

Tesis Doctoral

Estudio de la toxicidad diferencial causada por péptidos amiloides asociados a enfermedades neurodegenerativas en *Drosophila* *melanogaster*

Marcora, María Silvina

2015-03-10

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Marcora, María Silvina. (2015-03-10). Estudio de la toxicidad diferencial causada por péptidos amiloides asociados a enfermedades neurodegenerativas en *Drosophila melanogaster*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Marcora, María Silvina. "Estudio de la toxicidad diferencial causada por péptidos amiloides asociados a enfermedades neurodegenerativas en *Drosophila melanogaster*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-03-10.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Estudio de la toxicidad diferencial causada por péptidos
amiloides asociados a enfermedades neurodegenerativas
en Drosophila melanogaster.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas.

Lic. María Silvina Marcora.

Director de Tesis: Dr. Eduardo Castaño.
Director Asistente de Tesis: Dra. Fernanda Ceriani.
Consejero de Estudios: Dr. Arturo Romano.

Lugar de trabajo: Fundación Instituto Leloir; Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos
Aires, CONICET.

Buenos Aires, Noviembre de 2014.

**Estudio de la toxicidad diferencial causada por péptidos
amiloides asociados a enfermedades neurodegenerativas en
Drosophila melanogaster.**

La enfermedad de Alzheimer (EA) y las demencias familiares Británica (DFB) y Danesa (DFD) se caracterizan por la acumulación progresiva de péptidos amiloides y proteína tau hiperfosforilada en el cerebro. Nuestra hipótesis es que la toxicidad de péptidos amiloides depende de una vulnerabilidad neuronal intrínseca asociada al envejecimiento.

Para estudiar ello, generamos líneas de *Drosophila melanogaster* transgénicas para los péptidos A β 42 (EA), ABri (DFB), ADan (DFD) y Bri₂-23, el producto salvaje del precursor de ABri y ADan como control. Utilizando el sistema GAL4/UAS, demostramos que los niveles moderados de amiloides fueron suficientes para provocar toxicidad en el ojo y el sistema nervioso central (SNC) dependiente del envejecimiento. Ensayos de morfometría, Western blots, análisis histoquímicos y comportamentales mostraron que ADan fue más agresivo que ABri y A β 42, en forma concurrente con los fenotipos en humanos. Grupos neuronales específicos mostraron resistencia a la toxicidad (circuito “pdf”) y sólo algunos evidenciaron estrés de retículo endoplásmico a pesar de la sobre-expresión pan-neuronal de los amiloides. Estos resultados sustentan la hipótesis de vulnerabilidad neuronal selectiva. Finalmente, se desarrolló un rastillaje genético novedoso (utilizando un paradigma comportamental asociado al SNC) cuyos resultados preliminares sugieren que genes moduladores podrían participar en el proceso de neurotoxicidad de A β 42.

Palabras claves: Enfermedad de Alzheimer, Demencia Familiar Británica, Demencia Familiar Danesa, *Drosophila*, A β 42, ABri, ADan, Neurotoxicidad.

Study of differential neurotoxicity caused by amyloid peptides associated to neurodegenerative diseases in *Drosophila melanogaster*.

Alzheimer's disease (AD) and Familial British (FBD) and Danish (FDD) dementias are characterized by progressive accumulation of amyloid peptides and hyperphosphorylated tau in human brains. We hypothesized that the amyloid peptide toxicity is due to neuronal vulnerability associated with aging.

To study this, we generated transgenic *Drosophila melanogaster* lines carrying A β 42 (AD), ABri (FBD), ADan (FDD) and Bri₂-23, the wild type product of the precursor protein of ABri and ADan, as an experimental control. By using the GAL4/UAS binary system, we demonstrated that moderate levels of amyloids were sufficient to produce eye and neuronal toxicity, progressive with age. Morphometric assay, Western blots, histochemical and behavioral analysis showed that ADan was more aggressive than ABri and A β 42, as it happens in humans. Specific neuronal groups were resistant to amyloid toxicity ("pdf circuit") and some showed activation of endoplasmic reticulum stress response, even though the pan-neuronal amyloid expression. These results support the hypothesis of selective neuronal vulnerability. Finally, we carried out a novel genetic screening (using behavior associated to the central nervous system) and the preliminary results suggest that modulator genes could be participating in A β 42 neurotoxicity.

Key word: Alzheimer disease, Familial British Dementia, Familial Danish Dementia, *Drosophila*, A β 42, ABri, ADan, neurotoxicity

Agradecimientos.

Quiero agradecer a todas las personas que de una manera u otra participaron y me acompañaron a lo largo de esta etapa de mi vida.

-En primer lugar quiero agradecer a Eduardo Castaño por recibirme en su laboratorio, por su dirección y enseñanzas durante mi tesis doctoral.

-A Fernanda Ceriani, por su co-dirección, sus consejos y enseñanzas.

- A Laura Morelli, porque siempre estuvo dispuesta ayudarme en todo lo que estaba a su alcance.

-A mis compañeros y amigos del laboratorio 104; aquellos que estuvieron: Amaranta, Matías, Ezequiel, Pía, Celeste, Lula, y aquellos que están: Ágata, Pame, Nanu, Caro, Pablo y Lautaro. Su constante ayuda, en lo experimental y personal, permiten que el día sea más eficiente y divertido. En especial quiero agradecer a Amaranta, que me guió al mundo de las moscas y a Ágata, con quien realizamos varios experimentos juntas. Gracias a ambas por transmitirme sus conocimientos.

- Al laboratorio 109; a los están cerca y a los que ya volaron lejos; Nara, Nico, Lía, Guille, Anas, Magui, Sofi, Ana, Axel, Beck, Paula, Lore, Marta y Marian. Muchas gracias por su ayuda y compañía del día a día en el flyroom. Y a Andrés que todos los días cocina para las moscas. Gracias!!

-A Ceci Rotondaro, por ayudarme con las histologías.

-A mi comité de seguimiento de tesis: Fernando Pitossi, Amaicha Depino y Ale Rabossi, por sus sugerencias y consejos.

-A todos los integrantes de FIL: investigadores, becarios, técnicos, personal de administración, mantenimiento, biblioteca, droguero, limpieza, que generan del Instituto un lugar excelente para trabajar.

-A CONICET y la UBA, por el financiamiento que me permitió realizar un Doctorado.

- A mis amigas de la facu: Gabi, Roxi, Lau, Euge y Flor. Gracias por compartir el sentimiento siempre!

-A mi mamá, papá, abuela y hermana, que siempre me bancan y acompañan en todo lo que decido hacer.

-A Diego, no sólo por estar siempre, sino por el aguante y la comprensión constante. Gracias!!

A mi familia,

en especial a Diego,

por el apoyo incondicional y la confianza.

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han sido publicados en

- **“Amyloid peptides ABri and ADan show differential neurotoxicity in transgenic *Drosophila* models of familial British and Danish dementia”.**

Marcora MS, Fernández-Gamba AC, Avendaño LA, Rotondaro C, Podhajcer OL, Vidal R, Morelli L, Ceriani MF, Castaño EM. Mol. Neurodegener. 2014.

Índice

1 – Introducción.....	3
1.1 - Enfermedades neurodegenerativas y acumulación de proteínas mal plegadas.....	4
1.2 - Proteínas mal plegadas y Amiloides.	6
1.2.1 - Dinámica de agregación y formación de fibras amiloides.....	7
1.3 - Características comunes y diferenciales entre Enfermedad de Alzheimer y Demencias Británicas y Danesa.....	9
1.3.1 - Enfermedad de Alzheimer.	9
1.3.1.1 - Procesamiento de APP y producción de A β	11
1.3.1.2 - Genética de la EA.	13
1.3.1.3 - Metabolismo cerebral de A β : balance entre la producción y eliminación.	14
1.3.1.4 - Rol de A β en la patogenicidad.	14
1.3.2 - Demencias familiares Británica y Danesa.	15
1.3.2.1-Procesamiento de BRI ₂	16
1.3.2.2 - Genética de DFB y DFD.	17
1.3.2.3 - Metabolismo de ABri y ADan.	19
1.3.2.4 - Rol de ABri y ADan en la patogenia.....	20
1.3.3 - Interacción entre BRI ₂ -APP (precursores de A β , ABri y ADan).	20
1.4 - Modelos animales de Neurodegeneración.	20
1.4.1 - Modelos vertebrados para EA, DFB y DFD.....	21
1.4.2 - Modelos invertebrados para EA, DFB y DFD.....	22
1.4.2.1 - Drosophila como modelo de estudio de EA, DFD y DFB.	22
1.5 - Drosophila melanogaster.	24
1.5.1 - Drosophila como modelo para búsqueda de interacciones génicas.	26
2 - Hipótesis y Objetivos	28
Hipótesis de trabajo.	29
Objetivo General	29
Objetivos Específicos	29
3 - Materiales y Métodos.....	30

3.1 - <i>Drosophila</i> como modelo animal de estudio.	31
3.1.1 - Diseño de las construcciones y generación de líneas transgénicas.	31
3.1.2 - Cría y mantenimiento de las líneas.	35
3.1.3 - Cromosomas balanceadores.	35
3.1.4 - Sistema bipartito de expresión: GAL4/UAS.	36
3.1.5 - Líneas utilizadas.	37
3.2 - Biología molecular.	38
3.2.1 - Genotipificación de las líneas transgénicas.	38
3.2.1.1 - Extracción de ADN.	38
3.2.1.2 - Protocolo de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	38
3.2.2 - Cuantificación de ARN mensajeros.	38
3.2.2.1 - Extracción de ARN mensajero.	38
3.2.2.2 - Obtención de ADNc (Retrotranscripción, RT).	39
3.2.2.3 - PCR en Tiempo Real.	39
3.2.3 - Electroforesis en SDS-PAGE y Western blot.	39
3.2.3.1 - Extracción de proteínas.	39
3.2.3.2 - Corrida electroforética en condiciones desnaturalizantes y Western blots.	40
3.3 - Péptidos sintéticos.	40
3.4 - Ensayos de ELISA para Aβ42.	41
3.5 - Toxicidad en el ojo.	41
3.6 - Histología e Inmunohistoquímica.	41
3.6.1 - Armado del taco de parafina.	41
3.6.2 - Desparafinización.	42
3.6.3 - Tinción con Hematoxilina/Eosina y cuantificación de la toxicidad tisular.	42
3.6.4 - Inmunohistoquímica.	42
3.6.5 - Tinción con Tioflavina S.	43
3.6.6 - Inmunofluorescencia del disco imaginal de ojo en larva 3 tardía.	43
3.6.7 - Inmunofluorescencia en cerebros de moscas adultas.	44
3.7 - Anticuerpos.	44
3.7.1 - Anticuerpos primarios.	44
3.7.2 - Anticuerpos secundarios.	45
3.8 - Análisis del comportamiento.	46

