

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 656**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.03.2015 PCT/EP2015/054757**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.09.2015 WO15132397**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2015 E 15709878 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2019 EP 3114486**

54 Título: **Preproteínas mitocondriales como marcadores para la enfermedad de Alzheimer**

30 Prioridad:

07.03.2014 EP 14158408

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

14.07.2020

73 Titular/es:

**ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITÄT FREIBURG
(100.0%)**

**Fahnenbergplatz 1
79085 Freiburg, DE**

72 Inventor/es:

**MEISINGER, CHRIS;
VÖGTLE, NORA;
MOSSMANN, DIRK;
GLASER, ELZBIETA;
GRAFF, CAROLINE y
ZAHEDI, RENÉ, P.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 773 656 T3

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

DESCRIPCIÓN

Preproteínas mitocondriales como marcadores para la enfermedad de Alzheimer

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer en un paciente. La presente invención se refiere, además, al uso de al menos una proteína mitocondrial prematura como marcador para la enfermedad de Alzheimer y al uso de un anticuerpo dirigido contra una proteína mitocondrial prematura para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer. La presente invención describe, además, anticuerpos específicos y también se refiere a un agente antiinflamatorio y/o antioxidante para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en una población de pacientes específica y métodos para la detección de un compuesto eficaz contra la enfermedad de Alzheimer.

Antecedentes de la invención

15 La enfermedad de Alzheimer (AD, por sus siglas en inglés) es la forma más común de demencia. Muy a menudo, la AD se diagnostica en personas mayores de 65 años, aunque la AD de aparición temprana, menos prevalente, puede aparecer mucho antes. La AD empeora a medida que progresa y finalmente conduce a la muerte. Hasta la fecha no existe cura para la enfermedad. La AD se desarrolla durante una cantidad de tiempo desconocida y variable antes de volverse completamente notoria, y puede progresar sin ser diagnosticada durante años.

20 La AD se caracteriza por una pérdida de neuronas y sinapsis en la corteza cerebral y ciertas regiones subcorticales. Esta pérdida causa una pronunciada atrofia de las regiones afectadas, incluida la degeneración en el lóbulo temporal y el lóbulo parietal, y partes de la corteza frontal y la circunvolución del cíngulo. Estudios con el uso de MRI y PET han documentado reducciones en el tamaño de regiones cerebrales específicas en personas con AD a medida que progresaron de alteración cognitiva leve a AD y en comparación con imágenes similares de adultos ancianos sanos.

25 La AD normalmente se diagnostica clínicamente a partir de los antecedentes del paciente, los antecedentes colaterales de parientes y observaciones clínicas, en función de la presencia de rasgos neurológicos y neuropsicológicos característicos y la ausencia de afecciones alternativas. Se puede usar la obtención avanzada de imágenes para uso médico con CT o MRI y SPECT o PET para ayudar a excluir otra patología cerebral. La evaluación de las funciones intelectuales, incluida una prueba de memoria, pueden caracterizar adicionalmente el estado de la enfermedad. El diagnóstico se puede confirmar con precisión muy alta de manera póstuma, cuando el material cerebral está disponible y se puede examinar histológicamente.

30 Como puede deducirse a partir de las declaraciones introductorias previas tomadas de Wikipedia (<http://en.wikipedia.org>), no existe actualmente ningún método confiable para diagnosticar la AD en un sujeto vivo que padece potencialmente la enfermedad mediante el uso de un marcador, es decir, una prueba *in vitro*, mucho menos para diagnosticar una etapa inicial de la enfermedad mediante el uso de un marcador.

35 Como se describe en una revisión reciente (Reddy and Beal; "Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease"; Trends in Molecular Medicine, tomo 14, núm. 2 (2008)), se sabe que la A β se localiza en las mitocondrias y causa daño mitocondrial. Esta A β intracelular y su efecto tóxico particularmente sobre las mitocondrias se describen como un evento en fase bastante temprana de la progresión de la AD.

40 Como se indicó anteriormente, no existe cura para la AD; solo parece ser posible aliviar algunos de los síntomas o retardar el inicio de la enfermedad. Cabe señalar en este sentido que, existen indicios de que agentes antiinflamatorios y/o antioxidantes pueden ser beneficiosos para inhibir o retardar el inicio de la AD, dado que pacientes que padecen artritis y se tratan con agentes antiinflamatorios exhiben una tasa reducida de AD. Este efecto beneficioso podría producirse particularmente si se trata a pacientes con AD con agentes antiinflamatorios o antioxidantes en una etapa temprana de la enfermedad (ver Marty "Anti-inflammatory drugs and Alzheimer's disease"; BMJ 2003; 327:353 y Breitner et al. "Extended results of the Alzheimer's disease anti-inflammatory prevention trial"; Alzheimers Dement. 2011; 7(4):402-411).

45 La publicación internacional WO 00/55350 se refiere a polinucleótidos asociados al cáncer específicos de tejidos identificados recientemente y los polipéptidos codificados por estos polinucleótidos conocidos colectivamente en la publicación internacional WO 00/55350 como "antígenos cancerosos", y a las secuencias génicas completas asociadas a estos y a los productos de expresión de estos, así como al uso de dichos antígenos cancerosos específicos de tejidos para la detección, prevención y tratamiento de trastornos específicos de tejidos, particularmente, la presencia de cáncer.

La publicación internacional WO 03/087768 se refiere a dianas mitocondriales para ensayos de detección de fármacos y para la intervención terapéutica en el tratamiento de enfermedades asociadas a la función mitocondrial alterada. En la presente memoria se describen secuencias de aminoácidos completas de polipéptidos específicos,

en donde los polipéptidos comprenden el proteoma mitocondrial cardíaco humano, el uso de proteínas fraccionadas derivadas de preparaciones mitocondriales altamente purificadas, para identificar componentes mitocondriales no reconocidos anteriormente.

- 5 Como se evidencia a partir de lo indicado anteriormente, existe una gran necesidad de marcadores que indiquen la AD y métodos para diagnosticar la AD, particularmente en un sujeto vivo y en una etapa temprana de la AD. Además, existe una gran necesidad de desarrollar medicamentos eficaces contra la AD y de detectar compuestos por su actividad contra la AD.

Objetivos y compendio de la invención

- 10 Los inventores de la presente invención hallaron de manera sorprendente que la A β , que está presente en células y, en particular, en mitocondrias de pacientes con AD, no solo inhibe PreP, la peptidasa mitocondrial responsable de la degradación de los péptidos de señalización, sino también MPP, la peptidasa mitocondrial responsable de la eliminación de presecuencias dirigidas a la mitocondria. En consecuencia, la A β causa, por lo tanto, una acumulación de proteínas precursoras y precursoras intermediarias de procesamiento mitocondriales y dichas proteínas se pueden usar, por lo tanto, como marcadores para la AD.

- 15 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar la AD en un paciente que comprende las siguientes etapas:

a) Proporcionar una muestra de un paciente que posiblemente padece AD;

b) Determinar la cantidad de al menos una proteína mitocondrial prematura en dicha muestra, en donde dicha proteína mitocondrial prematura comprende al menos parte de su presecuencia dirigida a la mitocondria; y

- 20 c) Comparar la cantidad obtenida en la etapa b) con la cantidad de dicha al menos una proteína mitocondrial prematura determinada en una muestra testigo, en donde dicha muestra testigo se deriva de un sujeto que no padece AD;

25 en donde una cantidad más alta de dicha al menos una proteína mitocondrial prematura en la muestra de un paciente que posiblemente padece AD en comparación con la cantidad de dicha al menos una proteína mitocondrial prematura en la muestra testigo indica AD en dicho paciente.

Este método también se puede formular como un método *in vitro* para diagnosticar la AD en un paciente que comprende las siguientes etapas:

a) Proporcionar una muestra de un paciente que posiblemente padece AD;

- 30 b) Determinar la cantidad m1 de al menos una proteína mitocondrial prematura en dicha muestra, en donde dicha proteína mitocondrial prematura comprende al menos parte de su presecuencia dirigida a la mitocondria; y

c) Comparar la cantidad m1 obtenida en la etapa b) con la cantidad m2 de dicha al menos una proteína mitocondrial prematura determinada en una muestra testigo, en donde dicha muestra testigo se deriva de un sujeto que no padece AD;

en donde $m1 > m2$ indica AD en dicho paciente.

- 35 El método es un método *in vitro*.

En otra realización, se diagnostica una etapa temprana de AD.

En todavía otra realización, dicha muestra se proporciona fuera del cuerpo de un ser humano o animal. Cabe señalar que la etapa de obtener la muestra de un paciente vivo (particularmente un paciente humano vivo) no es parte del método según se reivindica.

- 40 En una realización preferida, dicha muestra es una muestra clínica, en donde dicha muestra clínica es preferiblemente de un paciente humano. Se puede preferir que dicha muestra clínica sea una muestra de tejido o una muestra de fluido corporal. Se prefiere particularmente que se use una muestra que comprende células que comprenden mitocondrias (tales como p. ej. una muestra de sangre).

45 Dicha muestra puede ser p. ej. una muestra de tejido obtenida del aparato respiratorio, el tracto gastrointestinal o el cerebro. Dicha muestra de tejido también se puede obtener de la piel, en donde dicha muestra de piel comprende fibroblastos. Se puede preferir una muestra de tejido obtenida del cerebro si el método es póstumo (es decir, después de que el paciente ha muerto). Sin embargo, es evidente que también se pueden usar muestras de tejido si el paciente que se desea diagnosticar es un paciente humano o animal vivo. Una muestra preferida, en este sentido,

es una muestra de piel que comprende fibroblastos cutáneos, en donde dichos fibroblastos cutáneos se aíslan opcionalmente y/o se cultivan opcionalmente según métodos estándares para aumentar la cantidad de células.

Además, dicha muestra puede ser, en particular, una muestra de fluido corporal seleccionada del grupo que consiste en sangre, plasma, suero, fluido linfático, saliva, líquido cefalorraquídeo, orina y heces, en donde se prefiere la sangre. Todos los fluidos corporales mencionados anteriormente, en particular, la sangre, se prefieren particularmente si el paciente que se desea diagnosticar es un paciente humano o animal vivo.

Se prefiere particularmente el uso de una muestra de sangre o una muestra de cerebro. Cuando el paciente que se desea diagnosticar es un paciente humano o animal vivo, se prefiere particularmente el uso de una muestra de sangre o una muestra de piel.

En otra realización del primer aspecto, la cantidad de dicha al menos una proteína mitocondrial prematura se determina mediante un método inmunológico, preferiblemente, transferencia Western o ELISA, y/o mediante un método de espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés), en particular, cromatografía diagonal fraccional combinada (COFRADIC; ver Gevaert et al., Nat. Biotech 21, 566 (2002)), cromatografía diagonal fraccional basada en carga (CHAFRADIC; ver Venne et al., J. Proteome Res. 12, 3823 (2013) y etiquetado isotópico de amina terminal de sustratos (TAILS; ver Kleifeld et al., Nat. Biotech. 28, 281 (2010)). Además, también se puede usar identificación fosfo (PTAC), ver Mommen GP et al., Mol Cell Proteomics 11(9) (2012). Cabe señalar que se prefiere particularmente COFRADIC dado que este método es particularmente adecuado para determinar los extremos N de proteínas.

En una realización preferida en relación con el primer aspecto, dicha al menos una proteína mitocondrial prematura comprende dicha al menos parte de su presecuencia dirigida a la mitocondria en su extremo N; dicha proteína puede ser una proteína codificada por el núcleo.

En otra realización preferida relacionada con el primer aspecto, dicha al menos una proteína mitocondrial prematura se selecciona del grupo que consiste en hMdh2, hOAT, hACADV, PMPCA, CLYBL, PPM1K, SLIRP, NDUFA9, MRPL23 y mezclas de estas. HMdh2 se prefiere particularmente. En una realización preferida, hMdh2 es la única proteína mitocondrial prematura, cuya cantidad se determina. Se entenderá que la lista anterior de proteínas mitocondriales corresponde a las versiones prematuras de las formas maduras, es decir, todas estas proteínas todavía comprenden al menos parte de su presecuencia dirigida a la mitocondria en sus extremos N de las formas maduras. Las presecuencias dirigidas a la mitocondria de las proteínas mencionadas anteriormente se proporcionan a continuación.

En todavía otra realización preferida, la cantidad de dicha al menos una proteína mitocondrial prematura determinada en una muestra testigo corresponde a un valor predeterminado derivado de al menos una, preferiblemente varias muestras testigo. Por lo tanto, la cantidad se puede proporcionar como un valor predeterminado de una lista correspondiente de cantidades testigo. Cabe señalar que se puede preferir que dicho sujeto que no padece AD tenga aproximadamente la misma edad que el paciente que posiblemente padece AD. Sin embargo, no se trata de un prerrequisito para la etapa de comparación.

En todavía otra realización preferida, más de aproximadamente un 5 %, preferiblemente, más de aproximadamente un 10 %, más preferiblemente, más de aproximadamente un 20 % y lo más preferiblemente, más de aproximadamente un 50 % de aumento de la cantidad de dicha al menos una proteína mitocondrial prematura en la muestra del paciente que posiblemente padece AD en comparación con la cantidad de dicha al menos una proteína mitocondrial prematura en la muestra testigo corresponde a una cantidad más alta.

Según se describe más adelante en la sección de descripción detallada, una "cantidad más alta" también puede significar que dicha proteína está presente en dicha muestra de un paciente que posiblemente padece AD y está ausente en la muestra testigo. Por lo tanto, en una realización preferida, el primer aspecto de la invención también se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar la AD en un paciente que comprende las siguientes etapas:

- a) Proporcionar una muestra de un paciente que posiblemente padece AD;
- b) Determinar la presencia o ausencia de al menos una proteína mitocondrial prematura seleccionada del grupo que consiste en hMdh2, hOAT, hACADV, PMPCA, CLYBL, PPM1K, SLIRP, NDUFA9, MRPL23 y mezclas de estas en dicha muestra, en donde dicha proteína prematura comprende al menos parte de su presecuencia dirigida a la mitocondria;

en donde la presencia de dicha proteína prematura en dicha muestra indica AD en dicho paciente.

En una realización particularmente preferida, el primer aspecto de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar la AD en un paciente que comprende las siguientes etapas:

- a) Proporcionar una muestra de un paciente que posiblemente padece AD;

b) Determinar la presencia o ausencia de hMdh2 prematura en dicha muestra, en donde dicha hMdh2 prematura comprende al menos parte de su presecuencia dirigida a la mitocondria;

en donde la presencia de hMdh2 prematura en dicha muestra indica AD en dicho paciente.

5 En una realización relacionada del primer aspecto, la presente invención también describe un método para corroborar el diagnóstico de AD en un paciente que comprende las siguientes etapas:

a) Proporcionar una muestra de un paciente al que se le ha diagnosticado que padece AD, en donde dicho diagnóstico se basa preferiblemente en un método diferente del método descrito en la presente memoria;

b) Determinar en dicha muestra la cantidad de al menos una proteína mitocondrial prematura, en donde dicha proteína mitocondrial prematura comprende al menos parte de su presecuencia dirigida a la mitocondria; y

10 c) Comparar la cantidad obtenida en la etapa b) con la cantidad de dicha al menos una proteína mitocondrial prematura determinada en una muestra testigo, en donde dicha muestra testigo se deriva de un sujeto que no padece AD;

en donde una cantidad más alta de dicha al menos una proteína mitocondrial prematura en la muestra de un paciente al que se le ha diagnosticado que padece AD en comparación con la cantidad de dicha al menos una proteína mitocondrial prematura en la muestra testigo corrobora (es decir, confirma) el diagnóstico de AD en dicho paciente.

15

Según lo indicado anteriormente, el primer aspecto de la invención describe, además, un método para corroborar el diagnóstico de AD en un paciente que comprende las siguientes etapas:

20 a) Proporcionar una muestra de un paciente que posiblemente padece AD, en donde dicho diagnóstico se basa preferiblemente en un método diferente del método descrito en la presente memoria;

b) Determinar la presencia o ausencia de al menos una proteína mitocondrial prematura seleccionada del grupo que consiste en hMdh2, hOAT, hACADV, PMPCA, CLYBL, PPM1K, SLIRP, NDUFA9, MRPL23 y mezclas de estas en dicha muestra, en donde dicha proteína prematura comprende al menos parte de su presecuencia dirigida a la mitocondria;

25 en donde la presencia de dicha proteína prematura en dicha muestra corrobora (es decir, confirma) el diagnóstico de AD en dicho paciente.

Por consiguiente, en otra realización preferida relacionada del primer aspecto, la presente invención también describe un método para corroborar el diagnóstico de AD en un paciente que comprende las siguientes etapas:

30 a) Proporcionar una muestra de un paciente al que se le ha diagnosticado que padece AD, en donde dicho diagnóstico se basa preferiblemente en un método diferente del método descrito en la presente memoria;

b) Determinar la presencia o ausencia de hMdh2 prematura en dicha muestra, en donde dicha hMdh2 prematura comprende al menos parte de su presecuencia dirigida a la mitocondria;

en donde la presencia de hMdh2 prematura en dicha muestra corrobora (es decir, confirma) el diagnóstico de AD en dicho paciente.

35 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere al uso de al menos una proteína mitocondrial prematura como marcador para la AD, en donde dicha al menos una proteína mitocondrial prematura comprende al menos parte de la presecuencia dirigida a la mitocondria.

40 En una realización preferida del segundo aspecto de la presente invención, dicha al menos una proteína mitocondrial prematura se selecciona del grupo que consiste en hMdh2, hOAT, hACADV, PMPCA, CLYBL, PPM1K, SLIRP, NDUFA9, MRPL23 y mezclas de estas. Se entenderá que la lista anterior de proteínas mitocondriales corresponde a las versiones prematuras de las formas maduras, es decir, todas estas proteínas todavía comprenden al menos parte de su presecuencia dirigida a la mitocondria en sus extremos N de las formas maduras. Estas presecuencias de extremo N se proporcionan a continuación.

45 En una realización particularmente preferida del segundo aspecto, dicha al menos una proteína mitocondrial prematura es hMdh2.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere al uso de un anticuerpo o un fragmento de unión de este que se une a una proteína mitocondrial prematura para diagnosticar la AD, en donde dicha proteína mitocondrial prematura comprende al menos parte de la presecuencia dirigida a la mitocondria. Se puede preferir usar un

anticuerpo o un fragmento de unión de este que se une a una proteína mitocondrial codificada por el núcleo para diagnosticar la AD.

5 Preferiblemente, dicho anticuerpo o fragmento de unión de este se une al dominio del extremo N de dicha forma prematura y, lo más preferiblemente, a la presecuencia dirigida a la mitocondria (o partes de esa) de dicha proteína mitocondrial. Lo más preferiblemente, dicho anticuerpo o fragmento de unión de este reconoce solo la forma prematura de dicha proteína mitocondrial y no la forma madura. Los anticuerpos o fragmentos de unión según esta realización se pueden preferir particularmente en la presente invención y se describe en mayor detalle en el cuarto aspecto de la presente invención. Por lo tanto, p. ej., el anticuerpo dirigido a la presecuencia de hMdh2 como se describe en el cuarto aspecto de la invención y en el ejemplo 1 de la presente solicitud es un ejemplo particularmente adecuado de dicho anticuerpo y se puede usar en el tercer aspecto de la presente invención.

En la tercera realización del tercer aspecto, dicho anticuerpo o fragmento de unión de este se une a la parte madura de dicha proteína mitocondrial y a la secuencia adicional de la presecuencia dirigida a la mitocondria (o partes de esta) en el extremo N de la parte madura.

15 En una realización preferida, dicho anticuerpo o fragmento de unión de este se une a una proteína mitocondrial seleccionada del grupo que consiste en hMdh2, hOAT, hACADV, PMPCA, CLYBL, PPM1K, SLIRP, NDUFA9 y MRPL23, en donde dicha proteína puede estar en su forma prematura o en sus formas maduras, dependiendo de qué tipo de anticuerpo o fragmento de unión de este se usa. Por lo tanto, cabe señalar que las tres realizaciones indicadas anteriormente también se aplican al anticuerpo o fragmento de unión de este que se une a las proteínas específicas indicadas anteriormente y que se pueden usar anticuerpos o fragmentos de unión de estos disponibles comercialmente.

En una realización particularmente preferida, dicho anticuerpo o fragmento de unión de este se une a hMdh2. Cabe señalar que las realizaciones indicadas anteriormente también se aplican al anticuerpo o fragmento de unión de este que se une a hMdh2 (es decir, dirigido solo a la presecuencia en el extremo N o dirigido a la presecuencia en el extremo N y a la parte madura de la proteína) y que se pueden usar anticuerpos disponibles comercialmente.

25 En un cuarto aspecto, la presente descripción se refiere a un anticuerpo o un fragmento de unión de este que se une a un péptido o fragmento de este seleccionado del grupo que consiste en MLSALARPASAALRRSFSTSAQNN (SEQ ID No.: 20), MFSKLAHLQRFAVLRSRVHSSVASATSVATKKTQ (SEQ ID No.: 21), MQAARMAASLGRQLLRLGGSSRLTALLGQPRPGPARRPY (SEQ ID No.: 22), MAAVLAATRLLRGSGSWGCSRLRFPPAYRRF (SEQ ID No.: 23), MALRLLRRAARGAAAAALLRLK (SEQ ID No.: 24), MSTAALITLVRSGGNQVRRRVLLSSRLQ (SEQ ID No.: 25), MAASAARGAAALRRSINQPVAFVRRIPW (SEQ ID No.: 26), MAAAQSRVVRVLSMSRSAITATSVCVHGPPCRQ (SEQ ID No.: 69) y MARNVVYPLYRLGGPQLRVFRT (SEQ ID No.: 70)

35 El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal y se puede producir mediante cualquier medio común para generar anticuerpos con el uso del péptido mencionado o un fragmento de este como antígeno. El fragmento de unión se puede derivar de un anticuerpo monoclonal o policlonal y también se puede producir según métodos estándares conocidos en la técnica.

40 En una realización preferida del cuarto aspecto, un fragmento de un péptido como se indicó anteriormente (seleccionado de las SEQ ID NO.: 20 a 26) comprende aproximadamente 21, aproximadamente 20, aproximadamente 19, aproximadamente 18, aproximadamente 17, aproximadamente 16, aproximadamente 15, aproximadamente 14, aproximadamente 13, aproximadamente 12, aproximadamente 11 o aproximadamente 10 aminoácidos a partir del extremo N de dicho péptido. Por lo tanto, a modo de ejemplo, el péptido MLSALARPASAALRRSFST (SEQ ID No.: 31) corresponde a un fragmento del péptido de la SEQ ID No.: 20, en donde dicho fragmento comprende 19 aminoácidos a partir del extremo N del péptido de la SEQ ID No.: 20. Se prefiere adicionalmente que un fragmento comprenda al menos 10 aminoácidos, más preferiblemente, al menos 15 aminoácidos.

50 En una realización especialmente preferida del cuarto aspecto, dicho anticuerpo o fragmento de unión de este se une al péptido MLSALARPASAALRRSFSTSAQNN (SEQ ID No.: 20) o un fragmento de este, en donde dicho fragmento se puede seleccionar del grupo que consiste en MLSALARPASAALRRSFSTSAQN (SEQ ID No.: 27), MLSALARPASAALRRSFSTSAQ (SEQ ID No.: 28), MLSALARPASAALRRSFSTSA (SEQ ID No.: 29), MLSALARPASAALRRSFSTS (SEQ ID No.: 30), MLSALARPASAALRRSFST (SEQ ID No.: 31), MLSALARPASAALRRSFS (SEQ ID No.: 32), MLSALARPASAALRRSF (SEQ ID No.: 33), MLSALARPASAALRRS (SEQ ID No.: 34), MLSALARPASAALRR (SEQ ID No.: 35), MLSALARPASAALR (SEQ ID No.: 36), MLSALARPASAAL (SEQ ID No.: 37) y MLSALARPASAA (SEQ ID No.: 38).

