

Memoria de Tesis Doctoral para obtener el grado de Doctor por la Universidad Autónoma de
Barcelona, Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología

Programa de Doctorado en Neurociencias

Jose Vicente Sánchez Mut

Alteraciones epigenéticas en modelos murinos y humanos de enfermedad de *Alzheimer*.

Director de tesis:

Doctorante:

Dr. Manel Esteller Badosa

Jose Vicente Sánchez Mut

Este trabajo ha sido realizado bajo la dirección del Doctor **Manel Esteller Badosa**, director del Programa de Epigenética y Biología del Cáncer del Instituto de Investigaciones Biomédicas de Bellvitge, y la tutoría del Doctor **Xavier Navarro Acebes**, director del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Bellaterra, 2014

Agradecimientos

...als meus pares, al meu germà i a Nèlia.

Indice de contenidos

Indice de contenidos

Abreviaturas	15
Resumen	21
Summary.....	24
1. Introducción.....	27
1.1. Epigenética	27
1.1.1 Metilación del ADN	28
1.1.2 Modificación de Histonas.....	31
1.1.3 Interacciones entre los diferentes mecanismos epigenéticos.....	34
1.2. Epigenética del sistema nervioso.....	36
1.3. Enfermedad de Alzheimer	37
1.4. La metilación del ADN en la enfermedad de Alzheimer	40
2. Planteamiento y objetivos	47
3. Material y métodos	51
3.1. Líneas celulares y establecimiento de clones estables	51
3.2. Muestras murinas	51
3.3. Muestras post-mortem humanas	52
3.4. Extracción del ADN	53
3.5. Extracción de ARN.....	54
3.6. Modificación del ADN con bisulfito sódico	54
3.7. Generación de controles de ADN metilado y no-metilado	55
3.8. Análisis de los niveles de metilación del ADN por Pirosecuenciación	55
3.9. Análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa.....	56
3.10. Diseño y análisis del <i>5mC-mouse-array</i>	56
3.11. Análisis del Illumina Infinium 27K array.....	57
3.12. Análisis de expresión proteica por <i>Western-blot</i>	58
3.13. Análisis de expresión proteica por Inmunohistología.....	60
3.14. Fraccionamiento celular e Inmunoprecipitación	60
3.15. Análisis de la supervivencia celular.....	61
4. Resultados	65
4.1. 1º Estudio: Caracterización de los patrones de metilación del ADN de las diferentes regiones del sistema nervioso del ratón.....	65

4.1.1.	El <i>array</i> de metilación del ADN diseñado bajo la tecnología VeraCode de Illumina es una herramienta fiable y precisa para analizar la metilación del ADN en cerebros de ratón	67
4.1.2.	El <i>5mC-mouse-array</i> identifica perfiles de metilación del ADN específicos para las doce regiones del cerebro analizadas	69
4.1.3.	Los patrones de metilación del ADN en las 12 regiones cerebrales son funcionalmente relevantes en la regulación de la expresión del RNA en los genes analizados	72
4.1.4.	El análisis de agrupamiento de los patrones de metilación del ADN reconoce a la corteza cerebral, el tronco cerebral y el cerebelo como grupos diferenciados	73
4.1.5.	Validación de los datos de metilación del ADN mediante análisis de componentes principales y pirosecuenciación	75
4.1.6.	La corteza cerebral presenta un patrón específico de metilación del ADN	76
4.2.	2º Estudio: Determinación de los patrones aberrantes de metilación del ADN en modelos murinos de la EA y posterior validación en muestras post-mortem humanas	79
4.2.1.	El análisis conjunto de los perfiles de metilación del ADN de los modelos murinos de EA APP/PSEN1 y 3xTg-AD no muestran diferencias en la corteza frontal	81
4.2.2.	Los patrones de metilación del ADN característicos de la corteza cerebral están alterados en los modelos murinos de EA APP/PSEN1 y 3xTg-AD	82
4.2.3.	Los genes <i>SORBS3</i> , <i>SPTBN4</i> y <i>TBXA2R</i> están diferencialmente metilados en muestras post-mortem humanas de EA	83
4.3.	3º Estudio: Determinación de los patrones aberrantes de metilación del ADN en muestras post-mortem humanas con EA	87
4.3.1.	La progresión en los estadios de Braak de la EA correlaciona con cambios de metilación del ADN	89
4.3.2.	El promotor del gen <i>DUSP22</i> se hipermetila en la EA y correlaciona con menores niveles de expresión del ARN y de proteína	90
4.3.3.	<i>DUSP22</i> regula la fosforilación de TAU a través de la inhibición de PKA	92
4.3.4.	La expresión de <i>DUSP22</i> condiciona la activación CREB y la expresión de los genes CREB-dependientes a través de la inhibición de PKA	95
5.	Discusión.....	99
6.	Conclusiones.....	113
7.	Bibliografía.....	117
Anexo 1.	Representación de las regiones analizadas con el <i>5mC-mouse-array</i>	135
Anexo 2.	Relación de muestras humanas utilizadas para cada uno de los estudios.	137
Anexo 3.	Lista de cebadores para la pirosecuenciación.	139
Anexo 4.	Lista de cebadores utilizados para las PCRs.....	141
Anexo 5.	Lista de sondas incluídas en el <i>5mC-mouse-array</i> con su descripción.....	143

Anexo 6. Artículo en el que se publican los datos del primer y segundo estudio.	149
Anexo 7. Artículo en el que se publican los datos del tercer estudio.	159
Anexo 8. Efecto de la inhibición de PKA.	165

Abreviaturas

Abreviaturas

5caC	5-carboxi-citosina
5fC	5-formil-citosina
5hmC	5-hidroximetil-citosina
5mC	5-metil-citosina
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADP	<i>Ammonium dihydrogen phosphate</i>
Adra1b	<i>Adrenergic, alpha-1B-, receptor</i>
AKAP79	<i>A-kinase-anchoring protein 79</i>
ANK3	<i>Ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G)</i>
APOE	<i>Apolipoprotein E</i>
APP	<i>Amyloid beta (A4) precursor protein</i>
APS	<i>Persulfato amónico</i>
ARN	Acido ribonucleico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
A β	Péptido β -amiloide
B2M	<i>Beta-2-microglobulin</i>
BA9	<i>Brodmann area 9</i>
BAF53b	<i>Actin-like 6A (ACTL6A)</i>
BAF60	<i>SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d</i>
BAF60a	<i>BAF60,member 1 (SMARCD1)</i>
BAF60b	<i>BAF60,member 2 (SMARCD2)</i>
BAF60c	<i>BAF60,member 3 (SMARCD3)</i>
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BLA	Amígdala basolateral
BRG	<i>ATP-dependent helicase SMARCA4</i>
BRM	<i>ATP-dependent helicase SMARCA2</i>
BS	Butirato sódico
BSA	Albúmina de suero bovino
CA1	Región del hipocampo Cuerno de Amón 1
CA3	Región del hipocampo Cuerno de Amón 3
Cacna1d	<i>Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit</i>
cAMP	<i>Adenosine-3',5'-cyclic monophosphate</i>
CBP	<i>CREB binding protein</i>
CBP/p300	<i>CBP/p300 histone acetyltransferase</i>
CGI	Isla de dinucleótidos Citosina-Guanina
CLDN15	<i>Claudin 15</i>
COX2	<i>Ciclooxigenase 2</i>
CpG	dinucleótido Citosina-Guanina
CPU	Núcleo caudado-putamen
CRB2	<i>Crumbs homolog 2</i>
CREB	cAMP responsive element binding protein
CREB	<i>cAMP responsive element binding protein</i>
CX	Cortex frontal

DAPI	<i>4',6-diamino-2-fenilindol</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DG	Región del hipocampo Giro dentado
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMP	<i>Dimethyl pimelinediimidate dihydrochloride</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNMT1	ADN metil-transferasa 1
DNMT3A	ADN metil-transferasa 3A
DNMT3B	ADN metil-transferasa 3B
DNMTs	ADN metil-transferasas
dNTPs	Deoxinucleotidos
DOT1L	<i>DOT1-like, histone H3 methyltransferase</i>
DPF3	<i>Zinc and double PHD fingers, family 3</i>
DPF3b	<i>Zinc and double PHD fingers, family 3b</i>
DUSP22	<i>Dual specificity phosphatase 22</i>
DUSPs	<i>Dual specificity phosphatases</i>
E2F	Secuencia 5'-TTTCCCGC-3'
EA	<i>Enfermedad de Alzheimer</i>
ECACC	<i>European Collection of Cell Cultures</i>
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
EE.UU.	<i>Estados Unidos</i>
ER-alpha	<i>Estrogen receptor alpha</i>
ERK2	<i>Extracellular signal-regulated kinase 2</i>
EZH2	<i>Enhancer of zeste homolog 2</i>
F2RL2	<i>Coagulation factor II (thrombin) receptor-like 2</i>
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FDR	<i>False discovery rate</i>
FOS	<i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>
G9A	<i>Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2</i>
GCL	Capa de células granulares del cerebelo
GCN5	<i>GCN5-related N-acetyltransferase</i>
GLP	<i>Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 1 (EHMT1)</i>
GNAT	<i>Glycine-N-acyltransferase-like</i>
Grin2a	<i>Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2A</i>
GSK3	<i>Glycogen synthase kinase 3</i>
GUSB	<i>Glucuronidase beta</i>
H2.A	Histona 2 A
H2.B	Histona 2 B
H3	Histona 3
H3K14	Lisina 14 de la histona 3
H3K14ac	Acetil-lisina 14 de la histona 3
H3K18	Lisina 18 de la histona 3
H3K27	Lisina 27 de la histona 3
H3K36me3	Tri-metilación de la lisina 36 de la histona 3
H3K4me1	Mono-metilación de la lisina 4 de la histona 3
H3K4me3	Tri-metilación de la lisina 4 de la histona 3

H3K56	Lisina 56 de la histona 3
H3K79	Lisina 79 de la histona 3
H3K79me2	Di-metilación de la lisina 79 de la histona 3
H3K9	Lisina 9 de la histona 3
H3K9ac	Acetil-lisina 9 de la histona 3
H3K9me1	Mono-metilación de la lisina 9 de la histona 3
H3K9me2	Di-metilación de la lisina 9 de la histona 3
H3K9me3	Tri-metilación de la lisina 9 de la histona 3
H4	Histona 4
H4K12	Lisina 12 de la histona 4
H4K16	Lisina 16 de la histona 4
H4K20me1	Mono-metilación de la lisina 20 de la histona 4
H4K20me2	Di-metilación de la lisina 20 de la histona 4
H4K20me3	Tri-metilación de la lisina 20 de la histona 4
H4K5	Lisina 5 de la histona 4
H4K8	Lisina 8 de la histona 4
HAT	Histona acetil-transferasas
HCl	Acido clorhídrico
HDAC	Histona deacetilasas
HDAC1	<i>Histone deacetylase 1</i>
HDAC2	<i>Histone deacetylase 2</i>
HDAC3	<i>Histone deacetylase 3</i>
HDMT	Histona demetilisas
HMTs	Histona metil-transferasas
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HPRT1	<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>
HSAN1	<i>Hereditary sensory and autonomic neuropathy type I</i>
HYP	Hipotálamo
IGFBP7	<i>Insuline-like growth factor-binding protein 7</i>
ISH	Hibridación <i>in situ</i>
ISWI	<i>Imitation SWI complex</i>
IVD	<i>In vitro methylated DNA</i>
JKAP	<i>JNK pathway-associated phosphatase</i>
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
JSP-1	<i>JNK stimulatory phosphatase-1</i>
KAISO	<i>Kaiso protein</i>
KAT2	<i>Lysin acetyltransferase 2</i>
KCl	Cloruro potásico
KDM4	Lysine-specific demethylase 4
KH2PO4	Fosfato de potasio monobásico
LMW-DSP2	<i>Low molecular weight DUSP2</i>
LSD1	Lysine-specific demethylase 1A
MBD	<i>Methyl-CpG binding domain protein</i>
MBD1	<i>Methyl-CpG binding domain protein 1</i>
MBD2	<i>Methyl-CpG binding domain protein 2</i>
MBD3	<i>Methyl-CpG binding domain protein 3</i>

MBD4	<i>Methyl-CpG binding domain protein 4</i>
MBT	<i>Malignant Brain Tumor</i>
MeCP2	Methyl CpG binding protein 2
MeDIP	Inmunoprecipitación de ADN metilado
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
MGP	Globo pálido
MTT	<i>3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide</i>
MYST	<i>MYST histone acetyltransferase</i>
NA ₂ HPO ₄	Bifosfato de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NFKB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NR4A2	<i>Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2</i>
NRF-1	Secuencia 5'-(T/C)GCGCA(C/T)GCGC(A/G)-3'
NuRD	<i>Nucleosome Remodeling Deacetylase complex</i>
p38	<i>p38 mitogen-activated protein kinase</i>
PBS	Tampón fosfato salino
PC	Capa de células de Purkinje del cerebelo
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDP1	<i>PWWP domain-containing protein 1</i>
PHD	<i>Plant Homeo Domain</i>
PKA	<i>Protein kinase A</i>
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PSEN1	<i>Presenilin 1</i>
PSEN2	<i>Presenilin 2</i>
PWWP	<i>Prolin-Tryptophan-Tryptophan-Prolin motif</i>
QSCN6	<i>Quiescin Q6 sulfhydryl oxidase 1</i>
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RPL38	<i>Ribosomal protein L38</i>
S100A2	<i>S100 calcium binding protein A2</i>
SAM	S-adenosil-metionina
SDS	Dodecilsulfato sódico
Ser133	Serina 133
Ser9	Serina 9
SETD8	<i>SET domain containing (lysine methyltransferase) 8</i>
sh-ARN	<i>Short harpin ARN</i>
SMA	<i>Spectral Map Analysis</i>
SN	Sustancia negra
SORBS3	<i>Sorbin and SH3 domain containing 3</i>
Sp1	Secuencia 5'-(G/T)GGGCGG(G/A)(G/A)(C/T)-3'
SPNB4	<i>Spectrin, beta, non-erythrocytic 4 (mouse)</i>
SPTBN4	<i>Spectrin, beta, non-erythrocytic 4 (human)</i>
SRA	<i>SET and Ring finger-associated protein</i>
SRC	<i>v-src avian sarcoma</i>
SSSI	Metil-transferasa derivada de <i>Spiroplasma sp. strain MQ1</i>
SST	<i>Somatostatin</i>

STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
SUV420H1	<i>Suppressor of variegation 4-20 homolog 1</i>
SUV420H2	<i>Suppressor of variegation 4-20 homolog 2</i>
SWI/SNIF	<i>SWItch/Sucrose Non Fermentable complex</i>
TADA2A	<i>Transcriptional adaptor 2A</i>
TADA2B	<i>Transcriptional adaptor 2B</i>
TATA	Secuencia 5'-TATAAA-3'
TAU	<i>Microtubule-associated protein tau (MAPT)</i>
TBP	<i>Tata binding protein</i>
TBXA2R	<i>Thromboxane A2 receptor</i>
TDG	<i>Thymine-DNA glycosylase</i>
TEMED	<i>Tetrametiletildiamina</i>
TET	<i>Ten-eleven proteins</i>
TFIID	<i>Transcription factor II D</i>
TH	Tálamo
Thr197	Treonina 197
Thr231	Treonina 231
TMEM59	<i>Transmembrane protein 59</i>
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TSS	<i>Transcription Start Site</i> (inicio de transcripción)
TXA2	<i>Thromboxane</i>
UCSC	<i>Universidad de California, Santa Cruz</i>
UHRF1	<i>Ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1</i>
UHRF2	<i>ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 2</i>
Ush1g	<i>Usher syndrome 1G</i>
VHX	<i>VHR-related MKPX</i>
VPA	Acido valproico
WD40	<i>Tryptophan-aspartic motif (40 repeats)</i>
ZBTB38	<i>Zinc finger and BTB domain containing 38</i>
ZBTB4	<i>Zinc finger and BTB domain containing 4</i>
Zf-CW	<i>Zinc finger with conserved cysteine and tryptophan residues</i>

Resumen

Resumen

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología neurodegenerativa devastadora. Es la principal causa de demencia en las sociedades occidentales y actualmente no tiene cura. Sus síntomas no son evidentes hasta estados muy avanzados y su origen sigue siendo desconocido. Aunque se acepta que es una enfermedad multigénica, han sido pocos los genes asociados a la enfermedad y, conjuntamente, sólo pueden explicar un pequeño porcentaje de los casos. Se estima que cerca de 34 millones de personas están afectadas por la patología en todo el mundo y que esta cifra se duplicará en los próximos 20 años. Por lo que son necesarios más esfuerzos para identificar las causas que conducen a la aparición de esta patología.

En los últimos años la epigenética se ha mostrado como un mecanismo crucial en el funcionamiento del sistema nervioso y participa en la cognición, el aprendizaje y en la formación de la memoria. Muchas enfermedades neurológicas están causadas por mutaciones en la maquinaria epigenética y cada vez más indicios sugieren su importancia en muchas otras. La EA no es una excepción y los primeros estudios están empezando a identificar ya nuevos genes epigenéticamente alterados en la EA.

Conscientes de la importancia de la epigenética en el funcionamiento del sistema nervioso, el trabajo presentado en esta tesis ha pretendido profundizar en las causas de la EA desde un punto de vista epigenético. Para ello, hemos desarrollado nuevas herramientas de análisis epigenómico. Hemos determinado los patrones de metilación del cerebro de ratón y hemos identificado un subgrupo de genes alterados en modelos murinos y muestras post-mortem de EA. Además, hemos identificado genes epigenéticamente alterados desde las primeras fases de la enfermedad y hemos demostrado las consecuencias funcionales de dichas alteraciones.

En conjunto, los resultados presentados en esta tesis no sólo ponen de relieve la importancia de los cambios epigenéticos en la aparición y progresión de la EA sino que, además, ofrecen nuevas vías de diagnóstico y tratamiento reforzando la necesidad de incidir en esta vía de investigación que está empezando a ofrecer nuevas perspectivas para una enfermedad que actualmente no tiene cura.

Summary

Alzheimer's disease (AD) is a devastating neurodegenerative disorder. It is the main cause of dementia in Western societies and currently has no cure. Symptoms only appear in late stages and its origin remains unknown. Although it is accepted that AD is a multigenic disease, few genes have been associated with these disease and, together, they only explain a small percentage of cases. It is estimated that around 34 million of people in the world is affected by AD and that this number will double in next 20 years. As consequence, more efforts are necessary to identify the causes of the disease.

In recent years, epigenetics has demonstrated to be crucial in nervous system and it is involved in cognition, learning and memory formation. Many neurological diseases are caused by mutations in the epigenetic machinery and many others are associated with epigenetic alterations. AD is not an exception and pioneer studies are starting to identify new genes epigenetically altered in these disease.

Due to the importance of epigenetics in nervous system, the work presented in this thesis aims to get insight of the causes of AD from an epigenetic perspective. To this end, we have developed new tools of epigenomic analysis, determined methylation patterns of mouse brain and described a subset of genes epigenetically altered in mouse models and post-mortem samples of AD. In addition, we have identified genes epigenetically altered from the earliest stages of the disease and demonstrated the functional consequences of these alterations.

In sum, the results presented in this thesis not only highlight the importance of epigenetic changes in the onset and progression of AD but also offer new avenues of diagnosis and treatments reinforcing the necessity of get deeper in this line of research that is already starting to provide a new perspectives for a disease that currently has no cure.

Introducción

1. Introducción

1.1. Epigenética

Epigenética (del griego *epi*-: “en, sobre”, and *genetikos*: “genitivo, génesis, origen”) es la disciplina que estudia los rasgos hereditarios consecuencia de cambios en la estructura de los cromosomas que no afectan a la secuencia del ADN (Berger *et al.*, 2009). En un sentido amplio, se entiende a la epigenética como al mecanismo mediante el cual el ambiente es capaz de modificar el fenotipo sin alterar el genotipo (Barros y Offenbacher, 2009) y, por tanto, está influenciado por factores como la dieta (Cooney *et al.*, 2002), el tabaquismo (Zeilinger *et al.*, 2013), el comportamiento (Miller *et al.*, 2010), el estilo de vida (Fraga *et al.*, 2005) y el envejecimiento (Heyn *et al.*, 2012).

En un sentido más estricto, la epigenética es la disciplina que estudia, principalmente, la metilación del ADN y la modificación de las histonas. Mediante estos mecanismos, la epigenética es capaz de controlar la unión de factores de transcripción, la expresión génica, la utilización de sitios de inicios de transcripción alternativos y los procesos de *splicing* (Choy *et al.*, 2010, Elango *et al.*, 2011, Schwartz *et al.*, 2010). Además, también regula el desarrollo (Palini *et al.*, 2011), la expresión tejido-específica, el silenciamiento de los elementos transponibles, la estabilidad del genoma, la impronta genómica, la inactivación del cromosoma X y la identidad celular (Inbar-Feigenberg *et al.*, 2013). Por tanto, se puede entender a la epigenética como a un mecanismo de regulación pan-genómica capaz de modular la mayoría de los aspectos del genoma y del transcriptoma. De hecho, bajo su batuta, un mismo genoma es capaz de presentar una inmensa variedad de fenotipos, permitiendo la adaptación a estímulos, la diferenciación celular o la senescencia. El aprendizaje, la memoria o el envejecimiento, son también diferentes manifestaciones de este mismo concepto, que adquiere vital importancia en el funcionamiento del sistema nervioso, donde millones de células, organizadas en estructuras específicas y con funciones determinadas, se coordinan gracias a la acción de patrones epigenéticos característicos.

1.1.1 Metilación del ADN

La metilación del ADN consiste en la adición de un grupo metilo a citosinas seguidas de guaninas (dinucleótidos CpG). Estos dinucleótidos están infra-representados en el genoma y tienden a acumularse en regiones denominadas islas CpG (CGIs). A pesar de ello, alrededor del 95% de las CpGs se encuentran dispersas por todo el genoma sin mostrar ningún tipo de agregación. En general, las CpGs de las CGIs están no metiladas y las CpGs que no se encuentran en CGIs, metiladas. Como consecuencia, se observa una distribución de la densidad de metilación del ADN bimodal, en la que la mayoría de las CpGs están metiladas, un menor número de CpGs están no metiladas y una fracción casi despreciable de CpGs están parcialmente metiladas (Vinson y Chatterjee, 2012).

Tradicionalmente, se ha considerado a la metilación del ADN como a una marca represiva. Esto es debido a que la metilación de CGIs en promotores está asociada al silenciamiento de genes tejido-específicos y a la inactivación del cromosoma X (Straussman *et al.*, 2009). Sin embargo, la realidad es mucho más compleja.

Hay que considerar que alrededor del 70% de los genes anotados, incluidos casi todos los genes de expresión constitutiva y una fracción de los genes específicos de tejido y genes reguladores, contienen CGIs en sus regiones promotoras (Deaton *et al.*, 2011). Esta asociación refuerza la importancia de las CGIs en la regulación génica, pero dado que dichas CGIs suelen estar no metiladas también sugiere que dicho papel en la regulación génica no es exclusivamente dependiente de su metilación del ADN. De hecho, si nos fijamos en la distribución de CGs en los promotores génicos, observamos que no siguen una distribución normal si no que presentan una distribución dicotómica (Sharif *et al.*, 2010). Es decir, que existen dos tipos de genes, los que contienen CGIs, principalmente de expresión constitutiva, con una baja tasa evolutiva y una utilización de inicios de transcripción (TSS) relajados, y los genes sin CGIs, con una expresión más débil y restringida, una tasa evolutiva más alta y una utilización de TSS más estricta (Tang *et al.*, 2007). Esta distinción entre genes que contienen CGIs y los que no, también es patente en la distribución de motivos de unión a factores de transcripción ya que se observa que los genes que contienen CGIs tienden a carecer de elementos TATA y son más ricos en motivos tipo Sp1, NRF-1 y E2F (Deaton *et al.*, 2011).

En este sentido también es importante tener en cuenta que el ADN no se encuentra libre en la célula y que está asociado a histonas en forma de nucleosomas: fragmentos de 147 pares de

bases de ADN que se enrollan alrededor de octámeros de histonas - dos dímeros de histonas H2.A-H2.B y un tetrámero de histonas H3-H4 (Schones *et al.*, 2008). La distribución y compactación de estos nucleosomas determinan la estructura de la cromatina, actuando como auténticas barreras físicas que, en última instancia, regulan el acceso de la maquinaria transcripcional al ADN. Es por ello que una baja ocupación nucleosomal en los TSS está generalmente asociada a un mejor acceso de la polimerasa y una mayor expresión génica, mientras que, a la inversa, una alta ocupación nucleosomal suele estar asociada a un peor acceso y a una menor expresión (Schones *et al.*, 2008). En este sentido, y volviendo a la distinción entre genes con y sin CGIs, hay que destacar que las CGIs representan una plataforma inestable para el posicionamiento nucleosomal, favoreciendo el estado de no ocupación y, por ello, proporcionando un espacio accesible para la polimerasa y factores de transcripción (Ramírez-Carrozzi *et al.*, 2009). De ese modo se confiere sentido a la asociación entre CGIs y genes de expresión constitutiva, donde se mantiene el acceso a la maquinaria de transcripción, garantizando una expresión constante y general, menos dependiente de regulaciones específicas, y a la asociación entre genes sin CGIs y una expresión más restringida, donde existe un acceso más limitado y una mayor regulación (Ramírez-Carrozzi *et al.*, 2009).

Recientemente se ha observado que las CGIs no metiladas en promotores suelen presentar un enriquecimiento de guaninas en la hebra del sentido de la transcripción. Este enriquecimiento permite la estabilidad termodinámica de una estructura híbrida entre las dos hebras del ADN y el transcrito complementario de ARN, denominada *R-loop*, que tiene la propiedad de bloquear la metilación del ADN (Ginno *et al.*, 2012). De ese modo, se establece una sinergia en la que la existencia de una CGI no metilada facilita la expresión de un gen que, a su vez, mantiene dicha CGI libre de metilación. Esta sinergia actuaría también en el sentido contrario, ya que si se metila el ADN de dicha región, silenciándose la expresión del gen, no se forma el *R-loop* y se mantiene de manera estable el silenciamiento ayudando a perpetuar dichos estados de regulación.

Por tanto, no solo es importante considerar el estado de metilación del ADN, sino que también, el contexto en el que esta ocurre. Aunque implicando diferentes mecanismos de acción, la metilación de los TSS en genes, con y sin CGIs, está asociada con la represión transcripcional. De un modo similar, la metilación de los motivos de unión a factores de transcripción se asocia con una menor expresión génica (Choy *et al.*, 2010) y, dado que los factores de transcripción tienden a localizarse cerca de los TSS, se puede concluir que la metilación de las regiones promotoras está generalmente correlacionada con la represión génica. Por el contrario, cuando se presenta en los cuerpos de los genes, donde la densidad de

CGs es menor, la metilación del ADN se asocia positivamente con la expresión génica (Zemach *et al.*, 2010) y, por tanto, se trata en una marca de activación génica. Este diferente comportamiento de la metilación del ADN según el contexto establece unos perfiles completamente opuestos entre los genes altamente expresados, con una baja metilación en los TSS y una alta metilación en los cuerpos génicos, y los genes reprimidos, con una mayor metilación en los TSS y una menor metilación en los cuerpos génicos (**Figura 1**).

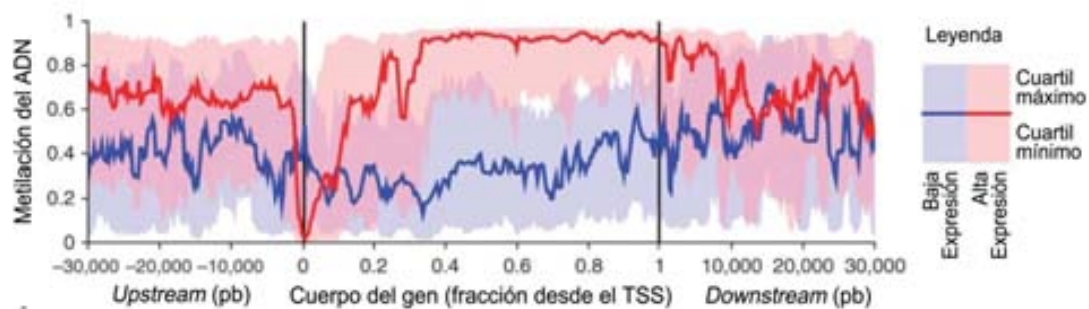


Figura 1. Perfiles de metilación del ADN media según posición genómica de genes alta y pobremente expresados basándose en los datos ENCODE para la línea celular GM06990 (Figura adaptada de Ball *et al.*, 2009. Nat Biotechnol).

Del mismo modo a lo que ocurre en los TSS, la metilación del ADN en los cuerpos génicos también se asocia con un mejor posicionamiento nucleosomal, pero en este caso, favoreciendo la extensión y la expresión génica (Guenther *et al.*, 2007). En este sentido, una mayor metilación de los exones del cuerpo del gen está asociada con una mayor inclusión en los transcritos finales, es decir, con su no *splicing* (Choi *et al.*, 2010). En consecuencia, el posicionamiento nucleosomal en los exones es también mayor, facilitando su reconocimiento y reforzando la idea de que la metilación del ADN y el posicionamiento nucleosomal están íntimamente relacionados (Tilgner *et al.*, 2009; Schwartz *et al.*, 2009; Chodavarapu *et al.*, 2010).

Otras observaciones también apoyan esta idea. Curiosamente, las ADN metiltransferasas (DNMTs), encima responsables de la metilación del ADN, se encuentran fuertemente ancladas a los nucleosomas (Jeong *et al.*, 2009), estableciendo una clara asociación entre el posicionamiento nucleosomal y la metilación del ADN. En general, se ha establecido que la DNMT1 es necesaria para mantener los patrones metilación durante la replicación del ADN,

mientras que las DNMT3A y DNMT3B son responsables de la metilación *de novo* del ADN durante el desarrollo. La carencia de estas enzimas provoca la hipometilación del genoma, de manera pasiva y dependiente de la replicación (Rhee *et al.*, 2002), pero el ADN también puede ser activamente desmetilado. En este sentido son necesarios varias actividades y pasos enzimáticos, incluyendo la oxidación de las 5-metilcitosinas (5mC) a 5-hidroximetilcitosinas (5hmC), y posteriormente a 5-formilcitosinas (5fC) y 5-carboxicitosinas (5caC), por las *ten-eleven translocation proteins* (TET), y la escisión y conversión final a citosinas por las *thymine-DNA glycosylases* (TDG) (Kohli y Zhang, 2013).

1.1.2 Modificación de Histonas

Como hemos visto, los nucleosomas son componentes importantes de la cromatina y están implicados en su regulación. La situación y compactación de dichos nucleosomas, aunque influenciada por la propia secuencia del ADN, está, principalmente, regulada por modificaciones covalentes en histonas. Dichas modificaciones tienden a ocurrir en las colas N-terminales de las histonas, con algunas excepciones afectando al núcleo globular de las mismas.

Existe una gran variedad de modificaciones que son fruto de la actividad enzimática de complejos antagonistas. Las dos principales modificaciones, la acetilación y metilación de lisinas, son el resultado de la actividad enzimática de las histona acetiltransferasas (HAT) y de las histona desacetilasas (HDAC), y de las histona metiltransferasas (HMTs) y de las histona desmetilasas (HDMTs), respectivamente (Portela *et al.*, 2010). Las fosforilaciones, las ADP-ribosilaciones, ubiquitinaciones, sumoilaciones, adenilaciones, y otras modificaciones, son también resultados de complejos antagónicos similares, aunque sus implicaciones funcionales han sido menos estudiadas.

Varios aminoácidos son susceptibles de ser modificados de diferentes maneras: las lisinas pueden ser acetiladas, mono-, di- o tri-metiladas, y mono- o poli-ubiquitiniladas; las argininas pueden ser desaminadas, mono-, o di-metiladas y mono- o poli-ADP-ribosiladas; las serinas y treoninas pueden ser N-acetylglucosaminadas y fosforiladas; los glutamatos pueden estar mono- o poli-ADP-ribosilados; las prolinas pueden ser isomerizadas; y, finalmente, las tirosinas pueden ser también fosforiladas. Por tanto, existe una gran variedad de modificaciones que

pueden ocurrir en múltiples residuos, por lo que se ha postulado la existencia de un verdadero código de histonas cuyas implicaciones funcionales son aún poco comprendidas.

Una de las modificaciones más estudiadas es la acetilación de histonas (H) en lisinas (K). La mayoría de ellas - H3K9, H3K14, H3K18, H3K27, H3K56, H4K5, H4K8, H4K12 y H4K16 - se encuentran en las colas de las histonas y su acetilación está asociada con la activación génica (Wang *et al.*, 2008), aunque, como hemos dicho, también existen modificaciones en el interior del núcleo de nucleosomal, como la acetilación de la H3K56. La acetilación de estas lisinas es fruto de la actividad de tres familias de HAT – las GNAT, MYST y CBP/p300 – cuya especificidad depende de su asociación con grandes complejos multiproteicos (Bannister y Kouzarides 2011). Por ejemplo, la lisina acetiltransferasa 2A (KAT2) - un miembro de la familia GNAT – acetila las lisinas H3K9 y H3K14 cuando se asocia con el adaptador transcripcional 2B (TADA2B) pero, en cambio, acetila las lisinas H4K5 y H4K12 cuando se asocia con el adaptador transcripcional 2A (TADA2A) (Pankotai *et al.*, 2005). De manera similar, la especificidad de las HDAC, que antagonizan los efectos de las HAT y, en consecuencia, se les considera represores transcripcionales, también depende de su asociación con grandes complejos multiproteicos (Yang y Seto, 2007).

Otra modificación de las histonas bien estudiada es también la metilación de las lisinas, que pueden ser mono-, di- o tri-metiladas. Contrariamente a lo que ocurre con la acetilación de histonas, el significado de cada modificación depende del aminoácido que se modifica y del número de grupos metilo añadidos. Por ejemplo, la mono-metilación de la H3K9 (H3K9me1) y de la H4K20me1 están asociadas con la activación génica, mientras que la tri-metilación de la H3K9 (H3K9me3) y de la H4K20me3 están asociadas con la represión génica (Wang *et al.*, 2008; Barski *et al.*, 2007). Del mismo modo, las H3K4me1, H3K4me3 y H3K36me3 representan marcas específicas enriquecidas en *enhancers*, TSS y cuerpos génicos, respectivamente (Heintzman *et al.*, 2007).

Contrariamente a lo que ocurre con la acetilación de histonas, las HMTs y las HDMTs son enzimas muy específicas que modifican lisinas concretas en un grado de metilación determinado. En este sentido, tres HMTs llevan a cabo la metilación de la H4K20 de manera específica. La monometilación de la H4K20 se lleva a cabo exclusivamente por la *SET domain containing 8* (SETD8), la dimetilación por la *suppressor of variegation 4-20 homolog 1* (SUV420H1), y la trimetilación, por la *suppressor of variegation 4-20 homolog 2* (SUV420H2). Del mismo modo, la metilación de la H3K79 es exclusivamente consecuencia de la actividad de la *DOT1-like histone H3 methyltransferase* (DOT1L), y la metilación de la H3K27 de la *enhancer*

of *zeste homolog 2* (EZH2). De manera similar, las HDMTs también muestran un alta especificidad de sustrato y, por ejemplo, la *lysine-specific demethylase 1A* (LSD1) exclusivamente desmetila las H3K4me1 y H3K9me2, pero no sus formas trimetiladas, y la subfamilia de *lysine-specific demethylases 4* (KDM4s) exclusivamente desmetila las formas di- y trimetiladas de las H3K9 y H3K36, pero no sus formas monometiladas (revisado en Bannister y Kouzarides, 2011).

Por tanto, una gran cantidad de aminoácidos pueden ser dianas de diferentes modificaciones llevadas a cabo por una gran variedad de enzimas y complejos, y, dado que algunos cambios impiden la presencia de otros, y viceversa, la complejidad del código de histonas es enorme. Algunas de estas modificaciones pueden regular directamente la estructura de la cromatina alterando la carga eléctrica de las histonas, como las acetilaciones y fosforilaciones, y otras, como las ubiquitilaciones, alteran la conformación de los nucleosoma por su gran tamaño.

Sin embargo, aunque estos efectos no pueden ser ignorados, el mayor efecto de estas modificaciones en la estructura de la cromatina está asociado a su importancia como "marcas" para la maquinaria celular. Por ejemplo, la H3K4me3 se asocia con TSS activos y se correlaciona con la expresión de genes, lo que es interpretado por la maquinaria celular como un indicador de "inicio de gen activo". La marca H3K36me3 se asocia con los cuerpos de los genes, especialmente en los exones que se incluyen en los transcritos finales (Hon *et al.*, 2009), y son interpretados por la maquinaria de *splicing* como una "marca de inclusión". De forma similar la H3K79me2, que se encuentra preferentemente en el primer intrón (Huff *et al.*, 2010), se reconoce como una "marca de intrón" y la H3K4me1, presente en los *enhancers*, como "enhancer activo" (Figura 2).

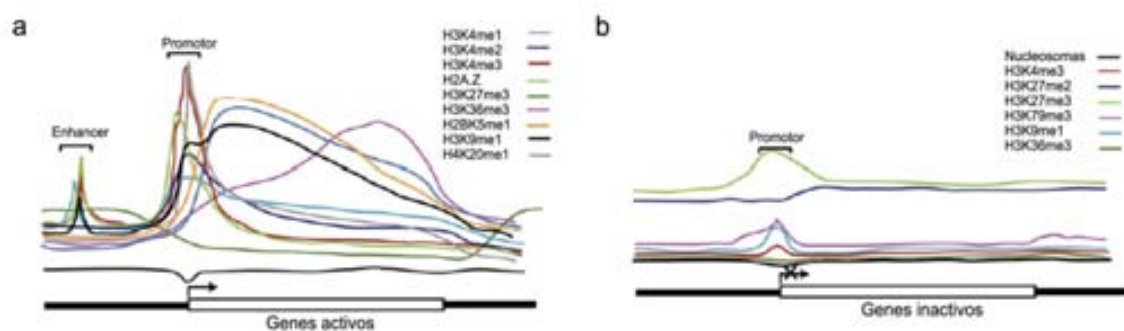


Figura 2. Perfiles de las diferentes modificaciones de histonas según posición genómica de genes activos (a) e inactivos (b) (Figura adaptada de Barski *et al.*, 2007. Cell).

1.1.3 Interacciones entre los diferentes mecanismos epigenéticos

Una analogía frecuentemente utilizada es hablar del código epigenético como de un lenguaje en el que las letras y las palabras son la metilación del ADN y las modificación de histonas, los escritores, las DNMTs, HATs y HMTs, y los correctores, las proteínas Tet, HDACs y HDMTs. En este lenguaje también hay lectores. Tres familias de proteínas son capaces de leer las 5mCs: las *methyl-CG binding domain proteins* (MBD) (MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3 y MBD4), las *SET-and Ring finger-associated proteins* (SRA) (UHRF1 y UHRF2) y las proteínas de la familia KAISO (Kaiso, ZBTB4 y ZBTB38). La acetilación de las histonas es leída por las proteínas que contienen bromodominios y dominios PHD en tándem, y la metilación, por proteínas que contienen cromodominios, dominios PHD, dominios WD40, Tudor, MBT, zf-CW, PWWP y repeticiones ankirina.

Siguiendo en la misma línea que las HATs y las HDACs, las proteínas que leen las marcas de acetilación muestran una baja especificidad y pueden reconocer diferentes aminoácidos modificados. Aunque que hay que destacar que, en este sentido, existe una cierta especificidad en algunas enzimas, como por ejemplo, en una de las variantes de *splicing* del gen *D4 zinc and double PHD fingers family 3* (DPF3), la DPF3b, tiene una mayor afinidad por las H3 acetiladas que por las H4 acetiladas. Del mismo modo que con las HMTs y las HDMTs, las proteínas que leen la metilación de las histonas muestran también un mayor grado de especificidad. Por ejemplo, destacar que la *PWWP domain-containing protein 1* (PDP1) reconoce exclusivamente las H4K20me1 y la *crumbs homolog 2* (CRB2), la H4K20me2 (revisado en Yun *et al.*, 2011).

En realidad, toda esta maquinaria de escritores, lectores y correctores no actúa independientemente y está asociada a grandes complejos, en los que se establece una profunda interacción entre las diferentes marcas epigenéticas. Así, se observa una fuerte relación entre la metilación del ADN y las marcas de las histonas que, actuando conjuntamente, son capaces de regular la mayoría de los aspectos del genoma y el transcriptoma. Por ejemplo, las proteína MeCP2 y KAISO, que reconocen sitios de ADN metilados, son capaces de interactuar con las HDAC1 y HDAC3 vinculando la metilación del ADN y la desacetilación de histonas (Suzuki *et al.*, 2003; Yoon *et al.*, 2003). De forma similar, la proteína UHRF1, que también reconoce sitios del ADN metilados, es capaz de interactuar con las diferentes DNMTs y con la histona metiltransferasa G9A proporcionando, en este caso, un enlace entre la metilación del ADN y la metilación de las H3K9 (Meilinger *et al.*, 2009; Rottach

et al., 2010). También existe una fuerte interacción entre las diferentes marcas de histonas como puede observarse, por ejemplo, con el hecho de que la histona acetilasa GCN5 es capaz de reconocer las marcas de H3K4me3, vinculando la metilación y la acetilación de histonas en contextos específicos. Como hemos mencionado anteriormente, tanto la acetilación de histonas como la H3K4me3 son marcas de activación génica, estableciéndose una sinergia que favorece la unión de la *transcription factor II D* (TFIID) de la polimerasa, que se une más fuertemente a la H3K4me3 cuando está flanqueado por las marcas H3K9ac y H3K14ac (Vermeulen *et al.*, 2010).

Siguiendo con la analogía del lenguaje, todas las lenguas tienen sus propios intérpretes y, en este caso, se trata de los complejos remodeladores de la cromatina que, en función de las diferentes marcas epigenéticas, son capaces de regular la presencia y posición de los nucleosomas en el genoma.

Existen tres grandes familias de complejos remodeladores: los SWI/SNF, los NuRD y los ISWI. La familia de los SWI/SNIF comprende una serie de complejos compuestos por 11 subunidades, codificadas por 20 genes, que se ensamblan de manera alternativa generando 288 combinaciones posibles. En estos complejos siempre aparece una ATPasa (BRG o BRM), una proteína BAF60 específica (BAF60a, BAF60b o BAF60c), y varias subunidades especializadas que varían entre los diferentes complejos. Como ejemplo de estas subunidades podríamos destacar a BAF53b, que se expresa exclusivamente en neuronas, y cuya ausencia en ratones es incompatible con la vida, observándose una fuerte reducción de la extensión de las neuritas y de la formación de sinapsis (Wu *et al.*, 2007). Una estructura modular similar se observa en las familias NuRD, con 48 combinaciones posibles, y la ISWI, con siete (Wu *et al.*, 2009).

En general, podríamos decir que estos complejos de remodelación son verdaderos políglotas que, interactuando con diferentes proteínas de la cromatina y factores de transcripción (Reddy *et al.*, 2010), son capaces de leer los diferentes contextos y marcas epigenéticas, interpretando que regiones deben ser expuestas o ocultadas, que regiones tienen que ser compactadas o relajadas, y, en definitiva, que regiones van a estar activas en cada momento y tipo celular concreto.

1.2. Epigenética del sistema nervioso

El sistema nervioso es un sistema altamente especializado en el que millones de células, con perfiles epigenéticos específicos, se organizan en diferentes estructuras con patrones epigenéticos y de expresión característicos (Xin *et al.*, 2010; Ko *et al.* 2013). Es en el sistema nervioso donde, como mecanismo de pan-regulación genómica, la epigenética afronta uno de sus mayores retos. Es donde tres de cada cuatro genes es expresado (Johnson *et al.*, 2009), y donde se expresan más variantes de *splicing* (Yeo *et al.*, 2004) y micro-RNAs (Cao *et al.*, 2009) que en ningún otro tejido. Además, estos patrones de expresión están siendo continuamente modulados por la actividad cerebral, la memoria y el aprendizaje (Zovkic *et al.*, 2013), expresándose en menos del 20% de las células más del 70% de los genes expresados en cerebro (Lein *et al.*, 2007).

En definitiva, el sistema nervioso es una estructura sumamente compleja en la que no solo existe una importante variabilidad estructural, sino en la que también existe una gran variabilidad celular. Por tanto, se trata de sistema altamente dependiente de la regulación epigenética y, con ello, también especialmente sensible a sus perturbaciones. Por eso, no es sorprendente que cada vez más alteraciones epigenéticas se asocien a enfermedades neurológicas (Jakovcevski y Akbarian, 2012) y que cada vez más indicios sugieran su relevancia en muchas otras.

La importancia de la metilación del ADN y de las modificaciones de histonas en el desarrollo neurológico queda patente por el hecho de que mutaciones en los genes de la maquinaria epigenética causan graves enfermedades asociadas a retrasos mentales severos (Berdasco y Esteller, 2013). En este sentido es destacable que, mutaciones en genes que establecen marcas epigenéticas, como la ADN metiltransferasa DNMT1 o en la histona acetiltransferasa *CREB-binding protein* (CBP), causan *neuropatía hereditaria sensorial autónoma con demencia tipo 1* (HSAN1) y *síndrome de Rubinstein-Taybi* respectivamente, y que mutaciones en genes que se encargan de leerlas, como MECP2, o de interpretarlas, como genes de la familia SWI/SNF, causan *síndrome de Rett* y *síndrome de Coffin-Siris* respectivamente (Urduingio *et al.*, 2009; Sanchez-Mut *et al.*, 2012; Berdasco y Esteller, 2013).

Pero quizás uno de los descubrimientos más fascinantes de la neurociencia actual que apoya la relevancia de la epigenética en la función del sistema nervioso ha sido el descubrimiento de que la actividad neuronal modifica la metilación del ADN y las marcas de histonas, y que la

memoria y el aprendizaje están sustentados por cambios epigenéticos (Levenson *et al.*, 2004; Miller y Sweatt, 2007; Ma *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2011; Zovkic *et al.*, 2013). De hecho, la eliminación de las DNMT1 y DNMT3a, y de las HMT GLP y G9A, en neuronas diferenciadas provoca alteraciones en la memoria y el aprendizaje (Feng *et al.*, 2010; Kramer *et al.*, 2011), así como también la sobreexpresión de la proteína MECP2 (Na *et al.*, 2012) o la proteína HDAC2 (Guan *et al.*, 2009), correlacionándose con un menor densidad dendrítica y un menor número de sinapsis. Por el contrario, las deficiencias en HDAC2 y HDAC3 facilitan la formación de la memoria y el aprendizaje, aumentando, a su vez, el número de dendritas y sinapsis (Guan *et al.*, 2009; McQuown *et al.*, 2011).

En ese sentido, es de destacar que tratamientos con inhibidores de las HDAC, como el ácido valproico (VPA) o el butirato sódico (BS), han demostrado ser capaces de potenciar la memoria y el aprendizaje en diferentes modelos animales (Gräff y Tsai, 2013), así como también reducir los déficits cognitivos asociados a patologías como la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Huntington (Zhang *et al.*, 2013).

1.3. Enfermedad de Alzheimer

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es un proceso neurodegenerativo que representa, con un 70%, la principal causa de demencia en las sociedades occidentales, afectando al 11% de la población de más de 65 años y al 50 % de más de 85 (Smith, 1998; Blennow *et al.*, 2006). Se trata de una enfermedad compleja y heterogénea, en la que se puede establecer una clara dicotomía entre las formas familiares, de alta penetrancia y de aparición temprana (<65 años), y las formas esporádicas, mucho más frecuentes, con agregación familiar difusa y de aparición tardía (>65 años) (Tanzi, 1999; Bird, 2008). Se caracteriza por un declive progresivo de las capacidades cognitivas generales acompañada de una acumulación de placas amiloideas y de neurofibrillas de proteína TAU hiperfosforilada (Duyckaerts y Dickson, 2003; Lowe *et al.*, 2008).

Aunque se acepta que es una enfermedad multigénica, amén de su componente ambiental (Chouliaras *et al.*, 2010), solamente se han conseguido identificar cuatro genes que causen o confieran un riesgo importante ante la EA: *amyloid beta precursor protein (APP)*, *presenilin 1 (PSEN1)*, *presenilin 2 (PSEN2)*, y *apolipoprotein E (APOE)* (Levy *et al.*, 1990; Van Broeckhoven *et al.*, 1990; Sherrington *et al.*, 1995; Rogaeve *et al.*, 1995; Corder *et al.*, 1993). En este sentido, mutaciones en *APP*, *PSEN1* y *PSEN2*, son responsables de la mayoría de las formas de aparición

temprana, representando alrededor del 5% de los casos totales, y determinados haplotipos del gen *APOE*, aunque no sean causa suficiente, confieren un riesgo importante a padecerla. De hecho poseer una o dos variantes $\epsilon 4$ del gen *APOE* confiere, según estudios, entre 2.7 y 33.1 veces más riesgo a padecer la enfermedad (Bertram *et al.*, 2007). Muchos otros genes han sido también asociados a las formas esporádicas de EA, aunque con riesgos asociados muy limitados (Bertram *et al.*, 2007; Lamber *et al.*, 2013).

Es interesante destacar que las mutaciones en *APP*, *PSEN1* y *PSEN2* asociadas a las formas familiares de EA tienden a favorecer la generación de placas amiloideas (Tanzi y Bertram, 2005; Tanzi, 2013). Esto es consecuencia de que la proteína APP puede ser secuencial y alternativamente procesada por los complejos α -/ γ -secretasas, liberando un fragmento soluble denominado P3, o por los complejos β -/ γ -secretasas, liberando el fragmento insoluble β -amiloide ($A\beta$), del que existen dos isoformas mayoritarias - $A\beta 40$, relativamente benigna, y $A\beta 42$, más tóxica y con una mayor tendencia a agregar. En este sentido, la generación del fragmento $A\beta 42$, que es el principal componente de las placas amiloideas, está favorecida por las mutaciones en *APP*, *PSEN1* y *PSEN2* (Tanzi y Bertram, 2005; Tanzi, 2013).