3.8.1 – Longevidad.	46
3.8.2 - Geotaxis negativa (Rapid Iterative Negative Geotaxis, RING).	46
3.8.3 - Fototaxis positiva.	47
3.8.4 - Actividad locomotora circadiana.	48
3.9 - Activación y cuantificación de la respuesta a estrés de RE.	51
3.10 - Identificación de genes moduladores de la toxicidad de Aβ42.	52
3.10.1 – Protocolo.	52
3.11 - Análisis estadísticos.	53
4 – Resultados.	55
4.1 - Capítulo 1: Estudio comparativo de la toxicidad de Aβ42, ABri y ADan en <i>Drosophila</i>	56
4.1.1 - Producción y acumulación de los amiloides A β 42, ABri y ADan in vivo.	56
4.1.1.1 - Generación de las líneas transgénicas.	56
4.1.1.2 - Expresión y procesamiento de Bri ₂ -23, A β 42, ABri y ADan.	57
4.1.1.3 - Acumulación in vivo de los amiloides.	61
4.1.2 -Neurotoxicidad causada por los péptidos amiloides en tejidos de <i>Drosophila</i>	63
4.1.2.1 - La sobre-expresión de A β 42, ABri y ADan genera leves desarreglos en la estructura externa e interna del ojo.	63
4.1.2.2 - Acumulación no-fibrilar de los péptidos amiloides en la retina.	69
4.1.2.3 - La acumulación de los péptidos amiloides en el SNC provoca defectos comportamentales asociados al envejecimiento.	70
4.1.2.4 - La acumulación no-fibrilar de los péptidos amiloides en el SNC provoca escasa vacuolización.	74
4.1.2.5 - La sobre-expresión de los péptidos amiloides podría ocasionar defectos sinápticos.	77
4.1.3 -Resumen e interpretación de los resultados.	78
4.2 - Capítulo 2: Vulnerabilidad selectiva de grupos neuronales a los péptidos amiloides.	79
4.2.1 –Las neuronas laterales ventrales resisten a los efectos neurotóxicos de los péptidos amiloides A β 42, ABri y ADan.	79
4.2.2 - Búsqueda de grupos neuronales susceptibles a los péptidos amiloides tóxicos. .	82
4.2.2.1 - Los péptidos amiloides disparan respuesta de UPR, vía IRE-1.	83
4.2.3 - Resumen e interpretación.	89

4.3 - Capítulo 3: Búsqueda de genes moduladores de la toxicidad de Aβ42.	90
4.3.1 - Rastrillaje genético en busca de moduladores de la toxicidad de A β 42.	90
4.3.1.1 - Caracterización de la línea de A β 42 elegida.	90
4.3.1.2 - Resultados preliminares del rastrillaje genético.....	91
4.3.2 - Resumen e interpretación.	94
5 - Discusión	95
5 - Discusión	96
5.1 - Acumulación y toxicidad diferencial de Aβ, ABri y ADan.....	97
5.2 - Resistencia y vulnerabilidad selectiva neuronal a péptidos amiloides.	101
5.3 - Rastrillaje genético en busca de moduladores de la toxicidad de Aβ42 en SNC.....	104
5.3.1 - Presenilina (PS).	105
5.3.2 - Sintetasa de ácido lipoico (LAS).	106
5.3.3 - 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD).	107
5.3.4 - 39S proteína ribosomal L15, mitocondrial (mRPL15).	108
5.4 - Perspectivas futuras.....	109
6 – Bibliografía.....	110

Abreviaturas

A β , amiloide Beta.

ADNc, ADN copia

APP, proteína precursora amiloide.

CO₂, dióxido de carbono.

DAB, diaminobencidina.

DFB, Demencia Familiar Británica.

DFD, Demencia Familiar Danesa.

DFT, Demencia Frontotemporal.

Dm, *Drosophila melanogaster*.

DTT, Ditiotreitól.

EA, Enfermedad de Alzheimer.

EAE, Enfermedad de Alzheimer Esporádica.

EAF, Enfermedad de Alzheimer Familiar.

EDI, enzima degradadora de insulina.

EDTA, ácido etildiaminotetra acético.

EGTA, ácido etilenglicol tetra ácido.

ELA, Esclerosis Lateral Amiotrófica.

ELAV, “embryonic lethal abnormal visual system”

EP, Enfermedad de Parkinson.

ESEM, microscopia electrónica de barrido ambiental.

GFP, proteína verde fluorescente.

GMR, “glass multiple reporter”.

HCl, ácido clorhídrico.

Htt, huntingtina.

MMP, Metaloproteasas de matriz.

NaCl, cloruro de sodio.

NEP, Neprilisina.

PBS-T, Buffer fosfato salino con Tween o Triton.

PDF, “pigment dispersing factor”.

PFA, praraformaldehido.

PrP, prión.

PS, Presenilina.

RFP, proteína roja fluorescente.

RIPA, “Radioinmuno-precipitation assay”.

RING, “rapid iterative negative geotaxis”.

SDS, dodecilsulfato sódico.

SDS-PAGE, electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

SN, sobrenadante.

TA, temperatura ambiente.

UAS, “Upstream Activating Sequence”.

1 – Introducción.

1.1 - Enfermedades neurodegenerativas y acumulación de proteínas mal plegadas.

Una gran variedad de enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento se caracterizan por el depósito anormal de proteínas en zonas específicas del cerebro [1].

La hipótesis actual sostiene que dichos depósitos de proteínas mal plegadas están relacionados de manera causal con el proceso neurodegenerativo. Existe además una relación entre la identidad de la proteína acumulada, su localización cerebral y el fenotipo cerebro-patológico. En la figura 1 se muestra un esquema de algunas de las enfermedades neurodegenerativas, proteínas asociadas y zonas del cerebro principalmente afectadas que se describen a continuación.

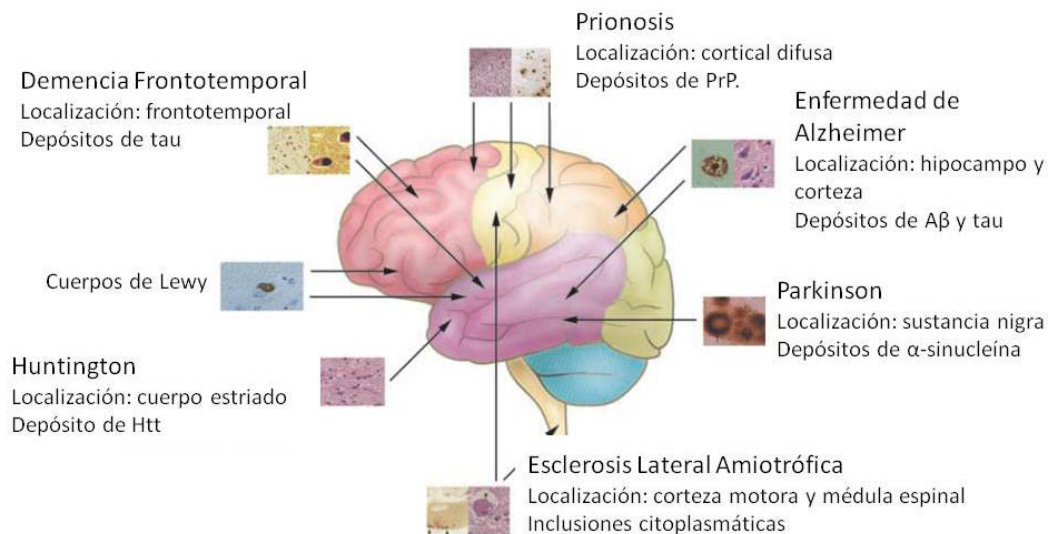


Figura 1: Esquema de las zonas del cerebro mayormente afectadas en distintas enfermedades neurodegenerativas. Se pone de manifiesto la vulnerabilidad neuronal diferencial frente a los distintos agregados proteicos. Es importante resaltar que el espectro neuropatológico completo de estas enfermedades es mucho más complejo. Imagen adaptada de Bertram y Tanzi, JCI, 2005.

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es el desorden neurológico de mayor incidencia en la población envejecida. Está caracterizada por depósitos del péptido amiloide Beta ($A\beta$) y agregados de tau formando ovillos neurofibrilares en el cerebro, predominantemente en corteza e hipocampo. Se describirá la patología en detalle más adelante (sección 1.3.1).

La Enfermedad de Parkinson (EP) es el segundo desorden neurodegenerativo más común en las poblaciones envejecidas. Histopatológicamente está caracterizado por pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra y acumulación de inclusiones citoplasmáticas compuestas por agregados insolubles de proteínas (denominados cuerpos de Lewy), lo que conlleva de manera progresiva a desórdenes de movimiento que incluye temblor, bradiquinesia (movimientos lentos) y rigidez. Se han identificado mutaciones en por lo menos 5 genes asociados a casos hereditarios de Parkinson (α -sinucleína, parkin, LRRK2, Dj-1 y PINK1 (revisado en [2]), si bien corresponden a un pequeño porcentaje de los casos de EP.

La Demencia Frontotemporal (DFT) se caracteriza clínicamente por cambios graduales de comportamiento y disfunción progresiva del lenguaje [3]. Esta demencia presenta neurodegeneración en los lóbulos frontal y temporal y, generalmente las neuronas afectadas presentan agregados de la proteína tau que difieren de los agregados de tau en ovillos neurofibrilares encontrados en la EA [4]. Entre un 25-40% de los casos de DFT son hereditarios, mientras que la clínica sugiere que existen diversos factores genéticos que influyen en la patología [5]. Se identificaron varias mutaciones en el gen de tau (MAPT) [6] las cuales provocan un incremento o reducción de la capacidad de tau de unirse a microtúbulos, así como agregados citoplasmáticos y alteraciones en la proporción de isoformas presentes.

En el caso de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), esta enfermedad se caracteriza por una rápida y progresiva degeneración de las neuronas motoras en el cerebro y la médula espinal, que desencadena parálisis y muerte prematura. Cabe destacar que un 20% de los casos de ELA son hereditarios y se encuentran asociados a mutaciones en los genes SOD1 y ALS2 [7, 8].

La Enfermedad de Huntington es causada por degeneración de las neuronas del cuerpo estriado provocando movimientos involuntarios, síntomas psiquiátricos y demencia. La mayoría de los casos son hereditarios (90%) y transmitidos por mutaciones dominantes. El gen afectado, huntingtina (Htt), presenta expansiones anormales de repeticiones de CAG (que codifica para el aminoácido glutamina) en la región del exón 1. Estas repeticiones varían entre 35 y 120 copias aumentando de forma inversamente proporcional a la edad de comienzo de la enfermedad [9].

Las prionosis abarcan un espectro heterogéneo de características clínicas e histopatológicas y pueden ser hereditarias (asociadas a mutaciones), esporádicas o adquiridas por un mecanismo infeccioso. Los pacientes presentan neurodegeneración

progresiva acompañada de espongiosis y depósitos amiloides de proteína priónica (PrP); probablemente generados por auto-propagación de PrP mal plegadas [10, 11].

Dos tipos de demencias hereditarias, la Demencia Familiar Británica (DFB) y la Demencia Familiar Danesa (DFD), son enfermedades asociadas a depósitos amiloides en el cerebro y muy poco frecuentes, pero de gran interés para el estudio de la hipótesis amiloide en la EA y se describirán más adelante.

A su vez, en muchas de estas enfermedades neurodegenerativas la acumulación de proteínas mal plegadas lleva a la formación de fibras amiloides.

1.2 - Proteínas mal plegadas y Amiloides.

Naturalmente las proteínas tienden a adoptar una conformación espacial, la cual impacta directamente sobre su función biológica. Bajo ciertas condiciones pueden plegarse de manera anormal provocando una tendencia a la agregación, pérdida de función biológica y acumulación progresiva intra o extracelular en una forma de auto-agregación ordenada llamada “amiloide”.

Los amiloides son agregados de proteínas insolubles que presentan las siguientes características fisicoquímicas:

- estructura secundaria de lámina β plegada.
- morfología fibrilar (8-10 nm de ancho), como se muestra en la figura 2.
- un patrón característico de difracción de rayos X.
- birrefringencia frente a la coloración con Rojo Congo.
- insolubilidad en solventes acuosos.
- resistencia a proteasas.
- afinidad por el fluoróforo Tioflavina S/T.

