niveles de  $A\beta_{40}$ , si observamos un cambio estadísticamente significativo en el marcador Tau fosforilado en serina 231, un análisis que no realizaron en el paper de Liu. A su vez, en ese trabajo analizaron otros péptidos amiloides como  $A\beta_{43}$ ,  $A\beta_{38}$  y  $A\beta_{37}$ . En particular  $A\beta_{43}$  ha sido asociado a una mayor propensión a agregarse e inducir neurotoxicidad<sup>312</sup>. A lo largo de este trabajo no realizamos estas mediciones, pero sería de suma importancia estudiar qué pasa con esos péptidos en nuestras variantes de estudio.

Por lo dicho anteriormente, sería extremadamente interesante ampliar los estudios realizados en este trabajo doctoral con otras líneas de CMPIh asociadas a EA

para estudiar posibles cambios fenotípicos asociados a la topología de la proteína. En estos momentos, nos encontramos generando líneas de CMPih de otra variante encontrada en una familia argentina, que presenta la sustitución en M146L también en *PSEN1*. Estas células nos ayudarán a realizar un estudio más profundo acerca de las implicancias de las diversas variantes asociadas a EA. Además, resultaría sumamente interesante explorar la oportunidad de investigar el papel de nuestra variante en vías que no estén directamente relacionadas con APP, como por ejemplo Notch, CD44, entre otras que forman parte de los sustratos de la  $\gamma$ -secretasa<sup>48</sup>. Además, consideramos la posibilidad de estudiar los efectos de nuestra variante en otros tipos celulares, como por ejemplo la microglía, lo que ampliaría nuestro entendimiento sobre su impacto en diferentes contextos biológicos.

## Regulación diferencial de genes en neuronas corticales derivadas de CMPih portadora de la variante *PSEN1* p.T119I

Como se discutió anteriormente, la EA es una enfermedad compleja multifactorial y que, incluso en los casos hereditarios tiene una presentación muy variable. Esto nos da cuenta de que varios procesos celulares podrían estar generando el fenotipo presentado por cada paciente. Dado que nuestros resultados respaldan el rol patogénico de la variante *PSEN1* p.T119I, decidimos embarcarnos en la búsqueda de genes que pudieran estar diferencialmente expresados (DE) en neuronas corticales derivadas de la línea FFAD1 (*PSEN1* T119I) con respecto a las derivadas de la línea UOWoo2i-A (*PSEN1* WT), como así también estudiar la modulación de dichos genes en neuronas corticales derivadas de la línea UOWoo3i-A (*PSEN1* p.A246E), con el fin de encontrar patrones que nos permitieran postular candidatos a blancos farmacológicos (Figura 87).

A partir de nuestro análisis exploratorio pudimos encontrar 85 genes DE, de los cuales seleccionamos 13 para validar y evaluar su perfil de expresión en neuronas corticales derivadas de las 3 líneas celulares estudiadas UOWoo2i-A (*PSEN1* WT), FFAD1 (*PSEN1* p.T119I) y UOWoo3i-A (*PSEN1* p.A246E). Como se puede apreciar en la figura 87, las regulaciones tanto positivas como negativas de los niveles de expresión de los transcritos, identificadas en el análisis *in silico* mediante RNA-Seq, fueron confirmadas mediante la técnica de RT-qPCR utilizando ARNm extraído de neuronas corticales en el día 70 de las líneas FFAD1 (*PSEN1* T119I) y UOWoo2i-A (*PSEN1* WT).

Observamos cambios significativos en los niveles de expresión de los ARNm de *TUBA4A* y *ACP5* (disminución), como así también una tendencia a la disminución en

*NOS3*, *ICAM4*, *HSPA6* y *TMEM87B*. Por otro lado, observamos una regulación positiva en *GPD1* y *RGPD2*, como así también una tendencia al aumento en *PROKR2*, *GRIN2A*, *TRPC6*, *THSD1* y *ADAMTS15*. Estos resultados apoyan los análisis bioinformáticos realizados para los genes DE entre las líneas FFAD1 (*PSEN1* T119I) y UOW002i-A (*PSEN1* WT).

Este análisis se volvió más interesante al considerar los patrones de expresión en neuronas corticales derivadas de la línea UOW003i-A (*PSEN1* A246E). En particular, encontramos que los genes *TUBA4A*, *NOS3* y *ACP5* presentaban un perfil de expresión similar, tendiente a la disminución en su expresión con respecto a la línea UOW002i-A (*PSEN1* WT). A su vez, los genes *RGPD2*, *TRPC6*, *THSD1*, *GPD1* y *PROKR2* siguen un perfil de regulación positiva para ambas líneas celulares. En breve ahondaremos en los mecanismos y vías en los que están involucrados estos genes.

Es crucial destacar la relevancia de los genes regulados de manera similar en neuronas corticales derivadas de ambas líneas CMPih portadoras de variantes en *PSEN1* con respecto a neuronas corticales derivadas de CMPih *PSEN1* WT, dado que podrían estar involucrados en mecanismos moleculares comunes asociados a la EA, convirtiéndolos en blancos terapéuticos potencialmente prometedores. Por otro lado, se plantea la necesidad de ampliar el estudio a un mayor número de CMPih derivadas de pacientes con mutaciones en el gen *PSEN1* como así también explorar bases de datos de experimentos de RNA-Seq con el fin de corroborar los datos obtenidos. También, se podría evaluar la expresión de estos genes en muestras de sangre y líquido cefalorraquídeo de pacientes con EA y personas sanas. Estos enfoques podrían revelar si los niveles de expresión de estos genes tienen el potencial de servir como marcadores de la enfermedad.

Es interesante también que otros genes no siguen este mismo patrón, especialmente en los casos de *GRIN2A*, *ICAM4*, *HSPA6*, *TMEM87B* y *ADAMTS15*. Esto podría explicar algunas de las diferencias observadas a nivel fenotípico en los niveles de A $\beta$  y p-Tau medidos por ELISA de sobrenadantes e inmunotinción en organoides cerebrales. Asimismo, esto podría explicarse porque, como ya se ha mencionado, distintas mutaciones en *PSEN1* pueden afectar la funcionalidad  $\gamma$ -secretasa de manera diferente, lo que resultará en efectos diversos sobre los sustratos y sus genes asociados. La variabilidad en la regulación entre las neuronas de diferentes líneas en lo que respecta a la actividad de la  $\gamma$ -secretasa sugiere una diversidad funcional que merece estudiarse en profundidad.

Uno de los genes expresados diferencialmente fue *TUBA4A*, que codifica para una proteína llamada tubulina alfa 4A, perteneciente a la familia de las tubulinas. Las tubulinas son proteínas fundamentales en la estructura y función de los microtúbulos,

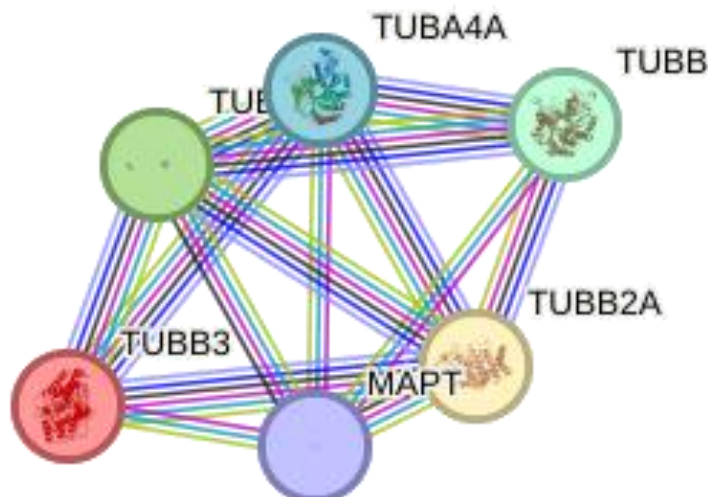
que son componentes importantes del citoesqueleto de las células eucariotas. Los microtúbulos participan en una variedad de procesos celulares, incluyendo la división celular, el transporte intracelular, y la organización celular. La *TUBA4A* se expresa en el tejido cerebral y desempeña un papel crucial en la arquitectura y función de los microtúbulos en las neuronas<sup>revisado en 313</sup>.

Al analizar la bibliografía existente acerca de este gen en relación con la EA no encontramos artículos publicados ni su mención en bases de consulta como ALzhforum (aunque existe un trabajo publicado en MedRxiv.org, un servidor de preprints, donde por secuenciación exómica completa de datos de poblaciones inglesas, encontraron variantes raras en la población, entre ellas variantes en *TUBA4A* que podrían estar asociadas al desarrollo de EA<sup>314</sup>). Y si bien, hay trabajos que reportan modificaciones post traduccionales en las  $\alpha$ -tubulina asociadas a EA<sup>315,316</sup>, los trabajos no indagan si efectivamente se trata de la tubulina alfa 4A o *TUBA1A*, otro gen que codifica para cadenas de  $\alpha$ -tubulina y se ha visto asociado a afecciones del sistema nervioso central.

Sin embargo, si encontramos una serie de trabajos donde reportan la presencia de variantes en este gen asociados a la aparición de otras demencias, como el continuo demencia frontotemporal-esclerosis lateral amiotrófica<sup>317,318</sup>, aunque su aparición es rara y despierta cierta controversia en el campo<sup>319</sup>.

La relación entre el estatus de los microtúbulos y la EA ha sido uno de los centros del debate de los últimos años, especialmente porque han aparecido múltiples mutaciones asociadas al gen *MAPT* el cual codifica para la proteína asociada a microtúbulos Tau, motivo por el cual esta patología también se puede entender como una Taupatía. Sin embargo, existen pocos trabajos que relacionen otros componentes de los microtúbulos con EA.

Interesantemente, al hacer un análisis de STRING de los 5 genes con mayor interacción con *TUBA4A*, no solo resaltan los genes que codifican para las tubulinas, como era de esperarse por bibliografía, sino también, la proteína *MAPT* (Figura 93). *MAPT* codifica para la proteína asociada a microtúbulos Tau la cual promueve el ensamblaje y la estabilidad de los microtúbulos y, como se ha descrito anteriormente, se ha visto fuertemente implicada en el desarrollo de la patología de la EA.



**Figura 93. Relación de los TUBA4A con otros genes asociados a microtúbulos en base de datos de STRING.** Las uniones entre nodos indican proteínas relacionadas entre sí en bases de datos. En rosa, proteínas relacionadas por trabajos experimentales; en celeste, proteínas relacionadas según bases de datos curadas; en verde, proteínas cuyos genes son vecinos; en azul, las proteínas con genes en co-ocurrencia; en violeta, las proteínas que son homólogas; en negro, proteínas co-expresadas y en amarillo, proteínas que han sido mencionadas en una misma fuente de información. Aquellos nodos de proteínas sin conectar no tienen relación en ninguno de los apartados descriptos previamente hasta el momento (extraído de <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TUBA4A>. Última fecha de acceso: 02/04/2024).

Dado que aún no ha sido reportada fehacientemente una asociación entre *TUBA4A* y el desarrollo de la EA, como así también su interacción con *MAPT* sería importante indagar las vías de señalización y mecanismos celulares involucrados en la interacción entre *TUBA4A* y *MAPT* en el contexto de EA.

Por otro lado, el gen *NOS3* codifica para la Óxido nítrico sintasa 3, que se ha visto expresada en neuronas y tejido endotelial. Las óxido nítrico sintasas catalizan la generación de óxido nítrico, un gas que tiene funciones de señalización intra e intercelular en cerebro<sup>320</sup>. Ciertos estudios de inicios de los 2000 vincularon un aumento en los niveles de *NOS3* con el desarrollo de EA<sup>321</sup> y alteraciones de los niveles de *NOS3* con diversos procesos neurodegenerativos<sup>322</sup>, apoyando tanto la hipótesis de la cascada de calcio (ya que la actividad de *NOS3* se ha visto modulada por la señalización de calcio-calmodulina<sup>323</sup>) como de la cascada mitocondrial. Desde ese momento, se ha acumulado bibliografía que indicaría un rol de las óxido nítrico sintasas en el desarrollo de la EA, tanto desde un punto de vista genético por la aparición de polimorfismos que podrían estar asociados al desarrollo de la patología<sup>324,325</sup>. Además, en modelos murinos se observó que una pérdida de función o *knock-out* de la óxido nítrico sintasa endotelial (otro nombre para *NOS3*) parecería estar asociada al desarrollo de EA y el aumento de la fosforilación de Tau<sup>326,327</sup>.

Estos últimos resultados vienen de la mano de lo observado por nosotros y, considerando la posibilidad de ver a la EA como una enfermedad vascular, sería sumamente interesante ver qué sucedería al diferenciar nuestras CMPih a tejido

endotelial o realizar vascularización de los organoides cerebrales para estudiar en profundidad estos procesos.

