



SILENCIAMIENTO SITIO ESPECÍFICO DE LA KINASA FYN EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE TAUPATÍA: CONSECUENCIAS FUNCIONALES Y PERSPECTIVAS TERAPÉUTICAS

Autor: Ramiro Clerici Delville

Directora: Dra. María Elena Avale

Codirector: Dr. Juan Esteban Ferrario

**Laboratorio de Terapéutica Experimental de los Procesos
Neurodegenerativos – Instituto de Investigaciones en Ingeniería
Genética y Biología Molecular “Dr. Héctor N. Torres” (INGEBI -
CONICET)**

**Carrera de Ciencias Biológicas - Facultad de Ciencias Exactas y
Naturales - Universidad de Buenos Aires (FCEyN, UBA)**

Febrero 2024

RESUMEN

La proteína Tau se expresa normalmente en las neuronas y participa en múltiples funciones neuronales. En condiciones normales, Tau se encuentra principalmente unida a los microtúbulos, mientras que en condiciones patológicas se despega de los microtúbulos y se acumula en agregados insolubles hiperfosforilados. Las taupatías se caracterizan por la presencia anómala de inclusiones intracelulares de proteína Tau hiperfosforilada en regiones definidas. Numerosas kinasas endógenas fosforilan a la proteína Tau, tanto de manera fisiológica como patológica. Entre ellas, la kinasa Fyn ha sido caracterizada como un mediador crucial de la neurodegeneración dependiente de Tau. Evidencias recientes identifican a Fyn como un regulador clave de la patología Tau, relacionado a su rol en la señalización post sináptica, cuya fisiología alterada está asociada con la excitotoxicidad y neurodegeneración.

En este proyecto se propuso analizar la interacción entre Tau y Fyn, en el desarrollo de patología Tau en un modelo murino de taupatía (modelo hTau). Para esto, se realizó un silenciamiento específico de Fyn en la corteza prefrontal (PFC) de estos ratones, por ser la región primariamente afectada en el modelo en estudio. Se realizaron inyecciones estereotáxicas con vectores lentivirales portadores de microRNAs dirigidos contra el mensajero de Fyn. Luego del tratamiento, se evaluaron los fenotipos comportamentales, electrofisiológicos y moleculares asociados a la patología Tau. Se observó que los ratones hTau con silenciamiento de Fyn mostraron una reducción de ciertos déficits cognitivos, asimismo mostraron una prevención parcial de la hiperactividad neuronal que presenta este modelo a edades tardías. Sin embargo, aún no se logró comprobar efectivamente el descenso de los niveles de Fyn con las técnicas utilizadas, por lo que se plantea refinar los métodos de detección, así como la evaluación de otros posibles blancos moleculares involucrados en los signos de deterioro evaluados en este modelo, que podrían estar indirectamente modificados por el silenciamiento de Fyn.

ABSTRACT

Site-specific silencing of Fyn kinase in an experimental model of tauopathy: functional consequences and therapeutic perspectives.

Tau protein is normally expressed in neurons and is involved in multiple neuronal functions. Under normal conditions, Tau is mainly bound to microtubules, whereas under pathological conditions it detaches from microtubules and accumulates in hyperphosphorylated insoluble aggregates. Tauopathies are characterized by the anomalous presence of intracellular inclusions of hyperphosphorylated Tau protein in defined regions. Numerous endogenous kinases phosphorylate Tau protein, both physiologically and pathologically. Among them, Fyn kinase has been characterized as a crucial mediator of Tau-dependent neurodegeneration. Recent evidence identifies Fyn as a key regulator of Tau pathology, related to its role in postsynaptic signaling, whose altered physiology is associated with excitotoxicity and neuronal death.

In this project we proposed to analyze the interaction between Tau and Fyn in the development of Tau pathology in a murine model of tauopathy (hTau model). For this purpose, stereotaxic injections were performed with lentiviral vectors carrying microRNAs directed against the Fyn messenger. After treatment, behavioral, electrophysiological and molecular phenotypes associated with Tau pathology were evaluated. It was observed that hTau mice with Fyn silencing showed a reduction of certain cognitive deficits, as well as a partial prevention of the neuronal hyperactivity presented by this model at late ages. However, the decrease in Fyn protein levels could not be effectively verified with the techniques used, so it is proposed to refine the detection methods, as well as the evaluation of other molecular targets involved in the signs of deterioration evaluated in this model that could be affected by Fyn reduction.

INDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1. <i>Expresión génica de Tau</i>	8
1.2. <i>Fosforilación de Tau</i>	10
1.3. <i>Bases moleculares de las taupatías</i>	10
1.4. <i>La kinasa Fyn</i>	11
1.5. <i>El modelo de ratón hTau</i>	13
1.5.1 <i>Estudio de fenotipos electrofisiológicos</i>	14
1.5.2 <i>Estudio de fenotipos comportamentales</i>	15
1.6. <i>Vectores lentivirales y estrategia de microRNA</i>	18
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1. <i>Modelo experimental</i>	22
<i>Genotipificación</i>	22
3.2. <i>Producción de partículas lentivirales</i>	24
3.2.1 <i>Diseño del miRNA</i>	24
3.2.2 <i>Protocolo de producción viral (realizado por la Bioq. Indiana Pérez Paz)</i>	24
3.3. <i>Inyecciones estereotáxicas (realizadas por el Dr. Javier Muñiz)</i>	25
3.4. <i>Ensayos comportamentales</i>	25
3.4.1 <i>Prueba de campo abierto.</i>	25
3.4.2 <i>Laberinto en cruz elevado</i>	26
3.4.3 <i>Reconocimiento de objeto novedoso.</i>	26
3.5. <i>Registros electrofisiológicos in vivo (realizados por el Dr. Ezequiel Pereyra)</i>	26
3.5.1 <i>Adquisición de datos.</i>	26
3.5.2 <i>Procesamiento y análisis de los datos.</i>	27
3.6. <i>Extracción de proteínas y Western Blot</i>	27
3.7. <i>Análisis estadístico</i>	29
4. RESULTADOS	30
4.1. <i>Evaluación de los fenotipos de ratones hTau inyectados con vectores lentivirales portadores de miRNA-Fyn en la PFC</i>	30
<i>Diseño experimental</i>	30
4.1.1 <i>Prueba de campo abierto</i>	31

4.1.2	<i>Laberinto en cruz elevado.....</i>	33
4.1.3	<i>Reconocimiento de objeto novedoso</i>	34
4.1.4	<i>Registros electrofisiológicos</i>	35
4.2.	<i>Determinación de los niveles de Fyn en la PFC de ratones hTau luego del tratamiento con miRNA</i>	37
5.	DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	39
	<i>Limitaciones del modelo animal para estudiar taupatías:</i>	39
	<i>Estudio de los cambios fenotípicos del hTau luego del tratamiento con el miRNA-Fyn</i>	40
	<i>Análisis molecular del silenciamiento de Fyn</i>	44
	<i>Perspectivas del miRNA-Fyn como potencial estrategia terapéutica</i>	46
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1. INTRODUCCIÓN

Tau es una proteína citoplasmática que se expresa principalmente en neuronas, aunque también se produce en astrocitos y oligodendrocitos, donde interacciona con los microtúbulos del citoesqueleto celular. Su localización es fundamentalmente axonal, en donde participa en una miríada de funciones neuronales, como la regulación de la dinámica y estabilidad de los microtúbulos, el transporte axonal y en mecanismos de regulación sináptica, entre otras (Morris et al., 2011). Su interacción dinámica con los elementos de tubulina que componen los microtúbulos está involucrada en procesos muy importantes de la fisiología neuronal, como la morfogénesis y diferenciación, polaridad y plasticidad neuronal, crecimiento y elongación axonal, y demás (Bodea et al., 2016; Arendt et al., 2016)

La estructura terciaria de Tau se divide en 4 dominios definidos estructural y funcionalmente:

i) el dominio N-terminal, el cual presenta en su composición un predominio de aminoácidos cargados negativamente, lo que genera una repulsión electrostática con la superficie de los microtúbulos, generando un dominio de proyección, y se hipotetiza que permitiría la separación entre los microtúbulos (Chen et al., 1992). También presenta sitios de unión para distintas moléculas de andamiaje, señalización, entre otras (Brandt et al., 1995; Gauthier-Kemper et al., 2011)

ii) la región rica en prolinas, donde se produce la asociación con microfilamentos de actina, permitiendo la generación de una estructura organizada junto con los haces de microtúbulos (He et al., 2009). Cuenta también con un alto porcentaje de aminoácidos como la serina y treonina, por lo que este segmento es susceptible a la fosforilación por distintas kinasas (Brandt et al., 2020);

iii) el dominio de unión a microtúbulos (MBD por *Microtubule Binding Domain* en inglés), en el cual se encuentra un número variable de entre 3 y 4 repeticiones de 18 aminoácidos en tándem, separados por secuencias de 13 o 14 aminoácidos, que funcionan como sitios de unión a tubulina (G. Lee et al., 1989);

iv) y el dominio C-terminal, menos caracterizado, pero cuya función está involucrada en posibles interacciones con otras regiones de Tau (Jeganathan et al., 2006), así como con la organización espacial de los microtúbulos axonales (Méphon-Gaspard et al., 2016).

En condiciones fisiológicas, aproximadamente un 80% de Tau se encuentra interaccionando con los microtúbulos, principalmente en los axones neuronales. Esta proporción está fuertemente regulada por distintos factores, como el número de repeticiones

con las que cuente el MBD (3R o 4R, véase más adelante), las modificaciones post-traduccionales que sufra (fosforilación, acetilación, glicosilación, entre otras (Mietelska-Porowska et al., 2014). Su asociación con tubulina y los motores moleculares como dineína y kinesina cumple un rol fundamental en la regulación del transporte axonal, particularmente en la entrega del cargo a la terminal presináptica, relacionado con el transporte anterógrado (Combs et al., 2019).

Existen diversas condiciones patológicas en las que debido a un metabolismo anormal de Tau ocurre una deslocalización patológica de esta proteína. Estas patologías, entre las que se encuentran la Enfermedad de Alzheimer (EA) y la demencia frontotemporal (DFT), componen el grupo de las llamadas taupatías. Cada taupatía tiene sus características clínicas únicas, en las cuales se ve una vulnerabilidad específica en neuronas de ciertos núcleos cerebrales y patrones definidos de propagación de la patología (Colin et al., 2020; Goedert et al., 2017). Pero en todos estos procesos neurodegenerativos, existe un factor común en el cual Tau se deslocaliza del axón al compartimiento somatodendrítico, donde se acumula formando inclusiones insolubles intracelulares, llamadas ovillos neurofibrilares (NFTs por *neurofibrillary tangles* en inglés) (Lee et al., 2001; Zempel & Mandelkow, 2014). Este proceso puede darse por una gran diversidad de mutaciones genéticas, procesamiento post-transcripcional anormal, déficits en el reciclaje proteico o hiperfosforilación patológica (Sergeant et al., 2005). Éste último evento tiene gran impacto en la vía patológica de Tau, ya que su fisiología está altamente regulada por una fosforilación y desfosforilación dinámica. En las taupatías, Tau se hiperfosforila en epítopes patológicos específicos, aumentando su carga negativa y promoviendo su disociación de los microtúbulos y deslocalización al soma neuronal (A. Ittner & Ittner, 2018). Estos eventos anómalos generan fuertes cambios en la dinámica de los microtúbulos y el transporte axonal, lo que conlleva a una grave alteración de la morfología y la subsecuente muerte neuronal (Figura 1) (Buée et al., 2010).

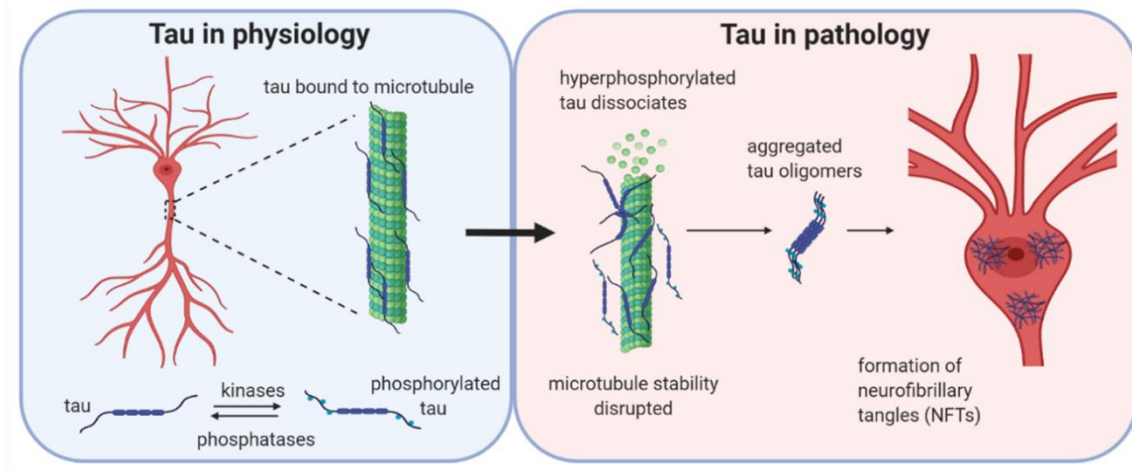


Figura 1. La interacción de Tau con los microtúbulos en condiciones fisiológicas y patológicas. En condiciones fisiológicas, Tau se une a los microtúbulos en mayor proporción y su estabilidad se mantiene gracias a la actividad equilibrada de kinasas y fosfatasa que actúan para regular la unión de Tau a los microtúbulos (izquierda). Si este equilibrio se altera por las causas mencionadas anteriormente (entre otras), Tau puede hiperfosforilarse y desprenderse de los microtúbulos (derecha). A continuación, Tau puede formar agregados, en primer lugar, pequeños oligómeros solubles que son ricos en lámina- β y se cree que son las especies tóxicas más pequeñas. Posteriormente, estas especies se agregan en protofibrillas, fibrillas y, por último, en ovillos neurofibrilares (NFTs) (Fuente: Hill et al., 2021)

1.1. Expresión génica de Tau

Tau es codificada por el gen *MAPT* (del inglés *Microtubule Associated Protein Tau*), el cual se encuentra en la posición del cromosoma 17q21.31. Está compuesto por 16 exones, que al expresarse generan las 6 diferentes isoformas de Tau por el *splicing* alternativo que sufre su transcripto primario de los exones 2, 3 y 10 (Andreadis, 2005) en el cerebro humano adulto (Figura 2). La inclusión o exclusión del exón 10 está fuertemente regulada espacial y temporalmente, el cual codifica para la segunda repetición del MBD. Su inclusión genera la isoforma de Tau con cuatro repeticiones, también llamada Tau 4R, que se relaciona con una mayor estabilidad de unión al tener más sitios de unión a tubulina, mientras que su exclusión genera la isoforma de Tau 3R, la cual se asocia con menor estabilidad en la interacción con los microtúbulos (Wang & Liu, 2008). A su vez, ocurre el *splicing* alternativo de los exones 2 y 3 en el dominio N terminal, generando las llamadas isoformas 0N, 1N y 2N (véase Figura 2). Se observó que, en condiciones fisiológicas, los niveles relativos de las isoformas 3R y 4R de Tau en el cerebro humano son equivalentes, por lo que se sospecha que hay un balance en el rol que cumplen estas variantes (Goedert et al., 1989; Spillantini et al., 2013).

La expresión diferencial de las distintas isoformas de Tau es tejido específica y también depende del estadio del desarrollo, donde se relaciona fuertemente con la plasticidad del citoesqueleto durante el crecimiento neurítico y la sinaptogénesis. Durante la embriogénesis, tanto en el cerebro humano como murino, se expresa en mayor proporción la isoforma 0N3R, la cual se hipotetiza que estaría relacionada con una mayor plasticidad, requerida para la formación de los procesos neuronales y la elongación de las neuritas durante el desarrollo del sistema nervioso. Luego del desarrollo, como ocurre en los roedores, se genera un cambio en el patrón de expresión de isoformas que coincide con la formación de las sinapsis, donde se observa una mayor incorporación del exón 10, llevando a una mayor estabilidad de los microtúbulos (Wang & Liu, 2008)

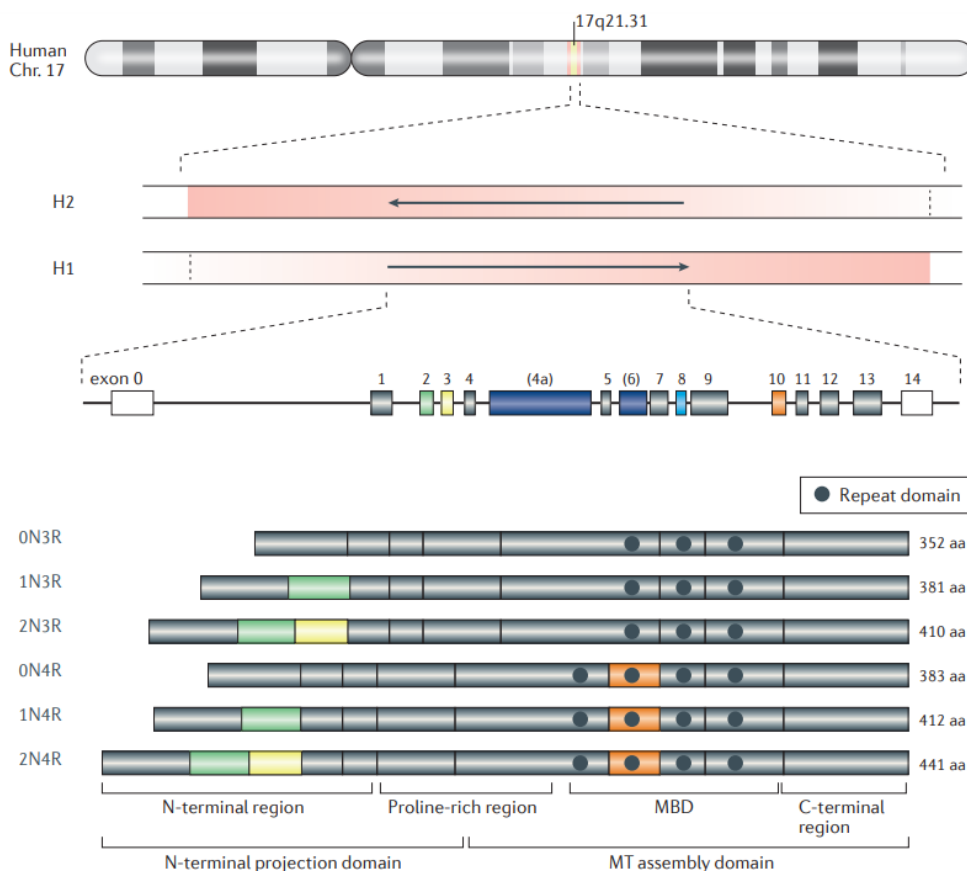


Figura 2. Expresión de las distintas isoformas de Tau en el Sistema Nervioso Central (SNC). Las 6 isoformas que se generan por el *splicing* alternativo del transcripto primario de Tau se diferencian por la inclusión o exclusión de los exones 2 y 3 en el extremo amino terminal (0N, 1N o 2N) y por la presencia de 3 o 4 repeticiones (3R o 4R) de unión a microtúbulos en el MBD del extremo carboxi terminal. Además, existen dos haplotipos en el genoma humano, conocidos como H1 y H2, debido a una inversión de ~900kb. (Fuente: C. Li & Götz, 2017)

1.2. Fosforilación de Tau

La proteína Tau es fosforilada de forma fisiológica en múltiples serinas y treoninas que presenta su estructura. Se descubrieron varias kinasas que reconocen distintos epítopes de Tau como sustrato de fosforilación *in vitro*, como la Glucógeno Sintetasa kinasa 3 β (GSK 3 β), la kinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk 5), la kinasa Fyn de la que se desarrollará más adelante, entre otras. Además, estas modificaciones se encuentran reguladas por la actividad de diversas fosfatasa como PP2A, PP2B y PP1, siendo la primera de ellas la responsable del 70% de actividad fosfatasa con Tau *in vitro* y también juega un rol fundamental en el estado de fosforilación *in vivo*, directamente relacionado con el grado de estabilización de Tau con la tubulina (Johnson & Stoothoff, 2004). La rápida dinámica de las modificaciones por grupos fosfato, sumado a las isoformas derivadas del *splicing* alternativo, generan una amplia heterogeneidad de moléculas individuales de Tau que muestran diversa funcionalidad, la cual continúa siendo poco conocida (Cleveland et al., 1977).