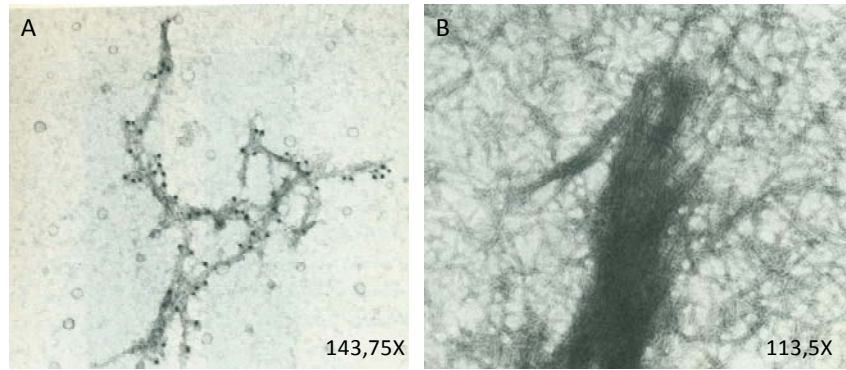


Figura 2: Microscopia electrónica de fibras amiloides. Formación *in vitro* de fibras amiloides de un fragmento del péptido A β (residuos 11-28). **A**, Inmunomarcación con partículas de oro. **B**, Microscopia electrónica de transmisión. Obtenida de Castaño, et al., BBRC, 1986.

Varios mecanismos pueden promover la desestabilización de la estructura secundaria de proteínas solubles incluyendo mutaciones, modificaciones post traduccionales, pH bajo, presencia de metales, entre otros, que conlleve a la auto-agregación de las mismas. Como resultante de estos fenómenos, los residuos hidrofóbicos, amidas y carboxilos de las proteínas pueden quedar expuestos al solvente siendo susceptibles a asociarse unos con otros provocando agregados de estructuras amorfas así como acúmulos altamente ordenados, originando agregados fibrilares.

1.2.1 - Dinámica de agregación y formación de fibras amiloides.

La formación de las fibras es un proceso de polimerización nucleación dependiente. La cinética de este proceso puede ser descrita por una curva sigmoidea, en la cual se evidencian 3 fases: la fase de nucleación, la fase exponencial y la fase estacionaria (Figura 3). En la fase de nucleación las especies solubles, usualmente monómeros, se auto-ensamblan formando pequeños oligómeros (denominados “núcleos”) con alto grado de contenido de estructura β . Para que se puedan generar los oligómeros, la disponibilidad de monómeros debe superar la concentración crítica, lo cual resulta el paso limitante para la dinámica de agregación. En la fase exponencial ocurre la adición de monómeros a los núcleos, evento termodinámicamente favorable, lo que resulta en la formación de fibrillas. Por último la fase estacionaria en la cual se han formado fibras amiloides, que permanecen en equilibrio con monómeros en concentración crítica.

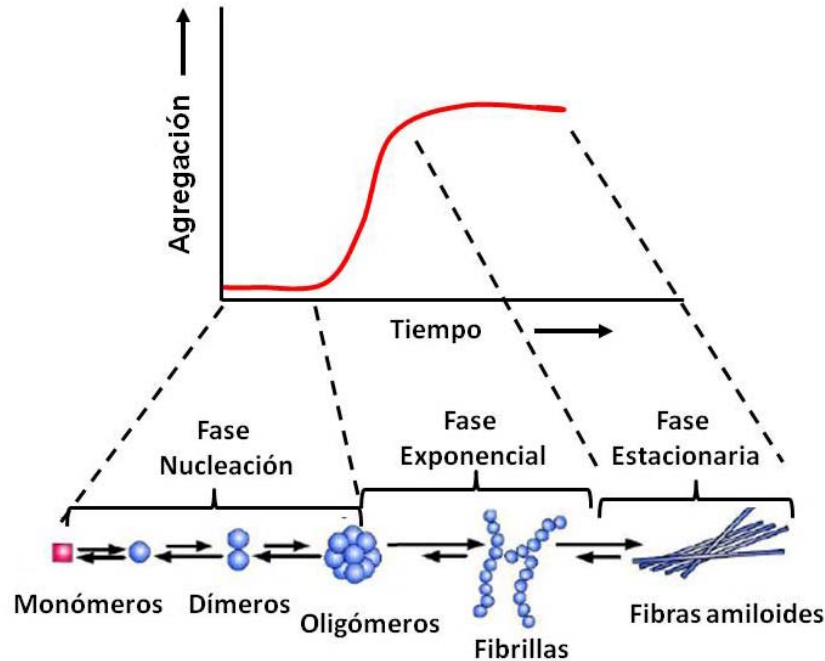


Figura 3: Modelo de polimerización del auto-ensamblado amiloide. La formación de estructuras amiloides se compone de tres fases: (1) Fase de nucleación, en la que los monómeros sufren un cambio conformacional y se asocian para formar núcleos. (2) Fase de crecimiento exponencial, en la que los núcleos crecen rápidamente por adición de monómeros en sus extremos formando fibrillas. (3) Fase estacionaria, en la cual los monómeros se intercambian lentamente en los extremos de las fibras amiloides sin modificar su longitud. Adaptada de Kumar y Walter, Aging, 2011.

En las enfermedades neurodegenerativas, el comienzo de la acumulación de proteínas puede ser estocástico, aunque la velocidad de agregación depende de la concentración de las mismas. Desde el punto de vista cinético, las mutaciones en proteínas asociadas a enfermedades familiares pueden acelerar el proceso de agregación por diversos mecanismos incluyendo, aumento de la concentración efectiva, disminución de la concentración crítica, aumento de la hidrofobicidad, alteraciones en la carga neta, etc.

1.3 - Características comunes y diferenciales entre Enfermedad de Alzheimer y Demencias Británicas y Danesa.

La Enfermedad de Alzheimer y las Demencias Británica y Danesa presentan neuropatología similar, asociada al depósito de péptidos amiloides en cerebro. Sin embargo, la EA posee una alta incidencia en la población, mientras que DFB y DFD son producto de casos muy poco frecuentes. Por otro lado, la sintomatología de los pacientes así como las zonas del cerebro mayormente afectadas no se solapan completamente, sugiriendo cierta vulnerabilidad selectiva por distintos grupos neuronales. Es así que resulta interesante el estudio comparativo entre las 3 patologías, con el objetivo de encontrar mecanismos comunes y diferenciales.

A continuación se describen en detalle los aspectos bioquímicos, genéticos y moleculares de las neuropatologías.

1.3.1 - Enfermedad de Alzheimer.

La enfermedad de Alzheimer, es la causa más común de demencia (corresponde a dos tercios de todos los casos de demencia que ocurren globalmente) y afecta a ~35 millones de individuos en todo el mundo [12].

El diagnóstico de la enfermedad se basa en la evaluación neurológica y neurocognitiva del paciente, las cuales son evidentes cuando la demencia ya está instalada y el daño cerebral existente es irreversible. Es importante destacar que el diagnóstico certero requiere de análisis histopatológicos *post mortem*.

A nivel clínico, la enfermedad se caracteriza por pérdida progresiva de la memoria y otras habilidades cognitivas (pérdida de atención, dificultades de habla y cambios de personalidad, entre otros), y finalmente culmina con demencia. La progresión de la enfermedad puede durar entre 8-10 años e inevitablemente provoca el fallecimiento del paciente. La sintomatología usualmente comienza a partir de los 65 años de edad, salvo en casos hereditarios en los cuales comienza a edades más tempranas, entre 30-40 años de edad (ver apartado de Genética 1.3.1.2).

En 1906, Alois Alzheimer fue el primero en reportar un análisis histopatológico inusual en un caso de demencia [13]. Determinó la presencia de una “sustancia peculiar” en la corteza cerebral del paciente, que posteriormente se descubrió que estaba compuesta por fibrillas de amiloide beta ($A\beta$) y ovillos neurofibrilares intraneuronales [14].

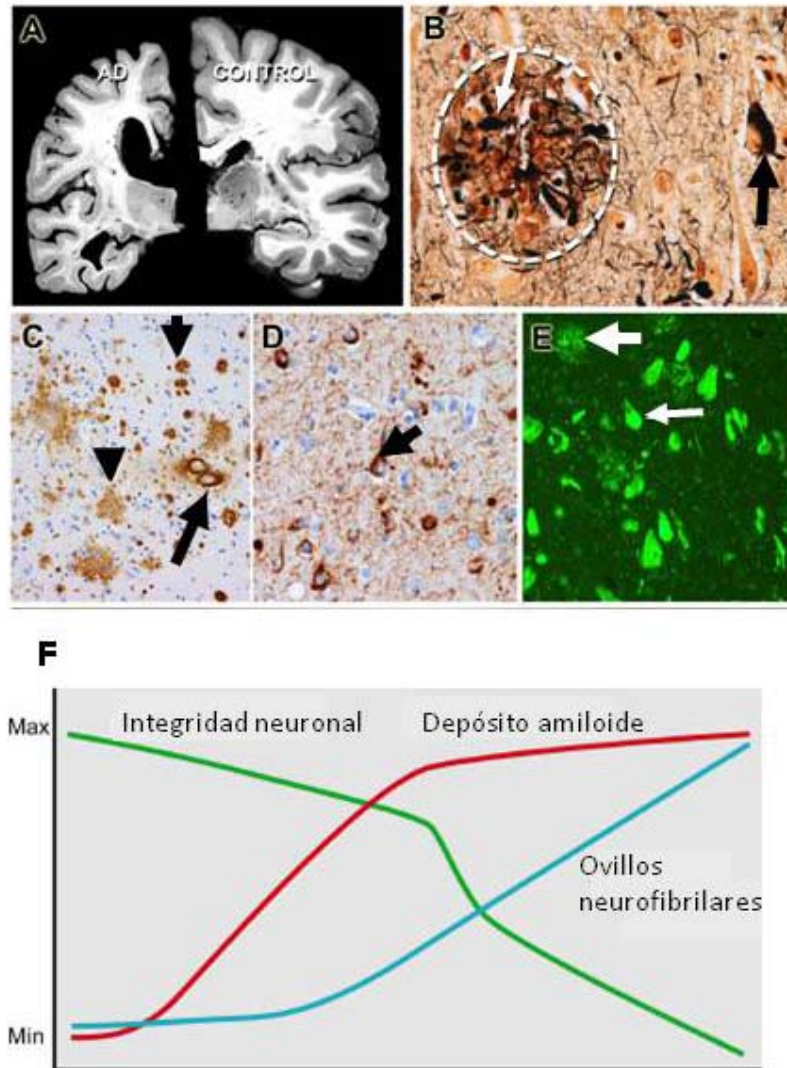


Figura 4: Patología de la Enfermedad de Alzheimer. **A**, Sección de cerebro de un paciente con EA (izquierda) muestra una severa atrofia del cerebro comparado con un individuo sano (derecha). **B**, Micrografía obtenida con tinción con plata (400x de magnificación) permite observar neuritas distróficas formando placas amiloides (flecha negra) y ovillos neurofibrilares (flecha blanca). **C**, Inmunohistoquímica anti-A β muestra placas difusas conteniendo A β (cabeza de flecha), placas compactas (flecha mediana) y angiopatía amiloide cerebral (flecha pequeña) (100x de magnificación). **D**, Inmunohistoquímica anti-fosfo tau permite observar acumulación intraneuronal de tau hiperfosforilada. **E**, Tinción con Tioflavina S muestra A β formando estructura de hoja β plegada en la placas amiloides (flecha grande) y tau adoptando estructura de hoja β plegada en los ovillos neurofibrilares (flecha chica) (200x magnificación). **F**, Esquema temporal de la progresión de los marcadores de EA, integridad neuronal, depósito amiloide y acumulación de tau hiperfosforilada en ovillos neurofibrilares. Adaptado de Hotlzman et al., Sci Transl Med, 2011.