Otro de los genes observados en los estudios de expresión diferencial fue *ACP5*, que codifica para fosfatasa ácida 5, resistente al tartrato (también conocida como proteína TRAP). TRAP se presenta en 2 isoformas: TRAP5a, que se encuentra principalmente en macrófagos y células dendríticas y TRAP5b, que se encuentra principalmente en osteoclastos. La función fisiológica de TRAP es poco clara y existe poca bibliografía que relacione *ACP5* con la EA. Las mutaciones de pérdida de función de esta proteína están asociadas a displasia espondilo-epifisaria, una condroplasia que, a su vez, presenta impedimentos cognitivos y afecciones del sistema inmune, resaltando un rol de esta proteína en diversos mecanismos<sup>328</sup>. En un trabajo del 2012, en el que estudiaron los perfiles de expresión génica de tejido cerebral *post-mortem* de sujetos diagnosticados con EA, EA preclínico y controles sanos se observó una disminución de la expresión de este gen<sup>329</sup>, corroborando los resultados obtenidos en nuestros experimentos. Por su parte, en 2023, un trabajo buscó asociar la patología de EA con la actividad de la IL-34 y la proteína TRAP. En el modelo murino 3x-Tg, que expresa variantes patogénicas en *APP*, *PSEN1* y *MAPT*, realizaron inyecciones de IL-34 en el hueso calvarial, ubicado en el cráneo, y vieron que el perfil cognitivo de los roedores se veía alterado con respecto al control sin inyectar. A su vez, observaron niveles elevados de p-Tau231, APP y la proteína RAGE, asociada a procesos inflamatorios y la cual se ha relacionado a EA. Por último, observaron un aumento en la cantidad de células TRAP<sup>+</sup>, marcadoras de un proceso osteoclástico y un aumento en la expresión de sus transcritos. Así, demostraron que existiría una relación entre los procesos inflamatorios mediados por IL-34, la expresión del gen *ACP5* y la EA<sup>330</sup>.

En un trabajo previo del 2011 estudiaron la relación entre la proteína RAGE y la activación osteoclástica en otro modelo murino de EA [Tg2576, que sobreexpresa la mutación Sweedish (KM670/671NL) en el gen de APP]. En este trabajo, vieron un aumento en la cantidad de APP sweedish presente en macrófagos de la médula ósea y osteoclastos y que la presencia de esa mutación generaría una disminución de los osteoclastos en edades avanzadas de los roedores (marcados por expresión de TRAP). Esta disminución se vio asociada a un incremento en la expresión de RAGE en los roedores envejecidos.

Si bien estos resultados en roedores apoyan la relevancia de *ACP5* en EA, queda poco claro el mecanismo por el cual los resultados observados a nivel óseo estarían asociados al deterioro cognitivo. Es probable que ambos fenotipos se deban más a la desregulación del sistema inmune (probablemente mediados por RAGE) que a una función de *ACP5* a nivel cognitivo. De todas formas, ante la falta de trabajos asociados al

estudio de este gen, sería interesante profundizar en los mecanismos en los que está involucrado, en diversos tejidos. En términos de estudios basados con CMPIh, sería muy interesante realizar co-cultivos con microglía derivadas de las CMPIh de pacientes portadores de variantes asociadas a EA.

Con respecto al gen *GPD1*, éste codifica para la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, cuya función es reducir la dihidroxiacetona fosfato a glicerol-3 fosfato, para ser subsecuentemente desfosforilado a glicerol. En trabajo de utilizando el ratón APP/PS1 (mutación Swedish en APP en conjunto con una delección del exón 9 del gen de *PSEN1*), realizaron análisis de espectrometría de masa de suero (UHPLC-MS y GC-MS) para estudiar el perfil metabólico con el fin de obtener biomarcadores de EA. Encontraron al Glicerol-3-fosfato como un potencial biomarcador por la técnica de GC-MS. En humanos, por otro lado, se encontraron diferencias en la presencia de glicerol-3 fosfato en la orina de pacientes de EA al compararlo con controles sanos<sup>331</sup>. En nuestros resultados encontramos una regulación positiva de este marcador en neuronas corticales derivadas de las líneas con variantes asociadas a EA con respecto a las neuronas derivadas de la línea de CMPIh *PSEN1* WT. Si bien la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa es citoplasmática, posee un rol en el metabolismo mitocondrial y, como se ha planteado anteriormente, existe una asociación entre estrés mitocondrial y EA (hipótesis de la cascada mitocondrial). Por este motivo, resultaría interesante realizar ensayos de actividad mitocondrial en nuestro modelo neuronal para estudiar el perfil metabólico de nuestras líneas.

*PROKR2* codifica para el receptor de prokineticina 2. Prokineticina 2 es un péptido que está ampliamente distribuido en el sistema nervioso e influye en una variedad de funciones cerebrales, como el dolor, la ingesta de alimentos y los ritmos circadianos y es capaz de mediar su señalización a través de dos receptores acoplados a proteínas G diferentes, designados como receptor de prokineticina 1 (PKR1) y receptor de prokineticina 2 (PKR2), aunque este último es el que está expresado a nivel del sistema nervioso<sup>332</sup>. En un estudio del 2015 en ratas inyectadas con A $\beta$  en hipocampo y corteza, se observaron niveles aumentados de ARNm de PROK2 y sus receptores PKR1 y PKR2 en respuesta a A $\beta$  en cultivos de neuronas corticales primarios y tejidos cerebrales de ratas, lo que sugiere su participación en la patología de la EA<sup>333</sup>. El uso de un antagonista de PKR protegió a las neuronas corticales de la toxicidad inducida por A $\beta$  al reducir los niveles de PROK2 y restauró la función sináptica normal en modelos de ratones con EA sin afectar los procesos neuronales básicos. A su vez, la administración de PC1, un antagonista de los receptores de prokineticina en neuronas y astrocitos del hipocampo de ratas transfundidas con A $\beta$ <sub>1-42</sub>, mejoró la capacidad de aprendizaje y restableció el equilibrio del sistema de prokinetina (el cual había mostrado una mayor



expresión de proquinetina 2 y sus receptores ante el insulto con  $A\beta_{1-42}$ )<sup>334</sup>. Si bien existe una creciente lista de estudios en roedores que apoyan estos resultados, hasta el momento no se han realizado estudios en humanos que permitan corroborar estos datos<sup>335</sup>. Así, los modelos de CMPih derivados de pacientes podrían funcionar como plataformas para complementar y validar estos hallazgos.

*GRIN2A* codifica para subunidad 2A del receptor ionotrópico de glutamato NMDA, un receptor permeable a iones de calcio cuya activación resulta en el ingreso de sodio y calcio a neuronas post-sinápticas. La relación entre los niveles de expresión de este gen y la severidad de la EA han sido establecidos anteriormente. En un trabajo de Du y colaboradores, ratas Wistar tratadas intracranealmente con un shRNA contra *GRIN2A* e inyectadas posteriormente con preparados de  $A\beta_{1-42}$  presentaron un fenotipo más agudo de deterioro cognitivo y procesos de memoria (medido por *Barnes maze* y *novel object recognition*) como así también alteraciones a nivel sináptico e identificaron un rol protector de los astrocitos<sup>336</sup>. Por otro lado, Zhang y colaboradores corroboraron que el *knockdown* de *GRIN2A* en astrocitos de hipocampo de ratas Sprague Dawley en experimentos de privación del sueño, disminuye el éxito en ensayos cognitivos en rata como así también una elevación de los niveles de  $A\beta_{1-42}$  hipocampales<sup>337</sup>.

Si bien en neuronas corticales nuestros resultados mostraron una regulación positiva del gen *GRIN2A* en la línea FFAD1 (*PSEN1* T119I) con respecto a la línea UOWoo2i-A (*PSEN1* WT), la línea UOWoo3i-A (*PSEN1* A246E) presentó una tendencia opuesta, que va de la mano de lo presentado en los trabajos anteriores.

Identificamos además como DE a *ICAM4*, que codifica para la molécula de adhesión intercelular 4. Otra molécula de adhesión intercelular (*ICAM1*) fue identificada hasta el momento en tejidos *post-mortem* de pacientes de EA. Y en particular, en astrocitos asociados a placas amiloides<sup>338</sup>. Las células de adhesión se han visto implicadas en la manutención de los botones sinápticos y su desregulación asociada a desordenes neurológicos<sup>339</sup>. Si bien *ICAM4* no ha sido asociada a patologías neurológicas sino más bien a patologías hematológicas, se ha observado su expresión en cerebro (GeneCards).

Otro gen DE fue *ADAMTS15*, que codifica para la proteína ADAMTS-15 que forma parte de un grupo de 19 proteasas (*ADAMTS1* a *ADAMTS20*). En particular *ADAMTS-15* es capaz de procesar agregano<sup>340</sup>. Hasta el momento no se lo ha relacionado con el desarrollo de EA.

*HSPA6*, por otro lado, codifica para la proteína de la familia de respuesta al choque térmico A, miembro 6. Forma parte de la familia de las proteínas de respuesta al choque térmico (del inglés, *Heat Shock proteins*). *HSPA6* está presente en el genoma humano, pero no en genomas murinos<sup>341</sup> y se ha asociado a la respuesta a la

proteotoxicidad, es decir, al daño celular producido por la acumulación de proteínas mal plegadas. En hipocampos *post-mortem* de pacientes con EA de inicio tardío se observó una regulación positiva de este gen al compararlo con muestras de cerebros sanos<sup>342</sup>. Interessantemente, este trabajo también mostró una regulación positiva de *NOS3*, *UAP1L1*, *SPP1*, *ANKRD18B*, (opuesto a nuestros resultados obtenidos por el análisis del RNA-seq) y una regulación negativa de *TUBA4A*, *NCEH1* (similar a nuestros resultados), *HCN1*, *ACVR1C*, *GPD1*, *GRIN2A*, *CRYM* (en contra de nuestros resultados). *UAP1L1*, *SPP1*, *ANKRD18B*, *NCEH1*, *HCN1*, *ACVR1C* y *CRYM* son genes que, si bien no validamos mediante RT-qPCR, si encontramos DE en nuestro análisis *in silico*, lo que apoya que estos genes se vean afectados en esta patología. Existe la posibilidad de que las diferencias observadas entre nuestros resultados y los de dicho estudio se deban al tipo celular estudiado. Sería interesante realizar estudios diferenciando las CMPih a neuronas hipotalámicas con el fin de corroborar estos resultados. En otro trabajo donde analizaron la expresión diferencial de genes en extractos *post mortem* de plexo coróide de pacientes con EA versus control, también se observó una regulación positiva de *HSPA6*<sup>343</sup>. Estos resultados podrían indicarnos que las vías que afectan a las diversas regiones de nuestro cerebro son diversas, lo que podría indicar una vulnerabilidad sitio-específica.

Los resultados reportados por estos trabajos respaldan lo que observamos en neuronas corticales derivadas de la línea UOWoo3i-A (*PSEN1* p.A246E), donde detectamos una tendencia al aumento de la expresión con respecto a neuronas derivadas de la línea *PSEN1* WT. A su vez, en un trabajo realizado en células SH-SY5Y (línea celular humana inmortalizada derivada de neuroblastoma de médula ósea) diferenciadas a neuronas se ha demostrado un aumento en su expresión proteica de *HSPA6* ante el tratamiento con MG132, un compuesto que inhibe al proteasoma, induciendo la deposición de agregados proteicos. A su vez, se ha observado que su ubicación es exclusivamente citoplasmática y periférica a la ubicación de los agregados proteicos<sup>344</sup>.

Por otro lado, *TMEM87B* codifica para la proteína transmembrana 87B, la cual se ha visto que está involucrada en el transporte anterógrado hacia el aparato de Golgi<sup>345</sup>. Es una proteína poco estudiada, cuya literatura hasta el momento cuenta con solamente 20 trabajos (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/> última revisión: 06/04/2024). En particular, se ha observado que mutaciones de pérdida de función en hemicigosis han generado casos de microcefalia y problemas cardíacos por lo cual se considera que su pérdida en homocigosis resultaría deletérea<sup>346</sup>. Hasta el momento no se la ha asociado a EA.

*RGPD2*, otro de los DE validados, codifica para la proteína que contienen dominio GRIP similares a RanBP2. Los genes *RGPD* (Proteínas que contienen dominio GRIP similares a RanBP2) se originan del gen *RANBP2*, el cual codifica para una

proteína de unión a Ran que interactúa con el complejo del poro nuclear<sup>347</sup>. Esta familia de genes *RGPD* ha experimentado una expansión a siete copias dispersas en el cromosoma humano 2 a través de duplicación segmentaria. La proteína *RANBP2* codificada por el gen progenitor se encuentra principalmente en la periferia del envoltorio nuclear, y se considera necesaria para la importación y exportación de carga celular. Si bien no se conocen los procesos en los que se involucran las *RGDP*, *RANBP2* ha sido asociada a múltiples funciones y asociada a enfermedades neurodegenerativas<sup>348</sup>. Al ser un grupo de proteínas que emergieron hace tan poco en la escala evolutiva, aún se están intentando dilucidar sus funciones.