1.3. Bases moleculares de las taupatías

Hasta el momento, se han reportado cerca de 100 mutaciones en el gen *MAPT*, algunas de las cuales afectan el procesamiento post-transcripcional y/o post-traducciona, modifican la capacidad de unión microtúbulos y están asociadas a taupatías (Spillantini & Goedert, 2013). Estas mutaciones pueden situarse tanto en la zona codificante, lo cual altera su secuencia, como en zonas no codificantes, que pueden alterar el *splicing* de su RNAm. De hecho, aproximadamente un tercio de las mutaciones asociadas a taupatías alteran el *splicing* del exón 10, y, consecuentemente, el balance entre las isoformas 3R y 4R (Niblock & Gallo, 2012). Existen además otros factores no genéticos que podrían afectar el *splicing* alternativo de *MAPT*, generando una plétora de causas del desbalance de isoformas relacionadas con distintos tipos de demencia (Rösler et al., 2019). En la mayoría de estos casos, este desbalance lleva a la hiperfosforilación de la isoforma en exceso, lo que disminuye su afinidad por los microtúbulos, llevando a su disociación y su concurrente patogenicidad al generar los agregados intracelulares mencionados (Ishihara et al., 1999; H. Lee et al., 2005). Sin embargo, en algunos casos, la disfunción neuronal y los concomitantes síntomas clínicos pueden aparecer sin la generación de NFTs, sugiriendo que la alteración del balance 3R:4R puede ser patológico *per se* (Berger et al., 2007; Damianich et al., 2021).

La hiperfosforilación de Tau, asociada a un desbalance en la actividad de las kinasas y fosfatasa que actúan sobre esta proteína, se asume que es un factor crítico para la formación de agregados fibrilares. Existen trabajos donde se estudiaron los múltiples pasos del proceso de conversión de especies fisiológicas de Tau a especies patológicas que terminan en la formación de NFTs (Kuret et al., 2005; Ross & Poirier, 2004). El primer paso involucra la pérdida de interacción de Tau con los microtúbulos, aumentando su contenido soluble, lo que promueve su incorrecto plegamiento y cambios conformacionales que incrementan la probabilidad de formación de agregados. Este secuestro de Tau fisiológica en agregados insolubles se encuentra mayormente asociado con una pérdida de función respecto a su rol en la estabilización de los microtúbulos, lo que genera fallas en la dinámica del citoesqueleto y el transporte axonal que llevan a una disfunción sináptica y la consecuente neurodegeneración.

1.4. La kinasa Fyn

Fyn es una kinasa de la familia de las tirosina kinasas Src, la cual juega un rol fundamental en regular la transducción de la señal generada por receptores de membrana en una variedad de ambientes celulares (Parsons & Parsons, 2004). En el contexto del SNC, se ha encontrado una gran evidencia que muestra que la función primaria de Fyn es la de promover la actividad de los receptores *N*-metil-D-aspartato (NMDARs) y de otros canales iónicos. Los NMDAR son el principal subtipo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos que permiten la rápida transmisión excitatoria en la mayoría de las sinapsis centrales, donde Fyn junto con otras kinasas de la familia Src cumplen un papel crítico en procesos subyacentes a la plasticidad fisiológica, como el aprendizaje y la memoria por su rol en la potenciación sináptica, como a la plasticidad patológica, como el dolor y la epilepsia (Salter & Kalia, 2004). Los receptores NMDA fueron caracterizados como complejos multiproteicos y clasificados por las distintas subunidades y sus variantes que los componen: NR1 (NR1-1, NR1-2, NR1-3, y NR1-4), NR2 (NR2A, NR2B, NR2C, y NR2D), y NR3 (NR3A y NR3B) (Dingledine et al., 1999). Los NMDARs nativos cuentan con dos subunidades NR1 y otras dos subunidades que pueden ser iguales o una combinación de las otras variantes. En las espinas dendríticas, donde se concentran los receptores glutamatérgicos, Fyn fosforila la subunidad NR2B del NMDAR para facilitar la interacción del receptor con la proteína de andamiaje de densidad postsináptica PSD-95, lo que se asocia con otros factores que generan el aumento de la señalización glutamatérgica mediada por los NMDAR (Nakazawa et al., 2001).

Distintos estudios demostraron que Tau interacciona con Fyn y es uno de sus sustratos de fosforilación, modificación que aumenta la afinidad de la interacción entre estas dos proteínas en el compartimento somatodendrítico (Bhaskar et al., 2010). Esta interacción facilita la localización de Fyn hacia las dendritas, promoviendo la actividad de los NMDARs. En condiciones patológicas, en las cuales **Tau se hiperfosforila y pierde afinidad por los microtúbulos, ocurre su *des*-localización hacia el compartimiento somatodendrítico y, en consecuencia, aumenta la cantidad de Tau asociada con Fyn, sobre estimulando la señalización glutamatérgica.** Este es uno de los principales mecanismos subyacentes a la excitotoxicidad descrita en las taupatías, y varios estudios sugieren que es uno de los eventos relacionados a la neurodegeneración (Figura 3) (Ittner & Götz, 2011; Miyamoto et al., 2017; Wu et al., 2016). Así como anteriormente se discutió sobre la vulnerabilidad selectiva de las neuronas que componen núcleos cerebrales puntuales afectados en las distintas taupatías, se hipotetiza que esta vulnerabilidad, asociada al mecanismo excitotóxico mencionado, se presente particularmente en las neuronas piramidales, involucradas en la señalización glutamatérgica en áreas como la corteza prefrontal (PFC) (Fu et al., 2019), en la cual se profundizará más adelante en este trabajo.

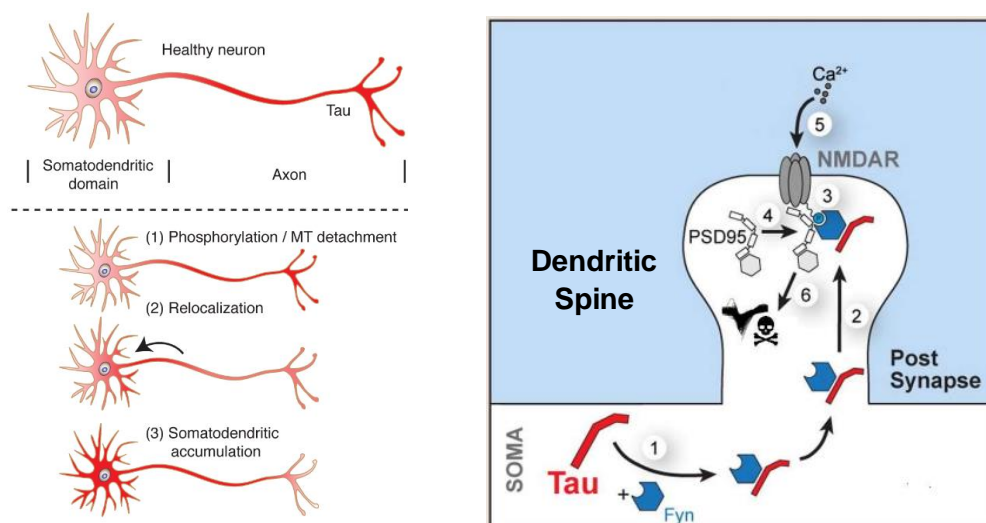


Figura 3: Mecanismo de excitotoxicidad mediada por Fyn-Tau en la postsinapsis. La hiperfosforilación de Tau favorece su desprendimiento de los microtúbulos axonales y su deslocalización en el compartimento somatodendrítico (izquierda), lo que promueve la interacción Tau-Fyn (1, derecha). Esto aumenta la localización de Fyn en las espinas dendríticas (2), donde fosforila la subunidad NR2B del receptor NMDA (3), reclutando la proteína PSD-95 (4), que promueve la entrada de calcio extracelular ante la señalización glutamatérgica (5). Esta entrada de Ca^{2+} desencadena la excitabilidad neuronal, acoplando la asociación de Fyn con el NMDAR a la señalización excitotóxica (6) (adaptado de Ittner et al., 2010).

1.5. *El modelo de ratón hTau*

Con el fin de estudiar las consecuencias funcionales asociadas a la patología Tau en el marco de los mecanismos de excitotoxicidad mencionados anteriormente, en el laboratorio utilizamos el modelo de ratón hTau (*human Tau*) validado previamente como un modelo de taupatía (Andorfer et al., 2003; Polydoro et al., 2009). Esta línea transgénica fue diseñada para expresar las 6 isoformas de Tau humanas, a diferencia del ratón salvaje que presenta en su estadio adulto únicamente la isoforma 4R. Los ratones hTau son mutantes nulos (*knock out*) de su gen *Mapt* endógeno (murino), el cual se encuentra interrumpido en su exón 1 por el gen codificante de la proteína fluorescente EGFP. Además, porta en su genoma un cromosoma artificial (PAC) con haplotipo humano H1, mayormente asociado a las taupatías (Duff et al., 2000), conteniendo el gen *MAPT* humano completo con todas sus secuencias exónicas e intrónicas y su promotor, a partir del cual se producen las seis isoformas de Tau humanas en el cerebro del hTau.

Una de las particularidades de este modelo consiste en la presencia de un desbalance en el contenido relativo de isoformas de Tau 3R y 4R, presentando hasta dos veces un exceso de la isoforma 3R (Andorfer et al., 2003; Avale et al., 2013), en contraste de los ratones salvajes que producen mayoritariamente la isoforma 4R. Se sugiere que esto se deba probablemente a diferencias en la regulación del *splicing* alternativo del exón 10 del transgén *MAPT* en el ratón. Una hipótesis sobre esta causa se basa en las diferencias entre especies (humano-ratón) en algunos factores en *trans* requeridos para el procesamiento del transcripto primario en el contexto murino. Además, estos ratones expresan niveles relativos de proteína Tau 2.5 veces más altos que en los ratones salvajes ((Espíndola et al., 2018) Los ratones hTau desarrollan patología Tau asociada con la edad (9-12 meses aproximadamente), incluyendo la redistribución de Tau al compartimiento somatodendrítico, su hiperfosforilación y acumulación en filamentos helicoidales en la PFC, lo que correlaciona con déficit motores y cognitivos.

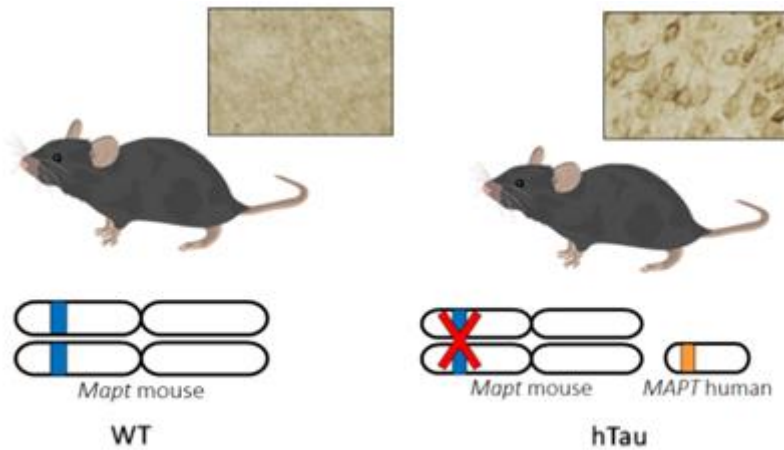


Figura 4: Organización genómica y proteica de Tau en condiciones normales y patológicas de los modelos experimentales utilizados en este trabajo. A la izquierda, se observa el ratón salvaje con el gen *Mapt* murino, que codifica mayoritariamente para la isoforma 4R en el adulto. A la derecha, el ratón hTau es un doble mutante negativo para su gen *Mapt* endógeno y además contiene un cromosoma artificial PAC donde se encuentra el gen *MAPT* humano completo. Gracias a la presencia del mismo, se expresan ambas isoformas de Tau, con un desbalance que tiende hacia una mayor expresión de 3R. Además, se muestran resultados de ensayos de inmunohistoquímica a partir de cortes coronales de PFC usando un anticuerpo que reconoce un epítipo de fosforilación patológica de Tau. Se detecta la presencia de Tau hiperfosforilada predominantemente en los somas neuronales de ratones hTau (adaptado de Espíndola et al, 2018).

1.5.1 Estudio de fenotipos electrofisiológicos

En un estudio realizado por nuestro laboratorio (Facal et al., 2024) se ha caracterizado el curso temporal del disparo neuronal en el área prelímbica de los ratones hTau, a partir de registros *in vivo* con multielectrodos discriminando entre neuronas piramidales putativas e interneuronas basándose en la forma de la onda de sus disparos (de Almeida et al., 2013; Barthó et al., 2004). Se observó que los ratones hTau mostraron un incremento significativo en las tasas de disparo de neuronas piramidales entre los 6 y 12 meses de edad, respecto de neuronas del mismo subtipo en ratones salvajes (Figura 5), sin observar diferencias en las interneuronas de ambos grupos. Esto es consistente con reportes previos que demuestran que la patología Tau afecta diferencialmente a neuronas glutamatérgicas versus gabaérgicas (Fu et al., 2017), lo cual podría estar asociado con los mecanismos de excitotoxicidad generados por el rol de Fyn en el contexto de las taupatías.

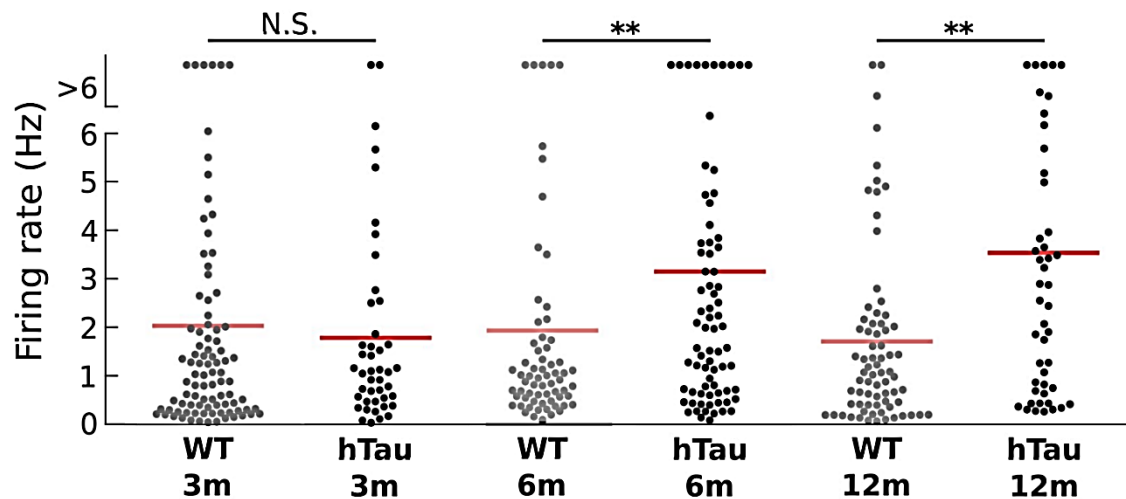


Figura 5. Caracterización del curso temporal de las tasas de disparo de neuronas piramidales putativas en la PFC de ratones WT y hTau. Cada punto representa la tasa de disparo media de cada neurona registrada. Se observa que, entre los 6 y 12 meses de edad, las neuronas piramidales putativas de la PFC de ratones hTau presentan una tasa de disparo significativamente mayor respecto del WT. Fuente: Facal et al., 2024.