La EA esta histopatológicamente caracterizada a nivel macroscópico por una severa atrofia cerebral, mientras que a nivel microscópico se observan neuritas distróficas rodeadas por placas extracelulares compuestas principalmente de A β , astrocitos y microglia activada así como también ovillos neurofibrilares intracelulares, compuesto predominantemente por la proteína tau hiperfosforilada (Figura 4) [15].

Como se mencionó anteriormente los ovillos neurofibrilares son agregados intraneuronales compuesto predominantemente por proteína tau hiperfosforilada. La proteína tau está presente tanto en neuronas como en glía y normalmente se une a tubulina estabilizando los microtúbulos. Sin embargo en la EA tau se hiperfosforila y pierde su capacidad de asociación a tubulina lo que favorece su auto-agregación, dando origen a los ovillos neurofibrilares en neuritas distróficas y cuerpos celulares [16, 17].

1.3.1.1 - Procesamiento de APP y producción de A β .

El péptido A β es producto de proteólisis de la proteína APP ("Amyloid Precursor Protein"), tanto en condiciones fisiológicas como patológicas [18].

El gen que codifica para la proteína APP se ubica en el cromosoma 21 y produce una glicoproteína de membrana tipo I de 695-770 aminoácidos [19]. APP presenta expresión ubicua, particularmente en neuronas así como también en microglia, astrocitos y otros tejidos [20]. Se ha propuesto que APP cumple funciones de adhesión celular [21], transducciones de señales vía proteína G0 [22] y transporte axonal por interacción con quinesina I [23]. En cuanto a su localización subcelular, APP se ha descrito en membrana plasmática, en retículo endoplasmático, Golgi, Trans-Golgi, endosomas, lisosomas y membrana mitocondrial (revisado en [24]).

Durante su tráfico por la célula APP puede ser procesado por 2 vías: la amiloidogénica y la no-amiloidogénica (Figura 5). En la vía amiloidogénica, APP es cortado inicialmente por BACE1 (del inglés " β -secretase APP cleaving enzyme 1"), una proteína integral de membrana tipo I [25], liberando APPs β al espacio extracelular y/o luminal y el fragmento CTF- β (C99). Este último es posteriormente cortado por el complejo γ -secretasa, dando origen al péptido A β y AICD (del inglés "APP intracelular domain"). El complejo γ -secretasa está compuesto por varias proteínas incluyendo Presenilina 1 y 2 (PS1 y PS2), Nicastrina, APH-1 y PEN2, siendo las PS las que contienen el sitio activo catalítico del complejo [26-28]. La mayoría de los péptidos A β producidos son de 40 aminoácidos, mientras que una pequeña fracción de los generados son de 38, 39, 42 y 43 aminoácidos. Pese a que difieren en 2 aminoácidos,

A β 42 presenta mayor capacidad de agregación y de generar efectos tóxicos en neuronas que A β 40, dado en parte por su mayor hidrofobicidad [29]. La ruta alternativa, no-amiloidogénica, evita la generación de péptidos A β . Es así que APP es procesado en primer lugar por el complejo α -secretasa, que está compuesto por proteínas pertenecientes a la familia ADAM (metaloproteinasas) [30]. Este corte genera un N-terminal APPs α , el cual es secretado al medio extracelular, mientras que el fragmento de CTF- α (C83) presente en la membrana es cortado por γ -secretasa, produciendo un fragmento p3 y AICD. Como el corte de α -secretasa ocurre dentro de la región de A β , esto impide la generación del péptido [31].

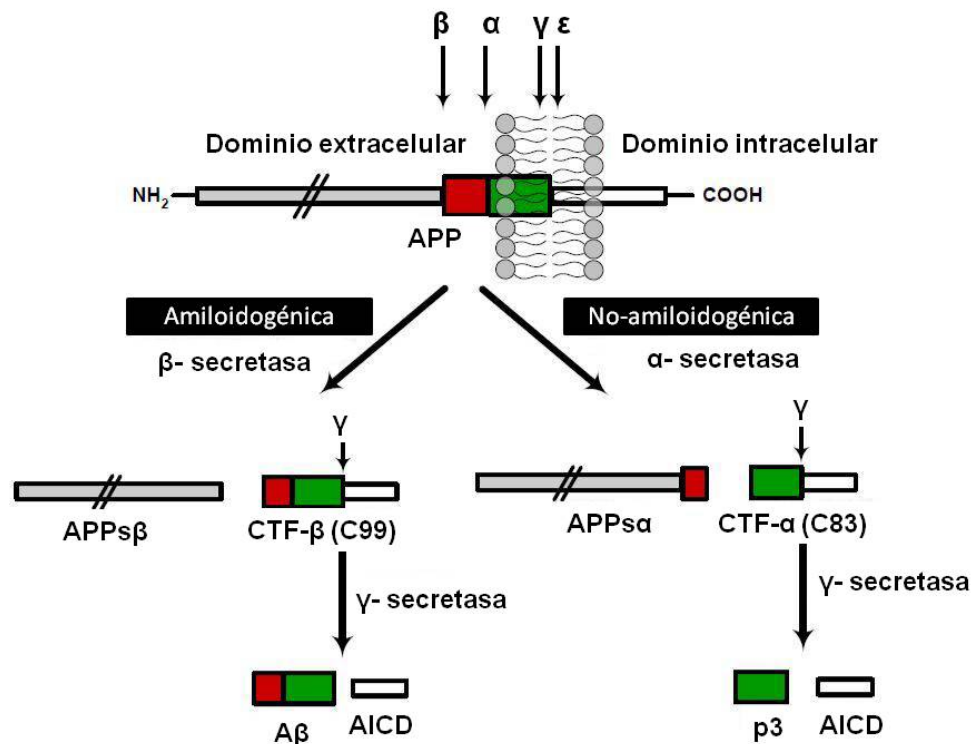


Figura 5: Esquema de procesamiento secuencial de APP. La vía amiloidogénica involucra la acción β -secretasa, liberando APPs β y CTF- β (C99). Este último es posteriormente cortado por el complejo γ -secretasa (PS1, PS2, nicastrina, PEN2, APH-1) liberando A β y AICD. En cambio, la vía no-amiloidogénica involucra la acción de α -secretasa para liberar APPs α y CTF- α (C83), siendo este último procesado por el complejo de γ -secretasa liberando p3 y AICD. Nótese que en el corte de α -secretasa ocurre dentro de la secuencia de A β . Adaptado de Kumar y Walter, AGING, 2011.

1.3.1.2 - Genética de la EA.

La mayoría de los casos de EA (95-98%) no están asociados a mutaciones y se los denomina “esporádicos” (EAE). Se cree que EAE es multifactorial y si bien sus causas no se conocen en detalle, la edad y la variante alélica de Apolipoproteína E 4 (Apo E4) son los mayores factores de riesgo para contraer la enfermedad [32, 33]. Otros factores de menor peso epidemiológico en EAE son la historial familiar, traumatismo de cráneo, enfermedades cardiovasculares, diabetes, hipertensión, obesidad y polimorfismos de diversos genes que aún requieren validación.

A su vez, sólo un muy pequeño porcentaje de los casos de EA (<5%) está asociado a mutaciones autosómicas dominantes en los genes de APP, PS1y PS2 [34], lo que conlleva al desarrollo temprano de la enfermedad, llamada “Enfermedad de Alzheimer Familiar” (EAF). Las mutaciones en APP, en general, aumentan la producción de A β total o 42/43 y/o su capacidad de agregación (Figura 6) [35], mientras que las mutaciones en PS aumentarían la producción relativa de A β 42 [36].

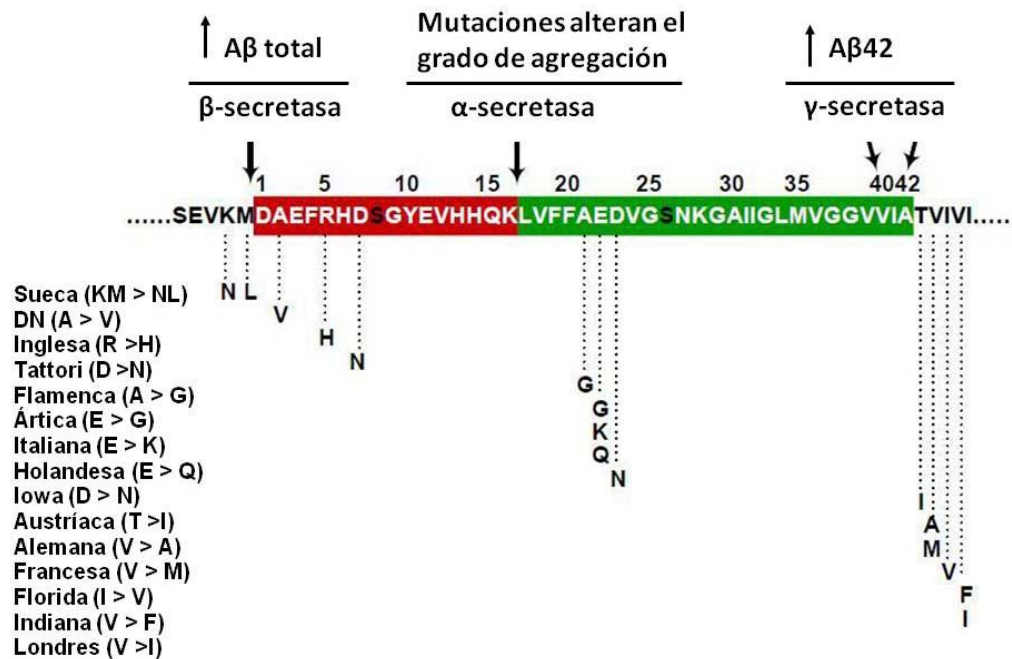


Figura 6: Representación de las mutaciones en APP asociadas a EAF. Se muestra la secuencia de A β numerada 1-42. La mutación Sueca en el N-terminal cerca del sitio de corte de β -secretasa aumenta la producción total de A β mientras que las mutaciones en el C-terminal provocan un aumento de A β 42 al modificar la actividad de γ -secretasa. Las mutaciones en el medio de la secuencia podrían disminuir la actividad de α -secretasa favoreciendo la vía amiloidogénica, aumentar la producción de A β y/o su agregación, o bien evitar la degradación por proteasas. Adaptado de Kumar y Walter, AGING, 2011.

Pese a que la variante A β 40 es la especie más abundante, A β 42 resulta más fibrillogénico [37] y parecería ser la especie que se encuentra tempranamente en las placas amiloides tanto en pacientes de EAE como EAF [38].

1.3.1.3 - Metabolismo cerebral de A β : balance entre la producción y eliminación.

Los niveles estacionarios del péptido A β en cerebro dependen de su síntesis y degradación. Hay evidencias que sugieren que los defectos en la degradación de A β más que los incrementos en la producción del péptido en SNC, serían los responsables del desarrollo de la EAE [39].