*THSD1*, también conocida como trombospondina tipo 1 dominio conteniendo proteína 1, es una molécula que posee un dominio característico de trombospondina tipo 1. Se ha establecido una conexión entre esta proteína y procesos fundamentales como la adhesión celular a la matriz extracelular. Los estudios realizados tanto en modelos animales como en análisis genéticos de pacientes con aneurismas intracraneales han revelado asociaciones significativas entre las alteraciones en *THSD1* y la predisposición a hemorragias y aneurismas en el cerebro<sup>349–351</sup>. Aunque hasta ahora no se ha establecido una asociación directa entre *THSD1* y la EA, nuestros resultados nos llevan a querer explorar esta relación en profundidad. Este interés surge especialmente a raíz de las investigaciones recientes que sugieren una posible superposición entre la EA y las enfermedades cerebrovasculares, como la angiopatía amiloide cerebral<sup>352</sup>. La angiopatía amiloide cerebral, caracterizada por la acumulación de depósitos de proteína amiloide en los vasos sanguíneos del cerebro, ha sido identificada como un factor de riesgo potencialmente relevante en el desarrollo y progresión de la EA. Por lo tanto, el estudio de *THSD1* podría proporcionar una comprensión más completa de los mecanismos subyacentes tanto de la EA como de las enfermedades cerebrovasculares, lo que podría tener importantes implicaciones tanto para la prevención como para el tratamiento de estas condiciones médicas complejas.

Por último, *TRPC6* codifica para el Canal de Cationes de la Subfamilia C del Receptor Potencial Transitorio, Miembro 6. El mismo ha surgido como un potencial actor en la patogénesis de la EA<sup>353</sup>. Esto es porque posee un rol en las vías de señalización mediadas por calcio, y estas han sido fuertemente asociadas a la función y supervivencia neuronal. La desregulación de la homeostasis del calcio ha sido implicada en varias enfermedades neurodegenerativas, incluida la EA (ver introducción “Hipótesis de la homeostasis del calcio”). Paradójicamente, los estudios previos realizados sobre ese gen difieren de los obtenidos en la presente tesis. Trabajos realizados sobre pacientes de EA (sin distinción entre EAF y EAs) demostraron una disminución en los niveles de transcripto de *TRPC6* en sangre<sup>354,355</sup>. Un trabajo de 2015 de Wang y colaboradores describió que la

proteína TRPC6 inhibe el procesamiento de APP a través de su dominio transmembrana 2 y que las mutaciones en ese sitio anulan el efecto inhibitorio de TRPC6 sobre el procesamiento de APP en células HEK293<sup>356</sup>. En este trabajo, los investigadores observaron una disminución en los péptidos A $\beta$ <sub>40</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub>, pero no analizan qué sucede con la relación entre ambos. Posteriormente, en un trabajo del mismo grupo se utilizaron CMPih de pacientes de EAe y controles no relacionados los cuales diferenciaron a neuronas corticales utilizando un protocolo combinado de neurorosetas y doble inhibición de SMAD<sup>357</sup>. En el mismo, observaron que las neuronas derivadas de CMPih de pacientes de EAe presentaban una disminución en los niveles proteicos y de ARNm de este gen. Posteriormente, aumentando los niveles de TRPC6, los investigadores observaron una disminución en los niveles de A $\beta$ <sub>40</sub> y A $\beta$ <sub>42</sub> como así también una disminución de Tau total y de la fosforilación en Tau [pT231]. En este sentido, sería interesante profundizar en su estudio utilizando CMPih de pacientes de EAF como EAs, ya que esto también podría dar cuenta de las diferencias observadas a nivel fenotípico entre las diferentes presentaciones de EA.

Los resultados obtenidos en la presente tesis representan un avance significativo en el campo de la investigación sobre la enfermedad de Alzheimer. La introducción de nuevas herramientas, como la generación de una línea de células madre pluripotentes inducidas a partir de un paciente portador de la mutación p.T119I en el gen de *PSEN1*, no solo llena una brecha importante en la disponibilidad de modelos celulares humanos para estudiar esta enfermedad, sino que también proporciona una plataforma valiosa para investigaciones futuras. En un momento donde la disponibilidad de líneas celulares humanas es limitada, nuestra contribución abre nuevas posibilidades para comprender los mecanismos subyacentes de la enfermedad y desarrollar enfoques terapéuticos más precisos y efectivos.

Además, los hallazgos de nuestra investigación respaldan la hipótesis de que la mutación examinada posee un rol patogénico en la EA de herencia autosómica dominante. A su vez, mediante el análisis de RNA-seq de neuronas corticales derivadas de CMPih hemos identificado alteraciones en genes previamente asociados con la enfermedad, así como pistas sobre posibles genes novedosos que podrían tener una relevancia más amplia en todos los casos de Alzheimer familiar. Estos descubrimientos no solo arrojan luz sobre los mecanismos moleculares subyacentes de la enfermedad, sino que también abren nuevas perspectivas para la identificación de objetivos terapéuticos y el desarrollo de enfoques de tratamiento más específicos y personalizados. En conjunto, los resultados de esta tesis subrayan la importancia de una investigación continua y detallada en el campo de la EA y su potencial para impulsar avances

significativos en la comprensión y el tratamiento de esta devastadora enfermedad neurodegenerativa.

# CONCLUSIONES

A partir de la presente tesis se desprenden las siguientes conclusiones generales:

- Generamos una línea HEK239T KO para *PSEN1* y la utilizamos para estudiar *in vitro* el procesamiento de APP sobreexpresando plásmidos *APP* WT y *PSEN1* WT, *PSEN1* p.T119I o *PSEN1* p.A246E y midiendo por ELISA los niveles intracelulares de  $A\beta_{42}$  y  $A\beta_{40}$ . Los resultados no aportaron datos que avalen la hipótesis de nuestro trabajo en lo que respecta a la patogenicidad de la variante *PSEN1* p.T119I. Existe la posibilidad de que esto se deba a problemas en la glicosilación de APP y su localización en membrana.
- Reprogramamos una línea de CMPih portadora de la variante *PSEN1* p.T119I derivada de un paciente masculino con diagnosticado con EAF que presentó morfología típica de CMPih (relación núcleo/citoplasma alto y colonias de borde definido), actividad de fosfatasa alcalina, marcadores endógenos de pluripotencia y capacidad de diferenciarse a las tres líneas germinales.
- Obtuvimos neuronas corticales a partir de la diferenciación de CMPih derivadas de pacientes de EAF (*PSEN1* p.T119I y *PSEN1* p.A246E) y una línea control (*PSEN1* WT). Validamos sus fenotipos mediante RT-qPCR, inmunomarcación y citometría de flujo. Logramos obtener con alta eficiencia (porcentaje de células TUJ-1 positivas mayor al 87%) neuronas que presentaban marcadores corticales (TBR1, TBR2 y CTIP2).
- Realizamos mediciones por ELISA de los péptidos  $A\beta_{40}$  y  $A\beta_{42}$  en extractos proteicos (niveles intracelulares) de neuronas corticales en 2D y encontramos un aumento de la relación entre los péptidos  $A\beta_{42/40}$  en las neuronas derivadas de las líneas FFAD1 (*PSEN1* p.T119I) y UOW003i-A (*PSEN1* p.A246E) con respecto a las derivadas de la línea UOW002i-A (*PSEN1* WT). Observamos una tendencia al aumento de  $A\beta_{42}$  en ambas líneas portadoras de variantes al analizar los sobrenadantes de los cultivos neuronales. Por último, observamos un aumento estadísticamente significativo en los niveles de en la fosforilación de Tau en serina 231 en las neuronas corticales derivadas de ambas líneas portadoras de variantes. Estos resultados apoyan el rol patogénico de la variante *PSEN1* p.T119I.

- Generamos organoides neurales a partir de CMPih derivadas de pacientes de EAF (*PSEN1* p.T119I y *PSEN1* p.A246E) y una línea control (*PSEN1* WT) y los validamos por inmunomarcación de marcadores neuronales incipientes, maduros, post-mitóticos y corticales como así también la presencia de marcadores astrocitarios. Concluimos que los organoides generados presentaban un fenotipo cortical.
- Analizamos por inmunotinción la presencia de agregados de A $\beta$ <sub>42</sub> en cortes histológicos de organoides cerebrales. Este análisis reveló una deposición generalizada de placas de A $\beta$  en los organoides derivados de las líneas portadoras de variantes de EA y solo 3 cortes con presencia de marca específica en los organoides derivados de *PSEN1* WT. Realizamos, además, mediciones por ELISA de los niveles de los péptidos A $\beta$ <sub>42</sub> en sobrenadantes de organoides cerebrales y encontramos una disminución en los niveles de A $\beta$ <sub>42</sub> en los organoides derivados de las líneas con mutaciones en *PSEN1*. A su vez, detectamos un aumento en la fosforilación de Tau en serina 231 al realizar mediciones por ELISA en lisados celulares de organoides, de forma similar a lo obtenido en cultivos en 2D.
- A partir del análisis del transcriptoma de neuronas corticales derivadas de CMPih FFAD1 (*PSEN1* p.T119I) y UOWoo2i-A (*PSEN1* WT) concluimos que 85 genes se expresaron diferencialmente entre ambas líneas celulares. La regulación de los genes *PROKR2*, *RGDP2*, *ADAMTS15*, *THSD1*, *TRP6*, *GPD1* y *GRIN2A* (aumento de los niveles de expresión de ARNm) y *ACP5*, *ICAM4*, *NOS3*, *TUBA4A*, *TMEM87B* y *HSPA6* (disminución de los niveles de expresión de ARNm) fue validada experimentalmente mediante RT-qPCR en neuronas corticales derivadas de CMPih de las líneas FFAD1 (*PSEN1* p.T119I) y UOWoo2i-A (*PSEN1* WT).
- Analizamos los niveles de expresión de ARNm de neuronas corticales derivadas de la línea UOWoo3i-A (*PSEN1* p.A246E) y los comparamos con los datos obtenidos de las líneas FFAD1 (*PSEN1* p.T119I) y UOWoo2i-A (*PSEN1* WT). Observamos que los genes *TUBA4A*, *NOS3*, *ACP5*, *TRPC6*, *THSD1*, *GPD1* y *PROKR2* siguen un perfil de regulación similar entre ambas líneas celulares, postulándolos como potenciales blancos farmacológicos de EA.



- Por último, nuestros datos apoyan la hipótesis de que la mutación *PSEN1* p.T119I está involucrada en desarrollo de la EAF.

# REFERENCIAS

1. Maurer, K., Volk, S. & Gerbaldo, H. Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet* **349**, 1546–1549 (1997).
2. International, D. World Alzheimer Report 2019: Attitudes to dementia; World Alzheimer Report 2019: Attitudes to dementia.
3. Alzheimer's Association. 2020 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's and Dementia* **16**, 391–460 (2020).
4. Wang, J.-T. *et al.* The impacts of health insurance and resource on the burden of Alzheimer's disease and related dementias in the world population. *Alzheimer's & Dementia* (2022) doi:10.1002/ALZ.12730.
5. Serrano-Aguilar, P. G., Lopez-Bastida, J. & Yanes-Lopez, V. Impact on Health-Related Quality of Life and Perceived Burden of Informal Caregivers of Individuals with Alzheimer's Disease. *Neuroepidemiology* **27**, 136–142 (2006).
6. Iavarone, A., Ziello, A. R., Pastore, F., Fasanaro, A. M. & Poderico, C. Caregiver burden and coping strategies in caregivers of patients with Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat* **10**, 1407 (2014).
7. Castro, D. M., Dillon, C., Machnicki, G. & Allegri, R. F. The economic cost of Alzheimer's disease Family or public-health burden? *Views & Reviews Dement Neuropsychol* **4**, 262–267 (2010).
8. Karanth, S. *et al.* Prevalence and Clinical Phenotype of Quadruple Misfolded Proteins in Older Adults. *JAMA Neurol* **77**, 1299–1307 (2020).
9. Scheltens, P. *et al.* Alzheimer's disease. *The Lancet* **397**, 1577–1590 (2021).
10. Dubois, B. *et al.* Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria. *Alzheimer's and Dementia* vol. 12 292–323 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.02.002> (2016).
11. Sperling, R. A. *et al.* Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement* **7**, 280 (2011).
12. Petersen, R. C. Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *J Intern Med* **256**, 183–194 (2004).
13. Prendecki, M. *et al.* Normal Aging and Dementia. *Update on Dementia* (2016) doi:10.5772/64203.
14. Rowe, C. C. *et al.* Imaging  $\beta$ -amyloid burden in aging and dementia. *Neurology* **68**, 1718–1725 (2007).
15. Weiner, M. W. *et al.* 2014 Update of the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: A review of papers published since its inception. *Alzheimer's and Dementia* **11**, e1–e120 (2015).
16. Lee, J. C., Kim, S. J., Hong, S. & Kim, Y. Diagnosis of Alzheimer's disease utilizing amyloid and tau as fluid biomarkers. doi:10.1038/s12276-019-0250-2.
17. Rabinovici, G. D. *et al.* 11C-PIB PET imaging in Alzheimer disease and frontotemporal lobar degeneration. *Neurology* **68**, 1205–1212 (2007).
18. Hunt, A. *et al.* CSF tau protein and FDG PET in patients with aging-associated cognitive decline and Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat* **2**, 207 (2006).