Estas observaciones han llevado a postular la denominada hipótesis amiloidea que sugiere que el péptido $A\beta$ y las placas amiloideas juegan un papel central en la etiopatología de la EA (Hardy y Allsop, 1991; Hardy y Higgins, 1992; Hardy, 1997). De hecho, esta hipótesis está sustentada por un gran número de evidencias, destacando, por ejemplo, la asociación entre las placas amiloideas y la presencia de neuritas distróficas, astrogliosis, y pérdida de sinapsis observada en EA (Serrano-Pozo *et al.*, 2011), la alta prevalencia de la EA en el síndrome de Down (Wisniewski *et al.*, 1985; Coppus *et al.*, 2006), donde existe una copia extra del cromosoma 21, y por tanto del gen *APP*, o el hecho de que los péptidos $A\beta$ provoquen neurodegeneración *in vitro* (Yankner *et al.*, 1990; Pike *et al.*, 1991; Mattson *et al.*, 1992; Pike *et al.*, 1993). En este sentido, es interesante destacar que, al igual que la EA muestra un avance progresivo, la acumulación de placas amiloideas también muestra un patrón espacio-temporal característico, estableciéndose, principalmente, tres estadios: 1) Estadio A, con afectación de las regiones basales de la corteza frontal, temporal y occipital; 2) Estadio B, con afectación de todas las regiones asociativas de la corteza, pero no de las regiones primarias; y 3) Estadio C, con afectación de toda la corteza, incluyendo las regiones primarias (**Figura 3a**; Braak y Braak, 1991). Des del punto de vista laminar, los depósitos amiloideos tienden a afectar a todas las capas de la corteza por igual, aunque las capas I y VI parecen estar un poco más protegidas.

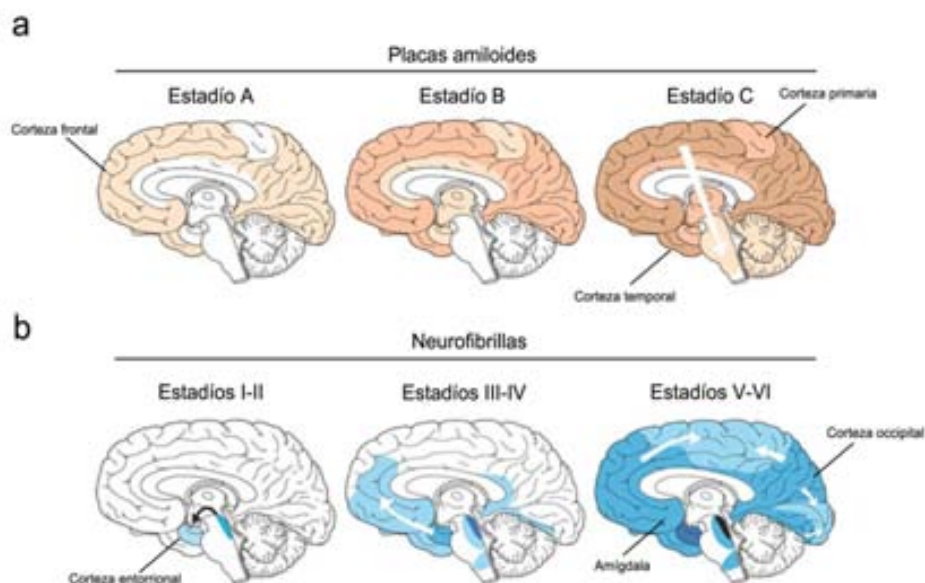


Figura 3. Progresión de la EA a lo largo de los diferentes estadios de Braak. Patrón de acumulación de placas amiloides (a) y neurofibrillas (b). Las flechas muestran las principales tendencias de acumulación (Figura adaptada de Jucker y Walker, 2011. *Ann Neurol.*).

Lamentablemente, aunque la patología amiloidea muestra una progresión en la EA, la correlación con la severidad o duración de la EA es baja, poniendo en duda si las placas amiloides son causa o consecuencia de la patología, y el modo en que estas se asocian con la enfermedad (Nelson *et al.*, 2012). De hecho, el péptido A β puede formar diferentes tipos de agregados, existiendo una gran controversia respecto al tipo o tipos de agregados que serían responsables de la pérdida neuronal y de los déficits cognitivos asociados a la EA, pudiendo ser incluso algunas de esas formas neuroprotectoras (revisado en Gilbert, 2014).

A diferencia de lo que ocurre con las placas amiloides, las neurofibrillas de proteína TAU hiperfosforilada sí presentan una fuerte correlación con la severidad y duración de la EA, mostrando, además, un patrón de progresión espacio-temporal mucho más consistente. En este caso, se han establecido seis estadios: Estadio I, afectación de la corteza entorrinal; Estadio II, afectación del hipocampo; Estadio III, afectación de las estructuras límbicas; Estadio IV, afectación de la amígdala y del tálamo; Estadio V, afectación de las regiones asociativas de la corteza, pero no de las regiones primarias; y Estadio VI, afectación de toda la corteza, incluyendo las regiones primarias (**Figura 3b**; Braak y Braak, 1991). También, a diferencia de las placas amiloides, las neurofibrillas presentan un patrón laminar, afectando principalmente a las capas II y IV en la corteza entorrinal, al estrato piramidal de la región CA1 del hipocampo, y

a las capas III y V en el resto de regiones corticales. Por el contrario, en el caso de las neurofibrillas no existe una asociación genética directa con la enfermedad y, junto con el hecho de que dichas neurofibrillas se encuentran frecuentemente en otras enfermedades, así como también en población envejecida sin demencia, ha llevado a sugerir que podría tratarse más bien de una consecuencia de la enfermedad y no de un agente causante de la misma (Nelson *et al.*, 2012). Aunque hay que destacar que ciertas mutaciones en el gen TAU causan otras formas de demencia y neurodegeneración, tales como la demencia frontotemporal, sugiriendo que la relación entre las neurofibrillas, la neurodegeneración y la EA es mucho más compleja (Nelson *et al.*, 2012). De hecho, existe una cierta controversia respecto a la relación entre las placas amiloides, las neurofibrillas y la EA, aunque la progresión espacio-temporal de ambas marcas histopatológicas, y su relación con la demencia, han sido irrefutablemente asociadas a la EA, observándose exclusivamente en los casos más severos la co-ocurrencia de estadios amiloides “C” y de neurofibrillas “V-VI” (Nelson *et al.*, 2012).

1.4. La metilación del ADN en la enfermedad de Alzheimer

Como hemos mencionado anteriormente, todo proceso fisiológico o patológico está sustentado por cambios epigenéticos, y dada la importancia de la epigenética en el aprendizaje y la formación de la memoria, la EA no debería ser una excepción. De hecho, numerosas evidencias apuntan en esa dirección como, por ejemplo, el hecho de que la EA sea mayoritariamente esporádica, que el patrón de aparición de la EA en gemelos monocigóticos no se ajuste a la herencia Mendeliana (Gatz *et al.*, 1997; Raiha *et al.*, 1997; Gatz *et al.*, 2005), que el principal riesgo ante la EA sea el envejecimiento (Chouliaras *et al.*, 2010) – que, a su vez, está asociado a cambios epigenéticos (Heyn *et al.*, 2012)-, o que la aparición de la EA esté influenciada por factores ambientales como la dieta, modo de vida o nivel educativo (Chouliaras *et al.*, 2010), donde la epigenética actuaría como mediador entre el componente ambiental y el genético.

A pesar de ello, el número de estudios epigenéticos de la EA es aún muy escaso, siendo todavía controvertido si los cambios epigenéticos afectan a regiones concretas del ADN o son más bien generales, o en el caso de que sean generales, si se pueden observar tendencias generales como, por ejemplo, la ganancia o a la pérdida de metilación del ADN. En este sentido, es importante mencionar que estas cuestiones se han abordado desde perspectivas muy

diferentes y que los resultados obtenidos están fuertemente influenciados por las aproximaciones experimentales, las muestras-regiones analizadas y las técnicas utilizadas. Parte de estos estudios se han basado en líneas celulares, otros, en modelos animales, y otros, en muestras post-mortem humanas. Además, se han utilizado diferentes técnicas para la determinación de la metilación del ADN que varían desde la utilización de enzimas de restricción del ADN – 5mC dependientes –, a la utilización de anticuerpos que reconocen específicamente las 5mC, o incluso hasta la lectura directa de la metilación del ADN mediante la modificación con bisulfito sódico – técnica que se basa en la modificación diferencial de las citosinas metiladas, que se mantienen como citosinas, y las no-metiladas, que se transforman en timinas- (para una revisión de métodos ver Harris *et al.*, 2010). Por tanto, teniendo en cuenta la escasez de estudios y su gran variabilidad experimental, establecer conclusiones es difícil, pudiéndose, de momento, solo establecer suposiciones a la espera de una mayor validación experimental.

En general, el uso de líneas celulares, independientemente de la técnica utilizada, sugiere que la presencia del péptido A β está asociada a una hipometilación general del genoma, observándose, por ejemplo, que en la línea celular H4 de glioblastoma con la doble mutación del gen APP (K670M/N671L), mutación identificada en una familia sueca que provoca un aumento del procesado por las β -secretasas y la producción de A β (Mullan *et al.*, 1992; Citron *et al.*, 1992; Haass *et al.*, 1995), existe una tendencia a la pérdida de metilación del ADN medida con *arrays* basados en sondas que reconocen CGs específicas del genoma y la modificación del ADN con bisulfito sódico (a partir de ahora denominados *5mC-arrays*) (Sung *et al.*, 2011). De manera similar, el tratamiento con medio condicionado obtenido a partir de células que sobreexpresan la mutación del gen APP (V717F), mutación identificada en una familia rumana por un grupo de Indiana que provoca un aumento de la producción de A β (Murrell *et al.*, 1991; Suzuki *et al.*, 1994), en la línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma induce una hipometilación general del ADN medida mediante la utilización de anticuerpos que reconocen el ADN metilado (a partir de ahora denominados *5mC-Ab*) (Hodgson *et al.*, 2013). El tratamiento de células endoteliales de la microvasculatura cerebral de ratones con el péptido A β también provocó una bajada de la metilación del ADN global medida con cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (Chen *et al.*, 2009). Aunque también hay que mencionar que, a diferencia de las anteriores observaciones, el tratamiento con el péptido A β en la línea celular IMR-32 de neuroblastoma no resultó en cambios de metilación globales medidos mediante la utilización de enzimas sensibles a la 5mC e hibridando el resultante ADN en *arrays* de ADN (Taher *et al.*, 2014).

Los niveles de los de metilación globales en modelos murinos de la EA han sido mucho menos estudiados y, hasta la fecha, solo un trabajo ha abordado esta importante cuestión. En este sentido, Cong y colaboradores, utilizaron ratones APP^{swe}/PS1^{dE9} – que presentan una combinación de la mutación sueca del gen APP junto a la delección del exón 9 del gen PSEN1 que provoca un aumento de la producción del péptido A β (Borchelt *et al.*, 1997) – y la inmunoprecipitación del ADN con anticuerpos que reconocen las 5mC seguida de la hibridación en *arrays* de ADN (técnica conocida como MeDIP). De ese modo, alrededor del 10% de los genes analizados (2.346 de los 20.404 contenidos en el *array* de ADN) mostraron mayores niveles de metilación en los ratones APP^{swe}/PS1^{dE9}, no reportándose genes hipometilados (Cong *et al.*, 2013), por lo que, a diferencia de lo que ocurre con los modelos celulares, los modelos murinos de la EA presentan, aunque leves, mayores niveles de metilación.

El estudio de muestras post-mortem humanas no ha ayudado a resolver esta aparente discrepancia, y la cuestión de si existe una ganancia o pérdida de metilación neta del ADN en la EA sigue estando abierta. En este sentido, utilizando *5mC-Ab*, se ha observado una pérdida de metilación del ADN en la corteza temporal de gemelos monocigóticos discordantes para la EA (Mastroeni *et al.*, 2009), así como también en la corteza entorrinal (Mastroeni *et al.*, 2010) e hipocampo de muestras post-mortem de EA (Chouliaras *et al.*, 2013). En cambio, en otros estudios, también utilizando *5mC-Ab*, se ha observado una ganancia de metilación en la corteza frontal (Bakulski *et al.*, 2012; Coppieters *et al.*, 2013), la corteza temporal (Coppieters *et al.*, 2013) e hipocampo de muestras de EA (Bradley-Whitman y Lovell, 2013), así como también, utilizando *5mC-arrays*, en corteza frontal (Bakulski *et al.*, 2012). En el caso de las muestras humanas, es interesante destacar que tanto la magnitud de los cambios de metilación observados como la cantidad de muestras analizadas es relativamente pequeña, por lo que las dichas variaciones podrían ser tanto consecuencia de las diferencias entre las regiones analizadas, como de la variación interindividual o de la variación experimental, ya que existen diferencias de metilación entre diferentes regiones (Ladd-Acosta *et al.*, 2007; Xin *et al.*, 2010; Hernandez *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011; Davies *et al.*, 2012), diferencias de metilación entre diferentes individuos (Turan *et al.*, 2010; Heyn *et al.*, 2013) y los ensayos *5mC-Ab* son difícilmente estandarizables. Por tanto, a la luz de los resultados, los datos sugieren que si existen diferencias de metilación en la EA estas deben ser pequeñas o estar asociadas a loci concretos.

Como es lógico pensar, los primeros esfuerzos para determinar si existen loci específicamente alterados en la EA se han centrado en los genes de la hipótesis amiloidea, aunque con escaso

éxito. En ese sentido, uno de los genes más profusamente estudiados ha sido el gen APP. A pesar de que se han detectado casos de EA en los que el gen APP podría estar hipometilado (West *et al.*, 1995), estas diferencias no parecen ser representativas en el conjunto de la EA y estudios con mayores tamaños muestrales no han sido capaces de encontrar diferencias significativas en corteza frontal, corteza parietal, hipocampo y cerebelo (Yoshikai *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 2008; Barrachina y Ferrer, 2009; Brohede *et al.*, 2010). De manera similar, los estudios dirigidos a determinar si el gen PSEN1 está diferencialmente metilado en la EA tampoco han sido concluyentes. En este caso, el hecho de que un menor poder de metilación en la línea celular SK-N-BE de neuroblastoma, provocado por la carencia de S-adenosilmetionina (SAM) - principal dador de grupos metilo - o de vitaminas B12 o B6 - que participan en la asimilación de la SAM-, resulte en la hipometilación del gen PSEN1 medida con enzimas sensibles a 5mC y posterior PCR (Fuso *et al.*, 2005) ha despertado un gran interés, ya que la alteración de la ruta de asimilación de grupos metilo ha sido frecuentemente asociada a la EA (Ford y Almeida 2012; Hinterberger y Fischer 2013). En este sentido, hay que destacar que la SAM es el resultado de la asimilación del ácido fólico proveniente de la dieta, en un proceso en el que participan las vitaminas B6 y B12, y en el que uno de los principales metabolitos es la homocisteína. Tanto los bajos niveles de ácido fólico, como de vitaminas B6 y B12, como los altos niveles de homocisteína – que indicarían un desequilibrio de la ruta y una menor producción de SAM- han sido repetidamente asociados a la EA (Ford y Almeida 2012; Hinterberger y Fischer 2013). De manera similar a lo que ocurre en la línea celular SK-N-BE, el mantenimiento del modelo murino de EA TgCRND8, en el que se combina las mutaciones sueca e indiana del gen APP (Chishti *et al.*, 2001), con una dieta pobre en vitamina B6 se observa una hipometilación y sobreexpresión del gen PSEN1 (Fuso *et al.*, 2011), medida con enzimas sensibles a 5mC y posterior PCR, que puede ser revertida con la suplementación de SAM (Fuso *et al.*, 2012). Estos interesantes datos podrían sugerir que el gen PSEN1 podría estar hipometilado y sobreexpresado en EA como consecuencia de una falta de poder de metilación asociada a altos niveles de homocisteína y/o bajos niveles de vitaminas B6/12. Esta hipótesis, aunque mecanísticamente posible, no ha podido ser demostrada, ya que en los estudios llevados a cabo en muestras post-mortem humanas no se han observado diferencias en la metilación del gen PSEN1 en corteza frontal (Wang *et al.*, 2008; Barrachina y Ferrer, 2009) e hipocampo (Barrachina y Ferrer, 2009) medidas por espectrometría de masas (MALDI) y secuenciación del ADN tras la modificación con bisulfito sódico. Por último, siguiendo con la lista de genes importantes en la etiopatología de la EA, aunque ya fuera de la hipótesis amiloidea, tampoco se han observado diferencias de metilación en el gen TAU en corteza

frontal e hipocampo de muestras post-mortem humanas de EA medida por secuenciación del ADN tras su modificación con bisulfito sódico (Barrachina y Ferrer, 2009).

A diferencia de lo que ha ocurrido con los estudios de gen candidato, los estudios basados en estrategias de “high-throughput” y muestras post-mortem humanas de EA están siendo más exitosos. Estos estudios están haciendo aflorar toda una serie de nuevos genes asociados a la EA fuera de la hipótesis amiloidea que están ampliando los horizontes de la EA. Aún así, hay que destacar que el número de estudios reportados es todavía escaso y que ninguno de los genes identificados como diferencialmente metilados en la EA ha sido validado por grupos independientes, por lo que los resultados deberían interpretarse más como prometedoras posibilidades que como auténticas realidades. En este sentido, Siegmund y colaboradores, utilizando la modificación del ADN con bisulfito sódico y posterior PCR, han observado que los genes *S100 calcium binding protein A2 (S100A2)* y el *sorbin and SH3 domain containing 3 (SORBS3)* se encuentran hipometilados y hipermetilados en corteza frontal de muestras post-mortem de EA respectivamente (Siegmund *et al.*, 2007). Utilizando una aproximación similar, Bakulski y colaboradores, han observado que el gen *transmembrane protein 59 (TMEM59)* se encuentra hipometilado en corteza frontal de muestras post-mortem de EA (Bakulski *et al.*, 2012). Rao y colaboradores, que los genes *ciclooxigenase 2 (COX2)*, *brain-derived neurotrophic factor (BDNF)* y *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NFkB)* se encuentran hipometilados en corteza frontal de muestras post-mortem humanas medida con enzimas sensibles a 5mC y posterior PCR, mientras que el gen *cAMP response element-binding protein (CREB)* se ha observado hipermetilado (Rao *et al.*, 2012). También trabajando con muestras post-mortem humanas, pero partiendo de modelos murinos de EA, Agbemenyah y colaboradores, han observado que el gen *insulin-like growth factor-binding protein 7 (IGFBP7)* está hipometilado en ratones APPPS1-21, en los que se combina la mutación sueca del gen APP y la mutación (L166P) en el gen PSEN1 que produce un aumento de la producción de AB (Radde *et al.*, 2006), y en corteza frontal de muestras post-mortem humanas de EA medidas inmunoprecipitando el ADN con anticuerpos que reconocen las 5mC seguida de PCR (Agbemenyah *et al.*, 2014).

Planteamiento y objetivos

2. Planteamiento y objetivos

La EA es la principal causa de demencia en las sociedades avanzadas y para la cual no existe aún ningún tratamiento efectivo. Parte de esta carencia es consecuencia de la poca información que tenemos a cerca de los mecanismos que desencadenan la enfermedad. Los patrones epigenéticos han demostrado jugar un papel importante en la función cerebral y las primeras evidencias apuntan a que podrían estar implicadas también en la etiopatología de la EA. Por ello, el objetivo principal de esta tesis es investigar las alteraciones de la metilación del ADN que puedan subyacer a la EA. Para ello, se han definido los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar si la metilación del ADN es funcionalmente relevante en el sistema nervioso.
2. Determinar si existen diferencias de metilación del ADN en modelos murinos de EA.
3. Determinar la utilidad de los modelos murinos de EA para identificar cambios de metilación del ADN en muestras humanas de EA.
4. Determinar si existen diferencias de metilación del ADN en muestras humanas de EA.
5. Determinar si estas alteraciones de la metilación del ADN son funcionalmente relevantes en la EA.

Durante el desarrollo de esta tesis, las técnicas de análisis epigenómico han sufrido un gran avance aumentando en gran medida su resolución. Por ello, el progreso de la tesis se ha ido adaptando a las diferentes plataformas de análisis de la metilación del ADN disponibles en cada momento. Como consecuencia, la tesis se ha estructurado en tres estudios animados a responder los anteriores objetivos específicos de la siguiente manera:

1º Estudio: Caracterización de los patrones de metilación del ADN de las diferentes regiones del sistema nervioso del ratón (Con el fin de responder al objetivo 1).

2º Estudio: Determinación de los patrones aberrantes de metilación del ADN en modelos murinos de la EA y posterior validación en muestras post-mortem humanas (Con el fin de responder a los objetivos 2 y 3).

3º Estudio: Determinación de los patrones aberrantes de metilación del ADN en muestras post-mortem humanas con EA (Con el fin de responder a los objetivos 4 y 5).

Material y métodos

3. Material y métodos

3.1. Líneas celulares y establecimiento de clones estables

Las líneas celulares SH-SY5Y (ATCC CRL-2266), SK-N-AS (ATCC CRL-2137), SK-N-BE(2) (ATCC: CRL-2271), SK-N-F1 (ECACC 94092304), SK-N-JD y SK-N-SH (ATCC HTB-11) se crecieron en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) con 4.5 g/l de glucosa, L-glutamina, y suplementado al 10% con suero bovino fetal y un 1% de penicilina/estreptomicina, en un incubador humidificado a 37°C de temperatura y con un 5% de CO₂. La línea SK-N-BE(2) se transfectó utilizando *Lipofectamine 2000* (Invitrogen), el plásmido pCMMV6 con una construcción que combina el gen DUSPP22 en pauta de lectura con la etiqueta *myc* en su extremo C-terminal, y los plásmido pGFP-V-RS con las diferentes construcciones sh-ARN y *scramble* según las instrucciones del fabricante (Origene). Para seleccionar clones de expresión se empleó G418 a 500 µg/ml y para los de sh-ARN, puromicina a 1 µg/ml, ambos durante 2-3 semanas. Los niveles de re-expresión y silenciamiento se midieron por *western-blot* y PCR cuantitativa. Dos clones independientes de cada construcción se utilizaron para cada uno de los experimentos posteriores.

3.2. Muestras murinas

Para la determinación de los perfiles de metilación del ADN en las diferentes regiones cerebrales se utilizaron ratones C57BL/6J obtenidos de los laboratorios Charles River (Charles River, L'Arbresle, Francia). Se utilizaron seis muestras P60 (3 hembras y 3 machos) para la hibridación en el *array* de metilación del ADN de ratón y otra tanda independiente de seis muestras P60 (3 hembras y 3 machos) para la validación posterior por pirosecuenciación. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y sus cerebros fueron procesados dentro de los primeros 2 minutos post-mortem. Las diferentes regiones del cerebro fueron diseccionadas a partir de secciones cerebrales de criostato (-20°C) con la ayuda de una lente de aumento 5Xsiguiendo las coordenadas esterotáxicas previamente descritas (Paxinos y Franklin, 2001; Roux *et al*, 2003; Panayotis *et al.*, 2011a; Panayotis *et al.*, 2011b): corteza frontal (Distancia desde el bregma, 3.2), caudado-putamen (0.98), amígdala basolateral (-0.90

a -0.95), hipotálamo (-0.82), globo pálido (-1.20), tálamo (-1.34), hipocampo (-1.94), sustancia negra-área tegmental ventral (-3.08), y cerebelo (-5.80). Posteriormente, las regiones hipocámpales (CA1, CA3 y DG) y cerebelo (GCL y PC) fueron diseccionadas bajo un microscopio binocular utilizando una aguja de perforación (0.5 mm Ø). Para ver una representación en detalle ver **Anexo 1**.

Para el análisis de las diferencias de metilación en los modelos murinos de EA se utilizaron muestras de la corteza frontal del modelo APP/PSEN1 (Borchelt *et al.*, 1997) y el modelo 3xTg-AD (Oddo *et al.*, 2003). Cinco hembras APP/PSEN1 de 12 meses de edad, cinco hermanas de camada no transgénicas, tres hembras 3xTg-AD de 18 meses de edad y tres hembras 3xTg control (129/C57BL6) de la misma edad se analizaron utilizando el *array* de metilación del ADN de ratón. Una serie independiente de cinco ratones de similares características por grupo se utilizó para la validación por pirosecuenciación, y otra, para los ensayos de ARN. Cuatro hembras APP/PSEN1 y cuatro hermanas no mutantes fueron anestesiadas por inyección intraperitoneal (0.2ml/10g de peso corporal) con una mezcla de ketamina (100mg/kg) y xilazina (20mg/kg) y sometidas a perfusión intracardiaca con una PBS 4% paraformaldehído. Los cerebros fueron extraídos y fijados con PBS 4% paraformaldehído durante 4 horas para su procesamiento inmunohistoquímico. Otro grupo de cuatro hembras APP/PSEN1 y cuatro hermanas no mutantes fueron sacrificadas por dislocación cervical, sus cerebros extraídos, diseccionados y conservados a -80°C hasta su procesamiento por *western-blot*. Todos los animales se mantuvieron con un ciclo de 12 horas luz-oscuridad y acceso libre a comida y agua. Los procedimientos experimentales realizados en esta tesis han cumplido con las directrices europeas para el cuidado y uso de animales de laboratorio (2010/63/UE) y fueron aprobados por el comité local de bio-ética (UB- IDIBELL).

3.3. Muestras post-mortem humanas

Las muestras post-mortem se obtuvieron del Banco de Cerebros del Instituto de Neuropatología (HUB-ICO-IDIBELL Biobanco). Todas las muestras se obtuvieron de acuerdo con las cuestiones éticas y leyes definidas por la Unión Europea, con la aprobación del Comité local de bio-ética. Las muestras fueron diseccionadas y sus estadíos de Braak caracterizados antes de su uso. Se extrajeron muestras de la sustancia gris de la corteza dorsolateral prefrontal área de Brodmann 9 (BA9) y del hipocampo, considerándose para los posteriores

análisis solo las muestras a partir de las cuales pudimos obtener ARN de buena calidad (RIN> 6.5). Para la validación de las diferencias observadas en los modelos murinos se utilizaron 20 muestras control y 20 muestras EA Braak V-VI C de la región BA9, pareadas por sexo, edad y tiempo post-mortem (PMI) (controles: 65% mujeres, edad 71 ± 13 años, PMI 10 ± 1 h; EA: 72% mujeres, edad 82 ± 9 años, 8 PMI ± 1 h). Para la búsqueda de diferencias de metilación del ADN en el hipocampo de la EA se utilizaron un conjunto de cinco muestras control, cinco muestras EA Braak I-II, cinco muestras EA Braak III-IV y cinco muestras EA Braak V-VI (control: edad 78 ± 2.9 años; EA I- II: 82.4 ± 2.7 años; EA III-IV: 81 ± 0.8 ; EA V-VI: 77.2 ± 0.7). A continuación, se utilizó un segundo grupo de 25 muestras control (edad 63.7 ± 2.5 años) y 25 muestras EA Braak V-VI (76.9 ± 1.6 años) para validar dichos resultados. Una descripción detallada de las muestras utilizadas está disponible en el **Anexo 2**.

3.4. Extracción del ADN

Para la extracción del ADN se partió de pellets celulares o porciones de tejido pulverizadas con la ayuda de un mortero a -80°C . El material biológico fue resuspendido en 675 μl de Tampón de Lisis de DNA (Tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 200mM, EDTA 10mM, SDS al 2%), se añadieron 15 μl de Proteinasa K (10 mg/ml) y 20 μl de RNasa A (10 mg/ml), manteniéndose en agitación a 37°C durante toda la noche. A continuación, se añadió un volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1; saturado con Tris-HCl ph 8.0 y EDTA 1mM), se mezcló en la noria durante 10 minutos, y se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 13000 rpm, recuperando la fase acuosa (600 μl) en un tubo nuevo. Se añadió un volumen de cloroformo se mezcló por inversión, y se centrifugó nuevamente 10 minutos a 13000 rpm, recuperando la fase acuosa (500 μl) en un tubo nuevo. La precipitación del DNA se llevó a cabo añadiendo 0.1 volúmenes de acetato de amonio 10M, 1 volúmen de isopropanol absoluto e incubando las muestras durante 3 horas a -80°C . Posteriormente se centrifugaron las muestras durante 15 minutos a 13000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se lavó dos veces con etanol 70% (v/v). Finalmente, las muestras se resuspendieron en agua destilada en el volumen apropiado según el precipitado.

3.5. Extracción de ARN

Para la extracción del ARN se partió de pellets celulares o porciones de tejido pulverizadas con la ayuda de un mortero a -80°C . El material biológico fue resuspendido en 1 ml de Trizol (Invitrogen) y se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se centrifugaron las muestras a 13000 rpm durante 2 minutos a 4°C y se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo. Se añadieron 200 μl de cloroformo, se mezcló por inversión durante 15 segundos, y se dejó a temperatura ambiente durante 3 minutos más. Se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos a 4°C . Se transfirió la fase superior acuosa a un tubo nuevo (600 μl) conteniendo un volumen de 500 μl de cloroformo. Se mezcló por inversión durante 15 segundos, y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C . Se transfirió la fase superior acuosa a un tubo nuevo (500 μl) conteniendo un volumen de 500 μl de isopropanol al 100 %, y se mantuvo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se volvió a centrifugar a 13000 rpm durante 15 min a 4°C , precipitando el RNA, que se lavó con 1.5 ml de etanol al 75 % (el etanol al 75 % se preparó con agua con DEPC al 0.1 %) centrifugando a 7600 rpm durante 5 minutos a 4°C . Se eliminó con precaución el sobrenadante y se dejó el tubo abierto, a temperatura ambiente, durante unos 5 minutos, para evaporar los restos de etanol. Después se resuspendió con agua libre de RNasas, en un volumen apropiado (unos 50 μl) y su calidad (RIN) determinada utilizando el equipo *Agilent 2100 Bioanalyzer*. El RNA obtenido se trató con DNasas (Turbo DNA free, de Ambion). Para un volumen de 50 μl se añadieron 5 μl de tampón *Turbo DNase 10X* y 1 μl de encima *Turbo DNase*. Se incubó durante 25 minutos a 37°C y se inactivó la DNasa añadiendo 5 μl de resina inactivante. Se centrifugó a 13000 rpm durante 1 minuto, a temperatura ambiente, y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo.

3.6. Modificación del ADN con bisulfito sódico

Para la conversión del ADN se empleó el kit *EZ DNA Methylation-Gold* (Zymo Research) siguiendo las recomendaciones del fabricante y modificando el proceso de incubación del ADN con bisulfito siguiendo el protocolo recomendado por Bibikova y colaboradores (Bibikova *et al.*, 2009; Incubación del ADN durante 16 horas a 50°C en un termociclador, pasando por una etapa de desnaturalización cada hora a 95°C durante 30 s). El ADN modificado se eluyó a una concentración final de 20 ng/ μl .

3.7. Generación de controles de ADN metilado y no-metilado

Para generar el ADN completamente no-metilado se realizó una amplificación genómica total utilizando el *Repli-G kit* (Qiagen) y siguiendo las especificaciones del fabricante. Para generar el ADN metilado se utilizó parte del ADN resultante de la amplificación genómica total y se metiló *in vivo* con el enzima metiltransferasa SSSI (New England Biolabs). Para obtener el ADN metilado *in vitro* (IVD) se utilizaron 50 µg de ADN en 220 µl de volumen final de agua y se añadieron 25 µl de tampón (*NE buffer 10 X* New England Biolab), 2.5 µl de SAM 32 mM (*S-adenosylmethyonine*, New England Methyonine) y 6.25 µl (25 unidades) de la enzima SSSI (4000 U/ml). Se incubó la reacción 4 horas a 37°C, y posteriormente se añadieron 5 µl de SAM 32 mM y 3.1 µl de SSSI 4000 U/ml extra, incubando la reacción 4 horas más a 37°C. Tanto el ADN no-metilado (amplificado genómico total) como el metilado (IVD) se purificaron siguiendo el protocolo de extracción de ADN explicado anteriormente.

3.8. Análisis de los niveles de metilación del ADN por Pirosecuenciación

Para la determinación de la metilación del ADN por pirosecuenciación se utilizaron cebadores diseñados por el programa *PyroMark Assay Design* (QIAGEN). La PCR se llevó a cabo siguiendo la estequiometría (3µl buffer, 3µl dNTPs 2mM, 0.9 µl MgCl₂, 0.3 µl F/R 10 µM, 0.12 µl Taq polimerasa, 20.38 µl agua, por reacción) y una reacción con una desnaturalización inicial de 95°C 5 minutos seguida de cuarenta ciclos en los combinando una desnaturalización de 95°C 30 segundos, una temperatura de anillamiento de 60°C 30 segundos y una extensión de 72°C 30 segundos, finalizando la reacción con una extensión de 72°C 7 minutos y manteniendo las muestras a 4°C. El producto amplificado se utilizó como molde para la pirosecuenciación tras ser capturado con sefarosa unida a estreptoavidina (capturando el cebador conjugado con biotina de la PCR previa) y lavado serialmente con etanol al 70%, NaOH 0.2 M y tampón de lavado *Pyromark wash buffer* (Qiagen). Posteriormente la cadena simple unida a biotina fue pirosecuenciada utilizando un tercer primer de secuenciación y el *Pyromark Gold Q96 kit* (Qiagen) según las especificaciones del fabricante. Los datos fueron analizados utilizando el equipo *Pyromark Q96* (QIAGEN). La lista de cebadores utilizados está disponible en el **Anexo 3**.

3.9. Análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa

La expresión de los genes investigados se determinó por PCR cuantitativa utilizando el *7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*, en placas de 384 pocillos, empleando el método de cuantificación relativa. En cada PCR se utilizaron 0.3 µl de cada cebador a 5 µM, 5 µl de *SYBR Green PCR reaction mix (2X) (Applied Biosystems)*, y 4.5 µl de cDNA a 10 ng/µl. Cada PCR se hizo por triplicado. Los genes *glucuronidase beta (GUSB)*, *ribosomal protein L38 (RPL38)* y *tata binding protein (TBP)*, y los genes beta-2-microglobulin (B2M), *glucuronidase beta (GUSB)* y *hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1)* se utilizaron como genes de expresión constitutiva en ratones y humanos respectivamente. Una lista detallada de todos los cebadores utilizados puede verse en el **Anexo 4**. Las eficiencias de cada las PCRs se determinaron utilizando diluciones estándar y el software *LinReg (Ruijter et al., 2009)*. El análisis de los datos se hizo utilizando el programa *SDS 2.4 (Applied Biosystems)*.

3.10. Diseño y análisis del *5mC-mouse-array*

Para el diseño del *array* de metilación del ADN de ratón (*5mC-mouse-array*) se seleccionaron genes relacionados con la percepción sensorial, la cognición, la neuroplasticidad, la fisiología del cerebro y genes afectados en diferentes enfermedades mentales. Utilizando las coordenadas del ensamblaje mm9 del genoma del ratón disponible en la base de datos de la *University of California, Santa Cruz (UCSC; <http://genome.ucsc.edu>)*, se obtuvieron las regiones de 1 kilobase comprendidas entre 750 pares *upstream* del inicio de transcripción y 250 pares de bases *downstream* de hasta 762 genes para el diseño de las sondas del *array*. La especificidad y calidad de las sondas fue determinada por el servicio de atención al usuario del fabricante (Illumina, San Diego, EE.UU.) y se seleccionaron las 384 sondas con mejores valores de especificidad y calidad para el diseño final del *array*. Para ver más en detalle la lista de genes y características de las sondas incluidas en el *array* ver **Anexo 5**.

Del total de sondas seleccionadas, 15 interrogan el estado de metilación de 5 CpGs, 48 de 4 CpGs, 92 de 3 CpGs, 124 de 2 CpGs y 102 de 1 CpG en la región promotora de los genes previamente seleccionados. Para el diseño de las sondas interrogando más de una posición CpG se asumió el mismo estado de metilación en todas ellas. Así, utilizando sondas alelo-

específicas (una para el metilado y otra para el no-metilado) y locus específicas, cuantificamos el estado de metilación de dichas CpGs (valor β), basado en el ratio de emisión de fluorescencia del alelo metilado (M) y el no-metilado (U): $\beta = [\text{Max}(M,0)]/[\text{Max}(U,0) + \text{Max}(M,0) + 100]$. El valor β es una medida cuantitativa (AVG.Beta) del estado de metilación de CpGs específicas, y varía entre 0 (no metilado) y 1 (completamente metilado).

Muestras de ADN de los diferentes modelos murinos fueron modificadas con bisulfito sódico e hibridadas en el *5mC-mouse-array* y los datos fueron analizados utilizando lenguaje de programación de código abierto R (versión 2.13.1). Los niveles de intensidad de los alelos metilados (rojo) y los no-metilados (verdes) fueron normalizados utilizando los cuantiles para corregir desviaciones técnicas utilizando el paquete *Lumi* (bioconductor), y calculados los valores AVG.Beta y p-valores asociados a cada sonda y muestra analizada. Posteriormente, todas las sondas con p-valores de detección menores de 0.01 en más de 15 % de las muestras (25) sondas fueron eliminadas. Las sondas localizadas en el cromosoma X (11 sondas) fueron también excluidas para evitar sesgos debidos al sexo. Las muestras de baja calidad (con más de 10 % de las sondas con p-valores de detección menores de 0.01) fueron también eliminadas.

Para el análisis de agrupamiento no supervisado, las sondas mostrando una desviación estándar inferiores a 0.05 a través de todas las muestras fueron excluidos por considerarse sondas no informativas. Dicho análisis se realizó utilizando el paquete *gplots*. El análisis de componentes principales *spectral map analysis* (SMA) se realizó utilizando el paquete *mpm* con las implementaciones aportadas por Wouters (Wouters *et al.*, 2003). El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete de *stats* (prueba de Mann-Whitney para la comparación de dos grupos y la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación de grupos múltiples, ajustando el p-valor con el algoritmo FDR).

3.11. Análisis del Illumina Infinium 27K array

Para el análisis de metilación de las muestras post-mortem humanas de EA se utilizó el *array* de metilación del ADN *Illumina Infinium 27K* (Illumina, San Diego, EE.UU.) que examina el estado de metilación de 27578 sitios CpG correspondientes a 14475 genes únicos.

El ADN de las muestras de hipocampo post-mortem humanas fue modificado con bisulfito sódico e hibridado en los *arrays Illumina Infinium 27K*. Los datos fueron analizados utilizando el

lenguaje de programación de código abierto R (versión 2.13.1). Los niveles de intensidad de los alelos metilados (rojo) y los no-metilados (verdes) fueron normalizados utilizando los cuantiles para corregir desviaciones técnicas utilizando el paquete *Lumi* (bioconductor), y calculados los valores AVG.Beta y p-valores asociados a cada sonda y muestra analizada. Las sondas mostrando una desviación estándar inferior a 0.05 fueron eliminadas por considerarse no informativas. Las sondas representando posiciones en los cromosomas X y Y, y las que afectan a loci donde existen SNPs también fueron eliminadas para evitar sesgos de sexo y genotipo, así como también aquellas con p-valores de detección menores que 0.001. Se calcularon las medias de los valores AVG.Beta para cada grupo de muestras y se realizó un análisis de agrupamiento no supervisado basado en estas medias utilizando el paquete *gplots*. El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete *stats* (prueba de Mann-Whitney comparando los valores medios de metilación entre el grupo control y el grupo EA Braak V-VI ajustando por múltiples comparaciones con el algoritmo FDR).

3.12. Análisis de expresión proteica por *Western-blot*

Las muestras congeladas fueron homogeneizadas en tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, EDTA 2 mM, Nonidet P-40 0.2 %, PMSF 1 mM, y un cocktail de inhibidores de proteasas y fosfatasas *Roche Molecular Systems*), se incubaron durante 20 minutos en agitación a 4 ° C y se centrifugó durante 30 minutos a 13000 rpm. El sobrenadante se recuperó y se almacenó a -80 ° C. Los pellets celulares fueron homogeneizados directamente en tampón *laemmli* (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, SDS 2 %, glicerol 10 % y azul de bromofenol 0.002 %). La concentración proteica de los extractos se determinó mediante colorimetría utilizando el *DC Protein Assay Kit* (BioRad), siguiendo las especificaciones del fabricante. Como curva de calibración se utilizaron cinco diluciones seriadas variando desde 1mg/ml hasta 0.2mg/ml de albúmina de suero bovino. Los geles de acrilamida se prepararon a un porcentaje adecuado según el tamaño de las proteínas analizadas (entre 7.5 y 15%) en placas de minigel Xcell SureLock® Mini-Cell (Invitrogen) en un volumen de 10 ml.

En primer lugar se preparó un gel separador con acrilamida-bisacrilamida 37.5:1 (Bio-Rad) al 7.5-15% (p/v), Tris-HCl 0.38 M pH 8.8 y SDS 0.1% con persulfato amónico (APS) al 0.1% y N,N,N',N'-tetrametiletildiamida (TEMED, BioRad) al 0,01%. Se dejó polimerizar el gel a temperatura ambiente con 1 ml de isopropanol en la parte superior para evitar la inhibición

por oxígeno y la formación de burbujas. El isopropanol se retiró, se lavó con agua y se eliminó cualquier traza de agua y sobre el gel separador se cargó un gel concentrador con acrilamida-bisacrilamida (37.5:1) al 5%, Tris-HCl 0.125 M pH 6.8 y SDS 0.1% al que se añadió APS al 0.1% y TEMED al 0.01%. Se colocaron peines de 1 mm de grosor y se dejó polimerizar a temperatura ambiente.

Se utilizó el tampón de *laemmli* como tampón de carga. Tanto las muestras de tejidos como las provenientes de pellets fueron a 100°C durante 5 minutos en tampón de carga conteniendo β -mercaptoetanol al 5 %. Cantidades iguales de proteína (20 μ g por carril) se cargaron en el gel, al igual que el marcador de peso molecular preteñido (Kaleidoscope prestained, de Bio-Rad).

La electroforesis se llevó a cabo a 25 mA (miliAmperios) en tampón de electroforesis (Tris-HCl 0.125 M pH 6.8, SDS 0.1% y glicina 1.5%). Una vez separadas por tamaño, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham, GE Healthcare).

La transferencia se realizó en una cubeta Mini Trans-Blot (Bio-Rad) durante 1 hora a 100 V en un tampón de SDS 0.1%, glicina 1.5%, Tris-HCl 0.125 M pH 6.,8 y metanol al 20 %. Después, las membranas se bloquearon en leche (Difko™) al 5% en PBS con Tween 20 (Sigma) al 0,1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario a la dilución adecuada en PBS-Tween 0,1% con un 2% de leche. Los anticuerpos utilizados fueron: SORBS3 (1:1000; Abnova), Dusp22 (1:1000; Abnova), CREB phospho-Ser129-Ser133 (1:2000; Abcam), PKA (1:2000; Cellular signaling), PKA phospho-T197 (1:2000; Abcam), GSK3 β phospho-Ser9 (1:1000; Cellular signaling), AKAP79 (1:1000; Santa Cruz), HISTH3 (1:20000; Abcam), Myc-tag (9E10)(1:2000; Cellular signaling), TAU phospho-Thr231 (1:1000; Abcam), JNK phospho-Thr183/Tyr185 (1:2000; Cellular signaling), β -ACTIN (1:50000; Sigma-Aldrich).

A continuación, y tras lavar la membrana con PBS-Tween 0,1%, fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (1:20000; GE Healthcare), diluido en PBS-Tween 0,1% con 2% de leche, y se lavaron nuevamente con PBS-Tween 0,1%.

Para la detección de las proteínas unidas a los anticuerpos se utilizaron los sistemas de quimioluminiscencia *ECL* y *ECL Plus Western Blotting Detection Reagent* (Amersham) siguiendo las indicaciones del fabricante y se expusieron a películas fotosensibles *Ortho CP-G Plus films* (Agfa), utilizando un intensificador de señal (*Reflection™ Intensifying Screen*, DuPont). El revelado de la película expuesta se llevó a cabo con los líquidos habituales de revelado y

fijación fotográfica (Agfa). La cuantificación densitométrica se llevó a cabo con el software de versión 2.01 TotalLab (Pharmacia).

3.13. Análisis de expresión proteica por Inmunohistología

Las muestras de tejido fijadas fueron embebidas en parafina y seccionadas coronalmente (secciones de 4 μm) utilizando un micrótopo. Las secciones se tiñeron con una solución saturada de negro Sudán B (Merck) durante 30 min para bloquear la autofluorescencia de los gránulos de lipofuscina presentes en los cuerpos celulares, lavándose posteriormente con etanol al 70 % y agua destilada. A continuación, las secciones se trataron con tampón citrato para mejorar la antigenicidad y se incubaron a 4°C durante toda la noche con anticuerpos primarios contra *Tbxa2r* (1:200; Acris), *F2rl2* (1:50; Santa Cruz) y *Spnb4* (1:100; Sigma-Aldrich). Después de varios lavados, las secciones fueron incubadas con el anticuerpo secundario contra la especie huésped correspondiente marcado con el fluoróforo Alexa488 (1:400; Molecular Probes). Los núcleos celulares fueron teñidos utilizando el colorante DRAQ5TM (1:2000; Biostatus). Las secciones fueron montadas en medio de montaje *Inmuno-Fluore* (ICN Biomedicals), selladas y secadas durante la noche. Las secciones se examinaron utilizando el microscopio confocal *Leica TCS-SL*. Los niveles de proteína fueron evaluados por cuantificación densitométrica en 5 imágenes representativas tomadas en la corteza cerebral de cada animal utilizando el software Adobe Photoshop CS4.

3.14. Fraccionamiento celular e Inmunoprecipitación

Para el fraccionamiento celular se utilizó el *Proteoma Extraction Kit* (Calbiochem, Alemania) siguiendo las especificaciones del fabricante. Para la inmunoprecipitación se fijaron las células utilizando formaldehído al 1 % durante 15 minutos, bloqueando la reacción con glicina 125 mM final. Se realizaron varios lavados con PBS frío y se recuperaron las células utilizando un rascador. Se pasó el contenido a un tubo y se lisaron las células con tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 8.0; NaCl 150 mM; deoxicolato 0.5 %; SDS 0.1 %; NP-40 1%) con inhibidores de proteasas (*cOmplete*, Roche) y fosfatasa (*PhosphoStop*, Roche), manteniendo el extracto 15

minutos en hielo y la ayuda de un *dounce*. La cantidad de proteína fue determinada utilizando el *DC Protein Assay Kit* (BioRad).

Por cada anticuerpo a utilizar, 1mg de extracto fue pre-incubado con 20 μ l de *dynabeads* (*Dynabeads M-280 Sheep Anti-Mouse IgG*, Invitrogen) en un volumen de 1 ml a 4°C en agitación continua durante 1 hora utilizando una noria y retirar las *dynabeads*. Entre 1-2 μ g de anticuerpo fue conjugado a 20 μ l de *dynabeads* en 1 ml de trietanolamina 0.2M y solución dipimelimidato dimetil (DMP) 25mM durante 30 minutos a temperatura ambiente manteniendo la agitación con una noria, parando posteriormente la reacción con Tris-HCl 50mM ph 7.5 e incubando 15 minutos en noria. Tras varios lavados con PBS (NaCl 137 mM; KCl 2.7 mM; KH₂PO₄ 2 mM; Na₂HPO₄ 10 mM ph 7.4) conteniendo albúmina de suero bovino (BSA) 5% añadimos las *dynabeads* a al extracto previamente pre-incubado con *dynabeads* sin anticuerpo y dejamos en agitación continua utilizando una noria durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, lavamos las *dynabeads* con PBS con BSA 5% NaCl 150 mM y NP-40 0.1 %, eluyendo las proteínas de las *dynabeads* con *laemmli* 10 minutos a 70°C.

3.15. Análisis de la supervivencia celular

Los niveles de supervivencia celular se midieron con el ensayo MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) tras 24 horas de tratamiento con el péptido A β (50 μ M) partiendo de 10000 células por pocillo en placas de 96 pocillos, y contando con media placa por condición y día de medición. Para medir la supervivencia se añadió 1/10 del volumen de MTT a 5 mg/ml, y se incubó durante 3 horas a 37°C. Posteriormente , se añadieron 100 μ l de DMSO (dimetil sulfóxido) para disolver el colorante precipitado. El valor de supervivencia celular se determinó estableciendo el ratio de la medida de colorimetría a 595 nm entre la condición control (DMSO) y la condición tratamiento (A β 50 μ M), expresándose como porcentaje.

Resultados

4. Resultados

4.1. 1º Estudio: Caracterización de los patrones de metilación del ADN de las diferentes regiones del sistema nervioso del ratón

4.1.1. El *array* de metilación del ADN diseñado bajo la tecnología VeraCode de Illumina es una herramienta fiable y precisa para analizar la metilación del ADN en cerebros de ratón

El sistema nervioso central tiene un patrón de expresión génica que está estrechamente regulado en las diferentes regiones funcionales y anatómicas (Bohland *et al.*, 2010; Ko *et al.*, 2013). La metilación del ADN es un importante regulador de la actividad transcripcional y, por ello, dichas regiones cerebrales deberían poseer diferentes patrones de metilación. De hecho, varios estudios han demostrado que diferentes regiones del cerebro humano, aunque analizando sólo unas pocas regiones, presentan patrones de metilación del ADN característicos (Ladd-Accosta *et al.*, 2007; Xin *et al.*, 2010; Hernandez *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011; Davies *et al.*, 2012). En este estudio pretendemos analizar profusamente los patrones de metilación de las diferentes regiones del cerebro y, para ello, nos hemos centrado en el cerebro de los ratones C57BL/6J (000664) porque son genéticamente homogéneos y muestran una variación interindividual reducida.

A pesar de la importancia de los modelos murinos en la investigación científica, no existen plataformas expresamente diseñadas para examinar la metilación del ADN en ratones en la actualidad y las alternativas disponibles no son lo suficientemente sensibles para cuantificar las diferencias esperadas en el sistema nervioso (para una revisión de métodos ver Harris *et al.*, 2010). Por ello, decidimos diseñar un *array* de metilación del ADN basado en la tecnología VeraCode de Illumina (*5mC-mouse-array*), que utiliza sondas específicas para reconocer el ADN metilado y no-metilado tras la conversión con bisulfito sódico, ya que las plataformas de Illumina han demostrado ser los ensayos más precisos para cuantificar la metilación del ADN (Bock *et al.*, 2010). Esta tecnología permite analizar 384 sondas en 96 muestras a la vez. Las sondas se diseñaron para reconocer las secuencias promotoras, consideradas como la región de 1 kilobase comprendida entre 750 pares de bases (pb) aguas arriba del TSS y 250 pb aguas abajo, de genes relacionados con la percepción sensorial, la cognición, la neuroplasticidad, la fisiología del cerebro y diversas enfermedades mentales (**Anexo 1**). Cada una de estas sondas reconoce alrededor de 2 CpGs.

Para determinar la fiabilidad del *5mC-mouse-array* se analizaron tres repeticiones técnica distribuidas aleatoriamente en el *array*. Los patrones de metilación de estas muestras fueron establecidos y posteriormente correlacionados. Para cada una de las tres réplicas técnicas se

obtuvieron altos coeficientes de correlación de Pearson ($r = 0.98, 0.99$ y 0.99 respectivamente) confirmando la reproducibilidad y fiabilidad del *5mC-mouse-array* (Figura 4).