1.5.2 Estudio de fenotipos comportamentales

Otras características que presenta el modelo hTau son distintos déficits comportamentales que recapitulan los observados en pacientes con taupatías como la EA y la DFT, donde las áreas del cerebro más afectadas son críticas para el control de la inhibición comportamental y la memoria de trabajo, como la PFC y el hipocampo (Arriagada et al., 1992). Una forma de estudiar estos fenotipos en los roedores es a partir de distintas pruebas comportamentales que están asociadas a la función del área del cerebro cuya función se intenta evaluar. Uno de ellos es la prueba de reconocimiento de objeto novedoso (*NOR* del inglés *Novel Object Recognition*), la cual evalúa la memoria a corto plazo al exponer al individuo en una cámara con dos objetos iguales, para luego reemplazar uno de ellos con un objeto novedoso y evaluar el tiempo en el que el animal explora cada objeto. Se espera que los animales presenten preferencia por el objeto novedoso. Se obtiene entonces el cociente entre el tiempo en el que el ratón pasa explorando el objeto novedoso en función del tiempo total: si este cociente, llamado índice de discriminación, da cerca del 50%, esto significa que el animal no distingue correctamente un objeto novedoso de uno conocido, lo que implicaría que su memoria de corto plazo estaría impedida, sugiriendo un deterioro de la PFC y/o hipocampo. Nuestro grupo reportó que los ratones hTau presentan déficits en el *NOR* a partir de los 6 meses de edad (Espíndola et al., 2018; Muñoz et al., 2022; Facal et al., 2024).

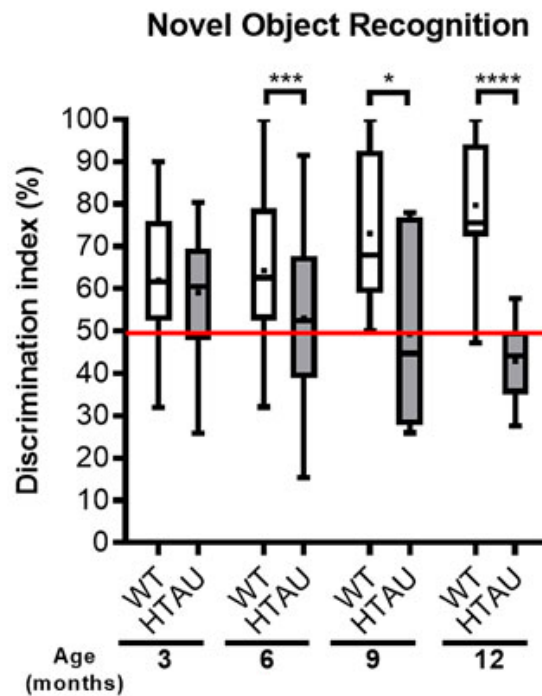


Figura 6. Caracterización del curso temporal del deterioro cognitivo observado en los ratones hTau a partir del reconocimiento de objeto novedoso. Se observó que los ratones hTau presentan déficits en el NOR a partir de los 6 meses de edad, signos de la falta de memoria de corto plazo. Esto sugiere que el inicio del deterioro cognitivo sucede entre los 3 y los 6 meses de edad de los ratones. Fuente: Muñiz et al., 2022.

Para evaluar otras de las funcionalidades de la PFC de los ratones como la inhibición comportamental, nuestro grupo también realiza la prueba del laberinto en cruz elevado (del inglés *Elevated Plus Maze*), el cual consiste en cuatro brazos con corredores conectados por uno de sus extremos, dos de ellos están delimitados por paredes verticales (cerrados), mientras que los otros dos están desprotegidos (abiertos). Por naturaleza, estos animales tienden a estar al resguardo de posibles depredadores, y se espera que los ratones salvajes pasen la mayoría del tiempo en los brazos cerrados. Si el control de la inhibición comportamental de los individuos fallase por deterioro de su PFC, estos no evaluarían el peligro y se lanzarían a explorar tanto los brazos cerrados como abiertos. Se evalúa entonces el tiempo en que los ratones pasan sobre los brazos abiertos en función del tiempo total. Los ratones hTau presentaron mayor desinhibición que los WT desde aproximadamente los 3 meses de edad y hasta cerca de los 6 meses. Para edades más tardías no se logró observar diferencias significativas entre grupos (Figura 7) (Muñiz et al., 2022). Esto sugiere nuevamente un deterioro de las áreas corticales del modelo hTau involucradas en el control de la inhibición comportamental.

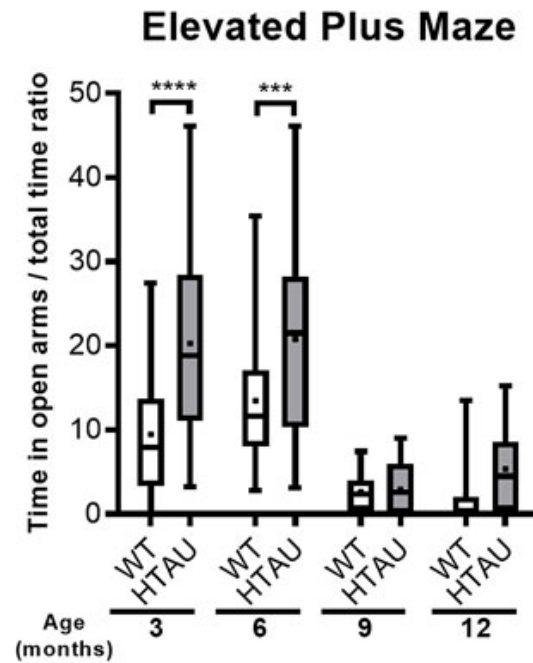


Figura 7. Caracterización del curso temporal del deterioro cognitivo observado en los ratones hTau a partir de la prueba del laberinto en cruz elevado. Se observó una ventana temporal temprana (3 a 6 meses de edad) en el que los ratones hTau pasaron más tiempo en los brazos abiertos en función del tiempo total de exploración que los ratones WT, signos de un déficit en el control de la inhibición comportamental. Fuente: Muñiz et al., 2022.

Además, como parte de la caracterización del modelo, analizamos la locomoción espontánea de los ratones hTau. Para esto se realiza la prueba de campo abierto (*Open Field Test* en inglés, *OF*) en ratones jóvenes y envejecidos de ambos grupos. La prueba consiste en utilizar una cámara cuadrada cerrada donde los animales son libres de explorar por un tiempo definido. Se evalúa tanto la distancia recorrida como el tiempo en el que los ratones pasan en un cuadrado imaginario de dimensiones específicas en el centro de la cámara en función del tiempo total de la prueba, con el fin de evaluar posibles fenotipos asociados con ansiedad y desinhibición. Se observó que los ratones hTau presentan signos de hiperlocomoción prácticamente durante todo el curso temporal, respecto de los ratones salvajes (Figura 8, izquierda). Además, los ratones hTau mostraron signos de ansiedad/desinhibición al pasar más tiempo en el centro de la cámara en función del tiempo total respecto a los ratones WT entre los 3 y 6 meses de edad, donde luego en edades más avanzadas las diferencias se minimizaron (Figura 8, derecha) (Muñiz et al., 2022). Nuevamente, el modelo hTau presenta fenotipos característicos de la patología Tau que luego serán evaluados en las condiciones experimentales que plantea este trabajo.

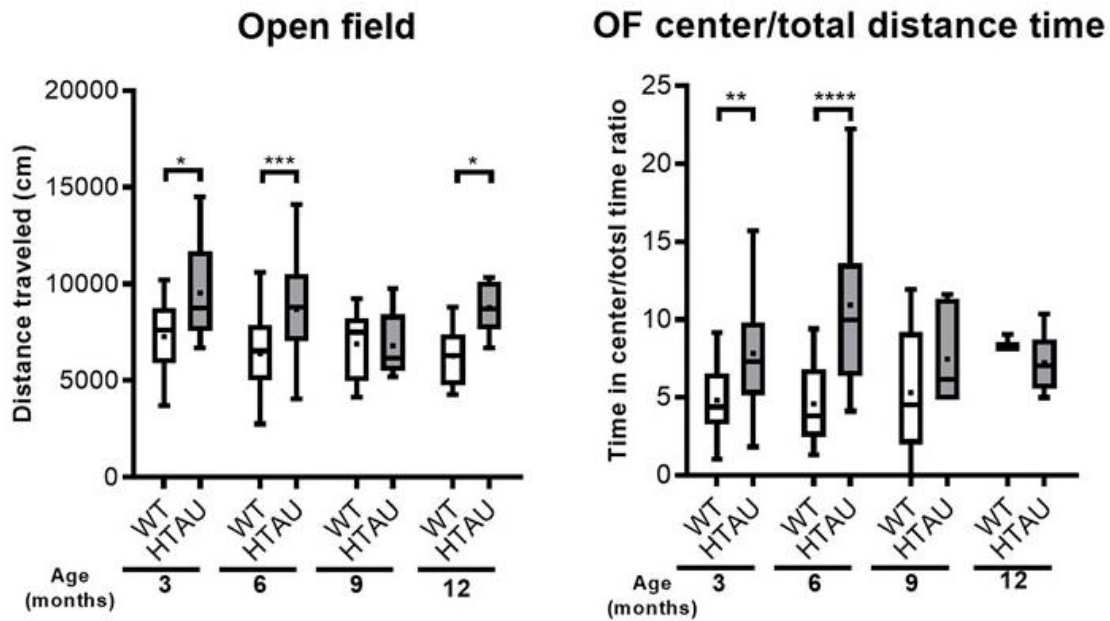


Figura 7. Caracterización del curso temporal de los cambios motores observados en los ratones hTau a partir de la prueba de campo abierto. Se observó que los ratones hTau presentaron una hiperlocomoción respecto a los ratones WT tanto a edades tempranas como tardías (izquierda), mientras que el tiempo en el que transcurrieron en el centro en función del tiempo total de exploración presentó diferencias significativas entre los grupos puntualmente entre los 3 y 6 meses de edad (derecha). Fuente: Muñiz et al., 2022.

1.6. Vectores lentivirales y estrategia de microRNA

Los vectores lentivirales son un tipo de vector viral derivado de los lentivirus, una familia de retrovirus. Los retrovirus son virus de RNA que pueden transcribir inversamente su genoma de RNA en ADN, que luego se integra en el genoma de la célula huésped. Los lentivirus, como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), son conocidos por su capacidad de infectar células que no se dividen, lo que los hace especialmente atractivos como vehículos de entrega de genes. Gracias a las inyecciones estereotáxicas de vectores virales, existe la posibilidad de manipular la expresión génica en el cerebro de roedores, tanto con un control espacial como temporal. Casi cualquier área del cerebro del roedor puede ser intervenida, generando la integración del transgén de interés de manera estable en cualquier momento del desarrollo (Cetin et al., 2006).

En nuestro laboratorio se desarrolló una estrategia molecular para modular negativamente la expresión de una proteína a partir de la estrategia de microRNA o miRNA (Facal et al., 2024; Bordone et al., 2021). Estas moléculas de RNA no codificante de entre 18 y 25 nucleótidos juegan un rol crucial en la regulación de la expresión génica y están involucradas en muchos procesos biológicos, incluyendo el desarrollo, la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis. La utilización de miRNA como parte de una estrategia terapéutica es un área de investigación activa con aplicaciones potenciales en el tratamiento de diversas enfermedades.

Los miRNA se transcriben a partir del ADN en el núcleo celular mediante la RNA polimerasa II, lo que da lugar a un transcripto primario de miRNA denominado pri-miRNA. A continuación, el pri-miRNA es procesado por una enzima llamada Drosha, junto con su cofactor DGCR8, para formar un miRNA precursor en forma de horquilla (pre-miRNA). El pre-miRNA es transportado del núcleo al citoplasma por la exportina-5 y procesado de nuevo por una enzima llamada Dicer, generando una molécula corta de RNA de doble cadena. Se selecciona una cadena del dúplex de miRNA, denominada cadena guía, y se incorpora en el complejo de silenciamiento inducido por RNA (*RISC* del inglés *RNA-Induced Silencing Complex*). El miRNA guía al *RISC* hasta el RNAm blanco en función de la complementariedad de secuencias. Si el miRNA tiene una complementariedad casi perfecta con el RNAm blanco, puede inducir el clivaje y degradación del RNAm, con la concomitante reducción de la expresión proteica. En los casos de emparejamiento imperfecto de bases, los miRNA pueden inhibir el inicio de la traducción, lo que conduce a una disminución de los niveles de proteína (Figura 8) (Ha & Kim, 2014; O'Brien et al., 2018)

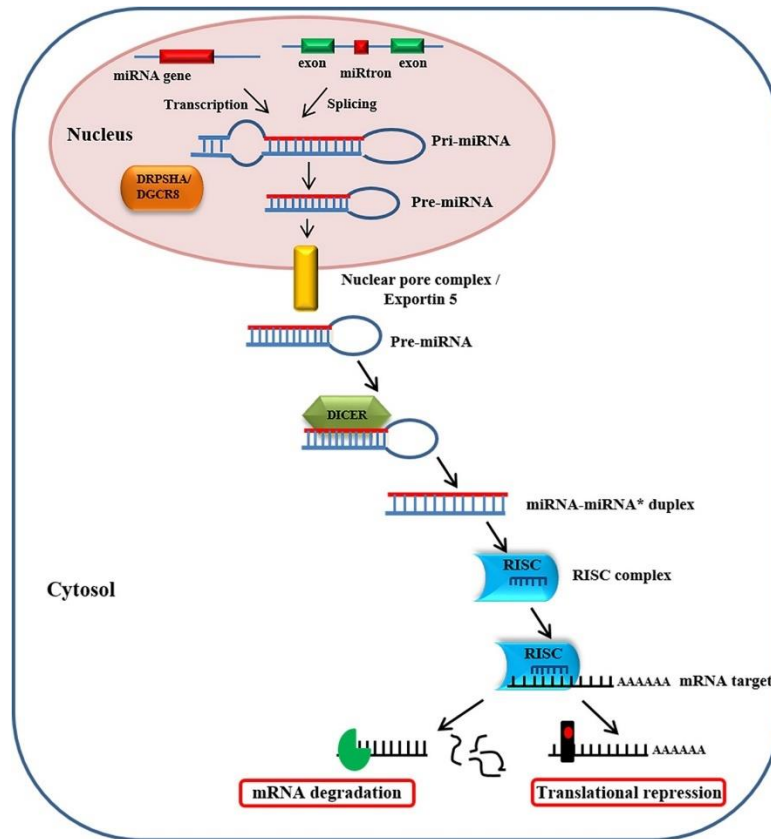


Figura 8. Biogénesis de los miRNAs y mecanismo de acción. Los microRNA son transcritos por la RNA polimerasa II dando el pri-miRNA, generando precursores que se someten a una serie de eventos de escisión para formar el microRNA maduro. Drosha, la primera ribonucleasa nuclear III, reconoce el pri-miRNA y corta el RNA de doble cadena liberando un pre-miRNA. La horquilla del pre-miRNA se exporta desde el núcleo en un proceso en el que interviene la proteína nucleocitoplasmática Exportina-5. En el citoplasma, la horquilla del pre-miRNA es cortada por la enzima Dicer en un dúplex de miRNA de 18-25 nt. Una de las hebras se incorpora al complejo *RISC* donde interactúan el miRNA y su RNAm blanco. El miRNA maduro actúa degradando el RNAm o inhibiendo su traducción. Fuente: (Melone et al., 2018)

Basándose en esta estrategia, nuestro laboratorio ya realizó estudios enfocados en el silenciamiento de Tau en el marco del modelo hTau, con resultados prometedores (Facal et al., 2024). No obstante, regular negativamente los niveles de una proteína tan importante en la fisiología neuronal podría traer consecuencias imprevistas desde una perspectiva terapéutica. Por esta razón, actualmente se buscan candidatos alternativos como blancos terapéuticos para el silenciamiento específico mediante distintas vías. En este contexto, y considerando el papel de Tau patológica en la sobreactividad de la kinasa Fyn descrito previamente (véase Introducción, sección 1.4), consideramos que el silenciamiento de Fyn podría ser una estrategia plausible en el manejo de la patología Tau.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Considerando el marco teórico propuesto y en base a los resultados previamente detallados, este trabajo se propone abordar el estudio del rol de la kinasa Fyn en las condiciones de la patología Tau, como prueba de concepto de una potencial terapia génica dirigida a silenciar la expresión de Fyn en núcleos cerebrales afectados por la patología Tau.

La hipótesis de trabajo postula que: *el silenciamiento de la expresión de Fyn en los núcleos vulnerables a la presencia de Tau patológica prevendrá los fenotipos asociados a taupatías en el modelo hTau.*

OBJETIVO GENERAL

Como objetivo general, en este trabajo se busca analizar las consecuencias funcionales del silenciamiento específico de Fyn en la corteza prefrontal de ratones hTau.

Objetivos específicos de esta tesina:

- Inyectar vectores lentivirales portadores de microRNAs que silencien la expresión de Fyn en la corteza prefrontal de ratones hTau.
- Evaluar los fenotipos conductuales del modelo hTau control o tratado con miRNA-Fyn.
- Analizar los cambios electrofisiológicos y moleculares inducidos por el silenciamiento específico de la expresión de Fyn en la corteza prefrontal.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. *Modelo experimental*

Todos los procedimientos con animales se diseñaron bajo las directrices del *National Institutes of Health* (NIH) y fueron aprobados por la Comisión Institucional de Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (CICUAL) del Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI - CONICET).

Los ratones con los que se trabajó en esta tesis de licenciatura fueron criados y mantenidos en el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME), con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, en condiciones apropiadas de luz, temperatura, humedad y con alimento y agua *ad libitum*.

Las colonias de ratones fueron generadas a partir de dos machos fundadores obtenidos del repositorio Jackson Laboratories (Bar Harbour, Maine, USA; B6.Cg-Mapt^{tm1(EGFP)Klt}Tg(MAPT) 8cPdav/J. Stock número: 005491), los cuales se retrocruzaron por tres generaciones con hembras C57BL/6 provenientes del bioterio de la FCEyN-UBA para obtener ratones heterocigotas para la Tau murina y portadores del gen MAPT humano (en heterocigosis). Los cruzamientos entre estos heterocigotas resultaron en colonias con los distintos genotipos utilizados en este trabajo: los ratones Wild Type (WT) fueron asignados al grupo control, mientras que los ratones hTau se emplearon como grupo experimental. Los ratones hTau expresan la variante de Tau humana por contar con un cromosoma artificial PAC (P1 Artificial Chromosome) que porta el transgén *MAPT* humano. Además, estos ratones son mutantes nulos (*knock out*) para la proteína Tau murina, en el background de C57BL/6 (20 generaciones de retrocruza). Para confirmar los distintos genotipos de cada uno de los animales empleados en este estudio, se realizó el protocolo de genotipificación detallado a continuación.