19. Frisoni, G. B., Fox, N. C., Jack, C. R., Scheltens, P. & Thompson, P. M. The clinical use of structural MRI in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* **6**, 67–77 (2010).
20. Petersen, R. C. *et al.* Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI): Clinical characterization. *Neurology* **74**, 201 (2010).
21. Parra, M. A. *et al.* Dementia in Latin America Assessing the present and envisioning the future. *Neurology* **90**, 222–231 (2018).
22. Nación, M. de salud de la. Análisis de mortalidad en personas mayores 2010-2019. Argentina. 28 (2021).
23. Peter J Whitehouse, Donald L Price, Robert G Struble, Arthur W Clark, Joseph T Coyle, M. R. D. Alzheimer's Disease and Senile Dementia: Loss of Neurons In the Basal Forebrain. *Science* (1979) **215**, 1237–1239 (1982).
24. Fuentes, P. & Slachevsky, A. An update on the pharmacological treatment of Alzheimer disease. *Rev Med Chil* **133**, 224–230 (2005).
25. Robinson, D. M. & Keating, G. M. Memantine: A review of its use in Alzheimer's disease. *Drugs* **66**, 1515–1534 (2006).
26. Shi, M., Chu, F., Zhu, F. & Zhu, J. Impact of Anti-amyloid- $\beta$  Monoclonal Antibodies on the Pathology and Clinical Profile of Alzheimer's Disease: A Focus on Aducanumab and Lecanemab. *Front Aging Neurosci* **14**, (2022).
27. Mendez, M. F. Early-Onset Alzheimer Disease. *Neurol Clin* **35**, 263–281 (2017).
28. Sirkis, D. W., Bonham, L. W., Johnson, T. P., La Joie, R. & Yokoyama, J. S. Dissecting the clinical heterogeneity of early-onset Alzheimer's disease. *Molecular Psychiatry* 2022 27:6 **27**, 2674–2688 (2022).
29. Tellechea, P. *et al.* Early- and late-onset Alzheimer disease: Are they the same entity? *Neurología* **33**, 244–253 (2018).
30. Mahley, R. W. Apolipoprotein E: Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* (1979) **240**, 622–630 (1988).
31. Huang, Y. & Mahley, R. W. Apolipoprotein E: Structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases. *Neurobiol Dis* **72**, 3–12 (2014).
32. Grøntvedt, G. R. *et al.* Alzheimer's disease. *Current Biology* **28**, R645–R649 (2018).
33. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, P.-V. MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* (1979) **216**, 921–923 (1993).
34. Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC Jr, Rimmler JB, Locke PA, Conneally PM, Schmader KE, et al. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet* **7**, 180–184 (1994).
35. Gatz, M. *et al.* Role of Genes and Environments for Explaining Alzheimer Disease. *Arch Gen Psychiatry* **63**, 168–174 (2006).
36. Lambert, J. C. *et al.* Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nature Genetics* 2013 45:12 **45**, 1452–1458 (2013).
37. Bellenguez, C. *et al.* New insights into the genetic etiology of Alzheimer's disease and related dementias. *Nature Genetics* 2022 54:4 **54**, 412–436 (2022).

38. Cuyvers, E. & Sleegers, K. Genetic variations underlying Alzheimer's disease: Evidence from genome-wide association studies and beyond. *Lancet Neurol* **15**, 857–868 (2016).
39. Scheltens, P. *et al.* Alzheimer's disease. *The Lancet* **397**, 1577–1590 (2021).
40. Scheltens, P. *et al.* Alzheimer's disease. *The Lancet* **388**, 505–517 (2016).
41. Schellenberg, G. D. *et al.* Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science* **258**, 668–671 (1992).
42. Levy-Lahad, E. *et al.* A Familial Alzheimer's Disease Locus on Chromosome 1. *Science* (1979) **269**, 970–973 (1995).
43. Rogaev, E. I. *et al.* Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* **376**, 775–778 (1995).
44. Levy-Lahad, E. *et al.* Candidate Gene for the Chromosome 1 Familial Alzheimer's Disease Locus. *Science* (1979) **269**, 973–977 (1995).
45. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin JF, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Da S, S. G.-H. PH. Cloning of a gene bearing missense mutations in early onset familial Alzheimer's disease: A Calabrian study. *Nature* vol. 13 257–261 Preprint at (1995).
46. Jurisch-Yaksi, N., Sannerud, R. & Annaert, W. A fast growing spectrum of biological functions of  $\gamma$ -secretase in development and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1828**, 2815–2827 (2013).
47. Haass, C. & Selkoe, D. J. Cellular Processing of P-Amyloid Precursor Protein and the Genesis of Amyloid P-Peptide Minireview. *Cell* **75**, 1039–1042 (1993).
48. Haapasalo, A. & Kovacs, D. M. The Many Substrates of Presenilin/ $\gamma$ -Secretase. *Journal of Alzheimer's Disease* **25**, 3–28 (2011).
49. De Strooper, B. Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin Generate an Active  $\gamma$ -Secretase Complex. *Neuron* **38**, 9–12 (2003).
50. Kimberly, W. T. *et al.* Secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, aph-1, and pen-2.
51. Sato, T. *et al.* Active  $\gamma$ -Secretase Complexes Contain Only One of Each Component. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 33985–33993 (2007).
52. Leem, J. Y. *et al.* Presenilin 1 is required for maturation and cell surface accumulation of nicastrin. *J Biol Chem* **277**, 19236–19240 (2002).
53. Kaether, C., Haass, C. & Steiner, H. Assembly, trafficking and function of  $\gamma$ -secretase. *Neurodegener Dis* **3**, 275–283 (2006).
54. Steiner, H. *et al.* PEN-2 is an integral component of the gamma-secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin. *J Biol Chem* **277**, 39062–39065 (2002).
55. Gertsik, N., Chiu, D. & Li, Y. M. Complex regulation of  $\gamma$ -secretase: From obligatory to modulatory subunits. *Front Aging Neurosci* **7**, 342 (2015).
56. LaVoie, M. J. *et al.* Assembly of the  $\gamma$ -Secretase Complex Involves Early Formation of an Intermediate Subcomplex of Aph-1 and Nicastrin. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 37213–37222 (2003).
57. Shah, S. *et al.* Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell* **122**, 435–447 (2005).

58. Dries, D. R. *et al.* Glu-333 of Nicastrin Directly Participates in  $\gamma$ -Secretase Activity\*. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 29714–29724 (2009).
59. Petit, D. *et al.* Extracellular interface between APP and Nicastrin regulates A $\beta$  length and response to  $\gamma$ -secretase modulators. *EMBO J* **38**, (2019).
60. Shirotani, K., Edbauer, D., Prokop, S., Haass, C. & Steiner, H. Identification of Distinct-Secretase Complexes with Different APH-1 Variants\*. (2004) doi:10.1074/jbc.M405768200.
61. Serneels, L. *et al.* Differential contribution of the three Aph1 genes to  $\gamma$ -secretase activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1719–1724 (2005).
62. Kaether, C. *et al.* The presenilin C-terminus is required for ER-retention, nicastrin-binding and  $\gamma$ -secretase activity. *EMBO J* **23**, 4738 (2004).
63. Laudon, H. *et al.* A nine-transmembrane domain topology for presenilin 1. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 35352–35360 (2005).
64. Doan, A. *et al.* Protein topology of presenilin 1. *Neuron* **17**, 1023–1030 (1996).
65. Ratovitski, T. *et al.* Endoproteolytic processing and stabilization of wild-type and mutant presenilin. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 24536–24541 (1997).
66. Thinakaran, G. *et al.* Endoproteolysis of Presenilin 1 and Accumulation of Processed Derivatives In Vivo. *Neuron* **17**, 181–190 (1996).
67. Wolfe, M. S. *et al.* Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* **398**, 513–517 (1999).
68. Kim, S. H. & Sisodia, S. S. A sequence within the first transmembrane domain of PEN-2 is critical for PEN-2-mediated endoproteolysis of presenilin 1. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 1992–2001 (2005).
69. Steiner, H. *et al.* PEN-2 is an integral component of the  $\gamma$ -secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 39062–39065 (2002).
70. Podlisny, M. B. *et al.* Presenilin Proteins Undergo Heterogeneous Endoproteolysis between Thr291 and Ala299 and Occur as Stable N- and C-Terminal Fragments in Normal and Alzheimer Brain Tissue. *Neurobiol Dis* **3**, 325–337 (1997).
71. Capell, A. *et al.*  $\gamma$ -secretase complex assembly within the early secretory pathway. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 6471–6478 (2005).
72. Kim, J. *et al.* Biogenesis of  $\gamma$ -secretase early in the secretory pathway. *Journal of Cell Biology* **179**, 951–963 (2007).
73. Wong, E., Frost, G. R. & Li, Y. M.  $\gamma$ -Secretase Modulatory Proteins: The Guiding Hand Behind the Running Scissors. *Front Aging Neurosci* **12**, 614690 (2020).
74. Fluhner, R., Friedlein, A., Haass, C. & Walter, J. Phosphorylation of Presenilin 1 at the Caspase Recognition Site Regulates Its Proteolytic Processing and the Progression of Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 1585–1593 (2004).
75. Walter, J., Schindzielorz, A., Grünberg, J. & Haass, C. Phosphorylation of presenilin-2 regulates its cleavage by caspases and retards progression of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1391–1396 (1999).
76. Sannerud, R. *et al.* Restricted Location of PSEN2/ $\gamma$ -Secretase Determines Substrate Specificity and Generates an Intracellular A $\beta$  Pool. *Cell* **166**, 193–208 (2016).

77. Wong, P. C. *et al.* Presenilin 1 is required for Notch1 and Dll1 expression in the paraxial mesoderm. *Nature* **387**, 288–292 (1997).
78. Hartmann, D., De Strooper, B. & Saftig, P. Presenilin-1 deficiency leads to loss of Cajal-Retzius neurons and cortical dysplasia similar to human type 2 lissencephaly. *Curr Biol* **9**, 719–727 (1999).
79. Shen, J. *et al.* Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice. *Cell* **89**, 629–639 (1997).
80. Sun, X., Chen, W. D. & Wang, Y. D.  $\beta$ -Amyloid: The key peptide in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Front Pharmacol* **6**, 164010 (2015).
81. Hardy, J. A. & Higgins, G. A. Alzheimer's Disease: The Amyloid Alzheimer's disease. *Science* (1979) **256**, 184–185 (1992).
82. Long, J. M. & Holtzman, D. M. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell* **179**, 312–339 (2019).
83. Fortea, J. *et al.* Alzheimer's disease associated with Down syndrome: a genetic form of dementia. *Lancet Neurol* **20**, 930–942 (2021).
84. Lehmann, S. *et al.* Relevance of A $\beta$ 42/40 ratio for detection of Alzheimer disease pathology in clinical routine: The PLMR scale. *Front Aging Neurosci* **10**, 325959 (2018).
85. Hampel, H. *et al.* The Amyloid- $\beta$  Pathway in Alzheimer's Disease. *Mol Psychiatry* **26**, 5481–5503 (2021).
86. Mawuenyega, K. G. *et al.* Decreased clearance of CNS  $\beta$ -amyloid in Alzheimer's disease. *Science* (1979) **330**, 1774 (2010).
87. Zhang, Y., Chen, H., Li, R., Sterling, K. & Song, W. Amyloid  $\beta$ -based therapy for Alzheimer's disease: challenges, successes and future. doi:10.1038/s41392-023-01484-7.
88. Mahase, E. Aducanumab: European agency rejects Alzheimer's drug over efficacy and safety concerns. *BMJ* **375**, n3127 (2021).
89. Vaz, M., Silva, V., Monteiro, C. & Silvestre, S. Role of Aducanumab in the Treatment of Alzheimer's Disease: Challenges and Opportunities. *Clin Interv Aging* **17**, 797–810 (2022).
90. Davies, P. & Maloney, A. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *The Lancet* **308**, 1403 (1976).
91. Rossor, M. N., Iversen, L. L., Reynolds, G. P., Mountjoy, C. Q. & Roth, M. Neurochemical characteristics of early and late onset types of Alzheimer's disease. *Br Med J (Clin Res Ed)* **288**, 961 (1984).
92. Oda, Y. Choline acetyltransferase: The structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathol Int* **49**, 921–937 (1999).
93. Wilcock, G. K., Esiri, M. M., Bowen, D. M. & Smith, C. C. T. Alzheimer's disease: Correlation of cortical choline acetyltransferase activity with the severity of dementia and histological abnormalities. *J Neurol Sci* **57**, 407–417 (1982).
94. Bowen, D. M., Smith, C. B., White, P. & Davison, A. N. NEUROTRANSMITTER-RELATED ENZYMES AND INDICES OF HYPOXIA IN SENILE DEMENTIA AND OTHER ABIOTROPHIES. *Brain* **99**, 459–496 (1976).
95. Whitehouse, P. J. *et al.* Alzheimer's Disease and Senile Dementia: Loss of Neurons in the Basal Forebrain. *Science* (1979) **215**, 1237–1239 (1982).
96. Deardorff, W. J., Feen, E. & Grossberg, G. T. The Use of Cholinesterase Inhibitors Across All Stages of Alzheimer's Disease. *Drugs Aging* **32**, 537–547 (2015).