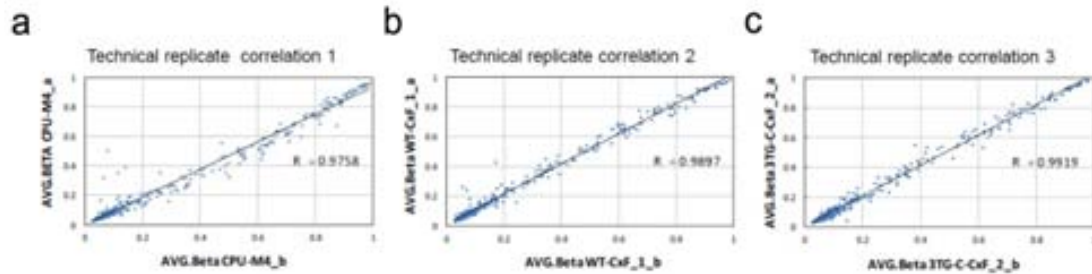


Figura 4. Control de calidad I. Correlación de Pearson entre los valores de metilación del ADN obtenidos con el *5mC-mouse-array* en las tres réplicas técnicas distribuidas aleatoriamente en el *array*. Muestras CPU-M4_a vs. CPU-M4_b (a), muestras CXF1_a vs. CXF1_b (b) y muestras CXF2_a vs. CXF2_b (c).

La linealidad y precisión del *5mC-mouse-array* se analizó utilizando ADNs metilados y no metilados *in vitro*, resultantes de la metilación con la enzima SSSI y la amplificación genómica total del ADN por PCR respectivamente. Además, también fueron analizadas cinco relaciones diferentes de ADN metilado y no-metilado (1:00, 2:01, 1:01, 1:02, y 0:1 respectivamente).

Los patrones de metilación de estos dos conjuntos de muestras fueron establecidos y posteriormente correlacionados. Como se esperaba, las sondas del *5mC-mouse-array* reconocieron al ADN metilado *in vitro* como mayoritariamente metilado, y el ADN no-metilado *in vitro* como mayoritariamente no metilado (Figura 5). En el caso de las diferentes relaciones de ADN metilado y no-metilado, se observó una alta correlación entre los valores esperados (100%, 75%, 50%, 25% y 0% respectivamente) y los valores obtenidos con el *5mC-mouse-array* ($r = 0.99$) confirmando la precisión y linealidad del *5mC-mouse-array* (Figura 6).

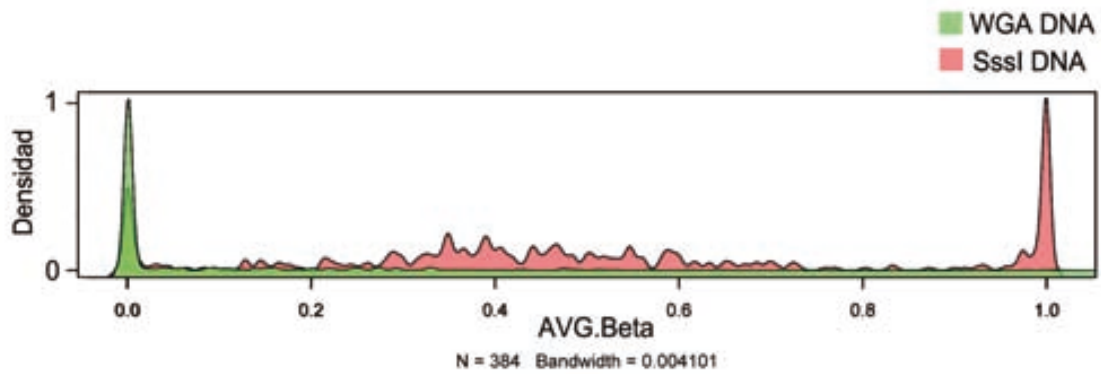


Figura 5. Control de calidad II. *Density-plot* de los valores de metilación del ADN obtenidos con el 5mC-mouse-array (AVG.Beta) y los ADN metilado (rojo) y no metilado (verde) *in vitro*. En el eje de las X están representados los valores AVG.Beta obtenidos con el 5mC-mouse-array. En el eje de la Y la densidad de sondas para cada uno de los valores de AVG.Beta.

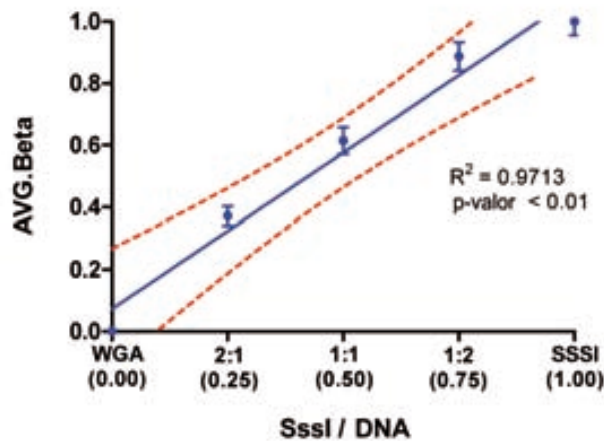


Figura 6. Control de calidad III. Correlación entre los valores de metilación del ADN esperados (relaciones de ADN metilado y no metilado; eje de la X) y los observados en el 5mC-mouse-array (AVG.Beta; eje de la Y) utilizando una correlación de Pearson. Como consecuencia de que el tratamiento con la enzima SSSI es una reacción enzimática ineficiente, sólo se consideraron las sondas completamente metiladas en el ADN-metilado (AVG.Beta > 0.75).

4.1.2. El 5mC-mouse-array identifica perfiles de metilación del ADN específicos para las doce regiones del cerebro analizadas

Como hemos mencionado anteriormente, varios estudios han demostrado que diferentes regiones cerebrales presentan patrones característicos de metilación del ADN. En general, estos estudios han analizado un pequeño número de regiones cerebrales, por lo que los patrones de metilación del ADN de la mayoría de las regiones queda aún por determinar. En

este estudio pretendemos llevar a cabo un análisis exhaustivo de las regiones más importantes del cerebro de ratón utilizando el 5mC-mouse-array previamente diseñado. Esto nos ha permitido establecer los patrones de metilación del ADN de hasta 12 regiones diferentes del cerebro de ratón. Para ello, hemos microdisecionado la corteza frontal (CX), el núcleo caudado-putamen (CPU), la amígdala basolateral (BLA), el hipotálamo (HYP), el globo pálido (MGP), el tálamo (TH), las regiones del hipocampo CA1, CA3 y giro dentado (DG), la sustancia negra (SN), y las capas de células de Purkinje (PC) y células granulares del cerebelo (GCL) en seis ratones C57BL/6 de 2 meses de edad (para ver una representación de las regiones analizadas ver **Anexo 1**). Se extrajo el ADN de cada una de estas muestras, se modificó con bisulfito sódico y se hibridó en los 5mC-mouse-arrays.

Las sondas para las que más del 15% de las muestras mostraban p-valores de detección mayores de 0.01 fueron excluidas (25 sondas), así como también las sondas localizadas en el cromosoma X (11 sondas) para eliminar el posible sesgo sexual. Del mismo modo, las muestras que mostraron más del 10% de las sondas con p-valores > 0.01 fueron también excluidas por su baja calidad (8 muestras). Tras filtrar los datos por calidad de muestra y sonda, determinamos los patrones de metilación de 344 genes en 64 muestras, representadas por un mínimo de 4 muestras y un máximo de 6 muestras por región analizada.

En línea con lo que se esperaba, el valor medio de metilación del ADN de las 344 sondas analizadas fue bajo (media del AVG.Beta = 0.27), ya que las sondas fueron diseñadas para determinar el estado de metilación de las regiones promotoras de genes expresados en el cerebro y, por tanto, supuestamente no-metiladas. En concreto, 196 sondas se encontraron no-metiladas (AVG.Beta < 0.2) y 21 de ellas completamente metiladas (AVG.Beta > 0.8) en todas las regiones analizadas, observándose 127 sondas con valores de metilación intermedios en alguna de las muestras y regiones analizadas. Más en detalle, 145 de las sondas mostraron diferencias mayores del 10% entre diferentes muestras y regiones, y 83 de ellas mayores del 20%, aunque solo 72 mostraron diferencias significativas en los valores de metilación del ADN entre las regiones analizadas (**Tabla 1**; Test Kruskal-Wallis y FDR < 0.05).

Las mayores diferencias de metilación se observaron en la región promotora del gen *Cacna1d* (48% comparando TH vs. GCL) y del gen *Tbxa2r* (43 % comparando CPU vs CA1). Es interesante mencionar que, con la excepción de CA3, se encontraron genes con valores máximos o mínimos de metilación del ADN para cada una de las regiones analizadas, sugiriendo su posible utilización como marcadores de región y su utilidad para discriminar entre las diferentes regiones analizadas (**Tabla 1**).

TargetID	BLA	CPU	MGP	SN	TH	HYP	CX	CA1	CA3	DG	GCL	PC	Delta	p-val	FDR
	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media			
	n=5	n=6	n=5	n=6	n=5	n=5	n=6	n=6	n=4	n=5	n=6	n=5			
Bdkrb2	0.45	0.49	0.39	0.40	0.40	0.40	0.30	0.31	0.39	0.33	0.20	0.20	0.29	9E-08	1E-06
Ednrb	0.22	0.13	0.18	0.26	0.20	0.25	0.17	0.10	0.11	0.10	0.08	0.07	0.18	1E-07	1E-06
F2rl2	0.82	0.82	0.84	0.88	0.86	0.83	0.70	0.66	0.69	0.60	0.93	0.93	0.33	1E-07	1E-06
Gcgr	0.56	0.50	0.53	0.63	0.61	0.62	0.38	0.33	0.46	0.47	0.46	0.41	0.31	1E-07	1E-06
Grin2c	0.50	0.49	0.39	0.48	0.39	0.52	0.34	0.32	0.33	0.33	0.16	0.16	0.36	1E-07	1E-06
Id1	0.11	0.09	0.14	0.14	0.11	0.15	0.07	0.08	0.10	0.08	0.23	0.20	0.16	1E-07	1E-06
Kcnip1	0.20	0.12	0.16	0.28	0.20	0.24	0.22	0.09	0.10	0.08	0.05	0.06	0.23	5E-08	1E-06
Tbx1	0.36	0.26	0.35	0.44	0.45	0.42	0.19	0.17	0.26	0.26	0.13	0.14	0.32	1E-07	1E-06
Tbxa2r	0.76	0.82	0.70	0.78	0.81	0.81	0.62	0.39	0.56	0.46	0.51	0.51	0.43	1E-07	1E-06
Tmhs	0.73	0.64	0.73	0.69	0.64	0.66	0.47	0.57	0.70	0.69	0.77	0.78	0.31	9E-08	1E-06
Ush1g	0.40	0.34	0.48	0.47	0.46	0.37	0.28	0.26	0.34	0.28	0.67	0.68	0.42	4E-08	1E-06
Nmur2	0.37	0.32	0.31	0.43	0.42	0.37	0.22	0.18	0.24	0.19	0.16	0.15	0.28	2E-07	1E-06
Sorbs3	0.51	0.58	0.41	0.53	0.44	0.56	0.34	0.25	0.33	0.29	0.26	0.26	0.33	2E-07	1E-06
Calcr	0.32	0.29	0.21	0.32	0.26	0.39	0.14	0.13	0.14	0.18	0.11	0.09	0.30	2E-07	1E-06
Grm2	0.26	0.33	0.18	0.17	0.18	0.15	0.13	0.12	0.15	0.11	0.25	0.22	0.22	2E-07	1E-06
Gfap	0.77	0.78	0.71	0.77	0.81	0.74	0.68	0.55	0.55	0.47	0.51	0.48	0.34	3E-07	1E-06
Spnb4	0.75	0.65	0.78	0.80	0.74	0.77	0.44	0.57	0.67	0.61	0.80	0.80	0.36	3E-07	1E-06
Sstr3	0.42	0.41	0.32	0.43	0.38	0.38	0.34	0.33	0.25	0.24	0.10	0.13	0.33	3E-07	1E-06
Sstr1	0.35	0.41	0.29	0.36	0.37	0.42	0.20	0.19	0.28	0.22	0.12	0.12	0.30	4E-07	2E-06
Grin2a	0.34	0.46	0.31	0.34	0.38	0.46	0.14	0.12	0.19	0.19	0.32	0.36	0.34	5E-07	2E-06
Lhb	0.73	0.71	0.71	0.76	0.75	0.74	0.75	0.66	0.64	0.66	0.59	0.56	0.20	5E-07	2E-06
Pthr1	0.58	0.58	0.50	0.59	0.61	0.57	0.59	0.51	0.46	0.43	0.24	0.25	0.36	7E-07	2E-06
Ide	0.63	0.51	0.68	0.67	0.65	0.71	0.38	0.48	0.69	0.70	0.72	0.72	0.35	1E-06	4E-06
Npy6r	0.35	0.45	0.33	0.39	0.44	0.44	0.42	0.20	0.34	0.34	0.19	0.19	0.26	2E-06	5E-06
Ctsg	0.81	0.81	0.79	0.81	0.78	0.84	0.75	0.67	0.71	0.66	0.84	0.82	0.18	2E-06	5E-06
Chrm4	0.79	0.70	0.82	0.83	0.83	0.83	0.57	0.64	0.80	0.86	0.80	0.79	0.28	2E-06	6E-06
Gm98	0.41	0.36	0.40	0.45	0.43	0.50	0.33	0.27	0.36	0.33	0.35	0.32	0.23	2E-06	6E-06
Cacna1d	0.76	0.77	0.69	0.79	0.80	0.77	0.77	0.71	0.57	0.59	0.32	0.36	0.48	2E-06	6E-06
Avpr1b	0.69	0.58	0.73	0.69	0.69	0.70	0.58	0.59	0.67	0.66	0.75	0.76	0.18	2E-06	6E-06
P2rx6	0.24	0.18	0.21	0.25	0.25	0.26	0.13	0.13	0.15	0.13	0.11	0.12	0.15	3E-06	7E-06
P2rx1	0.73	0.71	0.70	0.72	0.69	0.76	0.76	0.75	0.76	0.81	0.59	0.55	0.27	3E-06	7E-06
Ptger2	0.18	0.21	0.21	0.21	0.21	0.23	0.19	0.14	0.18	0.19	0.33	0.29	0.19	4E-06	9E-06
Hrh4	0.78	0.79	0.76	0.76	0.71	0.83	0.64	0.66	0.77	0.78	0.84	0.83	0.19	5E-06	1E-05
Chrna10	0.31	0.25	0.33	0.32	0.29	0.31	0.35	0.38	0.37	0.42	0.40	0.41	0.18	6E-06	1E-05
Otog	0.45	0.43	0.47	0.45	0.45	0.49	0.35	0.33	0.47	0.45	0.54	0.53	0.21	6E-06	1E-05
Hrh1	0.51	0.48	0.56	0.53	0.53	0.44	0.36	0.49	0.51	0.63	0.60	0.57	0.27	1E-05	2E-05
Cnr2	0.57	0.60	0.58	0.60	0.63	0.61	0.64	0.54	0.51	0.53	0.34	0.31	0.33	1E-05	2E-05
F2r	0.54	0.53	0.44	0.48	0.40	0.39	0.42	0.34	0.40	0.35	0.31	0.31	0.23	1E-05	2E-05
Gabrp	0.72	0.61	0.71	0.75	0.73	0.77	0.77	0.72	0.69	0.75	0.56	0.55	0.22	1E-05	3E-05
Gabbr1	0.71	0.76	0.75	0.65	0.75	0.74	0.69	0.61	0.74	0.68	0.80	0.78	0.19	1E-05	3E-05
Ush1c	0.88	0.87	0.85	0.90	0.89	0.87	0.91	0.89	0.85	0.88	0.67	0.67	0.24	2E-05	3E-05
Myo5a	0.73	0.64	0.74	0.75	0.71	0.68	0.63	0.67	0.75	0.74	0.76	0.76	0.14	2E-05	4E-05
Cckar	0.55	0.57	0.55	0.57	0.62	0.50	0.51	0.45	0.55	0.54	0.43	0.44	0.19	3E-05	4E-05
Mas1	0.63	0.59	0.62	0.64	0.63	0.69	0.34	0.45	0.60	0.61	0.59	0.57	0.35	3E-05	4E-05
Glp1r	0.30	0.28	0.29	0.31	0.29	0.29	0.34	0.32	0.24	0.31	0.19	0.20	0.15	4E-05	7E-05
Sgce	0.66	0.64	0.64	0.67	0.62	0.65	0.75	0.74	0.66	0.73	0.66	0.67	0.13	5E-05	8E-05
Galr3	0.62	0.49	0.64	0.63	0.60	0.60	0.49	0.51	0.52	0.47	0.55	0.56	0.17	5E-05	9E-05
Dld	0.68	0.61	0.66	0.66	0.61	0.67	0.61	0.57	0.67	0.70	0.74	0.72	0.17	7E-05	1E-04
Lep	0.96	0.95	0.95	0.96	0.96	0.96	0.96	0.95	0.96	0.97	0.83	0.83	0.14	7E-05	1E-04
Bdkrb1	0.93	0.92	0.89	0.94	0.93	0.91	0.92	0.91	0.91	0.93	0.64	0.63	0.31	9E-05	1E-04
Mtnr1b	0.43	0.40	0.34	0.41	0.36	0.44	0.40	0.39	0.41	0.40	0.13	0.13	0.31	1E-04	2E-04
Clic5	0.31	0.32	0.34	0.30	0.30	0.33	0.21	0.24	0.34	0.27	0.35	0.35	0.14	1E-04	2E-04
Adra1b	0.89	0.90	0.90	0.90	0.89	0.91	0.60	0.71	0.88	0.88	0.91	0.89	0.31	2E-04	2E-04
Lhcgr	0.61	0.52	0.57	0.64	0.61	0.59	0.56	0.57	0.56	0.56	0.40	0.40	0.24	2E-04	3E-04
Gje1	0.68	0.72	0.70	0.61	0.67	0.70	0.76	0.77	0.77	0.82	0.83	0.78	0.22	2E-04	3E-04
Cysltr2	0.65	0.53	0.69	0.65	0.69	0.64	0.65	0.67	0.70	0.72	0.74	0.72	0.21	2E-04	3E-04
Ptafr	0.48	0.48	0.49	0.45	0.44	0.50	0.42	0.48	0.54	0.56	0.52	0.51	0.13	3E-04	5E-04
F2rl3	0.78	0.72	0.76	0.77	0.75	0.77	0.63	0.63	0.76	0.69	0.79	0.78	0.16	5E-04	6E-04
Chrm2	0.75	0.74	0.75	0.74	0.76	0.76	0.58	0.56	0.75	0.65	0.76	0.76	0.19	5E-04	6E-04
Edg7	0.71	0.74	0.74	0.73	0.71	0.77	0.67	0.65	0.74	0.73	0.77	0.76	0.13	0.001	0.001
Tmc1	0.54	0.48	0.50	0.50	0.50	0.49	0.42	0.38	0.54	0.52	0.56	0.54	0.18	0.001	0.002
Accn1	0.52	0.53	0.51	0.54	0.53	0.51	0.36	0.44	0.55	0.53	0.55	0.55	0.19	0.002	0.002
Trpv1	0.67	0.65	0.68	0.65	0.67	0.63	0.55	0.54	0.67	0.67	0.62	0.62	0.15	0.002	0.002

P2ry10	0.48	0.49	0.48	0.49	0.47	0.53	0.41	0.34	0.42	0.41	0.47	0.47	0.19	0.004	0.005
Gabbr2	0.06	0.12	0.07	0.06	0.12	0.12	0.22	0.23	0.10	0.23	0.11	0.10	0.18	0.005	0.005
Myo15	0.78	0.79	0.80	0.76	0.78	0.80	0.76	0.56	0.76	0.81	0.75	0.77	0.25	0.005	0.006
Sstr5	0.72	0.72	0.66	0.71	0.72	0.71	0.60	0.62	0.73	0.67	0.69	0.68	0.13	0.01	0.011
Crhr2	0.44	0.46	0.54	0.53	0.54	0.51	0.47	0.47	0.51	0.52	0.51	0.50	0.10	0.015	0.017
Galr2	0.31	0.24	0.27	0.30	0.30	0.24	0.20	0.17	0.27	0.25	0.29	0.24	0.14	0.027	0.029
Hcrtr1	0.11	0.15	0.12	0.13	0.17	0.16	0.12	0.12	0.13	0.22	0.12	0.12	0.11	0.028	0.029
Uts2r	0.82	0.73	0.82	0.82	0.76	0.76	0.86	0.83	0.77	0.76	0.81	0.81	0.13	0.041	0.044
Adrb3	0.43	0.34	0.41	0.43	0.41	0.40	0.41	0.39	0.39	0.46	0.37	0.36	0.12	0.048	0.05

Tabla 1. Valores de metilación promedio obtenidos con el 5mC-mouse-array (AVG.Beta) en cada una de las regiones y genes analizados. Las sondas representando los diferentes genes están ordenadas según su valor de significancia (Kruskal-Wallis p-valor y FDR para múltiples comparaciones). El valor Delta se refiere a la diferencia máxima entre dos regiones para ese gen. Los valores máximos y mínimos para cada gen utilizados para calcular el valor Delta están resaltados en negrita.

4.1.3. Los patrones de metilación del ADN en las 12 regiones cerebrales son funcionalmente relevantes en la regulación de la expresión del RNA en los genes analizados

Una vez establecidos los patrones de metilación del ADN de los diferentes genes y regiones, examinamos su importancia funcional respecto a la regulación de su transcripción. Para ello, utilizamos los valores de expresión disponibles en la base de datos pública *Allen Brain Atlas* (Lein *et al.*, 2007). Dado que los datos de expresión de ARN la base *Allen Brain Atlas* han sido obtenidos mediante hibridación *in situ* (ISH) y que esta técnica es eminentemente semiquantitativa, se decidió categorizar los valores de expresión. Así, se consideraron los genes que muestran un nivel de expresión mayor de 10 como genes altamente expresados y los que muestran un nivel de expresión menor de 1.5, como genes no expresados. De manera similar, los valores de metilación del ADN fueron también categorizados. En este caso, se ordenaron los valores de metilación de las diferentes regiones en cada uno de los genes analizados, considerándose, en cada uno de los genes, como hipermetiladas las regiones del primer tercil y como hipometiladas las del último tercil. Posteriormente, las frecuencias de distribución de genes y regiones en las cuatro categorías fueron analizadas, observándose una asociación significativa entre hipometilación y mayor expresión, y entre hipermetilación y menor expresión (**Figura 7**; prueba exacta de Fisher; p-valor <0.001).

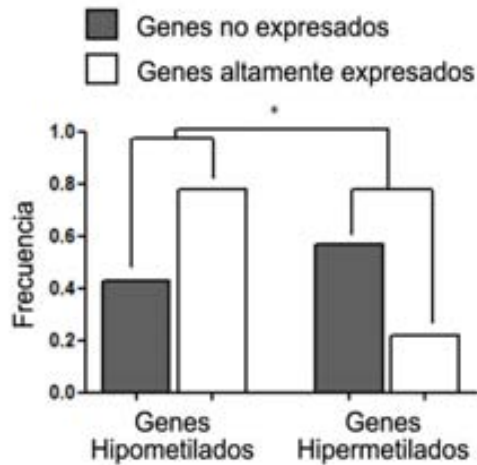


Figura 7. Correlación entre los datos de metilación del ADN obtenidos con el 5mC-mouse-array (AVG.Beta) y los valores de expresión del ARN obtenidos mediante ISH disponibles en la base de datos *Allen Brain Atlas*. Se consideraron genes altamente expresados en determinadas regiones los que mostraron valores de expresión brutos en la base de datos *Allen Brain Atlas* mayores de 10, y no expresados los que mostraban valores menores de 1.5. Se consideraron genes hipermetilados los que representaban el primer tercil de metilación en cada región, e hipometiladas las que representaban el tercer tercil (prueba exacta de Fisher; p-valor <0.001).

4.1.4. El análisis de agrupamiento de los patrones de metilación del ADN reconoce a la corteza cerebral, el tronco cerebral y el cerebelo como grupos diferenciados

Tras analizar la importancia funcional de los patrones de metilación del ADN observados, quisimos comparar los perfiles de metilación de cada una de las muestras y regiones analizadas de una manera no supervisada. Para ello, definimos como sondas informativas del *array* aquellas que mostraban una desviación estándar entre las muestras mayor que 0.05, y las utilizamos para realizar un análisis de agrupamiento no supervisado. De ese modo, observamos que las 12 regiones analizadas se asocian en tres grupos claramente diferenciados, representando cerebelo (GCL y PC), corteza cerebral (CX , CA1, CA3 y DG) y tronco cerebral (BLA, CPU , SN HYP y TH) (**Figura 8**).

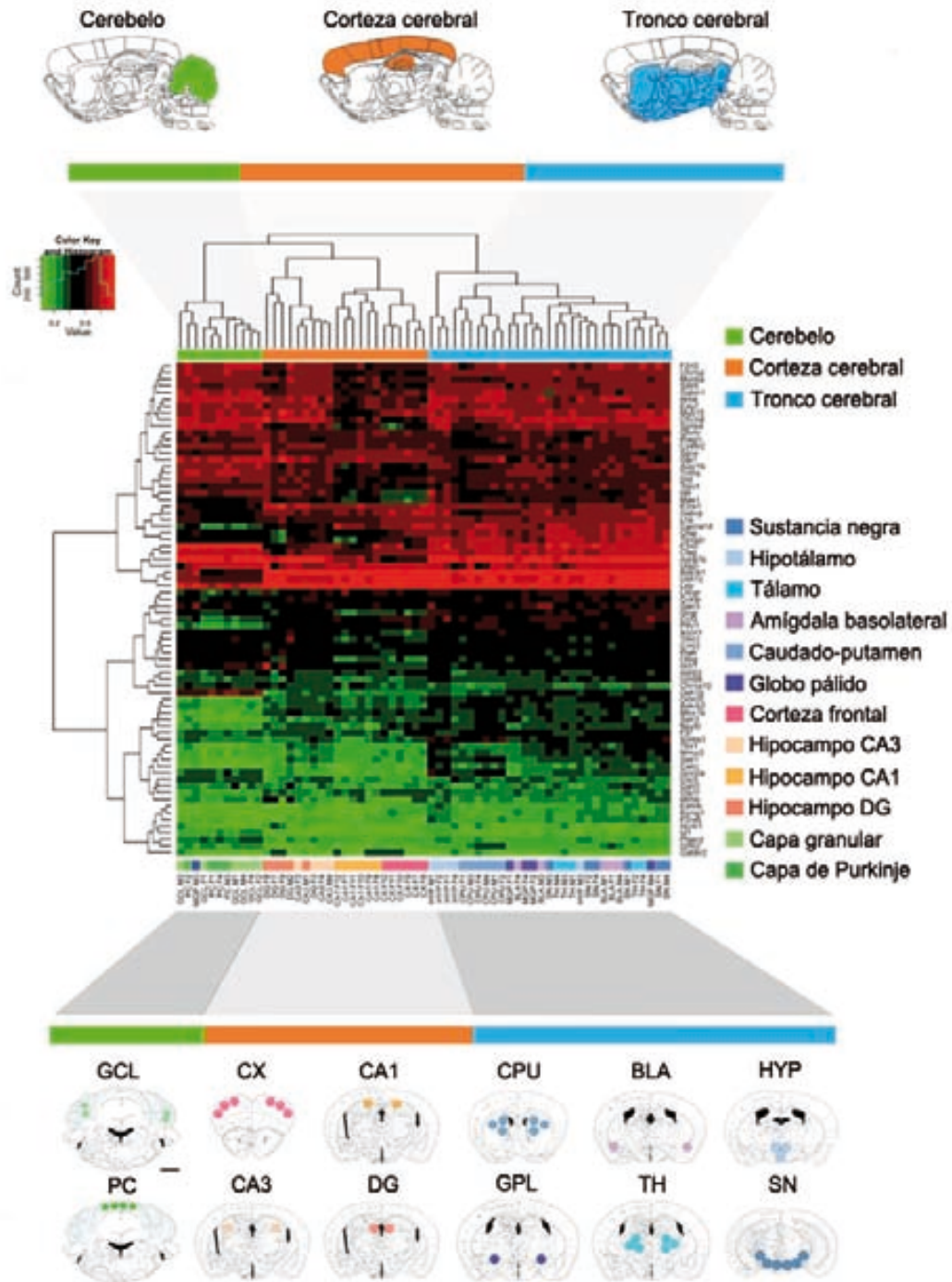


Figura 8. Análisis de agrupamiento de las diferentes muestras representando las diferentes regiones. Se consideraron las sondas mostrando una desviación estándar entre las diferentes regiones mayor que 0.05. Corteza frontal (CX), núcleo caudado-putamen (CPU), amígdala basolateral (BLA), hipotálamo (HYP), globo pálido (MGP), tálamo (TH), regiones hipocámpales CA1, CA3 y giro dentado (DG), sustancia negra (SN), y capas de células de Purkinje (PC) y células granulares del cerebelo (GCL). Las muestras se disponen en columnas, y las sondas en filas. Los valores de metilación de cada sonda en cada una de las muestras viene indicado por el gradiente entre verde (no metilado) y rojo (metilado).

4.1.5. Validación de los datos de metilación del ADN mediante análisis de componentes principales y pirosecuenciación

Con el fin de validar los datos obtenidos con el *5mC-mouse-array* decidimos utilizar el análisis de componentes principales para reducir la complejidad de los datos. Para ello, nos basamos en el *spectral map analysis* (SMA) que permite detectar relaciones entre genes y grupos basándose en la proyección dimensional de las diferentes variantes (Lewi, 1976). En esencia, el SMA es un método de análisis de componentes principales que permite seleccionar los genes que muestran una mayor diferencia entre grupos y una menor dispersión dentro del grupo. Así, basándonos en este método, identificamos ocho sondas como las principales contribuidoras al análisis de agrupamiento anteriormente observado (**Figura 9**). Posteriormente se seleccionaron las regiones que representaban el valor máximo y mínimo en cada uno de estos genes y se examinó el estado de metilación de los mismos en una serie de muestras independientes por pirosecuenciación (**Figura 9**). Ambas series de datos mostraron un alto coeficiente de correlación de Pearson ($r=0.72$; $p\text{-valor}<0.001$) confirmando la fiabilidad y reproducibilidad de los datos (**Figura 10 y 11**).

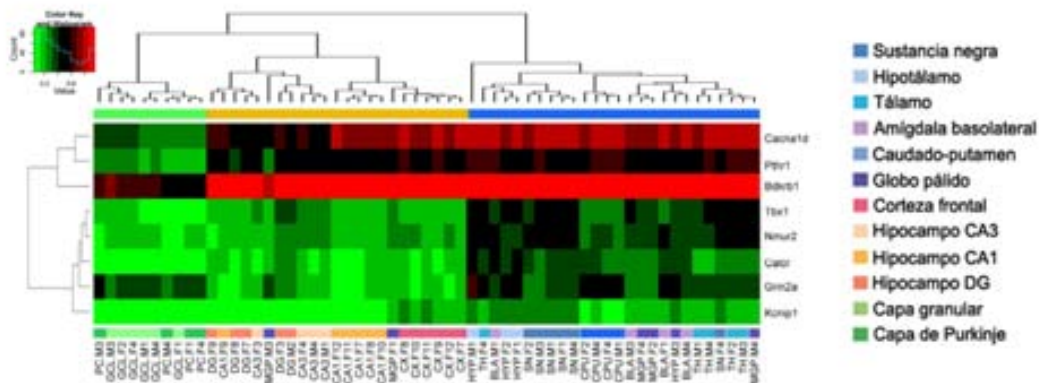


Figura 9. Análisis de componentes principales (*spectral map analysis*) de los patrones de metilación del ADN informativos entre las doce regiones analizadas.

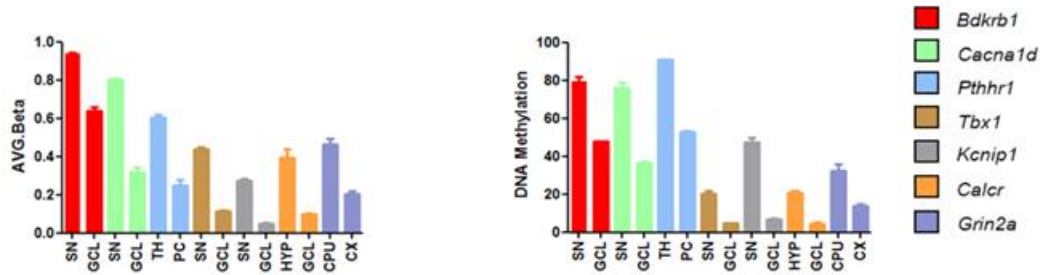


Figura 10. Comparación de valores de metilación del ADN entre las regiones más discordantes para cada uno de los genes identificados por el SMA obtenidos con el 5mC-mouse-array (izquierda) y por pirosecuenciación (derecha).

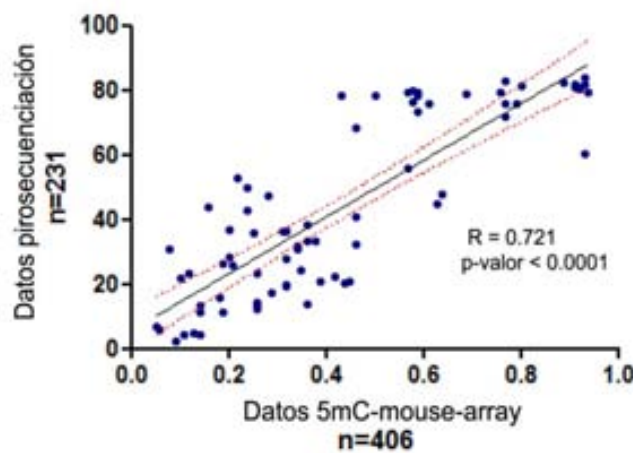


Figura 11. Correlación entre los valores de metilación de los genes identificados por el SMA obtenidos con el 5mC-mouse-array (eje de las X) y por pirosecuenciación (eje de las Y).

4.1.6. La corteza cerebral presenta un patrón específico de metilación del ADN

De especial relevancia es el hecho de que el análisis de agrupamiento reconozca la corteza cerebral como una rama independiente, ya que dicha región está especialmente afectada en la EA. Por ello, decidimos profundizar en las diferencias de metilación que caracterizan a esta región comparando los patrones de metilación del ADN de la corteza cerebral (CX, CA1, CA3 y DG) con el resto del cerebro (BLA, CPU, SN HYP, TH, GCL y PC). De ese modo, identificamos 52 genes diferencialmente metilados entre la corteza cerebral y el resto del cerebro (Tabla 2; FDR < 0.05). Los genes con mayores diferencias de metilación fueron seleccionados y su relación con la regulación de la expresión del RNA analizada mediante PCR cuantitativa en una serie de

muestras independientes. Seis de los siete genes examinados mostraron una asociación entre hipermetilación del ADN y menor expresión (**Figura 12**), sugiriendo que el 5mC-mouse-array es capaz de examinar patrones de metilación del ADN funcionalmente relevantes para la EA.

TargetID	Cerebral Cortex		Rest of Brain		Delta	p.value	FDR
	Mean	SD	Mean	SD			
Gabbr2	0.20	0.14	0.10	0.07	0.11	3.7055E-05	0.00013896
P2rx1	0.77	0.04	0.68	0.08	0.09	7.2544E-07	5.4408E-06
Sgce	0.72	0.05	0.65	0.03	0.07	6.7395E-07	5.4408E-06
Gje1	0.78	0.04	0.71	0.09	0.07	0.00869542	0.01552891
Gabrp	0.74	0.05	0.67	0.09	0.06	0.01419895	0.0226579
Ush1c	0.88	0.03	0.82	0.10	0.06	0.01070205	0.01783675
Chrna10	0.38	0.05	0.33	0.06	0.05	0.0015396	0.00329913
Glp1r	0.31	0.06	0.27	0.05	0.04	0.00869619	0.01552891
Sstr3	0.29	0.06	0.32	0.13	-0.03	0.02716656	0.03995083
Dld	0.63	0.07	0.67	0.06	-0.04	0.03313045	0.0477843
Bdkrb2	0.33	0.05	0.37	0.11	-0.04	0.01727859	0.0269978
Edg7	0.69	0.06	0.74	0.04	-0.05	0.00120115	0.00264959
Trpv1	0.60	0.08	0.65	0.05	-0.05	0.02618785	0.03928178
Ednrb	0.12	0.04	0.17	0.07	-0.05	0.00945427	0.01649
Grin2c	0.33	0.04	0.39	0.15	-0.05	0.00799291	0.0149867
Sstr5	0.65	0.08	0.70	0.05	-0.06	0.01209418	0.01971877
Galr2	0.21	0.07	0.28	0.07	-0.06	0.0008861	0.00218585
Tmc1	0.45	0.09	0.51	0.06	-0.06	0.00093263	0.00218585
Ptger2	0.17	0.03	0.24	0.05	-0.06	2.8297E-06	1.7686E-05
Myo15	0.71	0.11	0.78	0.03	-0.06	0.02432154	0.03722684
P2rx6	0.13	0.03	0.20	0.07	-0.07	0.00040184	0.00107634
Gabrr1	0.68	0.08	0.74	0.07	-0.07	2.2402E-05	9.334E-05
Accn1	0.46	0.09	0.53	0.04	-0.07	0.00120115	0.00264959
Clic5	0.25	0.06	0.32	0.04	-0.07	8.6753E-05	0.00028289
Id1	0.08	0.02	0.15	0.05	-0.07	9.4207E-09	1.1776E-07
Avpr1b	0.62	0.08	0.70	0.06	-0.08	9.7658E-05	0.00030518
Hrh4	0.71	0.08	0.79	0.05	-0.08	0.00025893	0.00071925
Gm98	0.32	0.05	0.40	0.07	-0.08	1.3374E-05	5.9004E-05
Galr3	0.50	0.05	0.58	0.07	-0.09	1.0285E-05	4.8213E-05
Otog	0.39	0.08	0.48	0.05	-0.09	6.4306E-05	0.00021922
Sstr1	0.22	0.07	0.30	0.12	-0.09	0.00645235	0.01240837
P2ry10	0.39	0.05	0.48	0.06	-0.09	3.2531E-06	1.8768E-05
Chrm4	0.70	0.13	0.80	0.05	-0.09	0.00985497	0.01679825
Grm2	0.13	0.03	0.22	0.07	-0.09	1.6931E-08	1.814E-07
F2rl3	0.67	0.07	0.76	0.05	-0.09	2.6394E-06	1.7686E-05
Tbx1	0.21	0.06	0.31	0.13	-0.10	0.00433703	0.00879127
Calcr	0.15	0.04	0.25	0.11	-0.10	0.00300784	0.00626633
Tmhs	0.60	0.10	0.70	0.06	-0.11	0.00019547	0.00056386
Nmur2	0.21	0.05	0.32	0.11	-0.11	0.0004241	0.0010968
Ctsg	0.70	0.07	0.81	0.03	-0.11	8.9607E-10	2.2402E-08
Ide	0.54	0.15	0.66	0.08	-0.12	0.00591496	0.01167427
Gfap	0.57	0.11	0.69	0.13	-0.13	0.00093263	0.00218585
Chrm2	0.62	0.09	0.75	0.02	-0.13	3.3744E-05	0.0001332
Mas1	0.48	0.13	0.62	0.06	-0.13	6.4306E-05	0.00021922
Gcgr	0.40	0.08	0.54	0.08	-0.14	5.3974E-07	5.06E-06

Sorbs3	0.30	0.07	0.44	0.13	-0.14	0.00011647	0.00034941
Adra1b	0.75	0.13	0.90	0.02	-0.15	4.0023E-06	2.1441E-05
Ush1g	0.28	0.06	0.48	0.13	-0.20	4.0089E-09	6.0133E-08
Spnb4	0.56	0.13	0.76	0.06	-0.20	4.0072E-09	6.0133E-08
F2rl2	0.66	0.10	0.86	0.05	-0.20	8.19E-10	2.2402E-08
Tbxa2r	0.51	0.13	0.71	0.13	-0.21	6.0261E-06	3.0131E-05
Grin2a	0.15	0.05	0.37	0.08	-0.22	2.4984E-10	1.8738E-08

Tabla 2. Genes diferencialmente metilados entre la corteza cerebral y el resto del cerebro. p-valor test Mann-Whitney con corrección para múltiples comparaciones FDR.

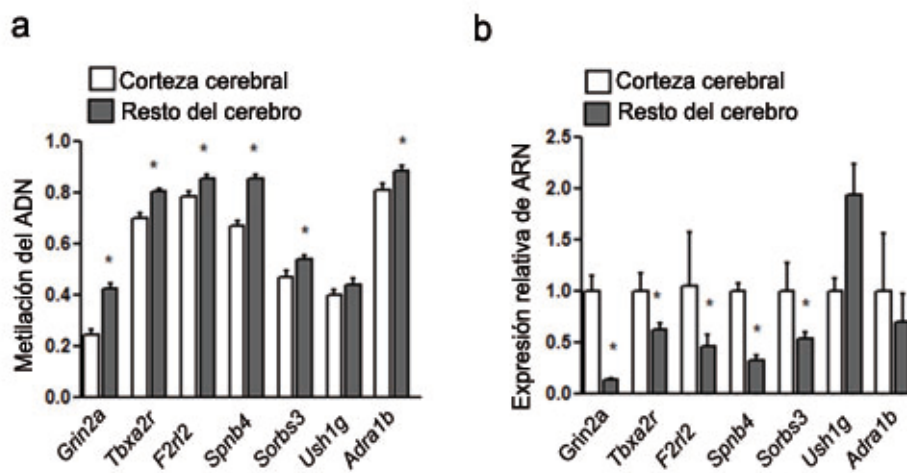


Figura 12. Comparación entre los datos de metilación del ADN obtenidos con el 5mC-mouse-array (a) y los valores de expresión de dichos genes medidos por PCR cuantitativa (b). Se representan los genes que muestran las mayores diferencias significativas entre corteza cerebral y el resto del cerebro. * Test de Mann-Whitney, p-valor < 0.05.

Datos publicados en el artículo: “DNA methylation map of mouse and human brain identifies target genes in Alzheimer's disease”. Sanchez-Mut JV, Aso E, Panayotis N, Lott I, Dierssen M, Rabano A, Urdinguio RG, Fernandez AF, Astudillo A, Martin-Subero JJ, Balint B, Fraga MF, Gomez A, Gurnot C, Roux JC, Avila J, Hensch TK, Ferrer I, Esteller M. Brain. 2013 Oct;136(Pt 10):3018-27. (Anexo 6).

4.2. 2º Estudio: Determinación de los patrones aberrantes de metilación del ADN en modelos murinos de la EA y posterior validación en muestras post-mortem humanas

4.2.1. El análisis conjunto de los perfiles de metilación del ADN de los modelos murinos de EA APP/PSEN1 y 3xTg-AD no muestran diferencias en la corteza frontal

Una vez confirmado el potencial de nuestro *5mC-mouse-array* para detectar cambios de la metilación del ADN potencialmente importantes para la EA, decidimos hacer examinar las posibles alteraciones de la metilación del ADN en modelos murinos debido a que son genéticamente homogéneos y han sido criados en condiciones ambientales similares. De ese modo, las posibles variaciones debidas a la carga genética y el componente ambiental deberían ser mucho menores. Para aumentar la potencia de nuestro estudio, utilizamos dos modelos murinos diferentes de la EA, el modelo APP^{swe}/PS1^{dE9}, en el que se combina la mutación sueca deleción del exón 9 del gen *PSEN1* que aumentan la cantidad de péptido A β (Borchelt *et al.*, 1997), y el modelo 3xTg-AD, en el que se combinan la mutación sueca del gen *APP*, con la mutación M146L del gen *PSEN1* y la mutación P301L del gen *TAU* que aumentan tanto la cantidad de A β como la fosforilación de TAU (Oddo *et al.*, 2003). Dado que en ambos modelos se produce una acumulación de A β en la corteza frontal similar a la que ocurre en los pacientes de EA (Borchelt *et al.*, 1997; Oddo *et al.*, 2003), se decidió centrar el análisis en dicha región. De ese modo, los patrones de metilación del ADN en la corteza frontal fueron examinados y comparados con los respectivos ratones salvajes utilizando el *5mC-mouse-array* previamente diseñado. De las 344 sondas que pasaron el control de calidad, 240 mostraron incrementos de metilación en los ratones APP^{swe}/PS1^{dE9} y 167 en los ratones 3xTg-AD, mientras que 104 y 177 mostraron pérdidas respectivamente. Un análisis global de la metilación de las sondas ratones mostró una ligera tendencia a la ganancia de metilación en los ratones APP^{swe}/PS1^{dE9} (incremento medio de AVG.Beta de 0.00987 ± 0.00118 ; test de Wilcoxon p-valor < 0.001). En cambio, los ratones 3xTg-AD, no mostraron tendencia neta alguna (incremento medio de AVG.Beta de 0.00003 ± 0.00158 ; test de Wilcoxon p-valor = 0.902). Más específicamente, y buscando diferencias en genes concretos, 45 sondas mostraron diferencias significativas en los ratones APP^{swe}/PS1^{dE9}, y 99 sondas en los ratones 3xTg-AD (test de Mann-Whitney; p-valor < 0.05). Desafortunadamente, ninguna de estas diferencias mantuvo la significancia estadística tras corregir por múltiples comparaciones (FDR<0.05).

4.2.2. Los patrones de metilación del ADN característicos de la corteza cerebral están alterados en los modelos murinos de EA APP/PSEN1 y 3xTg-AD

Como hemos visto anteriormente en el 1º Estudio, la mayoría de las sondas no muestran cambios de metilación entre las diferentes regiones analizadas, por lo que podría asumirse que sólo un reducido número de ellas son relevantes para la regulación de dichos genes en el sistema nervioso. Siguiendo esa premisa, decidimos analizar el estado de metilación de los genes diferencialmente metilados entre la corteza cerebral y el resto del cerebro en dos modelos murinos de EA. Para ello, examinamos los valores de metilación del ADN obtenidos con el *5mC-mouse-array* en los genes previamente correlacionados con ganancia de metilación y reducción de la expresión. Al reducir el número de genes a comparar, cuatro de los seis genes examinados mantuvieron la significancia estadística tras la corrección por múltiples comparaciones, en concreto los genes *coagulation factor II (thrombin) receptor-like 2 (F2rl2)*, *sorbin and SH3 domain containing 3 (Sorbs3)*, *spectrin beta non-erythrocytic 4 (Spbn4)* en ratones y *SPTBN4* humanos) y *thromboxane A2 receptor (Tbxa2r)* (**Figura 13a**; FDR < 0.05). Estas observaciones fueron posteriormente validadas en una serie de muestras independientes por pirosecuenciación (**Figura 13b**) y correlacionadas con menores niveles de ARN medidos por PCR cuantitativa (**Figura 13c**) y menores niveles de proteína medidos por *western-blot* e inmunohistoquímica (**Figura 13d**).

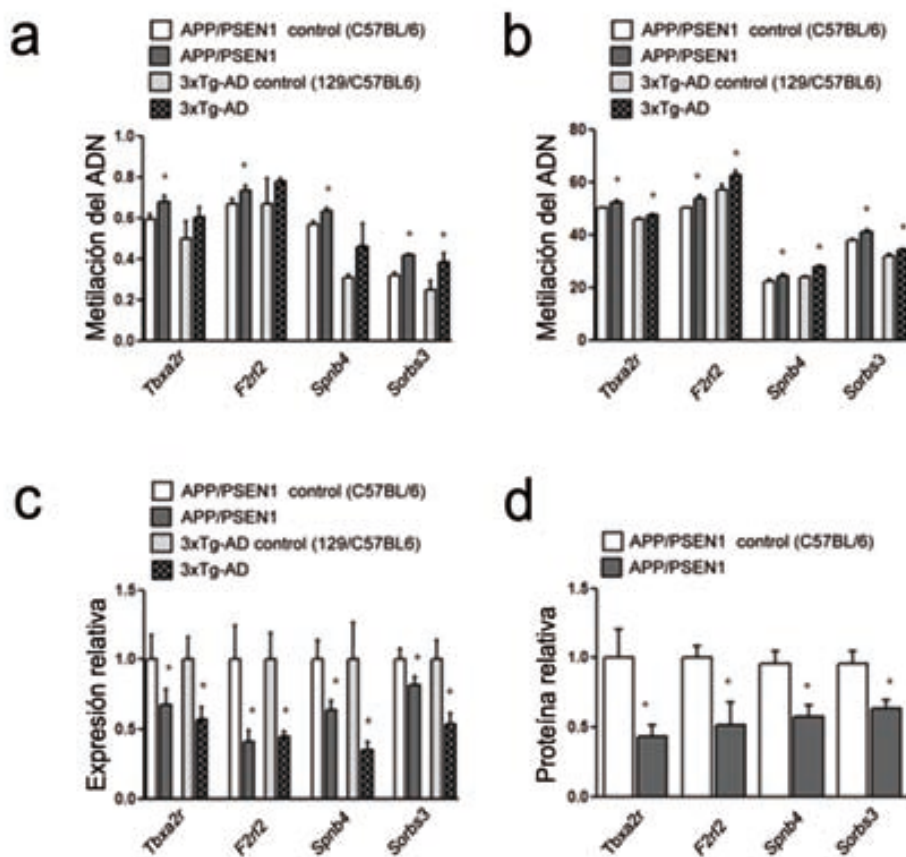


Figura 13. Alteración de los perfiles de la corteza cerebral en los modelos murinos de EA. Cambios de metilación del ADN en los diferentes modelos murinos medidos con el *5mC-mouse-array* (a) y pirosecuenciación utilizando una cohorte independiente (b). Cambios de expresión del ARN medidos con PCR cuantitativa(c). Cambios en los niveles de proteína medidos por *western-blot* (*F2RL2*, *SPBN4* y *SORBS3*) e inmunohistoquímica (*TBXA2R*) (d).

4.2.3. Los genes *SORBS3*, *SPTBN4* y *TBXA2R* están diferencialmente metilados en muestras post-mortem humanas de EA

Tras determinar que los genes *F2rl2*, *Sorbs3*, *Spnb4* y *Tbx2r* están diferencialmente metilados en ambos modelos murinos de EA, quisimos saber si estas diferencias de metilación del ADN también están presentes en humanos. Para ello, analizamos el estado de metilación de las regiones equivalentes en humanos por pirosecuenciación en una serie de 20 muestras control y 20 muestras post-mortem de EA con estadios Braak V-VI C. Al igual que ocurre en los modelos de ratón, los genes *SORBS3*, *SPTBN4* y *TBXA2R* se encuentran hipermetilados en las muestras de EA (**Figura 14a**). En cambio, no se encontraron diferencias significativas para el

gen *F2RL2*. Dichas diferencias de metilación fueron también correlacionadas con menores niveles de expresión del ARN medidas por PCR cuantitativa (**Figura 14b**) y con menores niveles de proteína medidos por inmunohistoquímica (**Figura 15**).