La remoción de A β del cerebro es llevada a cabo por diversos mecanismos: 1) por drenaje del fluido intersticial cerebral por la membrana perivascular al líquido cefalorraquídeo o por plasma a través de capilares, 2) por captación y degradación del péptido por microglía y astrocitos y 3) por acción de proteasas, incluyendo a neprilisina (NEP), enzima degradadora de insulina (EDI), metaloproteasas de matriz 9 (MMP-9) y glutamato carboxi peptidasa II (GCP II) (revisado en [40],[41]).

Fallas en los mecanismos antes descriptos pueden favorecer la acumulación de A β . Se describió que una disfunción de la barrera hematoencefálica puede contribuir a la acumulación de materiales neurotóxicos. A su vez, la microglía juega un rol esencial en la acumulación de A β , dado por su capacidad de fagocitar y degradar tanto especies solubles como fibras amiloides [42]. Además, existen numerosos estudios *in vivo* que muestran que las proteasas son capaces de degradar A β . Experimentos en ratones y rata knock out para las proteasas mencionadas mostraron aumento de los niveles de A β acumulada en cerebro [43, 44]. Además, si en ratones transgénicos modelos de EA se sobre-expresan las proteasas, disminuyen los niveles del péptido amiloide [45, 46]. Más aún, se ha reportado una disminución en la actividad de las proteasas *in vivo* a partir de muestras de tejido de pacientes de EA [47, 48]. Estos datos señalan un claro rol de las proteasas en el metabolismo del péptido A β .

1.3.1.4 - Rol de A β en la patogenicidad.

Hardy y Allsop postularon la llamada “Hipótesis de la cascada amiloide” [49]. Propusieron al depósito extracelular de A β en el cerebro como agente neurotóxico de la patología de EA, tal que su acumulación induce la formación de ovillos neurofibrilares intracelulares con posterior muerte celular [50, 51]. El rol de A β como disparador de la cascada estaba sustentado por la identificación de mutaciones en

APP, PS1 y PS2; y duplicaciones génicas de APP que promueven el procesamiento y producción de A β en casos de EAF. Con el tiempo la hipótesis sufrió modificaciones, postulando que los oligómeros de A β son las especies más tóxicas y las causantes de disparar mecanismos patológicos en EA, en lugar de las fibras insolubles [52, 53]. Pese a que tanto las fibras como los oligómeros son encontrados en cerebros de pacientes *post-mortem*, los oligómeros solubles correlacionan mejor con el avance de la enfermedad [54].

Se ha reportado acumulación intraneuronal de A β tanto en pacientes de EA como en modelos animales transgénicos y cultivos celulares [55-58]. En cuanto a su localización intracelular, A β se encuentra en Golgi [59], retículo endoplásmico, endosomas, cuerpos multivesiculados [60], lisosomas [61] y mitocondrias [62]. Diversos estudios mostraron que la toxicidad de A β esta mediada por varios mecanismos, como estrés oxidativo, daño mitocondrial, alteraciones en la permeabilidad de las membranas, inflamación, disfunción sináptica, excitotoxicidad por interacción con receptores de neurotransmisores, etc. (revisado en [63]). Se reportó que A β extracelular puede interaccionar con receptores NMDA [64] provocando disfunción sináptica y neurodegeneración, así como con receptores nicotínicos $\alpha 7$ de acetilcolina ($\alpha 7$ nAChR) promoviendo su internalización y acumulación intracelular [65, 66]. La acumulación intraneuronal precede a la formación de placas extracelulares y se cree que promueve disfunción sináptica temprana [67, 68]. Además, se evidenció que los oligómeros de A β pueden incorporarse a las membranas formando canales [69] que provocan desregulación de la homeostasis del calcio y otros metales [70, 71]. A su vez, la acumulación A β en mitocondrias está asociado a una disminución de la actividad del complejo I, III y IV de la cadena respiratoria, como también a una menor tasa de consumo de oxígeno [72].

Estos son algunos de los mecanismos descriptos asociados a la toxicidad del péptido A β , mostrando un amplio espectro de acción.

1.3.2 - Demencias familiares Británica y Danesa.

En 1933, Worster-Drought y colaboradores fueron los primeros en describir un tipo particular de demencia en 2 hermanos de una familia británica. Los pacientes presentaron problemas de memoria, parálisis, cambios de personalidad y demencia presenil [73]. Posteriormente, esta enfermedad fue denominada Demencia Familiar Británica (DFB) [74]. La enfermedad empieza a manifestarse a los 50 años de vida; los pacientes presentan demencia progresiva, ataxia y mueren alrededor de los 60 años

de edad [75, 76]. Los estudios neuropatológicos revelaron la presencia de placas amiloides perivasculares principalmente en hipocampo y cerebelo, y raramente en neocorteza; así como ovillos neurofibrilares formados por agregados de tau hiperfosforilada [74, 76, 77].

A su vez, Strömberg y colaboradores describieron en 1970 a una familia danesa con características clínicas de problemas de visión, de audición y demencia progresiva [78], patología posteriormente denominada Demencia Familiar Danesa (DFD) [79]. Los pacientes de DFD desarrollan cataratas a los 30 años de edad, presentan pérdida progresiva de la audición en los 10-20 años posteriores y a los 60 años de edad padecen demencia con posterior fallecimiento. Los estudios neuropatológicos evidenciaron depósitos amiloides en el hipocampo y cerebelo, negativos para las tinciones con Tioflavina S y rojo Congo [79, 80].

Análisis bioquímicos de los depósitos amiloides encontrados en los cerebros de enfermos de DFB y DFD, revelaron la presencia de 2 péptidos que no habían sido identificados anteriormente en ninguna otra enfermedad, denominados ABri [74] y ADan [79], respectivamente. Llamativamente, ambos péptidos son producto de mutaciones en la proteína BRI₂

1.3.2.1-Procesamiento de BRI₂

El gen BRI₂, también conocido como ITM2B [81], se encuentra ubicado en cromosoma 13q14.3 y da origen a una proteína transmembrana de tipo II de 266 aminoácidos [74, 79].

La proteína BRI₂ es de expresión ubicua [74, 82, 83] con altos niveles en corazón, placenta, riñón, páncreas e hígado, así como en cerebro. Se postula un rol de BRI₂ en diferenciación neuronal [84] y, además, ha sido propuesto como gen supresor tumoral por su posición cercana a un hotspot asociado al cáncer de próstata [85].

El procesamiento del precursor salvaje de BRI₂ por furinas y otras pro-proteínas convertasas (PCs) [86] da lugar a la liberación de un péptido C-terminal de 23 aminoácidos, llamado Bri₂-23, en la vía secretoria [74]. Luego, el precursor maduro BRI₂ (m-BRI₂) puede ser cortado por la metaloproteasa ADAM10, liberando el dominio Brichos [87] y un fragmento N-terminal. Éste último está sujeto a un evento de proteólisis adicional por la peptidasa de péptido señal 2 (SPPL2), liberando un dominio intracelular y un péptido BRI₂ C-terminal [88] (Figura 7). Hasta la fecha, no se ha dilucidado el rol biológico del péptido Bri₂-23.

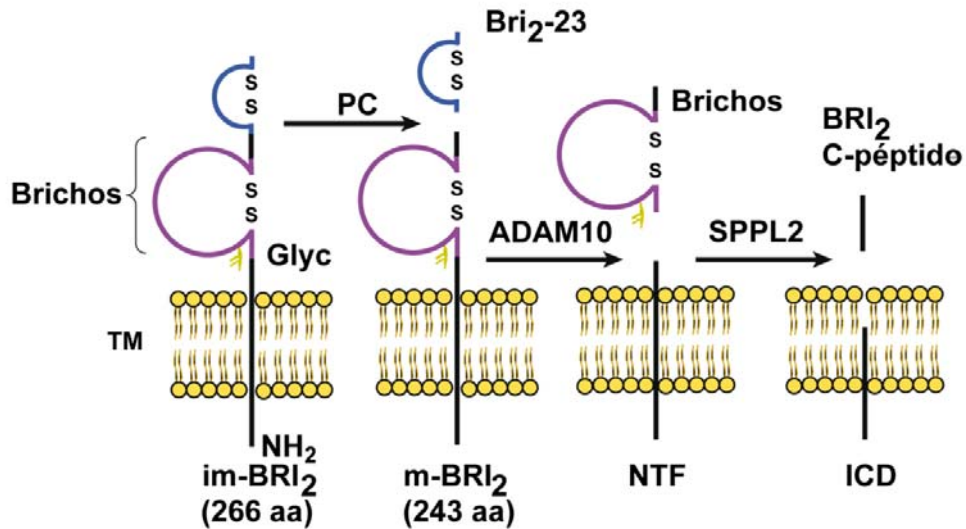


Figura 7: Diagrama de procesamiento de BRI₂. Mediante la acción de la pro-proteína convertasa (PC) se libera un péptido C-terminal de 23 aminoácidos, Bri₂-23. Posteriormente, por corte de ADAM10 se libera el dominio Brichos al espacio extracelular, quedando remanente el fragmento N-terminal, NTF, incluido en la membrana. El NTF es procesado por la peptidasa de péptido señal 2 (SPPL2) liberando un dominio intracelular (ICD) y uno extracelular, BRI₂-C péptido. BRI₂ inmaduro (im-BRI₂), BRI₂ maduro (m-BRI₂), Glicosilación (Glyc), Transmembrana (TM).

1.3.2.2 - Genética de DFB y DFD.

En el caso de DFB se determinó que una mutación puntual (posición 799, A>T) en el gen BRI₂ interrumpe un codón de terminación resultando en la síntesis de un precursor más largo de 277 aminoácidos. El procesamiento del mismo da origen a un péptido C-terminal de 34 aminoácidos, el cual fue aislado de los depósitos amiloides de los pacientes y al que se denominó ABri [74] (Figura 8).

A su vez, en DFD se determinó que una duplicación de 10 nucleótidos previos al codón de terminación en el gen BRI₂ produce un cambio en el marco de lectura generando la síntesis de un precursor más largo. Éste, al ser procesado en la vía secretoria, da como producto un péptido de 34 aminoácidos denominado ADan que es encontrado en depósitos cerebrales de pacientes de DFD [79] (Figura 8).

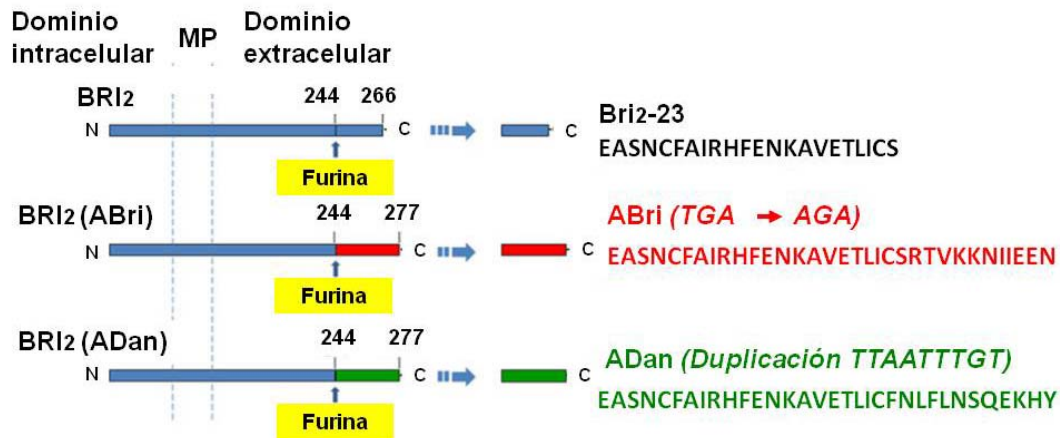


Figura 8: Mutaciones en BRI₂. Proteína transmembrana BRI₂ es cortada constitutivamente por proteínas convertasas, posiblemente furinas, liberando un péptido C-terminal de 23 aminoácidos, Bri₂-23. La mutación asociada a DFB, interrumpe un codón de terminación, generando un cambio en el marco de lectura y un precursor más largo. Como producto de proteólisis se libera ABri (rojo). En el caso de DFD, ocurre una duplicación de un decámero de nucleótidos previos al codón de terminación provocando un cambio en el marco de lectura y un precursor más largo. Como producto de proteólisis se libera ADan (verde). Secuencias de los péptidos usando el código de una letra de los aminoácidos. Adaptado de Welzel y Walsh. J Med Sci. 2010.