55 Lo más preferiblemente, el anticuerpo o fragmento de unión de este del cuarto aspecto de la presente invención es un anticuerpo o fragmento de unión de este que se une al péptido MLSALARPASAALRRSFST (SEQ ID No.: 31).

Los inventores han creado un anticuerpo policlonal dirigido contra dicho péptido según procedimientos estándares conocidos en la técnica y se describe en mayor detalle en la sección de ejemplos de la presente solicitud.

5 En otra realización preferida del cuarto aspecto, dicho anticuerpo o fragmento de unión de este se une al péptido MFSKLAHLQRFVLSRGVHSSVASATSV ATKKTQV (SEQ ID No.: 21) o un fragmento de este, en donde dicho fragmento se puede seleccionar del grupo que consiste en MFSKLAHLQRFVLSRGVHSSVASATSV ATKKTQV (SEQ ID No.: 39), MFSKLAHLQRFVLSRGVHSSVASATSVATK (SEQ ID No.: 40), MFSKLAHLQRFVLSRGVHSSVASATSV (SEQ ID No.: 41), MFSKLAHLQRFVLSRGVHSSVA (SEQ ID No.: 42) y MFSKLAHLQRFVLSR (SEQ ID No.: 43).

10 En otra realización preferida del cuarto aspecto, dicho anticuerpo o fragmento de unión de este se une al péptido MQAARMAASLGRQLLRLGGGSSRLTALL GQPRPGPARRPY (SEQ ID No.: 22) o un fragmento de este, en donde dicho fragmento se puede seleccionar del grupo que consiste en MQAARMAASLGRQLLRLGGGSSRLTALLGQPRPG (SEQ ID No.: 44), MQAARMAASLGRQLLRLGGGSSRLTA LLGQP (SEQ ID No.: 45), MQAARMAASLGRQLLRLGGGSSRLTALL (SEQ ID No.: 46), MQAARMAASLGRQLLRLGGGSSR (SEQ ID No.: 47) y MQAARMAASLGRQL (SEQ ID NO.: 48).

15 En otra realización preferida del cuarto aspecto, dicho anticuerpo o fragmento de unión de este se une al péptido MAAVVLAATRLLRSGSGSWGCSRLR FGPPAYRRF (SEQ ID No.: 23) o un fragmento de este, en donde dicho fragmento se puede seleccionar del grupo que consiste en MAAVVLAATRLLRSGSGSWGCSRLRFGP (SEQ ID No.: 49), MAAVVLAATRLLRSGSGSWGCSRLRFG (SEQ ID No.: 50), MAAVVLAATRLLRSGSGSWGCSRLRF (SEQ ID No.: 51), MAAVVLAATRLLRSGSGSWGCSRLR (SEQ ID No.: 52) y MAAVVLAATRLLRSGSGSWGCSRL (SEQ ID No.: 53).

20 En otra realización preferida del cuarto aspecto, dicho anticuerpo o fragmento de unión de este se une al péptido MALRLLRRAARGAAAAALLRLK (SEQ ID No.: 24) o un fragmento de este, en donde dicho fragmento se puede seleccionar del grupo que consiste en MALRLLRRAARGAAAAALLRL (SEQ ID No.: 54), MALRLLRRAARGAAAAALLR (SEQ ID No.: 55), MALRLLRRAARGAAAA ALL (SEQ ID No.: 56), MALRLLRRAARGAAAAAL (SEQ ID No.: 57) y MALRLLRRAARGAAAA (SEQ ID No.: 58).

25 En otra realización preferida del cuarto aspecto, dicho anticuerpo o fragmento de unión de este se une al péptido MSTAALITLVRSGGNQVRRRVLLSSRLQ (SEQ ID No.: 25) o un fragmento de este, en donde dicho fragmento se puede seleccionar del grupo que consiste en MSTAALITLVRSGGNQVRRRVLLSSR (SEQ ID No.: 59), MSTAALITLVRSGGNQVRRRVLLS (SEQ ID No.: 60), MSTAALITLVRSGGN QVRRRVL (SEQ ID No.: 61), MSTAALITLVRSGGNQVRRR (SEQ ID No.: 62) y MSTAALITLVRSGGNQVRR (SEQ ID No.: 63). Un fragmento particularmente preferido es MSTAALITLVRSGGNQVRRR (SEQ ID No.: 62).

30 En otra realización preferida del cuarto aspecto, dicho anticuerpo o fragmento de unión de este se une al péptido MAASAARGAAALRRSINQPVAFVRRIPW (SEQ ID No.: 26) o un fragmento de este, en donde dicho fragmento se puede seleccionar del grupo que consiste en MAASAARGAAALRRSINQPVAFV (SEQ ID No.: 64), MAASAARGAAALRRSINQPVAF (SEQ ID No.: 65), MAASAARGAAALRRSIN (SEQ ID No.: 66), MAASAARGAAALRRSI (SEQ ID No.: 67) y MAASAARGAAALRR (SEQ ID No.: 68).

35 En otra realización preferida del cuarto aspecto, dicho anticuerpo o fragmento de unión de este se une al péptido MAAAAQSRVVRVLSMSRSAITAIATSV CHGPPCRQ (SEQ ID No.: 69) o un fragmento de este, en donde dicho fragmento se puede seleccionar del grupo que consiste en MAAAAQSRVVRVLSMSRSAITAIATSVCH (SEQ ID No.: 71), MAAAAQSRVVRVLSMSRSAITAIA (SEQ ID No.: 72), MAAAAQSRVVRVLSMSRSAI (SEQ ID No.: 73), MAAAAQSRVVRVLSMSRS (SEQ ID No.: 74) y MAAAAQSRVVRVLSMS (SEQ ID No.: 75). Un fragmento particularmente preferido es MAAAAQSRVVRVLSMSRS (SEQ ID No.: 74).

40 En otra realización preferida del cuarto aspecto, dicho anticuerpo o fragmento de unión de este se une al péptido MARNVVYPLYRLGGPQLRVFRT (SEQ ID No.: 70) o un fragmento de este, en donde dicho fragmento se puede seleccionar del grupo que consiste en MARNVVYPLYRLGGPQLRVFR (SEQ ID No.: 76), MARNVVYPLYRLGGPQLRVF (SEQ ID No.: 77), MARNVVYPLYRLGGPQLRV (SEQ ID No.: 78), MARNVVYPLYRLGGPQLR (SEQ ID No.: 79) y MARNVVYPLYRLGGPQL (SEQ ID No.: 80).

Un anticuerpo o un fragmento de unión de este del cuarto aspecto de la presente invención se puede emplear particularmente en el uso descrito en el tercer aspecto.

50 En un quinto aspecto, la presente invención se refiere a un agente antiinflamatorio y/o un antioxidante para uso en el tratamiento de la AD, en donde dicho agente antiinflamatorio y/o antioxidante se administra a un paciente que exhibe una cantidad más alta de al menos una proteína mitocondrial prematura en una muestra (m1) en comparación con la cantidad (m2) de dicha proteína en una muestra testigo derivada de un sujeto que no padece AD (también se puede mencionar como $m1 > m2$), en donde dicha proteína mitocondrial prematura comprende al menos parte de la presecuencia dirigida a la mitocondria.

Una realización preferida del quinto aspecto se refiere a un agente antiinflamatorio y/o un antioxidante para uso en el tratamiento de la AD, en donde dicho agente antiinflamatorio y/o antioxidante se administra a un paciente que tiene hMdh2 prematura presente en una muestra, en donde dicha hMdh2 prematura comprende al menos parte de su presecuencia dirigida a la mitocondria.

5 En una realización del quinto aspecto, dicho agente antiinflamatorio y/o dicho antioxidante es para su uso en el tratamiento de un estado temprano de AD.

10 En otra realización, dicho agente antiinflamatorio es un agente antiinflamatorio no esteroideo (tal como, p. ej., ibuprofeno o indometacina). En todavía otra realización preferida, dicho antioxidante se selecciona del grupo que consiste en ácido ascórbico, ésteres grasos, isómeros y sales de estos (incluido ascorbato de sodio y ascorbato de calcio); tocoferol; derivados de ácido gálico; lecitina; lactato y sales de este; ácido cítrico y sales de este; tartrato y sales de este; y ácido fosfórico y sales de este.

15 En todavía otra realización preferida del quinto aspecto, más de aproximadamente un 5 %, preferiblemente, más de aproximadamente un 10 %, más preferiblemente, más de aproximadamente un 20 % y lo más preferiblemente, más de aproximadamente un 50 % de aumento de la cantidad de dicha al menos una proteína mitocondrial prematura en la muestra del paciente en comparación con la cantidad de dicha al menos una proteína mitocondrial prematura en la muestra testigo corresponde a una cantidad más alta.

20 Dicha muestra puede ser p. ej. una muestra de tejido obtenida de la piel, aparato respiratorio, el tracto gastrointestinal o del cerebro. Se puede preferir una muestra de tejido obtenida del cerebro si el método es póstumo, es decir, después de que el paciente ha muerto. Sin embargo, es evidente que también se pueden usar muestras de tejido y, en particular, muestras de piel, si el paciente que se desea diagnosticar es un paciente humano o animal vivo.

25 Además, dicha muestra puede ser, en particular, una muestra de fluido corporal seleccionada del grupo que consiste en sangre, plasma, suero, fluido linfático, saliva, líquido cefalorraquídeo, orina y heces, en donde se prefiere la sangre. Todos los fluidos corporales mencionados anteriormente, en particular, la sangre, se prefieren particularmente si el paciente que se desea diagnosticar es un paciente humano o animal vivo.

Se prefiere particularmente el uso de una muestra de sangre o una muestra de cerebro. Cuando el paciente que se desea diagnosticar es un paciente humano o animal vivo, se prefiere particularmente el uso de una muestra de sangre o piel.

30 En un sexto aspecto, la presente invención se refiere a un método para detectar un compuesto eficaz contra la AD que comprende las siguientes etapas:

a) Proporcionar un sistema de ensayo que comprende una PreP mitocondrial comprometida, en donde dicha PreP mitocondrial comprometida causa una acumulación de al menos una proteína mitocondrial prematura, en donde dicha proteína mitocondrial prematura comprende al menos parte de su presecuencia dirigida a la mitocondria;

b) Determinar la cantidad de dicha al menos una proteína mitocondrial prematura;

35 c) Poner en contacto dicho sistema de ensayo con un compuesto;

d) Determinar la cantidad de dicha al menos una proteína mitocondrial prematura;

en donde una cantidad más baja de dicha al menos una proteína mitocondrial prematura determinada en la etapa d) en comparación con la cantidad determinada en la etapa b) indica que dicho compuesto es eficaz contra la AD.

40 En una realización alternativa, el sexto aspecto de la presente invención se refiere a un método para detectar un compuesto eficaz contra la AD que comprende las siguientes etapas:

a) Proporcionar un sistema de ensayo que comprende una PreP mitocondrial comprometida, en donde dicha PreP mitocondrial comprometida causa una acumulación de al menos una proteína mitocondrial prematura, en donde dicha proteína mitocondrial prematura comprende al menos parte de su presecuencia dirigida a la mitocondria;

b) Determinar la cantidad de especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) en dicho sistema;

45 c) Poner en contacto dicho sistema de ensayo con un compuesto;

d) Determinar la cantidad de ROS en dicho sistema;

en donde una cantidad más baja de ROS determinada en la etapa d) en comparación con la cantidad determinada en la etapa b) indica que dicho compuesto es eficaz contra la AD.

En todavía otra realización alternativa, el sexto aspecto de la presente invención se refiere a un método para detectar un compuesto eficaz contra la AD que comprende las siguientes etapas:

- 5 a) Proporcionar un sistema de ensayo que comprende una PreP mitocondrial comprometida, en donde dicha PreP se ha comprometido por la adición de A β y dicha PreP mitocondrial comprometida causa una acumulación de al menos una proteína mitocondrial prematura, en donde dicha proteína mitocondrial prematura comprende al menos parte de su presecuencia dirigida a la mitocondria;
- b) Determinar la cantidad de A β en dicho sistema;
- c) Poner en contacto dicho sistema de ensayo con un compuesto;
- d) Determinar la cantidad de A β en dicho sistema;
- 10 en donde una cantidad más baja de A β determinada en la etapa d) en comparación con la cantidad determinada en la etapa b) indica que dicho compuesto es eficaz contra la AD.

Se puede preferir, en la última alternativa, que A β se agregue al sistema de ensayo al expresar una preforma de A β que comprende un sitio de reconocimiento para la TEV-proteasa, que después se escinde mediante TEV-proteasa tras la inducción de la expresión de dicha TEV-proteasa.

- 15 En una realización relacionada con las alternativas anteriores del sexto aspecto, dicho sistema de ensayo proporcionado en la etapa a) es un sistema *in vitro* o un sistema de cultivo celular o un sistema *in vitro* al menos reconstituido en parte. La sección de ejemplos de las presentes solicitudes establece ensayos que se pueden usar en el sexto aspecto. El experto sabe cómo usar sistemas de ensayo similares en el sexto aspecto.

20 En una realización preferida del sexto aspecto, dicho sistema de ensayo proporcionado en la etapa a) comprende mitocondrias aisladas de células de cultivo celular humanas o células de levadura.

En una realización preferida del sexto aspecto, se usan células de cultivo celular humanas en un sistema de cultivo celular. En otra realización preferida, se usan células de levadura en un sistema de cultivo celular, en donde dichas células de levadura expresan preferiblemente A β de manera inducible. Un sistema ilustrativo de dichas células de levadura se establece en la sección de ejemplos de la presente solicitud. Por lo tanto, dicho sistema de ensayo de la etapa a) puede comprender células de levadura en las que A β se puede preferiblemente generar de manera inducible al usar TEV proteasa inducible.

25

Se puede preferir, además, usar células de levadura que se han manipulado de acuerdo con los métodos conocidos para el experto para posibilitar una penetración más fácil del compuesto agregado al sistema.

30 En otra realización preferida del sexto aspecto, dicho compuesto es una molécula pequeña. En todavía otra realización preferida del sexto aspecto, dicho compuesto exhibe actividad de actividad sobre MPP y/o aumenta la semivida de MPP.

En todavía otra realización, el sistema de ensayo según se indicó anteriormente se incuba durante un tiempo específico después de la etapa de poner en contacto dicho sistema de ensayo con un compuesto y la etapa posterior. Este tiempo de incubación puede variar de varios minutos hasta varias horas hasta varios días, dependiendo del sistema de ensayo usado. Por lo tanto, el tiempo de incubación puede ser, p. ej., 10 minutos, 40 minutos, 1 hora, 2 horas, 5 horas, 1 día, 3 días o incluso 5 días. Se prefiere particularmente usar un tiempo de incubación de aproximadamente 1 hora.

35

En los métodos de detección indicados anteriormente, la cantidad de dicha al menos una proteína mitocondrial prematura se puede terminar de acuerdo con los métodos como se establecieron en el primer aspecto de la presente solicitud, mientras que la cantidad de A β se determina típicamente mediante métodos inmunológicos como se establecieron anteriormente. La cantidad de ROS como se determina en la segunda alternativa descrita en el sexto aspecto de la invención, se puede determinar mediante métodos estándares, p. ej., al usar tinción con dihidroetidio (DHE).

40

En todavía otra realización del sexto aspecto, más de aproximadamente un 5 %, preferiblemente, más de aproximadamente un 10 %, más preferiblemente, más de aproximadamente un 20 % y lo más preferiblemente, más de aproximadamente un 50 % de disminución de la cantidad determinada en la etapa d) en comparación con la cantidad en la etapa b) corresponde a una cantidad más baja.

45

Descripción de las figuras

50 **Figura 1.** Acumulación in vivo de proteínas precursoras e intermediarias de procesamiento en las mitocondrias de pacientes con AD y mutante de levadura carente de peptidasoma (*cym1 Δ*). (A) Análisis de inmunotransferencia de varias proteínas mitocondriales en mitocondrias de cerebro (corteza temporal) purificadas de mitocondrias de

cerebros con AD y testigo sin AD de la misma edad (aisladas en pares). La estrella indica una proteína precursora. (B) Validación de la acumulación del precursor MDH2 (estrella) en mitocondrias de cerebro con AD mediante el uso de un anticuerpo específico para la presecuencia. Flecha, señal no específica. (C) Letalidad sintética del mutante doble *cym1Δ mas1* en condiciones de crecimiento respiratorias (30 °C, YPG). (D) Análisis de inmunotransferencia de mitocondrias naturales (WT) y *cym1Δ* aisladas de cepas de levadura cultivadas en YPD a 30 °C. El panel derecho muestra Cym1 y proteínas no procesadas como testigos. (E) El anticuerpo específico para la presecuencia Sod2 reconoce la forma precursora más grande que se acumula en las mitocondrias *cym1Δ*. (F) Inmunotransferencia que muestra la acumulación del precursor Sod2 en levadura con mutaciones en el centro catalítico de Cym1 (HXXEH). p, precursor; i, intermediario; c, proteína escindida.

Figura 2. La maduración del precursor mitocondrial depende del recambio peptídico eficaz. (A) Procesamiento in vitro del precursor [³⁵S]Sod2 en extractos solubles de mitocondrias naturales (WT) y *cym1Δ* en presencia de 10 μM de péptido de presecuencia de Cox4. (B) La proteína Cym1 sintetizada in vitro restaura el procesamiento del precursor Sod2 en el extracto mitocondrial de *cym1Δ*. Testigo, lisado de germen de trigo. (C) Defecto de crecimiento sintético de la cepa de levadura mutante doble *cym1Δ oct1Δ* (23 °C, YPD). (D) El procesamiento del precursor [³⁵S]F₁β mediante MPP purificada no se inhibe mediante octapéptidos. (E) Ensayo de procesamiento in vitro del precursor [³⁵S]Cox4 en extracto mitocondrial WT y *cym1Δ* en presencia de octapéptidos. Las cuantificaciones representan la media ± EEM (n=4 para (A) y (E); n=3 para (D)).

Figura 3. Aβ altera el recambio peptídico mitocondrial que lleva a la inhibición por retroalimentación de enzimas que procesan la presecuencia. (A) Degradación de Aβ en extractos solubles de mitocondrias naturales (WT) y *cym1Δ*. (B) Degradación de Aβ mediante Cym1 traducida libre de células (lisado de germen de trigo). Oct1, Oct1 traducida en lisado de germen de trigo. (C) El péptido Aβ¹⁻²⁸, pero no Aβ^{aleatorio} altera la degradación del péptido de presecuencia de Cox4 en extracto mitocondrial soluble natural. Se agregaron 10 μM de péptido de presecuencia de Cox4 en cada reacción. Mas1, testigo de carga. (D) Procesamiento in vitro del precursor [³⁵S]Sod2 en extracto mitocondrial WT en presencia de os péptidos Aβ indicados (10 μM) y 10 μM de péptido de presecuencia de Cox4. El testigo de 60 min se estableció como el 100 %, media ± EEM (n=3).

Figura 4. Aβ mitocondrial inhibe la maduración del precursor. (A) El análisis de inmunotransferencia de mitocondrias purificadas de tejido cerebral de ratón natural (WT) y PS2APP (de ratones de 12 meses) revela la presencia de Aβ en mitocondrias de PS2APP. (B) Ensayo de procesamiento in vitro del precursor Cox4 en extracto mitocondrial de cerebro de ratón WT y PS2APP. mtHSP70, testigo de carga. Las cuantificaciones representan la media ± EEM (n=3). (C) Sistema de expresión inducible para la generación de péptido Aβ¹⁻⁴² libre en el citosol. (D) Ensayo de procesamiento in vitro del precursor [³⁵S]Sod2 en extractos mitocondriales de levadura aislados de cepas *coa6Δ* que alojan el vector vacío pESC^{ev} o pESC^{eGFP-Aβ} (1d de inducción en medio de galactosa). Ambas cepas coexpresaban TEV proteasa (p416^{TEVcyt}). Las cuantificaciones representan la media ± EEM (n=3). (E) Análisis de inmunotransferencia de mitocondrias purificadas a partir de cepas descritas en (D) después de 3d de inducción en medio de galactosa. exp., tiempo de exposición. Las estrellas indican proteínas precursoras que se acumulan.

Figura S1. Análisis de niveles de ROS, potencial de la membrana y consumo de O₂ (como se describe en materiales complementarios) en mitocondrias naturales (WT) y *cym1Δ* aisladas de cepas de levadura cultivadas a 24 °C o con un desplazamiento adicional in vivo a 37 °C durante 6 h (en YPG). El WT se estableció como el 100 %, media ± EEM (n=3).

Figura S2. Procesamiento in vitro de una proteína precursora mitocondrial en extractos mitocondriales solubles. El precursor [³⁵S]Sod2 se incubó con extracto mitocondrial WT soluble durante los períodos indicados. Las muestras se separaron mediante SDS-PAGE y las proteínas etiquetadas con radio se detectaron mediante obtención de imágenes por fosfo. A diferencia de la importación en el orgánulo (39), el procesamiento del precursor in vitro no depende de la adición de AVO que disipa el potencial de la membrana Δψ y la proteína escindida no se protege para tratamiento con Proteinasa K (Prot. K). p, precursor; c, proteína escindida. Mas1, testigo de carga.

Figura S3. Ensayo de degradación de péptido en extractos mitocondriales solubles. (A) Degradación rápida del péptido de presecuencia de Cox4 (10 μM) en extracto mitocondrial natural (WT). La degradación se inhibe en muestras de *cym1Δ*. (B) Degradación retardada del péptido Aβ (10 μM) en comparación con el péptido de presecuencia de Cox4 (10 μM) en extracto mitocondrial natural. Ssc1 y Mas1, testigos de carga.

Figura S4. Ensayo de procesamiento in vitro con MPP purificada. (A) Las subunidades de MPP purificadas en tándem Mas1 y Mas2 se separaron a través de SDS-PAGE. El gel se tiñó con azul brillante coomassie. (B) La actividad de procesamiento del precursor F₁β etiquetado con radio mediante MPP purificada se inhibe al aumentar las concentraciones del péptido de presecuencia de Cox4 (19). El F₁β procesado se analizó mediante autorradiografía después de SDS-PAGE y se cuantificó mediante el programa informático Multi Gauge. Las barras de error representan el EEM de tres experimentos independientes.

Figura S5. Ensayo de procesamiento in vitro del precursor $F_{1\beta}$ etiquetado por radio mediante MPP purificada en presencia de concentraciones crecientes de los péptidos $A\beta^{1-40}$ (A) o $A\beta^{1-28}$ (B). Las reacciones se llevaron a cabo según se describe en la Figura S4B. Las barras de error representan el EEM de tres experimentos independientes.