97. Knight, R., Khondoker, M., Magill, N., Stewart, R. & Landau, S. A Systematic Review and Meta-Analysis of the Effectiveness of Acetylcholinesterase Inhibitors and Memantine in Treating the Cognitive Symptoms of Dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* **45**, 131–151 (2018).
98. Mattson, M. P. *et al.* p-Amyloid Peptides Destabilize Calcium Homeostasis and Render Human Cortical Neurons Vulnerable to Excitotoxicity. *The Journal of Neuroscience* **12**, 376–389 (1992).
99. Josephs, K. A. *et al.* Rates of hippocampal atrophy and post-mortem TDP-43 in Alzheimer's disease: a longitudinal retrospective study. *Lancet Neurol* **16**, 917 (2017).
100. Meldrum, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr* **130**, 1007S–15S (2000).
101. Mattson, M. P. Antigenic changes similar to those seen in neurofibrillary tangles are elicited by glutamate and Ca<sup>2+</sup> influx in cultured hippocampal neurons. *Neuron* **4**, 105–117 (1990).
102. McKee, A. C., Kosik, K. S., Kennedy, M. B. & Kowall, N. W. Hippocampal Neurons Predisposed to Neurofibrillary Tangle Formation Are Enriched in Type II Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase. *J Neuropathol Exp Neurol* **49**, 49–63 (1990).
103. Ko, H.-J. *et al.* Clinical Medicine GSKIP-Mediated Anchoring Increases Phosphorylation of Tau by PKA but Not by GSK3 $\beta$  via cAMP/PKA/GSKIP/GSK3/Tau Axis Signaling in Cerebrospinal Fluid and iPSC Cells in Alzheimer Disease. *J. Clin. Med* **8**, 1751 (2019).
104. Wang, Y. J. *et al.* The expression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II- $\alpha$  in the hippocampus of patients with Alzheimer's disease and its links with AD-related pathology. *Brain Res* **1031**, 101–108 (2005).
105. Ghosh, A. & Giese, K. P. Calcium/calmodulin-dependent kinase II and Alzheimer's disease. *Mol Brain* **8**, 1–7 (2015).
106. Folch, J. *et al.* Memantine for the Treatment of Dementia: A Review on its Current and Future Applications. *Journal of Alzheimer's Disease* **62**, 1223–1240 (2018).
107. Swerdlow, R. H. & Khan, S. M. A “mitochondrial cascade hypothesis” for sporadic Alzheimer's disease. *Med Hypotheses* **63**, 8–20 (2004).
108. Ross, J. M. *et al.* Germline mitochondrial DNA mutations aggravate ageing and can impair brain development. *Nature* **501**, 412–415 (2013).
109. Trifunovic, A. *et al.* Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* **429**, 417–423 (2004).
110. Kujoth, C. C. *et al.* Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* (1979) **309**, 481–484 (2005).
111. Linnane, A. W., Ozawa, T., Marzuki, S. & Tanaka, M. MITOCHONDRIAL DNA MUTATIONS AS AN IMPORTANT CONTRIBUTOR TO AGEING AND DEGENERATIVE DISEASES. *The Lancet* **333**, 642–645 (1989).
112. Swerdlow, R. H. *et al.* Mitochondria, Cybrids, Aging, and Alzheimer's Disease. *Prog Mol Biol Transl Sci* **146**, 259–302 (2017).
113. Onyango, I. G., Tuttle, J. B. & Bennett, J. P. Altered intracellular signaling and reduced viability of Alzheimer's disease neuronal cybrids is reproduced by  $\beta$ -amyloid peptide acting through receptor for advanced glycation end products (RAGE). *Molecular and Cellular Neuroscience* **29**, 333–343 (2005).

114. Gasparini, L. *et al.* Effect of energy shortage and oxidative stress on amyloid precursor protein metabolism in COS cells. *Neurosci Lett* **231**, 113–117 (1997).
115. Webster, M.-T., Pearce, B. R., Bowen, D. M. & Francis, P. T. Energy metabolism and APP processing The effects of perturbed energy metabolism on the processing of amyloid precursor protein in PC12 cells. *J Neural Transm* **105**, 839–853 (1998).
116. Misrani, A., Tabassum, S. & Yang, L. Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* **13**, 1–20 (2021).
117. Swerdlow, R. H., Burns, J. M. & Khan, S. M. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: Progress and perspectives. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1842**, 1219–1231 (2014).
118. Hirai, K. *et al.* Mitochondrial abnormalities in Alzheimer disease. *The journal of neuroscience* **21**, 3017–3023 (2001).
119. Reynolds, A., Laurie, C., Lee Mosley, R. & Gendelman, H. E. Oxidative Stress and the Pathogenesis of Neurodegenerative Disorders. *Int Rev Neurobiol* **82**, 297–325 (2007).
120. Manczak, M. *et al.* Mitochondria are a direct site of A $\beta$  accumulation in Alzheimer's disease neurons: Implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum Mol Genet* **15**, 1437–1449 (2006).
121. Kamat, P. K. *et al.* Mechanism of Oxidative Stress and Synapse Dysfunction in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: Understanding the Therapeutics Strategies. *Mol Neurobiol* **53**, 648–661 (2016).
122. Kosik, K. S., Joachim, C. L. & Selkoe, D. J. Microtubule-associated protein tau ( $\tau$ ) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 4044–4048 (1986).
123. Grundke-Iqbal, I. *et al.* Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau ( $\tau$ ) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **83**, 4913–4917 (1986).
124. Bierer, L. M. *et al.* Neocortical Neurofibrillary Tangles Correlate With Dementia Severity in Alzheimer's Disease. *Arch Neurol* **52**, 81–88 (1995).
125. Arriagada, P. V., Growdon, J. H., Hedley-Whyte, E. T. & Hyman, B. T. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* **42**, 631–639 (1992).
126. Cleveland, D. W., Hwo, S. Y. & Kirschner, M. W. Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol* **116**, 207–225 (1977).
127. Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. Y. & Kirschner, M. W. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **72**, 1858–1862 (1975).
128. Iqbal, K., Gong, C. X. & Liu, F. Hyperphosphorylation-Induced Tau Oligomers. *Front Neurol* **4**, (2013).
129. Noble, W. *et al.* Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 6990–6995 (2005).
130. Frost, B., Jacks, R. L. & Diamond, M. I. Propagation of Tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 12845–12852 (2009).



131. Ittner, L. M. *et al.* Dendritic function of tau mediates amyloid- $\beta$  toxicity in alzheimer's disease mouse models. *Cell* **142**, 387–397 (2010).
132. Brecht, W. J. *et al.* Neuron-Specific Apolipoprotein E4 Proteolysis Is Associated with Increased Tau Phosphorylation in Brains of Transgenic Mice. *Journal of Neuroscience* **24**, 2527–2534 (2004).
133. Falzone, T. L., Gunawardena, S., McCleary, D., Reis, G. F. & Goldstein, L. S. B. Kinesin-1 transport reductions enhance human tau hyperphosphorylation, aggregation and neurodegeneration in animal models of tauopathies. *Hum Mol Genet* **19**, 4399–4408 (2010).
134. Palikaras, K., Achanta, K., Choi, S., Akbari, M. & Bohr, V. A. Alteration of mitochondrial homeostasis is an early event in a *C. elegans* model of human tauopathy. *Aging* **13**, 23876–23894 (2021).
135. Douglas G. Peters, M. S., James R. Connor & Mark D. Meadowcroft. The Relationship between Iron Dyshomeostasis and Amyloidogenesis in Alzheimer's Disease: Two Sides of the Same Coin. *Neurobiol Dis* **81**, 49–65 (2015).
136. Svobodová, H. *et al.* Elevated age-related cortical iron, ferritin and amyloid plaques in APP<sup>swe</sup>/PS1 $\Delta$ E9 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Physiol Res* **68**, S445–S451 (2019).
137. Derry, P. J. *et al.* Revisiting the intersection of amyloid, pathologically modified tau and iron in Alzheimer's disease from a ferroptosis perspective. *Prog Neurobiol* **184**, 101716 (2020).
138. Golde, T. E. Open questions for Alzheimer's disease immunotherapy. *Alzheimers Res Ther* **6**, 1–7 (2014).
139. Liu, P. P., Xie, Y., Meng, X. Y. & Kang, J. S. History and progress of hypotheses and clinical trials for alzheimer's disease. *Signal Transduct Target Ther* **4**, 1–1 (2019).
140. Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M. & Rybak, Z. Stem cells: past, present, and future. doi:10.1186/s13287-019-1165-5.
141. Sukoyan, M. A. *et al.* Embryonic stem cells derived from morulae, inner cell mass, and blastocysts of mink: Comparisons of their pluripotencies. *Mol Reprod Dev* **36**, 148–158 (1993).
142. Thomson, J. A. *et al.* Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* (1979) **282**, 1145–1147 (1998).
143. Quinlan, A. R. *et al.* Genome sequencing of mouse induced pluripotent stem cells reveals retroelement stability and infrequent DNA rearrangement during reprogramming. *Cell Stem Cell* **9**, 366–373 (2011).
144. Sobhani, A. *et al.* Multipotent Stem Cell and Current Application. *Acta Med Iran* **55**, 6–23 (2017).
145. Robertson, J. A. Human embryonic stem cell research: ethical and legal issues. *Nature Reviews Genetics* 2001 2:1 **2**, 74–78 (2001).
146. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
147. Takahashi, K. *et al.* Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* **131**, 861–872 (2007).
148. Liu, G., David, B. T., Trawczynski, M. & Fessler, R. G. Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. *Stem Cell Rev Rep* **16**, 3–32 (2020).

149. Isaja, L. *et al.* Generation of a human induced pluripotent stem cell line from a familial Alzheimer's disease PSEN1 T119I patient. *Stem Cell Res* **53**, (2021).
150. Sommer, A. G. *et al.* Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells from Peripheral Blood Using the STEMCCA Lentiviral Vector. *J Vis Exp* (2012) doi:10.3791/4327.
151. Zhou, T. *et al.* Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples. *Nat Protoc* **7**, 2080–2089 (2012).
152. Lee, S. & Huang, E. J. Modeling ALS and FTD with iPSC-derived neurons. *Brain Res* **1656**, 88–97 (2017).
153. Soubannier, V. *et al.* Characterization of human iPSC-derived astrocytes with potential for disease modeling and drug discovery. *Neurosci Lett* **731**, 135028 (2020).
154. Hasselmann, J. & Blurton-Jones, M. Human iPSC-derived microglia: A growing toolset to study the brain's innate immune cells. *Glia* **68**, 721–739 (2020).
155. De Masi, C., Spitalieri, P., Murdocca, M., Novelli, G. & Sangiuolo, F. Application of CRISPR/Cas9 to human-induced pluripotent stem cells: From gene editing to drug discovery. *Hum Genomics* **14**, 1–12 (2020).
156. McTague, A., Rossignoli, G., Ferrini, A., Barral, S. & Kurian, M. A. Genome Editing in iPSC-Based Neural Systems: From Disease Models to Future Therapeutic Strategies. *Front Genome Ed* **3**, 630600 (2021).
157. Engle, S. J., Blaha, L. & Kleiman, R. J. Primer Best Practices for Translational Disease Modeling Using Human iPSC-Derived Neurons. *Neuron* **100**, 783–797 (2018).
158. Parmar, M. & Björklund, A. From Skin to Brain: A Parkinson's Disease Patient Transplanted with His Own Cells. *Cell Stem Cell* **27**, 8–10 (2020).
159. Jang, S. E., Qiu, L., Chan, L. L., Tan, E. K. & Zeng, L. Current Status of Stem Cell-Derived Therapies for Parkinson's Disease: From Cell Assessment and Imaging Modalities to Clinical Trials. *Front Neurosci* **14**, 558532 (2020).
160. Mertens, J., Marchetto, M. C., Bardy, C. & Gage, F. H. Evaluating cell reprogramming, differentiation and conversion technologies in neuroscience. *Nat Rev Neurosci* **17**, 424–437 (2016).
161. Staats, K. A. *et al.* Representing Diversity in the Dish: Using Patient-Derived in Vitro Models to Recreate the Heterogeneity of Neurological Disease. *Frontiers in Neuroscience* | [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org) **12**, 56 (2018).
162. Barral, S. & Kurian, M. A. Utility of Induced Pluripotent Stem Cells for the Study and Treatment of Genetic Diseases: Focus on Childhood Neurological Disorders. *Front Mol Neurosci* **9**, (2016).
163. Zhang, P., Xia, N. & Reijo Pera, R. A. Directed Dopaminergic Neuron Differentiation from Human Pluripotent Stem Cells. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* e51737 (2014) doi:10.3791/51737.
164. Nicholas, C. R. *et al.* Functional maturation of hPSC-derived forebrain interneurons requires an extended timeline and mimics human neural development. *Cell Stem Cell* **12**, 573–586 (2013).
165. Maroof, A. M. *et al.* Directed differentiation and functional maturation of cortical interneurons from human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* **12**, 559–572 (2013).
166. Lu, J. *et al.* Generation of serotonin neurons from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* **34**, 89–94 (2016).