Genotipificación

A partir de biopsias de orejas se realizó una extracción de ADN, comenzando con una digestión con 100 µl de una solución de: buffer de lisis (50 mM TrisHCL pH 7.5, 100 mM NaCl) junto con EDTA 0,5M pH 8.0 y proteinasa K (Sigma-Aldrich P2308) 1/50 a 65°C en agitación *overnight* en tubos Eppendorf. Luego se agregaron 40 µl de acetato de potasio 5 mM y se dejó enfriar por 10 min en hielo para luego centrifugar por 20 min a 13.300 G. Seguidamente se

conservó el sobrenadante, al cual se le agregaron 100 µl de alcohol isopropílico puro y se enfrió en hielo nuevamente por 10 min, centrifugando luego por 10 min a 13.300 G. A continuación, se descartó el sobrenadante y al pellet se le agregaron 100 µl de etanol 70%, centrifugando a la misma velocidad por 5 min. Conservando el pellet, a este se lo calentó a 80°C para evaporar el excedente de etanol. El ADN se resuspendió en 40 µl de H₂O RNAsa free por 30 minutos a 55°C.

Una vez obtenida la muestra de ADN de cada ratón, se realizó una triple PCR utilizando *primers* diseñados por Andorfer et al., 2003 (Figura 9) para determinar el genotipo correspondiente de cada animal:

- **WT:** para determinar la presencia del alelo *MAPT* murino salvaje (*primers*: IMR 3092 forward, IMR 3093 reverse).
- **KO:** para determinar la presencia del alelo *MAPT* murino salvaje interrumpido (*knock out*) (*primers*: IMR 1416 forward, IMR 8072 reverse).
- **hTau:** para determinar la presencia o ausencia del transgen humano *MAPT* (*primers*: IMR 3115 forward, IMR 3116 reverse).

Primer	Secuencia	Detección
IMR 3115	5'-ACTTTGAACCAGGATGGCTGAGCCC-3'	MAPT humana
IMR 3116	5'-CTGTGCATGGCTGTCCCTACCTT-3'	
IMR 3092	5'-CTCAGCATCCCACCTGTAAC-3'	MAPT ratón
IMR 3093	5'-CCAGTTGTGTATGTCCACCC-3'	
IMR 1416	5'-CAGGCTTTGAACCAGTATGG-3'	Knockout MAPT
IMR 8072	5'-TGAACCTGTGGCCGTTTACG-3'	

Figura 9: Primers empleados en la triple PCR realizada a partir de muestras de orejas de ratones provenientes de colonias WT y hTau. Cuando se analizó ADN de un ratón WT, el resultado esperado era que resulte positiva únicamente la PCR de *MAPT* murina, mientras que para ratones hTau, se esperaba que diera positiva tanto la PCR de *MAPT* humana como del knockout del *MAPT* murino (KO). Al partir de una colonia de ratones con el gen *MAPT* humano en heterocigosis, se obtuvieron animales de la colonia hTau que presentaban un genotipo positivo para KO pero no para *MAPT* humano, por lo que a este grupo se los identificaba como knock-out o KO).

3.2. Producción de partículas lentivirales

3.2.1 Diseño del miRNA

Las moléculas de miRNA-Fyn dirigidas al RNAm de la kinasa Fyn de *Mus musculus* (Banco de Genes: BC092217.1) fueron diseñadas usando un algoritmo de selección de siRNA (<http://sirna.wi.mit.edu/>), utilizando criterios de selección desarrollados y validados por nuestro laboratorio, tal como fueron publicados previamente (Bordone et al., 2021). Se utilizó una secuencia de siRNA en la posición +691 (GACACTGTTTGTGGCGCTTTA). Este miRNA se diseñó basándose en el backbone del miRNA-155 de ratón, conservando sus secuencias flanqueantes nativas. El casete de miRNA se subclonó en un vector lentiviral de tercera generación (LV), bajo el promotor neuronal de sinapsina humana (Figura 10), entre los sitios de clonación AgeI y EcoRI de una columna vertebral pTrip LV. El vector de control lleva una secuencia control en el mismo backbone, con el mismo contenido de bases G-C pero carente de homología con los RNAm endógenos.

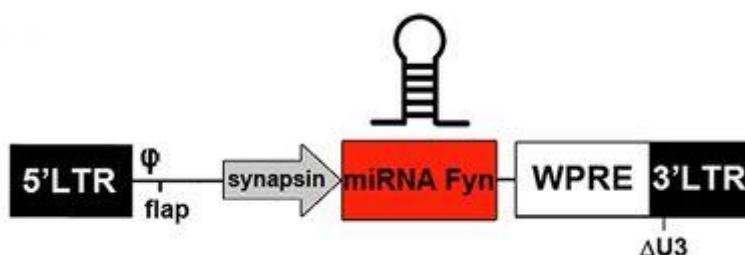


Figura 10. Esquema del vector lentiviral con el casete de miRNA para el silenciamiento de la kinasa Fyn. Además de las secuencias mencionadas anteriormente, el constructo cuenta una secuencia regulatoria post-transcripcional originaria del virus de la hepatitis (Woodchuck hepatitis virus Post-transcriptional Regulatory Element, WPRE), lo que permite aumentar tanto la expresión del transgén como la vida media de sus transcriptos. El 3'LTR presenta una alteración ($\Delta U3$) que vuelve al vector viral "auto-inactivante", lo cual previene que los transgenes integrados vuelvan a empaquetarse.

3.2.2 Protocolo de producción viral (realizado por la Bioq. Indiana Páez Paz)

Las partículas virales portadoras del miRNA destinadas al silenciamiento de Fyn fueron producidas siguiendo el protocolo previamente realizado por nuestro laboratorio, con algunas modificaciones (Facal et al., 2024). Las células HEK-293T se cultivaron en DMEM, suplementado con un 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS; Natocor, Argentina), 0,5 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomicina (ThermoFisher). Las células con una confluencia del 80-85% se co-transfectaron con un vector lentiviral (Fyn-miRNA-155 o Scr-miRNA) junto con vectores auxiliares que codifican las proteínas de empaquetamiento y envoltura (CMV Δ 8.9 y CMV-VSVg, respectivamente). Las partículas virales se recogieron del

medio de cultivo 36 h después de la transfección y se trataron con DNasa I libre de RNasa (ThermoFisher). Los vectores virales se purificaron por centrifugación y filtrado (45 µm de poro), se concentraron por ultracentrifugación a 100.000 x g (rotor Ti 90, Beckman) y se resuspendieron en PBS estéril. Tras realizar la titulación, se almacenaron alícuotas de 10 µl de partículas virales a -80°C.

3.3. *Inyecciones estereotáxicas (realizadas por el Dr. Javier Muñiz)*

Los ratones de 3 meses de edad (peso 25-30 g) fueron anestesiados con isoflurano 0,5-2% (Baxter) y colocados en un marco estereotáctico (Stoelting CO.). Se expuso el cráneo y se identificó el bregma. Se utilizó una jeringa Hamilton de 10,0 µL acoplada a un tubo de acero inoxidable de 36G (Cooper needleworks, Reino Unido) para inyectar 1,5 µL de suspensión lentiviral ($0,6 \times 10^7$ UT/ml; 0,2 µL/min) por lugar de inyección, siguiendo las coordenadas descritas en el atlas del ratón (Paxinos y Franklin, 2013). La suspensión LV se infundió bilateralmente, en 2 sitios en la PFC medial (mPFC), coordenadas (en mm): AP = +2,3, L = ±0,5, VD = -1,8 y -2,2. Los animales se mantuvieron a 37°C durante la cirugía hasta su completa recuperación. Inmediatamente después de la cirugía y 24 hs después, los ratones recibieron el analgésico Aponal (1 mg/kg, s.c.). Cualquier animal que mostrara signos de dolor o malestar tras la cirugía fue sacrificado siguiendo el protocolo de punto final.

3.4. *Ensayos comportamentales*

Todos los ratones analizados fueron cohortes de hermanos de 3 y 12 meses de edad, según se indica. Los experimentos se realizaron entre las 13:00 hs y las 17:00 hs con iluminación tenue, en una sala de comportamiento separada, a la que se trasladó a los ratones con antelación. Los ensayos conductuales se analizaron con el software ANY-maze (Stoelting Co.). Todos los escenarios y dispositivos se limpiaron entre sujetos para minimizar las señales de olor.

3.4.1 *Prueba de campo abierto.*

Se utilizaron cajas de actividad (Med Associates Inc.) acopladas a una interfaz informática (software Activity Monitor, Med Associates Inc.) para evaluar la actividad horizontal y vertical de los animales. Se colocaron ratones de a uno por vez en el centro de las cajas acrílicas vacías (40 × 40 × 40 cm) y se registraron sus trayectorias durante 30 min mediante la interrupción de haces fotográficos infrarrojos separados 2,5 cm que cruzan el

plano x-y en dos niveles z para determinar la distancia total recorrida, el tiempo de permanencia en el centro (un cuadrado virtual de 10 cm²) y la periferia de la arena.

3.4.2 Laberinto en cruz elevado.

Se colocaron a los ratones de a uno por vez en la zona central del laberinto (aparato de metacrilato negro en forma de cruz, elevado en 70 cm; brazos: 35 cm de largo × 5 cm de ancho; cuadrado central: 5 × 5 cm, brazos cerrados delimitados por paredes verticales y brazos abiertos con bordes desprotegidos). El tiempo en el que el animal permaneció tanto en los brazos abiertos como cerrados durante un periodo de exploración de 3 minutos se registró con una cámara aérea. Sólo se contabilizaba una entrada si las cuatro patas estaban dentro del brazo.

3.4.3 Reconocimiento de objeto novedoso.

Los ratones se habituaron individualmente a la cámara vacía (30 × 23 × 25 cm) durante 10 min. A continuación, se colocaron en la cámara con dos objetos idénticos durante 10 min. Tres horas más tarde, se evaluó a los ratones durante 3 min en la misma cámara con dos objetos en la misma posición, pero sustituyendo uno de los objetos por uno nuevo con forma y color diferentes. Los objetos utilizados fueron pequeñas botellas y bloques de construcción de juguete como los de Leger et al. (Leger et al., 2013). Cada objeto se asignó aleatoriamente como novedoso o familiar, para cada ratón. Se registró el tiempo empleado en explorar cada objeto. El índice de discriminación se calculó como el tiempo dedicado a explorar el objeto novedoso en relación con el tiempo total dedicado a explorar ambos objetos.

3.5. Registros electrofisiológicos in vivo (realizados por el Dr. Ezequiel Pereyra)

3.5.1 Adquisición de datos.

Los ratones se anestesiaron profundamente con isoflurano (2% para la inducción y 0,5-1% para mantenimiento, Baxter) y colocados en un marco estereotáxico. La temperatura se mantuvo entre 36-37°C. El cráneo se expuso para localizar claramente el bregma. Se realizó una craneotomía sobre la mPFC (coordenadas: AP= +2,1 mm, LM= ±0,5 mm, bregma como referencia). Un arreglo de tres tetrodos (alambre tetrodo: Kanthal 755768. I.D.12 µm, chapado en oro hasta una impedancia final de 200 y 500 kΩ) se descendió a lo largo de la mPFC a una

velocidad de 10-20 $\mu\text{m}/\text{seg}$ para registrar la actividad neuronal cada 300-400 μm . Se buscaron potenciales de acción estables entre -1 y -2,5 mm de la superficie. Los registros electrofisiológicos se tomaron en diferentes posiciones (se adquirieron hasta 7 grabaciones por animal) con duraciones que oscilaban entre 15 y 30 minutos cada una.

3.5.2 Procesamiento y análisis de los datos.

Los análisis y las pruebas estadísticas se implementaron en MATLAB (The MathWorks Inc., EE.UU.). Las señales sin procesar se filtraron por bandas entre 300 Hz y 6000 Hz. La clasificación de los picos se realizó de la siguiente manera. Se fijó un umbral automático en cinco veces la desviación estándar por encima de la media para detectar los eventos de pico. Los picos detectados se dividieron en muchos grupos con un método *k-means*, y luego se agregaron según su energía de interfaz para cada par. Los clusters se dividieron manualmente y se fusionaron según sus componentes principales para el análisis posterior. Las unidades individuales se clasificaron en dos grupos en función del ancho medio del pico o forma de onda, medida como el tiempo transcurrido desde el valle hasta el siguiente pico del potencial de acción. Las unidades con un “valle a pico” superior a 440 μs se consideraron neuronas piramidales putativas y, en caso contrario, interneuronas putativas. De este modo, distinguimos las neuronas en función de su forma de onda promedio, independientemente de su frecuencia de disparo (Facal et al., 2024; de Almeida et al., 2013; Barthó et al., 2004). Para cada unidad aislada se construyeron trazados con una resolución de 1 ms que contenían una secuencia de ceros (sin eventos de disparos) y unos (eventos de disparos). En estos trazados se determinó la frecuencia de disparo (espigas por segundo).

3.6. Extracción de proteínas y Western Blot

Las mPFC se diseccionaron manualmente y se homogeneizaron en un tubo con 100 μl de buffer de homogeneización (Tris-HCl 1mM, NaCl 150 mM, Triton X 1%, SDS 0,05%, EDTA 2mM pH 7,5) con un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa 1:100 (Thermo Scientific). Tras la homogeneización con una trituradora de tejidos motorizada, los extractos de proteínas se centrifugaron a 13.500 rpm durante 15 min a 4°C. Una vez aislado el sobrenadante, se le agregó una solución de cracking: 20 μl de buffer de homogeneización, 0,1% de cracking buffer 5X y 0,1% de β -mercaptoetanol. Esta solución se calentó a 99°C durante 10 minutos previo a su siembra en geles de poliacrilamida.

Se separaron cantidades iguales de proteínas totales (determinadas mediante el ensayo de Bradford, BioRad) en geles de SDS-poliacrilamida 0,75-1,5 mm (preparados con

acrilamida y N,N'-metilenbisacrilamida al 30%, Invitrogen) al 12% para revelar Fyn y 6% para NR2B, con la siguiente composición: Gel de running (corrida): H₂O, Acrilamida filtrada, Tris 1,5 M pH 8,8, SDS 10%, APS 10% y TEMED. Gel de stacking (apilado): H₂O, Acrilamida filtrada, Tris 1 M pH 6,8, SDS 10%, APS 10% y TEMED. Los geles se colocaron en una cuba electroforética, agregando running buffer (Glicina, Tris Base y SDS) y se corrió por 120 min a 90 V. Se utilizó See-Blue Plus 2 (Thermo Fisher) como marcador de peso molecular. Las proteínas se transfirieron mediante un sistema de transferencia tipo *semi-dry* o semi-seca (para Fyn) y *wet* o húmeda (para NR2B) a membranas de nitrocelulosa (BioRad) de 0,22 µm junto con esponjas Whatman (BioRad).

Para la transferencia semi-seca, se colocó sobre la cuba una esponja embebida en buffer de transferencia (80% Tris y Glicina; 20% Metanol), seguido de la membrana, por encima de esta se colocó el gel de poliacrilamida y por último otra esponja embebida en el buffer. Se transfirió a 20 V por 30 min y a continuación se determinó el estado de la transferencia mediante tinción con Rojo Ponceau, de modo de observar las distintas calles y su carga de proteínas. Para la transferencia húmeda se procedió con el armado del sándwich de transferencia de igual manera, excepto que del lado interno de las esponjas se colocaron papeles de filtro Whatman (BioRad). El sándwich se insertó en el casete de transferencia, de modo que el gel quede de cara al cátodo, y se colocó en la cuba rodeada de hielo, todo sumergido en buffer de transferencia. Se transfirió por 90 min a 100 V. Los tiempos mencionados están contemplados para un gel de 0,75 mm. Para los casos en los que se utilizaron geles de 1,5 mm, los tiempos de transferencia se duplicaron.

Las membranas se incubaron con solución de bloqueo, según la proteína a revelar: leche en polvo descremada al 5% para Fyn o albúmina de suero bovino (BSA) al 10%, ambas en TBS-T (0,05% v/v Tween 20 en TBS). Con la primera solución de bloqueo se incubaron las membranas durante 1 hs, mientras que con la que contiene BSA se incubó durante 2 hs por su menor efecto bloqueante. Posteriormente, se incubaron las membranas *overnight* a 4°C con anticuerpo primario anti-Fyn (1:1000; policlonal de conejo; Santa Cruz Biotechnology; catalog #sc-16 RRID:AB_631528) o anti-pNR2B-Tyr1472 (1:400; policlonal de conejo; Pel-Freez Biologicals; catalog #P43301-0, RRID:AB_476111) en TBS-T con leche o BSA al 0,5%, según corresponda. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno en TBS-T y se incubó por dos horas a las membranas en anticuerpo secundario anti-mouse o anti-rabbit, según correspondiera, en una concentración de 1:2000 en leche o BSA al 0,5% en TBS-T por 2 hs a temperatura ambiente. Luego se repitieron los 3 lavados y se procedió al revelado de las membranas con ECL (peróxido + luminol, ThermoFisher) utilizando un sistema detector de quimioluminiscencia (GenegnomeXRQ - Syngene). A posteriori, las membranas destinadas al

revelado de pNR2B fueron incubadas con solución de mild stripping (1,5% Glicina, 0,1% SDS, 1% Tween 20, pH 2,2) por 3 min para remover los anticuerpos adheridos a la membrana previamente incubados. Luego se lavó tres veces con TBS-T y se bloqueó con leche al 5% en TBS-T durante 1 hs, para seguidamente incubar la membrana *overnight* a 4°C con anticuerpo primario anti-NR2B (1:400; monoclonal de ratón; UC Davis/NIH NeuroMab Facility; catalog #75-097, RRID:AB_10673405), siguiendo el protocolo como se menciona anteriormente. A partir de las imágenes obtenidas, la intensidad de luminiscencia de las bandas observadas se cuantificó utilizando el software ImageJ (Rasband).