5 **Figura S6.** Modelo de levadura in vivo que genera $A\beta^{1-42}$ libre en el citosol. (A) Cepa de levadura natural que expresa una proteína de fusión eGFP-TCS- $A\beta^{1-42}$ después de 1d de desplazamiento a medio que contiene galactosa (30 °C). Se cargó un extracto de célula de levadura entero en SDS-PAGE y se llevó a cabo una inmunodecoración con los anticuerpos indicados. La coexpresión de la TEV proteasa citosólica (TEV^{Cyt}) por el vector p416^{TEV^{Cyt}} condujo a la generación de $A\beta^{1-42}$. p416^{ev}, coexpresión de vector vacío. TCS, sitio de escisión de TEV; Pgc1, fosfoglicerol
10 cinasa como marcador citosólico; Ssc1, Hsp70 mitocondrial. (B) La vía de importación de la presecuencia mitocondrial no se ve afectada después de la expresión de $A\beta$. El precursor [³⁵S]Hsp10 que no contiene ninguna presecuencia escindible se importó a mitocondrias *coa6Δ* que expresaban $A\beta^{1-42}$ libre (carriles 6-9) o el vector vacío (carriles 2-5). Las muestras se trataron con Proteinasa K y el potencial de la membrana ($\Delta\psi$) se disipó mediante la adición de AVO antes de la reacción de importancia donde se indica (39).

15 **Figura S7.** Modelo de inhibición inducida por $A\beta$ de la maduración de la preproteína mitocondrial. En células sanas (panel izquierdo), se importan preproteínas mitocondriales del citosol y las presecuencias se retiran por escisión de manera eficaz mediante enzimas de procesamiento de presecuencias. Los péptidos de presecuencia (que se muestran en rojo) a continuación se degradan mediante el peptidasoma PreP, que constituye la maquinaria de recambio peptídico mitocondrial. El recambio peptídico se altera en presencia de $A\beta$ (AD, panel derecho) que conduce a la inhibición del procesamiento de la presecuencia y la acumulación de preproteínas.

20 **Figura S8.** Análisis de niveles de ROS en mitocondrias de testigo de vector vacío (ev) y Abeta42 (eGFP- $A\beta$) aisladas de cepas de levadura cultivadas a 30 °C durante 5 días (en medio mínimo sin histidina, sin uracilo que contenía galactosa como fuente de carbono). El testigo de vector vacío se estableció como el 100 %, media \pm EEM (n=9).

25 **Figura S9.** Las proteínas precursoras mitocondriales se acumulan en muestras de sangre de pacientes con AD. A partir de muestras de sangre entera de dos pacientes con AD y dos testigos, se aislaron PBMC y después se fraccionaron en las fracciones de "monocitos" y "distintas de monocitos". Las fracciones se analizaron para detectar la presencia del precursor MDH2 mediante transferencia Western al usar un anticuerpo específico para presecuencia. Como puede observarse en la transferencia Western, el precursor MDH2 se puede detectar en las fracciones "distintas de monocitos" de las muestras de sangre derivadas de pacientes con AD, pero no en las
30 muestras de los testigos.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de que la proteasa mitocondrial MPP está funcionalmente acoplada a la proteasa mitocondrial PreP de manera que una inhibición de PreP mediante $A\beta$ conduce a la inhibición de MPP. En consecuencia, las proteínas precursoras y precursoras intermediarias
35 mitocondriales se acumulan. Por lo tanto, las cantidades crecientes de proteínas precursoras y precursoras intermediarias mitocondriales son indicativas de la presencia de $A\beta$ en las mitocondrias, que es característica de AD, particularmente, de una etapa temprana de AD.

Antes de describir la presente invención en mayor detalle, se presentan las siguientes definiciones.

1. Definiciones

40 Como se usan en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, las formas singulares "u" y "una" también incluyen los plurales correspondientes a menos que el contexto claramente indique lo contrario.

El término "aproximadamente" en el contexto de la presente invención denota un intervalo de precisión que un experto en la técnica entenderá que todavía garantiza el efecto técnico del rasgo en cuestión. El término típicamente indica una desviación del valor numérico indicado de ± 10 % y, preferiblemente, ± 5 %.

45 Se debe entender que el término "comprende" no es limitante. A los efectos de la presente invención, el término "consiste en" se considera que es una realización preferida del término "comprende". Si de aquí en adelante en la presente memoria un grupo se define por comprender al menos un cierto número de realizaciones, esto también significa que abarca un grupo que preferiblemente consiste en estas realizaciones solamente. Asimismo, si un polipéptido aislado se define por comprender una secuencia específica, esto también significa que abarca un
50 polipéptido aislado que preferiblemente consiste en esta secuencia específica.

A menos que se definan de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto. Por lo tanto, p. ej., el término "enfermedad de Alzheimer" o "AD", según se usa en la presente memoria, hace referencia a la enfermedad incluidos todos los síntomas (particularmente demencia) que conoce el experto.

El término "diagnosticar la AD en un paciente", según se usa en la presente memoria, significa que se determina la presencia o ausencia de la AD en un paciente. Por lo tanto, si el método de la presente invención indica una cantidad más alta de dicha al menos una proteína mitocondrial prematura en la muestra de un paciente que posiblemente padece AD en comparación con la cantidad de dicha al menos una proteína mitocondrial prematura en la muestra testigo, el diagnóstico de AD en dicho paciente es positivo (es decir, la AD está presente). Si el método de la presente invención no logra indicar una cantidad más alta de dicha al menos una proteína mitocondrial prematura en la muestra de un paciente que posiblemente padece AD en comparación con la cantidad de dicha al menos una proteína mitocondrial prematura en la muestra testigo, el diagnóstico de AD en dicho paciente es negativo (es decir, la AD no está presente). Por lo tanto, "diagnosticar la AD" no está necesariamente conectado con un diagnóstico positivo.

El término "paciente", según se usa en la presente memoria, se refiere a un sujeto humano o veterinario. Además, el término incluye pacientes vivos y muertos.

Según se usa en la presente memoria, el término "muestra" se refiere a cualquier muestra biológica de cualquier sujeto humano o veterinario. Las muestras pueden incluir tejidos obtenidos de cualquier órgano, tales como, p. ej., el cerebro y la piel, y fluidos obtenidos de cualquier órgano tales como, p. ej., la sangre, plasma, suero, fluido linfático, fluido sinovial, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, sangre de cordón amniótico, lágrimas, saliva y lavados nasofaríngeos. Una muestra de cerebro, una muestra de piel, una muestra de sangre y una muestra de líquido cefalorraquídeo se prefieren particularmente en la presente invención. Como se indicó anteriormente, se puede proporcionar una muestra de cerebro particularmente si el paciente está muerto, mientras que se puede proporcionar una muestra de sangre particularmente si el paciente está vivo. Cabe señalar que evidentemente también se puede proporcionar una muestra de tejido (p. ej., del aparato respiratorio, el tracto gastrointestinal, la piel o un músculo) de un paciente vivo. En relación con muestras distintas de una muestra de cerebro y, en particular, en relación con una muestra de sangre, cabe señalar que las disfunciones mitocondriales en la AD no solo se han descrito para células cerebrales, sino también para células periféricas, en particular células sanguíneas que comprenden, p. ej., linfocitos (ver Leuner et al., 2012).

Si se hace referencia a una "muestra clínica", esto indica que la muestra se manipula según procedimientos estándares usados para muestras en un entorno clínico, p. ej., en hospitales o un consultorio médico.

El término "posiblemente padece AD", como se usa en la presente invención, significa que todavía no se ha diagnosticado positivamente a un paciente con AD, p. ej., mediante un análisis histológico de tejido cerebral póstumo. El "paciente que posiblemente padece AD" puede ignorar las observaciones iniciales en relación con la AD o puede ser un paciente que ya sospecha generalmente que padece AD, p. ej., a partir de antecedentes correspondientes de AD en parientes, a partir de pruebas cognitivas o a partir de métodos de obtención de imágenes.

El término "determinar la cantidad", según se usa en la presente memoria, significa que la cantidad de al menos una proteína se determina en relación con un segundo parámetro tal como, p. ej., el volumen de una muestra o la cantidad de células en la muestra o la presencia de una proteína diferente usada como estándar interno. Esto significa que la cantidad siempre se normaliza con respecto a un segundo parámetro. Por lo tanto, la cantidad puede corresponder, p. ej., a una concentración si el segundo parámetro es el volumen. Se entenderá que la cantidad de la al menos una proteína determinada en la muestra testigo también se normaliza con respecto a un segundo parámetro, p. ej., los parámetros fijados anteriormente. El experto entiende que una etapa de comparación como se describe en la presente memoria solo es posible si ambas cantidades están normalizadas. El término "determinar la cantidad" no excluye que absolutamente nada de dicha proteína pueda detectarse en una muestra, esto se aplica particularmente a una proteína, cuya cantidad se determina en una muestra testigo. Por lo tanto, una proteína hallada en una muestra de un paciente que posiblemente padece AD (cuya cantidad se determina) puede no estar presente en una muestra testigo.

Para la presente solicitud, el término "proteína mitocondrial", en particular, se refiere a cualquier proteína codificada por el núcleo, cuyo gen se transcribe en ARNm en el núcleo, con la posterior traducción del ARNm en el ribosoma y la posterior liberación en el citosol y la importación hacia la mitocondria. Sin embargo, este término también abarca proteínas codificadas por la mitocondria con una secuencia de direccionamiento. Por lo tanto, una "proteína mitocondrial" inicialmente comprende una secuencia dirigida a la mitocondria. Esta secuencia normalmente se retira por escisión después de la importación satisfactoria hacia la mitocondria y/o un compartimento específico en ella, respectivamente. Según se usa en la presente memoria, el término no se relaciona con proteínas, que carecen completamente de cualquier tipo de secuencia dirigida a la mitocondria.

El término "prematura" usado en combinación con "proteína mitocondrial" significa que la secuencia de aminoácidos no corresponde a la secuencia de aminoácidos de la proteína mitocondrial madura; por lo tanto, al menos parte de la secuencia dirigida a la mitocondria todavía está presente en el extremo N de la secuencia madura de la proteína. Se debe entender que "prematura", según se usa en la presente memoria, no significa que la secuencia dirigida a la mitocondria completa debe estar presente en el extremo N de la secuencia madura de la proteína. Por este motivo,

pueden estar presentes varias formas prematuras de una única proteína mitocondrial, en donde cada forma puede comprender una secuencia dirigida a la mitocondria de una longitud diferente.

El término "presecuencia dirigida a la mitocondria", según se usa en la presente memoria, se refiere a una secuencia de direccionamiento para proteínas mitocondriales codificadas por el núcleo o para proteínas mitocondriales codificadas por la mitocondria, en donde dicha secuencia de direccionamiento se encuentra en los extremos N de dichas proteínas mitocondriales después de la traducción y antes de / durante la importación hacia la mitocondria o un compartimento de esta, respectivamente. La secuencia de direccionamiento para proteínas mitocondriales codificadas por el núcleo tiene normalmente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 80 aminoácidos de longitud y se supone que la secuencia de direccionamiento forma una α -hélice anfifática, en la que cadenas laterales de aminoácidos con carga positiva se ubican en un lado de la hélice, mientras que las cadenas laterales de aminoácidos polares sin carga se ubican en el otro lado de la hélice. Se hace hincapié en que no hay una secuencia dirigida a la mitocondria única, que se halla en exactamente esta secuencia en los extremos N de todas las proteínas dirigidas a las mitocondrias. En cambio, los aspectos funcionales mencionados anteriormente de la secuencia parecen ser esenciales de manera que ningún orden de los aminoácidos único parece ser necesario. Por este motivo, no es posible, p. ej., detectar todas las proteínas mitocondriales prematuras mediante un único anticuerpo.

El término "al menos parte de la (pre)secuencia dirigida a la mitocondria" significa que dicha secuencia no se ha retirado completamente. Por lo tanto, dicha secuencia todavía puede estar comprendida como una secuencia completa (ver más atrás) o carecer de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos desde el extremo N de la presecuencia completa. Dependiendo de la longitud de la presecuencia, es evidente que también se pueden retirar más de 8 aminoácidos mediante escisión inicial, en donde una parte de esta presecuencia todavía estaría presente.

El término "comparar", según se usa en la presente memoria, significa que la cantidad determinada en la etapa b) se compara con una cantidad derivada de una muestra testigo, en donde la cantidad de la muestra testigo ("cantidad testigo") no se debe necesariamente determinar en paralelo. La "cantidad testigo" también se puede derivar de una lista que comprende al menos un valor predeterminado, que se obtuvo de una determinación previa con al menos una muestra testigo, preferiblemente, con varias muestras testigo, tales como, p. ej. 10, 50, 100, 1000 o 10000 muestras testigo. Se puede preferir obtener dichos valores testigo predeterminados a partir de sujetos que no padecen AD en conexión con al menos un parámetro adicional, tal como, p. ej., la edad y/o el sexo; si hay disponibles valores testigo predeterminados dependientes de la edad, la edad del paciente que posiblemente padece AD puede corresponder a un valor testigo predeterminado derivado de sujetos de la misma edad. Se puede preferir determinar los valores testigo a partir de la edad de 40 años. Los comentarios anteriores en relación con la normalización también se aplican al testigo.

El término "cantidad más alta", según se usa en la presente memoria, significa que la cantidad de la al menos una proteína mitocondrial prematura en la muestra del paciente que posiblemente padece AD aumentó en comparación con la cantidad de dicha al menos una proteína mitocondrial prematura en la muestra testigo más de 5 %, preferiblemente, más de 10 %, más preferiblemente, más de 20 % y lo más preferiblemente, más de 50 %. Si dicha proteína mitocondrial prematura no debe ser detectable en absoluto en la muestra testigo, la presencia de dicha proteína mitocondrial prematura en la muestra de un paciente que posiblemente padece AD es indicativa de AD. Por lo tanto, el término "cantidad más alta" también puede hacer referencia a una situación en donde dicha proteína está presente en la muestra de un paciente que posiblemente padece AD y está ausente en la muestra testigo.

El término "anticuerpo", según se usa en la presente memoria, preferiblemente se refiere a un anticuerpo monoclonal o policlonal. Sin embargo, el anticuerpo también se puede seleccionar de variantes o fragmentos de anticuerpo tales como, p. ej., anticuerpos de cadena, diacuerpos, minicuerpos, fragmentos Fv de cadena simple (sc(Fv)), anticuerpos sc(Fv)₂, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂ o cuerpos en tándem. Los anticuerpos se pueden producir según cualquier método adecuado conocido para el experto en la técnica. Los anticuerpos policlonales se pueden producir, p. ej., mediante inmunización de animales con el antígeno elegido, mientras que los anticuerpos monoclonales de especificidad definida se pueden producir, p. ej., al usar la tecnología de hibridoma desarrollada por Köhler y Milstein. Cabe señalar que un anticuerpo, según se usa en la presente memoria, también puede estar funcionalmente vinculado, p. ej., comprender una etiqueta detectable. El término "fragmento de unión de este" se refiere a un fragmento de un anticuerpo, en donde dicho fragmento todavía es capaz de unirse al antígeno. Preferiblemente, dicho fragmento, por lo tanto, todavía comprende las regiones CDR del anticuerpo subyacente.

El término "péptido" se refiere a una cadena molecular de aminoácidos conectados a través de uniones peptídicas. Los polipéptidos según la definición pueden ser polipéptidos sintéticos que pueden incluir aminoácidos de origen natural o de origen no natural. Un "fragmento" de un péptido carece de al menos un aminoácido de la secuencia dada de un péptido.

El término "tratamiento de la AD" o "tratar la AD", según se usa en la presente memoria, también se puede relacionar con un alivio de dicha enfermedad e incluye el tratamiento o alivio de síntomas de la AD.

El término "compuesto", según se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier molécula que el experto considere adecuada para lograr posiblemente un efecto en un sistema de ensayo que comprende PreP mitocondrial comprometida. Particularmente, el experto tendrá en cuenta moléculas que posiblemente afectan las actividades enzimáticas de proteínas mitocondriales.

- 5 El término "sistema de ensayo", según se usa en la presente memoria, se refiere a un sistema típico usado por el experto en ensayos de detección. Por lo tanto, el sistema de ensayo puede ser un sistema *in vitro* completamente reconstituido, en donde se proporcionan todos los componentes necesarios en un tampón adecuado. El sistema también puede ser solo parcialmente reconstituido y, p. ej., comprender proteínas específicas expresadas recombinantemente junto con mitocondrias o extractos mitocondriales aislados obtenidos de células cultivadas *in vitro*, tales como células de mamífero o células de levadura. El sistema de ensayos también puede ser un sistema que emplea células vivas, tales como, p. ej., células de mamífero o células de levadura. Los ensayos ilustrativos se establecen en la sección de ejemplos de la presente solicitud. Finalmente, se pueden usar etiquetas específicas tales como, p. ej., etiquetas fluorescentes o etiquetas radioactivas en el sistema de ensayo, p. ej., para determinar las cantidades de proteínas.
- 10
- 15 El término "comprometida", según se usa en la presente memoria, se refiere a una enzima al menos parcialmente inactiva, en el presente caso, PreP, que causa una acumulación de al menos una proteína mitocondrial prematura. Se entenderá que el término "PreP" se usa cuando se hace referencia a la enzima humana, si se usan, p. ej., células de levadura, el homólogo correspondiente de levadura (Cym1) está comprometido de manera que al menos una proteína mitocondrial prematura se acumula.
- 20 El término "especies reactivas del oxígeno" o "ROS" se refiere a moléculas químicamente reactivas que contienen oxígeno, que aumentan si las mitocondrias están comprometidas. Por lo tanto, las ROS, *inter alia*, pueden indicar la condición de las mitocondrias en las células.

El término "molécula pequeña", según se usa en la presente memoria, se refiere a un compuesto orgánico pequeño que tiene un peso molecular bajo. Una molécula pequeña puede ser un compuesto sintético que sabe que no se produce en la naturaleza o un compuesto de origen natural aislado de o que se sabe que se produce en fuentes naturales, tales como, p. ej. células, plantas, hongos, animales y similares. Una molécula pequeña en el contexto de la presente invención preferiblemente tiene un peso molecular menor que 5000 Dalton, más preferiblemente, menor que 4000 Dalton, más preferiblemente, menor que 3000 Dalton, más preferiblemente, menor que 2000 Dalton o, incluso más preferiblemente, menor que 1000 Dalton. En una realización particularmente preferida, una molécula pequeña en el contexto de la presente invención tiene un peso molecular menor que 800 Dalton. En otra realización preferida, una molécula pequeña en el contexto de la presente invención tiene un peso molecular de 50 a 3000 Dalton, preferiblemente, de 100 a 2000 Dalton, más preferiblemente, de 100 a 1500 Dalton e, incluso más preferiblemente, de 100 a 1000 Dalton. Lo más preferiblemente, una molécula pequeña en el contexto de la presente invención tiene un peso molecular de 100 a 800 Dalton. Se prefiere adicionalmente que una molécula pequeña en el contexto de la presente invención cumpla la "Regla de cinco" como se establece a continuación y, por lo tanto, sea oralmente activa (es decir, tenga una buena biodisponibilidad oral); estas reglas son las siguientes: la molécula pequeña no tiene más de cinco donantes de unión de hidrógeno (p. ej., átomos de nitrógeno u oxígeno con uno o más átomos de hidrógeno); la molécula pequeña no tiene más de diez aceptores de unión de hidrógeno (p. ej., átomos de nitrógeno u oxígeno); la molécula pequeña tiene una masa molecular menor que 500 Dalton; la molécula pequeña tiene un coeficiente de reparto de octanol-agua *log P* no mayor que 5.

25

30

35

40

2. Descripción detallada de ciertos aspectos de la presente invención

2.1. Hallazgo subyacente derivado de resultados que se muestran en la sección de ejemplos

La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de que la proteasa mitocondrial MPP (que es responsable de la escisión de las presecuencias de importación del extremo N de proteínas mitocondriales codificadas por el núcleo (21)) está funcionalmente acoplada a la proteasa mitocondrial PreP (que es responsable de la degradación de las presecuencias de importación del extremo N).

45

Este vínculo funcional tiene las siguientes consecuencias para la AD: Se sabe que la proteína amiloide beta (A β) está presente en pacientes que padecen AD y que la A β , *inter alia*, se dirige a las mitocondrias dentro de las células; además, se sabe que la A β enlentece/inhíbe la actividad de PreP (17). El vínculo funcional tal como lo hallaron los inventores resulta en que MPP también se enlentece/inhíbe. En consecuencia, las proteínas precursoras mitocondriales (que todavía comprenden presecuencias de importación en el extremo N) y proteínas precursoras mitocondriales intermediarias (que todavía comprenden partes de las presecuencias de importación en el extremo N) se acumulan. Por consiguiente, las funciones mitocondriales se alteran en gran medida, p. ej., con respecto a la respiración y la respuesta al estrés oxidativo. En relación con las proteínas precursoras mitocondriales intermediarias mencionadas anteriormente, cabe señalar que MPP no solo cataliza la escisión completa de las presecuencias de importación (que da como resultado la proteína madura), sino que, en algunos casos, también escinde solo parte de las presecuencias de importación (que da como resultado proteínas precursoras

50

55

intermediarias). Generalmente, dichas proteínas precursoras intermediarias se procesan adicionalmente mediante Oct1/MIP (la octapeptidil peptidasa), que también se enlentece/inhíbe si PreP se enlentece/inhíbe.

5 Cabe señalar que las disfunciones mitocondriales, incluida la respiración celular, respuesta al estrés oxidativo, síntesis de ATP, mantenimiento del ADN mitocondrial y expresión génica alteradas se han observado en etapas tempranas de la AD y se ha propuesto que la disfunción mitocondrial puede servir como marcador periférico para la detección de la AD en células sanguíneas, especialmente en linfocitos. También se ha propuesto que las alteraciones tempranas de la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo pueden preceder a la superproducción y depósito de A β (la llamada "hipótesis de cascada mitocondrial"). Sin embargo, esto todavía no se ha vinculado con una acumulación de proteínas precursoras y precursoras intermediarias mitocondriales.

10 Debido al vínculo hallado por los inventores, cantidades crecientes de proteínas precursoras y precursoras intermediarias mitocondriales son indicativas de la presencia y/o una cantidad mayor de A β en las mitocondrias y células, respectivamente. Las cantidades crecientes de proteínas precursoras y precursoras intermediarias mitocondriales son, por lo tanto, características de la AD y, particularmente, de la etapa temprana de AD.

2.2. Procesamiento de muestras

15 Se puede preferir procesar la muestra proporcionada en la etapa a) de un método del primer aspecto de la presente invención antes de llevar a cabo cual(es)quier etapa(s) adicional(es).

20 La(s) etapa(s) de procesamiento *inter alia* depende(n) del método que se va a usar para la determinación de la cantidad que se lleva a cabo en la etapa b) (incluida la determinación de la presencia/ausencia de al menos una proteína mitocondrial prematura). Por lo tanto, si se usa, p. ej., una transferencia Western como método inmunológico, la muestra final que se va a analizar típicamente se proporciona en un tampón desnaturalizante. Para el análisis por MS, hay disponibles diferentes tampones conocidos para el experto y se usan según procedimiento rutinarios. Las preparaciones, tampones y similares ilustrativos que dependen del método que se va a usar se proporcionan en la sección de ejemplos de la presente solicitud.

Además, la(s) etapa(s) de procesamiento también depende(n) de la muestra usada en el método.

25 Si se usa una muestra de tejido y, en particular, una muestra de cerebro (p. ej., una muestra de la corteza temporal), el tejido típicamente se homogeneiza para lisar las células; una etapa posterior puede ser una centrifugación o similares para retirar las células enteras y núcleos. Típicamente, a continuación, se recogen las mitocondrias del lisado mediante otra centrifugación y se lisan al usar, p. ej., un tampón de lisis adecuado. El contenido proteico de este lisado mitocondrial después se analiza típicamente en la etapa posterior, en donde se pueden usar métodos comunes tales como determinación de la concentración, etc., con fines de normalización. Se proporciona un procesamiento ilustrativo de muestras de cerebro humano en la sección de ejemplos de la presente solicitud.