167. Carri, A. D. *et al.* Developmentally coordinated extrinsic signals drive human pluripotent stem cell differentiation toward authentic DARPP-32+ medium-sized spiny neurons. *Development* **140**, 301–312 (2013).
168. Espuny-Camacho, I. *et al.* Pyramidal neurons derived from human pluripotent stem cells integrate efficiently into mouse brain circuits in vivo. *Neuron* **77**, 440–456 (2013).
169. Erceg, S. *et al.* Efficient differentiation of human embryonic stem cells into functional cerebellar-like cells. *Stem Cells Dev* **19**, 1745–1756 (2010).
170. Shi, Y., Kirwan, P. & Livesey, F. J. Directed differentiation of human pluripotent stem cells to cerebral cortex neurons and neural networks. *Nat Protoc* **7**, 1836–1846 (2012).
171. Wada, T. *et al.* Highly efficient differentiation and enrichment of spinal motor neurons derived from human and monkey embryonic stem cells. *PLoS One* **4**, (2009).
172. TCW, J. *et al.* An Efficient Platform for Astrocyte Differentiation from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* **9**, 600–614 (2017).
173. Juopperi, T. A. *et al.* Astrocytes generated from patient induced pluripotent stem cells recapitulate features of Huntingtons disease patient cells. *Mol Brain* **5**, 1–14 (2012).
174. Emdad, L., D'Souza, S. L., Kothari, H. P., Qadeer, Z. A. & Germano, I. M. Efficient Differentiation of Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells into Functional Astrocytes. <https://home.liebertpub.com/scd> **21**, 404–410 (2011).
175. Douvaras, P. *et al.* Efficient generation of myelinating oligodendrocytes from primary progressive multiple sclerosis patients by induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* **3**, 250–259 (2014).
176. Wang, S. *et al.* Human iPSC-derived oligodendrocyte progenitor cells can myelinate and rescue a mouse model of congenital hypomyelination. *Cell Stem Cell* **12**, 252–264 (2013).
177. Nistor, G. I., Totoiu, M. O., Haque, N., Carpenter, M. K. & Keirstead, H. S. Human embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes in high purity and myelinate after spinal cord transplantation. *Glia* **49**, 385–396 (2005).
178. Guttikonda, S. R. *et al.* Fully defined human pluripotent stem cell-derived microglia and tri-culture system model C3 production in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* **24**, 343–354 (2021).
179. Lancaster, M. A. & Knoblich, J. A. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nature Protocols* 2014 9:10 **9**, 2329–2340 (2014).
180. Giandomenico, S. L., Sutcliffe, M. & Lancaster, M. A. Generation and long-term culture of advanced cerebral organoids for studying later stages of neural development. *Nature Protocols* 2020 16:2 **16**, 579–602 (2020).
181. Sloan, S. A., Andersen, J., Paşca, A. M., Birey, F. & Paşca, S. P. Generation and Assembly of Human Brain Region-Specific Three-Dimensional Cultures. doi:10.1038/s41596-018-0032-7.
182. Monzel, A. S. *et al.* Derivation of Human Midbrain-Specific Organoids from Neuroepithelial Stem Cells. *Stem Cell Reports* **8**, 1144–1154 (2017).
183. Bagley, J. A., Reumann, D., Bian, S., Lévi-Strauss, J. & Knoblich, J. A. Fused cerebral organoids model interactions between brain regions. *Nature Methods* 2017 14:7 **14**, 743–751 (2017).

184. Qian, X. *et al.* Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure. *Cell* **165**, 1238–1254 (2016).
185. Sakaguchi, H. *et al.* Generation of functional hippocampal neurons from self-organizing human embryonic stem cell-derived dorsomedial telencephalic tissue. *Nat Commun* **6**, (2015).
186. Muguruma, K., Nishiyama, A., Hashimoto, K. & Sasai, Y. Self-Organization of Polarized Cerebellar Tissue in 3D Culture of Human Pluripotent Stem Cells. doi:10.1016/j.celrep.2014.12.051.
187. Trujillo, C. A. *et al.* Complex Oscillatory Waves Emerging from Cortical Organoids Model Early Human Brain Network Development. *Cell Stem Cell* **25**, 558–569 (2019).
188. Quadrato, G. *et al.* Cell diversity and network dynamics in photosensitive human brain organoids. *Nature* **545**, 48–53 (2017).
189. Cho, A. N. *et al.* Microfluidic device with brain extracellular matrix promotes structural and functional maturation of human brain organoids. *Nature Communications* **12**, 1–23 (2021).
190. Mansour, A. A. *et al.* An in vivo model of functional and vascularized human brain organoids. *Nature Biotechnology* **36**, 432–441 (2018).
191. Cakir, B. *et al.* Engineering of human brain organoids with a functional vascular-like system. *Nature Methods* **16**, 1169–1175 (2019).
192. Paşca, S. P. The rise of three-dimensional human brain cultures. *Nature* **553**, 437–445 (2018).
193. Siggia, E. D. & Warmflash, A. Modeling mammalian gastrulation with embryonic stem cells. doi:10.1016/bs.ctdb.2018.03.001.
194. Nikolopoulou, E., Galea, G. L., Rolo, A., Greene, N. D. E. & Copp, A. J. Neural tube closure: cellular, molecular and biomechanical mechanisms. *Development* **144**, 552–566 (2017).
195. Brady, M. V & Vaccarino, F. M. cells Role of SHH in Patterning Human Pluripotent Cells towards Ventral Forebrain Fates. **10**, 914 (2021).
196. Cadwell, C. R., Bhaduri, A., Mostajo-Radji, M. A., Keefe, M. G. & Nowakowski, T. J. Development and Arealization of the Cerebral Cortex. *Neuron* **103**, 980–1004 (2019).
197. Englund, C. *et al.* Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *J Neurosci* **25**, 247–251 (2005).
198. Cánovas, J. *et al.* The Specification of Cortical Subcerebral Projection Neurons Depends on the Direct Repression of TBR1 by CTIP1/BCL11a. *The Journal of Neuroscience* **35**, 7552 (2015).
199. Alcamo, E. A. *et al.* Satb2 Regulates Callosal Projection Neuron Identity in the Developing Cerebral Cortex. *Neuron* **57**, 364–377 (2008).
200. Castillo-Rangel, C. *et al.* Animal models in Alzheimer’s disease: Biological plausibility and mood disorders. *Neurology Perspectives* **3**, (2023).
201. Perlman, R. L. Mouse models of human disease An evolutionary perspective. *Evolution (N Y)* **170**–176 (2016) doi:10.1093/emph/eow014.
202. Oakley, H. *et al.* Intraneuronal  $\beta$ -Amyloid Aggregates, Neurodegeneration, and Neuron Loss in Transgenic Mice with Five Familial Alzheimer’s Disease Mutations: Potential Factors in Amyloid Plaque Formation. *Journal of Neuroscience* **26**, 10129–10140 (2006).

203. Sanchez-Varo, R. *et al.* Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease: An Integrative Analysis. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 23 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms23105404> (2022).
204. Drummond, E. & Wisniewski, T. Alzheimer's disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathologica* 2016 133:2 **133**, 155–175 (2016).
205. Sasaguri, H. *et al.* APP mouse models for Alzheimer's disease preclinical studies. *EMBO J* **36**, 2473–2487 (2017).
206. Ochalek, A. *et al.* Neurons derived from sporadic Alzheimer's disease iPSCs reveal elevated TAU hyperphosphorylation, increased amyloid levels, and GSK3B activation. *Alzheimers Res Ther* **9**, (2017).
207. Ortiz-Virumbrales, M. *et al.* CRISPR/Cas9-Correctable mutation-related molecular and physiological phenotypes in iPSC-derived Alzheimer's PSEN2 N141I neurons. *Acta Neuropathol Commun* **5**, (2017).
208. Shi, Y., Inoue, H., Wu, J. C. & Yamanaka, S. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nat Rev Drug Discov* **16**, 115–130 (2017).
209. Gonzalez, C. *et al.* Modeling amyloid beta and tau pathology in human cerebral organoids. *Molecular Psychiatry* 2018 23:12 **23**, 2363–2374 (2018).
210. Kim, Y. H. *et al.* A 3D human neural cell culture system for modeling Alzheimer's disease. *Nature Protocols* 2015 10:7 **10**, 985–1006 (2015).
211. Choi, S. H. *et al.* A three-dimensional human neural cell culture model of Alzheimer's disease. *Nature* 2014 515:7526 **515**, 274–278 (2014).
212. Venkataraman, L., Fair, S. R., Mcelroy, C. A., Hester, M. E. & Fu, H. Modeling neurodegenerative diseases with cerebral organoids and other three-dimensional culture systems: focus on Alzheimer's disease. (2015) doi:10.1007/s12015-020-10068-9/Published.
213. Penney, J., Ralvenius, W. T., Li, • & Tsai, -Huei. Modeling Alzheimer's disease with iPSC-derived brain cells. *Mol Psychiatry* **25**, 148–167 (2020).
214. Muñoz, S. S. *et al.* Generation and characterization of human induced pluripotent stem cell lines from a familial Alzheimer's disease PSEN1 A246E patient and a non-demented family member bearing wild-type PSEN1. *Stem Cell Res* **31**, 227–230 (2018).
215. Ran, F. A. *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols* 2013 8:11 **8**, 2281–2308 (2013).
216. Waisman, A. *et al.* Inhibition of Cell Division and DNA Replication Impair Mouse-Naïve Pluripotency Exit. *J Mol Biol* **429**, 2802–2815 (2017).
217. Brunkan, A. L., Martinez, M., Walker, E. S. & Goate, A. M. Presenilin endoproteolysis is an intramolecular cleavage. *Molecular and Cellular Neuroscience* **29**, 65–73 (2005).
218. Weiner, M. P. *et al.* Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene* **151**, 119–123 (1994).
219. Schmidt, S. D., Nixon, R. A. & Mathews, P. M. ELISA method for measurement of amyloid- $\beta$  levels. *Methods in Molecular Biology* **299**, 279–297 (2005).
220. Itzcovich, T. *et al.* A novel mutation in PSEN1 (p.T119I) in an Argentine family with early- and late-onset Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **85**, 155.e9-155.e12 (2020).
221. Sommer, C. A. *et al.* iPS Cell Generation Using a Single Lentiviral Stem Cell Cassette. *Stem Cells* **27**, 543 (2009).