3.7. *Análisis estadístico*

Los datos se analizaron y graficaron con el software GraphPad Prism. En cada figura se detalla el tipo de análisis estadístico que se realizó sobre los datos graficados. Aquellos valores que presenten un p-valor < 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1. *Evaluación de los fenotipos de ratones hTau inyectados con vectores lentivirales portadores de miRNA-Fyn en la PFC*

En base a la hipótesis planteada, y teniendo en cuenta los estudios previos de caracterización del curso temporal de los déficits observados en los ratones hTau, se procedió a estudiar los cambios que el silenciamiento de la kinasa Fyn produjo sobre los fenotipos relacionados a la patología Tau.

Diseño experimental

La administración del miRNA-Fyn (o miRNA-Scr control) se realizó a los 3 meses de edad de los ratones, previo a la aparición de los signos de deterioro cognitivo (que ocurre entre los 3 y 6 meses de edad), basándonos particularmente en la caracterización realizada sobre los registros electrofisiológicos y el ensayo comportamental de reconocimiento de objeto novedoso del modelo hTau (véase Introducción, sección 1.5). Los grupos experimentales consistieron en ratones hTau tratados con el vector que expresa el miRNA contra Fyn (**hTau -Fyn**) o ratones hTau inyectados con el miRNA control (**hTau -Scr**), estos últimos se inyectaron con un LV portador de un miRNA con una secuencia control. Ambos grupos se compararon con ratones de genotipo salvaje (**WT**), también inyectados con vector miRNA-Fyn y control, los cuales fueron agrupados para el análisis estadístico en caso de no presentar diferencias entre ellos. Previo a la inyección (3 meses de edad), se realizaron los ensayos comportamentales para caracterizar los fenotipos previos al tratamiento. Seguidamente, los animales fueron asignados al azar al grupo miRNA-Fyn o miRNA-Scr. Luego de la inyección, los ratones se mantuvieron hasta los 12 meses de edad, momento en el cual se repitieron las pruebas conductuales seguido de los registros electrofisiológicos. A continuación, se procedió con la disección del cerebro de los ratones para obtener la PFC, la cual fue procesada para el análisis molecular por *Western Blot*.

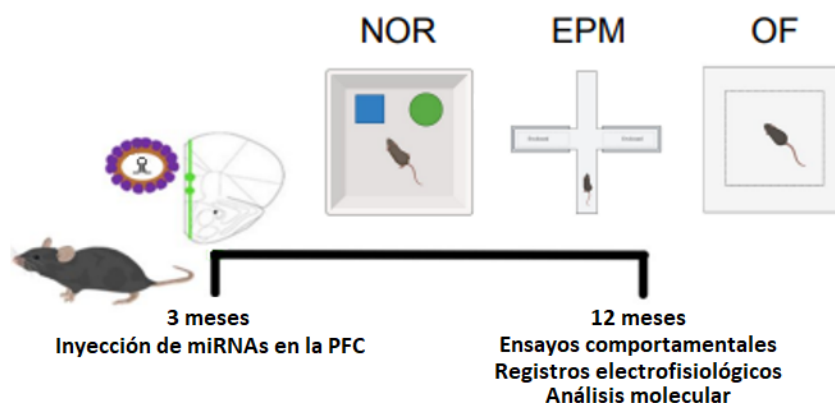


Figura 11. Esquema del diseño experimental.

4.1.1 Prueba de campo abierto

Para analizar posibles cambios en la locomoción espontánea luego del tratamiento con el miRNA-Fyn en la PFC de los ratones hTau, se realizó la prueba de campo abierto. Los ratones WT y hTau se evaluaron a los 3 meses de edad, previo a la inyección de las partículas virales, para evaluar la presencia de los fenotipos tempranos, característicos de este modelo. A esta edad temprana se pudo observar un aumento significativo de la locomoción en el grupo hTau, en concordancia con los estudios previos (Muñiz et al., 2022). Esta diferencia se mantuvo en los ratones hTau -Scr de 12 meses de edad, mientras que en los ratones hTau tratados con miRNA-Fyn se observó una disminución de la hiperactividad, aunque no resultó significativa (Figura 12). Estos resultados sugieren que el silenciamiento de Fyn en la PFC de ratones hTau de 3 meses de edad podría producir un rescate parcial de los signos de hiperlocomoción evaluados en esta prueba.

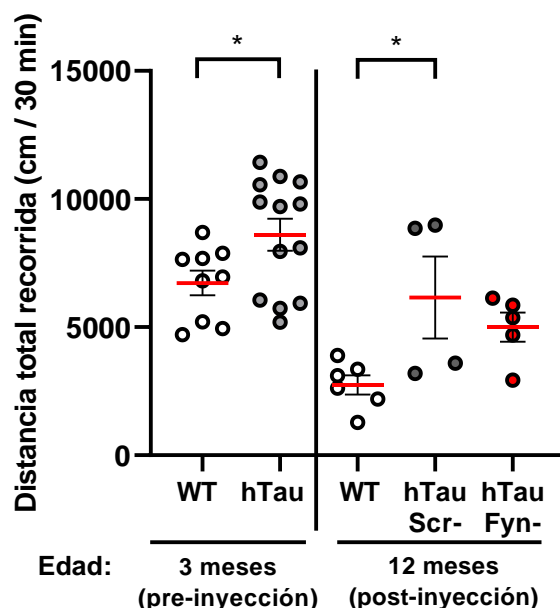


Figura 12. La hiperlocomoción de los ratones hTau observada en la prueba de campo abierto (OF) fue parcialmente rescatada tras la inyección con miRNA-Fyn a los 3 meses de edad. Los ratones WT y hTau fueron inyectados a los 3 meses de edad, con vectores lentivirales miRNA-Fyn o Scr (control) en la PFC. A los 12 meses de edad, los ratones fueron colocados en el centro de las cajas de acrílico vacías y sus trayectorias fueron grabadas durante 30 min mediante la interrupción de haces de luz infrarroja. Se utilizó el videotrack para determinar la distancia total recorrida (cm). Análisis estadístico: Prueba t-student de dos colas; * $p=0,0381$. N y media \pm SEM= WT: 9, 6724 \pm 481 cm/30min, hTau: 13, 8606 \pm 619 cm/30min; ANOVA de una vía, $p=0,0266$, N y media \pm SEM= WT: 6, 2742 \pm 378 cm/30min, hTau -Scr: 4, 6158 \pm 1596 cm/30min, hTau -Fyn: 5, 5515 \pm 314 cm/30min; comparaciones múltiples de Tukey, p-valores: WT vs hTau Scr-: *0,0342, WT vs hTau Fyn-: 0,0868, hTau Scr- vs hTau Fyn-: 0,8718. Los datos se muestran como gráfico de dispersión de puntos, cada punto representa un dato de un animal, con media \pm SEM de cada grupo.

Además de la actividad locomotora, en este ensayo también se estudió si la intervención con miRNA-Fyn tuvo algún efecto sobre los signos de ansiedad que presentan los ratones hTau, evaluado en base al tiempo en que los ratones se movilizan cerca del centro de la arena en función del tiempo total de la prueba. A diferencia de lo observado en los estudios previos, no se encontraron diferencias entre los ratones WT y hTau a los 3 meses de edad, mientras que a los 12 meses sí se observó una mayor actividad en el centro por parte de los ratones hTau -Scr respecto de los ratones salvajes, diferencias que se previnieron parcialmente con el silenciamiento de Fyn (Figura 13).

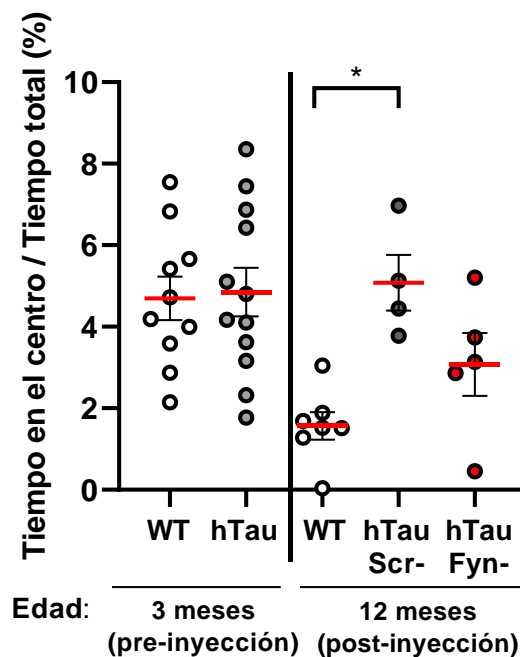


Figura 13. La desinhibición comportamental de los ratones hTau en la prueba de campo abierto es prevenida parcialmente con la inyección de miRNA-FYN. Se analizaron las trayectorias en campo abierto para evaluar los signos de ansiedad presente en el modelo hTau, cuantificando la actividad en el centro y el tiempo en la periferia de la arena, graficando el cociente entre estos dos tiempos. Análisis estadístico: Prueba t-student de dos colas; $p=0,8562$. N y media \pm SEM= WT: 10, $4,70 \pm 0,54$ %, hTau: 12, $4,85 \pm 0,60$ %; ANOVA de una vía, $p=0,0032$, N y media \pm SEM= WT: 7, $1,58 \pm 0,34$ %, hTau Scr-: 4, $5,08 \pm 0,69$ %, hTau Fyn-: 5, $3,08 \pm 0,078$ %; comparaciones múltiples de Tukey, p-valores: WT vs hTau Scr-: $*0,0024$, WT vs hTau Fyn-: $0,1586$, hTau Scr- vs hTau Fyn-: $0,0948$. Los datos se muestran como gráfico de dispersión de puntos, cada punto representa un dato de un animal, con media \pm SEM de cada grupo.

4.1.2 Laberinto en cruz elevado

Con el fin de evaluar si el fenotipo de desinhibición observado previamente en ratones hTau se ve alterado con el silenciamiento de Fyn, se realizó el ensayo del laberinto en cruz elevado, donde se analizó el tiempo en que los ratones exploraban los brazos abiertos del laberinto en función del tiempo total de exploración. Como se reportó previamente, los ratones hTau de 3 meses de edad recorren en promedio más tiempo los brazos abiertos del laberinto que los ratones WT, diferencias que desaparecen en edades tardías. Este fenotipo no presentó cambios ante el tratamiento con miRNA-Fyn (Figura 14). Estos resultados sugieren que el silenciamiento de la expresión de Fyn en la PFC de ratones jóvenes no tiene un impacto considerable sobre el fenotipo de desinhibición comportamental que presenta el modelo hTau a edades tardías.

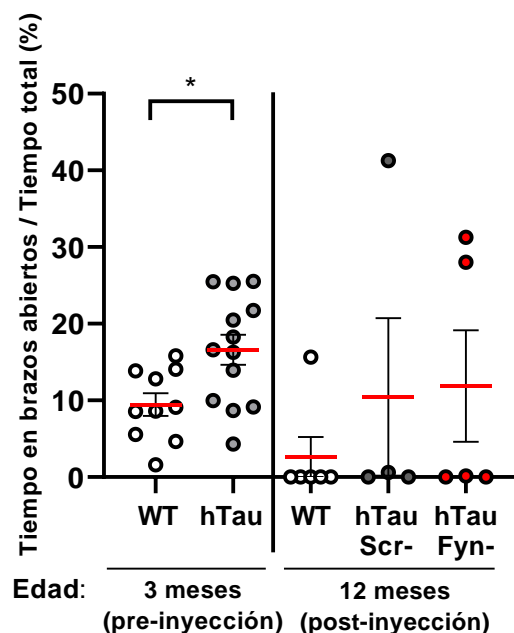


Figura 14. La inyección de miRNA-Fyn en la PFC de ratones hTau de 3 meses de edad no generó cambios en la desinhibición comportamental evaluada en el laberinto en cruz elevado. Los ratones WT y hTau fueron inyectados a los 3 meses de edad con vectores lentivirales miRNA-Fyn o -SCR (control) en la PFC. A los 12 meses de edad, cada ratón fue colocado en el centro del laberinto y se registró el tiempo de permanencia en los brazos abiertos o cerrados durante 3 min, graficando el tiempo en el que exploran los brazos abiertos sobre el tiempo total de la prueba. Análisis estadístico: Prueba t-student de dos colas; * $p=0,0116$. N y media \pm SEM= WT: 10, 9,46 \pm 1,47 %, hTau: 13, 16,60 \pm 1,96 %; ANOVA de una vía, $p=0,0032$, N y media \pm SEM= WT: 6, 2,61 \pm 2,61 %, hTau Scr-: 4, 10,46 \pm 10,27 %, hTau Fyn-: 5, 11,89 \pm 7,27 %; comparaciones múltiples de Tukey, p-valores: WT vs hTau Scr-: 0,6871, WT vs hTau Fyn-: 0,5578, hTau Scr- vs hTau Fyn-: 0,9883. Los datos se muestran como gráfico de dispersión de puntos, cada punto representa un dato de un animal, con media \pm SEM de cada grupo.

4.1.3 Reconocimiento de objeto novedoso

Para evaluar el rendimiento cognitivo de los ratones, se realizó la prueba de reconocimiento de objeto novedoso a los 3 y 12 meses de edad. Los estudios previos de nuestro laboratorio indican que el comienzo de los signos de deterioro cognitivo evidenciados en esta prueba ocurren entre los 3 y los 6 meses de edad de los ratones hTau. Sin embargo, en este estudio se observó que a los 3 meses, previo al silenciamiento de Fyn, el grupo hTau ya presentaba una falta de preferencia hacia el objeto novedoso respecto de los ratones salvajes, representado por un índice de discriminación cercano al 50%. No obstante, en edades avanzadas se observó un rescate de este fenotipo en los ratones hTau inyectados con miRNA-Fyn, ya que los índices de discriminación observados para estos animales fueron similares a los

obtenidos en los ratones WT, mientras que los hTau -Scr se mantuvieron en valores cercanos al 50%, que indican la falta de preferencia por el objeto novedoso (Figura 15). Estos resultados sugieren una recuperación en los signos de deterioro cognitivo observados en el modelo hTau frente a la reducción de Fyn en la PFC.

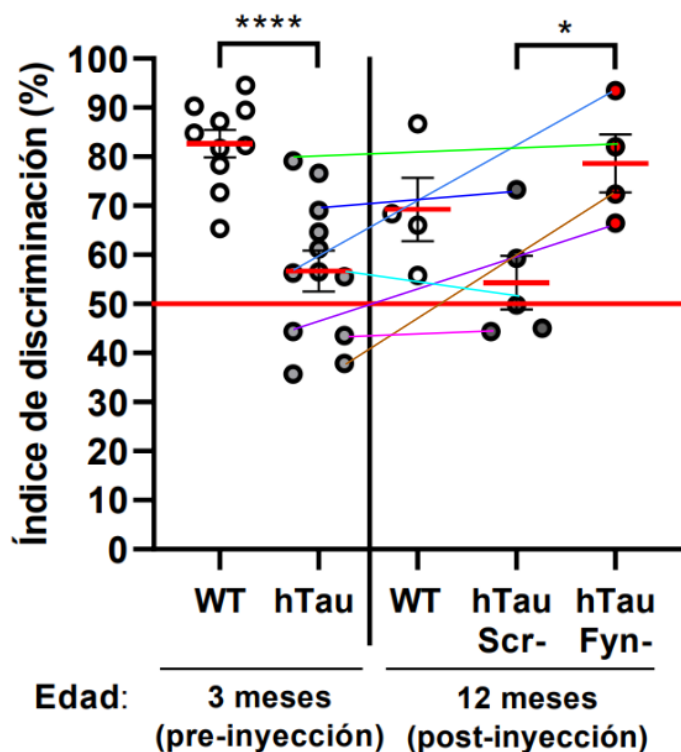


Figura 15. Rescate del deterioro cognitivo en la prueba NOR en ratones hTau inyectados con miRNA-FYN en la PFC a los 3 meses de edad. A los 12 meses de edad, los ratones fueron habituados a dos objetos similares y luego expuestos a un objeto nuevo. El índice de discriminación se calculó como el porcentaje de tiempo empleado explorando el objeto novedoso sobre el tiempo total explorando tanto el objeto familiar como novedoso. Análisis estadístico: Prueba t-student de dos colas; ****p<0,0001; N y media±SEM= WT: 10, 82,68±2,76 %, hTau: 12, 56,72±4,14 %; ANOVA de una vía, p=0,0898, N y media±SEM= WT: 4, 69,26±6,43 %, hTau Scr-: 5, 54,34±5,44 %, hTau Fyn-: 4, 78,60±5,90 %; comparaciones múltiples de Tukey, p-valores: WT vs hTau Scr-: 0,2151, WT vs hTau Fyn-: 0,5487, hTau Scr- vs hTau Fyn-: 0,0357. Los datos se muestran como gráfico de dispersión de puntos, cada punto representa un dato de un animal, con media ± SEM de cada grupo. Las rectas coloreadas unen puntos que representan valores obtenidos a partir de un mismo animal hTau evaluado a los 3 y 12 meses de edad, posterior a la inyección de alguno de los miRNA.

4.1.4 Registros electrofisiológicos

En base a los mecanismos moleculares relacionados a la excitotoxicidad asociada al aumento de la actividad de la kinasa Fyn en el marco de la patología Tau, en este estudio se

registró, mediante el criterio de discriminación mencionado anteriormente (de Almeida et al., 2013, la actividad de las neuronas piramidales putativas de la PFC, representada según su tasa de disparo. Las mismas cohortes de ratones utilizados en los ensayos conductuales fueron seguidamente registrados electrofisiológicamente, a los 12 meses de edad. Se observó que la actividad neuronal de los ratones hTau -Scr presentó un aumento significativo en la tasa de disparo media comparado con los ratones salvajes de la misma edad, coincidiendo con lo observado en la caracterización previa. Sin embargo, en el grupo hTau tratado con el miRNA-Fyn, no se observaron diferencias significativas respecto de los otros dos grupos experimentales (Figura 16). Este resultado sugiere que el silenciamiento de Fyn no tendría un efecto notable sobre la tasa de disparo de las neuronas piramidales de la PFC de ratones hTau.