30 Si se usa sangre como fluido corporal como muestra, puede ser necesario concentrar las células que contienen mitocondrias; por lo tanto, se puede preferir la separación de los eritrocitos para retirar las células que no contienen mitocondrias, se pueden usar procedimientos estándares conocidos para el experto para la separación de los eritrocitos. Por lo tanto, se puede preferir recoger y concentrar los leucocitos y los trombocitos y posteriormente someter a lisis dichas células según métodos estándares. A continuación, se pueden recoger y lisar las mitocondrias. También se pueden usar las células directamente. Según se señaló anteriormente para una muestra de cerebro, el contenido proteico del lisado mitocondrial después se analiza típicamente en la etapa posterior, en donde se pueden usar métodos comunes tales como determinación de la concentración, etc., con fines de normalización. Sin embargo, también se puede usar el sobrenadante de una muestra de fluido corporal (en particular sangre) directamente después de una etapa inicial de centrifugación o incluso la propia muestra de fluido corporal, en donde podría ser necesaria una etapa de concentración del sobrenadante y la muestra, respectivamente (opcionalmente llevada a cabo mediante ultrafiltración) para concentrar las preproteínas mitocondriales para la detección. Cabe señalar que en el Ejemplo 3.3 a continuación se describe un modo ilustrativo de usar sangre como muestra.

35 Si se usa piel como muestra, se prefiere usar los fibroblastos comprendidos en ella como células sometidas al análisis. Para obtener una cantidad suficiente de fibroblastos de una muestra de piel, puede ser necesario aislar los fibroblastos y/o concentrar los fibroblastos. Se prefiere cultivar los fibroblastos según métodos estándares antes de llevar a cabo el análisis para aumentar la cantidad de fibroblastos. El uso de fibroblastos de la piel y métodos estándares de este tipo se han descrito anteriormente, p. ej., en la publicación internacional WO 02/067764 (ver en particular la sección "Processing and culture of fibroblasts from fresh biopsies en las páginas 22 y 23 de la publicación internacional WO 02/067764).

45 Los protocolos y tampones típicos son conocidos para el experto y se pueden encontrar, p. ej., en las siguientes dos páginas web:

https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/protein_purification/extraction_clarification/lysis_buffer_additives
http://en.wikipedia.org/wiki/Lysis_buffer

Por lo tanto, un método de la presente invención que incluye las etapas adicionales mencionadas anteriormente también se puede formular de la siguiente manera:

- 5 Método para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer (AD) en un paciente que comprende las siguientes etapas:
- Proporcionar una muestra de un paciente que posiblemente padece AD;
 - Recoger y/o concentrar las células que contienen mitocondrias a partir de dicha muestra;
 - Lisar dichas células y opcionalmente recoger y/o concentrar las mitocondrias;
 - Lisar dichas células / mitocondrias;
- 10 - Determinar la cantidad de al menos una proteína mitocondrial prematura, en donde dicha proteína mitocondrial prematura comprende al menos parte de su presecuencia dirigida a la mitocondria; y
- Comparar la cantidad obtenida en la etapa anterior con la cantidad de dicha al menos una proteína mitocondrial prematura determinada en una muestra testigo,
- 15 en donde dicha muestra testigo se deriva de un sujeto que no padece AD; en donde una cantidad más alta de dicha al menos una proteína mitocondrial prematura en la muestra de un paciente que posiblemente padece AD en comparación con la cantidad de dicha al menos una proteína mitocondrial prematura en la muestra testigo indica AD en dicho paciente.

2.3. Proteínas precursoras preferidas

- 20 Las formas precursoras y precursora intermediaria de las siguientes proteínas mitocondriales se prefieren particularmente en la presente invención (en donde todas las isoformas y variantes de empalme también se incluyen); a continuación, se proporcionarán no solo detalles sobre estas proteínas, sino también sobre su presecuencia dirigida a la mitocondria (comenzando desde el extremo N):
- hMdh2: Malato deshidrogenasa 2 humana, mitocondrial
 [MDH2 humana, núm. acc. de GenBank CAG38785.1]
 - 25 MLSALARPASAALRRSFSTSAQNN (SEQ ID No.: 20)
 - hOAT: Ornitina aminotransferasa humana, mitocondrial
 [OAT humana, núm. de acc. de UniProtKB P04181]
 - MFSKLAHLQRFAVL SRGVHSSVASATSVATKKT VQ (SEQ ID No.: 21)
 - hACADV: Acil-CoA deshidrogenasa específica de cadena muy larga humana, mitocondrial
 - 30 [ACADV humana, núm. de acc. de UniProtKB P49748]
 - MQAARMAASLGRQLLRLGGSSRLTALLGQPRPGPARRPY (SEQ ID No.: 22)
 - PMPCA: subunidad alfa de peptidasa de procesamiento mitocondrial, mitocondrial
 [núm. de acc. de UniProtKB Q10713]
 - MAAVVLAATRLLRGSGSWGCSRLRF GPPAYRRF (SEQ ID No.: 23)
 - 35 - CLYBL: Proteína similar a subunidad beta de citrato liasa, mitocondrial
 [núm. de acc. de UniProtKB Q8N0X4]
 - MALRLLRRAARGAAAAALLRLK (SEQ ID No.: 24)
 - PPM1K: Proteína ph, mitocondrial
 [PPM1K, núm. de acc. de UniProtKB Q8N3J5]
 - 40 MSTAALITLVRSGGNQVRRRVLSSRLLQ (SEQ ID No.: 25)

- SLIRP: Proteína de unión a ARN que interactúa con tallo-bucle, mitocondrial

[SRA, núm. de acc. de UniProtKB Q9GZT3]

MAASAARGAAALRRSINQPVAFVRRIPW (SEQ ID No.: 26)

- NDUFA9: Subunidad 9 del subcomplejo alfa de NADH deshidrogenasa [ubiquinona] 1, mitocondrial

5 [NDUA_humana, núm. de acc. de UniProtKB Q16795]

MAAAAQSRVVRVLSMSRSAITAIATSVCHGPPCRQ (SEQ ID No.: 69)

- MRPL23: 39S proteína ribosómica L23, mitocondrial

[RM23_humana, núm. de acc. de UniProtKB Q16540]

MARNVVYPLYRLGGPQLRVFRT (SEQ ID No.: 70)

10 3. Ejemplos

3.1. Ejemplo 1:

La disfunción mitocondrial tiene un papel importante en la patología de la enfermedad de Alzheimer (AD). Aunque todavía no está claro si la disfunción mitocondrial es una causa o una consecuencia de la AD y cómo se conecta con otras disfunciones celulares (1-4), la A β parece acumularse en las mitocondrias de pacientes con AD y afecta a varias funciones que incluyen la respiración, detoxificación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y morfología organular (2, 5-14). La A β se puede aclarar mediante el *peptidasoma* PreP de matriz mitocondrial, una metalopeptidasa que degrada péptidos incluidos péptidos de presecuencia generados después de la maduración de las proteínas precursoras importadas y que tiene actividad disminuida en la AD (15-17). Muchas proteínas mitocondriales contienen presecuencias de extremo N que dirigen estos precursores desde el citosol hacia el orgánulo. Después de la importación, las presecuencias se escinden mediante la *peptidasa de procesamiento mitocondrial* MPP en la matriz que libera la proteína madura (18-21). En varios casos la MPP genera formas intermediarias que se procesan adicionalmente mediante la *octapeptidil peptidasa* Oct1/MIP o la *peptidasa de escisión intermediaria* Icp55.

Se analizaron mitocondrias aisladas a partir de muestras de cerebro póstumas de cuatro pacientes con AD y cuatro testigos sin AD de la misma edad (tabla S2) y se observó la presencia de especies precursoras moleculares más altas de la proteína de matriz MDH2 en todas las muestras de los pacientes, pero no en los testigos (Figura 1A). Se hicieron observaciones similares, es decir, la detección de especies precursoras moleculares más altas para las proteínas NDUFA9 y MRPL23 (no se muestran los datos). Un anticuerpo creado contra el péptido de presecuencia de MDH2 que reconoce solo el precursor, pero no la proteína escindida madura, confirmó la acumulación específica de los precursores de MDH2 en las mitocondrias de AD (Figura 1B). Se especuló que la acumulación de A β retarda el recambio peptídico de la matriz e induce, de este modo, la inhibición por retroalimentación de enzimas de procesamiento de presecuencias.

Para hallar un vínculo funcional entre la maduración de la preproteína mitocondrial y el recambio peptídico y su posible función en la toxicidad de A β , se usó *S. cerevisiae* que representa un organismo modelo ideal para estudiar los mecanismos básicos de las enfermedades humanas, incluida la AD (3, 25). Se generó un mutante que carece el homólogo de PreP de levadura Cym1 (26) y aloja un alelo sensible a la temperatura de la subunidad Mas1 de MPP esencial (18, 19, 21). El mutante no fue capaz de crecer en condiciones respiratorias (es decir, condiciones en las que el metabolismo de energía mitocondrial es esencial para la viabilidad celular) lo cual indica una interacción genética de la peptidasa de presecuencia MPP y el peptidasoma Cym1 (Figura 1C). Para evaluar si la degradación peptídica alterada afecta la actividad de procesamiento de presecuencia de MPP, se llevó a cabo un análisis de espectrometría de masas global de los extremos N mitocondriales en mitocondrias *cym1Δ* al usar COFRADIC (*cromatografía diagonal fraccional combinada*) (21) y una gran cantidad de extremos N en las mitocondrias *cym1Δ* correspondía a precursores o intermediarios de procesamiento no procesados de proteínas doblemente procesadas en comparación con el N-proteoma de las mitocondrias naturales (21). El análisis por transferencia Western de varias proteínas mitocondriales reveló una fuerte acumulación de formas precursoras, intermediarios de procesamiento y niveles reducidos de proteínas maduras, escindidas en las mitocondrias *cym1Δ* en comparación con las naturales (Figuras 1D y E). Las proteínas afectadas abarcan una variedad de funciones mitocondriales que incluyen la respiración, síntesis de ATP, mantenimiento de ADN mitocondrial y expresión génica o respuesta al estrés oxidativo (Figuras 1D y E). El análisis de los mutantes *cym1* que carecen de residuos esenciales de su motivo de unión a metal (HXXEH) (26) indicó que la acumulación de las proteínas precursoras depende de la actividad de proteasa de Cym1 (Figura 1 F). La evaluación de varias funciones mitocondriales en mitocondrias *cym1Δ* reveló niveles mayores de ROS, potencial de la membrana reducido y consumo de O₂ alterado en comparación con las naturales (Figura S1). Se han observado efectos similares en las mitocondrias de AD (2, 6, 7, 10, 17).

Para analizar directamente una dependencia de la maduración de la preproteína con respecto al recambio peptídico, se empleó un ensayo de procesamiento in vitro en extractos mitocondriales (Figura S2) (16) de las mitocondrias naturales y *cym1Δ*. Los péptidos de presecuencia se degradaron rápidamente en los extractos naturales, pero no en los de *cym1Δ* (Figuras S3A y B). En presencia de un péptido de presecuencia típico (Cox4^{presec.}) (19), el procesamiento in vitro del precursor Sod2 radioetiquetado por MPP se bloqueó de manera eficaz en ausencia de Cym1 (Figura 2A). Los péptidos de presecuencia Cox4 fueron capaces de inhibir la MPP purificada en concentraciones similares (Figura S4) (19). Después de la adición de la proteína Cym1 traducida sin células, se podría restaurar la actividad de procesamiento de MPP en los extractos de *cym1Δ* (Figura 2B). Estos resultados sugieren que el recambio alterado de los péptidos de presecuencia conduce a la inhibición de la actividad de MPP, lo que explica la acumulación de precursores en las mitocondrias mutantes *cym1Δ* in vivo (Figuras 1D y E). Sin embargo, también resultó desconcertante la acumulación de intermediarios de procesamiento precursores en el mutante *cym1Δ* (Figura 1D). Se ha propuesto que PreP/Cym1 requiere una longitud de sustrato mínima de 11 aminoácidos, mientras que la peptidasa intermediaria Oct1 genera octapéptidos (15, 23). Se generó un mutante doble *oct1Δcym1Δ* y el defecto de crecimiento sintético observado indicó un vínculo funcional entre ambas enzimas (Figura 2C). Se halló que la actividad de procesamiento de MPP no se ve afectada por octapéptidos (derivados del sustrato Oct1 Sdh1), a diferencia de los péptidos de presecuencia (Figura 2D y Figura S4). Sin embargo, el procesamiento in vitro del precursor Cox4 que se escinde secuencialmente mediante MPP y Oct1 reveló una alteración específica de la etapa de procesamiento dependiente de Oct1 en *cym1Δ* en presencia de octapéptidos (Figura 2E). Esto indicó que Cym1 también degrada péptidos más cortos y que un recambio alterado de presecuencias generadas por MPP y octapéptidos derivados de Oct1 conduce a una inhibición de enzimas de procesamiento de presecuencias que provocan la acumulación de precursores e intermediarios de procesamiento. La maduración alterada podría conducir a una estabilidad reducida de las proteínas mitocondriales (19, 21-24) y cantidades reducidas de proteínas maduras (Figuras 1D y E).

Se halló que los péptidos de Aβ se degradaron mediante Cym1 en extractos mitocondriales y mediante la enzima recombinante (Figuras 3A y B). Sin embargo, la degradación de Aβ fue más lenta en comparación con el recambio de péptidos de presecuencia (Figura S3B). La presencia de Aβ, pero no de una forma aleatorizada pareció alterar la capacidad de degradación de presecuencias de Cym1 (Figura 3C). Cuando se evaluó la actividad de MPP en presencia de Aβ, se halló un llamativo retardo en el procesamiento del precursor Sod2 (Figura 3D). Se observó que Aβ¹⁻⁴⁰ (a diferencia de la versión más corta Aβ¹⁻²⁸) inhibió ligeramente la actividad de MPP purificada a concentraciones más altas (Figura S5) y, por lo tanto, la versión más corta se incluyó en los ensayos funcionales.

La siguiente interrogante fue si la Aβ mitocondrial podría alterar la maduración del precursor y se eligieron dos sistemas de modelo. En primer lugar, se evaluaron extractos solubles preparados en el momento de mitocondrias de cerebro de ratones PS2APP. Este modelo de AD aloja mutaciones en los genes PS2 (N141I) y APP (Swedish FAD) y exhibe acumulación de Aβ en las mitocondrias (Figura 4A) (10, 27). De hecho, el procesamiento del precursor Cox4 estuvo significativamente alterado en muestras de PS2APP en comparación con ratones naturales de la misma edad (Figura 4B). En segundo lugar, se estableció un modelo de levadura que permitía la expresión inducida por galactosa de una proteína de fusión eGFP-Aβ¹⁻⁴² que aloja un sitio de escisión para TEV proteasa (Figura 4C). La coexpresión de TEV proteasa condujo a la liberación de péptidos de Aβ en el citosol (Figura S6A). Para imitar una disfunción mitocondrial relacionada con el envejecimiento usamos la cepa *coa6Δ* que exhibía una inestabilidad moderada de complejos de cadena respiratoria (28, 29) e inducía la expresión de eGFP-Aβ¹⁻⁴² después de 1d de incubación en galactosa. La Aβ se localizó en las mitocondrias y alteró la maduración del precursor Sod2 en extractos mitocondriales solubles (Figuras 4D y E). La vía de importación de la presecuencia no se vio afectada por Aβ (Figura S6B). Después de 3d de inducción, se observó una acumulación in vivo de varias proteínas precursoras mitocondriales en la cepa que expresaba Aβ (Figura 4E). En función de estos datos, se puede proponer el modelo que se muestra en la Figura S7.

3.2. Ejemplo 2

El objetivo de este ejemplo fue detectar y determinar las proteínas mitocondriales humanas que comprendían al menos parte de su presecuencia de extremo N (es decir, preproteínas) en muestras de cerebro de pacientes con AD en comparación con testigos de la misma edad sin AD.

Las muestras se analizaron según el método CHAFRADIC descrito en Venne et al., J. Proteome Res. 12, 3823 (2013). Las muestras mitocondriales humanas (ver la sección 3.3. a continuación para obtener más detalles) se lisaron con tampón de lisis (SDS al 2 %, 150 mM de NaCl, 50 mM de Tris, pH 7,8) y posteriormente se carbamido-metilaron. Por lo tanto, los lisados se redujeron inicialmente con 10 mM de DTT durante 30 minutos a 56 °C y después se alquilieron con 20 mM de IAA durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.

Para el etiquetado con dimetilo específico de los extremos N de proteína y residuos de lisina libres, se trataron 100 μg de cada una de la muestra testigo y de AD con una etiqueta pesada y ligera, respectivamente, durante 2 horas a 37 °C según el protocolo de Jentoft et al., J Biol Chem 1979, 254(11):4359-4365. Para llevar a cabo el etiquetado ligero, la muestra testigo se incubó con 20 mM de CH₂O, 40 mM de NaBH₃CN en 200 mM de HEPES, pH 8,0. La muestra de AD se etiquetó con una etiqueta pesada al usar 20 mM de CD₂O, 40 mM de NaBD₃CN en 200 mM de

HEPES. La reacción se bloqueó a través de incubación con 60 mM de glicina durante 10 minutos y 130 mM de hidroxilamina durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se agruparon en una relación 1:1 y se llevó a cabo la precipitación con etanol.

5 La muestra agrupada se trató con etanol helado en una relación 1:10 y se incubó durante 1 hora a -40 °C, con la posterior granulación de las proteínas a través de centrifugación a 4 °C durante 30 minutos. Después de descargar el sobrenadante, el granulado se secó inicialmente a temperatura ambiente y después se solubilizó en 40 µL de 2M GuHCl, 50 mM de Na₂HPO₄, pH 7,8. La disolución de proteína después se diluyó para la posterior digestión proteolítica con tampón de digestión (50 mM de NH₄HCO₃, Acetonitril al 5 %, 1 mM de CaCl₂, pH 7,8) en una relación 1:10. La digestión proteolítica se llevó a cabo mediante el uso de tripsina de Promega en una relación 1:30
10 durante 12 horas a 37 °C.

Después de que se llevó a cabo un control de digestión monolítica (Burkhart JM et al-. J Proteomics 2012; 75(4):1454-1462), la muestra se preparó para el intercambio catiónico fuerte, SCX. La muestra se desaló al usar un cartucho de 4 mg C18 SPEC. La separación por SCX se llevó a cabo en un sistema U3000 HPLC (Thermo Scientific) en combinación con una columna de 150 x 1 mm POLYSULFOETHYL A (PolyLC, Columbia, EE. UU., diámetro de partícula de 5 µm, tamaño de poro de 200 Å) con tres tampones: Tampón de SCX A (10 mM de KH₂PO₄, ACN al 20 %, pH 2,7), tampón de SCX B (10 mM de KH₂PO₄, 188 KCl, ACN al 20 %, pH 2,7) y tampón de SCX C (10 mM de KH₂PO₄, 800 mM de NaCl, ACN al 20 %, pH 2,7). Se suspendieron 100 µg de la muestra desalada en 50 µl tampón de SCX A y se separaron a un flujo de 80 µg/ml con un gradiente optimizado para las condiciones de carga de péptido: en 10 minutos, se usó tampón de SCX A al 100 %; después, la relación del tampón de SCX B se aumentó en 18 minutos de 0 a 20 %, en donde el gradiente se mantuvo durante 10 minutos con tampón de SCX B al 20 %. A continuación, la relación del tampón de SCX B se aumentó en 2 minutos de modo lineal hasta B al 40 % y se mantuvo durante 5 minutos adicionales, antes de que la relación del tampón de SCX de B se aumentase de modo lineal en 5 minutos hasta 100 %. Después de 5 minutos con tampón de SCX B al 100 %, la columna se lavó durante 5 minutos con tampón de SCX C al 100 %. Las fracciones de las condiciones de carga +1, +2, +3, +4, +5 se recogieron automáticamente y se concentraron hasta un volumen de 40 µl empleando vacío.
15
20
25

Para la derivación química de los extremos N de péptidos internos, las fracciones se ajustaron hasta un volumen final de 300 µl con 200 mM de Na₂HPO₄, pH 8,0 y después en dos etapas se incubaron durante 1 hora cada una con inicialmente 20 mM y después 10 mM de NHS-trisdeuteroacetato a 37 °C (Staes A et al., Nat Protoc 2011, 6(8):1130-1141). La reacción se bloqueó a través de incubación con 60 mM de glicina durante 10 minutos y 130 mM de hidroxilamina durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las fracciones se desalaron según se describió anteriormente al usar cartuchos de 4 mg C18 SPEC (Agilent) y después de concentrar las muestras hasta un estado seco se disolvieron en 50 µl de tampón de SCX A. La recromatografía de las condiciones de cargas +1, +2, +3, +4, +5 se llevó a cabo en las condiciones descritas anteriormente en separaciones independientes, en donde nuevamente se recogieron las condiciones de carga correspondientes. A continuación, se desalaron según se describió anteriormente al usar cartuchos de 4 mg C18 SPEC (Agilent) y después de la concentración hasta un estado seco se suspendieron al vacío en 15 µl de ácido trifluoroacético al 0,1 % (TFA).
30
35

El análisis cuantitativo de los péptidos del extremo N péptidos concentrados se llevó a cabo mediante LC-MS y los resultados se proporcionan en la siguiente tabla:

40 Identificación de extremos N mitocondriales de proteínas precursoras mitocondriales de mitocondrias de cerebro humano (lóbulo temporal); las relaciones entre péptidos se proporcionan en AD/testigos; gris: péptidos de presecuencia acumulados.

| Acc. | Proteína | Acc. de presencia en Uniprot | Péptido del extremo N identificado | | | PACIENTE 2 | | | | PACIENTE 1 | | | |
|--------|--|------------------------------|------------------------------------|-----------|-----------------------------------|--|--|--|--|------------|---------|----------------|----------------|
| | | | Primer AA | Último AA | Sec. | veces cuantificado (cuan) e identificado (PSM) | mediana de relación AD/testigo y desviación típica correspondiente | veces cuantificado (cuan) e identificado (PSM) | mediana de relación AD/testigo y desviación típica correspondiente | | | | |
| | | | | | | N.º cuant. | N.º PSM | MD de relación | DT de relación | N.º cuant. | N.º PSM | MD de relación | DT de relación |
| P04181 | OAT_HUMAN Ornitina aminotransferasa, mitocondrial | 1 a 36 | 26 | 46 | ISVATk kTVQG PPTSD DIFER | 3 | 7 | 2,31 | 0,10 | 4 | 8 | 2,87 | 0,29 |
| P49748 | ACADV_HUMAN Acil-CoA deshidrogenasa específica de cadena muy larga mitocondrial | 1 a 40 pred. | 7 | 16 | aASLG RQLLR | | | | | 11 | 37 | 100,00 | 36,73 |
| Q10713 | subunidad alfa de peptidasa de procesamiento mitocondrial | 1 a 33 | 2 | 10 | aAVVL AATR | 1 | 2 | 8,91 | | 2 | 6 | 6,76 | 3,66 |
| Q8N0X4 | Proteína similar a subunidad beta de citrato liasa, mitocondrial | 1 a 22 pred. | 9 | 20 | aARGA ΛΛΛΛL LR | 4 | 5 | 100,00 | | | | | |
| Q8N3J5 | PPM1K_HUMAN Proteína ph | 1 a 29 | 4 | 11 | aALIIL VR | 9 | 17 | 100,00 | | 4 | 6 | 77,02 | 26,74 |
| Q9GZT3 | SRA Proteína de unión a ARN que interactúa con tallo-bucle, mitocondrial | 1 a 28 pred. | 4 | 13 | sAARG ΛΛΛLR | 4 | 13 | 100,00 | | 1 | 3 | 100,00 | |

3.3. Detección de MDH2 prematura en sangre

Se tomaron muestras de sangre frescas de dos pacientes diagnosticados con AD y dos sujetos humanos de la misma edad que no padecen AD (denominados testigos de aquí en adelante).