Dado que los extremos C-terminal ABri y ADan difieren entre sí, éstos fueron utilizados para desarrollar sueros policlonales anti-ABri (nro 338) [74] y anti-ADan (nro 5282) [79]. Mediante técnicas histológicas se evidenciaron depósitos amiloides de ABri y ADan en cerebros de pacientes de DFB y DFD, respectivamente, utilizando los anticuerpos específico (Figura 9 A y B-C respectivamente). Estos depósitos se observaron tanto en parénquima como en vasos sanguíneos, en todo el SNC incluido el cerebelo. Llamativamente, se reportaron depósitos de A β en tejidos de pacientes con DFD (Figura 9 D). Además, se evidenció presencia de ovillos neurofibrilares (anticuerpos anti-fosfo tau) preferentemente en hipocampo en ambas enfermedades (Figura 9 F y G).

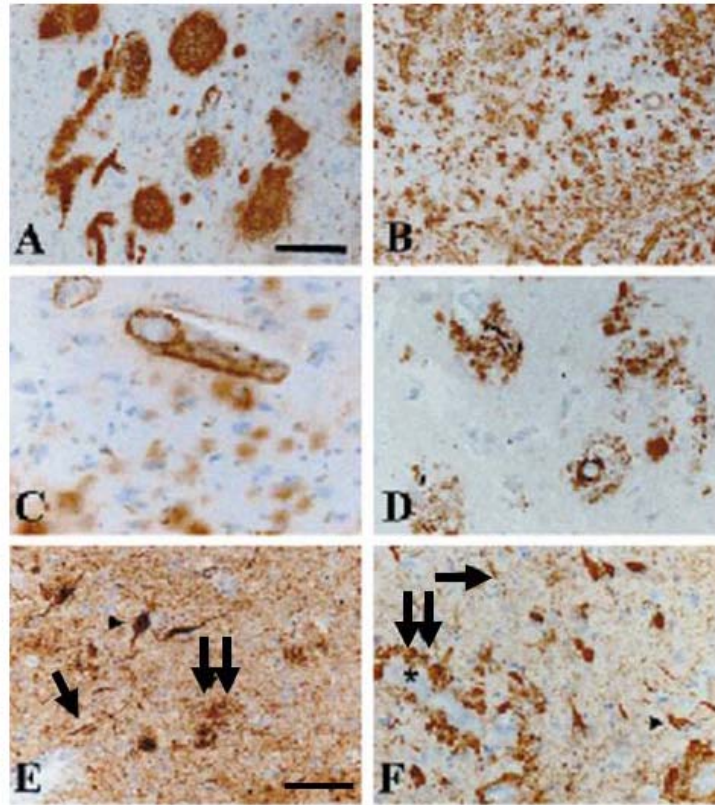


Figura 9: Inmunohistoquímica en DFB y DFD. **A**, Depósitos en hipocampo de ABri (anti-ABri nro. 338, suero policlonal). **B**, Depósitos difusos de ADan en hipocampo (anti-ADan, nro. 5282 suero policlonal). **C**, Depósitos difusos de ABri en corteza entorrinal (anti-ABri). **D**, Depósitos de Aβ en tejido de pacientes DFD (anti Aβ, 6E10). Formación de ovillos neurofibrilares **E**, en DFB y **F**, en DFD reconocidos con anti-fosfo tau, AT8 (indicadas con flechas). Barra= 150 μm en A, B, C y D. Barra = 75 μm en E y F. Adaptado de Rostagno et al., Cell. Mol. Life Sci, 2005.

Cabe destacar que en ambas patologías la mayoría de los depósitos resultaron rojo Congo negativos, sugiriendo que predominan especies no-fibrilares [79]. Estos depósitos difusos, pueden ser extraídos con detergentes iónicos y no iónicos, y no requieren del uso de ácido fórmico. Es así que los extractos estarían enriquecidos en oligómeros con el potencial para desencadenar toxicidad neuronal [89].

1.3.2.3 - Metabolismo de ABri y ADan.

A diferencia de EA, la acumulación y depósito de los amiloides ABri y ADan está directamente asociada con la presencia de las mutaciones en el gen *BRI₂*, como se describe en la sección anterior.

Si bien no se conoce mucho sobre el metabolismo de BRI_2 , se evidenció, mediante ensayos *in vitro*, que proteasas como EDI son capaces de degradar monómero de ABri y ADan [90], sugiriendo un rol de las metaloproteasas en su metabolismo.

1.3.2.4 - Rol de ABri y ADan en la patogenicidad.

Los péptidos ABri y ADan poseen una alta propensión a oligomerizar *in vitro* y formar estructuras ricas en conformación β (evidenciado por técnicas de dicroísmo circular), así como también son capaces de inducir citotoxicidad en cultivos celulares [91, 92].

Estudios *in vivo* mostraron que ABri y ADan presentan modificaciones post-traduccionales, entre ellas, la modificación de glutámico a piroglutámico en el extremo N-terminal [93]. Esta modificación se demostró que favorece la capacidad de agregación de los péptidos influyendo en la patogenicidad de los mismos [94]. A su vez, se reportó que ambos péptidos pueden agregarse formando estructuras morfológicamente compatibles con canales iónicos, implicados en los mecanismos de toxicidad [95].

1.3.3 - Interacción entre BRI_2 -APP (precursores de ABri, ADan y $A\beta$).

En los últimos años varios trabajos han mostrado que la proteína BRI_2 es capaz de regular el procesamiento de APP, uniéndose e inhibiendo la producción de $A\beta$ [96-98]. Compatible con estos resultados, Kim y colaboradores reportaron que la sobre-expresión de BRI_2 en ratones transgénicos que modelan la EA reduce los depósitos cerebrales de $A\beta$ y que en ensayos complementarios *in vitro*, se observó que Bri_2 -23 inhibe la agregación de $A\beta$ [99]. Esta interacción entre BRI_2 , APP y los productos proteolíticos de ambos añade una posible relación patogénica y/o mecanismos compartidos entre EA, DFB y DFD.

1.4 - Modelos animales de Neurodegeneración.

La EA y las DFB y DFD no ocurren espontáneamente en animales. Sin embargo, la utilización de modelos animales permite estudiar e identificar mecanismos celulares

y moleculares asociados a patologías, así como testear potenciales agentes terapéuticos.

1.4.1 - Modelos vertebrados para EA, DFB y DFD.

El mejor modelo animal para EA parece ser el mono envejecido [100], sin embargo, por su extenso ciclo de vida y su costo de mantenimiento así como las implicancias en bioética, se han desarrollado otros modelos animales que permiten el estudio de diversos procesos celulares, moleculares y comportamentales asociados.

En relación a la EA, se han generado ratones transgénicos que sobre-expresan versiones salvajes o mutantes de APP, así como animales que co-expresan APP con PS1, BACE1 y variantes de tau, dando origen a modelos doble y triple transgénicos (revisado en [101, 102]). Los ratones transgénicos de APP presentan depósitos de A β intra y extracelular en corteza e hipocampo, asociado a neuritis distróficas y gliosis; sin embargo, pese a que se evidencia aumento en la fosforilación de tau, no forman ovillos neurofibrilares. Estos individuos muestran defectos de memoria espacial, locomoción y comportamiento exploratorio asociado al envejecimiento. Los ratones triple transgénicos APP, PS y tau, presentan disfunción sináptica asociada a la acumulación intraneuronal de A β , evento que resulta previo a los depósitos extracelulares y la formación de ovillos neurofibrilares [103].

También se han desarrollado modelos de ratas transgénicas para EA. Dado que las ratas presentan características morfológicas, genéticas y fisiológicas más cercanas a los humanos, podrían aportar información adicional al estudio de la patología. Se ha visto que las ratas modelos de EA producen y acumulan A β intraneuronal en estadios previos a los depósitos extracelulares y presentan disfunción sináptica, defectos en memoria y aprendizaje, entre otros (revisado en [104]).

En cuanto a DFB y DFD, se desarrollaron ratones transgénicos que permiten modelar algunos aspectos de las enfermedades. En el caso de DFD, los ratones transgénicos que sobre-expresan el precursor BRI₂ mutado presentan depósitos de ADan en el cerebro, gliosis, inflamación y defectos comportamentales al envejecer [105, 106]. Los ratones doble transgénicos BRI₂ mutado y tau, a su vez, presentan un aumento en la acumulación de tau fosforilada y depósitos de ADan fibrilares [105, 107]. Los ratones obtenidos mediante estrategias de “knock in” en las que se reemplazó el gen endógeno de BRI₂ por el mutado, no presentaron alteraciones

detectables en el cerebro, ni acumulación de ADan, ni gliosis, aunque mostraron defectos de memoria y plasticidad sináptica [108]. Estos últimos resultados sugieren que la pérdida de función de la proteína BRI₂ influye en la patología humana de DFD [109, 110]. Los ratones modelos de DFB que sobre-expresan el gen BRI₂ mutado si bien mostraron altos niveles de expresión del precursor, no presentaron depósitos amiloides de ABri en el cerebro de animales envejecidos. Los autores sostienen que la falta de detección de ABri podría ser explicada por los bajos niveles de procesamiento del precursor [82]. Una segunda estrategia planteó el desarrollo de ratones “knock in”, mediante el cual se reemplazó un alelo salvaje por uno mutado. Estos ratones presentaron defectos de memoria, sin neuropatología asociada ni depósito de ABri, mientras que en ratones haplo-deficientes de BRI₂ (BRI₂^{+/-}) se reportaron resultados similares. Además, en muestras de pacientes de DFB se evidenció una disminución de los niveles endógenos de BRI₂, sugiriendo que la falta de función de BRI₂ podría contribuir con la patología [111].

1.4.2 - Modelos invertebrados para EA, DFB y DFD.

Se han desarrollado modelos invertebrados para la EA utilizando *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* (Dm). Estos organismos presentan varios de los genes implicados en EA conservados, así como muchos de los mecanismos de señalización celular, lo que permite extrapolar los resultados encontrados en estos modelos invertebrados a mamíferos. Pese a diferencias en cuanto a la complejidad de su sistema nervioso, presentan comportamientos complejos. Además sus ciclos de vida cortos y alto número de progenie, permiten realizar ensayos a gran escala en tiempos acotados. [112].

1.4.2.1 - *Drosophila* como modelo de estudio de EA, DFD y DFB.