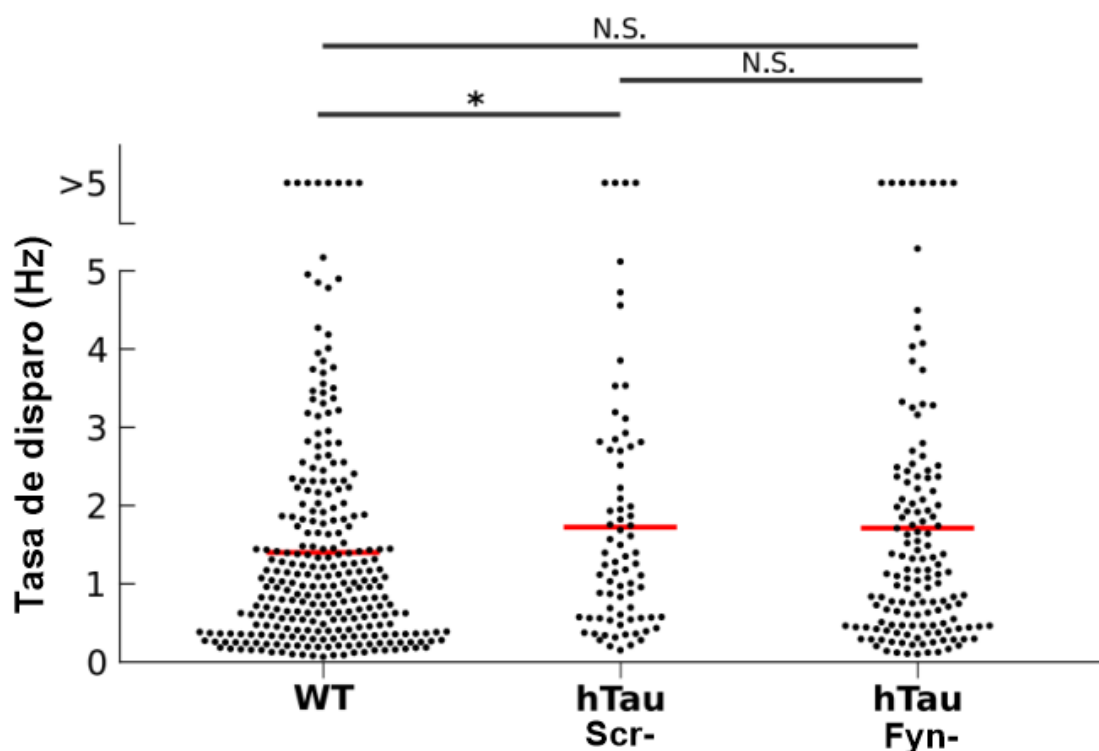


Figura 16. La inyección de miRNA-Fyn en ratones hTau a los 3 meses de edad no redujo significativamente la tasa de disparo aumentada de las neuronas piramidales en la PFC. Se realizaron registros electrofisiológicos *in vivo* en la corteza prefrontal de ratones de 12 meses de edad. Las neuronas piramidales se clasificaron en función de los parámetros de sus formas de onda medias, como se menciona anteriormente. Análisis estadístico: prueba de Kruskal-Wallis; WT: 274 neuronas / 4 ratones, media: 1,58 Hz; hTau -Scr: 76 neuronas / 4 ratones, media: 1,84 Hz; hTau -Fyn: 141 / 4 ratones, media: 1,72 Hz; comparaciones múltiples de Dunn, p-valores: WT vs hTau Scr-: 0,0258, WT vs hTau Fyn-: 0,2850, hTau Scr- vs hTau Fyn-: 0,2087. Los datos se muestran como gráfico de dispersión de puntos, cada punto representa una neurona de un animal, con la media de cada grupo.

4.2. Determinación de los niveles de Fyn en la PFC de ratones hTau luego del tratamiento con miRNA

Una vez realizados los registros comportamentales y electrofisiológicos de los ratones a los 12 meses de edad, los animales fueron sacrificados para determinar el silenciamiento de la kinasa Fyn por el tratamiento con el miRNA. Se disecó y homogenizó la PFC y se procedió a la extracción de proteínas para su posterior análisis por *Western Blot*. Inicialmente, se utilizó un anticuerpo específico contra la kinasa Fyn sobre muestras de proteínas extraídas de la PFC de ratones WT y hTau de 12 meses, tratados con miRNA-Fyn o vector control. Los niveles de proteína Fyn fueron relativizados a la señal de Actina como control de carga de cada animal. No se observaron diferencias en los niveles de expresión de Fyn entre animales WT y hTau tratados con miRNA-Scr. Sin embargo, tampoco se detectó un descenso significativo de los niveles de esta kinasa en los grupos tratados con miRNA-Fyn respecto de los grupos control (Figura 17).

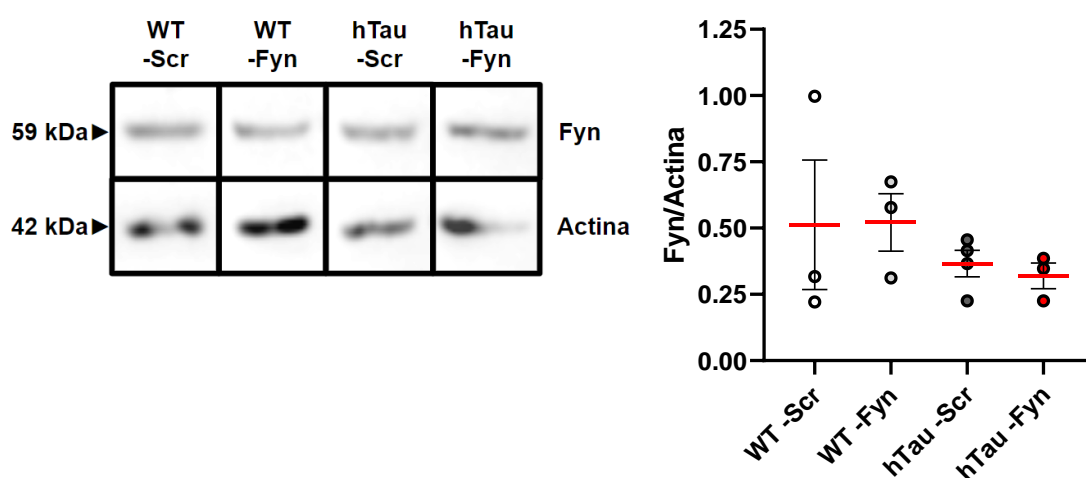


Figura 17. Los cambios en el nivel de expresión de la kinasa Fyn no fueron detectados luego de la inyección del miRNA-Fyn. Se analizó la cantidad de proteína Fyn presente en homogenatos provenientes de la PFC de cada animal por medio de la técnica de *Western Blot*. La señal de Fyn fue relativizada a los niveles de Actina obtenidos para cada ratón. Análisis estadístico: ANOVA de una vía, comparaciones múltiples de Tukey. N = WT -Scr: 3, WT -Fyn: 3, hTau -Scr: 4, hTau -Fyn: 3. No se observaron diferencias significativas entre grupos.

Dado que no se logró medir directamente el silenciamiento de Fyn utilizando un anticuerpo específico contra esta kinasa, se procedió a realizar un análisis indirecto,

detectando la actividad de Fyn en la PFC inyectada con el miRNA-Fyn. Para esto, se utilizó un anticuerpo que reconoce el epítipo Tyr1472 de la subunidad NR2B del receptor NMDA, el cual es fosforilado específicamente por Fyn, tal como fue realizado en un estudio previo de nuestro grupo (Bordone et al., 2021). Los niveles de fosforilación observados fueron relativizados a la señal obtenida proveniente de la cantidad total de receptor NMDA de extractos proteicos de PFC cada animal. Los cocientes que reflejan el grado de fosforilación de los receptores NMDA, producto de la actividad específica de Fyn, no presentaron diferencias entre ratones WT ni hTau, tanto tratados con vectores control como con miRNA-Fyn (Figura 18).

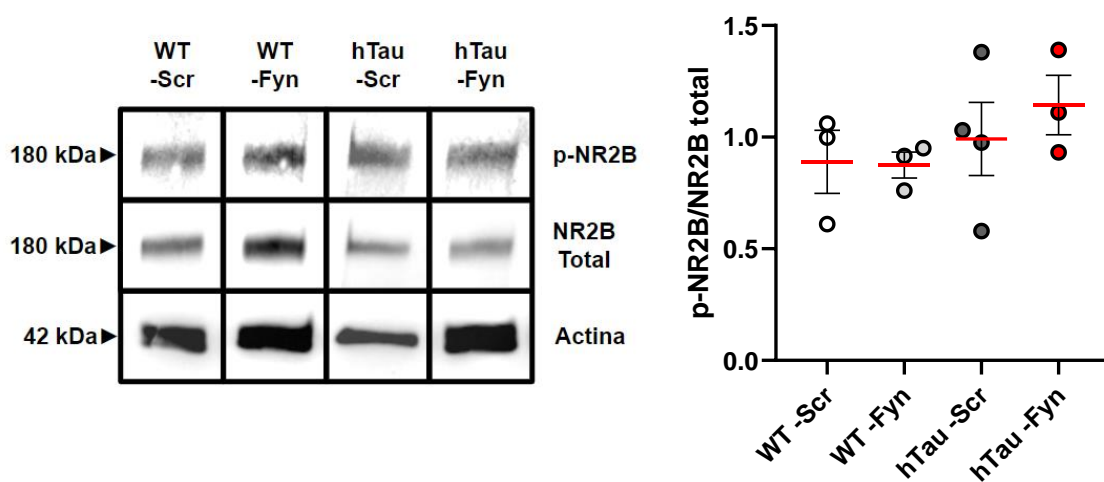


Figura 18. La actividad kinasa de Fyn medida por el estado de fosforilación de NR2B no se modificó tras la inyección de miRNA-Fyn. Los extractos proteicos de la PFC de ratones inyectados con vectores lentivirales portadores de miRNA-Fyn o -Scr (control) se analizaron mediante *Western Blot* para determinar la relación p-NR2B/NR2B total. Análisis estadístico: ANOVA de una vía, comparaciones múltiples de Tukey. N = WT -Scr: 3, WT -Fyn: 3, hTau -Scr: 4, hTau -Fyn: 3. No se observaron diferencias significativas entre grupos.

5. DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Las taupatías son enfermedades neurodegenerativas caracterizadas por alteraciones en la fisiología de la proteína asociada a microtúbulos Tau. Existen múltiples causas que pueden desencadenar la patología, pero todas ellas conllevan la hiperfosforilación patológica de Tau en epítopes específicos, lo cual promueve la disminución de su afinidad por los microtúbulos axonales y su deslocalización al compartimiento somatodendrítico. Allí, Tau se acumula en oligómeros y luego forma agregados insolubles intracelulares llamados ovillos neurofibrilares (NFTs), que son el sello distintivo de las taupatías. Una consecuencia directa de esta deslocalización, es el aumento de la concentración de Tau en las dendritas, por lo cual se incrementa la interacción de Tau con la kinasa Fyn, generando un aumento en la fosforilación de los receptores NMDA, que conduce a un estado de excitotoxicidad (Götz et al., 2010).

Existen taupatías muy estudiadas como la Enfermedad de Alzheimer (EA) y la Demencia Frontotemporal (DFT) donde estos mecanismos patológicos generados por la fisiología aberrante de Tau están bien caracterizados (X. Li et al., 2011), en las cuales se afectan predominantemente ciertas áreas cerebrales que luego están asociadas con los deterioros, ya sea cognitivos, motores, entre otros, que se observan en estos pacientes. En este trabajo en particular, el análisis estuvo dirigido a la corteza prefrontal (PFC), por ser una estructura particularmente afectada en el ratón hTau (Espíndola et al, 2018; Muñiz et al., 2022). En este modelo animal se realizó un silenciamiento específico de la kinasa Fyn en la PFC para evaluar el efecto sobre los fenotipos concomitantes a la acumulación de Tau patológica. El objetivo último de este trabajo fue generar una prueba de concepto que permita desarrollar posibles terapéuticas experimentales dirigidas a reducir los efectos de excitotoxicidad subyacentes a la presencia de patología Tau.

Limitaciones del modelo animal para estudiar taupatías:

En general, los modelos animales utilizados para estudiar patologías asociadas a Tau consisten en la sobreexpresión de alguna de las isoformas normales o mutadas de Tau. Distintos estudios han demostrado que varios de estos modelos recapitulan las características determinantes en las taupatías observadas en los pacientes, como la hiperfosforilación de Tau, formación de NFTs, muerte neuronal y déficits cognitivos. En base a esto, presentan validez para el estudio de los mecanismos que subyacen las taupatías y podrían ser blanco de nuevos

tratamientos dirigidos a la modulación de estos mecanismos (J. Götz & Ittner, 2008; Guo et al., 2017)

En este trabajo se utilizó el modelo de ratón hTau, desarrollado por Andorfer et al., 2003. Este ratón porta un cromosoma artificial (PAC) que expresa el transgén *MAPT* humano completo. Al presentar el gen en su secuencia completa, este cuenta tanto con los intrones como exones, y por lo tanto puede sufrir el *splicing* alternativo que genera el exceso de la isoforma 3R en el cerebro adulto, en contraste con los ratones salvajes donde predomina la isoforma 4R. Este desbalance, causado probablemente por una combinación diferente de elementos regulatorios del *splicing* alternativo en el ratón provoca la acumulación de Tau patológica, hiperfosforilada y deslocalizada al soma (Polydoro et al., 2009). Estos eventos conducen al desarrollo de la patología Tau en este modelo murino, el cual presenta los fenotipos que correlacionan con las taupatías observadas en humanos (Andorfer et al., 2003; Avale et al., 2013). A diferencia de numerosos modelos de taupatías que portan transgenes mutados bajo promotores fuertes y desarrollan patología de manera rápida y muy agresiva (Götz & Götz, 2019; Han et al., 2023), en el modelo hTau el curso temporal del desarrollo de los fenotipos patológicos se presenta progresivamente con la edad, como ocurre en los humanos, lo cual resulta clave para evaluar posibles ventanas de intervención terapéutica en distintos estadios, previos a una neurodegeneración irreversible en individuos seniles. Estas características del ratón hTau lo posicionan como un modelo experimental apropiado para probar estrategias terapéuticas *in vivo* y evaluar las consecuencias moleculares y fenotípicas.

Estudio de los cambios fenotípicos del hTau luego del tratamiento con el miRNA-Fyn

En base al curso temporal de la patología que desarrolla el modelo en estudio, se determinó una edad de intervención terapéutica de 3 meses de edad con fines preventivos, basándose en los ensayos comportamentales y electrofisiológicos de trabajos previos sobre el ratón hTau (Espíndola et al., 2018; Muñiz et al., 2022; Facal et al., 2024). Los animales con los que se trabajó en este estudio fueron evaluados con los distintos ensayos conductuales previo a la inyección de las partículas lentivirales portadores del miRNA-Fyn. En general, los resultados de estos ensayos coincidieron con lo observado en la caracterización previa del modelo, aunque hay que destacar que en estas pruebas los ratones suelen presentar una dispersión considerable, sumado a otros factores aleatorios externos (época del año, operador, etc.) por lo cual, en distintas cohortes de animales, no siempre se presenta el mismo curso temporal del deterioro cognitivo. En este trabajo se observó que, a los 3 meses de edad,

los ratones hTau ya presentaban una falta de preferencia significativa hacia el objeto novedoso en la prueba *NOR* (véase Figura 15), lo que representaría un avance temporal en el deterioro de la memoria de corto plazo, ya que en estudios previos (de nuestro grupo y otros laboratorios) se habían observado estas diferencias entre los 3 y los 6 meses de edad. Teniendo esto en cuenta, se analizaron los cambios comportamentales luego del silenciamiento de Fyn en los ratones hTau de 12 meses de edad, discriminando entre **prevención o rescate** de cada fenotipo según la existencia de diferencias previas a la inyección de los miRNA en los ensayos conductuales entre grupos WT y hTau.

En primer lugar, se evaluó si los signos de hiperlocomoción que presenta el modelo hTau fueron rescatados luego del tratamiento con el miRNA-Fyn, determinado a partir de la prueba *Open Field* en ratones de 12 meses de edad. En los modelos murinos de taupatía se presenta hiperactividad juvenil, principalmente cuando se encuentra afectada la PFC (Khan et al., 2023). En el modelo hTau se ha observado previamente este fenotipo (Damianich et al., 2021; Espíndola et al., 2018; Muñiz et al., 2022). Sin embargo, en animales seniles la hiperactividad disminuye significativamente. A los 12 meses, los animales hTau -Scr presentaron gran dispersión en la distancia total recorrida, sin embargo se observó que este grupo no difería significativamente del grupo hTau -Fyn, si bien estos animales presentaron una menor locomoción promedio. De hecho, el grupo hTau -Fyn tampoco presentó diferencias significativas respecto del grupo WT (véase Figura 12). En base a estos resultados, se podría concluir que el tratamiento con el miRNA-Fyn en la PFC provoca un rescate parcial del fenotipo de hiperlocomoción del ratón hTau a edades tardías luego del silenciamiento de esta kinasa. Sin embargo, es importante destacar que en todos estos ensayos se trata de una única cohorte de ratones inyectados, y no contamos con un número suficiente de animales para establecer un resultado definitivo. Concomitantemente, en la misma prueba se evaluó la desinhibición comportamental del modelo hTau, representado por una mayor actividad en el centro de la arena. Los ratones hTau inyectados con el miRNA-Fyn, también mostraron una prevención parcial de este fenotipo respecto de ratones hTau -Scr y WT (véase Figura 13). De acuerdo con esto, y basándose en estudios previos sobre el modelo hTau en el que se realizó una regulación de la expresión de las isoformas de Tau en núcleos vulnerables (Espíndola et al, 2018, Muñiz et al., 2022), se puede hipotetizar que una reducción en los niveles de Fyn en las neuronas de la PFC que desarrollan patología Tau tiene efecto sobre los comportamientos evaluados en el campo abierto. No obstante, se debe considerar que existen otras áreas del cerebro que están involucradas funcionalmente en estas conductas y también son blanco del deterioro causado por la fisiología aberrante de Tau y Fyn, como por ejemplo el cuerpo estriado y el hipocampo

(Duff et al., 2000). Al no estar interviniendo en estos núcleos, es probable que su funcionalidad continúe alterada y afectando los fenotipos de los ratones envejecidos en los ensayos comportamentales.