- 5 Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) a partir de las muestras y se crioconservaron según la referencia 43. De manera resumida, se aislaron PBMC a partir de sangre EDTA fresca, se diluyeron con el mismo volumen de disolución salina equilibrada de Hanks libre de $Ca^{2+}Mg^{2+}$ (HBSS de PAA) o disolución salina tamponada con fosfato (PBS de PAA) y se pipetearon cuidadosamente en gradientes Ficoll-Hypaque (Linaris) en tubos Falcon con relación 1:2 entre Ficoll-Hypaque y sangre diluida. Después de la centrifugación (25-30 minutos, 810 g, sin interrupción, temperatura ambiente) se recogió la interfaz con las PBMC.
- 10 Las células se lavaron tres veces con HBSS (10 min, 300 g, temperatura ambiente) y se contaron con un hemocitómetro al usaron azul tripán (Sigma) para discernir entre células vivas y muertas. Para el congelamiento, las células se resuspendieron cuidadosamente con suero fetal bovino al 40 % (FBS de Sigma o FCS de Invitrogen) en RPMI 1640 (Gibco) a temperatura ambiente. Se agregó el mismo volumen de DMSO al 20 % (Serva) en RPMI en dos etapas con 5 min de espera entre ellas. Las células en crioviales especiales (Greiner) se colocaron en cajas de cartón y se pasaron inmediatamente a un congelador a -80 °C y a nitrógeno líquido para almacenamiento a largo plazo.

Posteriormente, las PBMC se fraccionaron adicionalmente en las fracciones de "monocitos" y "distintas de monocitos".

- 20 Para separar las PBMC en estas dos fracciones, se usó la tecnología MACS de Miltenyi. Se incubaron las PBMC siguiendo las instrucciones del fabricante (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemania) con bloqueador de receptor FC (proporcionado por el fabricante) para bloquear la unión al anticuerpo no específica, se lavaron y se incubaron con

anticuerpos monoclonales especiales que se dirigen a moléculas superficiales específicas en la población celular deseada (en el presente caso CD14 para el aislamiento de los monocitos) o en caso de selección negativa en el resto de las PBMC (es decir, distintas de monocitos). Estos anticuerpos se enlazaron con partículas súper paramagnéticas (MACS MicroBeads). Cuando la suspensión celular se pipeteó en columnas (proporcionadas por el fabricante) en las cuales se aplica un campo magnético fuerte, se retuvieron las células etiquetadas. A través de un enjuague simple se recogieron las células no etiquetadas. Después de desprender la columna del imán, también se enjuagó la fracción de células etiquetadas, se recogió y se usó para experimentos adicionales. Con un hemocitómetro (cámara de Neubauer) se verificó el rendimiento de cada fracción y la pureza y el éxito de la separación se confirmaron mediante citometría de flujo según métodos estándares.

Después del procedimiento anterior, las fracciones de (i) monocitos y (ii) distintas de monocitos derivadas de PBMC estuvieron disponibles de dos pacientes con AD y dos testigos.

Las muestras de estas fracciones se separaron mediante una SDS-PAGE desnaturalizante (una cantidad de proteína de aproximadamente 10 µg se usó para cada muestra [y, por lo tanto, por carril]) según métodos estándares, y se llevó a cabo una transferencia Western según métodos estándares con el anticuerpo mencionado anteriormente que solamente reconoce el precursor MDH2 (pero no la proteína madura escindida, ver los procedimientos experimentales descritos en el siguiente ejemplo). Como puede deducirse a partir de la Figura S9, los precursores MDH2 están presentes y, por lo tanto, se acumulan en la fracción distinta de monocitos de las muestras de sangre de pacientes con AD, pero no en los testigos (cabe señalar que la señal "punto" en la fracción de monocitos de C2 en la Figura S9 es un artefacto). Por consiguiente, las proteínas mitocondriales humanas que comprenden al menos parte de su presecuencia en el extremo N pueden detectarse específicamente en muestras de sangre de pacientes con AD.

3.4. Procedimientos experimentales usados en los ejemplos anteriores

Cepas de levadura y condiciones de crecimiento

Las cepas de levadura usadas en este estudio se indican en la tabla S1. Se cultivaron células de levadura en medio YPD (extracto de levadura al 1 % (p/v), bacto-peptona al 2 % (p/v), glucosa al 2 % (p/v)) o medio YPG (que contiene glicerol al 3 % (p/v) en lugar de glucosa). Se generaron mutantes por eliminación mediante recombinación homóloga (31). Para las pruebas de crecimiento, se cultivaron células de levadura en 5 ml de medio YPD a 30 °C. Las cantidades de células (OD_{600}) se ajustaron y se depositaron diluciones en serie de 5 veces sobre placas de agar con YPD o YPG.

Aislamiento de mitocondrias a partir de levadura

Las células de levadura se cosecharon a 24 °C (no se indica de cualquier otra manera) hasta una OD_{600} de 1,0-1,5. Las células se recogieron, se lavaron en dH_2O y se incubaron en tampón DTT (0,1 M Tris/ H_2SO_4 , pH 9,4, 10 mM DTT) durante 20 min. Después de reisolamiento, los sedimentos celulares se resuspendieron en tampón de zimoliasa (1,2 M sorbitol, 20 mM de K_2HPO_4/HCl , pH 7,4) complementado con 3 mg/mg (peso húmedo de células) de zimoliasa y se incubaron durante 40 min a 24 °C. Los esferoplastos resultantes se lavaron en tampón de zimoliasa sin enzima y se resuspendieron en tampón homogeneizante (0,6 M sorbitol, 10 mM de Tris/ HCl , pH 7,4, 1 mM de EDTA, BSA al 0,2 % (p/v), 1 mM de PMSF). Las células se sometieron a 20 pulsaciones en un homogeneizador de vidrio. Los residuos celulares se retiraron mediante dos etapas de centrifugación consecutivas durante 5 min a 1500 xg a 4 °C. Las mitocondrias se aislaron mediante centrifugación durante 15 min a 16 000 xg a 4 °C. Las mitocondrias se suspendieron en tampón de SEM (250 mM de sacarosa, 1 mM de EDTA, 10 mM de MOPS/ KOH , pH 7,2) y se determinó la concentración proteica mediante ensayo Bradford y se ajustó hasta 10 mg/ml. Se ultracongelaron alícuotas en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C.

Ensayos de procesamiento y degradación con extractos mitocondriales solubles de levadura

Se lavaron mitocondrias aisladas a partir de cepas de levadura cultivadas en condiciones respiratorias con tampón de SEM, se reisolaron y resuspendieron en tampón de reacción (250 mM de sacarosa, 10 mM de MOPS/ KOH , pH 7,2, 80 mM de KCl , 5 mM de $MgCl_2$, 5 mM de KH_2PO_4) hasta una concentración de 3 µg/µl. Las mitocondrias se sometieron a sonicación (cinco veces 30 s con interrupciones de 30 s sobre hielo, Sonifier250, Branson) y posterior centrifugación a 100 000 xg durante 45 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido se usó para los experimentos de procesamiento y degradación. Se agregaron 0,5 µl de proteína precursora radio etiquetada y/o diversos péptidos en diferentes concentraciones a 9 µl de extractos mitocondriales solubles de levadura. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de 4x tampón Laemmli SDS (al 8 % (p/v), azul de bromofenol al 0,08 % (p/v), glicerol al 40 % (v/v), 240 mM de Tris/ HCl , pH 6,8) que contenía β-mercaptoetanol al 5 % (v/v) y se analizaron mediante SDS-PAGE con posterior autorradiografía e inmunodecoración. Las proteínas precursoras radioetiquetadas se sinterizaron con el sistema de lisado de reticulado de conejo de transcripción/traducción (Promega) en presencia de ^{35}S -metionina. Las cantidades químicas de Cym1 y proteína testigo (Oct1) se sintetizaron in vitro al usar el sistema de germen de trigo RTS (5 PRIME). Se usaron 0,5 µl de producto de traducción libre de células en los ensayos de procesamiento.

Medición del potencial de la membrana

El potencial de la membrana ($\Delta\psi$) se midió mediante aplacamiento de fluorescencia. Se incubaron mitocondrias de levadura aisladas (50 μ g) en 3 ml de tampón de potencial (0,6 M sorbitol, BSA al 0,1 % (p/v), 10 mM de $MgCl_2$, 0,5 mM EDTA, 20 mM de KPi, pH 7,2) en presencia de 3 μ l de DiSC3 (yoduro de 3,3'-dipropiltiadicarbocianina, 2 mM en etanol). Las muestras se mezclaron y se midió la absorción hasta que se alcanzó el equilibrio de distribución (excitación 622 nm, emisión 670 nm) al usar el espectrómetro de luminiscencia Aminco Bowman2 (Thermo Electron Corporation). El potencial de la membrana se dispó mediante la adición de 4 μ l de valinomicina (1 mM en etanol). Los datos se analizaron con FL WinLab (Perkin Elmer).

Respirometría de alta resolución

Se midió la respiración mitocondrial con Oxygraph 2-k (Oroboros Instruments, Austria) y se analizó con el programa informático DATLAB. Las mediciones se llevaron a cabo a 30 °C en una cámara de 2 ml. Se agregaron mitocondrias de levadura aisladas (100 μ g) a 2 ml de tampón de respiración (10 mM de MOPS/KOH, pH 7,2, 250 mM de sacarosa, 5 mM de $MgCl_2$, 80 mM de KCl, 5 mM de KPi) complementado con 1 mM de NADH y 1 mM de ADP para obtener una tasa de respiración básica. La tasa de respiración se midió en un transcurso de 5 min y los valores naturales obtenidos se establecieron como 100 %.

Detección de especies reactivas del oxígeno

Para la tinción con dihidroetidio (DHE) (10), se lavaron 20 μ g de mitocondrias de levadura con tampón de SEM y se incubaron con 1 μ M de DHE en tampón de reacción en la oscuridad durante 10 min. Se midieron las unidades de fluorescencia mediante un lector de fluorescencia (Infinite M200, Tecan) con una longitud de onda de excitación de 480 nm y una longitud de onda de emisión de 604 nm. Las muestras se midieron por triplicado y se restaron las señales de fondo (muestras sin mitocondrias). Los valores naturales se establecieron como el 100 %.

Expresión y purificación del complejo de peptidasa de procesamiento mitocondrial (MPP)

Se transformaron células BL21 de *E. coli* con el plásmido pVG18 (32) que permite la transcripción de un único ARNm que codifica las subunidades β - (con identificador de poli-histidina en el extremo N) y α -MPP (Mas1 y Mas2) de *S. cerevisiae*. Los cultivos celulares se cultivaron en medio LB (10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de NaCl) que contenía 100 μ g/ml de ampicilina a 37 °C hasta una OD_{600} de 0,6. La expresión se indujo mediante la adición de 1 mM de IPTG (β -D-1-tiogalactopiranosido de isopropilo, Formedium) durante 4 h. Las células se recolectaron y se ultracongelaron en nitrógeno líquido. Los gránulos se resuspendieron en tampón de unión (20 mM de Na_3PO_4 , 200 mM de NaCl, 20 mM de imidazol, pH 7,4) que contenía 1 mg/ml de lisozima (Sigma) y 10 μ g/ml de DNaseI (Sigma) y se incubaron durante 1 h a 4 °C para la lisis celular. El extracto celular se centrifugó a 4000 xg para retirar las células enteras. El sobrenadante se centrifugó adicionalmente a 100 000 xg durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido se incubó con resina Ni-NTA (Qiagen) durante 3 h a 4 °C. La resina se lavó cuatro veces con tampón de unión. Las proteínas unidas se eluyeron con tampón de elución (20 mM de Na_3PO_4 , 200 mM de NaCl, 200 mM de imidazol, pH 7,4). El eluato se concentró en un filtro se corte 50 kDa (Milipore) y se aplicó a una columna de exclusión por tamaño Superdex 200 10/300 GL equilibrada en 10 mM de HEPES/KOH, pH 7,4, 50 mM de NaCl, 1 mM de DTT para una purificación adicional de la proteína expresada.

Ensayos de actividad de MPP

Se incubó MPP de levadura purificada (0,15 μ g de proteína) en tampón de procesamiento (10 mM de HEPES/KOH, pH 7,4, 0,1 mM de $MnCl_2$, 1 mM de DTT, 0,1 mg/ml de BSA) durante 15 min a 30 °C (volumen de reacción de 20 μ l) con los péptidos indicados (ver Diversos). Después de la preincubación, se agregó 1 μ l de proteína precursora $F_1\beta$ (*Nicotiana plumbaginifolia*) etiquetada con [^{35}S] y se incubó durante 10 min a 30 °C. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de tampón de muestra de SDS (150 mM de Tris/HCl, pH 7,0, SDS al 12 % (p/v), β -mercaptoetanol al 6 % (p/v), glicerol al 30 % (v/v), azul de bromofenol al 0,05 % (p/v)). Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE y posteriormente mediante autorradiografía. Las bandas se cuantificaron usando el programa informático Multi Gauge (Fuji Film). Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

Ratones transgénicos

La línea de ratón transgénico PS2APP (línea B6.152H) es homocigótica para los transgenes PS2 N141I y APP Swedish FAD humanos. (10, 27). Como testigo, se usaron ratones C57Bl/6 naturales de la misma edad. Los ratones se mantuvieron en un ciclo alternante de 12 h de luz/12 h de oscuridad (las luces se encendían a las 6:00 am) a 20-22 °C. Se proporcionaron agua y alimentos ad libitum. Se mantuvo un cumplimiento estricto de las regulaciones federales alemanas sobre protección animal y las normas de la Asociación para la Evaluación y Acreditación del Cuidado Animal en Laboratorios para todos los procedimientos y todos los experimentos se llevaron a cabo con la aprobación explícita de la autoridad veterinaria local.

Aislamiento de mitocondrias a partir de tejido de ratón

Se sacrificaron ratones de un año y se retiraron los cerebros asépticamente del cráneo. Se extirparon el tronco encefálico y el cerebelo. Todas las etapas siguientes se llevaron a cabo sobre hielo. El tejido se cortó con un bisturí y se pesó. Se suspendieron muestras en disolución B (20 mM de HEPES/KOH, pH 7,6, 220 mM de manitol, 70 mM de sacarosa, 1 mM de EDTA, 0,5 mM de PMSF) de aproximadamente 10 ml/g de tejido cerebral y se homogeneizaron mediante 30 pulsaciones en una cuba de vidrio. Las células enteras se retiraron mediante centrifugación a 800 xg durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se sometió a centrifugación a 7000 xg durante 15 min a 4 °C para el aislamiento de las mitocondrias. El granulado mitocondrial se resuspendió en disolución B y se determinó la concentración proteica mediante un ensayo de proteína de Bradford. Las muestras se ajustaron hasta 10 mg/ml con tampón de sacarosa (10 mM de HEPES/KOH, pH 7,6, 0,5 M de sacarosa), se dividieron en alícuotas, se ultracongelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C.

Ensayos de procesamiento con extractos mitocondriales solubles de ratón

Se lavaron, reaislaron y solubilizaron mitocondrias aisladas en tampón de reacción que contenía digitonina al 1 % (p/v) y 1 mM de MnCl₂. Las muestras se incubaron sobre hielo durante 15 min. Después de la centrifugación a 20 000 xg durante 10 min a 4 °C, el sobrenadante obtenido se usó para ensayos de procesamiento. Se incubaron muestras que contenían 60 µg de extracto mitocondrial en tampón de reacción con 0,5 µl de proteína precursora radioetiquetada a 37 °C durante tiempos diferentes. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de 4x tampón Laemmli que contenía β-mercaptoetanol al 5 % (v/v). Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE y posteriormente mediante autorradiografía e inmunodecoración.

Aislamiento de orgánulos a partir de la corteza temporal de cerebros humanos

Las muestras de tejido (corteza temporal de cerebros humanos) usadas en este estudio se obtuvieron de individuos diagnosticados con enfermedad de Alzheimer (AD) e individuos testigo de la misma edad sin AD y se obtuvieron del Karolinska Institute, Estocolmo (tabla S2). Las muestras se recogieron según las regulaciones locales para fines de diagnóstico. Las muestras de tejido se anonimizaron después de la evaluación diagnóstica y se usaron para este estudio con la aprobación del Comité de ética (Dnr 2011/962-31/1, Estocolmo). Las regiones de la corteza temporal se homogeneizaron con un homogeneizador de vidrio/Teflon (15 pulsaciones) en Tampón A (230 mM de Manitol, 70 mM de Sacarosa, 20 mM de HEPES/KOH, pH 7,2, 0,5 mM de EDTA). Las células enteras y los núcleos se retiraron mediante centrifugación a 484 xg durante 5 min a 4 °C. Para recoger las mitocondrias, la fracción de sobrenadante se centrifugó a 7741 xg durante 10 min a 4 °C. Ambas etapas de centrifugación se repitieron. El granulado mitocondrial se resuspendió en tampón A y se determinó la concentración proteica mediante ensayo de Bradford.

Expresión de Aβ en levadura

El plásmido que codificaba una proteasa TEV (virus del grabado del tabaco) expresada citosólicamente (p416^{TEV_{cyt}}) se generó al eliminar la presecuencia *b₂* de pRS416GAL1-*b₂*-TEV (33) mediante PCR al usar los cebadores 5'-CGTCAAGGAGAAAAACCCCGATTCTAGCATGAGATCCAGCTTGTTTA AGGGACCACGTG-3' (SEQ ID No.: 1) y 5'-CACGTGGTCCCTTAAACAAGCTGGATCTCATGCTA GAATCCGGGGTTTTTCTCCTTGACG-3' (SEQ ID No.: 2). Para la generación del vector pESC^{eGFP-Aβ}, se amplificó eGFP mediante PCR, al usar pUG35(Ura) como plantilla, con los cebadores 5'-ATCTGAATTCATGTCTAAAGGTGAAGAATTATTAC-3' (SEQ ID No.: 3) y 5'-ATCTGAATTCCTT TGTACAATTCATCCATACCATG-3' (SEQ ID No.: 4), se digirió con EcoRI y se ligó en pESC(His) (Stratagene). Este vector pESC-eGFP contenía un enlazador (secuencia: RIQPSLKGGRS; según la parte principal del sitio de clonación múltiple (MCS, por sus siglas en inglés)) para garantizar el plegado adecuado de eGFP y Aβ¹⁻⁴² y un codón de terminación en marco con el MCS. El vector de clonación pESC-eGFP_G donde se omitía el codón de terminación se creó mediante PCR al usar los cebadores 5'-ATCTGAATTCATGTCTAAAGGTGAAGAATTATTAC-3' (SEQ ID No.: 5) y 5'-ATCTG AATTCGTTTGTACAATTCATCCATACCATG-3' (SEQ ID No.: 6). Aβ¹⁻⁴² se amplificó mediante PCR con los cebadores 5'-ATCTACTAGTATGGATGCAGAATTCCGACATGAC-3' (SEQ ID No.: 7) y 5'-ATCTATCG ATTTACGCTATGACAACACCGCCC-3' (SEQ ID No.: 8) al usar pAS1N-Aβ-GFP como plantilla (34), se digirió con SpeI y ClaI y se clonó en pESC-eGFP_G. Se insertó un sitio de escisión de TEV hacia 5' con respecto a Aβ¹⁻⁴² mediante PCR al usar los cebadores 5'-GGGCGGCCGCACTAGTGAGAACCTGTACTTCCAGTCCGATGCAGAATTCC GACATGACTCAGG-3' (SEQ ID No.: 9) y 5'-CGGAATTCTGCATCGGACTGGAAGTACAGGTTCTCACTAGTGCGGCCGCC CTTTAGTGAGGG-3' (SEQ ID No.: 10).

Las cepas se transformaron con p416^{TEV_{cyt}} y pESC^{eGFP-Aβ} o pESC^{ev} (vector vacío) según se describió anteriormente. Se cultivaron células en medio selectivo (base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos al 6,7 % (p/v), glucosa al 2 % (p/v) y Mezcla de complemento completa que carece de histidina y uracilo al 0,77 % (p/v)) a 30 °C. Para la inducción de la expresión, las células se pasaron a medio selectivo que contenía galactosa al 2 % (p/v) en lugar de glucosa y se incubaron a 30 °C durante 1 o 3 días, respectivamente. Se generaron extractos de células de levadura mediante el método de extracción postalcalina (35). De manera resumida, se lavaron 2,5 OD₆₀₀ de células de

levadura con dH₂O, se resuspendieron en 0,1 M NaOH y se incubaron durante 5 minutos a 25 °C con 1400 rpm de agitación. Después del reislamiento, las células se resuspendieron en 1x de tampón de Laemmli que contenía β-mercaptoetanol al 5 % (v/v) y se analizaron mediante SDS-PAGE e inmunodecoración.

Enriquecimiento de péptidos del extremo N mediante COFRADIC

- 5 Se llevó a cabo COFRADIC de extremo N según se describió anteriormente con las siguientes modificaciones (21, 36, 37). Se lisaron gránulos de mitocondria altamente puros (de cepas de levadura cultivadas en YPG, 30 °C) en 500 μl de 2 M clorhidrato de guanidinio, 50 mM de fosfato de sodio, pH 8,7. Las uniones disulfuro se redujeron mediante la adición de 10 mM de ditioneitol durante 30 min en 56 °C y posteriormente los grupos sulfhidrilo libres se carbamidometilaron al usar 20 mM de yodoacetamida a 25 °C en la oscuridad. A continuación, los residuos de lisina se acetilaron mediante incubación con 25 mM de deutero-acetil N-hidroxi-succimida durante 1 h a 37 °C. La reacción se aplacó mediante la adición de un exceso molar por 4 de hidroxilamina y un exceso por 2 de glicina. Las muestras se diluyeron 10 veces con 50 mM de bicarbonato de amonio, acetonitrilo (ACN) al 5 % (v/v), 1 mM de CaCl₂, pH 7,8 y se digirieron con tripsina a 37 °C durante toda la noche (relación entre proteasa y proteína de 1:20). Los péptidos generados se purificaron mediante extracción en fase sólida con columnas C18AR (Varian) según el protocolo del fabricante y se secaron al vacío. Los péptidos se reconstituyeron en ácido trifluoroacético (TFA) al 0,08 % (v/v), ACN al 50 % (v/v), pH 2,7 y se cargaron en una punta de intercambio catiónico fuerte (SCX) que se equilibró con 10 mM de Na₃PO₄, ACN al 50 % (v/v), pH 2,7. Los péptidos cargados individualmente se eluyeron con 10 mM de Na₃PO₄, ACN al 50 % (v/v), pH 2,7. Esta fracción se secó al vacío y se reconstituyó en 100 μl de 10 mM de acetato de amonio, ACN al 2 % (v/v), pH 5,5. Se agregó H₂O₂ hasta una concentración final de 0,5 % (v/v) y se incubaron a 30 °C durante 30 min, inmediatamente antes de la separación por RP-HPLC primaria. Los péptidos se separaron en un sistema Ultimate 3000 LC (Thermo Scientific) equipado con un muestreador de placa de 3000 pocillos con válvula de 8 puertos WPS-T al usar una columna Zorbax 300SB-C18 (tamaño de partícula de 5 μm, 2,1 x 150 mm, Agilent) a una velocidad de flujo de 80 μl/min a 30 °C. El disolvente A fue 10 mM de acetato de amonio, ACN al 2 % (v/v), pH 5,5 y el disolvente B fue 10 mM de acetato de amonio, ACN al 70 % (v/v), pH 5,5. Durante la pasada primaria, se recogieron 16 fracciones de 4 min cada una y posteriormente se secaron al vacío. Finalmente, los péptidos se reconstituyeron en 50 mM de borato de sodio, pH 9,5. Para la derivación de los extremos N de péptido internos libres, se agregaron 6 μM de ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico (TNBS) a cada fracción y se incubaron durante 30 min a 37 °C. Esta etapa se repitió tres veces. La reacción se detuvo mediante la adición de TFA hasta un pH final de 2. Después, las fracciones derivadas se aplicaron en una pasada de RP-HPLC secundaria, al usar condiciones cromatográficas idénticas a las indicadas anteriormente. Esta vez, las fracciones se recolectaron en un marco de tiempo que comenzó 4 min antes y terminó 4 min después del tiempo de elución original en la pasada primaria. Las fracciones se secaron al vacío y se prepararon para el análisis por LC-MS mediante reconstitución en TFA al 0,1 % (v/v).