Drosophila posee un homólogo de APP (dAPP o APPI) [113] y se ha reportado que las moscas deficientes en dAPP presentan defectos comportamentales, lo cuales pueden ser rescatados con APP humano, indicando que la función de la proteína esta conservada. Si bien dAPP posee los dominios característicos conservados con la proteína APP de vertebrados, la región correspondiente a Aβ (dAβ) presenta baja similitud de secuencia con el péptido amiloide humano [113]. Además, si bien *Drosophila* posee actividad de γ-secretasa [114], el homólogo de la enzima β-secretasa (dBACE) presenta muy baja actividad enzimática [115] por lo que

normalmente no se produce dA β en la mosca. Sin embargo, Carmine y colaboradores en el 2009 reportaron que la sobre-expresión de dBACE y dAPP resulta en la producción de dA β ; el cual es capaz de agregarse, generar defectos comportamentales con el envejecimiento y neurodegeneración [115]. Estos resultados sugieren que algunos mecanismos de toxicidad de APP también podrían estar conservados.

Drosophila posee un homólogo de tau (dtau) que presenta un 46% de identidad y 66% de similitud de secuencia con respecto a tau humana [116]. Los estudios comparativos entre tau humana y dtau mostraron que ambas pueden provocar disfunción neuronal, sin embargo presentan ciertas diferencias en cuanto a propiedades físicas y capacidad de interacción con microtúbulos [117-119].

En la figura 10 se muestran las proteínas asociadas a EA en un esquema comparativo entre humanos y *Drosophila*.

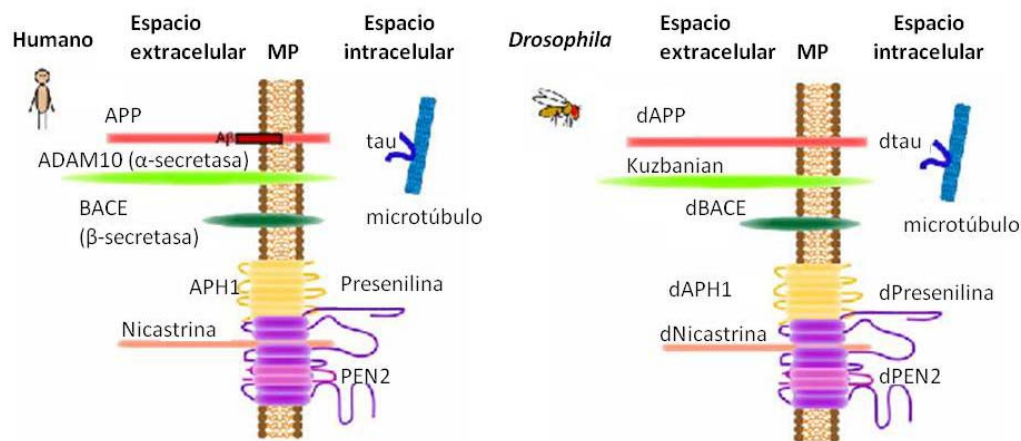


Figura 10: Esquema ilustrando APP, α - y β -secretasa, los componentes del complejo γ -secretasa y tau en humanos y en *Drosophila*. En colores se muestran las distintas enzimas y sus homólogos en *Drosophila*: APP: dAPP, ADAM10: Kuzbanian, BACE: dBACE, complejo γ -secretasa formado por: APh1, Presenilina, Nicastrina y PEN2. MP, membrana plasmática. Adaptado de Iijima-Ando e Iijima 2010.

En cuanto a los modelos de *Drosophila* para EA, en 2001 se reportó que tanto la disminución de los niveles de dAPP como la sobre-expresión de APP humana genera disrupción del transporte axonal [120]. Greeve y colaboradores mostraron que la sobre-expresión de APP, BACE1 y una mutante de PS1 asociada a la EA en *Drosophila* conlleva a la producción y acumulación de A β asociado a una neurodegeneración progresiva con la edad y reducción de la supervivencia [121]. Otros

grupos generaron líneas transgénicas que sobre-expresan distintas variantes de A β ya procesado y en la vía secretoria [122-124], sistema que permite evaluar directamente el efecto del péptido amiloide. La sobre-expresión de A β en el ojo de *Drosophila* provocó neurodegeneración evidenciada por la formación de un típico “ojo rugoso” (ver sección 1.5.1). Además, la sobre-expresión de A β en neuronas provocó acumulación del péptido con el envejecimiento y reducción en la sobrevivencia de las moscas, acompañados de defectos en la locomoción, pérdida de la memoria, y neurodegeneración [122-125]. Posteriormente, se reportó que la sobre-expresión de A β en neuronas causa disfunción sináptica, defectos en el transporte axonal que provocan entre otras cosas, deslocalización mitocondrial [126-128].

A su vez, se han generado varias líneas transgénicas para tau humana y sus variantes mutadas. Se reportó que la sobre-expresión de tau humana provoca disminución de la sobrevivencia, neurodegeneración, defectos en el transporte axonal (revisado en [129]), sin embargo no se observó formación de ovillos neurofibrilares [119]. Shulman y Feany identificaron fosfatasa y quinasas de tau como moduladores del fenotipo de ojo rugoso, apoyando la noción de que la hiperfosforilación juega un rol crítico en la toxicidad de tau [130]. Más aún, hay varios reportes que muestran que la co-expresión de tau y A β 42 en *Drosophila* incrementa la fosforilación de tau y exacerba el fenotipo neurotóxico [131, 132].

En relación a DFB y DFD, *Drosophila* no posee caracterizado ningún gen homólogo de BRL₂ y no se han descrito modelos para ninguna de estas patologías.

1.5 - *Drosophila melanogaster*.

En 1908 Thomas Morgan descubrió un macho de ojos blancos en sus stocks. A partir de este hallazgo, Morgan junto con sus colegas Sturtevant, Bridge y Muller desarrollaron la teoría de herencia mendeliana y el concepto que los cromosomas acarrean el material genético. En los años 1970, Seymour Benzer utilizó a *Drosophila* como modelo para estudiar la base genética de distintos comportamientos biológicos. En su laboratorio se aislaron mutantes con fenotipos de locomoción, defectos en la visión y ritmos circadianos, entre otros. Hoy en día *Drosophila melanogaster* se ha convertido en un excelente modelo animal para estudios desde biología del desarrollo, hasta aspectos de fisiología del sistema nervioso, ensayos de drogas, etc.

Entre las principales características de *Drosophila* como modelo animal podemos destacar:

- un genoma compacto y secuenciado; que posee ~15000 genes [133] distribuidos en 4 cromosomas.
- una gran variedad de herramientas genéticas que permiten obtener líneas transgénicas fácilmente, así como provocar desregulación génica de manera espacio-temporal específica (ver sección de Materiales y Métodos).
- un ciclo de vida corto, que consta de 10-12 días de desarrollo hasta adulto (figura 11) y adultos que viven ~3 meses (a 25°C), así como un alto número de progenie.
- una amplia variedad de comportamientos complejos que incluye ritmos circadianos, sueño, aprendizaje y memoria, cortejo sexual, agresión y vuelo [134, 135].

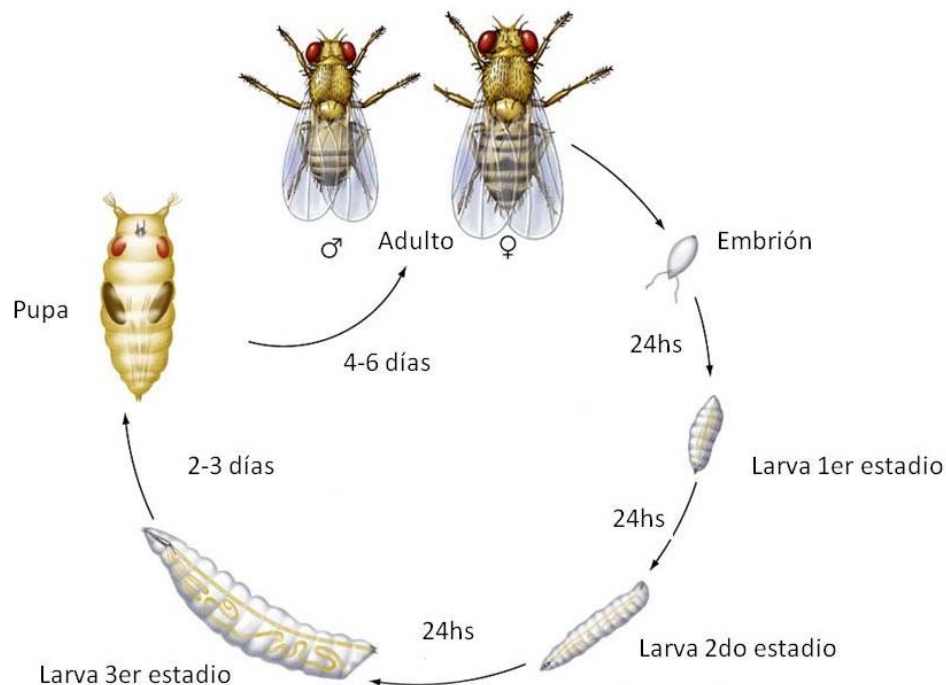


Figura 11: Ciclo de desarrollo hasta adulto. El ciclo comienza con la ovipuesta del huevo fecundado y en alrededor de ~ 24h ocurren los procesos de embriogénesis y eclosión de la larva en estadio 1. En las siguientes 48 h, la larva muda 2 veces aumentando considerablemente su tamaño y 2 días más adelante, se aleja de la comida dando comienzo al desarrollo de la pupa. Durante los próximos 4-6 días la pupa sufre metamorfosis dando origen al adulto formado que finalmente emerge y puede reiniciar el ciclo reproductivo.

Se ha visto que alrededor del 70% de los genes relacionados con enfermedades neurodegenerativas están conservados en *Dm*. [136]. Además, la falta de redundancia génica facilita el estudio de los procesos biológicos en las moscas. Por ello *Drosophila* representa un excelente modelo para estudiar procesos relacionados con enfermedades neurodegenerativas así como la búsqueda de interacciones génica

1.5.1 - *Drosophila* como modelo para búsqueda de interacciones génicas.

La gran variedad de herramientas genéticas y el ciclo de vida corto de *Drosophila* lo convierten en un modelo ideal para la búsqueda de interacciones génicas, con el fin de identificar cascadas de señalización que conllevan a la neurodegeneración.

Uno de los paradigmas ampliamente utilizado en *Drosophila* para evidenciar neurotoxicidad/neurodegeneración es la desorganización de la estructura externa del ojo. Este paradigma permite realizar, de manera rápida, una búsqueda de genes moduladores de la toxicidad. Ejemplo de ello se muestra en la figura 12, donde se observa que tanto la sobre-expresión de una mutante de tau humana (R406W) como altos niveles de A β 42 generan un fenotipo tóxico comúnmente llamado “ojo rugoso”. Estos fenotipos permiten realizar búsquedas de interacciones genéticas que modulen la toxicidad de tau y A β , evidenciado por un mejoramiento o un empeoramiento del fenotipo de ojo rugoso [137].

Uno de los primeros rastrillajes genéticos que utilizó este paradigma fue realizado por Kazemi-Esfarjani y Benzer en 2000, en busca de moduladores de la toxicidad provocada por la sobre-expresión en el ojo de Huntingtina mutante (con 127 repeticiones de CAG) [138]. De allí en adelante, se realizaron varios rastrillajes genéticos asociados a modelos de enfermedades neurodegenerativas, que incluyeron Huntington, Parkinson, Alzheimer, entre otros (revisado en [139])

En relación a EA, Shulman y Feany realizaron una búsqueda de genes moduladores de la toxicidad de tau humana en el ojo de *Drosophila* e identificaron mayoritariamente quinasas y fosfatasas relacionadas a las fosforilaciones patogénicas de tau [130]. Por su parte, Cao y colaboradores realizaron una búsqueda de interacciones génicas con A β 42 y encontraron varios genes moduladores relacionados con los procesos de secreción, homeostasis del colesterol, regulación de la cromatina y respuesta inmune innata [140, 141].