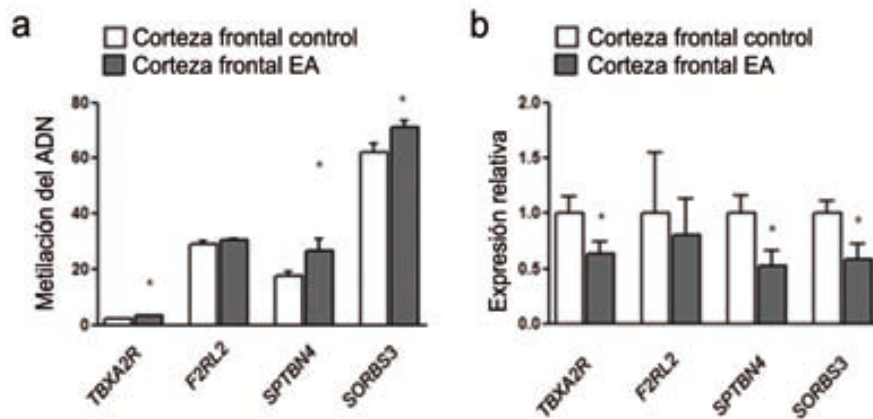


Figura 14. Validación en muestras post-mortem humanas de las diferencias observadas en los modelos murinos de EA. Cambios de metilación del ADN medidos por pirosecuenciación (a). Cambios de expresión del ARN medidos por PCR cuantitativa (b).

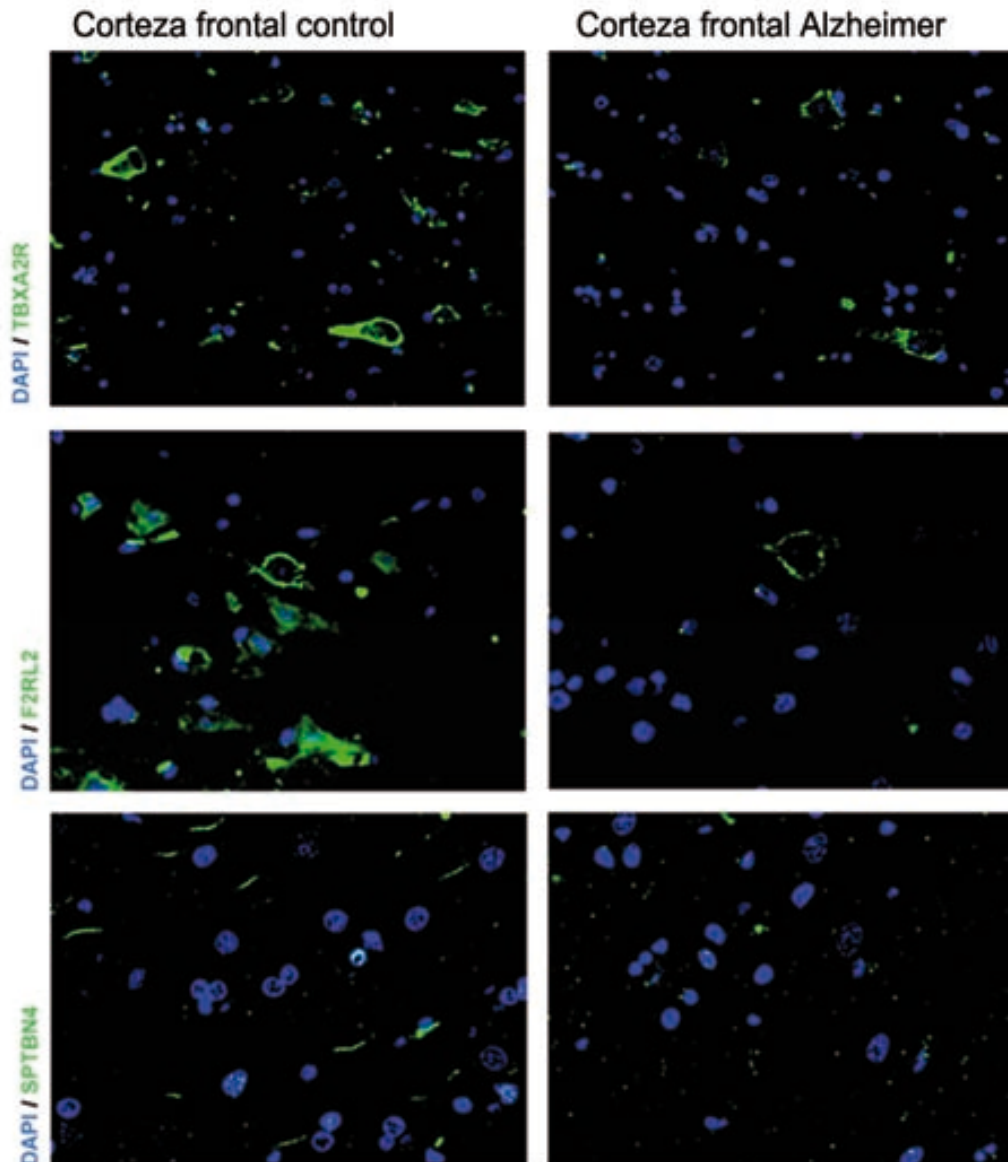


Figura 15. Ensayos inmunohistoquímicos en muestras post-mortem humanas. Se representa una muestra representativa control (izquierda) y EA (derecha).

Datos publicados en el artículo: **“DNA methylation map of mouse and human brain identifies target genes in Alzheimer's disease”**. Sanchez-Mut JV, Aso E, Panayotis N, Lott I, Dierssen M, Rabano A, Urdinguio RG, Fernandez AF, Astudillo A, Martin-Subero JJ, Balint B, Fraga MF, Gomez A, Gurnot C, Roux JC, Avila J, Hensch TK, Ferrer I, Esteller M. Brain. 2013 Oct;136(Pt 10):3018-27. (Anexo 6).

4.3. 3º Estudio: Determinación de los patrones aberrantes de metilación del ADN en muestras post-mortem humanas con EA

4.3.1. La progresión en los estadios de Braak de la EA correlaciona con cambios de metilación del ADN

La utilización de modelos murinos para investigar la EA es una herramienta tremendamente potente pero, a pesar de ello, inexorablemente, nos liga al efecto genético subyacente. Por tanto, teniendo en cuenta que estos modelos son más representativos de las formas familiares de la enfermedad, es necesario realizar más estudios de cribado en la población de EA esporádicos. En las últimas décadas, los intentos de descubrir nuevos factores de riesgo a la EA esporádica se han basado en el análisis de las variantes genéticas y, en general, no han tenido el éxito esperado (Bertram y Tanzi, 2008). Ahora, con la epigenética podemos abordar esta cuestión desde un nuevo punto de vista que nos ofrece incluso más posibilidades. Así, no sólo podemos analizar las alteraciones epigenéticas como posibles epimutaciones que puedan causar o conferir un riesgo ante la EA, si no que, debido a que son marcas dinámicas, las podemos analizar como posibles conductores o marcadores de la progresión de la enfermedad. Lamentablemente, los estudios destinados a identificar alteraciones epigenéticas en la EA son aún muy escasos, y ninguno de ellos ha examinado la EA como un proceso progresivo, centrándose, exclusivamente, en comparar la presencia y ausencia de la enfermedad.

En este estudio se ha pretendido, desde un punto epigenético, analizar la progresión y el avance de la EA con una visión integral. Para ello, hemos analizado como cambian los patrones epigenéticos de muestras post-mortem humanas con EA esporádica a través de los diferentes estadios de Braak, centrándonos en la región del hipocampo por ser una de las regiones más severamente alteradas en la EA y por ser también una de las regiones donde se observan alteraciones desde los primeros estadios asociadas con la patología TAU. En este caso, hemos utilizado el *array* de metilación *Illumina Infinium 27K* que permite analizar 27578 sitios CpGs correspondientes a 14475 genes únicos. Se examinaron cinco muestras por grupo, representando controles, Braak I-II, Braak III-IV y Braak V-VI. El análisis de agrupamiento muestra una correlación entre la metilación del ADN y el estadio de Braak, mostrando las mayores diferencias de metilación los grupos control y el grupo Braak V-VI (**Figura 16**), y una ligera tendencia a la ganancia de metilación (incremento medio del AVG.Beta entre los grupos Braak V-VI y control de 0.00027 ± 0.00013 ; test de Wilcoxon p-valor < 0.0001).

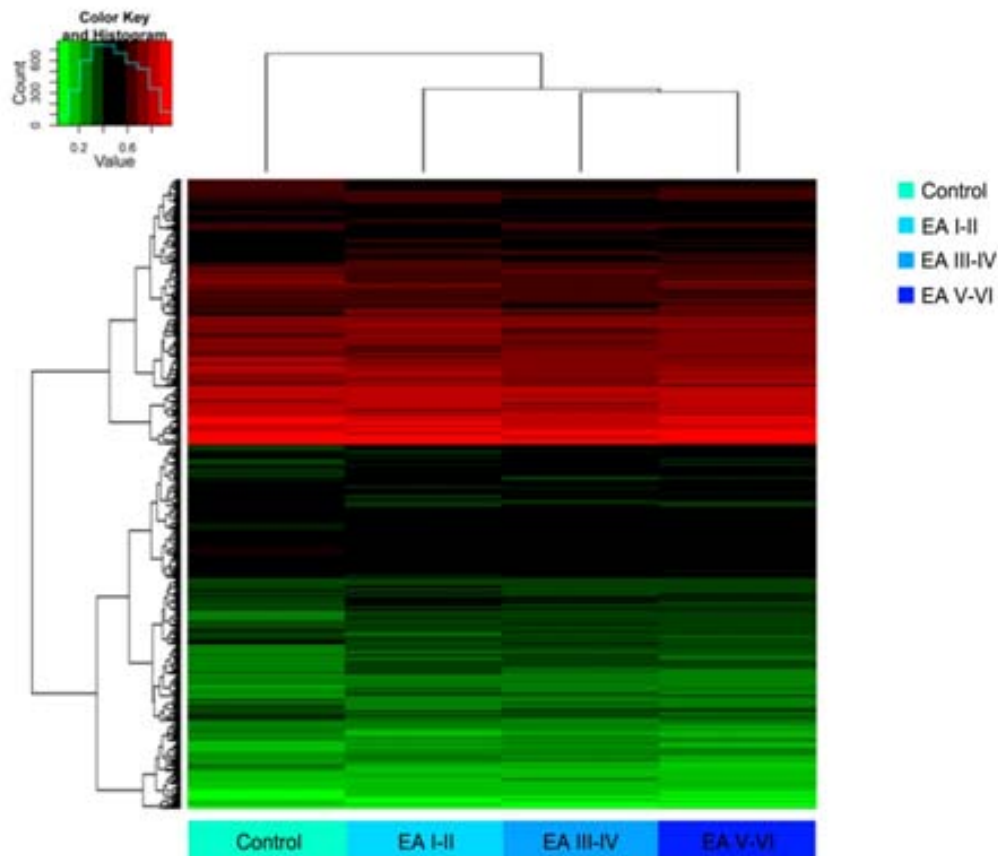


Figura 16. Análisis de agrupamiento de los grupos de muestras representando los diferentes estadios de Braak en la EA. Las medias de cinco muestras por grupo se han utilizado para realizar el análisis de agrupamiento.

4.3.2. El promotor del gen DUSP22 se hipermetila en la EA y correlaciona con menores niveles de expresión del ARN y de proteína

Con el fin de identificar nuevos genes asociados a la progresión de la EA nos centramos en las sondas que siguen un modelo progresivo de ganancia o pérdida de metilación del ADN a través de los diferentes estadios de Braak. Establecimos, además, un umbral de cambio de metilación del ADN mínimo, seleccionando aquellas sondas con un cambio mayor del 25% en, al menos, una muestra control y una muestra Braak V-VI. Siguiendo estos criterios, cuatro sondas correspondientes a tres genes individuales mostraron una diferencia significativa en la metilación del ADN entre el grupo control y el grupo Braak V-VI (test de Mann-Whitney, **Tabla 3**).

Gen	Control	AD I-II	AD III-IV	AD V_VI	Delta	p-valor
DUSP22	0.18	0.33	0.35	0.44	0.25	0.0115*
DUSP22	0.18	0.29	0.33	0.39	0.21	
CLDN15	0.41	0.57	0.58	0.6	0.19	0.0317
QSCN6	0.31	0.23	0.23	0.11	0.20	0.0159

Tabla 3. Sondas representado genes diferencialmente metilados entre el grupo control y el grupo Braak V-VI de la EA que siguen una progresión lineal de ganancia o pérdida de metilación. Mann-Whitney p-valor. * Análisis combinado de ambas sondas.

Estos datos fueron validados en una cohorte independiente de 25 muestras control y 25 muestras de EA Braak V-VI adicionales mediante pirosecuenciación (**Figura 17a**). Para ello, decidimos centrarnos en el gen *DUSP22* por mostrar el cambio de metilación más consistente. Al igual que habíamos observado con el Infinium 27K, el grupo de muestras de EA con estadio V-VI mostró un mayor grado de metilación del ADN que el grupo control, confirmando dichos resultados (**Figura 17b**).

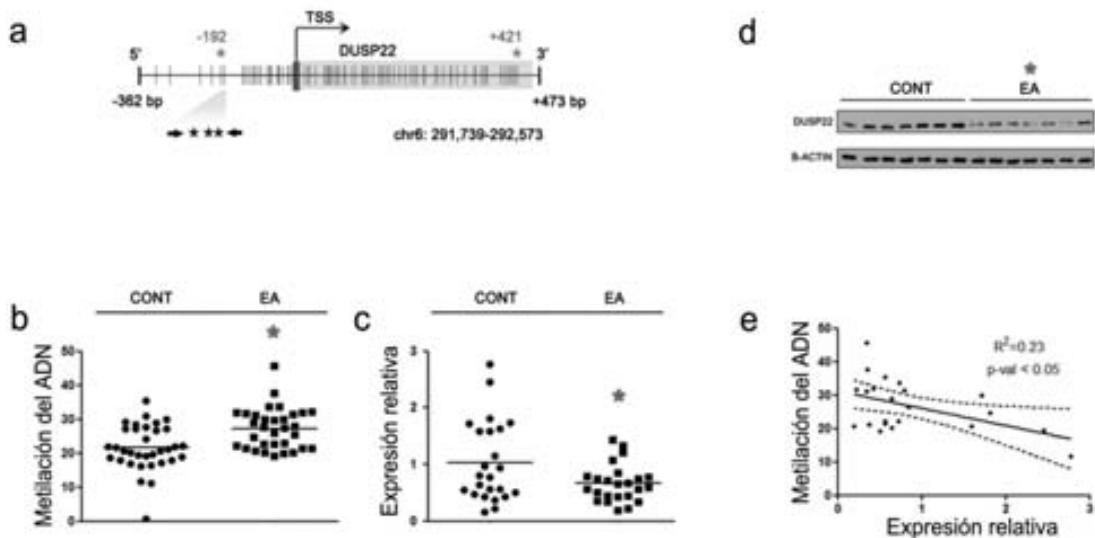


Figura 17. Represión del gen *DUSP22* por metilación del ADN en la EA. Representación de la región promotora del gen en el que se indican las CpGs analizadas en el *Infinium 27K* (asteriscos en gris) y en la pirosecuenciación (asteriscos en negro) (a). Niveles de metilación del ADN en muestras control y EA Braak V-VI medido por pirosecuenciación utilizando una cohorte independiente (b). Niveles relativos de expresión de *DUSP22* en muestras controles y EA medidos por PCR cuantitativa (c). Niveles de proteína en muestras control y EA Braak V-VI medido por *western-blot* (d). Correlación entre los niveles de metilación del ADN y expresión del gen *DUSP22* (e). * Mann-Whitney test, p-valor < 0.05.

Con el fin de examinar la significancia funcional de dicho incremento de metilación del ADN examinamos los niveles de expresión del ARN por PCR cuantitativa y los niveles de proteína por western-blot. En línea con la función de silenciamiento de la expresión génica de la metilación del ADN, las muestras de EA Braak V-VI mostraron menores niveles de expresión (**Figura 17c**) y proteína (**Figura 17d**) del gen *DUSP22* que los controles, observándose una correlación significativa entre el incremento de metilación del ADN y la reducción de expresión del RNA (**Figura 17e**).

4.3.3. DUSP22 regula la fosforilación de TAU a través de la inhibición de PKA

Una vez caracterizada la represión del gen *DUSP22* por hipermetilación del ADN, quisimos profundizar en sus consecuencias funcionales para la EA. Dado que la proteína DUSP22 es una fosfatasa y la fosforilación de TAU juega un papel muy relevante en la EA, quisimos saber si ambos fenómenos estaban relacionados. Para examinar esta hipótesis nos centramos en la fosforilación de la Thr231 de la proteína TAU, por ser uno de los primeros eventos de fosforilación de TAU en la EA y por ser especialmente relevante para su regulación (Luna-Muñoz *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2012). Se midió la fosforilación de la Thr231 en diferentes líneas celulares de neuroblastoma y se observó que la línea SK-N-BE(2) presentaba los mayores niveles de fosforilación (**Figura 18a**). Por ello, se decidió utilizar esta línea celular para generar clones estables con sh-ARN que provocan una disminución de los niveles de DUSP22 y clones estables de DUSP22-myc que sobreexpresan la proteína DUSP22 fusionada a una etiqueta myc (**Figura 18b**). Los niveles de fosforilación de la Thr231 en dos clones independientes para cada construcción fueron examinados, observándose, en contra de lo esperado, una correlación positiva entre expresión de *DUSP22* y fosforilación de TAU (**Figura 18c**). Estos datos indican, por un lado, que existe una relación directa entre la expresión de *DUSP22* y la fosforilación de TAU pero, por otro lado, dado que la proteína DUSP22 es una fosfatasa, también que dicha relación probablemente esté mediada por otra proteína.

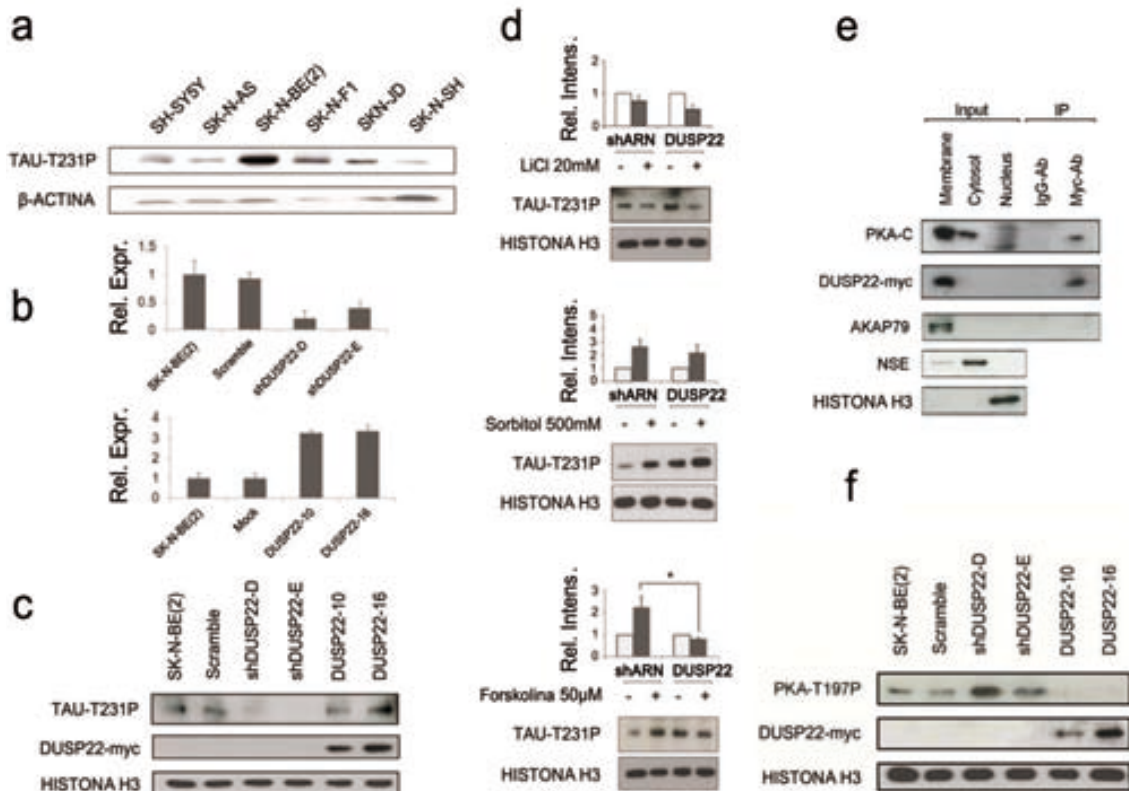


Figura 18. Fosforilación de la Thr231 de la proteína TAU. Niveles de fosforilación de la Thr231 en la proteína TAU en diferentes líneas celulares de neuroblastoma (a). Niveles relativos de expresión de ARN entre los clones de sh-ARN (parte de arriba) y DUSP22-myc (parte de abajo) (b). Niveles de fosforilación de la Thr231 en la proteína TAU en la línea celular SK-N-BE(2) y los diferentes clones establecidos (c). Niveles de fosforilación de la Thr231 en la proteína TAU tras diferentes tratamientos con drogas entre los clones de sh-ARN y DUSP22-myc (d). Fraccionamiento celular e inmunoprecipitación de DUSP22-myc (e). Niveles de fosforilación de la Thr197 de la proteína PKA en la línea celular SK-N-BE(2) y los diferentes clones establecidos (f).

Con el fin de identificar que proteína o proteínas podrían estar mediando dicha relación, examinamos el comportamiento de los clones de sh-ARN y DUSP22-myc ante diferentes tratamientos que modulan la fosforilación de TAU a través de vías de señalización alternativas. Nos centramos en las principales quinasas capaces de fosforilar TAU en la posición Thr231, la *glycogen synthase kinase 3* (GSK3 β), la *cAMP-dependent protein kinase* (PKA) y la *p38 mitogen-activated protein kinase* (p38) y utilizamos litio como inhibidor de la actividad GSK3 β , forskolina como activador de la actividad PKA y sorbitol como activador de la actividad p38 (revisado en Martin *et al.*, 2013). De ese modo, observamos que tanto los clones de sh-ARN como los de DUSP22-myc fueron capaces de inhibir la actividad GSK3 β y aumentar la actividad p38 tras el tratamiento con litio y sorbitol respectivamente (**Figura 18d**). En cambio, sólo los

clones sh-ARN fueron capaces de aumentar la actividad PKA, y no los clones DUSP22-myc, sugiriendo que la expresión de *DUSP22* inhibe específicamente la activación de esta vía (**Figura 18d**). De hecho, ambas proteínas co-localizan en la membrana plasmática y co-immunoprecipitan juntas (**Figura 18e**), sugiriendo que la proteína DUSP22 podría regular directamente a la proteína PKA.

La proteína PKA tiene una regulación compleja en la que dos subunidades catalíticas y dos subunidades reguladoras se asocian y fosforilan diferencialmente. En respuesta a la producción de cAMP, las subunidades reguladoras liberan las subunidades catalíticas que son a su vez fosforiladas en la posición Thr197 constituyendo la forma activa del enzima (Taylor *et al.*, 2012). Reforzando el rol de DUSP22 como inhibidor de la actividad PKA, los clones sh-ARN presentan mayores niveles de fosforilación en la posición Thr197 de la proteína PKA que las células no transfectadas o scramble, siendo menores los niveles en los clones DUSP22-myc (**Figura 18f**).

El efecto de PKA sobre la fosforilación de TAU es complejo y combina actividades contrapuestas. Por un lado, PKA es capaz de fosforilar directamente TAU, aumentando su fosforilación, pero, por otro, PKA es también capaz de fosforilar la posición Ser9 de la proteína GSK3 β , lo que resulta en una reducción de su actividad y una disminución final de la fosforilación de TAU (Jope y Johnson, 2004). Considerando estas premisas, nuestros datos parecen sugerir que la sobreexpresión constante de DUSP22 probablemente disminuya la actividad PKA, provocando un aumento de la actividad GSK3 β y en consecuencia de la fosforilación de TAU. En línea con esta idea, el tratamiento con forskolina aumenta inicialmente la fosforilación de TAU pero, tras 2 horas de la activación de PKA, el efecto final es una disminución de la fosforilación de TAU (**Figura 19a**). Así, el aumento y posterior disminución de la fosforilación de TAU tras 30 minutos y 2 horas de la inducción de la actividad PKA por forskolina es mucho mayor en los clones sh-ARN que en los clones DUSP22-myc, donde la proteína PKA está inhibida (**Figura 19a**). Reforzando esta idea, los clones sh-ARN y no los clones DUSP22-myc son capaces de inhibir la proteína GSK3 β fosforilando la posición Ser9 (**Figura 19b**).

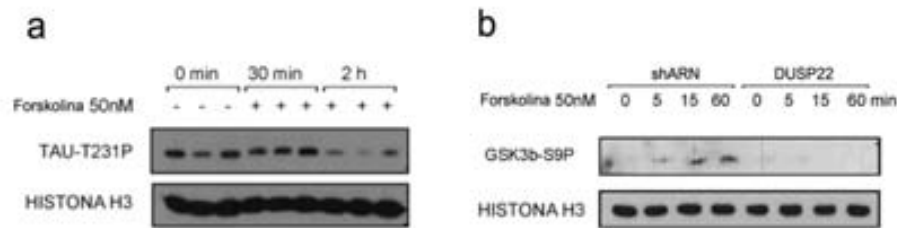


Figura 19. Dinámica de fosforilación de la proteína PKA. Fosforilación de la Thr231 en la proteína TAU tras la activación de PKA (a). Fosforilación de la Ser9 de la proteína GSK3 β tras la activación de PKA (b).

4.3.4. La expresión de DUSP22 condiciona la activación CREB y la expresión de los genes CREB-dependientes a través de la inhibición de PKA

La proteína PKA no solamente regula la fosforilación de TAU y GSK3 β , sino que también es un componente clave de la vía de la *cAMP responsive element binding protein* (CREB). Brevemente, la actividad neuronal provoca la despolarización de la membrana plasmática, causando un influjo de calcio, la activación de la adenilato ciclasa, el aumento de la producción de cAMP y la activación de PKA. En respuesta, PKA fosforila la posición Ser133 de la proteína CREB e induce la expresión de los genes regulados por CREB. La vía de CREB es una de las vías más importantes de la función neuronal y está implicada, entre otros procesos, en la plasticidad sináptica, la formación de la memoria y la supervivencia neuronal (Lonze y Ginty, 2002). En este sentido, es interesante destacar que todos estos procesos están alterados en la EA (Saura y Valero, 2011), por lo que nos preguntamos si la represión epigenética del gen DUSP22, y su efecto sobre la actividad PKA, podría también alterar la vía de CREB.

Con el fin de examinar esta hipótesis, analizamos la fosforilación de la posición Ser133 de la proteína CREB en los clones sh-ARN y los clones DUSP22-myc tras la inducción de la actividad de PKA con forskolina. En línea con los resultados anteriores, los clones DUSP22-myc fueron incapaces de activar la proteína CREB tras la inducción de la actividad PKA, observándose solo en el caso de los clones sh-ARN un aumento de fosforilación de la Ser133 de la proteína CREB (**Figura 20a**). Del mismo modo, la inducción de la expresión de los genes dependientes de CREB fue mayor en los clones sh-ARN, estando comprometida en los clones DUSP22-myc. En este sentido, los genes *somatostatin* (*SST*), *nuclear receptor subfamily 4 group A member 2* (*NR4A2*) y *FBJ osteosarcoma oncogene* (*FOS*) fueron analizados por PCR cuantitativa observándose una mayor expresión en los clones sh-ARN que en las líneas celulares sin

transfectar, y una menor actividad de la vía de señalización en los clones DUSP22-myc (**Figura 20b**).

Dado que la SST ejerce un papel protector ante la A β (Rubio *et al.*, 2012) y que su expresión está inhibida por DUSP22, hipotetizamos que la expresión de DUSP22 podría también comprometer la supervivencia celular. Para comprobar esta hipótesis, tratamos a las células con el péptido A β y medimos la supervivencia celular tras 24 horas. En línea con los datos anteriores, los clones sh-ARN mostraron una mayor capacidad de supervivencia celular que las líneas no transfectadas, estando la supervivencia de los clones DUSP22-myc más comprometida (**Figura 20c**). De acuerdo con el papel neuroprotector de la SST, la adición de SST fue capaz de recuperar parcialmente la supervivencia en los clones DUSP22-myc (**Figura 20c**).

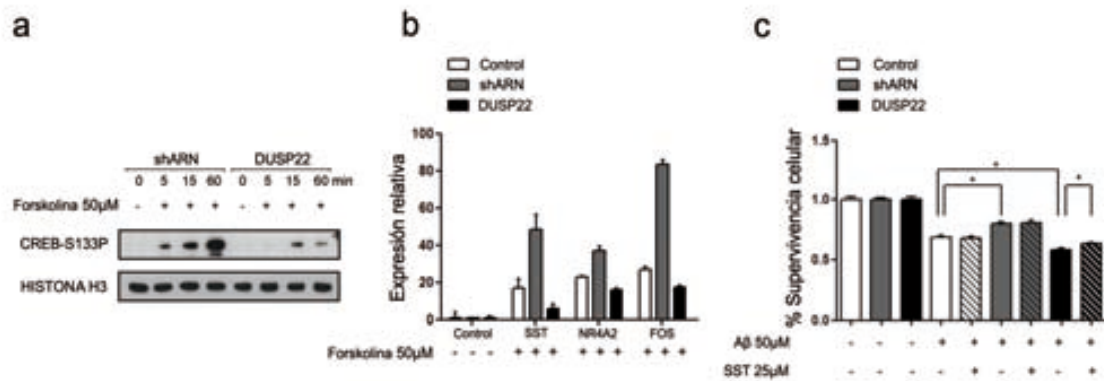


Figura 20. Activación de la vía de CREB. Fosforilación de la Ser133 de la proteína CREB tras la activación de PKA (a). Expresión relativa del ARN de genes CREB-dependientes tras la activación de PKA medida por PCR cuantitativa (b). Porcentaje de supervivencia celular tras tratamiento con el péptido A β y efecto sobre la misma de la adición del péptido somatostatina (SST) (c). * Mann-Whitney p-valor < 0.05.

Datos publicados en el artículo: **“Promoter hypermethylation of the phosphatase DUSP22 mediates PKA-dependent TAU phosphorylation and CREB activation in Alzheimer's disease”**. Sanchez-Mut JV, Aso E, Heyn H, Matsuda T, Bock C, Ferrer I, Esteller M. Hippocampus. 2014 Jan 16. doi: 10.1002/hipo.22245. (**Anexo 7**).

Discusión

5. Discusión

La EA es la principal causa de demencia en las sociedades occidentales y afecta a más de 35 millones de personas en todo el mundo (*World Alzheimer Report 2013*). Fue descrita por Alois Alzheimer en 1907 como una demencia presenil (antes de los 65 años), caracterizada por la presencia de depósitos neurofibrilares y placas en la corteza cerebral. En los años siguientes, se publicaron una serie de casos corroborando los hallazgos de Alois Alzheimer. Se observó que la demencia presenil y senil eran indistinguibles histopatológicamente. Se constató que los términos demencia senil y EA se referían a una misma patología, y se relacionó la EA con el envejecimiento (revisado en Ruiz-Ezquerro, 2005). Pero a pesar de estos avances las causas que provocaban la EA seguían siendo desconocidas. Fueron necesarias más de ocho décadas para identificar los primeros genes que causaban la EA (**Figura 21**).

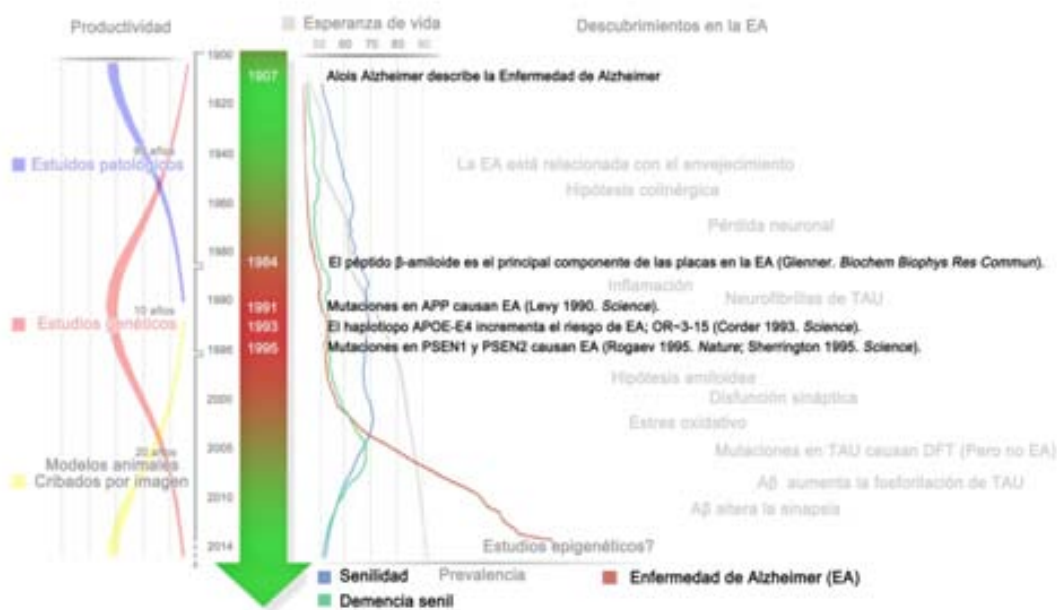


Figura 21. Representación esquemática de los avances más significativos en la investigación de la EA.

En poco más de cinco años, se identificaron mutaciones hasta en tres genes que causaban EA (*APP*, *PSEN1* y *PSEN2*). Esto provocó una auténtica revolución en el campo. Se disparó el número de estudios genéticos. Se identificaron variantes del gen APOE que conferían riesgo a padecer la EA. Se postuló la hipótesis amiloidea y se generaron modelos animales. Gracias a

estos avances se ha profundizado en la etiopatología de la EA, se han desarrollado tratamientos e incluso se han mejorado las herramientas de diagnóstico. Pero en lo referente a las causas que provocan la EA, llevamos más de 20 años sin conseguir avances significativos y solo hemos sido capaces de identificar unas pocas variantes genéticas asociadas a riesgos relativos bajos (Bertram *et al.*, 2007; Lamber *et al.*, 2013). La epigenética podría ayudarnos a invertir esta tendencia y provocar un nuevo cambio de paradigma (**Figura 21**). De hecho, se sabe que está implicada en el deterioro cognitivo asociado al envejecimiento (Oliveira *et al.*, 2012) y que es causa de muchos trastornos neurológicos (Urginguio *et al.*, 2009; Sanchez-Mut *et al.*, 2012; Berdasco y Esteller, 2013).

Todo ello ha generado un enorme interés en determinar los mecanismos epigenéticos que rigen el sistema nervioso y, quizás, uno de los aspectos más básicos sea conocer como se regulan a nivel epigenético las diferentes estructuras del cerebro. Varios estudios han demostrado que los perfiles de expresión celular siguen un patrón que se asemeja al de las regiones anatómicas del cerebro (**Figura 22**; Bohland *et al.*, 2010; Ko *et al.*, 2013). Y otros, que estas regiones están asociadas a perfiles de metilación del ADN característicos (Ladd-Accosta *et al.*, 2007; Xin *et al.*, 2010; Hernandez *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011; Davies *et al.*, 2012). Pero a diferencia de lo que ocurre con la metilación del ADN, los datos de expresión son muy extensos y es posible consultar los perfiles de expresión de la mayoría de las regiones cerebrales (por ejemplo, la base de datos *Allen Brain Atlas*). En cambio, los estudios de metilación del ADN son muy escasos y solo se han determinado los perfiles de metilación de un reducido número de regiones (Ladd-Accosta *et al.*, 2007; Xin *et al.*, 2010; Hernandez *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011; Davies *et al.*, 2012). Por ello, uno de los puntos que se pretendió abordar en esta tesis fue profundizar en este aspecto. En este caso, decidimos utilizar como modelo el cerebro de ratón por presentar una mayor homogeneidad genética y una menor variabilidad interindividual. Al no existir plataformas para examinar el estado de metilación del ADN en ratones se decidió diseñar un *array* de metilación del ADN específicamente para tal fin (*5mC-mouse-array*). El diseño del *array* se basó en la tecnología *Illumina* por ser una de las tecnologías de cribado epigenético más precisas (Bock *et al.*, 2010) y se incluyeron genes relacionados con la percepción sensorial, la cognición, la neuroplasticidad y la fisiología del cerebro, así como también en diversos genes asociados a diferentes enfermedades neurológicas (para ver un listado completo ver **Anexo 5**).

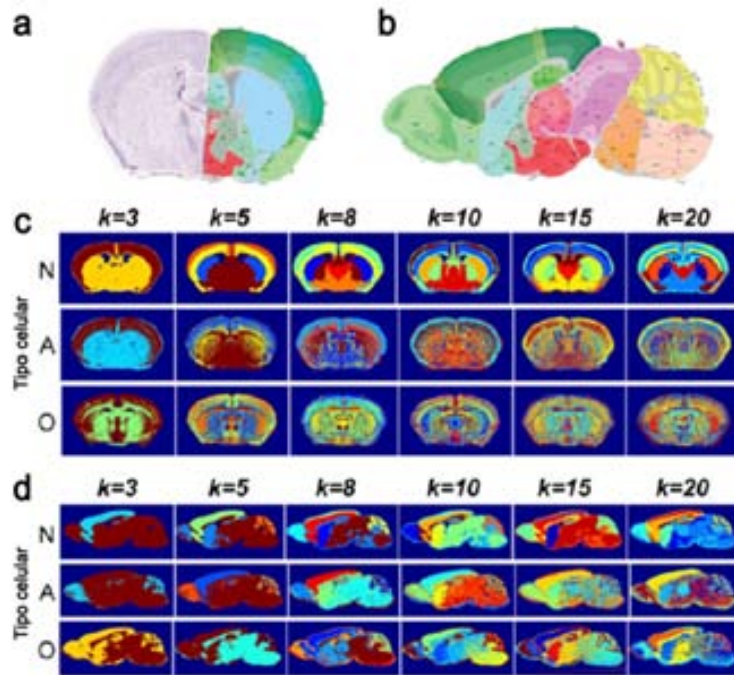


Figura 22. Análisis de agrupamiento de genes expresados específicamente en neuronas (N), astrocitos (A) y oligodendrocitos (O). Para facilitar la comparación con los resultados del análisis de agrupamiento se representa un corte coronal (a) y sagital (b) del cerebro de raton en el que se han coloreado las principales regiones cerebrales. Se han considerado diferentes categorías, o número de genes (k), para realizar el análisis de agrupamiento en cada tipo celular en cortes coronales (c) y sagitales (d). Como resultado, se puede observar que los diferentes tipos celulares muestran patrones de expresión alternativos en diferentes regiones cerebrales (Figura adaptada de Ko *et al.*, 2013. *Proc Natl Acad Sci U S A*).

Tras demostrar la fiabilidad y reproducibilidad del *array*, se caracterizaron los perfiles de metilación del ADN de hasta 12 regiones del cerebro de ratón identificándose más de 70 genes diferencialmente metilados entre las regiones analizadas. Estos datos se correlacionaron con los valores de expresión disponibles la base de datos *Allen Brain Atlas* confirmando su relevancia funcional y demostrando que pueden constituir una potente herramienta para investigaciones futuras. De hecho, se trata de la descripción más detallada de los perfiles de metilación del ADN de las regiones del cerebro hecha hasta la fecha. Gracias a estos datos hemos sido capaces de determinar los patrones de metilación característicos de una de las regiones más susceptibles a la EA, la corteza cerebral, cuestión que ha sido clave para identificar genes epigenéticamente alterados en la EA.

En este sentido es importante destacar que la alta complejidad del sistema nervioso es una dificultad añadida para encontrar genes alterados en la EA. Aproximadamente el 70% de los genes expresados en el cerebro se expresan en menos del 20 % de las células (Lein *et al.*, 2007). De hecho, existe una alta heterogeneidad celular asociada a una gran variabilidad de los perfiles de expresión (Xin *et al.*, 2010; Ko *et al.* 2013). Esto es especialmente relevante en el caso del las neuronas donde, además, los patrones de metilación del ADN muestran también una gran variación de acuerdo con sus características únicas (Iwamoto *et al.* 2011). Como consecuencia, es de suponer que estas características únicas se traduzcan en una etiopatología de la EA particular, con sus propias alteraciones epigenéticas, provocando un efecto dilución dentro de otras alteraciones en otros tipos celulares. Otra complicación adicional surge de la propia variación interindividual de los seres humanos (Turan *et al.*, 2010; Heyn *et al.*, 2013) y del hecho que procesos intrínsecos al funcionamiento del sistema nervioso, como el aprendizaje y la memoria, se sustenten en cambios epigenéticos (Levenson *et al.*, 2004; Miller y Sweatt, 2007; Ma *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2011; Zovkic *et al.*, 2013). Por tanto, no es de extrañar que hayan sido pocos los genes identificados como epigenéticamente alterados en la EA y que estas alteraciones hayan sido, en general, pequeñas en magnitud (Siegmond *et al.*, 2007; Bakulski *et al.*, 2012; Rao *et al.*, 2012; Agbemenyah *et al.*, 2014).

Estas dificultades resaltan la idoneidad de nuestra aproximación y explican, en parte, el porqué un análisis más general, comparando los patrones epigenéticos globales de los ratones control y Alzheimer, no ha sido capaz de identificar alteraciones epigenéticas significativas. Al centrarnos específicamente en la corteza cerebral nuestro análisis ha permitido reducir el número de genes a estudiar resaltando las características intrínsecas de una de las regiones más afectadas en la EA. Gracias a ello, hemos podido identificar un subgrupo de genes alterados en ambos modelos de la EA que, de manera destacable, han sido posteriormente validados en muestras humanas. Los genes *Tbxa2r*, *F2r12*, *Sorbs3* y *Spsnb4* mostraron incrementos significativo de la metilación del ADN asociados a reducciones de la expresión génica y menores niveles de proteínas en ambos modelos de EA. De manera similar, los genes *TBXA2R*, *SORBS3* y *SPTBN4* también mostraron alteraciones similares en muestras post-mortem de EA humanas, tanto a nivel de metilación del ADN, como a nivel de ARN y de proteína. Conjuntamente, estos resultados no sólo resaltan la validez de la utilización de modelos animales para investigar alteraciones epigenéticas en la EA sino que, además, ofrecen nuevas pistas para entender la etiopatología de la EA.

En este sentido, es interesante destacar que *TBXA2R* es un miembro de la familia de receptores acoplados a proteína G que al ser activado mediante análogos del ligando tromboxano A2 (TXA2) induce la actividad de PKA y la fosforilación de CREB (Muja *et al.*, 2001; Obara *et al.*, 2005). De manera destacable, la actividad CREB es crítica para la función neuronal (Franklin *et al.*, 1992) y está frecuentemente alterada en la EA (Saura y Valero, 2011). Pero además, *TBXA2R* también juega un papel importante en la etiopatología de la EA regulando la supervivencia celular, ya que el TXA2 actúa como mediador entre la muerte neuronal y la toxicidad provocada por exceso de NMDA y péptido A β (Yagami *et al.*, 2004; Okada *et al.*, 2008; Mitsumori *et al.*, 2011). Estos datos parecen sugerir que la hipermetilación del gen *TBXA2R* podría entenderse como una respuesta de las células ante la toxicidad por NMDA-A β en la que tratarían de aumentar la supervivencia celular reduciendo la señalización por TXA2. De hecho, la hipermetilación del gen *F2RL2*, aunque sólo ha sido validada en los modelos murinos, podría entenderse que persigue el mismo fin, ya que también está implicado en la señalización por NMDA en la que potencia la activación de los receptores de TXA2 (Guo *et al.*, 2004; Gieseler *et al.*, 2013).

La significancia funcional de estos resultados resaltan la relevancia de nuestro aproximación. Pero quizás, uno de los puntos que más refuerza nuestro análisis es el hecho que tanto en modelos murinos como en muestras humanas hayamos observado una hipermetilación del gen *SORBS3*, una alteración que había sido previamente asociada a la EA (Siegmond *et al.*, 2009). En este caso, es más difícil especular con las implicaciones de este hallazgo, pero el hecho de que esté relacionado con la sinapsis neuronal (Ito *et al.*, 2007) y la regulación génica (Matsuyama *et al.*, 2005) permiten augurar una prometedora línea de investigación que será abordada en un futuro próximo.

Por contra, en el caso de la hipermetilación del gen *SPTBN4* sí que es factible postular las implicaciones de dicha alteración. La proteína SPTBN4 forma parte del segmento inicial del axón donde actúa como puente entre el citoesqueleto y los canales de voltaje (Grubb *et al.*, 2010). La integridad de esta estructura es indispensable para disparar los potenciales de acción y la sinapsis neuronal (Palmer y Stuart, 2006; Kress *et al.*, 2010). De hecho, los ratones *quivering*, que presentan una mutación espontánea en el gen *Spnb4*, son incapaces generar potenciales de acción y muestran déficits de comportamiento asociados a una actividad neuronal alterada (Uemoto *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007; Winkels *et al.*, 2009). Además, la integridad del segmento inicial del axón también es importante para mantener la organización y polaridad celular (Hedstrom *et al.*, 2008). Actúa como barrera entre el soma y el axón, y es necesaria para mantener la localización axonal de la proteína TAU (**Figura 23**; Li *et al.*, 2011).

La disrupción de esta estructura provoca la deslocalización de la proteína TAU exponiéndola a la acción de más quinasas. También provoca la deslocalización de la *calmodulin-dependent protein kinase* (CAMKII) que se encuentra anclada al segmento inicial del axón (Hund *et al.*, 2010), facilitando la fosforilación de TAU por CAMKII, evento frecuentemente observado en la EA (Xiao *et al.*, 1996).

Además, hay que destacar que la utilización de ARNs de interferencia contra *SPTNB4* aumenta la patología TAU en modelos de EA desarrollados en *Drosophila* (Shulman *et al.*, 2011) y que mutaciones en el gen *ankyrin G* (*ANK3*), que también forma parte del segmento inicial del axón, provocan neurodegeneración asociada con la edad en modelos murinos (Zhou *et al.*, 1998). Pero no sólo eso, sino que la disrupción del segmento inicial del axón también podría afectar al procesamiento de la proteína APP. Como consecuencia de la pérdida de polaridad celular, la proteína APP que es activamente transportada a través del axón (Koo *et al.*, 1990; Back *et al.*, 2007), se acumularía en el compartimento somatodendrítico, donde tienden a acumularse las β -secretasas aumentando la producción del péptido A β (revisado en Haass *et al.*, 2012). De ese modo, la hipermetilación del gen *SPTNB4* no solo podría provocar el aumento de fosforilación de la proteína TAU sino que, además, también podría aumentar los niveles de A β .

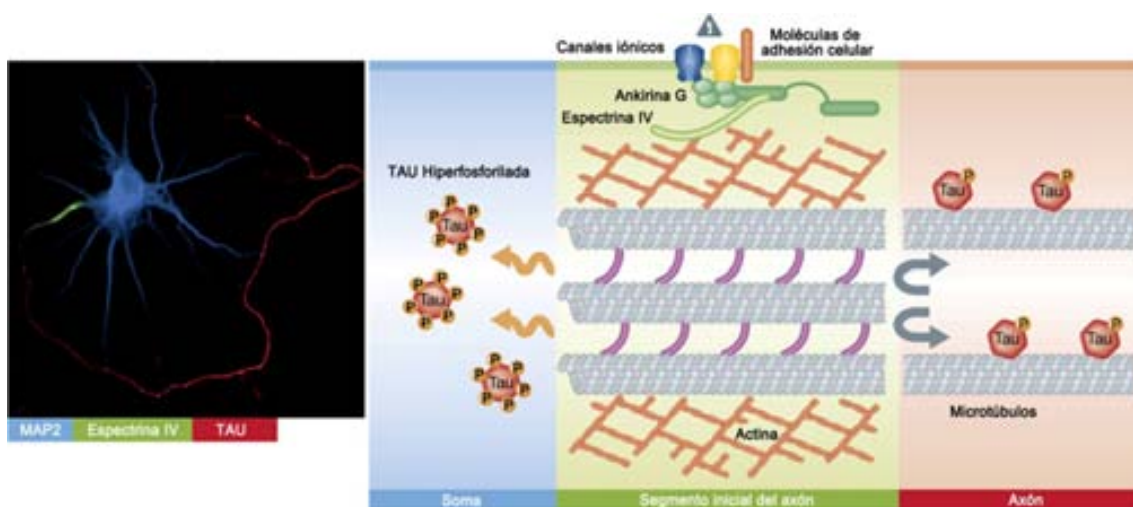


Figura 23. Cultivo de neuronas hipocámpicas en el que se muestra la localización de la proteína SPTBN4 (verde), MAP2 (azul) y TAU (rojo) por inmunohistoquímica (izquierda). Estas proteínas están enriquecidas en el segmento inicial del axón (SPTBN4), compartimento somatodendrítico (MAP2) y axón (TAU). El segmento inicial del axón está principalmente formado por filamentos de actina, espectrina y anquirina, formando una barrera que mantiene a la proteína TAU en el axón protegiéndola de las quinasas que se encuentran en el soma y de la hiperfosforilación (derecha) (Figura adaptada de Jha y Rasband, 2011. *EMBO J*).

En referencia a estos resultados, es importante tener en cuenta que, dada la naturaleza los modelos murinos empleados y las regiones cerebrales examinadas, estas alteraciones epigenéticas deberían estar más asociadas a la patología amiloidea que a las neurofibrillas de TAU. Como hemos mencionado anteriormente, ambos modelos murinos se caracterizan por una acumulación del péptido A β en la corteza frontal de manera similar a la que ocurre en los pacientes de EA (Borchelt *et al.*, 1997; Oddo *et al.*, 2003). Por ello, y como contrapunto, decidimos también llevar a cabo un estudio de metilación del ADN basándonos en la patología TAU. En este caso, nos centramos en una de regiones más severamente afectadas regiones por la patología TAU, el hipocampo (Nelson *et al.*, 2012). En este análisis comparamos los perfiles de metilación de diferentes muestras humanas con diferentes estadios de Braak utilizando el *array* de metilación del ADN *Illumina Infinium 27 K* (Bibikova *et al.*, 2009). De manera significativa observamos que existe una correlación entre los cambios de metilación del ADN y los estadios de Braak. Estos datos sugieren un modelo en el que existe en una acumulación progresiva de cambios en la metilación del ADN a través del avance de la EA, más que un cambio abrupto entre los diferentes estadios. Como consecuencia, y dado que las mayores diferencias se observaron entre los muestras no afectadas (Braak 0) y las muestras con estadios avanzados (Braak V-VI), decidimos centrarnos en estas diferencias. Entre los genes diferencialmente metilados el gen *DUSP22* mostró las mayores diferencias que resultaron ser consistentes utilizando una segunda cohorte de muestras y una técnica independiente.