Nano-LC-MS/MS

- 35 Las muestras se analizaron en un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific), acoplado en línea con un sistema U3000 nano-HPLC (Thermo Scientific). Los péptidos se preconcentraron en una columna de retención C18 de 100 μm de diámetro interno preparada internamente (Synergi HydroRP, Phenomenex, tamaño de partícula de 4 μm, tamaño de poro de 80 Å, longitud de 2 cm) en ácido trifluoroacético al 0,1 % y se separaron en una columna principal C18 de 75 μm de diámetro interno preparada internamente (Synergi HydroRP, Phenomenex, tamaño de partícula de 2 μm, tamaño de poro de 80 Å, longitud de 30 cm) al aplicar un gradiente binario de acetonitrilo al 4-42 % en ácido fórmico al 0,1 %. Se introdujeron blancos de lavado dedicados entre las muestras consecutivas para eliminar efectos de memoria (38). Se adquirieron barridos de sondeo de MS en el Orbitrap de m/z 300 a 2000 a una resolución de 60 000 al usar el polisiloxano m/z 445;120030 como estándar de masa interno. Las diez señales más intensas se sometieron a una disociación inducida por colisión (CID, por sus siglas en inglés) en la trampa iónica, tomando en cuenta una exclusión dinámica de 30 s. Se adquirieron espectros de CID con una CE normalizada de 35 %, un ancho de aislamiento de 2 m/z, un tiempo de activación de 30 ms y un tiempo de inyección máximo de 100 ms. Los valores diana de control automática de ganancia (AGC, por sus siglas en inglés) se establecieron en 10⁶ para los barridos de MS y 10⁴ para MS/MS. La interpretación de los datos se logró según se describió anteriormente en (21).

50 Diversos

- Se inmunizaron conejos con péptidos sintéticos para la generación de anticuerpos. Los péptidos se acoplaron a hemocianina de lapa californiana (KLH, por sus siglas en inglés) a través de un residuo de cisteína en el extremo N o C. Se usaron las siguientes secuencias peptídicas: humanMDH2^{presec} MLSALARPASAALRRSFST-Cys (SEQ ID No.: 11), que corresponden a los aminoácidos de presecuencia 1-19; yeastSod2^{presec} MFAKTAANLTKKGED-Cys (SEQ ID No.: 12), que corresponden a los aminoácidos de presecuencia 1-16; yeastCox4^{presec} MLSLRQSIRFFKPATRT-Cys (SEQ ID No.: 13), que corresponden a los aminoácidos de presecuencia 1-17 y humanVDAC3 Cys-GKNFSAGGHKVGGLGFELEA (SEQ ID No.: 14).

Las proteínas murinas y humanas analizadas mediante inmunodecoración se sondearon con los siguientes anticuerpos primarios: anti-β-amilode (The Genetics Company, WO-02), anti-Citocromo c (BD Pharmingen™), mtHSP70 (anti-GRP75, Abcam, ab2799), SDHA (Abcam, ab14715).

5 Se llevaron a cabo SDS-PAGE e inmunodecoración según protocolos estándares y se desarrollaron mediante el uso de reactivos de detección de transferencia Western ECL™ (GE Healthcare) y películas de rayos X o el sistema LAS 4000 (Fujifilm). Los carriles no relevantes se retiraron mediante procesamiento digital.

10 Los péptidos Cox4^{presec} (MLSLRQSIRFFKPTRRLCSSRYLL) (SEQ ID No.: 15), Sdh1^{octa} (FTSSALVR; EZ Biolab) (SEQ ID No.: 16) y Aβ¹⁻²⁸ (DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK; Anaspec) (SEQ ID No.: 17) se disolvieron en dH₂O hasta una concentración madre de 1 mM y se almacenaron a -20 °C. Los péptidos Aβ¹⁻⁴⁰ (DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV; Sigma, A1075) (SEQ ID NO.: 18) se disolvieron en dH₂O hasta una concentración madre de 500 μM, se sonicaron (dos veces 10 s con interrupciones de 10 s) y se almacenaron a -80 °C. Los péptidos Aβ^{scrambl.} (KVKGLIDGDHIGDLVYEFMDSNSAIFREGVVGAGHVHVAQVEF)(SEQ ID No.: 19) se disolvieron en NH₄OH al 0,1 % (p/v) hasta una concentración madre de 1 mM y se almacenaron a -20 °C. Para los ensayos de procesamiento in vitro, las concentraciones madre se diluyeron adicionalmente en tampón de reacción.

15

Tabla S1. Cepas de levadura usadas en este estudio.

| N.º | Nombre | Genotipo | Referencia |
|------|----------------------------|--|--------------|
| 1501 | Natural | <i>MATa;ade2-101;his3-Δ200;leu2-Δ1;ura3-52;trp1-Δ63;lys2-801</i> | (40) |
| 3372 | <i>cym1Δ</i> | <i>MATa;ade2-101;his3-Δ200;leu2-Δ1;ura3-52;trp1-Δ63;lys2-801;YDR430c::TRP1</i> | Este estudio |
| 3675 | <i>oct1Δ</i> | <i>MATa;ade2-101;his3-Δ200;leu2-Δ1;ura3-52;trp1-Δ63;lys2-801;YKL134c::HIS3MX6</i> | Este estudio |
| 3676 | <i>oct1Δcym1Δ</i> | <i>MATa;ade2-101;his3-Δ200;leu2-Δ1;ura3-52;trp1-Δ63;lys2-801; YDR430c::TRP1;YKL134c::HIS3MX6</i> | Este estudio |
| 2263 | <i>mas1</i> | <i>Mata;ura3-52;trp1-1;leu2-3; leu2-112;his3-11;his3-15</i> | (41) |
| 3508 | <i>mas1cym1Δ</i> | <i>Mata;ura3-52;trp1-1;leu2-3; leu2-112;his3-11;his3-15;YDR430c::HIS3MX6</i> | Este estudio |
| 2876 | <i>Cym1^{H84Y}</i> | <i>MATa;can1Δ100;his3Δ11,15;leu2Δ3,112; ura3Δ1;ade2Δ1;trp1Δ1; YDR430c::KanMX6;YCplac111-CYM1(H84Y)</i> | (26) |
| 2874 | <i>Cym1^{H88Y}</i> | <i>MATa;can1Δ100;his3Δ11,15;leu2Δ3,112; ura3Δ1;ade2Δ1;trp1Δ1; YDR430c::KanMX6;YCplac111-CYM1(H88Y)</i> | (26) |
| 2873 | <i>Cym1^{E87Q}</i> | <i>MATa;can1Δ100;his3Δ11,15;leu2Δ3,112; ura3Δ1;ade2Δ1;trp1Δ1; YDR430c::KanMX6;YCplac111-CYM1(E87Q)</i> | (26) |
| 2875 | <i>Cym1</i> | <i>MATa;can1Δ100;his3Δ11,15;leu2Δ3,112; ura3Δ1;ade2Δ1;trp1Δ1; YDR430c::KanMX6;YCplac111-CYM1(WT)</i> | (26) |
| 3941 | <i>coa6Δ</i> | <i>MATa;ade2-101;his3-Δ200;leu2-Δ1;ura3-52;trp1-Δ63;lys2-801;YMR244c-a:: KanMX6</i> | Este estudio |

Tabla S2. Descripción general de las muestras de cerebro humanas usadas en este estudio.

| Muestra | N.º de registro | Edad (a) | Sexo | Póstumo (h) |
|---------|-----------------|----------|-------|-------------|
| C1 | 184 | 91 | Mujer | 12 |
| C2 | 190 | 86 | Mujer | 14 |
| C3 | 178 | 79 | Mujer | 5 |
| C4 | 188 | 64 | Mujer | 5 |
| AD1 | 216 | 80 | Mujer | 12 |
| AD2 | 253 | 70 | Mujer | 12 |
| AD3 | 215 | 72 | Mujer | 8 |
| AD4 | 255 | 78 | Mujer | 12 |

Referencias:

- 5 1. J. Hardy, D.J. Selkoe, The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353-356 (2002).
2. V. A. Morais, B. de Strooper, Mitochondria dysfunction and neurodegenerative disorders: cause or consequence. *J. Alzheimers Dis.* 20, 255-263(2010).
3. S. Treusch et al., Functional links between A β toxicity, endocytic trafficking, and Alzheimer's disease risk factors in yeast. *Science* 334, 1241-1245 (2011).
- 10 4. E. Area-Gomez et al., Upregulated function of mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease. *EMBO J.* 31, 4106-4123 (2012).
5. J. W. Lustbader et al., ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease. *Science* 304, 448-452 (2004).
- 15 6. M. Manczak et al., Mitochondria are a direct site of A β accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum. Mol. Genet.* 15, 1437-1449 (2006).
7. H. Du et al., Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 14, 1097-1105 (2008).
8. P.J. Crouch et al., Mechanisms of A β mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 181-198 (2008).
- 20 9. C. A. Hansson Petersen et al., The amyloid β -peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105, 13145-13150 (2008).
10. V. Rhein et al., Amyloid- β and tau synergistically impair the oxidative phosphorylation system in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 20057-20062 (2009).
- 25 11. J. Yao et al., Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 14670-14675 (2009).
12. L. M. Ittner, J. Götz, Amyloid- β and tau - a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 65-72 (2011).
13. K.C. Walls et al., Swedish Alzheimer mutation induces mitochondrial dysfunction mediated by HSP60 mislocalization of amyloid precursor protein (APP) and beta-amyloid. *J. Biol. Chem.* 287, 30317-30327 (2012).

14. J.E. Selfridge, L.E., J. Lu, R.H. Swerdlow, Role of mitochondrial homeostasis and dynamics in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 51, 3-12 (2013).
15. A. Stahl et al., Isolation and identification of a novel mitochondrial metalloprotease (PreP) that degrades targeting presequences in plants. *J. Biol. Chem.* 277, 41931-41939 (2002).
- 5 16. A. Falkevall et al., Degradation of the amyloid β -protein by the novel mitochondrial peptidosome, PreP. *J. Biol. Chem.* 281, 29096-29104 (2006).
17. N. Alikhani et al., Decreased proteolytic activity of the mitochondrial amyloid- β degrading enzyme, PreP peptidosome, in Alzheimer's disease brain mitochondria. *J. Alzheimers Dis.* 27, 75-87 (2011).
- 10 18. G. Hawlitschek et al., Mitochondrial protein import: identification of processing peptidase and of PEP, a processing enhancing protein. *Cell* 53, 795-806 (1988).
19. M. J. Yang et al., The MAS-encoded processing protease of yeast mitochondria. Interaction of the purified enzyme with signal peptides and a purified precursor protein. *J. Biol. Chem.* 266, 6416-6423 (1991).
20. P. Dolezal, V. Likic, J. Tachezy, T. Lithgow, Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. *Science* 313, 314-318 (2006).
- 15 21. F.-N. Vögtle et al., Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability. *Cell* 139, 428-439 (2009).
22. A. Mukhopadhyay, C.-S. Yang, B. Wei, H. Weiner, Precursor protein is readily degraded in mitochondrial matrix space if the leader is not processed by mitochondrial processing peptidase. *J. Biol. Chem.* 282, 37266-37275 (2007).
- 20 23. F.-N. Vögtle et al., Mitochondrial protein turnover: role of the precursor intermediate peptidase Oct1 in protein stabilization. *Mol. Biol. Cell* 22, 2135-2143 (2011).
24. A. Varshavsky, The N-end rule pathway and regulation by proteolysis. *Protein Sci.* 20, 1298-1345 (2011).
25. D. F. Tardiff et al., Yeast reveal a "druggable" Rsp5/Nedd4 network that ameliorates α -synuclein toxicity in neurons. *Science* 342, 979-983 (2013).
26. M. Kambacheld, S. Augustin, T. Tatsuta, S. Müller, T. Langer, Role of the novel metallopeptidase MoP112 and Saccharolysin for the complete degradation of proteins residing in different subcompartments of mitochondria. *J. Biol. Chem.* 280, 20132-20139 (2005).
27. L. Ozmen, A. Albientz, C. Czech, H. Jacobsen, Expression of transgenic APP mRNA is the key determinant for beta-amyloid deposition in PS2APP transgenic mice. *Neurodegener. Dis.* 6, 29-36 (2009).
- 30 28. F.-N. Vögtle et al., Intermembrane space proteome of yeast mitochondria. *Mol. Cell Proteomics* 11, 1840-1852 (2012).
29. N.G. Larsson, Somatic mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. *Ann. Rev. Biochem.* 79, 683-706 (2010).
30. I. Begcevic et al., Semiquantitative proteomics analysis of human hippocampal tissues from Alzheimer's disease and age-matched control brains. *Clinical Proteomics* 10, 5 (2013).
- 35 31. R.S. Sikorski, P. Hieter P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27 (1989).
32. C. Witte, R. E. Jensen, M. P. Yaffe, G. Schatz, MAS1, a gene essential for yeast mitochondrial assembly, encodes a subunit of the mitochondrial processing protease. *EMBO J.* 7, 1439-1447 (1988).
- 40 33. M. Longtine et al., Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 953-961 (1998).
34. V. Géli, Functional reconstitution in *Escherichia coli* of the yeast mitochondrial matrix peptidase from its two inactive subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 6247-6251 (1993).
35. N. Kondo-Okamoto, J. M. Shaw, K. Okamoto, Mmmlp spans both the outer and inner mitochondrial membranes and contains distinct domains for targeting and foci formation. *J. Biol. Chem.* 278, 48997-49005 (2003).
- 45 36. J. Caine et al., Alzheimer's A β fused to green fluorescent protein induces growth stress and a heat shock response. *FEMS Yeast Res.* 7, 1230-1236 (2007).

37. V. V. Kushnirov, Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast* 16, 857-860 (2000).
38. K. Gevaert et al., Exploring proteomes and analyzing protein processing by mass spectrometric identification of sorted N-terminal peptides. *Nat. Biotechnol.* 21, 566-569 (2003).
- 5 39. A. Staes et al., Selecting protein N-terminal peptides by combined fractional diagonal chromatography. *Nat. Protoc.* 6, 1130-1141 (2011).
40. J.M. Burkhardt, T. Premisler, A. Sickmann, Quality control of nano-LC-MS systems using stable isotope-coded peptides. *Proteomics* 11, 1049-1057 (2011).
41. D. Stojanovski, N. Pfanner, N. Wiedemann, Import of proteins into mitochondria. *Meth. Cell Biol.* 80, 783-806 (2007).
- 10 42. www.uniprot.org
43. Alam, I., et al. (2012). "Flow cytometric lymphocyte subset analysis using material from frozen whole blood." *Journal of immunoassay & immunochemistry* 33(2): 128-139.

Listado de secuencias

- 15 <110> Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
 <120> Preproteínas mitocondriales como marcadores para la enfermedad de Alzheimer
 <130> U 7507-WO / LE
 <150> EP14158408.6
 < 151> 2014-03-07
- 20 <160> 80
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 < 211> 61
 < 212> ADN
 25 < 213> Secuencia artificial
 <220>
 < 223> Cebador
 <400> 1
 cgtcaaggag aaaaaacccc ggattctagc atgagatcca gcttgtttaa gggaccacgt 60
 g 61
- 30 <210> 2
 < 211> 61
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia artificial
 <220>
 35 < 223> cebador
 <400> 2
 cacgtggtcc cttaaacaag ctggatctca tgctagaatc cggggttttt tctccttgac 60
 g 61
- 40 <210> 3
 < 211> 36
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia artificial

ES 2 773 656 T3

| | | |
|----|---|----|
| | <220> < 223> cebador | |
| | <400> 3 atctgaattc atgtctaaag gtgaagaatt attcac | 36 |
| 5 | <210> 4 < 211> 34 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial | |
| | <220> < 223> Cebador | |
| 10 | <400> 4 atctgaattc ttgtacaat tcatccatac catg | 34 |
| | <210> 5 < 211> 36 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial | |
| 15 | <220> < 223> cebador | |
| | <400> 5 atctgaattc atgtctaaag gtgaagaatt attcac | 36 |
| | <210> 6 < 211> 35 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial | |
| 20 | <220> < 223> cebador | |
| | <400> 6 atctgaattc gttgtacaa tcatccata ccatg | 35 |
| | <210> 7 < 211> 34 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial | |
| 25 | <220> < 223> cebador | |
| | <400> 7 atctactagt atggatgcag aattccgaca tgac | 34 |
| | <210> 8 < 211> 32 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial | |
| 30 | <220> < 223> cebador | |
| | <400> 8 atctatcgat ttacgctatg acaacaccgc cc | 32 |
| | <210> 9 < 211> 63 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial | |
| 35 | <220> < 223> cebador | |
| | <400> 8 atctatcgat ttacgctatg acaacaccgc cc | 32 |
| | <210> 9 < 211> 63 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial | |
| 40 | <220> < 223> cebador | |
| | <400> 8 atctatcgat ttacgctatg acaacaccgc cc | 32 |
| | <210> 9 < 211> 63 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial | |
| 45 | <220> < 223> cebador | |
| | <400> 8 atctatcgat ttacgctatg acaacaccgc cc | 32 |
| | <210> 9 < 211> 63 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial | |

ES 2 773 656 T3

<220>
< 223> cebador

<400> 9
gggCGGCCGC actagtgaga acctgtactt ccagtcCGAT gcagaattcc gacatgactc 60
5
agg 63

<210> 10
< 211> 62
< 212> ADN
10 < 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> cebador

<400> 10
cggaattctg catcggactg gaagtacagg ttctcactag tgcggccgcc ctttagtgag 60
gg 62

15 <210> 11
< 211> 20
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

20 <220>
< 223> péptido

<400> 11
Met Leu Ser Ala Leu Ala Arg Pro Ala Ser Ala Ala Leu Arg Arg Ser
1 5 10 15

Phe Ser Thr Cys
20

25 <210> 12
< 211> 17
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> péptido

<400> 12
Met Phe Ala Lys Thr Ala Ala Ala Asn Leu Thr Lys Lys Gly Glu Asp
1 5 10 15

30 Cys

<210> 13
< 211> 18
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

35 <220>
< 223> péptido

<400> 13
Met Leu Ser Leu Arg Gln Ser Ile Arg Phe Phe Lys Pro Ala Thr Arg
1 5 10 15

Thr Cys

ES 2 773 656 T3

<210> 14
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> péptido

<400> 14
 Cys Gly Lys Asn Phe Ser Ala Gly Gly His Lys Val Gly Leu Gly Phe
 1 5 10 15

Glu Leu Glu Ala
 20

10

<210> 15
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido

15

<400> 15
 Met Leu Ser Leu Arg Gln Ser Ile Arg Phe Phe Lys Pro Ala Thr Arg
 1 5 10 15

Thr Leu Cys Ser Ser Arg Tyr Leu Leu
 20 25

20

<210> 16
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido

<400> 16
 Phe Thr Ser Ser Ala Leu Val Arg
 1 5

25

<210> 17
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> péptido

<400> 17
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys
 20 25

35

<210> 18
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido

ES 2 773 656 T3

<400> 18

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
35 40

<210> 19

<211> 42

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido

<400> 19

Lys Val Lys Gly Leu Ile Asp Gly Asp His Ile Gly Asp Leu Val Tyr
1 5 10 15

Glu Phe Met Asp Ser Asn Ser Ala Ile Phe Arg Glu Gly Val Gly Ala
20 25 30

Gly His Val His Val Ala Gln Val Glu Phe
35 40

<210> 20

<211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> presecuencia

<400> 20

Met Leu Ser Ala Leu Ala Arg Pro Ala Ser Ala Ala Leu Arg Arg Ser
1 5 10 15

Phe Ser Thr Ser Ala Gln Asn Asn
20

<210> 21

<211> 35

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> presecuencia

<400> 21

Met Phe Ser Lys Leu Ala His Leu Gln Arg Phe Ala Val Leu Ser Arg
1 5 10 15

Gly Val His Ser Ser Val Ala Ser Ala Thr Ser Val Ala Thr Lys Lys
20 25 30

Thr Val Gln
35

5

10

15

20

25

ES 2 773 656 T3

<210> 22
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> presecuencia

<400> 22
 Met Gln Ala Ala Arg Met Ala Ala Ser Leu Gly Arg Gln Leu Leu Arg
 1 5 10 15

Leu Gly Gly Gly Ser Ser Arg Leu Thr Ala Leu Leu Gly Gln Pro Arg
 20 25 30

Pro Gly Pro Ala Arg Arg Pro Tyr
 35 40

10

<210> 23
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> presecuencia

15

<400> 23
 Met Ala Ala Val Val Leu Ala Ala Thr Arg Leu Leu Arg Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Ser Trp Gly Cys Ser Arg Leu Arg Phe Gly Pro Pro Ala Tyr Arg Arg
 20 25 30

Phe

20

<210> 24
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> presecuencia

<400> 24
 Met Ala Leu Arg Leu Leu Arg Arg Ala Ala Arg Gly Ala Ala Ala Ala
 1 5 10 15