Para completar el análisis del fenotipo de desinhibición del modelo hTau, realizamos la prueba del laberinto en cruz elevado. En edades tempranas, previo a la inyección del miRNA, se observó una preferencia mayor de los ratones hTau por los brazos abiertos respecto de los WT, en tanto que a los 12 meses de edad no se observaron diferencias significativas entre los ratones WT respecto de hTau, tanto Scr- como Fyn- (véase Figura 14), consistente con los estudios previos de caracterización temporal de los fenotipos del modelo (Muñiz et al., 2022). Tal como ha sido publicado por nuestro grupo, estas diferencias podrían indicar que la desinhibición comportamental (reflejada por la exploración de los ambientes “peligrosos”) es un fenotipo temprano del modelo hTau, que desaparece en animales envejecidos. Los estudios de nuestro laboratorio (Facal et al., 2024) sugieren además que este fenotipo es dependiente de disfunción cortical en los inicios de la patología, de manera similar a lo que ocurre en pacientes con demencia frontotemporal (J. Götz et al., 2019). Cabe destacar que en trabajos previos en los que se utilizaron herramientas moleculares para modificar la expresión relativa de las isoformas de Tau en la PFC y cuerpo estriado, tampoco se observaron variaciones a edades tardías en el laberinto en cruz elevado (Espíndola et al., 2018; Damianich et al., 2021). En conjunto, en base a los resultados previos del laboratorio y de este trabajo de tesina, concluimos que el laberinto elevado en cruz es un test robusto para determinar disfunción de la PFC en modelos de taupatías en estados tempranos. Es interesante destacar asimismo que la deslocalización de Tau ocurre tempranamente en este modelo, al igual que su hiperfosforilación en epítopes patológicos (Muñiz et al., 2022; Facal et al., 2024), por lo cual sería interesante evaluar si una reducción de la kinasa Fyn en edades previas (2 meses de edad por ejemplo) podría ejercer un efecto sobre este fenotipo en animales de 3 meses de edad.

Finalmente, se analizó el déficit cognitivo utilizando la prueba de reconocimiento de objeto novedoso, utilizando un paradigma que evalúa principalmente la memoria de corto plazo, dependiente de la PFC (Morici et al., 2015), que está severamente afectada en ratones hTau (Espíndola et al., 2018; Muñiz et al., 2022). Curiosamente, a los 3 meses de edad, los ratones hTau mostraron un déficit del *NOR* evidenciado por un índice de discriminación cercano al 55 %. Es curioso que en nuestros estudios previos (Muñiz et al., 2022; Facal et al., 2024) a esta edad el déficit en el ensayo de *NOR* no resultaba tan severo, lo cual indica que en esta cohorte de ratones hubo un inicio más temprano de este fenotipo. Asimismo, resultó

sorprendente que, a los 12 meses de edad, los ratones hTau -Fyn mostraron un rendimiento similar a los WT en discriminar el objeto novedoso, demostrando una recuperación notable en esta tarea frente a los ratones hTau tratados con el miRNA-Scr, en los cuales no se observó una preferencia entre objetos (véase Figura 15). Esto sugiere que, la reducción localizada de Fyn en la PFC resulta eficiente para revertir el déficit cognitivo en el ensayo de *NOR*. Si bien se trata de una sola cohorte analizada y un número bajo de ratones, este resultado es muy promisorio, dado que postula a Fyn como un potencial blanco terapéutico en las taupatías.

Como objetivo a corto plazo para poder reforzar la fiabilidad de estos resultados se busca aumentar el número de ratones destinados a la inyección de los miRNAs, con el fin de que las pruebas estadísticas realizadas entre los grupos experimentales que participan en los ensayos comportamentales y los subsiguientes análisis sean más robustas.

Luego, basándonos en la hipótesis de trabajo y en el mecanismo que involucra la asociación incrementada entre Tau y Fyn en la post sinapsis relacionada a la excitotoxicidad mediada por los receptores NMDA, postulamos que el silenciamiento de la kinasa en las neuronas de la PFC tendría como consecuencia una disminución en los niveles de actividad neuronal, reflejada en su tasa de disparo. Con esta premisa, se realizaron registros electrofisiológicos *in vivo* de neuronas glutamatérgicas putativas de la PFC de ratones de 12 meses de edad de los distintos grupos experimentales, posterior a la inyección de los miRNAs (los registros fueron llevados a cabo por el Dr. Ezequiel Pereyra, becario postdoctoral de nuestro grupo). Se observó que las neuronas de los ratones hTau -Scr presentaban una tasa de disparo significativamente mayor a las de los animales WT, tal como se describió anteriormente en este modelo, mientras que los ratones hTau inyectados con el miRNA-Fyn vieron disminuida levemente su actividad neuronal, al punto de que la tasa de disparo media de este grupo se situó entre los valores medios de los otros dos grupos, sin diferir significativamente con ellos (véase Figura 16). En cuanto a las neuronas gabaérgicas putativas de la PFC, no se observaron cambios en el curso temporal de la tasa de disparo en el modelo hTau respecto del WT (datos no mostrados), fortaleciendo la idea de una vulnerabilidad selectiva de la patología Tau afectando principalmente a las neuronas glutamatérgicas. Estos resultados se alinean con la hipótesis surgida a partir de trabajos previos en los que se demostró que el *knockout* de Tau en ratones salvajes tiende a disminuir la frecuencia de disparo de neuronas piramidales corticales (Chang et al., 2021), similar a lo observado en un estudio recientemente publicado por nuestro laboratorio donde el tratamiento con un miRNA-Tau en el modelo hTau redujo la actividad de las neuronas piramidales de la PFC, sin afectar significativamente a las interneuronas (Facal et al., 2024). En base a estas observaciones, se

puede hipotetizar que los fenotipos de hiperexcitabilidad neuronal observados en este modelo se encuentran asociados fundamentalmente a la disfunción de las neuronas piramidales generada por la patología Tau, donde su rol como regulador de la funcionalidad de la kinasa Fyn estaría representando una parcialidad del fenotipo excitotóxico observado en el modelo hTau. Ya que estos resultados no evidencian desde una perspectiva mecanística la asociación de Fyn con la sobreestimulación de la actividad neuronal en el marco de la patología Tau, se propone evaluar otros marcadores relacionados a la excitotoxicidad observada en el modelo hTau. Con el objetivo de continuar dilucidando los mecanismos asociados a la vulnerabilidad selectiva en el marco de las taupatías, nuestro laboratorio está desarrollando actualmente una herramienta que permite expresar alguno de estos miRNAs específicamente en neuronas glutamatérgicas o gabaérgicas, lo que permitiría esclarecer cómo la patología Tau afecta diferencialmente a estos tipos neuronales en distintas regiones del cerebro.

En base a estos resultados es posible concluir que el silenciamiento de la kinasa Fyn en neuronas de la PFC de ratones hTau a los 3 meses de edad provoca una prevención de los signos de deterioro prefrontal, evaluado particularmente en la prueba *NOR*, y que esta prevención es independiente de la tasa de disparo de las neuronas piramidales. Sin embargo, cabe destacar que se han estudiado diversos mecanismos por los cuales las especies patológicas de Tau pueden desencadenar una excitabilidad neuronal incrementada, como el control de la compartimentalización sináptica de otros componentes de señalización (Bi et al., 2017), la perturbación de la actividad mitocondrial y su concomitante efecto en la fisiología neuronal (Bal-Price & Brown, 2001), entre otros. A partir de estas observaciones, es posible explicar la falta de efecto del silenciamiento de Fyn sobre la tasa de disparo de las neuronas piramidales de la PFC del modelo hTau, dado que al no revertir la actividad aberrante de Tau asociada a los mecanismos mencionados, probablemente estos continúen siendo la causa subyacente a los signos de hiperactividad registrados en estos ratones.

Análisis molecular del silenciamiento de Fyn

Al finalizar los estudios comportamentales y electrofisiológicos de los ratones de 12 meses de edad, se procedió a la determinación de los niveles proteicos de Fyn en la PFC a través de un análisis por *Western Blot*, luego de la disección del cerebro y extracción de proteínas. Al intentar medir si el miRNA-Fyn había tenido un efecto sobre la expresión de la kinasa, no se logró evidenciar un descenso de sus niveles proteicos entre muestras provenientes de ratones WT y hTau, inyectados con este o el miRNA control (véase Figura 17).

Una posible explicación para este resultado reside en que los miRNA se expresan únicamente en neuronas (por estar bajo el promotor de Sinapsina), y la expresión de Fyn ocurre también en otras células no neuronales del cerebro, como astrocitos, oligodendrocitos y microglia (Panicker et al., 2015). La disminución de Fyn entonces podría no reflejarse en el *Western Blot* por estar presente la proteína proveniente de los otros tipos celulares. Es por eso que se decidió realizar una medida indirecta de los niveles de Fyn en base a su actividad, analizando el grado de fosforilación de la subunidad NR2B de los receptores NMDA, utilizando un anticuerpo específico contra el residuo fosforilado por esta kinasa. Sin embargo los resultados obtenidos tampoco verifican un silenciamiento exitoso de la expresión de Fyn, además de no encontrar las diferencias esperadas en los ratones hTau, que se esperaba que presentaran un grado de fosforilación de NR2B mayor que los del grupo WT (véase Figura 18). Existen estudios donde también se encontraron receptores NMDA en astrocitos (Skowrońska et al., 2019), oligodendrocitos (Káradóttir et al., 2005) y microglia (Kaindl et al., 2012), lo que podría estar interfiriendo de la misma forma en la determinación del efecto del miRNA-Fyn. Con estos resultados moleculares, no es posible concluir que el miRNA-Fyn tuviese un efecto certero sobre su expresión en la PFC. Sin embargo, este miRNA resultó eficiente en ensayos *in vitro* e *in vivo* realizados previamente en el cuerpo estriado (Bordone et al., 2021). Esta discrepancia podría deberse por ejemplo a diferencias en la estructura inyectada, problemas técnicos durante la inyección o en la detección de la fosforilación de NR2B. Cabe destacar que los anticuerpos contra Fyn y p-NR2B son de naturaleza policlonal, los cuales presentan una alta inespecificidad, dificultando la observación de una señal clara de la banda específica en el *Western Blot*, por lo que sería oportuno utilizar otros anticuerpos más específicos. Otro de los objetivos propuestos para mejorar la detección es realizar un fraccionamiento subcelular a partir del homogenato de la PFC para aislar y enriquecer la fracción sinaptosomal, la cual contiene las terminales sinápticas y las proteínas localizadas en la densidad post sináptica. Esto lograría evitar la presencia de Fyn y receptores NMDA provenientes de células no neuronales, lo que podría generar una lectura más específica y eficiente de la regulación de la expresión de la kinasa.

Adicionalmente, otro objetivo que se propone para caracterizar cómo afecta el silenciamiento de Fyn a la patología Tau consiste en estudiar los niveles de las especies patológicas de Tau en este modelo murino, por ejemplo los NFTs o formas hiperfosforiladas de Tau por medio de técnicas como inmunohistoquímica o *Western Blot* a partir de muestras proteicas extraídas utilizando el detergente Sarkosyl para lograr la purificación de estas especies altamente insolubles. Esta información sería muy útil para darle una causalidad a los

cambios fenotípicos observados previamente. En un estudio previo donde se realizó el *knockout* de Fyn en ratones que expresan una forma mutante de Tau asociada a la DFT, se observó una reducción casi total de los NFTs, junto con una gran disminución de las formas hiperfosforiladas e insolubles de Tau en distintas zonas corticales (Briner et al., 2020). Estos hallazgos logran fortalecer la hipótesis de que Fyn puede ser considerado un blanco terapéutico plausible para los distintos procesos neurodegenerativos asociados a la patología Tau.

Perspectivas del miRNA-Fyn como potencial estrategia terapéutica

Aunque este trabajo carece de una determinación certera de la efectividad del miRNA en lograr un descenso de los niveles de Fyn en las neuronas de la PFC, las mejoras fenotípicas observadas en los ratones hTau sugieren un potencial beneficio terapéutico basado en la regulación de la expresión de la kinasa, posicionando a esta herramienta versátil como una terapia génica plausible para las taupatías humanas. Un estudio previo basado en ratones transgénicos que expresan una variante mutante de Tau vinculada a la DFT determinó un gran descenso de las formas hiperfosforiladas de Tau y NFTs frente al *knockout* de Fyn (Briner et al., 2020). Estas observaciones ubican a Fyn como un potencial blanco terapéutico.

Es de vital importancia recalcar que, así como la patología Tau influye en varios aspectos de la fisiología neuronal, resulta imperioso idear enfoques terapéuticos multifactoriales adecuados a cada condición, con el fin de lograr un descenso eficiente del proceso neurodegenerativo, minimizando los efectos adversos.

En ciertos aspectos, la estrategia del miRNA-Fyn logró revertir los signos de deterioro cognitivo. Basándose en la hipótesis de trabajo que postula a esta intervención como preventiva, esto requeriría la existencia de diagnósticos clínicos previos a la aparición de los déficits, con el fin de determinar fenotipos tempranos asociados a la patología. En la actualidad existen distintos análisis de imágenes y biomarcadores capaces de determinar el inicio de ciertas demencias, a partir de imágenes de resonancia magnética (MRI) o mediante tomografía de emisión de positrones (PET) cerebral (Russo et al., 2016; Schöll et al., 2019), siendo esta última técnica actualmente utilizada en nuestro modelo hTau para caracterizar y estudiar los cambios en la actividad neuronal de la PFC y el cuerpo estriado, lo cual podría ser un estudio complementario frente a las alteraciones que generan la patología Tau vía Fyn sobre la fisiología neuronal. Lamentablemente, durante la ventana temporal en la cual se

logran detectar signos clínicos a partir de estas metodologías, los pacientes ya presentan un desarrollo avanzado de la patología, lo cual remarca la urgencia de hallar marcadores clínicos de disfunción precoz mediante técnicas de detección no invasivas para poder implementar terapéuticas tempranas y efectivas.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andorfer, C., Kress, Y., Espinoza, M., De Silva, R., Tucker, K. L., Barde, Y., Duff, K., & Davies, P. (2003). Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms. *Journal of Neurochemistry*, 86(3), 582–590. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01879.x>
- Andreadis, A. (2005). Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1739(2–3), 91–103. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.08.010>
- Arendt, T., Stieler, J. T., & Holzer, M. (2016). Tau and tauopathies. *Brain Research Bulletin*, 126, 238–292. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.08.018>
- Arriagada, P. V., Growdon, J. H., Hedley-Whyte, E. T., & Hyman, B. T. (1992). Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology*, 42(3), 631–631. <https://doi.org/10.1212/WNL.42.3.631>
- Avale, M. E., Rodríguez-Martín, T., & Gallo, J.-M. (2013). Trans-splicing correction of tau isoform imbalance in a mouse model of tau mis-splicing. *Human Molecular Genetics*, 22(13), 2603–2611. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt108>
- Bal-Price, A., & Brown, G. C. (2001). Inflammatory Neurodegeneration Mediated by Nitric Oxide from Activated Glia-Inhibiting Neuronal Respiration, Causing Glutamate Release and Excitotoxicity. *The Journal of Neuroscience*, 21(17), 6480–6491. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-17-06480.2001>
- Barthó, P., Hirase, H., Monconduit, L., Zugaro, M., Harris, K. D., & Buzsáki, G. (2004). Characterization of Neocortical Principal Cells and Interneurons by Network Interactions and Extracellular Features. *Journal of Neurophysiology*, 92(1), 600–608. <https://doi.org/10.1152/jn.01170.2003>
- Berger, Z., Roder, H., Hanna, A., Carlson, A., Rangachari, V., Yue, M., Wszolek, Z., Ashe, K., Knight, J., Dickson, D., Andorfer, C., Rosenberry, T. L., Lewis, J., Hutton, M., & Janus, C. (2007). Accumulation of Pathological Tau Species and Memory Loss in a Conditional Model of Tauopathy. *The Journal of Neuroscience*, 27(14), 3650–3662. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0587-07.2007>
- Bhaskar, K., Hobbs, G. A., Yen, S.-H., & Lee, G. (2010). Tyrosine phosphorylation of tau accompanies disease progression in transgenic mouse models of tauopathy. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 36(6), 462–477. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2010.01103.x>
- Bi, M., Gladbach, A., Van Eersel, J., Ittner, A., Przybyla, M., Van Hummel, A., Chua, S. W., Hoven, J. Van Der, Lee, W. S., Müller, J., Parmar, J., Jonquieres, G. Von, Steffen, H., Guccione, E., Fath, T., Housley, G. D., Klugmann, M., Ke, Y. D., & Ittner, L. M. (2017).