Este gen, también conocido como *JNK pathway-associated phosphatase (JKAP)*, *VHR-related MKPX (VHX)*, *JNK stimulatory phosphatase-1 (JSP-1)* y *LMW-DSP2*, es miembro de la familia de las *atypical dual specificity phosphatases (DUSPs)*, proteínas que carecen del dominio regulador N-terminal de las típicas DUSPs y que son importantes reguladoras de la señalización intracelular (Patterson *et al.*, 2009). En el trabajo presentado en esta tesis hemos demostrado que la inactivación del gen *DUSP22* altera la vía PKA, provocando una desregulación de la fosforilación de la proteína TAU y una reducción de la activación de CREB. A pesar de que existe una evidente interacción funcional entre ambas proteínas, y que tanto *DUSP22* como PKA localizan en la membrana celular, no ha sido resuelto en esta tesis si la inhibición de la proteína PKA por la proteína *DUSP22* es directa o indirecta, aunque nuestros datos parecen apuntar a que *DUSP22* podría regular directamente la fosforilación de la Thr197 de la proteína PKA. Independientemente de esta cuestión concreta, nuestros datos sugieren, de manera general, que la expresión *DUSP22* podría suponer una desventaja para las células. La mayor expresión de *DUSP22* supondría una menor actividad PKA, provocando un aumento de la actividad GSK3 β y una mayor fosforilación de TAU. De manera similar, una mayor expresión

de *DUSP22* también provocaría una menor activación de la vía CREB y una menor expresión de los genes pro-supervivencia en respuesta al péptido A β (**Figura 24**; Rubio *et al.*, 2012; Saura y Valero, 2011).

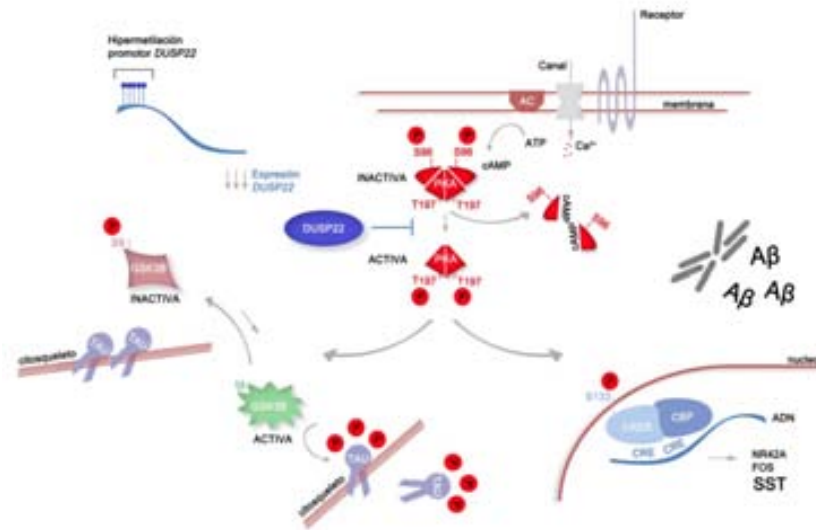


Figura 24. Modelo esquemático en el que se representan las consecuencias de la inhibición de la actividad de la proteína PKA por la proteína DUSP22 estudiadas en esta tesis.

Considerando estos datos, la hipermetilación gen *DUSP22* podría entenderse como una respuesta a la acumulación de A β , en la que las células intentarían maximizar sus posibilidades de sobrevivir aumentando la actividad de la vía CREB. En este sentido es interesante destacar que la depleción total de CREB es inviable (Rudolph *et al.*, 1998), pero que mutaciones en otros genes de la vía están asociadas a diferentes trastornos neurológicos como el síndrome de *Coffin-Lowry* o el síndrome de *Rusbenstein-Taybi* (Trivier 1996 y Petrij, 1995). Alteraciones de expresión de otros genes de la vía CREB son también recurrentes en enfermedades como la enfermedad de *Huntington* (Steffan *et al.*, 2000) o la enfermedad de *Parkinson* (Andersson *et al.*, 2001), y están especialmente alterados en la EA (Yamamoto- Sasaki *et al.*, 1999; Dineley *et al.*, 2001; Pugazhenthii *et al.*, 2011; Saura, 2011). De hecho, la actividad de CREB no solo está afectada por la hipermetilación del gen *DUSP22* sino que la acumulación del péptido A β es capaz de alterar la vía CREB a diferentes niveles. Por un lado, el péptido A β disminuye fosforilación de CREB en neuronas hipocámpales a través de la inhibición de PKA (Vitolo *et al.*, 2002) pero, por otro, también es capaz de inhibir la proteína *CREB regulated transcription cofactor 1* (CRTC1), disminuyendo la expresión de los genes *downstream* y alterando la plasticidad neuronal y la formación de la memoria (España *et al.*, 2010). Además, también es

interesante destacar que la hipermetilación del gen *TBXA2R* también afecta directamente a la vía CREB reforzando la idea de la importancia de esa vía en la EA.

No podemos pasar por alto la posibilidad de que la hipermetilación del gen *DUSP22* en la EA también podría ser el resultado de una diferente susceptibilidad al péptido A β de las células expresando mayores (hipometiladas) y menores (hipermetiladas) niveles de *DUSP22*. En este sentido, las células hipometiladas serían más sensibles y tenderían a desaparecer en la condición EA. Lo que alteraría los ratios entre ambas condiciones y resultaría en un incremento de la metilación global en el contexto EA. Aunque esta cuestión no ha sido resuelta en esta tesis, cualquiera de estas dos posibilidades respalda la importancia de estos resultados, ya que sea por disminuir la susceptibilidad como por proteger ante la toxicidad por A β , inhibir la actividad *DUSP22* puede ser un potencial tratamiento ante la EA.

Al igual que ocurre con *DUSP22*, no podemos descartar que las diferencias de metilación del ADN observadas en los genes *TBXA2R*, *SORBS3* y *SPTBN4* puedan ser también consecuencia de diferentes ratios celulares entre las muestras control y las muestras de EA. Pero de manera similar, independientemente de si estas alteraciones son causa o consecuencia, estos datos resaltan que estos genes, o las células que expresan estos genes, están especialmente afectados en la EA, por lo que podrían considerarse como potenciales dianas para desarrollar nuevos fármacos contra la EA. En este sentido, los datos parecen indicar que la inhibición del gen *DUSP22* o del gen *TBXA2R* podría aumentar la supervivencia celular, mejorando la activación de la vía CREB y la respuesta ante el péptido A β , y que la activación del gen *SORBS3* o del gen *SPTBN4* podría también mejorar la sinapsis y la actividad neuronal, reduciendo la fosforilación de TAU y la producción del péptido A β .

En relación a la función de la proteína *DUSP22* también es importante mencionar que su actividad se ha relacionado con diferentes sustratos dependiendo del origen de las células analizadas. Así, se ha relacionado con la actividad de la quinasa *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) en células de riñón y fibroblastos (Shen *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002), con la actividad *extracellular signal-regulated kinase 2* (ERK2) en linfocitos (Alonso *et al.*, 2002), *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) en células de testículo (Sekine *et al.*, 2006), *estrogen receptor alpha* (ER-alpha) en células de cáncer de mama y con la actividad de la *focal adhesion kinase* (FAK) en células de cáncer de pulmón (Li *et al.*, 2010). De qué manera *DUSP22* es capaz de articular todas estas funciones sigue siendo un misterio pero podría ser, simplemente, resultado de asociaciones alternativas en los diferentes tipos celulares. Independientemente de esta cuestión, también es importante tener en cuenta otros factores.

La proteína DUSP22 fue identificada en 2001 por el laboratorio del Dr. Nicholas Kester Tonks como una proteína que aumentaba la fosforilación de la quinasa JNK (Shen *et al.*, 2001). Estos resultados fueron inesperados e ilustraban un nuevo mecanismo mediante el cual una fosfatasa era capaz de aumentar la fosforilación de una quinasa. Por esta razón, se propuso cambiar el nombre de DUSP22 por el de *fosfatasa estimuladora de la JNK (JNK stimulatory phosphatase 1, JSP - 1)*. Estos resultados fueron posteriormente validados por el laboratorio del Dr. Belmont en 2002 (Chen *et al.*, 2002). En este sentido es interesante considerar que la proteína PKA es capaz de inhibir la fosforilación de la quinasa JNK (revisado en Gerits *et al.*, 2008), por lo que el efecto podría estar mediado por la inhibición de DUSP22 sobre PKA. De hecho, de acuerdo con estas publicaciones, la fosforilación de JNK aumentó al inhibir la actividad PKA mostrando mayores niveles los clones DUSP22-myc que los sh-ARN (**Anexo 8**). De manera muy similar, la observación del laboratorio del Dr. Tse-Huan Tan de que DUSP22 es capaz de desfosforilar la quinasa FAK en células de pulmón H1299 (Li *et al.*, 2010) podría también ser consecuencia de la inhibición de PKA. En este caso hay que considerar que la quinasa *v-src avian sarcoma (SRC)* es la principal responsable de la fosforilación de FAK. En algunas células, PKA es capaz de activar a la quinasa SRC (Schmitt *et al.*, 2002; Deo *et al.*, 2004), mientras que en otras causa su inhibición (Abrahamsen *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2010). Como consecuencia, la inhibición de PKA puede tanto provocar el aumento como la disminución de la fosforilación de FAK dependiendo del tipo celular analizado. Apoyando esta idea, la inhibición de PKA provocó una disminución de los niveles de fosforilación de la quinasa FAK en las células H1299 utilizadas por el Dr. Tse-Huan Tan (**Anexo 8**), pero aumentaron en las células SK-N-BE(2) utilizadas en esta tesis. Otras asociaciones de la actividad DUSP22 con otras proteínas como ERK2 (Alonso *et al.*, 2002), STAT3 (Sekine *et al.*, 2006) o ER-alpha (Sekine *et al.*, 2007) también podrían ser consecuencia de su actividad sobre la proteína PKA (Stork *et al.*, 2007; Deo *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 1999), aunque en estos casos los datos deben ser consideradas con cautela ya que son resultado de experimentos llevados a cabo utilizando una construcción de DUSP22 con una etiqueta N-terminal que provoca la deslocalización de la proteína desde la membrana al citoplasma (Alonso *et al.*, 2004).

Por último, también es importante destacar las limitaciones técnicas de nuestro estudio. Los *arrays* de metilación utilizados se basan en la modificación del ADN mediante el tratamiento con bisulfito sódico. Este tratamiento es incapaz de distinguir entre las citosinas metiladas y las hidroximetiladas, provocando que ambas marcas se interpreten como citosinas metiladas (Huang *et al.*, 2010). Datos recientes han puesto de manifiesto la importancia de la hidroximetilación en el cerebro donde pueden llegar a representar hasta el 10% de la

metilación del ADN total (Globisch *et al.*, 2010; Münzel *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2011; Nestor *et al.*, 2012). Esta limitación no debería causar grandes perturbaciones en nuestro estudio debido a que representa un bajo porcentaje y está asociada a un aumento de la expresión del ARN (Ficz *et al.*, 2011). Todas las alteraciones de la metilación del ADN descritas en esta tesis apuntan hacia una represión génica lo que está en consonancia con la función represiva de la metilación del ADN y no con la función activadora de la hidroximetilación (Vinson y Chatterjee, 2012).

En líneas generales podemos resumir que la mayoría de los cambios de metilación en la EA están asociados a loci concretos sin causar una tendencia global hacia la ganancia o la pérdida de metilación del ADN. A diferencia de lo que ocurre en los estudios basados en líneas celulares, los estudios basados en cerebros de ratones y cerebros humanos no muestran grandes diferencias globales de metilación del ADN (Mastroeni *et al.*, 2009; Mastroeni *et al.*, 2010; Bakulski *et al.*, 2012; Cong *et al.*, 2013; Coppieters *et al.*, 2013; Bradley-Whitman y Lovell, 2013; Chouliaras *et al.*, 2013). El hecho de que los estudios basados en líneas celulares apunten hacia una pérdida de metilación global (Chen *et al.*, 2009; Sung *et al.*, 2011; Hodgson *et al.*, 2013), podría ser consecuencia de que las líneas celulares necesitan establecer los patrones de metilación del ADN con cada división. Este proceso podría estar alterado por la presencia del péptido A β , explicando la aparente controversia con los estudios basados en tejidos neuronales que no dependen de la división celular.

Conclusiones

6. Conclusiones

- Existen diferencias de metilación del ADN entre diferentes regiones anatómicas del cerebro que son funcionalmente relevantes.
- Los modelos murinos de EA presentan diferencias de metilación del ADN asociadas a la patología.
- Los modelos murinos de EA muestran diferencias de metilación del ADN similares a las muestras post-mortem humanas de EA.
- Existen diferencias de metilación del ADN en muestras post-mortem humanas de EA que correlacionan con la patología.
- Las diferencias de metilación del ADN observadas en las muestras humanas de EA son funcionalmente relevantes.
- Los cambios de metilación del ADN en la EA afectan principalmente a loci concretos.

Bibliografía

7. Bibliografía

Abrahamsen H, Vang T, Taskén K. Protein kinase A intersects SRC signaling in membrane microdomains. *J Biol Chem.* 2003 .278(19):17170-7.

Agbemenyah HY, Agis-Balboa RC, Burkhardt S, Delalle I, Fischer A. Insulin growth factor binding protein 7 is a novel target to treat dementia. *Neurobiol Dis.* 2014 Feb;62:135-43.

Alonso A, Merlo JJ, Na S, Kholod N, Jaroszewski L, Kharitonov A, Williams S, Godzik A, Posada JD, Mustelin T. Inhibition of T cell antigen receptor signaling by VHR-related MKPX (VHX), a new dual specificity phosphatase related to VH1 related (VHR). *J Biol Chem.* 2002 Feb 15;277(7):5524-8.

Alonso A, Narisawa S, Bogetz J, Tautz L, Hadzic R, Huynh H, Williams S, Gjörlöf-Wingren A, Bremer MC, Holsinger LJ, Millan JL, Mustelin T. VHY, a novel myristoylated testis-restricted dual specificity protein phosphatase related to VHX. *J Biol Chem.* 2004 Jul 30;279(31):32586-91.

Andersson M, Konradi C, Cenci MA. cAMP response element-binding protein is required for dopamine-dependent gene expression in the intact but not the dopamine-denervated striatum. *J Neurosci.* 2001 Dec 15;21(24):9930-43.

Back S, Haas P, Tschäpe JA, Gruebl T, Kirsch J, Müller U, Beyreuther K, Kins S. beta-amyloid precursor protein can be transported independent of any sorting signal to the axonal and dendritic compartment. *J Neurosci Res.* 2007 Sep;85(12):2580-90.

Bakulski KM, Dolinoy DC, Sartor MA, Paulson HL, Konen JR, Lieberman AP, Albin RL, Hu H, Rozek LS. Genome-wide DNA methylation differences between late-onset Alzheimer's disease and cognitively normal controls in human frontal cortex. *J Alzheimers Dis.* 2012;29(3):571-88.

Ball MP, Li JB, Gao Y, Lee JH, LeProust EM, Park IH, Xie B, Daley GQ, Church GM. Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells. *Nat Biotechnol.* 2009 Apr;27(4):361-8.

Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 2011 Mar;21(3):381-95.

Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell.* 2007 May 18;129(4):823-37.

Barrachina M, Ferrer I. DNA methylation of Alzheimer disease and tauopathy-related genes in postmortem brain. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2009 Aug;68(8):880-91.

Barros SP, Offenbacher S. Epigenetics: connecting environment and genotype to phenotype and disease. *J Dent Res.* 2009 May;88(5):400-8.

Berdasco M, Esteller M. Genetic syndromes caused by mutations in epigenetic genes. *Hum Genet.* 2013 Apr;132(4):359-83.

Berger, S. L., Kouzarides, T., Shiekhattar, R., & Shilatifard, A. (2009). An operational definition of epigenetics. *Genes & Development*, 23(7), 781–783.

- Bertram L, McQueen MB, Mullin K, Blacker D, Tanzi RE. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat Genet.* 2007 Jan;39(1):17-23.
- Bertram L, Tanzi RE. Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. *Nat Rev Neurosci.* 2008 Oct;9(10):768-78.
- Bibikova Marina, Le Jennie, Barnes Bret, Saedinia-Melnyk Shadi, et al. Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium® assay. *Epigenomics.* October 2009;1:177-200.
- Bird TD. Genetic aspects of Alzheimer disease. *Genet Med.* 2008 Apr;10(4):231-9.
- Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet.* 2006 Jul 29;368(9533):387-403.
- Bock C, Tomazou EM, Brinkman AB, Müller F, Simmer F, Gu H, Jäger N, Gnirke A, Stunnenberg HG, Meissner A. Quantitative comparison of genome-wide DNA methylation mapping technologies. *Nat Biotechnol.* 2010 Oct;28(10):1106-14.
- Bohland JW, Bokil H, Pathak SD, Lee CK, Ng L, Lau C, Kuan C, Hawrylycz M, Mitra PP. Clustering of spatial gene expression patterns in the mouse brain and comparison with classical neuroanatomy. *Methods.* 2010 Feb;50(2):105-12.
- Borchelt DR, Ratovitski T, van Lare J, Lee MK, Gonzales V, Jenkins NA, Copeland NG, Price DL, Sisodia SS. Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron.* 1997 Oct;19(4):939-45.
- Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 1991;82(4):239-59.
- Bradley-Whitman MA, Lovell MA. Epigenetic changes in the progression of Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev.* 2013 Oct;134(10):486-95.
- Brohede J, Rinde M, Winblad B, Graff C. A DNA methylation study of the amyloid precursor protein gene in several brain regions from patients with familial Alzheimer disease. *J Neurogenet.* 2010 Dec;24(4):179-81.
- Cao X, Yeo G, Muotri AR, Kuwabara T, Gage FH. Noncoding RNAs in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 2006;29:77-103.
- Chen AJ, Zhou G, Juan T, Colicos SM, Cannon JP, Cabrera-Hansen M, Meyer CF, Jurecic R, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Fletcher F, Tan TH, Belmont JW. The dual specificity JKAP specifically activates the c-Jun N-terminal kinase pathway. *J Biol Chem.* 2002 Sep 27;277(39):36592-601.
- Chen D, Pace PE, Coombes RC, Ali S. Phosphorylation of human estrogen receptor alpha by protein kinase A regulates dimerization. *Mol Cell Biol.* 1999 Feb;19(2):1002-15.
- Chen KL, Wang SS, Yang YY, Yuan RY, Chen RM, Hu CJ. The epigenetic effects of amyloid-beta(1-40) on global DNA and neprilysin genes in murine cerebral endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Jan 2;378(1):57-61.
- Chishti MA, Yang DS, Janus C, Phinney AL, Horne P, et al. Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. *J Biol Chem.* 2001 Jun 15;276(24):21562-70.

Chodavarapu RK, Feng S, Bernatavichute YV, Chen PY, Stroud H, Yu Y, Hetzel JA, Kuo F, Kim J, Cokus SJ, Casero D, Bernal M, Huijser P, Clark AT, Krämer U, Merchant SS, Zhang X, Jacobsen SE, Pellegrini M. Relationship between nucleosome positioning and DNA methylation. *Nature*. 2010 Jul 15;466(7304):388-92.

Choi JK. Contrasting chromatin organization of CpG islands and exons in the human genome. *Genome Biol*. 2010;11(7):R70. Epub 2010 Jul 5.

Chouliaras L, Rutten BP, Kenis G, Peerbooms O, Visser PJ, Verhey F, van Os J, Steinbusch HW, van den Hove DL. Epigenetic regulation in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*. 2010 Apr;90(4):498-510.

Chouliaras L, Mastroeni D, Delvaux E, Grover A, Kenis G, Hof PR, Steinbusch HW, Coleman PD, Rutten BP, van den Hove DL. Consistent decrease in global DNA methylation and hydroxymethylation in the hippocampus of Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging*. 2013 Sep;34(9):2091-9.

Choy MK, Movassagh M, Goh HG, Bennett MR, Down TA, Foo RS. Genome-wide conserved consensus transcription factor binding motifs are hyper-methylated. *BMC Genomics*. 2010 Sep 27;11:519.

Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ. Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature*. 1992 Dec 17;360(6405):672-4.

Cooney CA, Dave AA, Wolff GL. Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring. *J Nutr*. 2002 Aug;132(8 Suppl):2393S-2400S.

Cong L, Jia J, Qin W, Ren Y, Sun Y. Genome-wide analysis of DNA methylation in an APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Acta Neurol Belg*. 2013 Dec 18.

Coppieters N, Dieriks BV, Lill C, Faull RL, Curtis MA, Dragunow M. Global changes in DNA methylation and hydroxymethylation in Alzheimer's disease human brain. *Neurobiol Aging*. 2013 Dec 4. pii: S0197-4580(13)00615-5.

Coppus A, Evenhuis H, Verberne GJ, Visser F, van Gool P, Eikelenboom P, van Duijn C. Dementia and mortality in persons with Down's syndrome. *J Intellect Disabil Res*. 2006 Oct;50(Pt 10):768-77.

Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. 1993 Aug 13;261(5123):921-3.

Davies MN, Volta M, Pidsley R, Lunnon K, Dixit A, Lovestone S, Coarfa C, Harris RA, Milosavljevic A, Troakes C, Al-Sarraj S, Dobson R, Schalkwyk LC, Mill J. Functional annotation of the human brain methylome identifies tissue-specific epigenetic variation across brain and blood. *Genome Biol*. 2012 Jun 15;13(6):R43.

Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev*. 2011 May 15;25(10):1010-22.

Deo DD, Bazan NG, Hunt JD. Activation of platelet-activating factor receptor-coupled G alpha q leads to stimulation of Src and focal adhesion kinase via two separate pathways in human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem*. 2004 Jan 30;279(5):3497-508.

- Dineley KT, Westerman M, Bui D, Bell K, Ashe KH, Sweatt JD. Beta-amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade via hippocampal alpha7 nicotinic acetylcholine receptors: In vitro and in vivo mechanisms related to Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2001 Jun 15;21(12):4125-33.
- Duyckaerts C, Dickson DW. 2003. Neuropathology of Alzheimer's disease. In: Dickson DW (Ed.). *Neurodegeneration: The Molecular Pathology of Dementia and Movement Disorders*. ISN Neuropath Press, Basel, pp.47-65.
- Elango N, Yi SV. DNA methylation and structural and functional bimodality of vertebrate promoters. *Mol Biol Evol*. 2008 Aug;25(8):1602-8.
- España J, Valero J, Miñano-Molina AJ, Masgrau R, Martín E, Guardia-Laguarta C, Lleó A, Giménez-Llort L, Rodríguez-Alvarez J, Saura CA. beta-Amyloid disrupts activity-dependent gene transcription required for memory through the CREB coactivator CRTCL1. *J Neurosci*. 2010 Jul 14;30(28):9402-10.
- Feng J, Zhou Y, Campbell SL, Le T, Li E, Sweatt JD, Silva AJ, Fan G. Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. *Nat Neurosci*. 2010 Apr;13(4):423-30.
- Ficz G, Branco MR, Seisenberger S, Santos F, Krueger F, Hore TA, Marques CJ, Andrews S, Reik W. Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature*. 2011;473(7347):398-402.
- Ford AH, Almeida OP. Effect of homocysteine lowering treatment on cognitive function: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Alzheimers Dis*. 2012;29(1):133-49.
- Fraga, M. F., Ballestar, E., Paz, M. F., Ropero, S., Setien, F., Ballestar, M. L., et al. (2005). Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(30), 10604–10609.
- Franklin JL, Johnson EM Jr. Suppression of programmed neuronal death by sustained elevation of cytoplasmic calcium. *Trends Neurosci*. 1992;15:501-8.
- Fuso A, Seminara L, Cavallaro RA, D'Anselmi F, Scarpa S. S-adenosylmethionine/homocysteine cycle alterations modify DNA methylation status with consequent deregulation of PS1 and BACE and beta-amyloid production. *Mol Cell Neurosci*. 2005 Jan;28(1):195-204.
- Fuso A, Nicolìa V, Pasqualato A, Fiorenza MT, Cavallaro RA, Scarpa S. Changes in Presenilin 1 gene methylation pattern in diet-induced B vitamin deficiency. *Neurobiol Aging*. 2011 Feb;32(2):187-99.
- Fuso A, Nicolìa V, Ricceri L, Cavallaro RA, Isopi E, Mangia F, Fiorenza MT, Scarpa S. S-adenosylmethionine reduces the progress of the Alzheimer-like features induced by B-vitamin deficiency in mice. *Neurobiol Aging*. 2012 Jul;33(7):1482.e1-16.
- Gatz M, Pedersen NL, Berg S, Johansson B, Johansson K, Mortimer JA, Posner SF, Viitanen M, Winblad B, Ahlbom A. Heritability for Alzheimer's disease: the study of dementia in Swedish twins. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 1997 Mar;52(2):M117-25.
- Gatz M, Fratiglioni L, Johansson B, Berg S, Mortimer JA, Reynolds CA, Fiske A, Pedersen NL. Complete ascertainment of dementia in the Swedish Twin Registry: the HARMONY study. *Neurobiol Aging*. 2005 Apr;26(4):439-47.

- Gerits N, Kostenko S, Shiryaev A, Johannessen M, Moens U. Relations between the mitogen-activated protein kinase and the cAMP-dependent protein kinase pathways: comradeship and hostility. *Cell Signal*. 2008 Sep;20(9):1592-607.
- Gieseler F, Ungefroren H, Settmacher U, Hollenberg MD, Kaufmann R. Proteinase-activated receptors (PARs) - focus on receptor-receptor-interactions and their physiological and pathophysiological impact. *Cell Commun Signal*. 2013 Nov 11;11:86. doi: 10.1186/1478-811X-11-86.
- Gilbert BJ. Republished: The role of amyloid β in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Postgrad Med J*. 2014 Feb;90(1060):113-7.
- GINNO PA, LIM YW, LOTT PL, KORF I, CHÉDIN F. GC skew at the 5' and 3' ends of human genes links R-loop formation to epigenetic regulation and transcription termination. *Genome Res*. 2013 Oct;23(10):1590-600.
- Globisch D, Münzel M, Müller M, Michalakis S, Wagner M, Koch S, Brückl T, Biel M, Carell T. Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. *PLoS One*. 2010 Dec 23;5(12):e15367. doi: 10.1371/journal.pone.0015367.
- Gräff J, LH. The potential of HDAC inhibitors as cognitive enhancers. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2013;53:311-30.
- Grubb, M.S. & Burrone, J. Building and maintaining the axon initial segment. *Curr. Opin. Neurobiol*. 2010; 20:1–8.
- Guan JS, Haggarty SJ, Giacometti E, Dannenberg JH, Joseph N, Gao J, Nieland TJ, Zhou Y, Wang X, Mazitschek R, Bradner JE, DePinho RA, Jaenisch R, Tsai LH. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature*. 2009 May 7;459(7243):55-60.
- Guenther MG, Levine SS, Boyer LA, Jaenisch R, Young RA. A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell*. 2007 Jul 13;130(1):77-88.
- Guo H, Liu D, Gelbard H, Cheng T, et al. Activated protein C prevents neuronal apoptosis via protease activated receptors 1 and 3. *Neuron*. 2004;41:563-72.
- Guo JU, Su Y, Zhong C, Ming GL, Song H. Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell*. 2011 Apr 29;145(3):423-34.
- Gupta S, Kim SY, Artis S, Molfese DL, Schumacher A, Sweatt JD, Paylor RE, Lubin FD. Histone methylation regulates memory formation. *J Neurosci*. 2010 Mar 10;30(10):3589-99.
- Haass C, Lemere CA, Capell A, Citron M, Seubert P, Schenk D, Lannfelt L, Selkoe DJ. The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat Med*. 1995 Dec;1(12):1291-6.
- Haass C, Kaether C, Thinakaran G, Sisodia S. Trafficking and Proteolytic Processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2:a006270.
- Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci*. 1991 Oct;12(10):383-8.
- Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. 1992 Apr 10;256(5054):184-5.

Hardy J. Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 1997 Apr;20(4):154-9.

Harris RA, Wang T, Coarfa C, Nagarajan RP, Hong C, *et al.* Comparison of sequencing-based methods to profile DNA methylation and identification of monoallelic epigenetic modifications. *Nat Biotechnol.* 2010 Oct;28(10):1097-105.

Hedstrom, K.L., Ogawa, Y. & Rasband, M.N. AnkyrinG is required for maintenance of the axon initial segment and neuronal polarity. *J. Cell Biol.* 2008;183:635–640.

Heintzman ND, Stuart RK, Hon G, Fu Y, Ching CW, Hawkins RD, Barrera LO, Van Calcar S, Qu C, Ching KA, Wang W, Weng Z, Green RD, Crawford GE, Ren B. Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet.* 2007 Mar;39(3):311-8.

Hernandez DG, Nalls MA, Gibbs JR, Arepalli S, van der Brug M, Chong S, Moore M, Longo DL, Cookson MR, Traynor BJ, Singleton AB. Distinct DNA methylation changes highly correlated with chronological age in the human brain. *Hum Mol Genet.* 2011 Mar 15;20(6):1164-72.

Heyn H, Li N, Ferreira HJ, Moran S, Pisano DG, Gomez A, Diez J, Sanchez-Mut JV, Setien F, Carmona FJ, Puca AA, Sayols S, Pujana MA, Serra-Musach J, Iglesias-Platas I, Formiga F, Fernandez AF, Fraga MF, Heath SC, Valencia A, Gut IG, Wang J, Esteller M. Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Jun 26;109(26):10522-7.

Heyn H, Moran S, Hernando-Herraez I, Sayols S, Gomez A, Sandoval J, Monk D, Hata K, Marques-Bonet T, Wang L, Esteller M. DNA methylation contributes to natural human variation. *Genome Res.* 2013 Sep;23(9):1363-72.

Hinterberger M, Fischer P. Folate and Alzheimer: when time matters. *J Neural Transm.* 2013 Jan;120(1):211-24.

Hodgson N, Trivedi M, Muratore C, Li S, Deth R. Soluble oligomers of amyloid- β cause changes in redox state, DNA methylation, and gene transcription by inhibiting EAAT3 mediated cysteine uptake. *J Alzheimers Dis.* 2013 Jan 1;36(1):197-209.

Hon G, Wang W, Ren B. Discovery and annotation of functional chromatin signatures in the human genome. *PLoS Comput Biol.* 2009 Nov;5(11):e1000566.

Huang Y, Pastor WA, Shen Y, Tahiliani M, Liu DR, Rao A. The behaviour of 5-hydroxymethylcytosine in bisulfite sequencing. *PLoS One.* 2010 26;5(1):e8888.

Hund TJ, Koval OM, Li J, Wright PJ, *et al.* A β (IV)-spectrin/CaMKII signaling complex is essential for membrane excitability in mice. *J Clin Invest.* 2010 Oct;120(10):3508-19.

Huff JT, Plocik AM, Guthrie C, Yamamoto KR. Reciprocal intronic and exonic histone modification regions in humans. *Nat Struct Mol Biol.* 2010 Dec;17(12):1495-9.

Inbar-Feigenberg M, Choufani S, Butcher DT, Roifman M, Weksberg R. Basic concepts of epigenetics. *Fertil Steril.* 2013 Mar 1;99(3):607-15.

Ito H, Usuda N, Atsuzawa K, Iwamoto I, *et al.* Phosphorylation by extracellular signal-regulated kinase of a multidomain adaptor protein, vinexin, at synapses. *J Neurochem.* 2007;100:545-54.

Iwamoto K, Bundo M, Ueda J, Oldham MC, Ukai W, Hashimoto E, Saito T, Geschwind DH, Kato T. Neurons show distinctive DNA methylation profile and higher interindividual variations compared with non-neurons. *Genome Res.* 2011;21(5):688-96.

Jakovcevski M, Akbarian S. Epigenetic mechanisms in neurological disease. *Nat Med.* 2012 Aug;18(8):1194-204.

Jeong S, Liang G, Sharma S, Lin JC, Choi SH, Han H, Yoo CB, Egger G, Yang AS, Jones PA. Selective anchoring of DNA methyltransferases 3A and 3B to nucleosomes containing methylated DNA. *Mol Cell Biol.* 2009 Oct;29(19):5366-76.

Jin H, Garmy-Susini B, Avraamides CJ, Stoletov K, Klemke RL, Varner JA. A PKA-Csk-pp60Src signaling pathway regulates the switch between endothelial cell invasion and cell-cell adhesion during vascular sprouting. *Blood.* 2010 .116(25):5773-83.

Jin SG, Wu X, Li AX, Pfeifer GP. Genomic mapping of 5-hydroxymethylcytosine in the human brain. *Nucleic Acids Res.* 2011 Jul;39(12):5015-24.

Johnson MB, Kawasawa YI, Mason CE, Krsnik Z, Coppola G, Bogdanović D, Geschwind DH, Mane SM, State MW, Sestan N. Functional and evolutionary insights into human brain development through global transcriptome analysis. *Neuron.* 2009 May 28;62(4):494-509.

Jope RS, Johnson GV. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci.* 2004 Feb;29(2):95-102.

Ko Y, Ament SA, Eddy JA, Caballero J, Earls JC, Hood L, Price ND. Cell type-specific genes show striking and distinct patterns of spatial expression in the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Feb 19;110(8):3095-100.

Kohli RM, Zhang Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature.* 2013 Oct 24;502(7472):472-9.

Koo EH, Sisodia SS, Archer DR, Martin LJ, Weidemann A, Beyreuther K, Fischer P, Masters CL, Price DL. Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Feb;87(4):1561-5.

Kramer JM, Kochinke K, Oortveld MA, Marks H, Kramer D, de Jong EK, Asztalos Z, Westwood JT, Stunnenberg HG, Sokolowski MB, Keleman K, Zhou H, van Bokhoven H, Schenck A. Epigenetic regulation of learning and memory by *Drosophila* EHMT/G9a. *PLoS Biol.* 2011 Jan 4;9(1):e1000569.

Ladd-Acosta C, Pevsner J, Sabunciyan S, Yolken RH, Webster MJ, Dinkins T, Callinan PA, Fan JB, Potash JB, Feinberg AP. DNA methylation signatures within the human brain. *Am J Hum Genet.* 2007 Dec;81(6):1304-15.

Lambert JC, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, Naj AC, Sims R, *et al.* Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 2013 Dec;45(12):1452-8.

Lee RS, Tamashiro KL, Aryee MJ, Murakami P, Seifuddin F, Herb B, Huo Y, Rongione M, Feinberg AP, Moran TH, Potash JB. Adaptation of the CHARM DNA methylation platform for the rat genome reveals novel brain region-specific differences. *Epigenetics.* 2011 Nov;6(11):1378-90.

- Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, *et al.* Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*. 2007 Jan 11;445(7124):168-76.
- Levenson JM, O'Riordan KJ, Brown KD, Trinh MA, Molfese DL, Sweatt JD. Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J Biol Chem*. 2004 Sep 24;279(39):40545-59.
- Levy E, Carman MD, Fernandez-Madrid IJ, Power MD, Lieberburg I, van Duinen SG, Bots GT, Luyendijk W, Frangione B. Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science*. 1990 Jun 1;248(4959):1124-6.
- Lewi PJ. Spectral mapping, a technique for classifying biological activity profiles of chemical compounds. *Arzneimittelforschung*. 1976;26(7):1295-1300.
- Li JP, Fu YN, Chen YR, Tan TH. JNK pathway-associated phosphatase dephosphorylates focal adhesion kinase and suppresses cell migration. *J Biol Chem*. 2010 Feb 19;285(8):5472-8.
- Li X, Kumar Y, Zempel H, Mandelkow EM, *et al.* Novel diffusion barrier for axonal retention of Tau in neurons and its failure in neurodegeneration. *EMBO J*. 2011;30:4825-37.
- Lister R, Mukamel EA, Nery JR, Urich M, Puddifoot CA, Johnson ND, Lucero J, Huang Y, Dwork AJ, Schultz MD, Yu M, Tonti-Filippini J, Heyn H, Hu S, Wu JC, Rao A, Esteller M, He C, Haghghi FG, Sejnowski TJ, Behrens MM, Ecker JR. Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development. *Science*. 2013 Aug 9;341(6146):1237905.
- Lonze BE, Ginty DD. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron*. 2002 Aug 15;35(4):605-23.
- Lowe J, Mirra SS, Hyman B, Dickson DW. 2008. Ageing and Dementia. In: Love S, Louis DN, Ellison DW (Eds.), *Greenfield's Neuropathology*, vol.1. Hodder Arnold, London, pp. 1031-1152.
- Luna-Muñoz J, Chávez-Macías L, García-Sierra F, Mena R. Earliest stages of tau conformational changes are related to the appearance of a sequence of specific phospho-dependent tau epitopes in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2007 Dec;12(4):365-75.
- Ma DK, Jang MH, Guo JU, Kitabatake Y, Chang ML, Pow-Anpongkul N, Flavell RA, Lu B, Ming GL, Song H. Neuronal activity-induced Gadd45b promotes epigenetic DNA demethylation and adult neurogenesis. *Science*. 2009 Feb 20;323(5917):1074-7.
- Martin L, Latypova X, Wilson CM, Magnaudeix A, Perrin ML, Yardin C, Terro F. Tau protein kinases: involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev*. 2013 Jan;12(1):289-309.
- Mastroeni D, McKee A, Grover A, Rogers J, Coleman PD. Epigenetic differences in cortical neurons from a pair of monozygotic twins discordant for Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2009 Aug 12;4(8):e6617.
- Mastroeni D, Grover A, Delvaux E, Whiteside C, Coleman PD, Rogers J. Epigenetic changes in Alzheimer's disease: decrements in DNA methylation. *Neurobiol Aging*. 2010 Dec;31(12):2025-37.
- Matsuyama M, Mizusaki H, Shimono A, Mukai T, *et al.* A novel isoform of Vinexin, Vinexin gamma, regulates Sox9 gene expression through activation of MAPK cascade in mouse fetal gonad. *Genes Cells*. 2005;10:421-34.

Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I, Rydel RE. Beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci.* 12 (1992) 376-389.

McQuown SC, Barrett RM, Matheos DP, Post RJ, Rogge GA, Alenghat T, Mullican SE, Jones S, Rusche JR, Lazar MA, Wood MA. HDAC3 is a critical negative regulator of long-term memory formation. *J Neurosci.* 2011 Jan 12;31(2):764-74.

Meilinger D, Fellinger K, Bultmann S, Rothbauer U, Bonapace IM, Klinkert WE, Spada F, Leonhardt H. Np95 interacts with de novo DNA methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b, and mediates epigenetic silencing of the viral CMV promoter in embryonic stem cells. *EMBO Rep.* 2009 Nov;10(11):1259-64. Epub 2009 Oct 2.

Miller CA, Sweatt JD. Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron.* 2007;53:857-69.

Miller CA, Gavin CF, White JA, Parrish RR, Honasoge A, Yancey CR, Rivera IM, Rubio MD, Rumbaugh G, Sweatt JD. Cortical DNA methylation maintains remote memory. *Nat Neurosci.* 2010 Jun;13(6):664-6.

Miller G. Epigenetics. The seductive allure of behavioral epigenetics. *Science.* 2010 Jul 2;329(5987):24-7.

Mitsumori T, Furuyashiki T, Momiyama T, Nishi A, et al. Thromboxane receptor activation enhances striatal dopamine release, leading to suppression of GABAergic transmission and enhanced sugar intake. *Eur J Neurosci.* 2011;34:594-604.

Muja N, Blackman SC, Le Breton GC, DeVries GH. Identification and functional characterization of thromboxane A2 receptors in Schwann cells. *J Neurochem.* 2001;78:446-56.

Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet.* 1992 Aug;1(5):345-7.

Münzel M, Globisch D, Brückl T, Wagner M, Welzmler V, Michalakis S, Müller M, Biel M, Carell T. Quantification of the sixth DNA base hydroxymethylcytosine in the brain. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2010 Jul 19;49(31):5375-7.

Murrell J, Farlow M, Ghetti B, Benson MD. A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science.* 1991 Oct 4;254(5028):97-9.

Na ES, Nelson ED, Adachi M, Autry AE, Mahgoub MA, Kavalali ET, Monteggia LM. A mouse model for MeCP2 duplication syndrome: MeCP2 overexpression impairs learning and memory and synaptic transmission. *J Neurosci.* 2012 Feb 29;32(9):3109-17.

Nakamura K, Greenwood A, Binder L, Bigio EH, Denial S, Nicholson L, Zhou XZ, Lu KP. Proline isomer-specific antibodies reveal the early pathogenic tau conformation in Alzheimer's disease. *Cell.* 2012 Mar 30;149(1):232-44.

Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, et al. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2012 May;71(5):362-81.

- Nestor CE, Ottaviano R, Reddington J, Sproul D, Reinhardt D, Dunican D, Katz E, Dixon JM, Harrison DJ, Meehan RR. Tissue type is a major modifier of the 5-hydroxymethylcytosine content of human genes. *Genome Res.* 2012 Mar;22(3):467-77.
- Obara Y, Kurose H, Nakahata N. Thromboxane A2 promotes interleukin-6 biosynthesis mediated by an activation of cyclic AMP-response element-binding protein in 1321N1 human astrocytoma cells. *Mol Pharmacol.* 2005;68:670-9.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron.* 2003 Jul 31;39(3):409-21.
- Okada S, Yamaguchi-Shima N, Shimizu T, Arai J, et al. Centrally administered N-methyl-d-aspartate evokes the adrenal secretion of noradrenaline and adrenaline by brain thromboxane A2-mediated mechanisms in rats. *Eur J Pharmacol.* 2008;586:145-50.
- Oliveira AM, Hemstedt TJ, Bading H. Rescue of aging-associated decline in Dnmt3a2 expression restores cognitive abilities. *Nat Neurosci.* 2012 Jul 1;15(8):1111-3.
- Palini S, De Stefani S, Scala V, Dusi L, Bulletti C. Epigenetic regulatory mechanisms during preimplantation embryo development. *Ann N Y Acad Sci.* 2011 Mar;1221:54-60.
- Palmer LM, Stuart GJ. Site of action potential initiation in layer 5 pyramidal neurons. *J Neurosci.* 2006;26:1854-63.
- Panayotis N, Pratte M, Borges-Correia A, Ghata A, et al. Morphological and functional alterations in the substantia nigra pars compacta of the Mecp2-null mouse. *Neurobiol Dis.* 2011;41:385-97.
- Panayotis N, Ghata A, Villard L, Roux JC. Biogenic amines and their metabolites are differentially affected in the Mecp2-deficient mouse brain. *BMC Neurosci.* 2011;12:47.
- Pankotai T, Komonyi O, Bodai L, Ujfaludi Z, Muratoglu S, Ciurciu A, Tora L, Szabad J, Boros I. The homologous Drosophila transcriptional adaptors ADA2a and ADA2b are both required for normal development but have different functions. *Mol Cell Biol.* 2005 Sep;25(18):8215-27.
- Patterson KI, Brummer T, O'Brien PM, Daly RJ. Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. *Biochem J.* 2009 Mar 15;418(3):475-89.
- Paxinos G, Franklin KBJ. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates.* 2nd ed. San Diego: Academic Press 2001.
- Petrij F, Giles RH, Dauwerse HG, Saris JJ, Hennekam RC, Masuno M, Tommerup N, van Ommen GJ, Goodman RH, Peters DJ, et al. Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP. *Nature.* 1995 Jul 27;376(6538):348-51.
- Pike CJ, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW. In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. *Brain Res.* 1991 Nov 1;563(1-2):311-4.
- Pike CJ, Burdick D, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW. Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J Neurosci.* 1993 Apr;13(4):1676-87.
- Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol.* 2010 Oct;28(10):1057-68.

Pugazhenth S, Wang M, Pham S, Sze CI, Eckman CB. Downregulation of CREB expression in Alzheimer's brain and in A β -treated rat hippocampal neurons. *Mol Neurodegener.* 2011 Aug 19;6:60.

Radde R, Bolmont T, Kaeser SA, Coomaraswamy J, Lindau D, Stoltze L, Calhoun ME, Jäggi F, Wolburg H, Gengler S, Haass C, Ghetti B, Czech C, Hölscher C, Mathews PM, Jucker M. Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep.* 2006 Sep;7(9):940-6.

Räihä I, Kaprio J, Koskenvuo M, Rajala T, Sourander L. Alzheimer's disease in twins. *Biomed Pharmacother.* 1997;51(3):101-4.

Ramirez-Carrozzi VR, Braas D, Bhatt DM, Cheng CS, Hong C, Doty KR, Black JC, Hoffmann A, Carey M, Smale ST. A unifying model for the selective regulation of inducible transcription by CpG islands and nucleosome remodeling. *Cell.* 2009 Jul 10;138(1):114-28.

Rao JS, Keleshian VL, Klein S, Rapoport SI. Epigenetic modifications in frontal cortex from Alzheimer's disease and bipolar disorder patients. *Transl Psychiatry.* 2012 Jul 3;2:e132.

Reddy BA, Bajpe PK, Bassett A, Moshkin YM, Kozhevnikova E, Bezstarosti K, Demmers JA, Travers AA, Verrijzer CP. Drosophila transcription factor Tramtrack69 binds MEP1 to recruit the chromatin remodeler NuRD. *Mol Cell Biol.* 2010 Nov;30(21):5234-44.

Rhee I, Bachman KE, Park BH, Jair KW, Yen RW, Schuebel KE, Cui H, Feinberg AP, Lengauer C, Kinzler KW, Baylin SB, Vogelstein B. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature.* 2002 Apr 4;416(6880):552-6.

Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T, 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.* 1995 Aug 31;376(6543):775-8.

Rottach A, Frauer C, Pichler G, Bonapace IM, Spada F, Leonhardt H. The multi-domain protein Np95 connects DNA methylation and histone modification. *Nucleic Acids Res.* 2010 Apr;38(6):1796-804.

Roux JC, Mamet J, Perrin D, Peyronnet J, et al. Neurochemical development of the brainstem catecholaminergic cell groups in rat. *J Neural Transm.* 2003;110:51-65.

Rubio A, Sánchez-Mut JV, García E, Velasquez ZD, Oliver J, Esteller M, Avila J. Epigenetic control of somatostatin and cortistatin expression by β amyloid peptide. *J Neurosci Res.* 2012 Jan;90(1):13-20.

Rudolph D, Tafuri A, Gass P, Hämmerling GJ, Arnold B, Schütz G. Impaired fetal T cell development and perinatal lethality in mice lacking the cAMP response element binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Apr 14;95(8):4481-6.

Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WM, Karlen Y, et al. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:e45.

Ruiz-Ezquerro JJ. 100 años de enfermedad de Alzheimer. Alois Alzheimer: su vida y su obra. *Historia de la enfermedad de Alzheimer. Alzheimer. Real Invest Demenc* 2007;35:12-22

Sanchez-Mut JV, Huertas D, Esteller M. Aberrant epigenetic landscape in intellectual disability. *Prog Brain Res.* 2012;197:53-71

Saura CA, Valero J. The role of CREB signaling in Alzheimer's disease and other cognitive disorders. *Rev Neurosci*. 2011;22(2):153-69.

Schmitt JM, Stork PJ. PKA phosphorylation of Src mediates cAMP's inhibition of cell growth via Rap1. *Mol Cell*. 2002 Jan;9(1):85-94.

Schones DE, Cui K, Cuddapah S, Roh TY, Barski A, Wang Z, Wei G, Zhao K. Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome. *Cell*. 2008 Mar 7;132(5):887-98.

Schwartz S, Meshorer E, Ast G. Chromatin organization marks exon-intron structure. *Nat Struct Mol Biol*. 2009 Sep;16(9):990-5.

Sekine Y, Tsuji S, Ikeda O, Sato N, Aoki N, Aoyama K, Sugiyama K, Matsuda T. Regulation of STAT3-mediated signaling by LMW-DSP2. *Oncogene*. 2006 Sep 21;25(42):5801-6.

Sekine Y, Ikeda O, Hayakawa Y, Tsuji S, Imoto S, Aoki N, Sugiyama K, Matsuda T. DUSP2/LMW-DSP2 regulates estrogen receptor-alpha-mediated signaling through dephosphorylation of Ser-118. *Oncogene*. 2007 Sep 6;26(41):6038-49.

Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011 Sep;1(1):a006189.

Siegmund KD, Connor CM, Campan M, Long TI, Weisenberger DJ, Biniszkiwicz D, Jaenisch R, Laird PW, Akbarian S. DNA methylation in the human cerebral cortex is dynamically regulated throughout the life span and involves differentiated neurons. *PLoS One*. 2007 Sep 19;2(9):e895.

Sharif J, Endo TA, Toyoda T, Koseki H. Divergence of CpG island promoters: a consequence or cause of evolution? *Dev Growth Differ*. 2010 Aug;52(6):545-54.

Shen Y, Luche R, Wei B, Gordon ML, Diltz CD, Tonks NK. Activation of the Jnk signaling pathway by a dual-specificity phosphatase, JSP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Nov 20;98(24):13613-8.

Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1995 Jun 29;375(6534):754-60.

Shulman JM, Chipendo P, Chibnik LB, Aubin C, et al. Functional screening of Alzheimer pathology genome-wide association signals in *Drosophila*. *Am J Hum Genet*. 2011;88:232-8.

Smith MA. Alzheimer disease. *Int Rev Neurobiol*. 1998;42:1-54.

Steffan JS, Kazantsev A, Spasic-Boskovic O, Greenwald M, Zhu YZ, Gohler H, Wanker EE, Bates GP, Housman DE, Thompson LM. The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jun 6;97(12):6763-8.

Stork PJ, Schmitt JM. Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol*. 2002 Jun;12(6):258-66.

Straussman R, Nejman D, Roberts D, Steinfeld I, Blum B, Benvenisty N, Simon I, Yakhini Z, Cedar H. Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome. *Nat Struct Mol Biol*. 2009 May;16(5):564-71.

Sung HY, Choi EN, Ahn Jo S, Oh S, Ahn JH. Amyloid protein-mediated differential DNA methylation status regulates gene expression in Alzheimer's disease model cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Nov 4;414(4):700-5.