Ala Leu Leu Arg Leu Lys
 20

25

<210> 25
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> artificial

30

<220>
 <223> presecuencia

ES 2 773 656 T3

<400> 25

Met Ser Thr Ala Ala Leu Ile Thr Leu Val Arg Ser Gly Gly Asn Gln
1 5 10 15

Val Arg Arg Arg Val Leu Leu Ser Ser Arg Leu Leu Gln
20 25

<210> 26

< 211> 28

< 212> PRT

< 213> artificial

<220>

< 223> presecuencia

<400> 26

Met Ala Ala Ser Ala Ala Arg Gly Ala Ala Ala Leu Arg Arg Ser Ile
1 5 10 15

Asn Gln Pro Val Ala Phe Val Arg Arg Ile Pro Trp
20 25

<210> 27

< 211> 23

< 212> PRT

< 213> artificial

<220>

< 223> fragmento de presecuencia

<400> 27

Met Leu Ser Ala Leu Ala Arg Pro Ala Ser Ala Ala Leu Arg Arg Ser
1 5 10 15

Phe Ser Thr Ser Ala Gln Asn
20

<210> 28

< 211> 22

< 212> PRT

< 213> artificial

<220>

< 223> fragmento de presecuencia

<400> 28

Met Leu Ser Ala Leu Ala Arg Pro Ala Ser Ala Ala Leu Arg Arg Ser
1 5 10 15

Phe Ser Thr Ser Ala Gln
20

<210> 29

< 211> 21

< 212> PRT

< 213> artificial

<220>

< 223> fragmento de presecuencia

ES 2 773 656 T3

<400> 29

Met Leu Ser Ala Leu Ala Arg Pro Ala Ser Ala Ala Leu Arg Arg Ser
1 5 10 15

Phe Ser Thr Ser Ala
20

<210> 30

< 211> 20

< 212> PRT

< 213> artificial

<220>

< 223> fragmento de presecuencia

<400> 30

Met Leu Ser Ala Leu Ala Arg Pro Ala Ser Ala Ala Leu Arg Arg Ser
1 5 10 15

Phe Ser Thr Ser
20

<210> 31

< 211> 19

< 212> PRT

< 213> artificial

<220>

< 223> fragmento de presecuencia

<400> 31

Met Leu Ser Ala Leu Ala Arg Pro Ala Ser Ala Ala Leu Arg Arg Ser
1 5 10 15

Phe Ser Thr

<210> 32

< 211> 18

< 212> PRT

< 213> artificial

<220>

< 223> fragmento de presecuencia

<400> 32

Met Leu Ser Ala Leu Ala Arg Pro Ala Ser Ala Ala Leu Arg Arg Ser
1 5 10 15

Phe Ser

<210> 33

< 211> 17

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> fragmento de presecuencia

<400> 33

Met Leu Ser Ala Leu Ala Arg Pro Ala Ser Ala Ala Leu Arg Arg Ser
1 5 10 15

Phe

ES 2 773 656 T3

<210> 34
 < 211> 16
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial
 5 <220>
 < 223> fragmento de presecuencia
 <400> 34
Met Leu Ser Ala Leu Ala Arg Pro Ala Ser Ala Ala Leu Arg Arg Ser
 1 5 10 15
 10 <210> 35
 < 211> 15
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial
 <220>
 < 223> fragmento de presecuencia
 15 <400> 35
Met Leu Ser Ala Leu Ala Arg Pro Ala Ser Ala Ala Leu Arg Arg
 1 5 10 15
 <210> 36
 < 211> 14
 < 212> PRT
 20 < 213> Secuencia artificial
 <220>
 < 223> fragmento de presecuencia
 <400> 36
Met Leu Ser Ala Leu Ala Arg Pro Ala Ser Ala Ala Leu Arg
 1 5 10
 25 <210> 37
 < 211> 13
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial
 <220>
 30 < 223> fragmento de presecuencia
 <400> 37
Met Leu Ser Ala Leu Ala Arg Pro Ala Ser Ala Ala Leu
 1 5 10
 <210> 38
 < 211> 12
 35 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial
 <220>
 < 223> fragmento de presecuencia
 <400> 38
Met Leu Ser Ala Leu Ala Arg Pro Ala Ser Ala Ala
 40 1 5 10
 <210> 39
 < 211> 34
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial
 45 <220>
 < 223> fragmento de presecuencia

ES 2 773 656 T3

<400> 39

Met Phe Ser Lys Leu Ala His Leu Gln Arg Phe Ala Val Leu Ser Arg
1 5 10 15

Gly Val His Ser Ser Val Ala Ser Ala Thr Ser Val Ala Thr Lys Lys
20 25 30

Thr Val

<210> 40

< 211> 31

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> fragmento de presecuencia

<400> 40

Met Phe Ser Lys Leu Ala His Leu Gln Arg Phe Ala Val Leu Ser Arg
1 5 10 15

Gly Val His Ser Ser Val Ala Ser Ala Thr Ser Val Ala Thr Lys
20 25 30

<210> 41

< 211> 28

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> fragmento de presecuencia

<400> 41

Met Phe Ser Lys Leu Ala His Leu Gln Arg Phe Ala Val Leu Ser Arg
1 5 10 15

Gly Val His Ser Ser Val Ala Ser Ala Thr Ser Val
20 25

<210> 42

< 211> 23

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> fragmento de presecuencia

<400> 42

Met Phe Ser Lys Leu Ala His Leu Gln Arg Phe Ala Val Leu Ser Arg
1 5 10 15

Gly Val His Ser Ser Val Ala
20

<210> 43

< 211> 16

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> fragmento de presecuencia

ES 2 773 656 T3

<400> 43
 Met Phe Ser Lys Leu Ala His Leu Gln Arg Phe Ala Val Leu Ser Arg
 1 5 10 15

 <210> 44
 < 211> 34
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

 <220>
 < 223> fragmento de presecuencia

 <400> 44
 Met Gln Ala Ala Arg Met Ala Ala Ser Leu Gly Arg Gln Leu Leu Arg
 1 5 10 15

 Leu Gly Gly Gly Ser Ser Arg Leu Thr Ala Leu Leu Gly Gln Pro Arg
 20 25 30

 10 Pro Gly

 <210> 45
 < 211> 31
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

 15 <220>
 < 223> fragmento de presecuencia

 <400> 45
 Met Gln Ala Ala Arg Met Ala Ala Ser Leu Gly Arg Gln Leu Leu Arg
 1 5 10 15

 Leu Gly Gly Gly Ser Ser Arg Leu Thr Ala Leu Leu Gly Gln Pro
 20 25 30

 20 <210> 46
 < 211> 28
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

 <220>
 < 223> fragmento de presecuencia

 25 <400> 46
 Met Gln Ala Ala Arg Met Ala Ala Ser Leu Gly Arg Gln Leu Leu Arg
 1 5 10 15

 Leu Gly Gly Gly Ser Ser Arg Leu Thr Ala Leu Leu
 20 25

 <210> 47
 < 211> 23
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

 30 <220>
 < 223> fragmento de presecuencia

ES 2 773 656 T3

<400> 47

Met Gln Ala Ala Arg Met Ala Ala Ser Leu Gly Arg Gln Leu Leu Arg
1 5 10 15

Leu Gly Gly Gly Ser Ser Arg
20

<210> 48

< 211> 14

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> fragmento de presecuencia

<400> 48

Met Gln Ala Ala Arg Met Ala Ala Ser Leu Gly Arg Gln Leu
1 5 10

<210> 49

< 211> 27

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> fragmento de presecuencia

<400> 49

Met Ala Ala Val Val Leu Ala Ala Thr Arg Leu Leu Arg Gly Ser Gly
1 5 10 15

Ser Trp Gly Cys Ser Arg Leu Arg Phe Gly Pro
20 25

<210> 50

< 211> 26

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> fragmento de presecuencia

<400> 50

Met Ala Ala Val Val Leu Ala Ala Thr Arg Leu Leu Arg Gly Ser Gly
1 5 10 15

Ser Trp Gly Cys Ser Arg Leu Arg Phe Gly
20 25

<210> 51

< 211> 25

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> fragmento de presecuencia

<400> 51

Met Ala Ala Val Val Leu Ala Ala Thr Arg Leu Leu Arg Gly Ser Gly
1 5 10 15

Ser Trp Gly Cys Ser Arg Leu Arg Phe
20 25

ES 2 773 656 T3

<210> 52
< 211> 24
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

5 <220>
< 223> fragmento de presecuencia

<400> 52
Met Ala Ala Val Val Leu Ala Ala Thr Arg Leu Leu Arg Gly Ser Gly
1 5 10 15

Ser Trp Gly Cys Ser Arg Leu Arg
20

10 <210> 53
< 211> 23
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> fragmento de presecuencia

15 <400> 53
Met Ala Ala Val Val Leu Ala Ala Thr Arg Leu Leu Arg Gly Ser Gly
1 5 10 15

Ser Trp Gly Cys Ser Arg Leu
20

20 <210> 54
< 211> 21
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> fragmento de presecuencia

<400> 54
Met Ala Leu Arg Leu Leu Arg Arg Ala Ala Arg Gly Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

Ala Leu Leu Arg Leu
20

25 <210> 55
< 211> 20
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> fragmento de presecuencia

30 <400> 55
Met Ala Leu Arg Leu Leu Arg Arg Ala Ala Arg Gly Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

Ala Leu Leu Arg
20

35 <210> 56
< 211> 19
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

ES 2 773 656 T3

<220>
< 223> fragmento de presecuencia+

<400> 56
Met Ala Leu Arg Leu Leu Arg Arg Ala Ala Arg Gly Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

Ala Leu Leu

5 <210> 57
< 211> 18
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

10 <220>
< 223> fragmento de presecuencia

<400> 57
Met Ala Leu Arg Leu Leu Arg Arg Ala Ala Arg Gly Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

Ala Leu

15 <210> 58
< 211> 17
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> fragmento de presecuencia

<400> 58
Met Ala Leu Arg Leu Leu Arg Arg Ala Ala Arg Gly Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

20 Ala

<210> 59
< 211> 26
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

25 <220>
< 223> fragmento de presecuencia

<400> 59
Met Ser Thr Ala Ala Leu Ile Thr Leu Val Arg Ser Gly Gly Asn Gln
1 5 10 15

Val Arg Arg Arg Val Leu Leu Ser Ser Arg
20 25

30 <210> 60
< 211> 24
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> fragmento de presecuencia

ES 2 773 656 T3

<400> 60
Met Ser Thr Ala Ala Leu Ile Thr Leu Val Arg Ser Gly Gly Asn Gln
1 5 10 15

Val Arg Arg Arg Val Leu Leu Ser
20

5
<210> 61
< 211> 22
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> fragmento de presecuencia

<400> 61
Met Ser Thr Ala Ala Leu Ile Thr Leu Val Arg Ser Gly Gly Asn Gln
1 5 10 15

10
Val Arg Arg Arg Val Leu
20

<210> 62
< 211> 20
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

15
<220>
< 223> fragmento de presecuencia

<400> 62
Met Ser Thr Ala Ala Leu Ile Thr Leu Val Arg Ser Gly Gly Asn Gln
1 5 10 15

20
Val Arg Arg Arg
20

<210> 63
< 211> 19
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

25
<220>
< 223> fragmento de presecuencia

<400> 63
Met Ser Thr Ala Ala Leu Ile Thr Leu Val Arg Ser Gly Gly Asn Gln
1 5 10 15

Val Arg Arg

30
<210> 64
< 211> 23
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> fragmento de presecuencia

ES 2 773 656 T3

<400> 64
Met Ala Ala Ser Ala Ala Arg Gly Ala Ala Ala Leu Arg Arg Ser Ile
1 5 10 15

Asn Gln Pro Val Ala Phe Val
20

5
<210> 65
< 211> 22
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> fragmento de presecuencia

<400> 65
Met Ala Ala Ser Ala Ala Arg Gly Ala Ala Ala Leu Arg Arg Ser Ile
1 5 10 15

10
Asn Gln Pro Val Ala Phe
20

<210> 66
< 211> 17
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

15
<220>
< 223> fragmento de presecuencia

<400> 66
Met Ala Ala Ser Ala Ala Arg Gly Ala Ala Ala Leu Arg Arg Ser Ile
1 5 10 15

Asn

20
<210> 67
< 211> 16
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> fragmento de presecuencia

25
<400> 67
Met Ala Ala Ser Ala Ala Arg Gly Ala Ala Ala Leu Arg Arg Ser Ile
1 5 10 15

30
<210> 68
< 211> 14
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> fragmento de presecuencia

<400> 68
Met Ala Ala Ser Ala Ala Arg Gly Ala Ala Ala Leu Arg Arg
1 5 10

35
<210> 69
< 211> 35
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

ES 2 773 656 T3

<220>

< 223> presecuencia

<400> 69

Met Ala Ala Ala Ala Gln Ser Arg Val Val Arg Val Leu Ser Met Ser
1 5 10 15

Arg Ser Ala Ile Thr Ala Ile Ala Thr Ser Val Cys His Gly Pro Pro
20 25 30

Cys Arg Gln
35

5

<210> 70

< 211> 22

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

10

<220>

< 223> presecuencia

<400> 70

Met Ala Arg Asn Val Val Tyr Pro Leu Tyr Arg Leu Gly Gly Pro Gln
1 5 10 15

Leu Arg Val Phe Arg Thr
20

15

<210> 71

< 211> 29

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> fragmento de presecuencia

<400> 71

Met Ala Ala Ala Ala Gln Ser Arg Val Val Arg Val Leu Ser Met Ser
1 5 10 15

20

Arg Ser Ala Ile Thr Ala Ile Ala Thr Ser Val Cys His
20 25

<210> 72

< 211> 24

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

25

<220>

< 223> fragmento de presecuencia

<400> 72

Met Ala Ala Ala Ala Gln Ser Arg Val Val Arg Val Leu Ser Met Ser
1 5 10 15

Arg Ser Ala Ile Thr Ala Ile Ala
20

30

<210> 73

< 211> 20

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

ES 2 773 656 T3

<220>
< 223> fragmento de presecuencia

<400> 73
Met Ala Ala Ala Ala Gln Ser Arg Val Val Arg Val Leu Ser Met Ser
1 5 10 15

Arg Ser Ala Ile
20

5 <210> 74
< 211> 18
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

10 <220>
< 223> fragmento de presecuencia

<400> 74
Met Ala Ala Ala Ala Gln Ser Arg Val Val Arg Val Leu Ser Met Ser
1 5 10 15

Arg Ser

15 <210> 75
< 211> 16
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> fragmento de presecuencia

20 <400> 75
Met Ala Ala Ala Ala Gln Ser Arg Val Val Arg Val Leu Ser Met Ser
1 5 10 15

<210> 76
< 211> 21
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

25 <220>
< 223> fragmento de presecuencia

<400> 76
Met Ala Arg Asn Val Val Tyr Pro Leu Tyr Arg Leu Gly Gly Pro Gln
1 5 10 15

Leu Arg Val Phe Arg
20

30 <210> 77
< 211> 20
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> fragmento de presecuencia

ES 2 773 656 T3

<400> 77

Met Ala Arg Asn Val Val Tyr Pro Leu Tyr Arg Leu Gly Gly Pro Gln
1 5 10 15

Leu Arg Val Phe
20

<210> 78

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fragmento de presecuencia

<400> 78

Met Ala Arg Asn Val Val Tyr Pro Leu Tyr Arg Leu Gly Gly Pro Gln
1 5 10 15

Leu Arg Val

<210> 79

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fragmento de presecuencia

<400> 79

Met Ala Arg Asn Val Val Tyr Pro Leu Tyr Arg Leu Gly Gly Pro Gln
1 5 10 15

Leu Arg

<210> 80

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fragmento de presecuencia

<400> 80

Met Ala Arg Asn Val Val Tyr Pro Leu Tyr Arg Leu Gly Gly Pro Gln
1 5 10 15

Leu

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer (AD) en un paciente que comprende las siguientes etapas:
 - a) Se proporciona una muestra de un paciente que posiblemente padece AD;
 - 5 b) Determinar la cantidad de al menos una proteína mitocondrial prematura en dicha muestra, en donde dicha proteína mitocondrial prematura comprende al menos parte de su presecuencia dirigida a la mitocondria; y
 - c) Comparar la cantidad obtenida en la etapa b) con la cantidad de dicha al menos una proteína mitocondrial prematura determinada en una muestra testigo, en donde dicha muestra testigo se deriva de un sujeto que no padece AD;
 - 10 en donde una cantidad más alta de dicha al menos una proteína mitocondrial prematura en la muestra de un paciente que posiblemente padece AD en comparación con la cantidad de dicha al menos una proteína mitocondrial prematura en la muestra testigo indica AD en dicho paciente.
2. El método según la reivindicación 1, en donde dicha muestra es una muestra de sangre o una muestra de cerebro.
- 15 3. El método según la reivindicación 1 o 2, en donde la cantidad de dicha al menos una proteína mitocondrial prematura se determina mediante un método inmunológico y/o mediante un método de espectrometría de masas.
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha al menos una proteína mitocondrial prematura se selecciona del grupo que consiste en hMdh2, hOAT, hACADV, PMPCA, CLYBL, PPM1K, SLIRP, NDUFA9, MRPL23 y mezclas de estas.
- 20 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha al menos una proteína mitocondrial prematura es hMdh2.
6. Uso de al menos una proteína mitocondrial prematura como marcador para la AD, en donde dicha al menos una proteína mitocondrial prematura comprende al menos parte de su presecuencia dirigida a la mitocondria.
- 25 7. Uso de un anticuerpo o un fragmento de unión de este que se une a una proteína mitocondrial prematura, preferiblemente, una proteína mitocondrial codificada por el núcleo, para diagnosticar la AD, en donde dicha proteína mitocondrial prematura comprende al menos parte de su presecuencia dirigida a la mitocondria.
8. El uso según la reivindicación 7, en donde dicha proteína mitocondrial se selecciona del grupo que consiste en hMdh2, hOAT, hACADV, PMPCA, CLYBL, PPM1K, SLIRP, NDUFA9, MRPL23 y mezclas de estas.
- 30 9. Un agente antiinflamatorio y/o un antioxidante para su uso en el tratamiento de la AD, en donde dicho agente antiinflamatorio y/o antioxidante se administra a un paciente que exhibe una cantidad más alta de al menos una proteína mitocondrial prematura en una muestra en comparación con la cantidad de dicha proteína en una muestra testigo derivada de un sujeto que no padece AD, en donde dicha proteína mitocondrial prematura comprende al menos parte de la presecuencia dirigida a la mitocondria.
- 35 10. El agente antiinflamatorio y/o antioxidante para su uso según la reivindicación 9, en donde dicha al menos una proteína mitocondrial prematura se selecciona del grupo que consiste en hMdh2, hOAT, hACADV, PMPCA, CLYBL, PPM1K, SLIRP, NDUFA9, MRPL23 y mezclas de estas.
11. Método *in vitro* para detectar un compuesto eficaz contra la AD que comprende las siguientes etapas:
 - a) Proporcionar un sistema de ensayo que comprende una PreP mitocondrial comprometida, en donde dicha PreP mitocondrial comprometida causa una acumulación de al menos una proteína mitocondrial prematura, en donde
 - 40 dicha proteína mitocondrial prematura comprende al menos parte de su presecuencia dirigida a la mitocondria;
 - b) Determinar la cantidad de dicha al menos una proteína mitocondrial prematura;
 - c) Poner en contacto dicho sistema de ensayo con un compuesto;
 - d) Determinar la cantidad de dicha al menos una proteína mitocondrial prematura;
 - 45 en donde una cantidad más baja de dicha al menos una proteína mitocondrial prematura determinada en la etapa d) en comparación con la cantidad determinada en la etapa b) indica que dicho compuesto es eficaz contra la AD.

12. El método según la reivindicación 11, en donde dicha al menos una proteína mitocondrial prematura se selecciona del grupo que consiste en hMdh2, hOAT, hACADV, PMPCA, CLYBL, PPM1K, SLIRP, NDUFA9, MRPL23 y mezclas de estas.

13. Método *in vitro* para detectar un compuesto eficaz contra la AD que comprende las siguientes etapas:

- 5 a) Proporcionar un sistema de ensayo que comprende una PreP mitocondrial comprometida, en donde dicha PreP mitocondrial comprometida causa una acumulación de al menos una proteína mitocondrial prematura, en donde dicha proteína mitocondrial prematura comprende al menos parte de su presecuencia dirigida a la mitocondria;
- b) Determinar la cantidad de especies reactivas del oxígeno (ROS) en dicho sistema;
- c) Poner en contacto dicho sistema de ensayo con un compuesto;
- 10 d) Determinar la cantidad de ROS en dicho sistema;

en donde una cantidad más baja de ROS determinada en la etapa d) en comparación con la cantidad determinada en la etapa b) indica que dicho compuesto es eficaz contra la AD.

14. Método *in vitro* para detectar un compuesto eficaz contra la AD que comprende las siguientes etapas:

- 15 a) Proporcionar un sistema de ensayo que comprende una PreP mitocondrial comprometida, en donde dicha PreP se ha comprometido por la adición de A β y dicha PreP mitocondrial comprometida causa una acumulación de al menos una proteína mitocondrial prematura, en donde dicha proteína mitocondrial prematura comprende al menos parte de su presecuencia dirigida a la mitocondria;
- b) Determinar la cantidad de A β en dicho sistema;
- c) Poner en contacto dicho sistema de ensayo con un compuesto;
- 20 d) Determinar la cantidad de A β en dicho sistema;

en donde una cantidad más baja de A β determinada en la etapa d) en comparación con la cantidad determinada en la etapa b) indica que dicho compuesto es eficaz contra la AD.