- Tau exacerbates excitotoxic brain damage in an animal model of stroke. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-017-00618-0>
- Bodea, L., Eckert, A., Ittner, L. M., Piguet, O., & Götz, J. (2016). Tau physiology and pathomechanisms in frontotemporal lobar degeneration. *Journal of Neurochemistry*, 138(S1), 71–94. <https://doi.org/10.1111/jnc.13600>
- Bordone, M. P., Damianich, A., Bernardi, A., Eidelman, T., Sanz-Blasco, S., Gershanik, O. S., Avale, M. E., & Ferrario, J. E. (2021). Fyn Knock-Down Prevents Levodopa-Induced Dyskinesia in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *Eneuro*, 8(4), ENEURO.0559-20.2021. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0559-20.2021>
- Brandt, R., Léger, J., & Lee, G. (1995). Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *The Journal of Cell Biology*, 131(5), 1327–1340. <https://doi.org/10.1083/jcb.131.5.1327>
- Brandt, R., Trushina, N. I., & Bakota, L. (2020). Much More Than a Cytoskeletal Protein: Physiological and Pathological Functions of the Non-microtubule Binding Region of Tau. *Frontiers in Neurology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.590059>
- Briner, A., Götz, J., & Polanco, J. C. (2020). Fyn Kinase Controls Tau Aggregation In Vivo. *Cell Reports*, 32(7). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108045>
- Buée, L., Troquier, L., Burnouf, S., Belarbi, K., Van der Jeugd, A., Ahmed, T., Fernandez-Gomez, F., Caillierez, R., Grosjean, M.-E., Begard, S., Barbot, B., Demeyer, D., Obriot, H., Brion, I., Buée-Scherrer, V., Maurage, C.-A., Balschun, D., D'Hooge, R., Hamdane, M., ... Sergeant, N. (2010). From tau phosphorylation to tau aggregation: what about neuronal death? *Biochemical Society Transactions*, 38(4), 967–972. <https://doi.org/10.1042/BST0380967>
- Cetin, A., Komai, S., Eliava, M., Seeburg, P. H., & Osten, P. (2006). Stereotaxic gene delivery in the rodent brain. *Nature Protocols*, 1(6), 3166–3173. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.450>
- Chang, C.-W., Evans, M. D., Yu, X., Yu, G.-Q., & Mucke, L. (2021). Tau reduction affects excitatory and inhibitory neurons differently, reduces excitation/inhibition ratios, and counteracts network hypersynchrony. *Cell Reports*, 37(3), 109855. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109855>
- Chen, J., Kanai, Y., Cowan, N. J., & Hirokawa, N. (1992). Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature*, 360(6405), 674–677. <https://doi.org/10.1038/360674a0>
- Cleveland, D. W., Hwo, S.-Y., & Kirschner, M. W. (1977). Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *Journal of Molecular Biology*, 116(2), 207–225. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(77\)90213-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(77)90213-3)

- Colin, M., Dujardin, S., Schraen-Maschke, S., Meno-Tetang, G., Duyckaerts, C., Courade, J.-P., & Buée, L. (2020). From the prion-like propagation hypothesis to therapeutic strategies of anti-tau immunotherapy. *Acta Neuropathologica*, 139(1), 3–25. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02087-9>
- Combs, B., Mueller, R. L., Morfini, G., Brady, S. T., & Kanaan, N. M. (2019). *Tau and Axonal Transport Misregulation in Tauopathies* (pp. 81–95). https://doi.org/10.1007/978-981-32-9358-8_7
- Damianich, A., Facal, C. L., Muñiz, J. A., Mininni, C., Soiza-Reilly, M., De León, M. P., Urrutia, L., Falasco, G., Ferrario, J. E., & Avale, M. E. (2021). Tau mis-splicing correlates with motor impairments and striatal dysfunction in a model of tauopathy. *Brain : A Journal of Neurology*, 144(8), 2302–2309. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWAB130>
- de Almeida, J., Jourdan, I., Murer, M. G., & Belforte, J. E. (2013). Refinement of Neuronal Synchronization with Gamma Oscillations in the Medial Prefrontal Cortex after Adolescence. *PLoS ONE*, 8(4), e62978. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062978>
- Di Forti, M., Lappin, J. M., & Murray, R. M. (2007). Risk factors for schizophrenia — All roads lead to dopamine. *European Neuropsychopharmacology*, 17, S101–S107. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2007.02.005>
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., & Traynelis, S. F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological Reviews*, 51(1), 7–61.
- Duff, K., Knight, H., Refolo, L. M., Sanders, S., Yu, X., Picciano, M., Malester, B., Hutton, M., Adamson, J., Goedert, M., Burki, K., & Davies, P. (2000). Characterization of Pathology in Transgenic Mice Over-Expressing Human Genomic and cDNA Tau Transgenes. *Neurobiology of Disease*, 7(2), 87–98. <https://doi.org/10.1006/nbdi.1999.0279>
- Espíndola, S. L., Damianich, A., Alvarez, R. J., Sartor, M., Belforte, J. E., Ferrario, J. E., Gallo, J.-M., & Avale, M. E. (2018). Modulation of Tau Isoforms Imbalance Precludes Tau Pathology and Cognitive Decline in a Mouse Model of Tauopathy. *Cell Reports*, 23(3), 709–715. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.079>
- Facal, C. L., Bessone, I. F., Muñiz, J. A., Pereyra, A. E., Pedroncini, O., Páez-Paz, I., Clerici-Delville, R., Arnaiz, C., Urrutia, L., Falasco, G., Argañaraz, C. V., Saez, T., Marin-Burgin, A., Soiza-Reilly, M., Falzone, T., & Avale, M. E. (2024). Tau reduction with artificial microRNAs modulates neuronal physiology and improves tauopathy phenotypes in mice. *Molecular Therapy*. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2024.01.033>
- Fu, H., Possenti, A., Freer, R., Nakano, Y., Hernandez Villegas, N. C., Tang, M., Cauhy, P. V. M., Lassus, B. A., Chen, S., Fowler, S. L., Figueroa, H. Y., Huey, E. D., Johnson, G. V. W., Vendruscolo, M., & Duff, K. E. (2019). A tau homeostasis signature is linked with

- the cellular and regional vulnerability of excitatory neurons to tau pathology. *Nature Neuroscience*, 22(1), 47–56. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0298-7>
- Fu, H., Rodriguez, G. A., Herman, M., Emrani, S., Nahmani, E., Barrett, G., Figueroa, H. Y., Goldberg, E., Hussaini, S. A., & Duff, K. E. (2017). Tau Pathology Induces Excitatory Neuron Loss, Grid Cell Dysfunction, and Spatial Memory Deficits Reminiscent of Early Alzheimer's Disease. *Neuron*, 93(3), 533–541.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.023>
- Gauthier-Kemper, A., Weissmann, C., Golovyashkina, N., Sebö-Lemke, Z., Drewes, G., Gerke, V., Heinisch, J. J., & Brandt, R. (2011). The frontotemporal dementia mutation R406W blocks tau's interaction with the membrane in an annexin A2-dependent manner. *Journal of Cell Biology*, 192(4), 647–661. <https://doi.org/10.1083/jcb.201007161>
- Goedert, M., Eisenberg, D. S., & Crowther, R. A. (2017). Propagation of Tau Aggregates and Neurodegeneration. *Annual Review of Neuroscience*, 40, 189–210. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-NEURO-072116-031153>
- Goedert, M., Spillantini, M. G., Jakes, R., Rutherford, D., & Crowther, R. A. (1989). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron*, 3(4), 519–526. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90210-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90210-9)
- Götz, J., Halliday, G., & Nisbet, R. M. (2019). Molecular Pathogenesis of the Tauopathies. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 14(1), 239–261. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012936>
- Götz, J., & Ittner, L. M. (2008). Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(7), 532–544. <https://doi.org/10.1038/nrn2420>
- Götz, J. J., & Götz, J. (2019). *Experimental Models of Tauopathy – From Mechanisms to Therapies* (pp. 381–391). https://doi.org/10.1007/978-981-32-9358-8_28
- Guo, T., Noble, W., & Hanger, D. P. (2017). Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathologica*, 133(5), 665–704. <https://doi.org/10.1007/S00401-017-1707-9>
- Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(8), 509–524. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>
- Han, Z. Z., Fleet, A., & Larrieu, D. (2023). Can accelerated ageing models inform us on age-related tauopathies? *Aging Cell*, 22(5). <https://doi.org/10.1111/accel.13830>
- He, H. J., Wang, X. S., Pan, R., Wang, D. L., Liu, M. N., & He, R. Q. (2009). The proline-rich domain of tau plays a role in interactions with actin. *BMC Cell Biology*, 10(1), 81. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-10-81>

- Hill, E., Karikari, T. K., Lantero-Rodriguez, J., Zetterberg, H., Blennow, K., Richardson, M. J., & Wall, M. J. (2021). Truncating tau reveals different pathophysiological actions of oligomers in single neurons. *Communications Biology*, 4(1), 1265. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02791-x>
- Ishihara, T., Hong, M., Zhang, B., Nakagawa, Y., Lee, M. K., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M.-Y. (1999). Age-Dependent Emergence and Progression of a Tauopathy in Transgenic Mice Overexpressing the Shortest Human Tau Isoform. *Neuron*, 24(3), 751–762. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81127-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81127-7)
- Ittner, A., & Ittner, L. M. (2018). Dendritic Tau in Alzheimer's Disease. *Neuron*, 99(1), 13–27. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2018.06.003>
- Ittner, L. M., & Götz, J. (2011). Amyloid- β and tau — a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(2), 67–72. <https://doi.org/10.1038/nrn2967>
- Ittner, L. M., Ke, Y. D., Delerue, F., Bi, M., Gladbach, A., van Eersel, J., Wölfling, H., Chieng, B. C., Christie, M. J., Napier, I. A., Eckert, A., Staufenbiel, M., Hardeman, E., & Götz, J. (2010). Dendritic Function of Tau Mediates Amyloid- β Toxicity in Alzheimer's Disease Mouse Models. *Cell*, 142(3), 387–397. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.036>
- Jeganathan, S., von Bergen, M., Bruchl, H., Steinhoff, H.-J., & Mandelkow, E. (2006). Global Hairpin Folding of Tau in Solution. *Biochemistry*, 45(7), 2283–2293. <https://doi.org/10.1021/bi0521543>
- Johnson, G. V. W., & Stoothoff, W. H. (2004). Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *Journal of Cell Science*, 117(24), 5721–5729. <https://doi.org/10.1242/jcs.01558>
- Kaindl, A. M., Degos, V., Peineau, S., Gouadon, E., Chhor, V., Loron, G., Le Charpentier, T., Josserand, J., Ali, C., Vivien, D., Collingridge, G. L., Lombet, A., Issa, L., Rene, F., Loeffler, J., Kavelaars, A., Verney, C., Mantz, J., & Gressens, P. (2012). Activation of microglial N-methyl-D-aspartate receptors triggers inflammation and neuronal cell death in the developing and mature brain. *Annals of Neurology*, 72(4), 536–549. <https://doi.org/10.1002/ana.23626>
- Kapur, S. (2004). How antipsychotics become anti-‘psychotic’ – from dopamine to salience to psychosis. *Trends in Pharmacological Sciences*, 25(8), 402–406. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.06.005>
- Káradóttir, R., Cavelier, P., Bergersen, L. H., & Attwell, D. (2005). NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia. *Nature*, 438(7071), 1162–1166. <https://doi.org/10.1038/nature04302>

- Kuret, J., Congdon, E. E., Li, G., Yin, H., Yu, X., & Zhong, Q. (2005). Evaluating triggers and enhancers of tau fibrillization. *Microscopy Research and Technique*, 67(3–4), 141–155. <https://doi.org/10.1002/jemt.20187>
- Lee, G., Neve, R. L., & Kosik, K. S. (1989). The microtubule binding domain of tau protein. *Neuron*, 2(6), 1615–1624. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90050-0](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90050-0)
- Lee, H., Perry, G., Moreira, P. I., Garrett, M. R., Liu, Q., Zhu, X., Takeda, A., Nunomura, A., & Smith, M. A. (2005). Tau phosphorylation in Alzheimer's disease: pathogen or protector? *Trends in Molecular Medicine*, 11(4), 164–169. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2005.02.008>
- Lee, V. M.-Y., Goedert, M., & Trojanowski, J. Q. (2001). Neurodegenerative Tauopathies. *Annual Review of Neuroscience*, 24(1), 1121–1159. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.1121>
- Leger, M., Quiedeville, A., Bouet, V., Haelewyn, B., Boulouard, M., Schumann-Bard, P., & Freret, T. (2013). Object recognition test in mice. *Nature Protocols*, 8(12), 2531–2537. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.155>
- Li, C., & Götz, J. (2017). Somatodendritic accumulation of Tau in Alzheimer's disease is promoted by Fyn-mediated local protein translation. *The EMBO Journal*, 36(21), 3120–3138. <https://doi.org/10.15252/embj.201797724>
- Li, X., Kumar, Y., Zempel, H., Mandelkow, E.-M., Biernat, J., & Mandelkow, E. (2011). Novel diffusion barrier for axonal retention of Tau in neurons and its failure in neurodegeneration. *The EMBO Journal*, 30(23), 4825–4837. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.376>
- Melone, M. A. B., Valentino, A., Margarucci, S., Galderisi, U., Giordano, A., & Peluso, G. (2018). The carnitine system and cancer metabolic plasticity. *Cell Death & Disease*, 9(2), 228. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0313-7>
- Méphon-Gaspard, A., Boca, M., Pioche-Durieu, C., Desforges, B., Burgo, A., Hamon, L., Piétrement, O., & Pastré, D. (2016). Role of tau in the spatial organization of axonal microtubules: keeping parallel microtubules evenly distributed despite macromolecular crowding. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(19), 3745–3760. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2216-z>
- Mietelska-Porowska, A., Wasik, U., Goras, M., Filipek, A., & Niewiadomska, G. (2014). Tau Protein Modifications and Interactions: Their Role in Function and Dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(3), 4671–4713. <https://doi.org/10.3390/ijms15034671>
- Miyamoto, T., Stein, L., Thomas, R., Djukic, B., Taneja, P., Knox, J., Vossel, K., & Mucke, L. (2017). Phosphorylation of tau at Y18, but not tau-fyn binding, is required for tau to modulate NMDA receptor-dependent excitotoxicity in primary neuronal culture.

- Molecular Neurodegeneration*, 12(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0176-x>
- Morici, J. F., Bekinschtein, P., & Weisstaub, N. V. (2015). Medial prefrontal cortex role in recognition memory in rodents. *Behavioural Brain Research*, 292, 241–251. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.06.030>
- Morris, M., Maeda, S., Vossel, K., & Mucke, L. (2011). The Many Faces of Tau. *Neuron*, 70(3), 410–426. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.04.009>
- Muñiz, J. A., Facal, C. L., Urrutia, L., Clerici-Delville, R., Damianich, A., Ferrario, J. E., Falasco, G., & Avale, M. E. (2022). SMaRT modulation of tau isoforms rescues cognitive and motor impairments in a preclinical model of tauopathy. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.951384>
- Nakazawa, T., Komai, S., Tezuka, T., Hisatsune, C., Umemori, H., Semba, K., Mishina, M., Manabe, T., & Yamamoto, T. (2001). Characterization of Fyn-mediated Tyrosine Phosphorylation Sites on GluR2 (NR2B) Subunit of the N-Methyl-d-aspartate Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 276(1), 693–699. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008085200>
- Niblock, M., & Gallo, J.-M. (2012). Tau alternative splicing in familial and sporadic tauopathies. *Biochemical Society Transactions*, 40(4), 677–680. <https://doi.org/10.1042/BST20120091>
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>
- Panicker, N., Saminathan, H., Jin, H., Neal, M., Harischandra, D. S., Gordon, R., Kanthasamy, K., Lawana, V., Sarkar, S., Luo, J., Anantharam, V., Kanthasamy, A. G., & Kanthasamy, A. (2015). Fyn Kinase Regulates Microglial Neuroinflammatory Responses in Cell Culture and Animal Models of Parkinson's Disease. *Journal of Neuroscience*, 35(27), 10058–10077. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0302-15.2015>
- Parsons, S. J., & Parsons, J. T. (2004). Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene*, 23(48), 7906–7909. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208160>
- Polydoro, M., Acker, C. M., Duff, K., Castillo, P. E., & Davies, P. (2009). Age-Dependent Impairment of Cognitive and Synaptic Function in the htau Mouse Model of Tau Pathology. *The Journal of Neuroscience*, 29(34), 10741–10749. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1065-09.2009>
- Rösler, T. W., Tayanian Marvian, A., Brendel, M., Nykänen, N.-P., Höllerhage, M., Schwarz, S. C., Hopfner, F., Koeglsperger, T., Respondek, G., Schwyer, K., Levin, J., Villemagne, V. L., Barthel, H., Sabri, O., Müller, U., Meissner, W. G., Kovacs, G. G., &

- Höglinger, G. U. (2019). Four-repeat tauopathies. *Progress in Neurobiology*, 180, 101644. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2019.101644>
- Ross, C. A., & Poirier, M. A. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature Medicine*, 10(S7), S10–S17. <https://doi.org/10.1038/nm1066>
- Russo, A., Jayakar, P., Lallas, M., Miller, I., Hyslop, A., Korman, B., Dunoyer, C., Resnick, T., & Duchowny, M. (2016). The diagnostic utility of 3D electroencephalography source imaging in pediatric epilepsy surgery. *Epilepsia*, 57(1), 24–31. <https://doi.org/10.1111/epi.13228>
- Salter, M. W., & Kalia, L. V. (2004). Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(4), 317–328. <https://doi.org/10.1038/nrn1368>
- Schöll, M., Maass, A., Mattsson, N., Ashton, N. J., Blennow, K., Zetterberg, H., & Jagust, W. (2019). Biomarkers for tau pathology. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 97, 18–33. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2018.12.001>
- Sergeant, N., Delacourte, A., & Buée, L. (2005). Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1739(2–3), 179–197. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.06.020>
- Skowrońska, K., Obara-Michlewska, M., Zielińska, M., & Albrecht, J. (2019). NMDA Receptors in Astrocytes: In Search for Roles in Neurotransmission and Astrocytic Homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 309. <https://doi.org/10.3390/ijms20020309>
- Spillantini, M. G., & Goedert, M. (2013). Tau pathology and neurodegeneration. *The Lancet Neurology*, 12(6), 609–622. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70090-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70090-5)
- Wang, J.-Z., & Liu, F. (2008). Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons. *Progress in Neurobiology*, 85(2), 148–175. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2008.03.002>
- Wu, J. W., Hussaini, S. A., Bastille, I. M., Rodriguez, G. A., Mrejeru, A., Rilett, K., Sanders, D. W., Cook, C., Fu, H., Boonen, R. A. C. M., Herman, M., Nahmani, E., Emrani, S., Figueroa, Y. H., Diamond, M. I., Clelland, C. L., Wray, S., & Duff, K. E. (2016). Neuronal activity enhances tau propagation and tau pathology in vivo. *Nature Neuroscience*, 19(8), 1085–1092. <https://doi.org/10.1038/nn.4328>
- Zempel, H., & Mandelkow, E. (2014). Lost after translation: missorting of Tau protein and consequences for Alzheimer disease. *Trends in Neurosciences*, 37(12), 721–732. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.08.004>