Suzuki M, Yamada T, Kihara-Negishi F, Sakurai T, Oikawa T. Direct association between PU.1 and MeCP2 that recruits mSin3A-HDAC complex for PU.1-mediated transcriptional repression. *Oncogene*. 2003 Nov 27;22(54):8688-98.

Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L Jr, Eckman C, Golde TE, Younkin SG. An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science*. 1994 May 27;264(5163):1336-40.

Taher N, McKenzie C, Garrett R, Baker M, Fox N, Isaacs GD. Amyloid- β Alters the DNA Methylation Status of Cell-fate Genes in an Alzheimer's Disease Model. *J Alzheimers Dis*. 2014 Jan 1;38(4):831-44.

Tang CS, Epstein RJ. A structural split in the human genome. *PLoS One*. 2007 Jul 11;2(7):e603.

Tanzi RE. A genetic dichotomy model for the inheritance of Alzheimer's disease and common age-related disorders. *J Clin Invest*. 1999 Nov;104(9):1175-9.

Tanzi RE, Bertram L. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell*. 2005 Feb 25;120(4):545-55.

Tanzi RE. A brief history of Alzheimer's disease gene discovery. *J Alzheimers Dis*. 2013;33 Suppl 1:S5-13.

Taylor SS, Ilouz R, Zhang P, Kornev AP. Assembly of allosteric macromolecular switches: lessons from PKA. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 Oct;13(10):646-58.

Tilgner H, Nikolaou C, Althammer S, Sammeth M, Beato M, Valcárcel J, Guigó R. Nucleosome positioning as a determinant of exon recognition. *Nat Struct Mol Biol*. 2009 Sep;16(9):996-1001.

Trivier E, De Cesare D, Jacquot S, Pannetier S, Zackai E, Young I, Mandel JL, Sassone-Corsi P, Hanauer A. Mutations in the kinase Rsk-2 associated with Coffin-Lowry syndrome. *Nature*. 1996 Dec 12;384(6609):567-70.

Turan N, Katari S, Coutifaris C, Sapienza C. Explaining inter-individual variability in phenotype: is epigenetics up to the challenge? *Epigenetics*. 2010 Jan 1;5(1):16-9. Epub 2010 Jan 6.

Uemoto Y, Suzuki S, Terada N, Ohno N, et al. Specific role of the truncated betaIV-spectrin Sigma6 in sodium channel clustering at axon initial segments and nodes of ranvier. *J Biol Chem*. 2007;282:6548-55.

Urduingio RG, Sanchez-Mut JV, Esteller M. Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies. *Lancet Neurol*. 2009 Nov;8(11):1056-72.

Van Broeckhoven C, Haan J, Bakker E, Hardy JA, Van Hul W, Wehnert A, Vegter-Van der Vlis M, Roos RA. Amyloid beta protein precursor gene and hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (Dutch). *Science*. 1990 Jun 1;248(4959):1120-2.

Vermeulen M, Eberl HC, Matarese F, Marks H, Denissov S, Butter F, Lee KK, Olsen JV, Hyman AA, Stunnenberg HG, Mann M. Quantitative interaction proteomics and genome-wide profiling of epigenetic histone marks and their readers. *Cell*. 2010 Sep 17;142(6):967-80.

- Vinson C, Chatterjee R. CG methylation. *Epigenomics*. 2012 Dec;4(6):655-63.
- Vitolo OV, Sant'Angelo A, Costanzo V, Battaglia F, Arancio O, Shelanski M. Amyloid beta - peptide inhibition of the PKA/CREB pathway and long-term potentiation: reversibility by drugs that enhance cAMP signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Oct 1;99(20):13217-21.
- Wang SC, Oelze B, Schumacher A. Age-specific epigenetic drift in late-onset Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2008 Jul 16;3(7):e2698.
- Wang Z, Zang C, Rosenfeld JA, Schones DE, Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Peng W, Zhang MQ, Zhao K. Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat Genet*. 2008 Jul;40(7):897-903.
- West RL, Lee JM, Maroun LE. Hypomethylation of the amyloid precursor protein gene in the brain of an Alzheimer's disease patient. *J Mol Neurosci*. 1995;6(2):141-6.
- Winkels R, Jedlicka P, Weise FK, Schultz C, et al. Reduced excitability in the dentate gyrus network of betaIV-spectrin mutant mice in vivo. *Hippocampus*. 2009;19:677-86.
- Wisniewski KE, Dalton AJ, McLachlan C, Wen GY, Wisniewski HM. Alzheimer's disease in Down's syndrome: clinicopathologic studies. *Neurology*. 1985 Jul;35(7):957-61.
- Wouters L, Göhlmann HW, Bijmens L, Kass SU, Molenberghs G, Lewi PJ. Graphical exploration of gene expression data: a comparative study of three multivariate methods. *Biometrics*. 2003;59(4):1131-9.
- Wu JI, Lessard J, Olave IA, Qiu Z, Ghosh A, Graef IA, Crabtree GR. Regulation of dendritic development by neuron-specific chromatin remodeling complexes. *Neuron*. 2007 Oct 4;56(1):94-108.
- Wu JI, Lessard J, Crabtree GR. Understanding the words of chromatin regulation. *Cell*. 2009 Jan 23;136(2):200-6.
- Xiao J, Perry G, Troncoso J, Monteiro MJ. alpha-calcium-calmodulin-dependent kinase II is associated with paired helical filaments of Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1996;55:954-63.
- Xin Y, Chanrion B, Liu MM, Galfalvy H, Costa R, Ilievski B, Rosoklija G, Arango V, Dwork AJ, Mann JJ, Tycko B, Haghghi F. Genome-wide divergence of DNA methylation marks in cerebral and cerebellar cortices. *PLoS One*. 2010 Jun 28;5(6):e11357.
- Yagami T, Takahara Y, Ishibashi C, Sakaguchi G, et al. Amyloid beta protein impairs motor function via thromboxane A2 in the rat striatum. *Neurobiol Dis*. 2004;16:481-9.
- Yamamoto-Sasaki M, Ozawa H, Saito T, Rösler M, Riederer P. Impaired phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein in the hippocampus of dementia of the Alzheimer type. *Brain Res*. 1999 Apr 10;824(2):300-3.
- Yang XJ, Seto E. HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene*. 2007 Aug 13;26(37):5310-8.
- Yang Y, Ogawa Y, Hedstrom KL, Rasband MN. betaIV spectrin is recruited to axon initial segments and nodes of Ranvier by ankyrinG. *J Cell Biol*. 2007;176:509-19.
- Yankner BA, Duffy LK, Kirschner. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid β protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* 250 (1990) 2279-2282.

Yeo G, Holste D, Kreiman G, Burge CB. Variation in alternative splicing across human tissues. *Genome Biol.* 2004;5(10):R74.

Yoon HG, Chan DW, Reynolds AB, Qin J, Wong J. N-CoR mediates DNA methylation-dependent repression through a methyl CpG binding protein Kaiso. *Mol Cell.* 2003 Sep;12(3):723-34.

Yoshikai S, Sasaki H, Doh-ura K, Furuya H, Sakaki Y. Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene. *Gene.* 1990 Mar 15;87(2):257-63.

Yun M, Wu J, Workman JL, Li B. Readers of histone modifications. *Cell Res.* 2011 Apr;21(4):564-78.

Zeilinger S, Kühnel B, Klopp N, Baurecht H, Kleinschmidt A, Gieger C, Weidinger S, Lattka E, Adamski J, Peters A, Strauch K, Waldenberger M, Illig T. Tobacco smoking leads to extensive genome-wide changes in DNA methylation. *PLoS One.* 2013 May 17;8(5):e63812.

Zemach A, McDaniel IE, Silva P, Zilberman D. Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science.* 2010 May 14;328(5980):916-9.

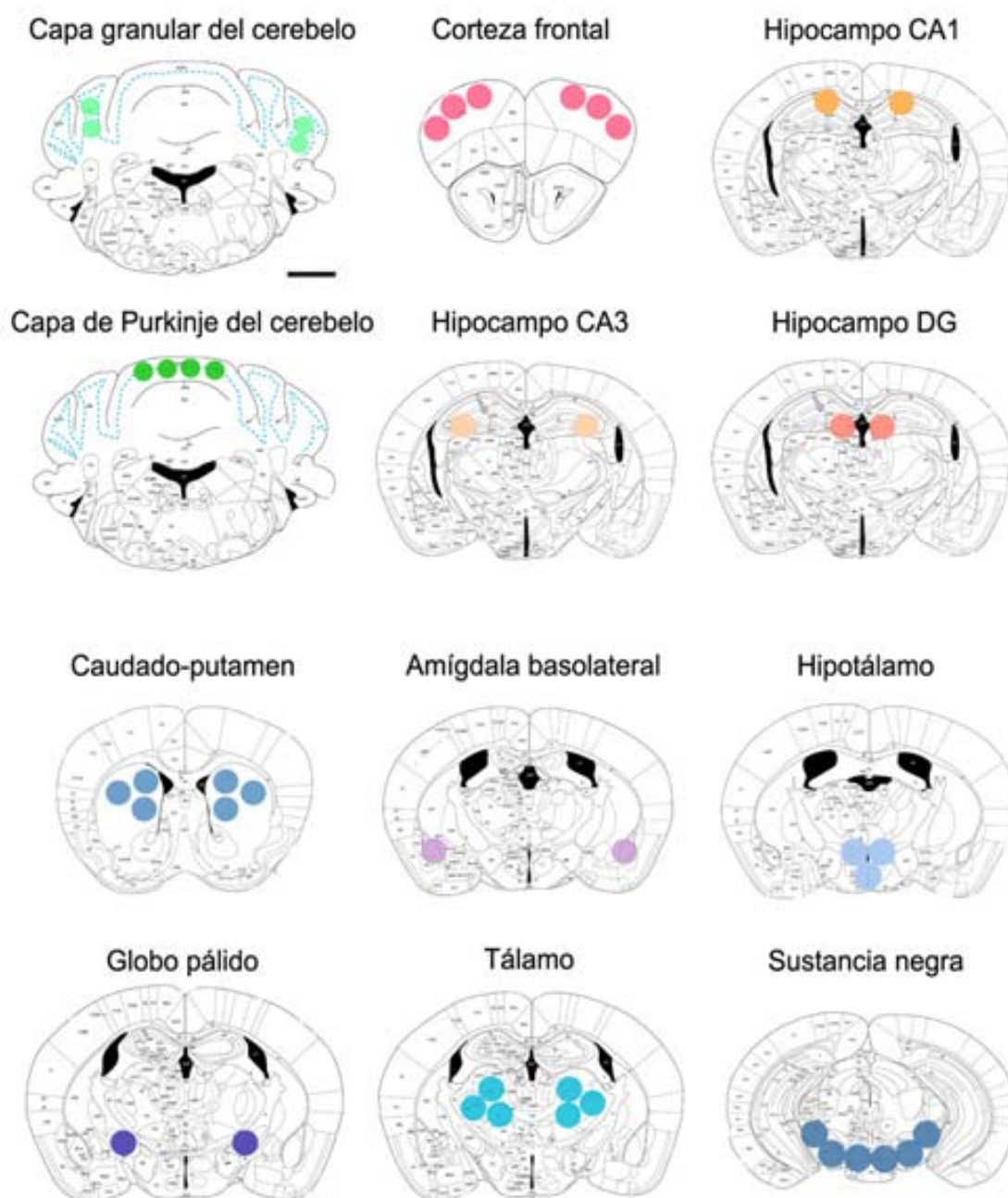
Zhang R, Lu J, Kong X, Jin L, Luo C. Targeting epigenetics in nervous system disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2013 Feb 1;12(1):126-41.

Zhou D, Lambert S, Malen PL, Carpenter S, et al. AnkyrinG is required for clustering of voltage-gated Na channels at axon initial segments and for normal action potential firing. *J Cell Biol.* 1998;143:1295-304.

Zovkic IB, Guzman-Karlsson MC, Sweatt JD. Epigenetic regulation of memory formation and maintenance. *Learn Mem.* 2013 Jan 15;20(2):61-74.

Anexos

Anexo 1. Representación de las regiones analizadas con el *5mC-mouse-array*.



Anexo 2. Relación de muestras humanas utilizadas para cada uno de los estudios.

Muestra	Estado	Región	Estadio Braak	PMI (h)	Edad	Sexo
CONT_1	Normal	Corteza frontal	I	5	78	M
CONT_2	Normal	Corteza frontal	0	13.5	37	H
CONT_3	Control	Corteza frontal	IIA	5	83	H
CONT_4	Normal	Corteza frontal	I	6	79	M
CONT_5	Normal	Corteza frontal	0	14	70	H
CONT_6	Normal	Corteza frontal	I	13	68	H
CONT_7	Normal	Corteza frontal	II	4.5	84	H
CONT_8	Normal	Corteza frontal	0	14.25	46	H
CONT_9	Normal	Corteza frontal	0	4.5	84	H
CONT_10	Normal	Corteza frontal	I	14	78	H
CONT_11	Normal	Corteza frontal	II	5.5	83	H
CONT_12	Normal	Corteza frontal	II	6.5	89	H
CONT_13	Normal	Corteza frontal	II	15	79	H
CONT_14	Normal	Corteza frontal	0	4.25	64	M
CONT_15	Normal	Corteza frontal	I	15.75	73	H
CONT_16	Normal	Corteza frontal	I	14.75	67	M
CONT_17	Normal	Corteza frontal	0	10.75	58	M
CONT_18	Normal	Corteza frontal	I	9.75	63	M
CONT_19	Normal	Corteza frontal	0	8.5	55	M
CONT_20	Normal	Corteza frontal	0	7	81	H
AD_1	Alzheimer	Corteza frontal	VI C	5.5	75	H
AD_2	Alzheimer	Corteza frontal	V C	7.75	92	M
AD_3	Alzheimer	Corteza frontal	VI C	6	79	M
AD_4	Alzheimer	Corteza frontal	V C	6.5	84	H
AD_5	Alzheimer	Corteza frontal	V C	7.5	94	H
AD_6	Alzheimer	Corteza frontal	V C	8	60	M
AD_7	Alzheimer	Corteza frontal	V C	9.25	78	H
AD_8	Alzheimer	Corteza frontal	VI C	13.75	63	H
AD_9	Alzheimer	Corteza frontal	V C	16.25	85	H
AD_10	Alzheimer	Corteza frontal	V C	16	77	M
AD_11	Alzheimer	Corteza frontal	VI C	4	98	H
AD_12	Alzheimer	Corteza frontal	VI C	5	75	M
AD_13	Alzheimer	Corteza frontal	V C	8.5	84	H
AD_14	Alzheimer	Corteza frontal	V C	7	87	M
AD_15	Alzheimer	Corteza frontal	VI C	5.5	88	H
AD_16	Alzheimer	Corteza frontal	VI C	6	79	H
AD_17	Alzheimer	Corteza frontal	V C	6.25	87	H
AD_18	Alzheimer	Corteza frontal	VI C	5.5	97	H
AD_19	Alzheimer	Corteza frontal	V C	4.75	92	H
AD_20	Alzheimer	Corteza frontal	VI C	8	67	H

Muestra	Estado	Región	Estadio Braak	PMI (h)	Edad	Sexo
CONT_1	Normal	Hipocampo		7:00	69	H
CONT_2	Normal	Hipocampo	II	3:30	81	H
CONT_3	Normal	Hipocampo		2:15	64	H
CONT_4	Normal	Hipocampo		8:05	63	M
CONT_5	Normal	Hipocampo	I	3:35	79	M
CONT_6	Normal	Hipocampo		5:20	67	H
CONT_7	Normal	Hipocampo		5:00	64	H
CONT_8	Normal	Hipocampo		8:30	53	M
CONT_9	Normal	Hipocampo	I	9:55	75	M
CONT_10	Normal	Hipocampo		4:35	64	M
CONT_11	Normal	Hipocampo		9:25	52	M
CONT_12	Normal	Hipocampo		11:40	64	M
CONT_13	Normal	Hipocampo		6:00	41	M
CONT_14	Normal	Hipocampo	I	3:05	66	M
CONT_15	Normal	Hipocampo		10:45	58	M
CONT_16	Normal	Hipocampo		2:45	55	M
CONT_17	Normal	Hipocampo		9:25	49	M
CONT_18	Normal	Hipocampo		8:10	60	M
CONT_19	Normal	Hipocampo	II	15:45	83	M
CONT_20	Normal	Hipocampo		14:40	67	H
CONT_21	Normal	Hipocampo		3:05	66	M
CONT_22	Normal	Hipocampo		8:10	60	H
CONT_23	Normal	Hipocampo		7:00	81	H
CONT_24	Normal	Hipocampo		15:45	73	H
CONT_25	Normal	Hipocampo		9:00	52	H
AD_1	Alzheimer	Hipocampo	VI	18:00	60	M
AD_2	Alzheimer	Hipocampo	V	19:15	78	H
AD_3	Alzheimer	Hipocampo	V	16:15	85	H
AD_4	Alzheimer	Hipocampo	V	5:30	74	H
AD_5	Alzheimer	Hipocampo	V	5:15	81	H
AD_6	Alzheimer	Hipocampo	V	11:30	75	M
AD_7	Alzheimer	Hipocampo	V	13:50	63	H
AD_8	Alzheimer	Hipocampo	V	3:45	82	M
AD_9	Alzheimer	Hipocampo	VI	16:00	77	M
AD_10	Alzheimer	Hipocampo	V	8:00	67	H
AD_11	Alzheimer	Hipocampo	V	7:20	78	M
AD_12	Alzheimer	Hipocampo	VI	5:00	79	M
AD_13	Alzheimer	Hipocampo	V	6:00	79	H
AD_14	Alzheimer	Hipocampo	V	4:30	79	H
AD_15	Alzheimer	Hipocampo	VI	5:00	83	M
AD_16	Alzheimer	Hipocampo	V	5:00	84	H
AD_17	Alzheimer	Hipocampo	V	8:30	84	H
AD_18	Alzheimer	Hipocampo	V	5:30	75	H
AD_19	Alzheimer	Hipocampo	IV	6:40	79	M
AD_20	Alzheimer	Hipocampo	V	5:00	88	H
AD_21	Alzheimer	Hipocampo	VI	3:00	81	M
AD_22	Alzheimer	Hipocampo	V	5:00	83	M
AD_23	Alzheimer	Hipocampo	V	5:00	84	M
AD_24	Alzheimer	Hipocampo	VI	5:30	97	M
AD_25	Alzheimer	Hipocampo	V	5:00	82	M

Anexo 3. Lista de cebadores para la pirosecuenciación utilizada en los diferentes estudios.

Especie	Gen	Técnica	Cebador	Secuencia	CpGs
Ratón	ADRA1B	Pyrosequencing	Forward	TGTTAGTTGGTTGAAGTTAAGATGA	
Ratón	ADRA1B	Pyrosequencing	Reverse	[Btn]CCACATCCCACAAAATTACA	
Ratón	ADRA1B	Pyrosequencing	Sequencer	GGTTGAAGTTAAGATGAATTTATT	2
Ratón	BDKRB1	Pyrosequencing	Forward	TGGGTTTGGTTTTTATATTTTTTGTAA	
Ratón	BDKRB1	Pyrosequencing	Reverse	[Btn]ACACAACAAATCCCAACTT	
Ratón	BDKRB1	Pyrosequencing	Sequencer	GTTAGTAGGTTTTTTAATATTAT	3
Ratón	CACNA1D	Pyrosequencing	Forward	GGGTGTTGGAGTGGTTTGTAG	
Ratón	CACNA1D	Pyrosequencing	Reverse	[Btn]AAAAACCTCCTCACTCTACC	
Ratón	CACNA1D	Pyrosequencing	Sequencer	TTTGTAGTATAGGAGATAGTAAT	2
Ratón	CALCR	Pyrosequencing	Forward	ATAGGAGGTGGAGGATAGT	
Ratón	CALCR	Pyrosequencing	Reverse	[Btn]ACAATTCCTCTCCACTA	
Ratón	CALCR	Pyrosequencing	Sequencer	ATTGTTTTTTTTTAGGGTG	4
Ratón	F2RL2	Pyrosequencing	Forward	GGTTTGATGAAGATATTGTATAGG	
Ratón	F2RL2	Pyrosequencing	Reverse	[btn]ATCCCTATACAAAACCTAAC	
Ratón	F2RL2	Pyrosequencing	Sequencer	ATGGAATTTGTGTTTGT	3
Ratón	GABBR2	Pyrosequencing	Forward	[btn]GGAAGGGGTGGGAGTTAG	
Ratón	GABBR2	Pyrosequencing	Reverse	CTACCCCTCCCTCCCTAAC	
Ratón	GABBR2	Pyrosequencing	Sequencer	CCCCCTCCCTCCCTAAC	4
Ratón	GRIN2A	Pyrosequencing	Forward	GGTGTGTTGGGTTATAGT	
Ratón	GRIN2A	Pyrosequencing	Reverse	[Btn]AACATCTAAACCACAACCTCTAAT	
Ratón	GRIN2A	Pyrosequencing	Sequencer	GTGTTGTTGGGTTATAGTTA	8
Ratón	KCNIP1	Pyrosequencing	Forward	AGGGGAAAGATAGAGTGGAAGA	
Ratón	KCNIP1	Pyrosequencing	Reverse	[Btn]CCCAAACCTTACTAACAATCTTACCTACAT	
Ratón	KCNIP1	Pyrosequencing	Sequencer	AGATAGAGTGGAAGAGA	3
Ratón	PTHR1	Pyrosequencing	Forward	AGAGAAAGGGGAAATTTGTT	
Ratón	PTHR1	Pyrosequencing	Reverse	[Btn]CCCAAACCTACCAATATTCTAAAATCTTAA	
Ratón	PTHR1	Pyrosequencing	Sequencer	GGGAATTTGTTTAGTAAGG	3
Ratón	SORBS3	Pyrosequencing	Forward	[btn]TGGTTAGATAGAGGTAGGATAGT	
Ratón	SORBS3	Pyrosequencing	Reverse	ACACCCRTCTATCTTTCTATAACCTATT	
Ratón	SORBS3	Pyrosequencing	Sequencer	AAATATAAAAAAAAAACCAATTT	3
Ratón	SPBN4	Pyrosequencing	Forward	[btn]ATTTGAATAGTATTATAGGATGGAATAGTG	
Ratón	SPBN4	Pyrosequencing	Reverse	AACATCAACTAAAATTCCTTTTATATCTTA	
Ratón	SPBN4	Pyrosequencing	Sequencer	ACCTAAACAACATAATACATT	2
Ratón	TBX1	Pyrosequencing	Forward	GGGGAGTTAGTAAGTTTAAGATT	
Ratón	TBX1	Pyrosequencing	Reverse	[Btn]ACTCCTCACTCCCTATCTATTA	
Ratón	TBX1	Pyrosequencing	Sequencer	GGTTGTTAGGTTGTTAGAGA	5
Ratón	TBXA2R	Pyrosequencing	Forward	AGAGTAGGTAGAAAGATAGATGGAGATAG	
Ratón	TBXA2R	Pyrosequencing	Reverse	[btn]ACCCCAACAAAACCTAA	
Ratón	TBXA2R	Pyrosequencing	Sequencer	AAAGATAGATGGAGATAGG	3
Ratón	USH1G	Pyrosequencing	Forward	TTTAGGTTGTTATGGTAGGTAGTT	
Ratón	USH1G	Pyrosequencing	Reverse	[btn]TCCCTCAACCTCATACTC	
Ratón	USH1G	Pyrosequencing	Sequencer	ATGGTAGGTAGTTTAGAGA	3
Humano	F2RL2	Pyrosequencing	Forward	GGGTTTTATTTGATGATTTG	
Humano	F2RL2	Pyrosequencing	Reverse	[Btn]AAAATTAATACCTTCTCCAAAAA	
Humano	F2RL2	Pyrosequencing	Sequencer	AGGGTTTTATTTGATGAT	2
Humano	SPTBN4	Pyrosequencing	Forward	GTTTGGTTTTGAGTTTTTTATTTGTGTG	
Humano	SPTBN4	Pyrosequencing	Reverse	[Btn]AAAAAAACAATCCTCCATAAATATCAAC	
Humano	SPTBN4	Pyrosequencing	Sequencer	TTTTAGTTTTAATTAAGA	3
Humano	SORBS3	Pyrosequencing	Forward	GGGTTYGGAGTAG	
Humano	SORBS3	Pyrosequencing	Reverse	[btn]CTAAAACAACCCCTTCT	
Humano	SORBS3	Pyrosequencing	Sequencer	GGTYGGGTGAGTGGGAGA	2
Humano	TBXA2R	Pyrosequencing	Forward	GGGTTTGGTTGATTTGGAGTT	
Humano	TBXA2R	Pyrosequencing	Reverse	[btn]TCCCTACCACCATAACCTAAAAATCC	
Humano	TBXA2R	Pyrosequencing	Sequencer	ATATTTATAGTTTTTTGGGGAA	2
Humano	DUSP22	Pyrosequencing	Forward	AGAAAATTTAGGTAGGGGAGTTTTTAGAG	
Humano	DUSP22	Pyrosequencing	Reverse	[btn]TCCAAAATCCCTTTAACCTTT	
Humano	DUSP22	Pyrosequencing	Sequencer	GAGATTAGGTTTTTGATTAGTA	3

Anexo 4. Lista de cebadores utilizados para las PCRs cuantitativas realizadas en los diferentes estudios.

Especie	Gen	Técnica	Cebador	Secuencia
Ratón	ADRA1B	qRT-PCR	Forward	ACCAAGGCCAAGGGCCACAAC
Ratón	ADRA1B	qRT-PCR	Reverse	TTGAATACGGCGTCCGGGGG
Ratón	F2RL2	qRT-PCR	Forward	TTCTGCCAGTCACTGTTTGC
Ratón	F2RL2	qRT-PCR	Reverse	CTCTGTCCAGCCCTCTATG
Ratón	GABBR2	qRT-PCR	Forward	GGAAGAAaGTCACCATGCAG
Ratón	GABBR2	qRT-PCR	Reverse	AGTTgCCCAaGcTGAGGATG
Ratón	GRIN2A	qRT-PCR	Forward	TCTATGACGCAGCtGTCTTGAAct
Ratón	GRIN2A	qRT-PCR	Reverse	TGTGGTgGCAAAGATGTACCCGCT
Ratón	GUSB	qRT-PCR	Forward	ACTGACACCTCCATGTATCCCAAG
Ratón	GUSB	qRT-PCR	Reverse	CAGTGGTCACCAGCCCGATG
Ratón	RPL38	qRT-PCR	Forward	AGGATGCCAAGTCTGTCAAGA
Ratón	RPL38	qRT-PCR	Reverse	TCCTTGTCTGTGATAACCAGGG
Ratón	SORBS3	qRT-PCR	Forward	GGAATCGGGCCCGTGGATG
Ratón	SORBS3	qRT-PCR	Reverse	GCGCGTGGGAAACCACTTT
Ratón	SPBN4	qRT-PCR	Forward	AGGTGTTGGAGGTGGACAAG
Ratón	SPBN4	qRT-PCR	Reverse	CAGTTTGCTTTGGATGCTGA
Ratón	TBP	qRT-PCR	Forward	CCCCACAActCTTCCATTCT
Ratón	TBP	qRT-PCR	Reverse	GCAGGAGTGATAGGGGTCAT
Ratón	TBXA2R	qRT-PCR	Forward	CGGTGACGTGGTCTTCGGGC
Ratón	TBXA2R	qRT-PCR	Reverse	CTCGCGGTGTGGTAGACCC
Ratón	USH1G	qRT-PCR	Forward	ACGAGGATGGCATGACCCCGA
Ratón	USH1G	qRT-PCR	Reverse	TGTTGGCCCCGAAGGAGACGA
Humano	GUSB	qRT-PCR	Forward	CTCATTTGGAATTTTCCGATT
Humano	GUSB	qRT-PCR	Reverse	CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA
Humano	RPL38	qRT-PCR	Forward	TGGGTGAGAAAGGTCCTGGTCCG
Humano	RPL38	qRT-PCR	Reverse	CGTCGGGCTGTGAGCAGGAA
Humano	TBXA2R	qRT-PCR	Forward	ATGGTGGTGGCCAGCGTGTG
Humano	TBXA2R	qRT-PCR	Reverse	GGCTCATGGCAGGCGGGTTT
Humano	F2RL2	qRT-PCR	Forward	GCCGGGCCACCACAGTCATC
Humano	F2RL2	qRT-PCR	Reverse	GGCAGGCCCCGGTAGGTGAA
Humano	SPTBN4	qRT-PCR	Forward	TTTGAGCATGTCTCGGTGCT
Humano	SPTBN4	qRT-PCR	Reverse	TCCACCATCTGGTTCACAGC
Humano	SORBS3	qRT-PCR	Forward	GCTAATTATGTGGAGGTGCTG
Humano	SORBS3	qRT-PCR	Reverse	TCCCCCTTGAAGGTGTACTG
Humano	DUSP22	qRT-PCR	Forward	CTCGTGATTGCTTCTGTGA
Humano	DUSP22	qRT-PCR	Reverse	AGAGCTTTCGGTCAATTCCA
Humano	SST	qRT-PCR	Forward	AGCAGGAACTGGCCAAGTACT
Humano	SST	qRT-PCR	Reverse	AGGTTCCAGGGCATCATTCTC
Humano	NR4A2	qRT-PCR	Forward	CAAGGAACCCAAGAGAGTGG
Humano	NR4A2	qRT-PCR	Reverse	TGTGTGCAAAGGGTACGAAG
Humano	CFOS	qRT-PCR	Forward	CTGCTGAAGGAGAAGGAAAACTAG
Humano	CFOS	qRT-PCR	Reverse	TCAAGGGAAGCCACAGACATC

Anexo 5. Lista de sondas incluidas en el *5mC-mouse-array* con su descripción.

Gen	Sonda	CpGs	TSS	CGI	Descripción
5730403B10Rik	chr16:4790252-4790373	10	66	SI	RIKEN cDNA 5730403B10 gene
Accn1	chr11:81781648-81781748	2	-190	NO	amiloride-sensitive cation channel 1, neuronal (degenerin)
Aco2	chr15:81702806-81702927	9	26	SI	aconitase 2, mitochondrial
Adam23	chr1:63492238-63492359	6	179	NO	a disintegrin and metalloproteinase domain 23
Adcy9	chr16:4420756-4420877	3	318	NO	adenylate cyclase 9
Adcyap1r1	chr6:55401990-55402111	12	-77	SI	adenylate cyclase activating polypeptide 1 receptor 1
Adora1	chr1:136131895-136132016	10	-49	NO	adenosine A1 receptor
Adora2a	chr10:74779747-74779868	16	-120	SI	adenosine A2a receptor
Adora2b	chr11:62062445-62062566	13	-20	SI	adenosine A2b receptor
Adra1a	chr14:67254029-67254150	9	5	SI	adrenergic receptor, alpha 1a
Adra1b	chr11:43714486-43714607	3	-166	NO	adrenergic receptor, alpha 1b
Adra1d	chr2:131388161-131388282	13	200	SI	adrenergic receptor, alpha 1d
Adra2a	chr19:54119269-54119390	7	342	SI	adrenergic receptor, alpha 2a
Adra2b	chr2:127188293-127188414	5	668	NO	adrenergic receptor, alpha 2b
Adra2c	chr5:35621059-35621180	4	95	NO	adrenergic receptor, alpha 2c
Adrb1	chr19:56796568-56796689	16	233	SI	adrenergic receptor, beta 1
Adrb2	chr18:62339505-62339626	8	-48	SI	adrenergic receptor, beta 2
Adrb3	chr8:28340227-28340348	2	227	NO	adrenergic receptor, beta 3
Afg3l2	chr18:67608585-67608706	15	-145	SI	AFG3(ATPase family gene 3)-like 2 (yeast)
Agtr1a	chr13:30428095-30428216	7	69	NO	angiotensin II receptor, type 1a
Agtr1b	chr3:20265917-20266038	7	-122	NO	angiotensin II receptor, type 1b
Alms1	chr6:85537318-85537439	4	146	NO	Alstrom syndrome 1 homolog (human)
Amigo1	chr3:107988830-107988951	7	362	NO	adhesion molecule with Ig like domain 1
Aplnr	chr2:84976555-84976676	4	-99	NO	Apelin receptor
Atp2b2	chr6:113992147-113992268	7	133	SI	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 2
Atp6v1b1	chr6:83692538-83692659	1	412	NO	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V1 subunit B1
Auts2	chr5:133018400-133018521	5	247	SI	autism susceptibility candidate 2
Avpr1a	chr10:121885296-121885417	8	198	SI	arginine vasopressin receptor 1A
Avpr1b	chr1:133495324-133495445	1	306	NO	arginine vasopressin receptor 1B
Avpr2	chrX:71137057-71137178	5	63	NO	arginine vasopressin receptor 2
Axin1	chr17:26275295-26275416	9	275	NO	axin 1
Barhl1	chr2:28772565-28772686	1	665	NO	BarH-like 1 (Drosophila)
Bdkrb1	chr12:106842435-106842550	4	-195	NO	bradykinin receptor, beta 1
Bdkrb2	chr12:106801064-106801185	6	257	NO	bradykinin receptor, beta 2
Bdnf	chr2:109514106-109514195	4	722	SI	brain derived neurotrophic factor
Bok	chr1:95582431-95582520	10	-221	SI	BCL2-related ovarian killer protein
Brs3	chrX:54296245-54296366	4	-55	NO	bombesin-like receptor 3
Bsnd	chr4:106165185-106165306	2	397	NO	Bartter syndrome, infantile, with sensorineural deafness (Barttin)
C5ar1	chr7:16844350-16844435	3	-277	NO	complement component 5a receptor 1
Cacna1d	chr14:31304783-31304904	2	501	NO	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit
Calcr	chr6:3714463-3714570	5	-190	NO	calcitonin receptor
Calcr1	chr2:84265319-84265440	5	-44	NO	calcitonin receptor-like
Calm1	chr12:101437797-101437918	11	-107	SI	calmodulin 1
Camk2a	chr18:61085278-61085399	6	-53	NO	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha
Casp3	chr8:47702359-47702480	8	341	SI	caspase 3
Cckar	chr5:54099247-54099368	3	364	NO	cholecystokinin A receptor
Cckbr	chr7:112573861-112573982	4	412	NO	cholecystokinin B receptor
Cdh23	chr10:60159301-60159422	2	123	NO	cadherin 23 (otocadherin)
Cdk5	chr5:23929701-23929822	6	413	SI	cyclin-dependent kinase 5
Cdk5r1	chr11:80289898-80290019	3	589	NO	cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35)
Cdkn1b	chr6:134869937-134870058	8	421	SI	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
Cdkn2d	chr9:21095695-21095816	9	102	SI	cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits CDK4)
Chd7	chr4:8616845-8616966	3	647	NO	chromodomain helicase DNA binding protein 7
Chrm1	chr19:8738449-8738570	2	-15	NO	cholinergic receptor, muscarinic 1, CNS
Chrm2	chr6:36338131-36338252	8	-108	SI	cholinergic receptor, muscarinic 2, cardiac
Chrm3	chr13:10360325-10360446	7	336	SI	cholinergic receptor, muscarinic 3, cardiac
Chrm4	chr2:91766970-91767091	4	375	NO	cholinergic receptor, muscarinic 4
Chrm5	chr2:112320755-112320876	3	-159	NO	cholinergic receptor, muscarinic 5
Chrna10	chr7:109264979-109265100	2	-188	NO	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 10
Chrna9	chr5:66358369-66358490	4	-67	NO	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 9
Chrn2	chr3:89568282-89568403	12	-212	NO	cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 2 (neuronal)
Clic5	chr17:44325627-44325748	3	-167	SI	chloride intracellular channel 5
Cnp	chr11:100436181-100436302	14	11	SI	2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase
Cnr1	chr4:34011138-34011259	12	408	SI	cannabinoid receptor 1 (brain)
Cnr2	chr4:135450962-135451083	2	296	NO	cannabinoid receptor 2 (macrophage)
Cntn5	chr9:10904685-10904806	5	-30	NO	contactin 5
Col11a2	chr17:34175631-34175721	5	721	SI	collagen, type XI, alpha 2
Crhr1	chr11:103993445-103993531	5	725	NO	corticotropin releasing hormone receptor 1
Crhr2	chr6:55083449-55083570	1	543	NO	corticotropin releasing hormone receptor 2
Ctsg	chr14:56721419-56721540	4	68	NO	cathepsin G

Cysl1r1	chrX:103798748-103798869	3	7	NO	cysteinyl leukotriene receptor 1
Cysl1r2	chr14:73449242-73449363	1	381	NO	cysteinyl leukotriene receptor 2
Dek	chr13:47202141-47202229	1	579	NO	DEK oncogene (DNA binding)
Dfna5	chr6:50211830-50211951	7	-26	NO	Non-syndromic hearing impairment protein 5 homolog
Dld	chr12:32036632-32036753	3	390	NO	dihydroliipoamide dehydrogenase
Drd1a	chr13:54151048-54151169	10	81	SI	dopamine receptor D1A
Drd2	chr9:49148817-49148938	7	-111	SI	dopamine receptor D2
Drd3	chr16:43762390-43762511	4	-96	NO	dopamine receptor D3
Drd4	chr7:148477858-148477979	8	-14	SI	dopamine receptor D4
Drd5	chr5:38710884-38710997	11	-197	SI	dopamine receptor D5
Dusp5	chr19:53603562-53603683	13	185	SI	dual specificity phosphatase 5
Dusp6	chr10:98725482-98725603	7	322	SI	dual specificity phosphatase 6
S1pr1	chr3:115417733-115417854	7	-180	SI	Sphingosine 1-phosphate receptor 1
S1pr3	chr13:51504146-51504267	7	-220	SI	Sphingosine 1-phosphate receptor 3
Lpar2	chr8:72346395-72346516	7	8	SI	Endothelial differentiation, lysophosphatidic acid G-protein-coupled receptor 4
S1pr2	chr9:20781081-20781202	7	-96	SI	Sphingosine 1-phosphate receptor 2
Lpar3	chr3:145883356-145883477	2	508	NO	Lysophosphatidic acid receptor 3
S1pr5	chr9:21050592-21050713	4	-1080	NO	Sphingosine 1-phosphate receptor 5
Ednra	chr8:80248235-80248356	7	-56	SI	endothelin receptor type A
Ednrb	chr14:104243442-104243563	4	112	SI	endothelin receptor type B
Egr2	chr10:67000377-67000498	11	179	SI	early growth response 2
Eif2ak3	chr6:70794090-70794211	5	370	SI	eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 3
Erb2	chr11:98273927-98274047	9	-190	SI	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2,
Ercc2	chr7:19967081-19967202	5	246	SI	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2
F2	chr2:91476696-91476817	2	185	NO	coagulation factor II
F2r	chr13:96388961-96389082	4	633	NO	coagulation factor II (thrombin) receptor
F2rl1	chr13:96295264-96295385	9	129	SI	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1
F2rl2	chr13:96466449-96466570	4	365	NO	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 2
F2rl3	chr8:75285639-75285760	3	79	NO	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 3
Fbxo11	chr17:88465276-88465375	11	689	SI	F-box protein 11
Fbxw7	chr3:84755991-84756112	5	81	NO	F-box and WD-40 domain protein 7
Foxp2	chr6:14850711-14850832	5	577	SI	forkhead box P2
Fshb	chr2:106899863-106899984	2	115	NO	follicle stimulating hormone beta
Fshr	chr17:89600596-89600717	2	641	NO	follicle stimulating hormone receptor
Gabbr1	chr17:37182522-37182643	2	328	NO	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 1
Gabbr2	chr4:47004599-47004720	16	73	SI	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 2
Gabra1	chr11:41996500-41996621	5	128	SI	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit alpha 1
Gabra2	chr5:71487266-71487387	12	238	SI	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit alpha 2
Gabra4	chr5:72049387-72049508	4	-100	SI	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit alpha 4
Gabra5	chr7:64765353-64765474	12	-16	SI	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit alpha 5
Gabra6	chr11:42134550-42134671	2	57	NO	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit alpha 6
Gabrb1	chr5:72091132-72091253	6	62	NO	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit beta 1
Gabrb2	chr11:42233419-42233508	3	-221	NO	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit beta 2
Gabrb3	chr7:64845939-64846060	4	-96	SI	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit beta 3
Gabrd	chr4:154772054-154772175	13	-64	SI	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit delta
Gabre	chrX:69520017-69520138	7	17	SI	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit epsilon
Gabrg1	chr5:71234171-71234292	5	375	NO	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit gamma 1
Gabrg2	chr11:41813983-41814104	2	-137	NO	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit gamma 2
Gabrg3	chr7:64642157-64642278	11	-24	SI	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit gamma 3
Gabrp	chr11:33478735-33478856	1	-162	NO	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, pi
Gabrq	chrX:70070628-70070749	7	86	SI	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit theta
Gabbr1	chr4:33219448-33219569	5	22	NO	gamma-aminobutyric acid (GABA) C receptor, subunit rho 1
Gal3st1	chr11:3883808-3883929	5	-230	NO	galactose-3-O-sulfotransferase 1
Galr1	chr18:82576278-82576399	4	169	NO	galanin receptor 1
Galr2	chr11:116141820-116141941	2	372	NO	galanin receptor 2
Galr3	chr15:78871585-78871706	4	669	NO	Galanin receptor type 3
Gap43	chr16:42341036-42341157	1	332	NO	growth associated protein 43
Gapdh	chr6:125115773-125115894	5	232	SI	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Gcgr	chr11:120391666-120391787	6	314	NO	glucagon receptor
Gfap	chr11:102758295-102758416	9	-159	SI	glial fibrillary acidic protein
Gh	chr11:106162912-106163033	2	-152	NO	growth hormone
Ghr	chr15:3533331-3533452	13	161	SI	growth hormone receptor
Ghrhr	chr6:55326215-55326336	2	13	NO	growth hormone releasing hormone receptor
Ghsr	chr3:27270285-27270406	8	-73	SI	growth hormone secretagogue receptor
Gje1	chr5:138403997-138404118	3	130	NO	gap junction protein, epsilon 1
Glp1r	chr17:31038974-31039061	2	-223	NO	glucagon-like peptide 1 receptor
Glp2r	chr11:67584411-67584532	6	-184	SI	glucagon-like peptide 2 receptor
Gira1	chr11:55421720-55421841	9	488	SI	glycine receptor, alpha 1 subunit
Gira2	chrX:161764774-161764895	2	-79	NO	glycine receptor, alpha 2 subunit
Gira3	chr8:58419621-58419742	4	-60	NO	glycine receptor, alpha 3 subunit
Glr3	chr3:8017296-8017414	17	-190	SI	glycine receptor, beta subunit
Gm98	chr19:10293625-10293746	1	67	NO	predicted gene 98
Gnpat	chr8:127386752-127386873	12	120	SI	glyceronephosphate O-acyltransferase

Got1	chr19:43599188-43599309	5	153	SI	glutamate oxaloacetate transaminase 1, soluble
Gpr156	chr16:37916237-37916358	6	284	NO	G protein-coupled receptor 156
Gpr50	chrX:68916993-68917114	7	-112	SI	G-protein-coupled receptor 50
Gpr83	chr9:14664703-14664824	9	-66	SI	G protein-coupled receptor 83
Gpr98	chr13:81772343-81772464	5	260	SI	G protein-coupled receptor 98
Gpx1	chr9:108241683-108241804	11	-333	SI	glutathione peroxidase 1
Gria1	chr11:56825242-56825363	7	-110	NO	glutamate receptor, ionotropic, AMPA1 (alpha 1)
Gria2	chr3:80606980-80607101	5	327	SI	glutamate receptor, ionotropic, AMPA2 (alpha 2)
Gria3	chrX:38753767-38753888	5	203	NO	glutamate receptor, ionotropic, AMPA3 (alpha 3)
Gria4	chr9:4796104-4796225	3	-70	SI	glutamate receptor, ionotropic, AMPA4 (alpha 4)
Grid1	chr14:35633466-35633571	9	-205	SI	glutamate receptor, ionotropic, delta 1
Grid2	chr6:63206746-63206867	5	44	SI	glutamate receptor, ionotropic, delta 2
Grik1	chr16:88290238-88290340	3	-205	NO	glutamate receptor, ionotropic, kainate 1
Grik2	chr10:49508730-49508851	4	230	NO	glutamate receptor, ionotropic, kainate 2 (beta 2)
Grik3	chr4:125167324-125167431	7	704	SI	glutamate receptor, ionotropic, kainate 3
Grik4	chr9:42752398-42752519	10	4	SI	glutamate receptor, ionotropic, kainate 4
Grik5	chr7:25857842-25857963	12	514	SI	glutamate receptor, ionotropic, kainate 5 (gamma 2)
Grin1	chr2:25174319-25174440	8	-304	SI	glutamate receptor, ionotropic, NMDA1 (zeta 1)
Grin2a	chr16:9992383-9992504	10	-183	SI	glutamate receptor, ionotropic, NMDA2A (epsilon 1)
Grin2b	chr6:136123735-136123856	5	266	NO	glutamate receptor, ionotropic, NMDA2B (epsilon 2)
Grin2c	chr11:115128658-115128779	3	161	NO	glutamate receptor, ionotropic, NMDA2C (epsilon 3)
Grin2d	chr7:53122552-53122673	3	561	NO	glutamate receptor, ionotropic, NMDA2D (epsilon 4)
Grin3a	chr4:49858046-49858167	11	153	SI	glutamate receptor ionotropic, NMDA3A
Grin3b	chr10:79433476-79433597	6	-68	NO	glutamate receptor, ionotropic, NMDA3B
Grm1	chr10:10801994-10802115	5	-75	SI	glutamate receptor, metabotropic 1
Grm2	chr9:106558753-106558874	2	373	NO	glutamate receptor, metabotropic 2
Grm3	chr5:9725979-9726100	8	687	SI	glutamate receptor, metabotropic 3
Grm4	chr17:27649739-27649860	18	22	SI	glutamate receptor, metabotropic 4
Grm5	chr7:94732901-94733022	10	-284	SI	glutamate receptor, metabotropic 5
Grm7	chr6:110595265-110595386	3	266	NO	glutamate receptor, metabotropic 7
Grm8	chr6:28084536-28084657	4	227	SI	glutamate receptor, metabotropic 8
Grpr	chrX:159987783-159987904	3	264	NO	gastrin releasing peptide receptor
Hcctr1	chr4:129816695-129816816	5	349	SI	hypocretin (orexin) receptor 1
Hcctr2	chr9:76171254-76171375	6	-71	SI	hypocretin (orexin) receptor 2
Hes1	chr16:30065216-30065337	12	166	SI	hairy and enhancer of split 1 (Drosophila)
Hes3	chr4:151665521-151665614	1	-190	NO	hairy and enhancer of split 3 (Drosophila)
Hes5	chr4:154334809-154334930	15	162	SI	hairy and enhancer of split 5 (Drosophila)
Hexa	chr9:59387544-59387665	8	-131	SI	hexosaminidase A
Hexb	chr13:97968494-97968615	2	242	NO	hexosaminidase B
Hrh1	chr6:114347257-114347378	2	612	NO	histamine receptor H1
Hrh2	chr13:54287352-54287473	7	85	NO	histamine receptor H2
Hrh3	chr2:179839004-179839125	11	137	SI	histamine receptor H3
Hrh4	chr18:13164933-13165054	3	505	NO	histamine receptor H4
Hspa5	chr2:34627595-34627716	13	-46	SI	heat shock protein 5
Hspa8	chr9:40609310-40609431	8	-15	SI	heat shock protein 8
Htr1a	chr13:106233963-106234084	6	-251	SI	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A
Htr1b	chr9:81526125-81526246	8	26	SI	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B
Htr1d	chr4:135979365-135979486	5	13	NO	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1D
Htr1f	chr16:65105517-65105638	12	-33	SI	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1F
Htr2c	chrX:143396724-143396845	2	271	NO	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2C
Htr4	chr18:62483394-62483515	5	403	NO	5 hydroxytryptamine (serotonin) receptor 4
Htr5a	chr5:28168537-28168658	6	-111	SI	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 5A
Htr5b	chr1:123424792-123424893	6	-190	SI	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 5B
Htr6	chr4:138630846-138630967	6	202	SI	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 6
Htr7	chr19:36132202-36132323	9	412	SI	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 7
Icam5	chr9:20835783-20835896	11	646	SI	intercellular adhesion molecule 5, telencephalin
Id1	chr2:152561917-152562038	3	32	NO	inhibitor of DNA binding 1
Id2	chr12:25781304-25781425	8	407	SI	inhibitor of DNA binding 2
Id3	chr4:135699085-135699206	2	591	NO	inhibitor of DNA binding 3
Id4	chr13:48356045-48356150	2	706	NO	inhibitor of DNA binding 4
Ide	chr19:37412396-37412517	2	114	NO	insulin degrading enzyme
Ifig	chr10:117877845-117877966	3	197	NO	interferon gamma
Itn2b	chr14:73784828-73784940	11	-190	SI	integral membrane protein 2B
Jag2	chr12:114168222-114168343	6	576	SI	jagged 2
Jun	chr4:94718712-94718833	12	-141	SI	Jun oncogene
Kcnab2	chr4:151851973-151852094	13	445	SI	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 2
Kcnd2	chr6:21165851-21165972	2	197	NO	potassium voltage-gated channel, Shal-related family, member 2
Kcnp1	chr11:33893267-33893388	3	134	NO	Kv channel-interacting protein 1
Kcnq4	chr4:120420331-120420452	5	610	SI	potassium voltage-gated channel, subfamily Q, member 4
Kiss1r	chr10:79379580-79379701	14	75	SI	KISS1 receptor