Fig. 1

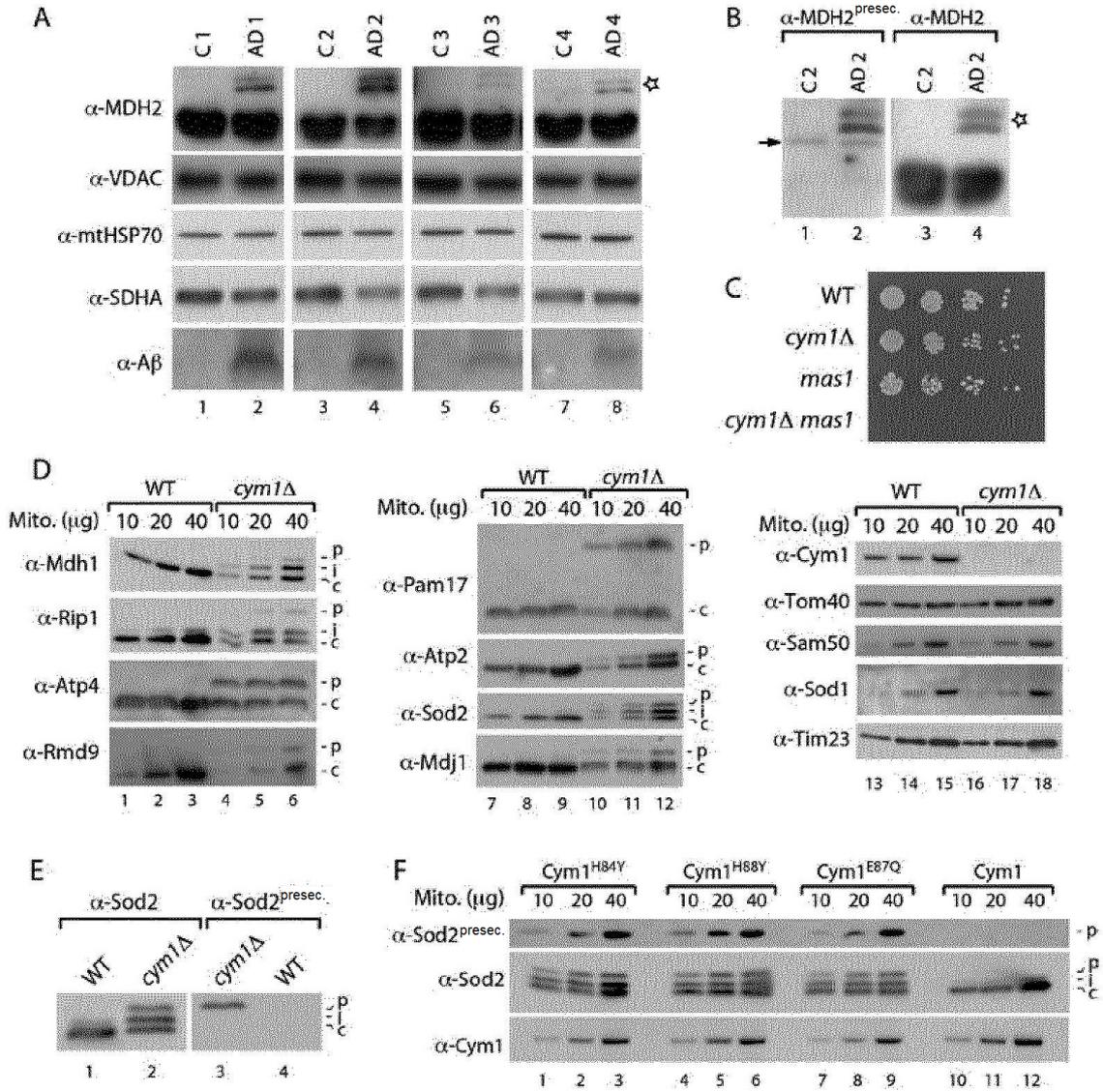


Figura 1

Fig. 2

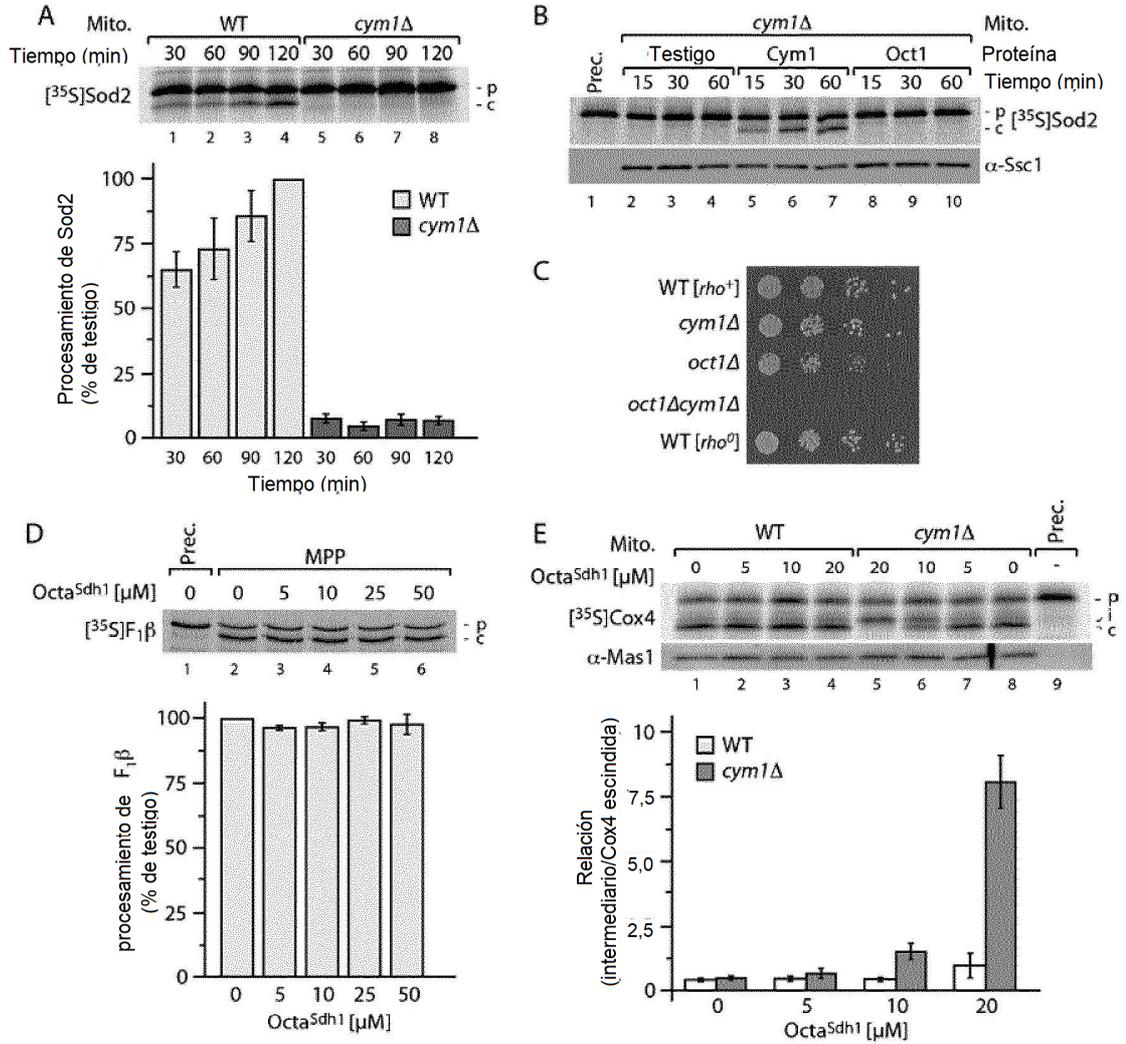


Figura 2

Fig. 3

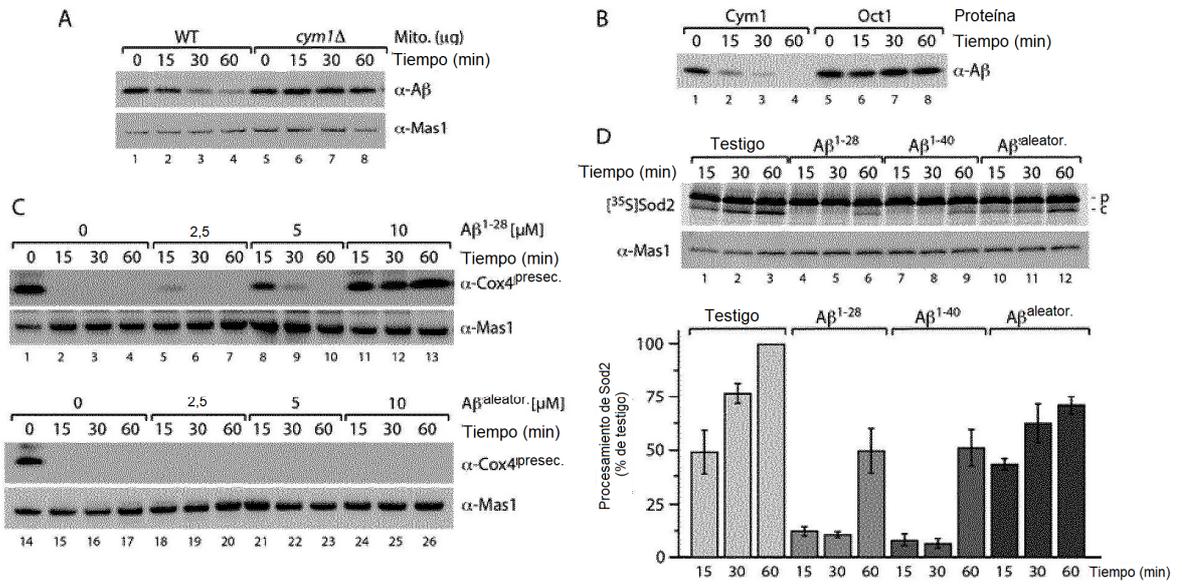


Figura 3

Fig. 4

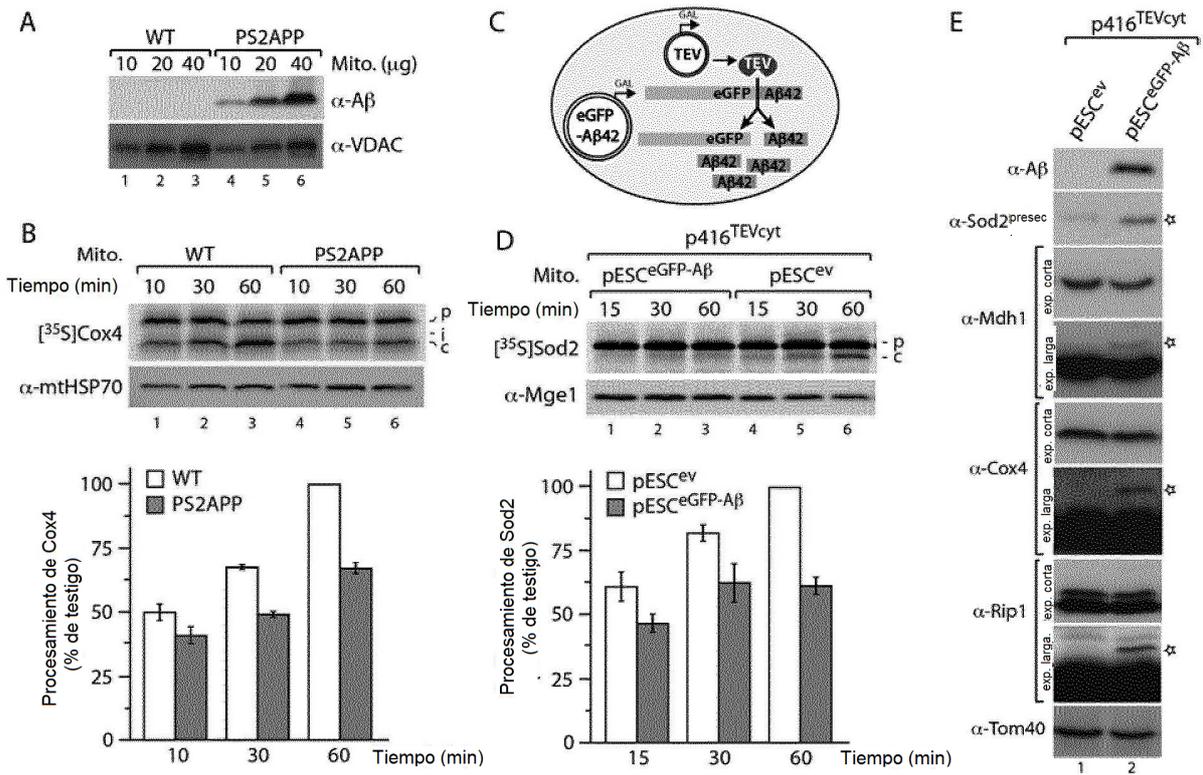


Figura 4

Fig. S1

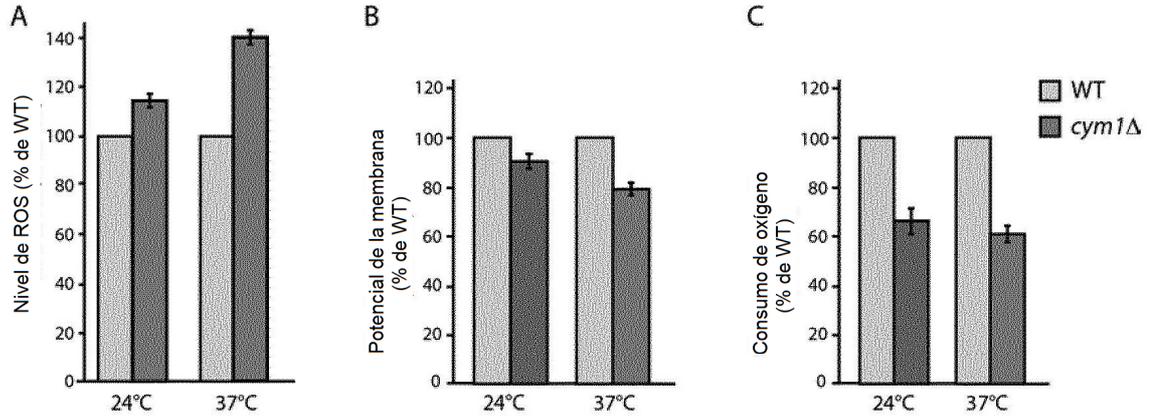


Figura S1

Fig. S2

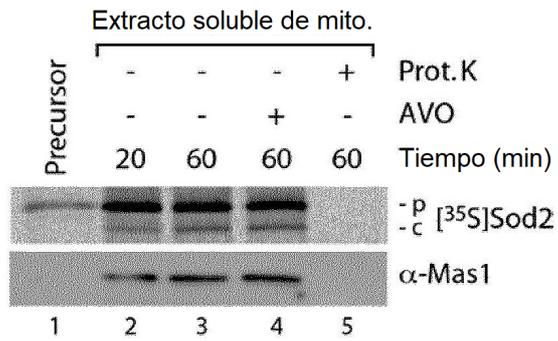


Figura S2

Fig. S3

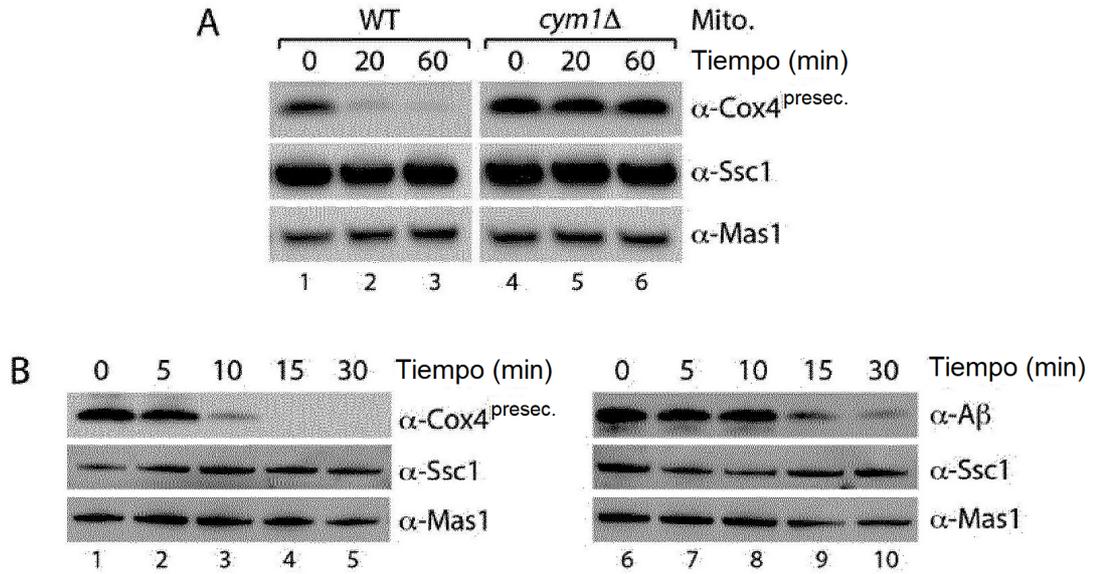


Figura S3

Fig. S4

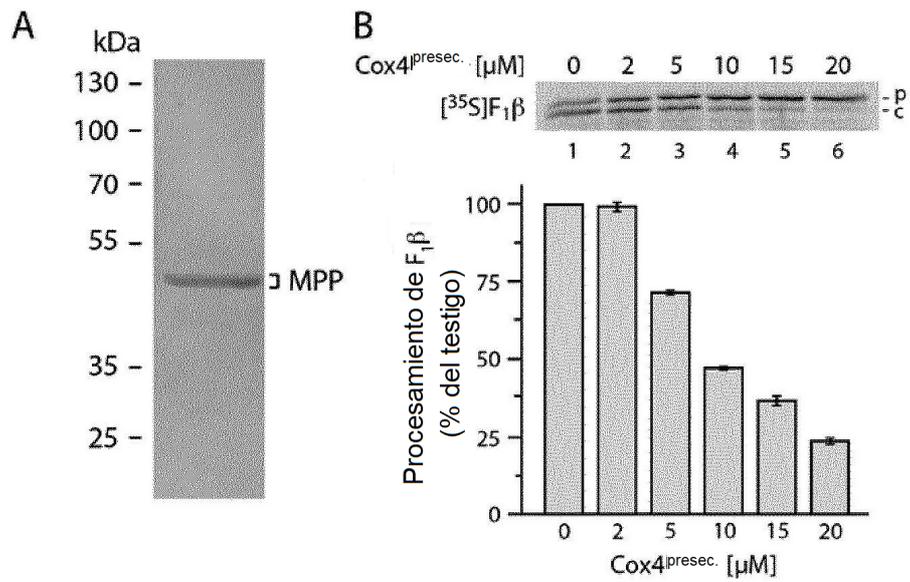


Figura S4

Fig. S5

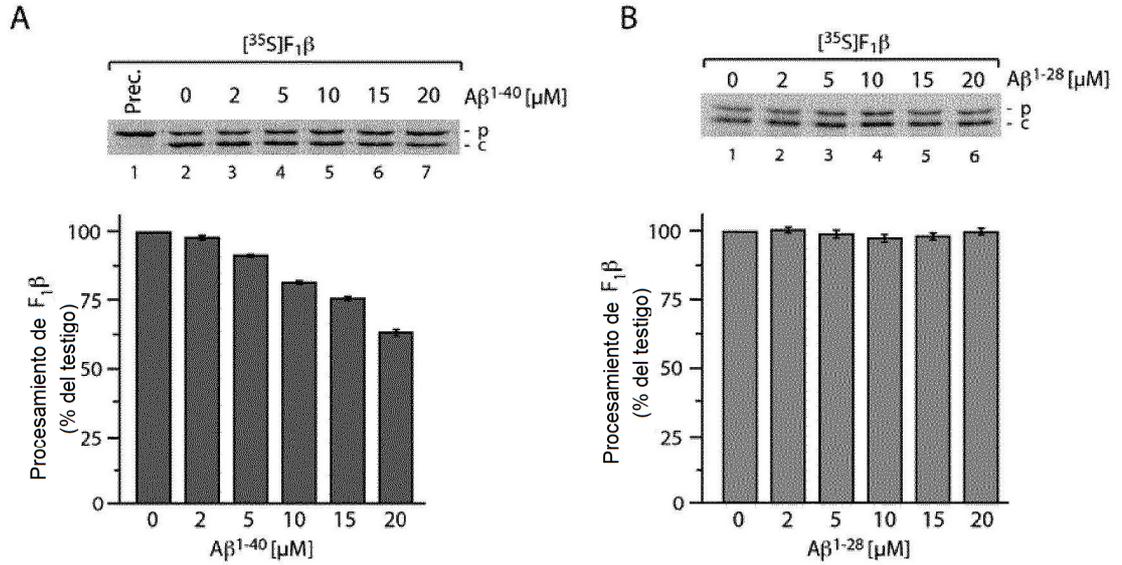


Figura S5

Fig. S6

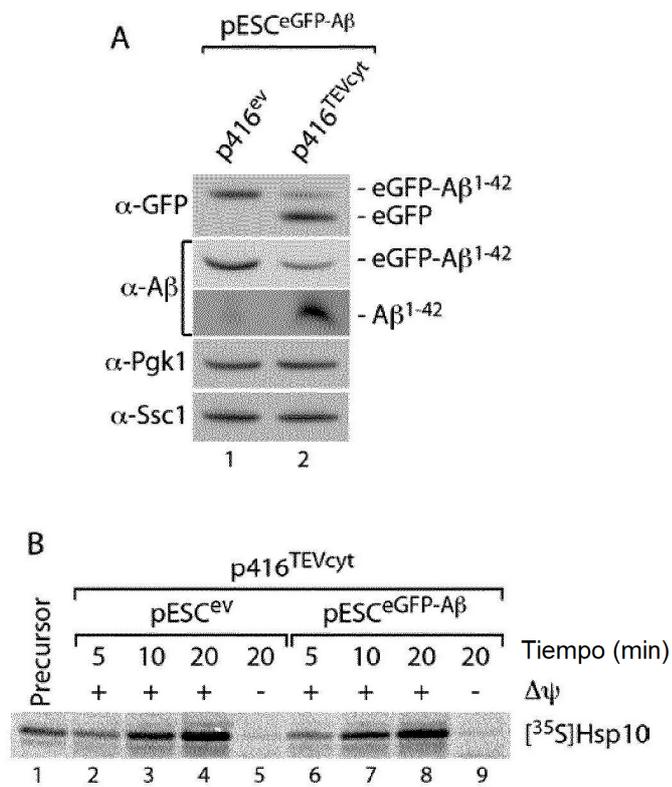


Figura S6
55

Fig. S7

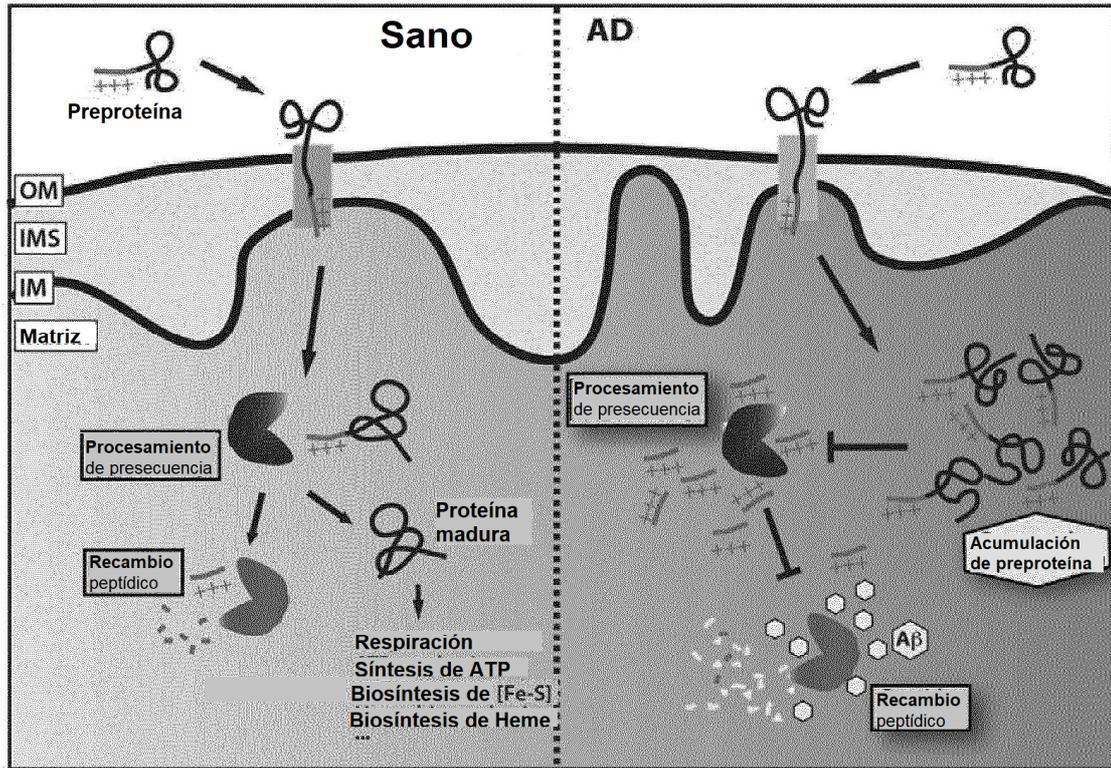


Fig. S8

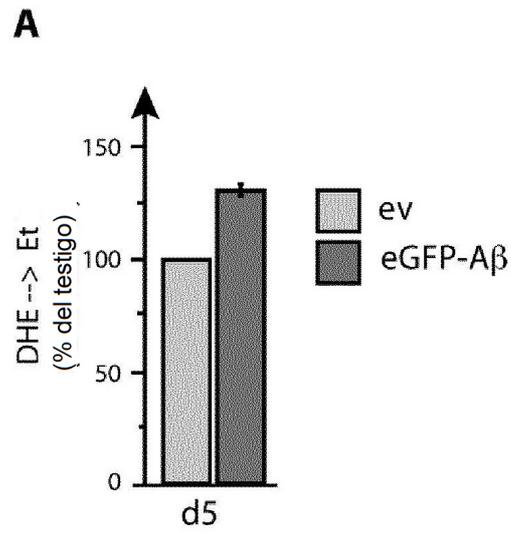


Fig. S9