222. Jiang, W. *et al.* An optimized method for high-titer lentivirus preparations without ultracentrifugation. *Scientific Reports* 2015 5:1 **5**, 1–9 (2015).
223. Claassen, D. A., Desler, M. M. & Rizzino, A. ROCK Inhibition Enhances the Recovery and Growth of Cryopreserved Human Embryonic Stem Cells and Human Induced Pluripotent Stem Cells. doi:10.1002/mrd.21021.
224. Gauthaman, K., Fong, C. Y. & Bongso, A. Effect of ROCK inhibitor Y-27632 on normal and variant human embryonic stem cells (hESCs) in vitro: Its benefits in hESC expansion. *Stem Cell Rev Rep* **6**, 86–95 (2010).
225. Yoon, T.-M. *et al.* Human Embryonic Stem Cells (hESCs) Cultured Under Distinctive Feeder-Free Culture Conditions Display Global Gene Expression Patterns Similar to hESCs from Feeder-Dependent Culture Conditions. doi:10.1007/s12015-010-9158-x.
226. Amit, M. & Itskovitz-Eldor, J. Feeder-Free Culture of Human Embryonic Stem Cells. *Methods Enzymol* **420**, 37–49 (2006).
227. Nakagawa, M. *et al.* A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells. (2014) doi:10.1038/srep03594.
228. Nakagawa, M. *et al.* A novel efficient feeder-Free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep* **4**, 1–7 (2014).
229. Štefková, K., Procházková, J. & Pacherník, J. Alkaline Phosphatase in Stem Cells. (2015) doi:10.1155/2015/628368.
230. Isaja, L., Ferriol-Laffouillere, S. L., Mucci, S., Rodríguez-Varela, M. S. & Romorini, L. Embryoid Bodies-Based Multilineage Differentiation of Human Embryonic Stem Cells Grown on Feeder-Free Conditions. *Methods Mol Biol* **2520**, (2022).
231. Byman, E. *et al.* Neuronal  $\alpha$ -amylase is important for neuronal activity and glycogenolysis and reduces in presence of amyloid beta pathology. *Aging Cell* **20**, 2018–02564 (2021).
232. Bergström, P. *et al.* Herpes Simplex Virus 1 and 2 Infections during Differentiation of Human Cortical Neurons. *Viruses* 2021, Vol. 13, Page 2072 **13**, 2072 (2021).
233. Karmirian, K. *et al.* Modeling Alzheimer's Disease Using Human Brain Organoids. *Methods in Molecular Biology* **2561**, 135–158 (2023).
234. Simons, A. FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. *Babraham Bioinformatics* <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (2010).
235. Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y. & Gu, J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* **34**, i884–i890 (2018).
236. Langmead, B. & Salzberg, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* **9**, 357–359 (2012).
237. Sahara, N. *et al.* Identification and characterization of presenilin I-467, I-463 and I-374. *FEBS Lett* **381**, 7–11 (1996).
238. Rogaev, E. I. *et al.* Analysis of the 5' sequence, genomic structure, and alternative splicing of the presenilin-1 gene (PSEN1) associated with early onset Alzheimer disease. *Genomics* **40**, 415–424 (1997).
239. Dowjat, W. K., Kuchna, I., Wisniewski, T. & Wegiel, J. A novel highly pathogenic Alzheimer presenilin-1 mutation in codon 117 (Pro117Ser): Comparison of

- clinical, neuropathological and cell culture phenotypes of Pro117Leu and Pro117Ser mutations. *J Alzheimers Dis* **6**, 31–43 (2004).
240. Hutton, M. *et al.* Complete analysis of the presenilin 1 gene in early onset Alzheimer's disease. *Neuroreport* **7**, 801–805 (1996).
  241. Cruts, M. *et al.* Estimation of the genetic contribution of presenilin-1 and -2 mutations in a population-based study of presenile Alzheimer disease. *Hum Mol Genet* **7**, 43–51 (1998).
  242. Campion, D. *et al.* Mutations of the presenilin I gene in families with early-onset Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* **4**, 2373–2377 (1995).
  243. Van Campenhout, C. Guidelines for optimized gene knockout using CRISPR/Cas9. (2019) doi:10.2144/btn-2018-0187.
  244. Hsu, S. *et al.* Discovery and validation of autosomal dominant Alzheimer's disease mutations. *Alzheimers Res Ther* **10**, 1–8 (2018).
  245. Brunkan, A. L., Martinez, M., Walker, E. S. & Goate, A. M. Presenilin endoproteolysis is an intramolecular cleavage. *Molecular and Cellular Neuroscience* **29**, 65–73 (2005).
  246. Borchelt, D. R. *et al.* Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate A $\beta$ 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* **17**, 1005–1013 (1996).
  247. Xie, Y. Z. & Zhang, R. X. Neurodegenerative diseases in a dish: the promise of iPSC technology in disease modeling and therapeutic discovery. *Neurological Sciences* **36**, 21–27 (2015).
  248. Kim, J., Koo, B. K. & Knoblich, J. A. Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**, 571–584 (2020).
  249. Sternecker, J. L., Reinhardt, P. & Schöler, H. R. Investigating human disease using stem cell models. *Nat Rev Genet* **15**, 625–639 (2014).
  250. Poetsch, M. S., Strano, A. & Guan, K. Human Induced Pluripotent Stem Cells: From Cell Origin, Genomic Stability, and Epigenetic Memory to Translational Medicine. *Stem Cells* **40**, 546–555 (2022).
  251. Liang, Gaoyang; Zhang, Y. Genetic and epigenetic variations in iPSCs: potential causes and implications for application. *Cell Stem Cell* **13**, 149.159 (2013).
  252. Liu, X. *et al.* Chromosomal aberration arises during somatic reprogramming to pluripotent stem cells. *Cell Div* **15**, 1–13 (2020).
  253. Akopian, V. *et al.* Comparison of defined culture systems for feeder cell free propagation of human embryonic stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **46**, 247–258 (2010).
  254. Ludwig, T. E. *et al.* Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nature Biotechnology* 2006 **24**:2 **24**, 185–187 (2006).
  255. Adewumi, O. *et al.* Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol* **25**, 803–816 (2007).
  256. Kashyap, V. *et al.* Regulation of Stem Cell Pluripotency and Differentiation Involves a Mutual Regulatory Circuit of the Nanog, OCT4, and SOX2 Pluripotency Transcription Factors With Polycomb Repressive Complexes and Stem Cell microRNAs. *Stem Cells Dev* **18**, 1093 (2009).
  257. Fong, C. Y., Peh, G. S. L., Gauthaman, K. & Bongso, A. Separation of SSEA-4 and TRA-1-60 labelled undifferentiated human embryonic stem cells from a heterogeneous cell population using magnetic-activated cell sorting (MACS) and fluorescence-activated cell sorting (FACS). *Stem Cell Rev Rep* **5**, 72–80 (2009).

258. Almeida, J. L., Cole, K. D. & Plant, A. L. Standards for Cell Line Authentication and Beyond. *PLoS Biol* **14**, e1002476 (2016).
259. Yan, Y. *et al.* Efficient and Rapid Derivation of Primitive Neural Stem Cells and Generation of Brain Subtype Neurons From Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Transl Med* **2**, 862–870 (2013).
260. Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P. & Brivanlou, A. H. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* **10**, 55–63 (2004).
261. Li, W. *et al.* Rapid induction and long-term self-renewal of primitive neural precursors from human embryonic stem cells by small molecule inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **20**, 8299–8304 (2011).
262. López-González, R., Camacho-Arroyo, I. & Velasco, I. Progesterone and 17 $\beta$ -estradiol increase differentiation of mouse embryonic stem cells to motor neurons. *IUBMB Life* **63**, 930–939 (2011).
263. Lendahl, U., Zimmerman, L. B. & McKay, R. D. G. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* **60**, 585–595 (1990).
264. Suter, D. M., Tirefort, D., Julien, S. & Krause, K.-H. A Sox1 to Pax6 Switch Drives Neuroectoderm to Radial Glia Progression During Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* **27**, 49–58 (2009).
265. Cavallaro, M. *et al.* Impaired generation of mature neurons by neural stem cells from hypomorphic Sox2 mutants. *Development* **135**, 541–557 (2008).
266. Asami, M. *et al.* The role of Pax6 in regulating the orientation and mode of cell division of progenitors in the mouse cerebral cortex. *Development* **138**, 5067–5078 (2011).
267. Estivill-Torrus, G., Pearson, H., van Heyningen, V., Price, D. J. & Rashbass, P. Pax6 is required to regulate the cell cycle and the rate of progression from symmetrical to asymmetrical division in mammalian cortical progenitors. *Development* **129**, 455–466 (2002).
268. Brewer, G. J., Torricelli, J. R., Evege, E. K. & Price, P. J. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented neurobasal™, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res* **35**, 567–576 (1993).
269. Chambers, S. M. *et al.* Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol* **27**, 275–280 (2009).
270. Shi, Y., Kirwan, P. & Livesey, F. J. Directed differentiation of human pluripotent stem cells to cerebral cortex neurons and neural networks. *Nat Protoc* **7**, 1836–1846 (2012).
271. James, D., Levine, A. J., Besser, D. & Hemmati-Brivanlou, A. TGF $\beta$ /activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development* **132**, 1273–1282 (2005).
272. Erickson, R. I., Paucar, A. A., Jackson, R. L., Visnyei, K. & Kornblum, H. Roles of insulin and transferrin in neural progenitor survival and proliferation. *J Neurosci Res* **86**, 1884–1894 (2008).
273. Rhee, Y. H. *et al.* Insulin concentration is critical in culturing human neural stem cells and neurons. *Cell Death & Disease* **2013 4:8 4**, e766–e766 (2013).
274. Eichmüller, O. L. & Knoblich, J. A. Human cerebral organoids — a new tool for clinical neurology research. *Nat Rev Neurol* **18**, 661–680 (2022).



275. Mayhew, C. N. & Singhanian, R. A review of protocols for brain organoids and applications for disease modeling. *STAR Protoc* **4**, 101860 (2023).
276. Chiu, S. L. & Cline, H. T. Insulin receptor signaling in the development of neuronal structure and function. *Neural Dev* **5**, 1–18 (2010).
277. Maden, M. Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience* 2007 8:10 **8**, 755–765 (2007).
278. Bejoy, J. *et al.* Wnt-Notch Signaling Interactions During Neural and Astroglial Patterning of Human Stem Cells. <https://home.liebertpub.com/tea> **26**, 419–431 (2020).
279. Bian, J., Zheng, J., Li, S., Luo, L. & Ding, F. Sequential Differentiation of Embryonic Stem Cells into Neural Epithelial-Like Stem Cells and Oligodendrocyte Progenitor Cells. *PLoS One* **11**, (2016).
280. Rifes, P. *et al.* Modeling neural tube development by differentiation of human embryonic stem cells in a microfluidic WNT gradient. *Nat Biotechnol* **38**, 1265–1273 (2020).
281. Delepine, C., Pham, V. A., Tsang, H. W. S. & Sur, M. GSK3 $\beta$  inhibitor CHIR 99021 modulates cerebral organoid development through dose-dependent regulation of apoptosis, proliferation, differentiation and migration. *PLoS One* **16**, e0251173 (2021).
282. Quadrato, G. *et al.* Cell diversity and network dynamics in photosensitive human brain organoids. *Nature* 2017 545:7652 **545**, 48–53 (2017).
283. Delaby, C. *et al.* The A $\beta$ 1–42/A $\beta$ 1–40 ratio in CSF is more strongly associated to tau markers and clinical progression than A $\beta$ 1–42 alone. *Alzheimers Res Ther* **14**, 1–11 (2022).
284. Bellier, J. P. *et al.* Uncovering elevated tau TPP motif phosphorylation in the brain of Alzheimer’s disease patients. *Alzheimer’s and Dementia* (2023) doi:10.1002/alz.13557.
285. Hoogmartens, J., Cacace, R. & Van Broeckhoven, C. Insight into the genetic etiology of Alzheimer’s disease: A comprehensive review of the role of rare variants. (2021) doi:10.1002/dad2.12155.
286. Zhang, S. *et al.* Identification of a Rare PSEN1 Mutation (Thr119Ile) in Late-Onset Alzheimer’s Disease With Early Presentation of Behavioral Disturbance. *Front Psychiatry* **11**, (2020).
287. Bagyinszky, E. *et al.* Pathogenic PSEN1 Thr119Ile Mutation in Two Korean Patients with Early-Onset Alzheimer’s Disease. *Diagnostics* 2020, Vol. 10, Page 405 **10**, 405 (2020).
288. Schultz, S. A. *et al.* Location of pathogenic variants in PSEN1 impacts progression of cognitive, clinical, and neurodegenerative measures in autosomal-dominant Alzheimer’s disease. *Aging Cell* **22**, (2023).
289. Liu, L., Lauro, B. M., Wolfe, M. S. & Selkoe, D. J. Hydrophilic loop 1 of Presenilin-1 and the APP GxxxG transmembrane motif regulate  $\gamma$ -secretase function in generating Alzheimer-causing A $\beta$  peptides. *Journal of Biological Chemistry* **296**, 100393–100394 (2021).
290. Mahairaki, V. *et al.* Induced pluripotent stem cells from familial Alzheimer’s disease patients differentiate into mature neurons with amyloidogenic properties. *Stem Cells Dev* **23**, 2996–3010 (2014).