Klk8	chr7:51052576-51052697	3	310	NO	kallikrein related-peptidase 8
L1cam	chrX:71126431-71126552	5	318	SI	L1 cell adhesion molecule
Lep	chr6:29010202-29010323	4	-42	NO	leptin
Lepr	chr4:101320448-101320569	12	120	SI	leptin receptor
Lgi4	chr7:31844203-31844316	1	698	NO	leucine-rich repeat LGI family, member 4
Lhb	chr7:52675903-52676024	2	352	NO	luteinizing hormone beta
Lhgr	chr17:89191277-89191398	10	21	SI	luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor
Lpar1	chr4:58565937-58566058	11	-168	SI	lysophosphatidic acid receptor 1
Lrp8	chr4:107474504-107474625	7	299	SI	low density lipoprotein receptor-related protein 8, apolipoprotein e receptor
Ltb4r1	chr14:56384628-56384749	1	110	NO	leukotriene B4 receptor 1
Ltb4r2	chr14:56380054-56380175	2	150	NO	leukotriene B4 receptor 2
Lypd1	chr1:127808976-127809097	6	245	SI	Ly6/Plaur domain containing 1
Mag	chr7:31699895-31700016	2	104	NO	myelin-associated glycoprotein
Mapk8ip1	chr2:92241586-92241707	3	226	NO	mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 1
Mas1	chr17:13061447-13061568	2	498	NO	MAS1 oncogene
Mbp	chr18:82644418-82644539	13	36	SI	myelin basic protein
Mc1r	chr8:125930801-125930922	2	120	NO	melanocortin 1 receptor
Mc3r	chr2:172073752-172073873	7	179	SI	melanocortin 3 receptor
Mc4r	chr18:67020431-67020552	4	365	NO	melanocortin 4 receptor
Mc5r	chr18:68497189-68497310	7	7	SI	melanocortin 5 receptor
Mchr1	chr15:81066127-81066248	8	-259	NO	melanin-concentrating hormone receptor 1
Mef2a	chr7:74518383-74518494	3	689	NO	myocyte enhancer factor 2A
Mkks	chr2:136717136-136717257	4	54	SI	McKusick-Kaufman syndrome protein
Mme	chr3:63099669-63099759	10	64	SI	membrane metallo endopeptidase
Mpv17	chr5:31456520-31456641	7	-83	NO	MpV17 mitochondrial inner membrane protein
Mtap1a	chr2:121114938-121115059	6	339	SI	microtubule-associated protein 1 A
Mtnr1a	chr8:46154253-46154374	9	250	SI	melatonin receptor 1A
Mtnr1b	chr9:15678700-15678821	5	-240	SI	melatonin receptor 1B
Myc	chr15:61816503-61816624	12	332	SI	myelocytomatosis oncogene
Myo15	chr11:60282507-60282628	2	273	NO	myosin XV
Myo5a	chr9:74918294-74918415	4	658	NO	myosin VA
Myo6	chr9:80012996-80013096	11	-216	SI	Unconventional myosin-VI
Myo7a	chr7:105268061-105268182	2	118	NO	myosin VIIA
Nab1	chr1:52557511-52557632	16	279	SI	Ngfi-A binding protein 1
Nab2	chr10:127104066-127104187	12	367	SI	Ngfi-A binding protein 2
Ncam1	chr9:49607170-49607291	4	56	SI	neural cell adhesion molecule 1
Nf1	chr11:79152850-79152971	12	483	SI	neurofibromatosis 1
Ngfr	chr11:95448769-95448890	7	-183	SI	nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)
Nkx6-2	chr7:146769251-146769372	2	615	NO	NK6 homeobox 2
Nmbr	chr10:14480250-14480344	3	-216	SI	neuromedin B receptor
Nmur1	chr1:88284476-88284597	8	-180	SI	neuromedin U receptor 1
Nmur2	chr11:55854350-55854471	4	-79	NO	neuromedin U receptor 2
Notch1	chr2:26359153-26359274	12	-129	SI	Notch gene homolog 1 (Drosophila)
Notch2	chr3:97817523-97817644	15	-123	SI	Notch gene homolog 2 (Drosophila)
Notch3	chr17:32304234-32304355	4	497	SI	Notch gene homolog 3 (Drosophila)
Npbwr1	chr1:5907239-5907360	9	-180	SI	neuropeptides B/W receptor 1
Npffr2	chr5:89956008-89956129	8	385	SI	neuropeptide FF receptor 2
Npy1r	chr8:69220851-69220972	9	409	SI	neuropeptide Y receptor Y1
Npy2r	chr3:82351810-82351931	3	-137	NO	neuropeptide Y receptor Y2
Npy5r	chr8:69211884-69212005	11	-49	SI	neuropeptide Y receptor Y5
Npy6r	chr18:44429674-44429795	1	46	NO	neuropeptide Y receptor Y6
Nr3c1	chr18:39650986-39651078	8	-981	SI	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1
Nr3c1	chr18:39650151-39650272	7	-146	SI	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1
Ntsr1	chr2:180234298-180234419	5	322	SI	Neurotensin receptor type 1
Ntsr2	chr12:16660353-16660474	13	-138	NO	neurotensin receptor 2
Olig2	chr16:91225313-91225434	6	421	SI	oligodendrocyte transcription factor 2
Oprd1	chr4:131700218-131700339	14	-123	SI	Delta-type opioid receptor
Oprk1	chr1:5578515-5578636	3	-2	NO	opioid receptor, kappa 1
Otog	chr7:53496495-53496606	4	-199	NO	otogelin
Oxtr	chr6:112440403-112440524	5	661	SI	oxytocin receptor
P2rx1	chr11:72812425-72812546	4	161	NO	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 1
P2rx2	chr5:110771981-110772071	6	-13	SI	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 2
P2rx4	chr5:123157118-123157239	1	387	NO	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel 4
P2rx5	chr11:72973276-72973384	2	538	NO	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 5
P2rx6	chr16:17561266-17561387	5	651	NO	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 6
P2rx7	chr5:123093203-123093324	3	656	NO	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 7
P2ry1	chr3:60806189-60806310	7	467	SI	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 1
P2ry10	chrX:104283634-104283755	2	136	NO	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 10
P2ry14	chr3:58957164-58957255	2	-190	NO	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 14
P2ry2	chr7:108160357-108160478	10	-88	SI	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 2

P2ry4	chrX:97790049-97790170	1	-99	NO pyrimidineric receptor P2Y, G-protein coupled, 4
Lpar6	chr14:73637863-73637951	6	-226	NO Lysophosphatidic acid receptor 6
P2ry6	chr7:108113487-108113608	2	667	NO pyrimidineric receptor P2Y, G-protein coupled, 6
Pard3	chr8:129588290-129588394	11	-395	SI par-3 (partitioning defective 3) homolog (C. elegans)
Pax3	chr1:78193513-78193634	7	-138	SI paired box gene 3
Pcdh11x	chrX:117403646-117403767	4	229	NO protocadherin 11 X-linked
Pcdh15	chr10:73284442-73284563	4	112	SI protocadherin 15
Pea15a	chr1:174136705-174136826	8	-147	SI phosphoprotein enriched in astrocytes 15A
Pja1	chrX:96665911-96666032	11	-103	SI praja1, RING-H2 motif containing
Plagl1	chr10:12810559-12810680	10	-26	SI pleiomorphic adenoma gene-like 1
Pld3	chr7:28338500-28338621	6	429	SI phospholipase D family, member 3
Plg	chr17:12570746-12570867	2	668	NO plasminogen
Plp1	chrX:133357342-133357463	1	-28	NO proteolipid protein (myelin) 1
Pmp22	chr11:62945018-62945139	8	-67	SI peripheral myelin protein 22
Pou3f1	chr4:124334215-124334336	13	613	SI POU domain, class 3, transcription factor 1
Pou3f2	chr4:22415639-22415760	7	421	SI POU domain, class 3, transcription factor 2
Pou3f4	chrX:108009932-108010053	6	-189	SI POU domain, class 3, transcription factor 4
Pou4f2	chr8:80960733-80960854	9	242	SI POU domain, class 4, transcription factor 2
Pou4f3	chr18:42553927-42554048	8	263	NO POU domain, class 4, transcription factor 3
Ppp2ca	chr11:51912036-51912157	14	229	SI protein phosphatase 2 (formerly 2A), catalytic subunit, alpha isoform
Ppp2r5c	chr12:111140137-111140258	6	413	NO protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), gamma isoform
Ppp3ca	chr3:136333753-136333874	13	-80	SI protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isoform
Ppp3cb	chr14:21365744-21365865	10	9	SI protein phosphatase 3, catalytic subunit, beta isoform
Ppp3r1	chr11:17051105-17051226	3	-24	NO protein phosphatase 3, regulatory subunit B, alpha isoform (calcineurin B, type I)
Ppyr1	chr14:34965524-34965645	6	-21	NO pancreatic polypeptide receptor 1
Prlhr	chr19:60544572-60544693	4	425	NO prolactin releasing hormone receptor
Prlr	chr15:10107392-10107513	7	-460	SI prolactin receptor
Prss2	chr6:41471557-41471678	1	157	NO protease, serine, 2
Ptafr	chr4:132119566-132119687	2	355	NO platelet-activating factor receptor
Ptgd	chr14:45479293-45479414	2	303	NO prostaglandin D receptor
Ptger2	chr14:45607818-45607939	2	-93	NO prostaglandin E receptor 2 (subtype EP2)
Ptger3	chr3:157229938-157230059	12	-143	SI prostaglandin E receptor 3 (subtype EP3)
Ptger4	chr15:5194653-5194774	7	439	SI Prostaglandin E receptor 4 (Subtype EP4), isoform CRA_b
Ptgr	chr3:151500497-151500618	6	65	SI prostaglandin F receptor
Pth1r	chr9:110649729-110649850	3	140	NO Parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor
Pth2r	chr1:65357812-65357933	6	-42	NO Parathyroid hormone 2 receptor
Qk	chr17:10513286-10513407	6	1120	NO quaking
Reln	chr5:21851134-21851255	9	671	SI reelin
Rtn4	chr11:29592776-29592897	7	61	SI reticulon 4
Rtn4r	chr16:18127283-18127404	9	455	NO reticulon 4 receptor
Rxfp2	chr5:150820708-150820829	3	481	SI relaxin/insulin-like family peptide receptor 2
Sctr	chr1:121903697-121903806	4	-201	NO secretin receptor
Sdha	chr13:74487490-74487611	9	-138	SI succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)
Serinc5	chr13:93380596-93380717	8	436	SI serine incorporator 5
Sgce	chr6:4697393-4697514	12	249	SI sarcoglycan, epsilon
Slc12a2	chr18:58037502-58037618	3	769	NO solute carrier family 12, member 2
Slc1a3	chr15:8660756-8660877	2	9	NO solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 3
Slc6a4	chr11:76811802-76811923	5	236	SI solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4
Sobp	chr10:42894622-42894743	7	346	SI sine oculis-binding protein homolog (Drosophila)
Sod1	chr16:90220602-90220723	5	324	NO superoxide dismutase 1, soluble
Sod2	chr17:13200731-13200852	19	-87	SI superoxide dismutase 2, mitochondrial
Sorbs3	chr14:70611891-70612012	4	155	NO sorbin and SH3 domain containing 3
Sorcs3	chr19:48279963-48280084	7	491	SI sortilin-related VPS10 domain containing receptor 3
Sort1	chr3:108086633-108086754	7	356	SI sortilin 1
Sox2	chr3:34548568-34548689	6	298	SI SRY-box containing gene 2
Spnb4	chr7:28232209-28232330	3	661	NO spectrin beta 4
Spry2	chr14:106296539-106296660	12	563	SI sprouty homolog 2 (Drosophila)
Sstr1	chr12:59312280-59312401	6	450	NO somatostatin receptor 1
Sstr2	chr11:113480901-113481022	5	-167	SI somatostatin receptor 2
Sstr3	chr15:78374600-78374721	6	-115	NO somatostatin receptor 3
Sstr4	chr2:148220805-148220926	7	247	SI somatostatin receptor 4
Sstr5	chr17:25634261-25634382	5	88	NO somatostatin receptor 5
Strc	chr2:121213058-121213179	4	214	NO stereocilin
Stxbp1	chr2:32702424-32702545	9	-273	SI syntaxin binding protein 1
Taar1	chr10:23640166-23640287	2	-15	NO trace amine-associated receptor 1
Tacr1	chr6:82352195-82352316	5	213	NO tachykinin receptor 1
Tacr2	chr10:61714784-61714905	5	341	NO tachykinin receptor 2
Tacr3	chr3:134492092-134492213	5	-182	SI tachykinin receptor 3
Tapbp	chr17:34056348-34056469	6	14	SI TAP binding protein
Tbx1	chr16:18591407-18591514	6	689	SI T-box 1

Tbxa2r	chr10:80791403-80791524	6	12	NO	thromboxane A2 receptor
Tectb	chr19:55255443-55255564	5	-129	NO	tectorin beta
Tert	chr13:73763698-73763789	4	720	NO	telomerase reverse transcriptase
Thra	chr11:98602499-98602620	3	627	NO	thyroid hormone receptor alpha
Thrb	chr14:18492994-18493115	9	419	SI	thyroid hormone receptor beta
Tmc1	chr19:21028450-21028571	4	-182	NO	transmembrane channel-like gene family 1
Lhfp15	chr17:28712083-28712204	3	520	NO	Tetraspan membrane protein of hair cell stereocilia
Tmie	chr9:110782964-110783085	4	437	NO	transmembrane inner ear
Tomm20	chr8:129470193-129470314	2	523	NO	translocase of outer mitochondrial membrane 20 homolog (yeast)
Tomt	chr7:109055034-109055155	4	221	NO	transmembrane O-methyltransferase
Trhr	chr15:44027738-44027859	2	-118	NO	thyrotropin releasing hormone receptor
Trhr2	chr8:124884465-124884586	5	-121	NO	thyrotropin releasing hormone receptor 2
Trpv1	chr11:73047305-73047426	2	428	NO	transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1
Tsc1	chr2:28496278-28496399	3	424	NO	tuberous sclerosis 1
Tshr	chr12:92639235-92639356	6	137	SI	thyroid stimulating hormone receptor
Tspo	chr15:83394034-83394155	9	-92	SI	translocator protein
Tub	chr7:116154144-116154265	7	189	NO	tubby candidate gene
Txndc15	chr13:55815950-55816071	14	0	SI	thioredoxin domain containing 15
Uchl1	chr5:67067521-67067642	7	-222	SI	ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1
Ush1c	chr7:53494475-53494596	4	675	NO	Usher syndrome type-1C protein homolog
Ush1g	chr11:115183006-115183127	6	-166	NO	Usher syndrome 1G homolog (human)
Uts2r	chr11:121021302-121021423	1	222	NO	urotensin 2 receptor
Vcp	chr4:43013396-43013517	9	77	SI	valosin containing protein
Vipr1	chr9:121551501-121551622	8	272	SI	vasoactive intestinal peptide receptor 1
Vipr2	chr12:117316266-117316387	9	-131	SI	vasoactive intestinal peptide receptor 2
Vldlr	chr19:27291657-27291778	17	-208	SI	very low density lipoprotein receptor
Wdr1	chr5:38952937-38953058	17	163	SI	WD repeat domain 1
Whrn	chr4:63157142-63157263	6	217	SI	whirlin
Yme11	chr2:23012210-23012315	6	-205	SI	YME1-like 1 (<i>S. cerevisiae</i>)
Ywhag	chr5:136410209-136410330	11	-242	SI	tyrosine 3/5-monooxygenase activation protein, gamma polypeptide
Ywhaz	chr15:36723761-36723882	10	-472	SI	tyrosine 3/5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide

DNA methylation map of mouse and human brain identifies target genes in Alzheimer's disease

Jose V. Sanchez-Mut,¹ Ester Aso,² Nicolas Panayotis,^{3,4} Ira Lott,⁵ Mara Dierssen,⁶ Alberto Rabano,⁷ Rocio G. Urdinguio,⁸ Agustin F. Fernandez,⁸ Aurora Astudillo,⁹ Jose I. Martin-Subero,¹ Balazs Balint,¹ Mario F. Fraga,^{8,10} Antonio Gomez,¹ Cecile Gurnot,¹¹ Jean-Christophe Roux,^{3,4} Jesus Avila,¹² Takao K. Hensch,¹¹ Isidre Ferrer² and Manel Esteller^{1,13,14}

- 1 Cancer Epigenetics and Biology Program (PEBC), Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), 08908 L'Hospitalet, Barcelona, Catalonia, Spain
- 2 Neuropathology Institute, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL)-Hospital Universitari de Bellvitge, Universitat de Barcelona, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Catalonia, Spain
- 3 INSERM UMR_S 910, Unité de Génétique Médicale et Génomique Fonctionnelle, Faculté de Médecine de La Timone, Marseille, F-13385, France
- 4 Aix-Marseille Université, Faculté de Médecine de La Timone, Marseille, F-13000, France
- 5 Department of Paediatrics and Neurology, School of Medicine, University of California Irvine (UCI), Orange, CA 92868, USA
- 6 Centre for Genomic Regulation (CRG); Universitat Pompeu Fabra (UPF); and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Dr. Aiguader 88, E-08003 Barcelona, Catalonia, Spain
- 7 Neuropathology Laboratory, Research Unit Alzheimer's Project (UIPA), Fundación CIEN, Madrid, Spain
- 8 Cancer Epigenetics Laboratory, Institute of Oncology of Asturias (IUOPA), HUCA, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain
- 9 Banco de Tumores, Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA), HUCA, Universidad de Oviedo, 33006-Oviedo, Spain
- 10 Department of Immunology and Oncology, National Centre for Biotechnology, Campus de Cantoblanco, Madrid, 28049, Spain
- 11 Centre for Brain Science, Department of Molecular and Cellular Biology, Harvard University, Cambridge, MA, USA
- 12 Department of Neuroscience, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa CSIC/UAM, Universidad Autónoma de Madrid, and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain
- 13 Department of Physiological Sciences II, School of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain
- 14 Institut Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Barcelona, Catalonia, Spain

Correspondence to: Professor Manel Esteller,
Cancer Epigenetics and Biology Program (PEBC),
Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL),
Av. Gran Via no 199,
08908 - L'Hospitalet de Llobregat (Barcelona), Spain
E-mail: mesteller@idibell.cat

The central nervous system has a pattern of gene expression that is closely regulated with respect to functional and anatomical regions. DNA methylation is a major regulator of transcriptional activity, and aberrations in the distribution of this epigenetic mark may be involved in many neurological disorders, such as Alzheimer's disease. Herein, we have analysed 12 distinct mouse brain regions according to their CpG 5'-end gene methylation patterns and observed their unique epigenetic landscapes. The DNA methylomes obtained from the cerebral cortex were used to identify aberrant DNA methylation changes that occurred in two mouse models of Alzheimer's disease. We were able to translate these findings to patients with Alzheimer's disease, identifying DNA methylation-associated silencing of three target genes: thromboxane A2 receptor (TBXA2R), sorbin and SH3 domain containing 3 (SORBS3) and spectrin beta 4 (SPTBN4). These hypermethylation targets indicate that the cyclic AMP response element-binding protein (CREB) activation pathway and the axon initial segment could contribute to the disease.

Keywords: DNA methylation; Alzheimer's disease; brain regions; epigenetics

Abbreviations: PMI = post-mortem interval delay

Received February 6, 2013. Revised June 4, 2013. Accepted July 3, 2013.

© The Author (2013). Published by Oxford University Press on behalf of the Guarantors of Brain. All rights reserved.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com

Introduction

DNA methylation has a critical role in the regulation of gene expression in tissues and organs (Cedar and Bergman, 2012) and its deregulated patterns are increasingly associated with human diseases (Feinberg, 2007; Heyn and Esteller, 2012), among which feature a range of neurological disorders (Urduguio et al., 2009; Jakovcsevi and Akbarian, 2012). In this latter context, epigenetic marks, such as CpG methylation, may be essential because the CNS is a highly specialized structure that requires fine-tuning for gene expression. This is exemplified by the observations that it expresses more alternatively spliced transcripts (Yeo et al., 2004) and microRNAs (Cao et al., 2006) than any other tissue, and that three out of four genes are active (Johnson et al., 2009). The role of DNA methylation in the function of the CNS has been highlighted by its involvement in memory formation (Miller and Sweatt, 2007; Feng et al., 2010; Guo et al., 2011) and ageing-related cognitive decline (Oliveira et al., 2012). Consequently, increasing interest is now focused on the impact of aberrant DNA methylation patterns in the origin and progression of Alzheimer's disease. This, the most common type of dementia, is characterized by insidious degeneration of brain networks related to memory and cognition. However, few genes are known to be deregulated by DNA methylation in case-control studies of Alzheimer's disease (Sjogmund et al., 2009; Bakulski et al., 2012; Rao et al., 2012). The explanation for this paucity of results might be associated with the existence of many distinctly functional subregions of the brain that may have different DNA methylation patterns that mask the analyses of the data, a matter that has only recently been addressed, and even then, only for large brain regions (Ladd-Accosta et al., 2007; Xin et al., 2010; Hernandez et al., 2011; Lee et al., 2011; Davies et al., 2012). Most importantly, even if close to 80% of human genes are expressed in the brain, most of them are expressed in a relatively small percentage of cells (i.e. 70.5% of genes are transcribed in <20% of all cells) (Lein et al., 2007), an important handicap to discover epigenetically altered genes in specific cells because their DNA methylation patterns could be diluted amongst the majority of cells with different epigenomic patterns. We have addressed this challenging issue by carefully microdissecting the 12 most relevant brain regions of the mouse and hybridizing the corresponding samples to a DNA methylation microarray. The observed DNA methylomes were used to identify aberrant DNA methylation changes that occurred in two mouse models of Alzheimer's disease and to translate these findings to patients with Alzheimer's disease.

Materials and methods

Mice samples

Brain region profiles were derived from C57BL/6J mice obtained from the Charles River laboratories. Twelve P60 samples (three female and three male samples for the array hybridization and three female and three male samples for the pyrosequencing validation) were used. Mice were killed by cervical dislocation, and their brains were dissected out within the first 2 min post-mortem and kept at -80°C . Brain areas

were dissected from cryostat brain sections (-20°C) with the help of a $\times 5$ magnifying lens, following their stereotaxic coordinates (Paxinos and Franklin, 2001), as previously described (Roux et al., 2003; Panayotis et al., 2011a, b). For validations of epigenetically deregulated genes in Alzheimer's disease, frontal cortex samples from two transgenic models were used, namely APP/PSEN1 (Borchelt et al., 1997) and 3xTg-AD (Oddo et al., 2003) mice. Five 12-month-old APP/PS1 and five wild-type littermates, and three 18-month-old 3Tg and three 3Tg control mice, were assayed for DNA methylation using the mouse brain genome-wide promoter DNA methylation array. Additionally, independent sets of 12-month-old APP/PS1 and five wild-type littermates, and three 18-month-old 3Tg and three 3Tg control mice were used for pyrosequencing validations and RNA assays. Four APP/PS1 and four wild-type animals were deeply anaesthetized by intraperitoneal injection (0.2 ml/10 g body weight) with a mixture of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (20 mg/kg) before intra-cardiac perfusion with 4% paraformaldehyde in PBS. Brains were removed, post-fixed in the same fixative for 4 h and processed for immunohistochemistry. Another group of four APP/PS1 and four wild-type mice were sacrificed by decapitation and their brains quickly removed, dissected on ice and immediately frozen and stored at -80°C until processing for the immunoblot analysis. All animals were maintained under standard animal house conditions in a 12-h dark-light cycle with free access to food and water. The experimental procedures complied with the European guidelines for the care and use of laboratory animals (EU directive 2010/63/EU) and were approved by the local ethics committee (UB-IDIBELL).

Human samples

Post-mortem tissues were obtained from the IDIBELL Biobank, which is part of the eBrainNet Europe Bank (<http://www.brainnet-europe.org/>) 'Network of Excellence' funded by the European Commission in the 6th Framework Program 'Life Science' (LSHM-CT-2004-503039); the CIEN Tissue Bank, CIEN Foundation, Instituto de Salud Carlos III; and the University of California Irvine Alzheimer Disease Research Centre, UCI Institute for Memory Impairments and Neurological Disorders. The collection of all samples conformed to the relevant regulations, ethical considerations and legislation as defined by the European Union and Spain. Samples were dissected and characterized for Braak stage before further examination. DNA and RNA from grey matter samples of frontal cortex were extracted for pyrosequencing and RNA assay validations. Only samples with RIN > 6.5 according to the RNA quality test developed using the Agilent 2100 bioanalyzer were included in the study. These filtered samples were DNA and RNA from grey matter of frontal cortex (Brodmann area 9) of 20 controls (65% female; age 71 ± 3 years, post-mortem interval delay (PMI) 9 ± 1 h, mean \pm SEM) and 20 Alzheimer's disease Braak stage V-VI (70% female; age 82 ± 2 years, PMI 8 ± 1 h, mean \pm SEM) samples matched for age and gender. Supplementary Table 1 describes in detail the available clinicopathological information for all cases and controls (Braak staging, PMI, age and gender). The PMIs were similar for both groups.

Bisulphite conversion of DNA

The Repli-g whole genome-amplification kit (Qiagen) was used to generate non-methylated DNA following the manufacturer's protocol. For methylated DNA, part of the resulting DNA was *in vitro* methylated using SssI enzyme (New England Biolabs). The EZ DNA methylation kit (Zymo Research) was used for bisulphite conversion of all DNA samples used, according to Bibikova et al. (2009).

Mouse brain genome-wide promoter DNA methylation array

The mouse brain genome-wide promoter DNA methylation array is a custom designed Illumina's VeraCode GoldenGate DNA methylation assay that was specifically enriched in genes related with sensory perception, cognition, neuroplasticity, brain physiology and mental diseases in order to provide a useful tool for subsequent neurological studies. From the starting list of 762 genes we downloaded the transcription start coordinates from <http://genome.ucsc.edu> using 2007 July mm9 assembly and UCSC Genes track. From genes with more than one transcription starting site we selected the first at the 5' end of the gene. We took 750bp upstream (5') and 250bp downstream (3') relative to the marked transcription site to design the specific probe for the array, which was subsequently filtered for single mapping on its specific chromosome position. The 384 genes with the highest scores were included in the final design of the array (Supplementary Table 2). Among the 384 amplicons, the average of interrogated CpGs was 2.7 (Supplementary Table 2).

Data analysis

All data were analysed using the open-source statistical programming language R (version 2.13.1). Quantile normalization of the array was carried out using the lumi package and posterior analysis was done with the genefilter package (Bioconductor). For general analysis, all probes with detection values of $P < 0.01$ in $> 15\%$ of the samples (25 probes) and probes located on chromosome X (17 probes) were excluded. Poor-quality samples ($> 10\%$ failed probes) were also excluded. For unsupervised clustering analysis, probes with a general standard deviation < 0.05 were excluded as non-informative. Subsequently, heatmaps were analysed using the gplots package. Spectral map analysis was carried out using the ppm package (Wouters et al., 2003). Statistical analysis was performed using the lumi package (Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests for two- and multiple-group comparisons, respectively, adjusting P -values with the FDR algorithm).

Pyrosequencing

The set of primers for PCR amplification and sequencing (Supplementary Table 3) were designed using the PyroMark assay design program, version 2.0.01.15 (Qiagen); amplification primers hybridize with CpG-free sites to ensure a methylation-independent reaction and one primer (opposite the sequencing primer) is biotinylated to convert the PCR product to single-stranded DNA templates. We used 1 μ l of bisulphite-treated DNA for each PCR. In order to prepare single-stranded PCR products, we used the Vacuum Prep Tool (Qiagen), following the manufacturer's instructions. Pyrosequencing reactions and methylation quantification were performed in a PyroMark Q24 System version 2.0.6 (Qiagen). All pyrosequencing assays were run in triplicate. These technical replicates yielded standard errors of means $< 1\%$.

Real-time polymerase chain reaction

Total RNA purification and DNase treatment were performed using TRIzol (Invitrogen) and the Turbo DNA-Free kit (Ambion). RNA was reverse-transcribed using the ThermoScript RT-PCR system (Invitrogen) and each PCR was carried out in triplicate using SYBR Green PCR MasterMix (Applied Biosystems). Thermocycling conditions

were 10 min at 95°C, then 50 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. Fluorescent signals were acquired by the ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems), and positive standard deviations were normalized using three housekeeping genes (GUSB, APL3B and TBP). The primers for real-time PCR are listed in Supplementary Table 4. PCR efficiencies were calculated using standard dilutions and the LinReg software (Ruijter et al., 2009).

Immunofluorescence and confocal microscopy

Tissue samples were embedded in paraffin and 4- μ m coronal sections were cut with a microtome. De-waxed sections were stained with a saturated solution of Sudan Black B (Merck) for 30 min to block the autofluorescence of lipofuscin granules present in cell bodies, then rinsed in 70% ethanol and washed in distilled water. The sections were treated with citrate buffer to enhance antigenicity, and then incubated at 4°C overnight with primary antibodies against Tbx20 (1:200, rabbit; Acris), F2r2 (1:50, rabbit; Santa Cruz), Sptbn4 (1:100, rabbit; Sigma-Aldrich). After washing, the sections were incubated with Alexa488 (1:400, Molecular Probes) fluorescence secondary antibody against the corresponding host species. After counterstaining of nuclei with DRAQ5TM (1:2000, Biostatus), the sections were mounted in Immuno-Fluore Mounting medium (ICN Biomedicals), sealed, and dried overnight. Sections were examined with a Leica TCS-SL confocal microscope. The protein levels were evaluated by densitometric quantification in reference to the GFAP immunostained area in five representative pictures taken from the neocortex of each animal using Adobe® Photoshop® CS4.

Immunoblot analysis

Frozen cortical areas were dounce-homogenized in lysis buffer (50 mM Tris/HCl buffer, pH 7.4 containing 2 mM EDTA, 0.2% Nonidet P-40, 1 mM PMSF, protease and phosphatase inhibitor cocktails, Roche Molecular Systems), incubated for 20 min with agitation at 4°C and centrifuged for 30 min at 16000g. The supernatant was recovered and stored at -80°C . Protein content was determined by the BCA method (Thermo Scientific). Equal amounts of protein (20 μ g per lane) were separated by SDS-PAGE (10%) and transferred onto nitrocellulose membranes (Amersham, GE Healthcare). Non-specific bindings were blocked by incubation in 5% non-fat milk in Tris-buffered saline (100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.4) containing 0.2% Tween (TTBS) for 1 h at room temperature. Afterwards, membranes were incubated overnight at 4°C with the polyclonal mouse anti-SORBS3 (1:1000, Abnova) in TTBS with 3% bovine serum albumin. Protein loading was monitored using a mouse monoclonal antibody against β -actin (1:30000, Sigma-Aldrich). Membranes were then incubated for 1 h in the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:2000, Dako) and immunocomplexes were revealed by an enhanced chemiluminescence reagent (ECL AdvanceTM, Amersham Biosciences). Densitometric quantification was carried out with TotalLab v2.01 software (Pharmacia). Protein bands were normalized to β -actin levels and expressed as a percentage of the control group level.

Results

We first carefully microdissected the 12 most relevant brain regions of the mouse (cerebellar granular and Purkinje layers,

frontal cortex, hippocampal regions CA1, CA3 and dentate gyrus, basolateral amygdala, caudatus putamen, substantia nigra, hypothalamus, globus pallidus and thalamus) and hybridized the corresponding DNAs obtained to a custom microarray containing the 5'-end regulatory regions of 384 mouse genes (Supplementary Table 2). The list was specifically enriched in genes related to sensory perception, cognition, neuroplasticity, brain physiology and mental diseases. The CpG probes used were mapped to locations between -750 bp and +250 bp of the corresponding transcription start sites. Among the 384 amplicons, the average of interrogated CpGs was 2.7. To test the reliability of the array we used three different technical replicates randomly distributed on the array. After quantile normalization, we obtained excellent coefficients of correlation ($r^2 = 0.98$, 0.99 and 0.99 , Supplementary Fig. 1) confirming the high reliability of the method. Two important control samples were also included: DNA fully methylated *in vitro* using the *SssI* enzyme (New England Biolabs), as a positive methylated control for all CpG sites, and a whole genome PCR amplified DNA obtained using the Repli-g whole genome-amplification kit that does not retain methylated CpGs (Qiagen), as a negative methylated control for all CpG sites. The VeraCode assay recognizes the *SssI*-treated DNA as highly methylated and the whole genome amplified DNA as fully unmethylated (Supplementary Fig. 2A). We also interrogated the linear capacity of the array, mixing different proportions of methylated and unmethylated DNA generating a set of five different ratios (1:0, 2:1, 1:1, 1:2 and 0:1). The use of the above described whole-genome amplified DNA as a negative control and *in vitro* methylated DNA as positive control DNA obtained a high Pearson's coefficient of correlation ($r^2 = 0.97$, Supplementary Fig. 2B). We further validated the VeraCode assay as a tool to measure DNA methylation by the existence of inactivation of one X-chromosome in females by DNA methylation, when compared with the unmethylated X-chromosome in males. Herein, we observed that those CpG sites located in the X-chromosome in the VeraCode assay were able to discriminate between female and male samples in brain regions (Supplementary Fig. 2C).

To further validate the array data (obtained using three female and three male samples), we took advantage of the spectral map analysis (Supplementary Fig. 3A) and performed pyrosequencing of the most discordant regions for each of the genes identified using an additional set of biological samples (a distinct group of three female and three male samples). Herein, we obtained similar ratios between both techniques and high overall correlation ($r^2 = 0.721$, Supplementary Fig. 3B and C). In addition, we interrogated the biological relevance of such DNA methylation correlating these data with the RNA expression profiles available in Allen Brain Atlas database (Supplementary Fig. 4). In this regard, we obtained an excellent correlation between both sets of values (Fisher's exact test $P < 0.001$) underlying its biological significance. Using this approach, we identified 72 genes (Supplementary Table 5) that were significantly differentially methylated (FDR < 0.05) across the described 12 brain regions of C57BL/6J mice, enabling them to be distinguished by the hierarchical clustering approach (Fig. 1). The observed differences were not associated with cellular heterogeneity at the level of glia versus neuron lineage. When these two cell types were isolated in

the mouse brain using A2B5 and PSA-N-CAM antibodies, respectively, followed by magnetic separation (Seidenfaden et al., 2006; Strathmann et al., 2007) no significant differences in DNA methylation were observed for seven studied genes (Spearman's correlation test, $\rho = 0.60$, $P = 0.166$; Supplementary Fig. 3D). Interestingly, the cluster analysis identified three main DNA methylation branches corresponding to cerebellum (granular cell layer and Purkinje cells), cerebral cortex (CX, CA1, CA3 and dentate gyrus) and diencephalon-basal ganglia (basolateral amygdala, caudate-putamen, substantia nigra, hypothalamus, globus pallidus and TH). These largely correspond with the major divisions of the brain into hindbrain, forebrain and midbrain (Fig. 1). Thus, consistent with the previously reported RNA expression profiles (Johnson et al., 2009; Lein et al., 2007), our results suggest that major brain divisions are not only structural bisections but also have distinct functional significance. These DNA methylation patterns also reflect the cell type composition of these regions: diencephalon-basal ganglia, which are mainly enriched in GABAergic neurons, and cerebral cortex, which is enriched in glutamate neurons, cluster according to their cell characteristics (Fig. 1). DNA methylation microarray data for 384 genes in the 12 studied mouse brain regions are available to download from NCBI Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>): GSE47038.

The DNA methylation clustering analyses that recognize cerebral cortex as a distinct branch are relevant to our understanding of Alzheimer's disease because this is the region most strongly affected in the disorder. Thus, we made a detailed comparison of the DNA methylation patterns in cerebral cortex and the rest of the brain, the latter being regions that are not targeted in Alzheimer's disease. We identified 52 genes that were differentially methylated between cerebral cortex and the rest of the brain (Supplementary Table 6) (FDR < 0.05) and further investigated the seven genes with the greatest differential methylation (Fig. 2A). For six of these seven (86%) genes, we were able to link the presence of high levels of DNA methylation at their 5'-end regions with downregulation of the corresponding transcripts measured by quantitative real time-PCR (Fig. 2B), highlighting the functional relevance of the observed epigenetic differences. To determine if these genes underwent DNA methylation changes in the disorder, we hybridized the frontal cortex samples from two well-established models of Alzheimer's disease in mice, APP/PSEN1 and 3xTg-AD (Borchelt et al., 1997; Oddo et al., 2003) to the DNA methylation microarray. Strikingly, we observed that thromboxane A2 receptor (Tbxa2r), coagulation factor II (thrombin) receptor-like 2 (F2rl2), sorbin and SH3 domain containing 3 (Sorbs3) and spectrin beta 4 (Spnb4) were hypermethylated in the frontal cortex of APP/PSEN1 mice observing a similar trend in 3xTg-AD mice (Fig. 2C). DNA methylation microarray data for the 384 genes in the frontal cortex samples from control animals and the two transgenic models APP/PSEN1 and 3xTg-AD are available to download from NCBI Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>): GSE47036.

To achieve biological replication of the data obtained with the first group of samples, we confirmed the hypermethylation of the four genes identified above using an additional set of samples from the frontal cortex of APP/PSEN1 and 3xTg-AD mice using

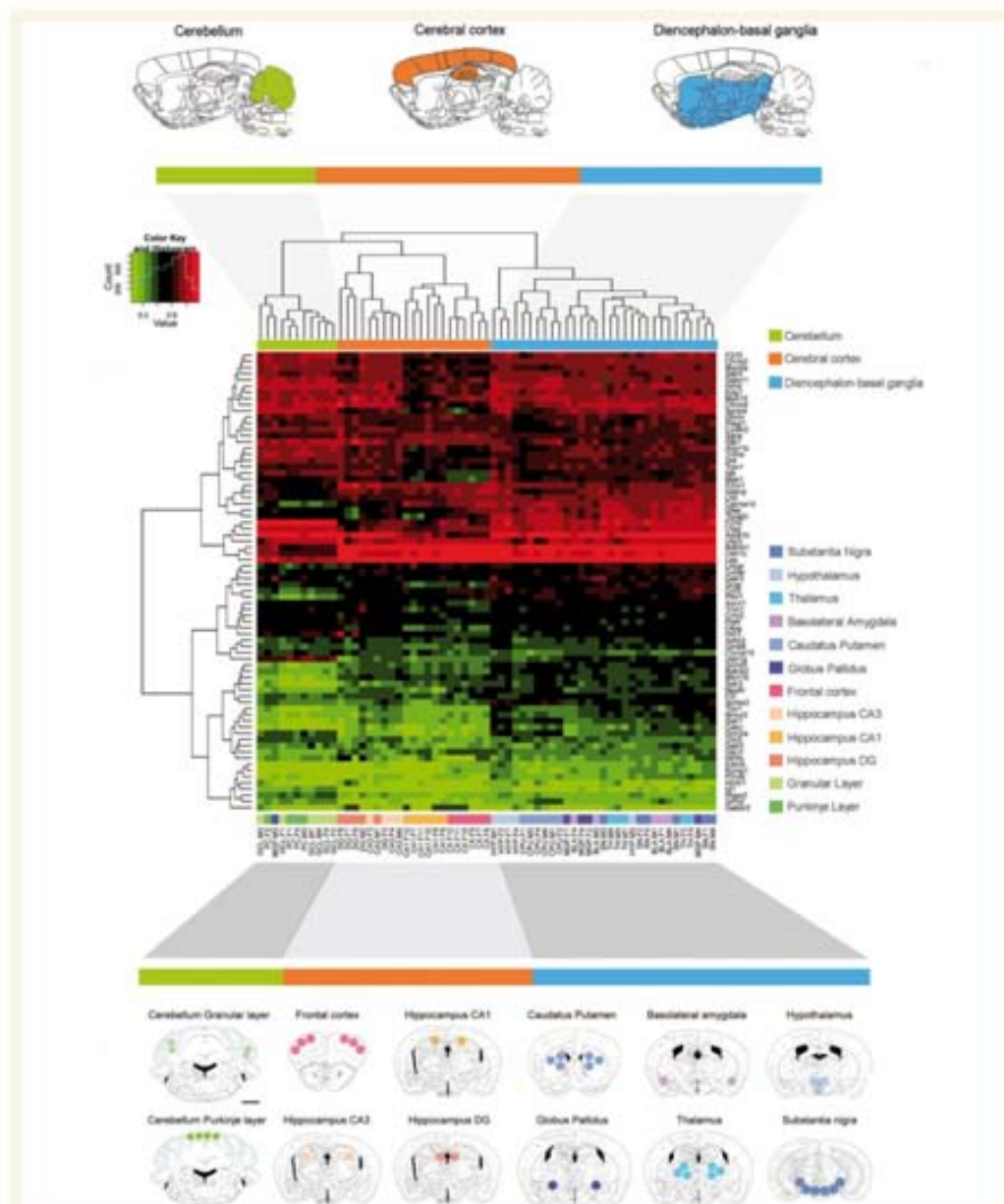
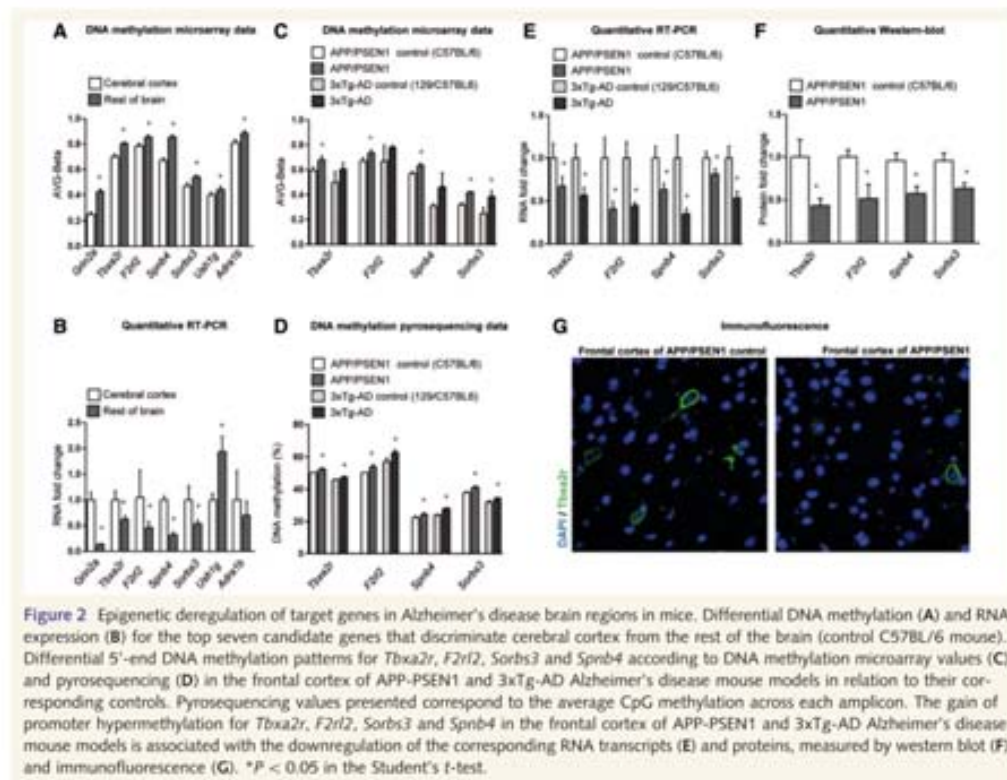


Figure 1 Unsupervised heatmap clustering of a genome-wide promoter DNA methylation microarray across 12 brain regions in the C57BL/6 mouse. A schematic representation of studied regions was performed on plates adapted from the mouse brain in a stereotaxic coordinates atlas. The circles and areas mark sites from which brain tissue was dissected. The frontal cortex (distance from the bregma, + 2.68), caudate-putamen (+ 0.98), basolateral amygdala (− 0.90 to − 0.95), hypothalamus (− 0.82), globus pallidus (− 1.20), thalamus (− 1.34), hippocampus (− 1.94, hippocampal field CA3, CA1 and dentate gyrus, DG), midbrain area (substantia nigra + ventral tegmental area, − 3.08), and cerebellum (− 5.80, granular cell layer, GCL; Purkinje cells, PC) were microdissected. Red and green colours indicate high and low levels of DNA methylation, respectively. Scale bars = 1 mm.

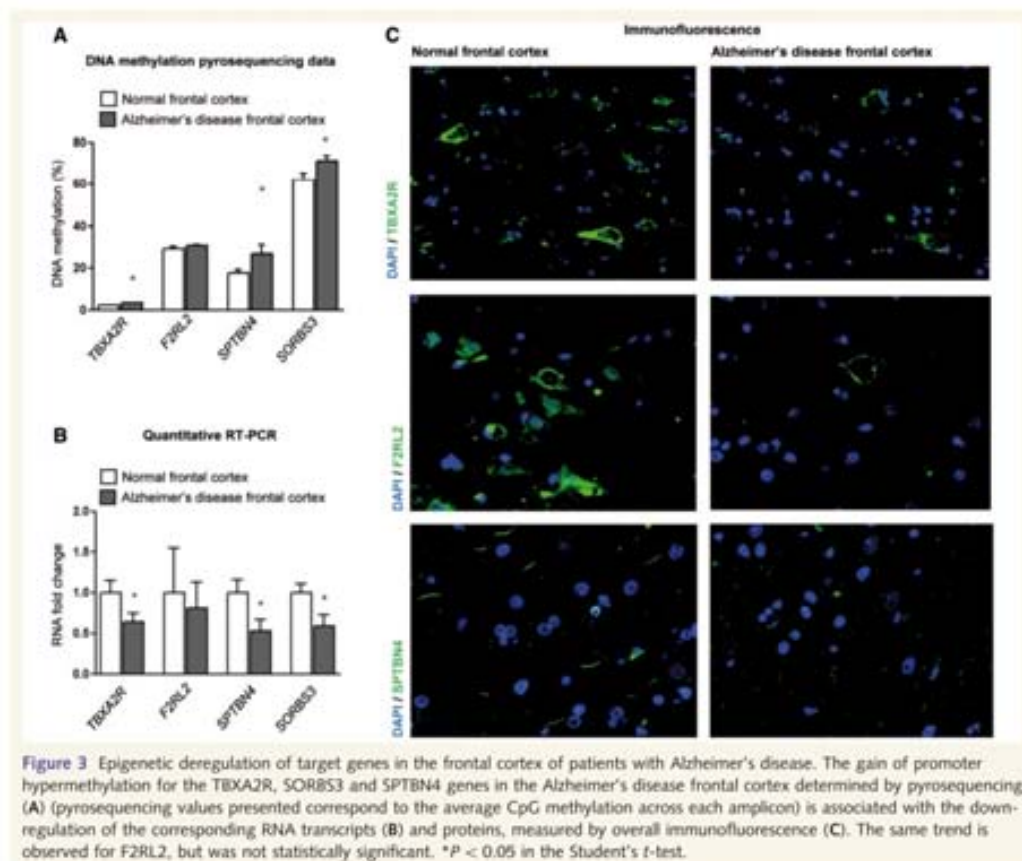


a different DNA methylation technique, pyrosequencing (Fig. 2D). The presented pyrosequencing values correspond to the average level of CpG methylation across each amplicon and Supplementary Fig. 5 shows methylation values for each CpG within the studied amplicons. In these cases, we also linked the presence of the hypermethylation events in the cortex from the Alzheimer's mouse models to the downregulation of the corresponding transcripts (Fig. 2E) and proteins in the western blot of *F2rl2*, *Sorbs3* and *Spnb4* genes (Fig. 2F and Supplementary Fig. 6) and immunofluorescence of *Tbx2r* (Fig. 2F and G).

These encouraging results prompted us to investigate human biological samples to address whether the observed epigenetic changes occurred in patients with Alzheimer's disease. We used pyrosequencing to analyse the DNA methylation status of the four validated genes (from which gain of 5'-end methylation was associated with diminished expression in the Alzheimer's disease mouse models) in a collection of 20 frontal cortex samples from Alzheimer's disease Braak stage V-VI cases, comparing them with 20 aged-matched control samples. As in the mouse models, *TBXA2R*, *SORBS3* and *SPTBN4* were hypermethylated in the human Alzheimer's frontal cortex samples (Fig. 3A). The pyrosequencing values presented correspond with the average level of CpG methylation across each amplicon and Supplementary Fig. 7

shows methylation values for each CpG within the studied amplicons. We found an association between the gain in hypermethylation of *TBXA2R*, *SORBS3* and *SPTBN4* in the frontal cortex of the patients with Alzheimer's disease with a reduction of the corresponding RNA transcripts (Fig. 3B) and proteins (Fig. 3C), reinforcing the biological role of the identified epigenetic events. Finally, we found a similar trend for *F2RL2* DNA methylation and RNA expression although the great variability of expression among samples precluded a definitive conclusion for this gene.

It is worth mentioning that the 5'-ends of the human counterparts (*F2RL2*, *SORBS3*, *SPTBN4* and *TBXA2R*) of the mouse genes (*F2rl2*, *Sorbs3*, *Spnb4* and *Tbx2r*) validated as targets of epigenetic disruption in Alzheimer's disease show structural and functional homologies (Supplementary Fig. 8). In addition to the chromosomal location of the corresponding homologous regions between humans and mice, the 5'-ends of these four genes share, in both species, a high number of identical transcription factor binding sites (Supplementary Fig. 8A). Interestingly, this observation is particularly true for the nucleotide regions that contain the CpG dinucleotides assessed by the DNA methylation microarray and pyrosequencing (Supplementary Fig. 8B). Most importantly, four of the transcription factor binding sites common in both species, and located precisely within the CpGs with differential DNA



methylation between cases and controls, show methylation-sensitive binding affinity. These sites were *TFAP2A* (Kulak *et al.*, 2012), *TBP* (Bane *et al.*, 2002), *GATA-2* (Rui *et al.*, 2013) and *GATA-3* (Hutchins *et al.*, 2002) (Supplementary Fig. 8C). In this regard, for promoters without a CpG island, the methylation of particular CpG sites surrounding the transcription start sites can also be linked with transcriptional downregulation (Han *et al.*, 2011; Kelly *et al.*, 2012; Øster *et al.*, 2013). These findings warrant further research in this area.

Discussion

As mentioned previously, ~80% of total genes are expressed in the brain and most are expressed in a relatively small percentage of cells (Lein *et al.*, 2007). It is an important handicap to elucidate epigenetically deregulated genes in CNS because the characteristic patterns that regulate the expression of concrete genes in specific cells are presumably diluted inside a majority of cells governed by alternative epigenetic patterns. Furthermore, we should consider

that neurons show a high variation in DNA methylation profiles according to their unique characteristics (Iwamoto *et al.*, 2011). An additional complication arises from the interindividual variation observed in humans which also contributes to mask such differences. These make the discovery of epigenetic alterations in neurological diseases difficult and, as consequence, few genes have, to date, been reported in widespread non-tumoral disorders such as Alzheimer's disease (Sigmund *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2008; Bakulski *et al.*, 2012; Rao *et al.*, 2012).

To face this challenge, we focused on genetically homogeneous mouse models because they show a reduced interindividual variation. In spite of the importance of mice models in scientific research, no platforms interrogating mouse DNA methylation have been commercialized and the available alternatives are not sensitive enough to quantify the expected DNA methylation differences in CNS (a comparison of methods is available in Harris *et al.*, 2010). For that, we designed a custom Illumina VeraCode DNA methylation mouse array enriched in genes related to sensory perception, cognition, neuroplasticity, brain physiology and mental diseases. Illumina platforms have been demonstrated to be

accurate genome-wide assays, commonly used to study DNA methylation (Bock et al., 2010), and, as consequence, our custom array could be a useful tool to identify DNA methylation differences in mouse brain. However, there is the limitation that only the DNA sequences included in the microarray can be studied and the enrichment of candidate genes selected for their putative role on neurological pathways creates a bias for these types of candidates. Additionally, we have confined our study to the sequences 750bp upstream and 250bp downstream of the corresponding transcription start sites and CpGs located in other intragenic or intergenic DNA methylation regions, which could also have an impact on gene activity. Importantly, there are new challenges in the study of DNA methylation in the brain and its disorders that should be considered, such as the presence of hydroxymethylation (Kriaucionis and Heintz, 2009; Münzel et al., 2010; Song et al., 2011; Szulwach et al., 2011; Khare et al., 2012) which, unfortunately, cannot be distinguished by standard bisulphite conversion (Huang et al., 2010) or the recognition that DNA methylation is a dynamic process in brain regions, including those associated with cognition and behaviour (Lubin et al., 2011; Numata et al., 2012). In our study, we accomplished a detailed description of DNA methylation profiles of 12 well-defined mouse brain regions and used this information to highlight the specific characteristics of affected regions in Alzheimer's disease. Thus, we identified a subset of possible target genes for Alzheimer's disease that were interrogated in two different Alzheimer's mouse models and human samples achieving a high correlation between the groups.

The DNA hypermethylation-associated inactivation of the *TBXA2R*, *F2RL2*, *SORBS3* and *SPTBN4* genes discovered here in samples of Alzheimer's disease could provide additional clues to understand the pathology of the disease. *TBXA2R* is a member of the family of G protein-coupled receptors that regulates the cAMP response element-binding protein (CREB) (Muja et al., 2001; Obara et al., 2005). In this regard, the CREB activation pathway is critical for neuron activity (Franklin et al., 1992). It has been recently observed that other CREB-related genes are differentially methylated across different cortex regions and cerebellum (Davies et al., 2012) and CREB-signalling alterations occur in Alzheimer's disease (Saura and Valero, 2011). *TBXA2R* plays another important role in the pathobiology of Alzheimer's disease by mediating NMDA excitotoxicity (Mitsumori et al., 2011). NMDA treatment induces apoptosis and the production of thromboxane A2 (TXA2) (Okada et al., 2008). The ligand of *TBXA2R* establishes a link between NMDA excitotoxicity and TXA2 signalling. Interestingly, amyloid- β treatments also induce TXA2 production and are associated with neurodegeneration, which is, in turn, attenuated by TXA2 antagonists (Yagami et al., 2004). It is also important to mention that *F2RL2*, identified in the Alzheimer's mice models but not completely validated in the human samples, is also associated with NMDA excitotoxicity and is necessary for the APC-mediated protection after NMDA treatments (Guo et al., 2004). The second identified target of epigenetic inactivation, *SORBS3*, is a gene previously reported to be hypermethylated in Alzheimer's disease (Siegmond et al., 2009). *SORBS3*, also known as vinexin, is involved in synapsis (Ito et al., 2007) and regulates gene

expression (Matsuyama et al., 2005) and further research is necessary to understand its putative role in Alzheimer's disease.

Finally, the third candidate, *SPTBN4*, is a prominent member of the axon initial segment and, in combination with the ankyrin G protein, acts as a bridge between the cytoskeleton and voltage-gated channels (Grubb et al., 2010). The correct formation of the axon initial segment is essential for synaptic integration and the firing of the action potential (Palmer and Stuart, 2006; Kress et al., 2010) and its disruption compromises neuronal function, organization and polarity (Hedstrom et al., 2008). Indeed, *Spnb4* mutant mice fail to initiate action potentials and show progressive behavioural deficits with altered network excitability (Uemoto et al., 2007; Yang et al., 2007; Winkels et al., 2009). Most importantly for Alzheimer's disease, the integrity of the axon initial segment is necessary to maintain the axonal localization of tau (Li et al., 2011) and its disruption could result in tau mislocalization, increase of tau presence in the somatodendritic compartment and enhanced exposure to kinases. In this regard, *SPTBN4* also anchors CAMKII to the axon initial segment (Hund et al., 2010), and, thus, CAMKII mislocalization upon *SPTBN4* epigenetic loss could cause tau hyperphosphorylation, a common finding in Alzheimer's disease (Xiao et al., 1996). Supporting this hypothesis, RNA interference of the *SPTBN4* orthologue in a *Drosophila* Alzheimer's disease model also enhances tau toxicity (Shulman et al., 2011). In addition, the mutant mice for ankyrin G (the partner of *Spnb4* in axon initial segment) shows neurodegeneration (Zhou et al., 1998), reinforcing the importance of axon initial segment integrity in neuronal viability. Interestingly, the DNA-methylation associated loss of *SPTBN4* identified here could also contribute to Alzheimer's disease by another pathway: the alteration of amyloid precursor protein processing. Alpha and beta-secretases, which are responsible for non-amyloidic and amyloidic processing of amyloid precursor protein, tend to localize in the somatodendritic compartment and plasmatic membrane, respectively (reviewed in Haass et al., 2012). In this context, the non-amyloidic processing of amyloid precursor protein occurs predominantly on the cell surface and could depend on the integrity of the axon initial segment that could be disrupted by *SPTBN4* epigenetic silencing. Thus, the observed DNA methylation-associated inactivation of *SPTBN4* could relate to both tau hyperphosphorylation and an increase in the amyloidic processing of amyloid precursor protein, the two main hallmarks of Alzheimer's disease.

Overall, our data suggest that key genes are altered by DNA methylation in Alzheimer's disease, highlighting the disruption of particular molecular signalling pathways and cellular structures, such as CREB-activation and the axon initial segment.

Funding

This work was supported by the Human Frontiers Science Program (HFSP) Ref.RGPO018/2007-C, the European Community's Sixth Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement PITN-GA-2009-238242-DISCHROM project and grant agreement 278486-DEVELAGE, NIH Grants NIA P50-AG16573 and HD065160-01, the Instituto de Salud Carlos III—Ministerio de Sanidad y Consumo Proyecto FIS (Fondo Investigación

Sanitaria, Spain) through the E-RARE EuroRETT network and CureFXS ERare-EU/FIS P509102673, Grants P50-AG16573, HD065160-01 and SAF2007-6-8, the Fondation Lejeune (France), the Lilly Foundation (Spain), the Lilly Foundation (Spain), Botin Foundation, and the Cellex Foundation (Catalonia). J.V.S.-M is affiliated to the Neuroscience PhD program of the Autonomous University of Barcelona, Spain. ME is an ICREA Reseach Professor.

Supplementary material

Supplementary material is available at Brain online.

References

- Bakulski KM, Dolnoy DC, Sartor MA, Paulson HL, Konen JR, Lieberman AP, et al. Genome-wide DNA methylation differences between late-onset Alzheimer's disease and cognitively normal controls in human frontal cortex. *J Alzheimers Dis* 2012; 29: 571-88.
- Bane TK, LeBlanc JF, Lee TD, Riggs AD. DNA affinity capture and protein profiling by SELDI-TOF mass spectrometry: effect of DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: e69.
- Bibikova M, Le J, Barnes B, Saadnia-Melnyk S, Zhou L, Shen R, et al. Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium[®] assay. *Epigenomics* 2009; 1: 177-200.
- Bock C, Tomazou EM, Brinkman AB, Müller F, Simmer F, Gu H, et al. Quantitative comparison of genome-wide DNA methylation mapping technologies. *Nat Biotechnol* 2010; 28: 1106-14.
- Borchelt DR, Ratovitski T, van Lare J, Lee MK, Gonzales V, Jenkins NA, et al. Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron* 1997; 19: 939-45.
- Cao X, Yeo G, Muotri AR, Kuwabara T, Gage FH. Noncoding RNAs in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 2006; 29: 77-103.
- Cedar H, Bergman Y. Programming of DNA methylation patterns. *Annu Rev Biochem* 2012; 81: 97-117.
- Davies MN, Volta M, Pidsley R, Lunnon K, Dixit A, Lovestone S, et al. Functional annotation of the human brain methylome identifies tissue-specific epigenetic variation across brain and blood. *Genome Biol* 2012; 13: R43.
- Feinberg AP. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature* 2007; 447: 433-40.
- Feng J, Zhou Y, Campbell SL, Li T, Li E, Sweatt JD, et al. Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. *Nat Neurosci* 2010; 13: 423-30.
- Franklin JL, Johnson EM Jr. Suppression of programmed neuronal death by sustained elevation of cytoplasmic calcium. *Trends Neurosci* 1992; 15: 501-8.
- Guo H, Liu D, Gelbard H, Cheng T, Insalaco R, Fernández JA, et al. Activated protein C prevents neuronal apoptosis via protease activated receptors 1 and 3. *Neuron* 2004; 41: 563-72.
- Guo JU, Ma DK, Mo H, Ball MP, Jang MH, Bonaguidi MA, et al. Neuronal activity modifies the DNA methylation landscape in the adult brain. *Nat Neurosci* 2011; 14: 1345-51.
- Grubb MS, Burrone J. Building and maintaining the axon initial segment. *Curr Opin Neurobiol* 2010; 20: 1-8.
- Harris C, Kaether C, Thirakaran G, Sisodia S. Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2: a006270.
- Han H, Cortez CC, Yang X, Nichols PW, Jones PA, Liang G. DNA methylation directly silences genes with non-CpG island promoters and establishes a nucleosome occupied promoter. *Hum Mol Genet* 2011; 20: 4299-310.
- Harris RA, Wang T, Coarfa C, Nagarajan RP, Hong C, Downey SL, et al. Comparison of sequencing-based methods to profile DNA methylation and identification of monoallelic epigenetic modifications. *Nat Biotechnol* 2010; 28: 1097-105.
- Hedstrom KL, Ogawa Y, Rasband MN. AnkyrinG is required for maintenance of the axon initial segment and neuronal polarity. *J Cell Biol* 2008; 183: 635-40.
- Hernandez DG, Nalls MA, Gibbs JR, Arepalli S, van der Brug M, Chong S. Distinct DNA methylation changes highly correlated with chronological age in the human brain. *Hum Mol Genet* 2011; 20: 1164-72.
- Heyn H, Esteller M. DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. *Nat Rev Genet* 2012; 10: 679-92.
- Huang Y, Pastor WA, Shen Y, Tahiliani M, Liu DR, Rao A. The behaviour of 5-hydroxymethylcytosine in bisulfite sequencing. *PLoS One* 2010; 5: e8888.
- Hurd TJ, Koval OM, Li J, Wright PJ, Qian L, Snyder JS, et al. A β IV-spectrin/CaMKII signaling complex is essential for membrane excitability in mice. *J Clin Invest* 2010; 120: 3508-19.
- Hutchins AS, Mullen AC, Lee HW, Sykes KJ, High FA, Hendrich BD, et al. Gene silencing quantitatively controls the function of a developmental trans-activator. *Mol Cell* 2002; 10: 81-91.
- Ito H, Usuda N, Atsuzawa K, Iwamoto I, Sudo K, Katoh-Semba R, et al. Phosphorylation by extracellular signal-regulated kinase of a multidomain adaptor protein, vinexin, at synapses. *J Neurochem* 2007; 100: 545-54.
- Iwamoto K, Bundo M, Ueda J, Oldham MC, Ukai W, Hashimoto E, et al. Neurons show distinctive DNA methylation profile and higher inter-individual variations compared with non-neurons. *Genome Res* 2011; 21: 688-96.
- Jakovcic M, Akbarian S. Epigenetic mechanisms in neurological disease. *Nat Med* 2012; 188: 1194-204.
- Johnson MB, Kawasawa YI, Mason CE, Krsnik Z, Coppola G, Bogdanovic D, et al. Functional and evolutionary insights into human brain development through global transcriptome analysis. *Neuron* 2009; 62: 494-509.
- Kelly TK, Liu Y, Lay FD, Liang G, Berman BP, Jones PA. Genome-wide mapping of nucleosome positioning and DNA methylation within individual DNA molecules. *Genome Res* 2012; 22: 2497-506.
- Kress GJ, Dowling MJ, Eiserich LN, Mennerick S. Axonal sodium channel distribution shapes the depolarized action potential threshold of dentate granule neurons. *Hippocampus* 2010; 20: 558-71.
- Khare T, Pal S, Koncevicius K, Pal M, Kriukiene E, Luitkeviciute Z, et al. 5-hmC in the brain is abundant in synaptic genes and shows differences at the exon-intron boundary. *Nat Struct Mol Biol* 2012; 19: 1037-43.
- Kriaucionis S, Heintz N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science* 2009; 324: 929-30.
- Kulak MV, Cyr AR, Woodfield GW, Bogachek M, Spanheimer PM, Li T, et al. Transcriptional regulation of the GPX1 gene by TFAP2C and aberrant CpG methylation in human breast cancer. *Oncogene* 2012, in press. doi: 10.1038/onc.2012.400.
- Ladd-Acosta C, Pevsner J, Sabuncyan S, Yolken RH, Webster MJ, Dinkins T, et al. DNA methylation signatures within the human brain. *Am J Hum Genet* 2007; 81: 1304-15.
- Lee RS, Tamashiro KL, Aryee MJ, Murakami P, Seifuddin F, Herb B, et al. Adaptation of the CHARM DNA methylation platform for the rat genome reveals novel brain region-specific differences. *Epigenetics* 2011; 6: 1378-90.
- Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, Bernard A, et al. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 2007; 445: 168-76.
- Li X, Kumar Y, Zempel H, Mandelkow EM, Biernat J, Mandelkow E. Novel diffusion barrier for axonal retention of Tau in neurons and its failure in neurodegeneration. *EMBO J* 2011; 30: 4825-37.
- Lubin FD, Gupta S, Parrish RR, Grissom NM, Davis RL. Epigenetic mechanisms: critical contributors to long-term memory formation. *Neuroscientist* 2011; 17: 616-32.

- Matsuyama M, Mizusaki H, Shimono A, Mukai T, Okumura K, Abe K, et al. A novel isoform of *Vinexin*, *Vinexin gamma*, regulates *Sox9* gene expression through activation of MAPK cascade in mouse fetal gonad. *Genes Cells* 2005; 10: 421-34.
- Miller CA, Sweatt JD. Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron* 2007; 53: 857-69.
- Mitsumori T, Furuyashiki T, Momiya T, Nishi A, Shuto T, Hayakawa T, et al. Thromboxane receptor activation enhances striatal dopamine release, leading to suppression of GABAergic transmission and enhanced sugar intake. *Eur J Neurosci* 2011; 34: 594-604.
- Muja N, Blackman SC, Le Breton GC, DeVries GH. Identification and functional characterization of thromboxane A2 receptors in Schwann cells. *J Neurochem* 2001; 78: 446-56.
- Münzel M, Globisch D, Brückl T, Wagner M, Weizsäcker V, Michalakis S, et al. Quantification of the sixth DNA base hydroxymethylcytosine in the brain. *Angew Chem Int Ed Engl* 2010; 49: 5375-7.
- Numata S, Ye T, Hyde TM, Guitart-Navarro X, Tao R, Winking M, et al. DNA methylation signatures in development and aging of the human prefrontal cortex. *Am J Hum Genet* 2012; 90: 260-72.
- Obara Y, Kurose H, Nakahata N. Thromboxane A2 promotes interleukin-6 biosynthesis mediated by an activation of cyclic AMP-response element-binding protein in 1321N1 human astrocytoma cells. *Mol Pharmacol* 2005; 68: 670-9.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 2003; 39: 409-21.
- Okada S, Yamaguchi-Shima N, Shimizu T, Arai J, Yorimitsu M, Yokotani K. Centrally administered N-methyl-D-aspartate evokes the adrenal secretion of noradrenaline and adrenaline by brain thromboxane A2-mediated mechanisms in rats. *Eur J Pharmacol* 2008; 586: 145-50.
- Oliveira AM, Hemstedt TJ, Bading H. Rescue of aging-associated decline in *Dnmt3a2* expression restores cognitive abilities. *Nat Neurosci* 2012; 15: 1111-3.
- Öster B, Linné L, Christensen LL, Thomsen K, Ongen H, Dermitzakis ET, et al. Non-CpG island promoter hypomethylation and miR-149 regulate the expression of *SRPX2* in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2013; 132: 2303-15.
- Palmer LM, Stuart GI. Site of action potential initiation in layer 5 pyramidal neurons. *J Neurosci* 2006; 26: 1854-63.
- Panayotis N, Pratte M, Borges-Correira A, Ghata A, Villard L, Roux JC. Morphological and functional alterations in the substantia nigra pars compacta of the *Mecp2*-null mouse. *Neurobiol Dis* 2011a; 41: 385-97.
- Panayotis N, Ghata A, Villard L, Roux JC. Biogenic amines and their metabolites are differentially affected in the *Mecp2*-deficient mouse brain. *BMC Neurosci* 2011b; 12: 47.
- Paxinos G, Franklin KB. The mouse brain in stereotaxic coordinates. 2nd edn. San Diego: Academic Press; 2001.
- Rao JS, Keleshian VL, Klein S, Rapoport SI. Epigenetic modifications in frontal cortex from Alzheimer's disease and bipolar disorder patients. *Transl Psychiatry* 2012; 2: e132.
- Roux JC, Mamet J, Perrin D, Peyronnet J, Royer C, Cottet-Emard JM, et al. Neurochemical development of the brainstem catecholaminergic cell groups in rat. *J Neural Transm* 2003; 110: 51-65.
- Rui W, Jin Z, Zhe G, Song H. The methylation of C/EBP β gene promoter and regulated by GATA-2 protein. *Mol Biol Rep* 2013; 40: 797-801.
- Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WM, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJ, et al. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* 2009; 37: e45.
- Saura CA, Valero J. The role of CREB signaling in Alzheimer's disease and other cognitive disorders. *Rev Neurosci* 2011; 22: 153-69.
- Seidenfaden R, Desoeuvre A, Bosio A, Virard I, Cremer H. Glial conversion of SVZ-derived committed neuronal precursors after ectopic grafting into the adult brain. *Mol Cell Neurosci* 2006; 32: 187-98.
- Shulman JM, Chipendo P, Chibrik LB, Aubin C, Tran D, Keenan BT, et al. Functional screening of Alzheimer pathology genome-wide association signals in *Drosophila*. *Am J Hum Genet* 2011; 88: 232-8.
- Siegmund KD, Connor CM, Campan M, Long TI, Weisenberger DJ, Binzkiwicz D, et al. DNA methylation in the human cerebral cortex is dynamically regulated throughout the life span and involves differentiated neurons. *PLoS One* 2009; 2: e895.
- Song CX, Szulwach KE, Fu Y, Dai Q, Yi C, Li X, et al. Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine. *Nat Biotechnol* 2011; 29: 68-72.
- Strathmann FG, Wang X, Mayer-Pröschel M. Identification of two novel glial-restricted cell populations in the embryonic telencephalon arising from unique origins. *BMC Dev Biol* 2007; 7: 33.
- Szulwach KE, Li X, Li Y, Song CX, Wu H, Dai Q, et al. 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging. *Nat Neurosci* 2011; 14: 1607-16.
- Uemoto Y, Suzuki S, Terada N, Ohno N, Ohno S, Yamanaka S, et al. Specific role of the truncated betaIV-spectrin *Sigma6* in sodium channel clustering at axon initial segments and nodes of Ranvier. *J Biol Chem* 2007; 282: 6548-55.
- Urdinguio RG, Sanchez-Mut JV, Esteller M. Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies. *Lancet Neurol* 2009; 8: 1056-72.
- Wang SC, Oelze B, Schumacher A. Age-specific epigenetic drift in late-onset Alzheimer's disease. *PLoS One* 2008; 3: e2698.
- Winkels R, Jedlicka P, Weise FK, Schultz C, Deller T, Schwarzacher SW, et al. Reduced excitability in the dentate gyrus network of betaIV-spectrin mutant mice in vivo. *Hippocampus* 2009; 19: 677-86.
- Wouters L, Göhlmann HW, Bijns L, Kass SJ, Molenberghs G, Lewi PJ. Graphical exploration of gene expression data: a comparative study of three multivariate methods. *Biometrics* 2003; 59: 1131-9.
- Xiao J, Perry G, Troncoso J, Monteiro MJ. alpha-calcium-calmodulin-dependent kinase II is associated with paired helical filaments of Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55: 954-63.
- Xin Y, Chanvion B, Liu MM, Galfalvy H, Costa R, Ilievski B, et al. Genome-wide divergence of DNA methylation marks in cerebral and cerebellar cortices. *PLoS One* 2010; 5: e11357.
- Yagami T, Takahara Y, Ishibashi C, Sakaguchi G, Itoh N, Ueda K, et al. Amyloid beta protein impairs motor function via thromboxane A2 in the rat striatum. *Neurobiol Dis* 2004; 16: 481-9.
- Yang Y, Ogawa Y, Hedstrom KL, Rasband MN. betaIV spectrin is recruited to axon initial segments and nodes of Ranvier by ankyrinG. *J Cell Biol* 2007; 176: 509-19.
- Yeo G, Holte D, Kreiman G, Burge CB. Variation in alternative splicing across human tissues. *Genome Biol* 2004; 5: R74.
- Zhou D, Lambert S, Malen PL, Carpenter S, Boland LM, Bennett V. AnkyrinG is required for clustering of voltage-gated Na channels at axon initial segments and for normal action potential firing. *J Cell Biol* 1998; 143: 1295-304.

RAPID COMMUNICATION

Promoter Hypermethylation of the Phosphatase DUSP22 Mediates PKA-Dependent TAU Phosphorylation and CREB Activation in Alzheimer's Disease

Jose Vicente Sanchez-Mut,¹ Ester Aso,² Holger Heyn,¹ Tadashi Matsuda,³ Christoph Bock,⁴ Isidre Ferrer,² and Manel Esteller^{1,5,6*}

ABSTRACT: Genetic screening in Alzheimer's disease (AD) has identified only a handful of genes that are mutated in the disorder. Thus, for a very large proportion of patients, the biology of their disease is poorly understood. Epigenetic alterations may provide an explanation in these cases. Using DNA methylation profiles of human hippocampus from controls and patients, we have identified the presence of promoter hypermethylation of the dual-specificity phosphatase 22 (DUSP22) gene in AD. DUSP22 is a likely candidate gene for involvement in the pathogenesis of the disorder since, as we demonstrate here, it inhibits PKA activity and thereby determines TAU phosphorylation status and CREB signaling. © 2014 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: epigenetics; DNA methylation; hippocampus; brain and neurodegeneration

Alzheimer's disease (AD) is the most frequent degenerative brain disorder in western society. It affects 11% of people older than 65 years and 50% of those older than 85 years. It is characterized by a progressive

decline in mental abilities, neuronal loss and accumulation of amyloid plaques and neurofibrillary tangles of phosphorylated TAU (Querfurth et al., 2010). Epidemiologically, there are two main variants of AD, a rare familial early-onset variant, caused by mutations in amyloid precursor protein (APP), presenilin 1 (PSEN1) or presenilin 2 (PSEN2), and a sporadic late-onset variant, representing 95% of cases and for which only one gene, APOE, has been clearly associated as a risk factor (Querfurth et al., 2010). In recent decades, attempts to discover new risk factors for AD using genetic screening have not been as successful as expected (Bertram et al., 2008). A consideration of epigenetics offers additional opportunities to identify disease-associated genes. In this context, initial epigenetic screening has already identified genes that are deregulated by DNA methylation in case-control studies of AD (Seigmund et al., 2009; Bakulski et al., 2012; Rao et al., 2012). Herein, we focus our attention on the DNA methylation profile in one of the brain regions most commonly affected in AD, the hippocampus.

We compared the DNA methylation status of 27,578 individual CpG sites corresponding to 14,475 unique genes (Bibikova et al., 2009) in five DNA samples of control hippocampus grey matter, five Braak stage I–II, five Braak stage III–IV, and five Braak stage V–VI DNA samples from sporadic late-onset AD cases (Supporting Information). The available clinicopathological information (Braak staging, age, and gender) for the control samples in this discovery cohort is described in Supporting Information. To detect sites that are differentially methylated in AD, we selected those CpGs that yielded a more than 25% average beta-value difference between controls and Braak stage V–VI samples with increasing CpG methylation differences according to their Braak stage. The DNA methylation data obtained are freely available in the Gene Expression Omnibus database: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?token=ttmzzyksmukiafk&acc=GSE45775>.

Using this approach, four CpG methylation probes corresponding to three individual genes showed a

¹Epigenetics and Biology Program (PEBC), Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), Barcelona, Catalonia, Spain; ²Neuropathology Institute, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL)-Hospital Universitari de Bellvitge, Universitat de Barcelona, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Catalonia, Spain; ³Department of Immunology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Sapporo, Japan; ⁴CeMM Research Center for Molecular Medicine of the Austrian Academy of Sciences, Vienna, Austria; ⁵Department of Physiological Sciences II, School of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain; ⁶Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Barcelona, Catalonia, Spain

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article

J.V.S.-M. is currently at Neuroscience PhD program of the Autonomous University of Barcelona, Spain.

Grant sponsor: Cellex Foundation, the Botin Foundation, the Fundació Agrupació Mutua and the Health and Science Departments of the Catalan Government (Generalitat de Catalunya).

*Correspondence to: Manel Esteller, Epigenetics and Biology Program (PEBC), Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), 3rd Floor, Hospital Duran i Reynals, Av. Gran Via de L'Hospitalet 199, 203, 08908 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Catalonia, Spain.

E-mail: mesteller@idibell.cat

Received 20 May 2013; Revised 18 December 2013; Accepted for publication 9 January 2014.

DOI 10.1002/hipo.22245

Published online 00 Month 2014 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

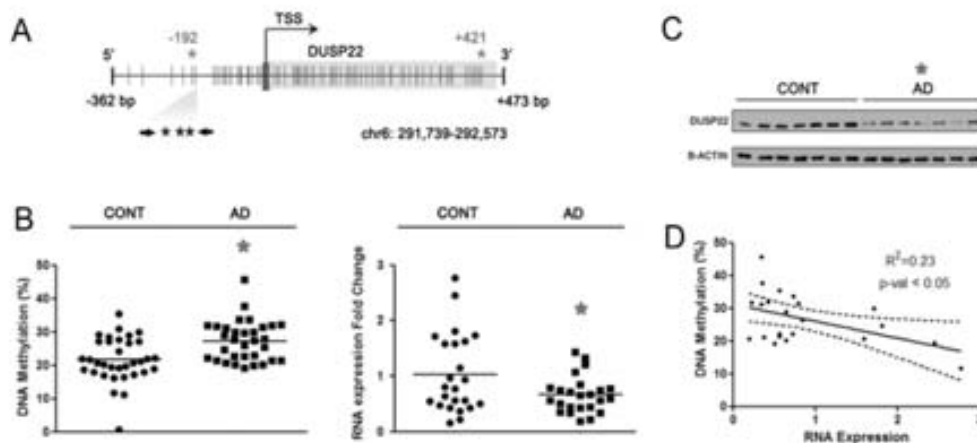


FIGURE 1. DUSP22 promoter hypermethylation and diminished expression in hippocampus of AD patients. (a) Schematic representation of DUSP22 promoter. CpGs interrogated by microarray and pyrosequencing are represented by grey and black stars, respectively. Vertical lines represent CpG dinucleotides. (b) Left, DNA methylation in control and AD samples measured by pyrosequencing.

Mean values for three CpGs are shown. Right, fold change in RNA expression between control and AD samples. (c) DUSP22 protein levels in control and AD samples measured by western blot. (d) Correlation of DUSP22 DNA methylation and RNA expression. * $P < 0.05$ in two-tailed Student's t -test. Correlation p -value corresponds to the linear regression coefficient.

significant difference (Mann–Whitney test, FDR adjusted $P < 0.05$): dual-specificity phosphatase 22 (DUSP22), claudin 15 (CLDN15), and quiescin Q6 sulfhydryl oxidase 1 (QSCN6). DUSP22 is represented by two CpG probes that are differentially methylated between control and AD samples (Fig. 1a). There was a linear relationship between DUSP22 methylation and the Braak stage (Pearson correlation coefficient $R = 0.95$, $P < 0.05$) (Supporting Information). In addition, because cognitively normal controls above age 80 might also have Braak I & II, we pooled these samples with the five AD Braak stage I–II samples as our reference population. Using this approach, the two DUSP22 CpG probes retained the highest differences between the reference population and the pooled AD Braak stage III–IV–V–VI group with a 13.5% and 12.7% DNA methylation difference. For all these reasons, we studied this candidate gene further for evidence of epigenetic dysregulation.

We next confirmed the presence of DUSP22 hypermethylation in the disease-associated DNAs using a different DNA methylation detection technology (pyrosequencing) in an independent set of 25 control hippocampus grey matter and 25 AD samples (Supporting Information and Fig. 1b). The available clinicopathological information (Braak staging, age, and gender) for the control samples in this validation cohort is described in Supporting Information. The lower methylation difference found in the validation set in comparison to the discovery set could be explained because the pyrosequencing data is an average across a larger region that contains three CpGs where only one is a critical CpG derived from the DNA methylation microarray. We observed downregulation of the DUSP22 RNA transcript (0.67 ± 0.07 fold change; t -test $P < 0.05$) (Fig. 1b) and protein (0.50 ± 0.07 fold change; t -test

$P < 0.05$) (Fig. 1c) in the AD hippocampus samples compared with the control tissues. In keeping with the accepted epigenetic concept that links gene promoter hypermethylation and transcriptional inactivation (Portela et al., 2010), we observed a correlation between DUSP22 DNA methylation and diminished RNA expression ($R^2 = 0.23$, $P < 0.05$) (Fig. 1d).

Once we had identified the presence of DUSP22 promoter hypermethylation and downregulation in the hippocampus of AD patients, we examined its potential functional consequences. Dual-specific phosphatases (DUSPs) can dephosphorylate both tyrosine and serine/threonine residues (Patterson et al., 2009). DUSP22, also known as JNK pathway-associated phosphatase (JKAP), is expressed in various types of tissues and organs (Chen et al., 2009), including the hippocampus (Hawrylycz et al., 2012), suggesting that it may participate in essential biological processes. The TAU protein could be an important target for DUSP22-mediated dephosphorylation in AD. TAU Thr231 phosphorylation is one of the first phosphorylation events in AD and has a major role in TAU regulation (Luna-Muñoz et al., 2007). Although phosphoserine/phosphothreonyl protein phosphatase-2A (PP-2A) appears to be the most active enzyme in dephosphorylating the abnormal TAU to a near-normal state (Wang et al., 2013), other phosphatases might also play a role. Due to the lack of human cell culture models of AD, we screened a panel of seven cell lines from neuronal lineages (the neuroblastoma cell lines SH-SY5Y, SK-N-AS, SK-N-BE(2), SK-N-F1, SKN-JD, and SK-N-SH) for TAU Thr231 phosphorylation (Fig. 2a). In this setting, SK-N-BE(2) presented the highest levels of TAU Thr231 phosphorylation (Fig. 2a) and was selected for further experimentation. Stable short-hairpin RNA (shRNA) depletion of DUSP22 in

Hippocampus

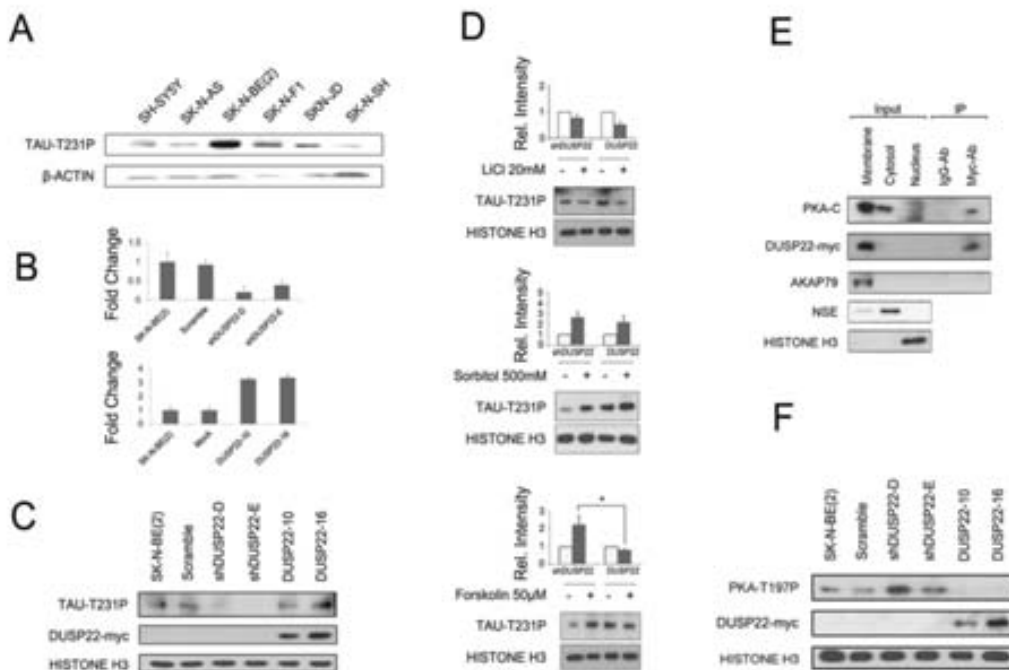


FIGURE 2. DUSP22 regulates TAU phosphorylation through PKA. (a) Levels of TAU Thr231 phosphorylation across different neuronal cell lines. (b) Stable clones interfering (top) and overexpressing (bottom) DUSP22. (c) Levels of TAU Thr231 phosphorylation across stable clones. (d) Levels of TAU Thr231 phosphorylation between interfered and overexpressing DUSP22 SK-N-BE(2) cells after 24 h of 20 mM LiCl, 30 min of 500 mM sorbitol and 30 min

of 50 μ M forskolin treatments. (e) Top, immunoprecipitation between DUSP22-myc tagged and catalytic subunits of PKA. Below, western blot to confirm cellular fractionation using membrane (AKAP79), cytosol (NSE) and nuclear (Histone H3) located proteins. (f) Basal levels of PKA Thr197 of wild-type, scramble, interfered and overexpressing DUSP22 SK-N-BE(2) cells.

SK-N-BE(2) cells caused a loss of TAU Thr231 phosphorylation in comparison with the shRNA scramble cells (Fig. 2b). In the reciprocal experiment we found the equivalent result, whereby stable transfection of DUSP22 in SK-N-BE(2) cells caused an increase in TAU Thr231 phosphorylation (Fig. 2c). These data suggest that DUSP22 affects TAU Thr231 phosphorylation status but in an inverse manner, contrary to what was expected. Thus, TAU is not itself a direct target of DUSP22, but its phosphorylation depends indirectly on the studied phosphatase.

Several candidates could mediate the effect of DUSP22 on TAU phosphorylation, the most likely targets being those kinases that phosphorylate TAU. In this regard, we studied the glycogen synthase kinase 3 (GSK3 β), p38 mitogen-activated protein kinase (p38) and cAMP-dependent protein kinase (PKA) proteins which are all able to phosphorylate TAU at the Thr231 site (Wang et al., 2013). The use of a GSK3 β inhibitor (lithium) caused a similar reduction of TAU Thr231 phosphorylation in both DUSP22 shRNA-depleted (0.7 ± 0.12) and transfected SK-N-BE(2) (0.5 ± 0.13) cells (Fig. 2d). In a similar way, the use of a p38 activator (sorbitol) induced a sim-

ilar increase in TAU Thr231 phosphorylation in both DUSP22 experimental models, stable downregulation (2.7 ± 0.5) and stable overexpression (2.2 ± 0.6) (Fig. 2d). These findings suggest that the two TAU Thr231 phosphorylation pathways are unaffected by DUSP22 expression. A different pattern was observed for PKA, wherein the use of the PKA activator forskolin was able to induce TAU Thr231 phosphorylation in DUSP22 shRNA-depleted cells (2.2 ± 0.5), but not in DUSP22-overexpressing SK-N-BE(2) cells (0.8 ± 0.3) (Fig. 2d). This result suggests that DUSP22 inhibits PKA activity, and the link between the two pathways was confirmed by the observation that both proteins are located in the cellular membrane subfraction (Fig. 2c) and co-immunoprecipitate (Fig. 2e).

PKA has a complex regulation in which two catalytic and two regulatory subunits are differentially associated and phosphorylated (Taylor et al., 2012). In response to cAMP production, PKA regulatory subunits release the catalytic components which are concomitantly phosphorylated at Thr197 constituting the active form of the enzyme (Taylor et al., 2012). DUSP22 shRNA depletion increased PKA Thr197 phosphorylation, while

Hippocampus

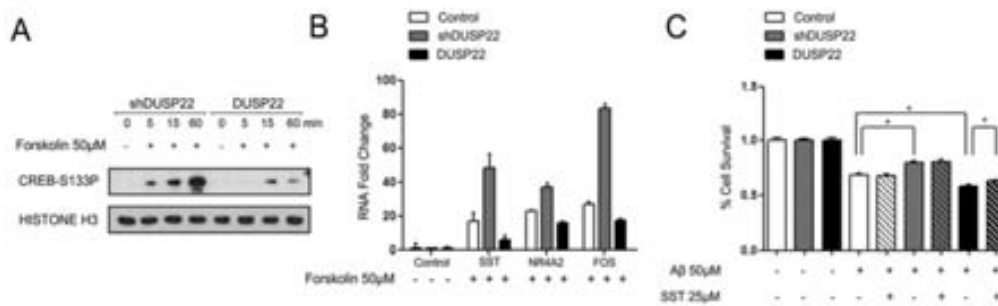


FIGURE 3. DUSP22 regulates CREB phosphorylation and activity through PKA. (a) Different kinetics of CREB activation between interfered and overexpressing DUSP22 SK-N-BE(2) cells measured by Ser133 phosphorylation. (b) RNA expression patterns of genes downstream CREB wild type, interfered and overexpressing

DUSP22 SK-N-BE(2) cells after 2 h of 50 μ M forskolin treatment. (c) Percentage cell survival after 24 h of 50 μ M A β treatment in wild type, interfered and overexpressing DUSP22 SK-N-BE(2) cells with and without external addition of 25 μ M SST peptide measured by MTT assay. * $P < 0.05$ in two-tailed Student's t -test.

DUSP22 transfection decreased phosphorylation. Wild-type and shRNA scramble cells showed intermediate phosphorylation (Fig. 2f). These data reinforce the idea of DUSP22 acting as a PKA inhibitor.

In addition to the DUSP22 role on PKA-mediated TAU phosphorylation, the epigenetic silencing of the studied phosphatase can have another physiopathological role in PKA and the disease: its impact on the cAMP response element-binding protein (CREB) signaling pathway. CREB activity is nowadays considered critical for neuronal function and regulates synaptic plasticity, long-term memory formation and neuronal survival (Lonze et al., 2002); all processes that are altered in AD (Querfurth et al., 2010). Given that PKA activates CREB by phosphorylation of Ser133 (Johannessen et al., 2004), we analyzed this pathway in our model. We found that in SK-N-BE(2) cells with stable overexpression of DUSP22 the phosphorylation of CREB Ser133 upon the use of the PKA activator was delayed relative to DUSP22-shRNA-depleted cells (Fig. 3a). Most significantly, we also observed that DUSP22 through PKA was able to regulate the expression of CREB target downstream genes, such as somatostatin (SST), nuclear receptor subfamily 4 group member 2 (NR4A2) and FBJ osteosarcoma oncogene (FOS). We found that in DUSP22-shRNA-depleted cells the use of the PKA activator induced the expression of the described CREB-response genes in comparison with the lack of effect in DUSP22 stable transfected cells (Fig. 3b). With respect to the CREB target genes, the effect on SST is of particular note because its expression is a protective factor against amyloid beta (A β) toxicity (Rubio et al., 2012). In this regard, we were able to show that DUSP22-shRNA-depleted cells have a significantly higher survival ability (measured by the MTT assay) than the cells with stable overexpression of DUSP22 (Fig. 3c). Most importantly, the external addition of SST in the DUSP22-overexpressing cells can partially rescue the survival ability of these cells upon A β use (Fig. 3c), providing evi-

Hippocampus

dence of the role of STT as a neuroprotective factor and the contribution of DUSP22 to these processes. Thus, these latter data imply that the inhibition of PKA by DUSP22 also causes a loss of CREB phosphorylation and of the activity that affects its downstream effector genes and functions, such as STT and cell survival.

DUSP22, VHR-related MKPX (VHX), JNK stimulatory phosphatase-1 (JSP-1), and LMW-DSP2 are members of the atypical dual specificity phosphatases family (DUSPs); these small proteins lack the typical N-terminal regulatory domain of DUSPs proteins. DUSPs are important signaling regulators that dephosphorylate tyrosine and serine/threonine residues and can act on many substrates (Patterson et al., 2009). Herein, we have demonstrated that DUSP22 is epigenetically deregulated in AD and that it affects PKA signaling in neuroblastoma cells. Our results suggest that DUSP22 expression could elicit a handicap in PKA/GSK3 β regulation and TAU phosphorylation. Furthermore, this suggests that high-expressing DUSP22 cells would have a special tendency to accumulate hyperphosphorylated TAU, thereby reducing the viability of such cells. Therefore, the increase in DNA promoter methylation in DUSP22 observed in AD could be consequence of an imbalance of cell populations, by which high DUSP22-expressing cells would persistently dwindle in parallel with the progression of the disease, and only epigenetically-silenced DUSP22 cells would remain viable. We cannot reject the possibility that cells, in order to increase their survival, actively methylate DUSP22 promoter when exposed to A β -induced toxicity. Nevertheless, it highlights the role of PKA/GSK3 β signaling in AD and supports the idea that treatments inducing DUSP22 inhibition could benefit AD patients.

Additionally, our results suggest that DUSP22 expression could also compromise A β -induced cell survival through PKA/CREB inhibition outstanding the pro-survival role of the downstream SST gene. Complete disruption of CREB is lethal

(Rudolph et al., 1998), but its partial disturbance has been associated to several neurological disorders. Coffin-Lowry syndrome and Rubenstein-Taybi Syndrome are caused by mutations in CREB pathway genes (Petrij et al., 1995; Trivier et al., 1996). CREB signaling deficits have also been reported in Huntington's disease (Steffan et al., 2000), Parkinson's disease (Andersson et al., 2001) and AD (Saura et al., 2011). Namely, much time has passed since CREB was initially associated with AD in seminal studies reporting a decrease of CREB phosphorylation in AD (Yamamoto-Sasaki et al., 1999). Similarly, the AD Tg2576 mice model also exhibits reduced CREB expression (Pugazhenthil et al., 2011) and phosphorylation (Dineley et al., 2001), suggesting a general disturbance of CREB signaling in AD. In fact, A β can impair PKA/CREB signaling at different levels. On one hand, A β decreases PKA activity and CREB phosphorylation in hippocampal neurons (Vitolo et al., 2002). On the other hand, A β also inhibits CREB regulated transcription coactivator 1 (CRTC1) with similar results in CREB signaling (España et al., 2010); in both cases, this resulted in reduced synaptic plasticity and memory formation. Our data is in line with these results and reinforce the idea that CREB signaling could be affected in AD.

The importance of epigenetic alterations to our understanding of human disease is increasingly well established and such changes are probably also involved in neurodegenerative disorders, such as AD. Herein, we have shown that in the hippocampus of AD patients a particular phosphatase (DUSP22) undergoes promoter hypermethylation and loss of expression. We further demonstrate that this enzyme could be relevant, as a PKA inhibitor, in TAU phosphorylation and CREB signaling, two pathways that are essential in AD pathobiology. However, a limitation of the studies doing whole tissue epigenetics, such as this one, derives from the recognition that the number of neurons in a hippocampus varies wildly between Braak V and Braak I samples, thus the distinct DNA methylation profiles could also be due to changing cell type populations with disease, rather than a mechanism of disease in neurons. These issues will be the focus of future research in this area.

Acknowledgments

M.E. is an ICREA Research Professor.

REFERENCES

- Andersson M, Konradi C, Cenci MA. 2001. cAMP response element-binding protein is required for dopamine-dependent gene expression in the intact but not the dopamine-denervated striatum. *J Neurosci* 21:9930–9943.
- Bakulski KM, Dolinsky DC, Sartor MA, Paulson HL, Konen JR, Lieberman AP, Albin RL, Hu H, Rozek LS. 2012. Genome-wide DNA methylation differences between late-onset Alzheimer's disease and cognitively normal controls in human frontal cortex. *J Alzheimers Dis* 29:571–588.
- Bertram L, Tanzi RE. 2008. Thirty years of Alzheimer's disease genetics: The implications of systematic meta-analyses. *Nat Rev Neurosci* 9:768–778.
- Bibikova M, Le J, Barnes B, Saedinia-Melnyk S, Zhou L, Shen R, Gunderson KL. 2009. Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium[®] assay. *Epigenomics* 1:177–200.
- Chen AJ, Zhou G, Juan T, Colicos SM, Cannon JP, Cabrera-Hansen M, Meyer CF, Jurecic R, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Fletcher F, Tan TH, Belmont JW. 2002. The dual specificity JKAP specifically activates the c-Jun N-terminal kinase pathway. *J Biol Chem* 277:36592–36601.
- Dineley KT, Westerman M, Bui D, Bell K, Ashe KH, Sweatt JD. 2001. Beta-amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade via hippocampal alpha7 nicotinic acetylcholine receptors: In vitro and in vivo mechanisms related to Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21:4125–4133.
- España J, Valero J, Miñano-Molina AJ, Mauguier R, Martín E, Guardia-Laguarta C, Lleó A, Giménez-Llort L, Rodríguez-Alvarez J, Saura CA. 2010. beta-Amyloid disrupts activity-dependent gene transcription required for memory through the CREB coactivator CRTC1. *J Neurosci* 30:9402–9410.
- Hawrylycz MJ, Lein ES, Guillozet-Bongaarts AL, Shen EH, Ng L, Miller JA, van de Lagemaar LN, Smith KA, Ebbert A, Riley ZL, Abajian C, Beckmann CF, Bernard A, Bertagnoli D, Boe AF, Cartagena PM, Chakravarty MM, Chapin M, Chong J, Dalley RA, Daly BD, Dang C, Datta S, Dee N, Dolbear TA, Faber V, Feng D, Fowler DR, Goldy J, Gregor BW, Haradon Z, Haynor DR, Hohmann JG, Horvath S, Howard RE, Jeromin A, Jochim JM, Kinnunen M, Lau C, Lazarek ET, Lee C, Lemon TA, Li L, Li Y, Morris JA, Overly CC, Parker PD, Parry SE, Reding M, Royall JJ, Schulkin J, Sequeira PA, Slaughterbeck CR, Smith SC, Sodi AJ, Sunkin SM, Swanson BE, Vawter MP, Williams D, Wohnoutka P, Zielke HR, Geschwind DH, Hof PR, Smith SM, Koch C, Grant SG, Jones AR. 2012. An anatomically comprehensive atlas of the adult human brain transcriptome. *Nature* 489:391–399.
- Johannessen M, Delghandi MP, Moens U. 2004. What turns CREB on? *Cell Signal* 16:1211–1227.
- Lonze BE, Riccio A, Cohen S, Ginty DD. 2002. Apoptosis, axonal growth defects, and degeneration of peripheral neurons in mice lacking CREB. *Neuron* 34:371–385.
- Luna-Muñoz J, Chávez-Macías L, García-Sierra F, Mena R. 2007. Earliest stages of tau conformational changes are related to the appearance of a sequence of specific phospho-dependent tau epitopes in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 12:365–375.
- Patterson KL, Brummer T, O'Brien PM, Daly RJ. 2009. Dual-specificity phosphatases: Critical regulators with diverse cellular targets. *Biochem J* 418:475–489.
- Portela A, Esteller M. 2010. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* 28:1057–1068.
- Petrij F, Giles RH, Dauwerse HG, Saris JJ, Hennekam RC, Masuno M, Tommerup N, van Ommen GJ, Goodman RH, Peters DJ, Breuning MH. 1995. Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP. *Nature* 376:348–351.
- Pugazhenthil S, Wang M, Pham S, Sze CI, Eckman CB. 2011. Down-regulation of CREB expression in Alzheimer's brain and in A β -treated rat hippocampal neurons. *Mol Neurodegener* 6:60.
- Querfurth HW, LaFerla FM. 2010. Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 362:329–344.
- Rao JS, Keleshian VL, Klein S, Rapoport SI. 2012. Epigenetic modifications in frontal cortex from Alzheimer's disease and bipolar disorder patients. *Transl Psychiatry* 2:e132.
- Rubio A, Sánchez-Mut JV, García E, Velásquez ZD, Oliver J, Esteller M, Avila J. 2012. Epigenetic control of somatostatin and corticotropin expression by β amyloid peptide. *J Neurosci Res* 90:13–20.
- Rudolph D, Tafuri A, Gass P, Hämmerling GJ, Arnold B, Schütz G. 1998. Impaired fetal T cell development and perinatal lethality in

Hippocampus

- mice lacking the cAMP response element binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:4481–4486.
- Saura CA, Valero J. 2011. The role of CREB signaling in Alzheimer's disease and other cognitive disorders. *Rev Neurosci* 22:153–169.
- Siegmund KD, Connor CM, Campan M, Long TL, Weisenberger DJ, Biniszkiwicz D, Jaenisch R, Laird PW, Akbarian S. 2007. DNA methylation in the human cerebral cortex is dynamically regulated throughout the life span and involves differentiated neurons. *PLoS One* 2:e895.
- Steffan JS, Kazantsev A, Spasic-Boskovic O, Greenwald M, Zhu YZ, Gohler H, Wanker EE, Bates GP, Housman DE, Thompson LM. 2000. The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6763–6768.
- Taylor SS, Ilouz R, Zhang P, Kornev AP. 2012. Assembly of allosteric macromolecular switches: Lessons from PKA. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:646–658.
- Trivier E, De Cesare D, Jacquot S, Pannetier S, Zackai E, Young I, Mandel JL, Sassone-Corsi P, Hanauer A. 1996. Mutations in the kinase Rsk-2 associated with Coffin-Lowry syndrome. *Nature* 384:567–570.
- Vinolo OV, Sant'Angelo A, Costanzo V, Battaglia F, Arancio O, Shelanski M. 2002. Amyloid beta-peptide inhibition of the PKA/CREB pathway and long-term potentiation: Reversibility by drugs that enhance cAMP signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:13217–13221.
- Wang JZ, Xia YY, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. 2013. Abnormal hyperphosphorylation of tau: Sites, regulation, and molecular mechanism of neurofibrillary degeneration. *J Alzheimers Dis* 33:S123–S139.
- Yamamoto-Sasaki M, Ozawa H, Saito T, Rösler M, Riederer P. 1999. Impaired phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein in the hippocampus of dementia of the Alzheimer type. *Brain Res* 824:300–303.

Anexo 8. Efecto de la inhibición de PKA. Fosforilación de JNK y FAK tras inhibir PKA con el inhibidor H89 en los ARN-sh (shDUSP22) y los clones DUSP22-myc (DUSP22) en células SK-N-BE(2) (izquierda). Fosforilación de FAK tras inhibir PKA con el inhibidor H89 en células H1299 (derecha).