291. Yang, J. *et al.* Early pathogenic event of Alzheimer's disease documented in iPSCs from patients with PSEN1 mutations. *Oncotarget* **8**, 7900–7913 (2017).
292. Armijo, E. *et al.* Increased susceptibility to A $\beta$  toxicity in neuronal cultures derived from familial Alzheimer's disease (PSEN1-A246E) induced pluripotent stem cells. *Neurosci Lett* **639**, 74–81 (2017).
293. Yazaki, M. *et al.* Mutation of potential N-linked glycosylation sites in the Alzheimer's disease amyloid precursor protein (APP). *Neurosci Lett* **221**, 57–60 (1996).
294. Kitazume, S. *et al.* Brain Endothelial Cells Produce Amyloid  $\beta$  from Amyloid Precursor Protein 770 and Preferentially Secrete the O-Glycosylated Form. *J Biol Chem* **285**, 40097 (2010).
295. Tachida, Y. *et al.* O-GalNAc glycosylation determines intracellular trafficking of APP and A $\beta$  production. *Journal of Biological Chemistry* **299**, (2023).
296. Papp, B. & Plath, K. Reprogramming to pluripotency: stepwise resetting of the epigenetic landscape. *Cell Research* **21**, 486–501 (2011).
297. David, L. & Polo, J. M. Phases of reprogramming. *Stem Cell Res* **12**, 754–761 (2014).
298. Liu, L., Michowski, W., Kolodziejczyk, A. & Sicinski, P. The cell cycle in stem cell proliferation, pluripotency and differentiation. *Nature Cell Biology* **21**, 1060–1067 (2019).
299. Hurley, E. M., Mozolewski, P., Dobrowolski, R. & Hsieh, J. Familial Alzheimer's disease-associated PSEN1 mutations affect neurodevelopment through increased Notch signaling. *Stem Cell Reports* **18**, 1516–1533 (2023).
300. Arber, C. *et al.* Familial Alzheimer's Disease Mutations in PSEN1 Lead to Premature Human Stem Cell Neurogenesis. *Cell Rep* **34**, (2021).
301. Skarnes, W. C., Pellegrino, E. & McDonough, J. A. Improving homology-directed repair efficiency in human stem cells. *Methods* **164–165**, 18–28 (2019).
302. Hernández-Sapiéns, M. A. *et al.* Presenilin mutations and their impact on neuronal differentiation in Alzheimer's disease. (2022) doi:10.4103/1673-5374.313016.
303. Borghese, L. *et al.* Inhibition of notch signaling in human embryonic stem cell-derived neural stem cells delays G1/S phase transition and accelerates neuronal differentiation in vitro and in vivo. *Stem Cells* **28**, 955–964 (2010).
304. Villarejo, L. G. *et al.* Role of Intracellular Amyloid  $\beta$  as Pathway Modulator, Biomarker, and Therapy Target. *Int J Mol Sci* **23**, (2022).
305. Bayer, T. A. & Wirths, O. Intracellular accumulation of amyloid-beta - A predictor for synaptic dysfunction and neuron loss in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* **2**, (2010).
306. Pierrot, N., Ghisdal, P., Caumont, A. S. & Octave, J. N. Intraneuronal amyloid- $\beta$ 1-42 production triggered by sustained increase of cytosolic calcium concentration induces neuronal death. *J Neurochem* **88**, 1140–1150 (2004).
307. Kienlen-Campard, P., Miolet, S., Tasiaux, B. & Octave, J. N. Intracellular amyloid-beta 1-42, but not extracellular soluble amyloid-beta peptides, induces neuronal apoptosis. *J Biol Chem* **277**, 15666–15670 (2002).
308. Velasco, S. *et al.* Individual brain organoids reproducibly form cell diversity of the human cerebral cortex. *Nature* **570**, 523–527 (2019).

309. Zhao, J. *et al.* APOE4 exacerbates synapse loss and neurodegeneration in Alzheimer's disease patient iPSC-derived cerebral organoids. *Nature Communications* 2020 11:1 **11**, 1–14 (2020).
310. Andreasen, N. *et al.* Cerebrospinal Fluid  $\beta$ -Amyloid(1-42) in Alzheimer Disease: Differences Between Early- and Late-Onset Alzheimer Disease and Stability During the Course of Disease. *Arch Neurol* **56**, 673–680 (1999).
311. Ashton, N. J. *et al.* Differential roles of A $\beta$ 42/40, p-tau231 and p-tau217 for Alzheimer's trial selection and disease monitoring. *Nat Med* **28**, 2555–2562 (2022).
312. Burnouf, S., Gorsky, M. K., Dols, J., Grönke, S. & Partridge, L. A $\beta$  43 is neurotoxic and primes aggregation of A $\beta$  40 in vivo. *Acta Neuropathol* **3**, 35–47 (2015).
313. Binarová, P. & Tuszynski, J. Tubulin: Structure, Functions and Roles in Disease. *Cells* **8**, (2019).
314. Raymond Gao, X., Chiariglione, M. & Arch, A. J. Whole-exome sequencing study identifies genes associated with Alzheimer's disease and related dementias. doi:10.1101/2022.12.22.22283864.
315. Vu, H. T., Akatsu, H., Hashizume, Y., Setou, M. & Ikegami, K. Increase in  $\alpha$ -tubulin modifications in the neuronal processes of hippocampal neurons in both kainic acid-induced epileptic seizure and Alzheimer's disease. *Scientific Reports* 2017 7:1 **7**, 1–14 (2017).
316. Martínez-Hernández, J. *et al.* Crosstalk between acetylation and the tyrosination/detyrosination cycle of  $\alpha$ -tubulin in Alzheimer's disease. *Front Cell Dev Biol* **10**, 926914 (2022).
317. Schilling, S. *et al.* Frontotemporal Lobar Degeneration Case with an N-Terminal TUBA4A Mutation Exhibits Reduced TUBA4A Levels in the Brain and TDP-43 Pathology. *Biomolecules* 2022 **12**, 440 (2022).
318. Mol, M. O. *et al.* Novel TUBA4A Variant Associated With Familial Frontotemporal Dementia. (2021) doi:10.1212/NXG.0000000000000596.
319. Dols-Icardo, O. *et al.* Assessing the role of TUBA4A gene in frontotemporal degeneration. *Neurobiol Aging* **38**, 215.e13-215.e14 (2016).
320. Schmidt, H. H. H. W. & Walter, U. NO at work. *Cell* **78**, 919–925 (1994).
321. De La Monte, S. M. *et al.* Aberrant expression of nitric oxide synthase III in Alzheimer's disease: relevance to cerebral vasculopathy and neurodegeneration. *Neurobiol Aging* **21**, 309–319 (2000).
322. Sohn, Y. K., Ganju, N., Bloch, K. D., Wands, J. R. & De La Monte, S. M. Neuritic sprouting with aberrant expression of the nitric oxide synthase III gene in neurodegenerative diseases. *J Neurol Sci* **162**, 133–151 (1999).
323. Klatt, P. *et al.* Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent cytochrome c reductase activity of brain nitric oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 11374–11378 (1992).
324. De la Monte, S. M. *et al.* Nitric Oxide Synthase-3 Overexpression Causes Apoptosis and Impairs Neuronal Mitochondrial Function: Relevance to Alzheimer's-Type Neurodegeneration. *Laboratory Investigation* 2003 83:2 **83**, 287–298 (2003).
325. Liu, S. *et al.* The nitric oxide synthase 3 G894T polymorphism associated with Alzheimer's disease risk: a meta-analysis. *Scientific Reports* 2015 5:1 **5**, 1–9 (2015).

326. Austin, S. A. & Katusic, Z. S. Loss of Endothelial Nitric Oxide Synthase Promotes p25 Generation and Tau Phosphorylation in a Murine Model of Alzheimer's Disease. *Circ Res* **119**, 1128–1134 (2016).
327. Cifuentes, D. *et al.* Inactivation of Nitric Oxide Synthesis Exacerbates the Development of Alzheimer Disease Pathology in APPPS1 Mice (Amyloid Precursor Protein/Presenilin-1). *Hypertension* **70**, 613–623 (2017).
328. Lam, M. M. W., Mapletoft, J. P. & Miller, M. S. Abnormal regulation of the antiviral response in neurological/neurodegenerative diseases. *Cytokine* **88**, 251–258 (2016).
329. Silva, A. R. T. *et al.* Transcriptional Alterations Related to Neuropathology and Clinical Manifestation of Alzheimer's Disease. *PLoS One* **7**, e48751 (2012).
330. Ho, A. *et al.* IL-34 exacerbates pathogenic features of Alzheimer's disease and calvaria osteolysis in triple transgenic (3x-Tg) female mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **166**, 115435 (2023).
331. Watanabe, Y. *et al.* Alterations in Glycerolipid and Fatty Acid Metabolic Pathways in Alzheimer's Disease Identified by Urinary Metabolic Profiling: A Pilot Study. *Front Neurol* **12**, 719159 (2021).
332. Negri, L. & Lattanzi, R. Bv8/PK2 and prokineticin receptors: a druggable pronociceptive system. *Curr Opin Pharmacol* **12**, 62–66 (2012).
333. Severini, C. *et al.* Bv8/prokineticin 2 is involved in A $\beta$ -induced neurotoxicity. *Sci Rep* **5**, (2015).
334. Maftei, D. *et al.* The prokineticin receptor antagonist PC1 rescues memory impairment induced by  $\beta$  amyloid administration through the modulation of prokineticin system. *Neuropharmacology* **158**, 107739 (2019).
335. Lattanzi, R. *et al.* Involvement of the Chemokine Prokineticin-2 (PROK2) in Alzheimer's Disease: From Animal Models to the Human Pathology. *Cells* 2019, Vol. 8, Page 1430 **8**, 1430 (2019).
336. Du, Z. *et al.* Knockdown of astrocytic Grin2a aggravates  $\beta$ -amyloid-induced memory and cognitive deficits through regulating nerve growth factor. *Aging Cell* **20**, (2021).
337. Zhang, W. *et al.* Knockdown of astrocytic Grin2a exacerbated sleep deprivation-induced cognitive impairments and elevation of amyloid-beta. *Sleep Med* **100**, 280–290 (2022).
338. Frohman, E. M., Frohman, T. C., Gupta, S., de Fougères, A. & van den Noort, S. Expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* **106**, 105–111 (1991).
339. Leshchyns'Ka, I. & Sytnyk, V. Synaptic Cell Adhesion Molecules in Alzheimer's Disease. *Neural Plast* **2016**, (2016).
340. Porter, S., Clark, I. M., Kevorkian, L. & Edwards, D. R. The ADAMTS metalloproteinases. *Biochemical Journal* **386**, 15 (2005).
341. Parsian, A. J. *et al.* The human Hsp70B gene at the HSPA7 locus of chromosome 1 is transcribed but non-functional. *Biochim Biophys Acta* **1494**, 201–205 (2000).
342. Annese, A. *et al.* Whole transcriptome profiling of Late-Onset Alzheimer's Disease patients provides insights into the molecular changes involved in the disease. *Scientific Reports* 2018 8:1 **8**, 1–15 (2018).
343. Wu, Y., Liang, S., Zhu, H. & Zhu, Y. Analysis of immune-related key genes in Alzheimer's disease. *Bioengineered* **12**, 9610–9624 (2021).

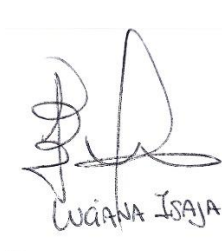
344. Deane, C. A. S. & Brown, I. R. Intracellular Targeting of Heat Shock Proteins in Differentiated Human Neuronal Cells Following Proteotoxic Stress. *Journal of Alzheimer's Disease* **66**, 1295–1308 (2018).
345. Hirata, T. *et al.* Post-Golgi anterograde transport requires GARP-dependent endosome-to-TGN retrograde transport. *Mol Biol Cell* **26**, 3071–3084 (2015).
346. Yu, H.-C. *et al.* Discovery of a potentially deleterious variant in TMEM87B in a patient with a hemizygous 2q13 microdeletion suggests a recessive condition characterized by congenital heart disease and restrictive cardiomyopathy. *Cold Spring Harb Mol Case Stud* **2**, a000844 (2016).
347. Desgraupes, S., Etienne, L. & Arhel, N. J. RANBP2 evolution and human disease. *FEBS Lett* **597**, 2519–2533 (2023).
348. Bekpen, C. & Tautz, D. Human core duplicon gene families: Game changers or game players? *Briefings in Functional Genomics* vol. 18 402–411 Preprint at <https://doi.org/10.1093/bfpg/elz016> (2019).
349. Rui, Y. N. *et al.* The Intracranial Aneurysm Gene THSD1 Connects Endosome Dynamics to Nascent Focal Adhesion Assembly. *Cellular Physiology and Biochemistry* **43**, 2200–2211 (2017).
350. Haasdijk, R. A. *et al.* THSD1 preserves vascular integrity and protects against intraplaque haemorrhaging in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Cardiovasc Res* **110**, 129–139 (2016).
351. Santiago-Sim, T. *et al.* THSD1 (Thrombospondin Type 1 Domain Containing Protein 1) Mutation in the Pathogenesis of Intracranial Aneurysm and Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke* **47**, 3005–3013 (2016).
352. Attems, J. & Jellinger, K. A. The overlap between vascular disease and Alzheimer's disease - lessons from pathology. *BMC Med* **12**, 1–12 (2014).
353. Lu, R., He, Q. & Wang, J. TRPC Channels and Alzheimer's Disease. *Adv Exp Med Biol* **976**, 73–83 (2017).
354. Lu, R. *et al.* Reduced TRPC6 mRNA levels in the blood cells of patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Mol Psychiatry* **23**, 767–776 (2018).
355. Chen, J. M. *et al.* TRPC6 mRNA levels in peripheral leucocytes of patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: A case-control study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **92**, 279–284 (2019).
356. Wang, J. *et al.* TRPC6 specifically interacts with APP to inhibit its cleavage by  $\gamma$ -secretase and reduce A $\beta$  production. *Nat Commun* **6**, (2015).
357. Tao, R. *et al.* Probing the therapeutic potential of TRPC6 for Alzheimer's disease in live neurons from patient-specific iPSCs. *J Mol Cell Biol* **12**, 807 (2020).



Leonardo Romorini



Ezequiel I. Surace



LUCIANA ISAJA