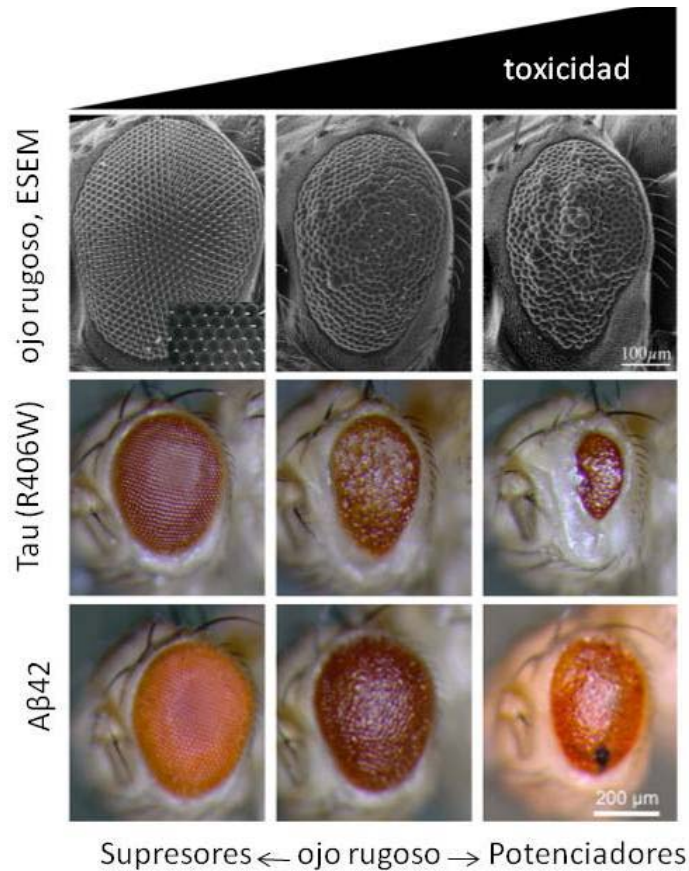


Figura 12: Fenotipo de “ojo rugoso” utilizado en rastrillajes genéticos La sobre-expresión de tau mutante (R406W) y de altos niveles de A β 42 genera un fenotipo de “ojo rugoso”, que puede ser modulado. En el panel superior, se muestra la estructura externa del ojo por microscopía electrónica de barrido y en el panel del medio e inferior se muestran las micrografías obtenidas por luz transmitida. Tomada de Prubing, Mol. Neurodeg. 2013.

Además de los rastrillajes genéticos en el ojo, hay otros paradigmas que pueden ser utilizados para búsqueda de moduladores de neurodegeneración, como la locomoción, el vuelo, la longevidad, entre otros [139]. Por ejemplo, Rival y colaboradores realizaron una búsqueda de genes moduladores A β 42 en base al fenotipo de longevidad reducida provocado por su sobre-expresión pan-neuronal y encontraron mayoritariamente genes involucrados en procesos de control de estrés oxidativo [142].

Es así que la utilización de *Drosophila* permite la búsqueda a gran escala de interacciones genéticas, que puedan llevar a la mejor comprensión de los mecanismos involucrados en ciertos aspectos de las patologías humanas.

2 - Hipótesis y Objetivos

Hipótesis de trabajo.

La acumulación de los péptidos amiloides en áreas específicas del cerebro es un factor importante pero no suficiente para el desarrollo de las demencias, debiendo existir factores de vulnerabilidad neuronal relacionados con el envejecimiento cerebral que promuevan la toxicidad.

Los péptidos amiloides A β 42, ABri y ADan comparten mecanismos neurotóxicos similares, pero existen diferencias intrínsecas que resultan en una vulnerabilidad neuronal diferencial.

Objetivo General

Desarrollar un modelo animal para estudiar la toxicidad de péptidos amiloides y la vulnerabilidad neuronal selectiva.

Objetivos Específicos

- 1) Caracterizar y comparar el efecto tóxico provocado por la sobre-expresión de péptidos amiloides asociados a la EA, DFB y DFD.
- 2) Analizar la vulnerabilidad neuronal frente a los distintos péptidos amiloides asociados al envejecimiento.
- 3) Realizar una búsqueda de genes moduladores de la toxicidad de A β 42 en el SNC.

3 - Materiales y Métodos

3.1 - *Drosophila* como modelo animal de estudio.

3.1.1 - *Diseño de las construcciones y generación de líneas transgénicas.*

Con el objetivo de expresar los péptidos amiloides humanos, A β 42, ABri y ADan y el péptido control Bri₂-23 directamente en la vía secretoria, se procedió a generar construcciones con una secuencia señal de secreción fusionada a la secuencia de los péptidos amiloides y control. Para ello en la literatura había 2 antecedentes de líneas de mosca que sobre-expresan A β en la vía secretoria; Crowther y colaboradores utilizaron la secuencia señal de la proteína Necrotic (nec) de *Drosophila*: MASKVSILLLLTVHLLAAQ TFAQ [122], mientras que Finelli y colaboradores utilizaron la secuencia señal de la proteína pre-pro-encefalina de rata: MAQFLRLCIWLLALGSCLLATVQA [123]. En base a las predicciones de corte obtenidas con el programa Signal P (ExPasy), se decidió utilizar la secuencia nec dado que presentó mayor probabilidad de corte entre la secuencia señal y las de Bri₂-23, ABri y ADan y, a su vez, la pre-pro encefalina no cuenta con un ortólogo en *Drosophila*. Es así que se generaron las construcciones de fusión nec-péptidos y, además, se generaron construcciones de fusión conteniendo la secuencia nec y 6 Histidinas (6His) en el amino-terminal de cada péptido con el objetivo de poder comparar por Western blot los niveles de acumulación de los 4 péptidos usando un mismo anticuerpo.

A partir del pOT Nec (GH10112) se amplificó el ADN copia (ADNc) de la secuencia señal de secreción nec. Se utilizaron los siguientes pares de cebadores para nec: Br_F1b y Br_R4 y para generar el nec-His: Br_F1b y Br_R1 (tabla 1). Los ADNc de Bri₂-23, ABri and ADan se obtuvieron por PCR a partir de templados del precursor BRI₂ mutado. Se usaron los siguientes pares de cebadores para Bri₂-23, ABri y ADan: Br_F3 (común para los 3) y Br_R2, Br_R3 y Br_R5, respectivamente y para las construcciones con tag de His: se utilizaron Br_F2 (común para los 3) y Br_R2, Br_R3 y Br_R5, respectivamente. El ADNc de A β 42 humano fue amplificado del fragmento A β PP-CT99 clonado en el pGEX, utilizando los cebadores F_A β 42 y R_A β 42 y para la versión con tag de His F_HIS-A β 42 y R_A β 42. En la tabla 1 se muestra la secuencia de los cebadores utilizados y la estrategia general para obtener las construcciones de fusión.

Tabla 1: Secuencia de los cebadores utilizados para generar las construcciones, moldes y productos finales

Molde	Secuencia de cebadores	Productos
pOT Nec (GH10112).	Sentido: Br_F1b : 5'-ATA CGA ATT CAT GGC GAG CAA AG-3' Anti sentido: Br_R4 : 5'-CAA TTG CTG GCT TCC TGG GCG AAG GTC TG-3. His-anti sentido: Br_R1 : 5'-TCG TGG TGG TGG TGA TGA TGC TGG GCG AAG GTC-3'.	nec nec-HIS
Moldes mutantes de BRI₂.	Sentido: Br_F3 : 5'-CAG ACC TTC GCC CAG GAA GCC AGC AAT TG-3'. His-sentido: Br_F2 : 5'-CAT CAT CAC CAC CAC CAC GAA GCC AGC AAT TGT-3'. Anti sentido: Br_R2 : 5'-GAT TCT CGA GTC AAG AAC AAA TTA AAG-3'.	Bri₂-23 HIS-Bri₂ - 23
Moldes mutantes de BRI₂ (ABri).	Sentido: Br_F3 : 5'-CAG ACC TTC GCC CAG GAA GCC AGC AAT TG-3'. His-sentido: Br_F2 : 5'-CAT CAT CAC CAC CAC CAC GAA GCC AGC AAT TGT-3'. Anti sentido: Br_R3 : 5'-GAT TCT CGA GTT AAT TTT CCT CAA TAA TG-3'	ABri HIS-ABri
Moldes mutantes de BRI₂ (ADan).	Sentido: Br_F3 : 5'-CAG ACC TTC GCC CAG GAA GCC AGC AAT TG-3'. His-sentido: Br_F2 : 5'-CAT CAT CAC CAC CAC CAC GAA GCC AGC AAT TGT-3'. Anti sentido: Br_R5 : GAT TCT CGA GTC AAT AAT GTT TTT CTT GAC TGT-3'	ADan HIS-ADan
pGEX. APP-CT99.	Sentido: F-Aβ42 : 5'-CAG-ACC-TTC-GCC-CAG-GAT-GCA-G -3' His-sentido: F-HIS Aβ42 : 5'-CAT-CAT-CAC-CAC-CAC-CAC-GAT-G -3' Anti sentido R-Aβ42 : 5'- GAT TCT CGA GTC ACG CTA TGA CAA CAC-3'	Aβ42. HIS-Aβ42.

pOTNec, plásmido comercial con la secuencia del péptido Necrotic. pGEX, vector de expresión que contiene la secuencia APP.

Para generar las construcciones completas, es decir nec-péptidos y nec-His-péptidos, se realizó una segunda ronda de PCR combinando los productos previamente obtenidos y utilizando los siguientes pares de cebadores.

Producto de la 1er PCR.	Cebadores.	Construcciones finales.
nec + Bri₂-23	Br_F1b y Br_R2	nec-Bri₂-23
nec-HIS + HIS- BRI₂-23	Br_F1b y Br_R2	nec-HIS-Bri₂-23
nec + ABri	Br_F1b y Br_R3	nec-ABri
nec-HIS +HIS- ABri	Br_F1b y Br_R3	nec-HIS-ABri
nec + ADan	Br_F1b y Br_R5	nec-ADan
nec-HIS + HIS-ADan	Br_F1b y Br_R5	nec-HIS-ADan
nec + Aβ42.	Br_F1b y R-Aβ42	nec-Aβ42.
nec-HIS + HIS-Aβ42.	Br_F1b y R-Aβ42	nec-HIS-Aβ42.

Estas construcciones fueron posteriormente clonadas en el vector de expresión pUAST-attB, utilizando los sitios EcoR1 y Xho1.

Bischof y colaboradores reportaron una colección de líneas aceptoras, que permiten la inserción del vector pUAST-attB en sitios específicos del genoma, como se muestra en la figura 13 A y B [143]. Esto es posible porque las líneas aceptoras cuentan con un sitio attP y el gen de la enzima recombinasa del fago Phi C 31 insertos en el genoma. Es así que mediante el sistema de ϕ -recombinasa los vectores se integran en un sitio específico del genoma (dado por la ubicación del attP), generando sitios nuevos que no pueden ser reconocidos por la recombinasa tal que se evita la posible escisión del plásmido (Figura 13 C).

La estrategia de inserción sitio-dirigida permite asegurar niveles de expresión comparables entre los transgenes y evitar posibles efectos de posición dados por la inserción al azar del plásmido en el genoma.

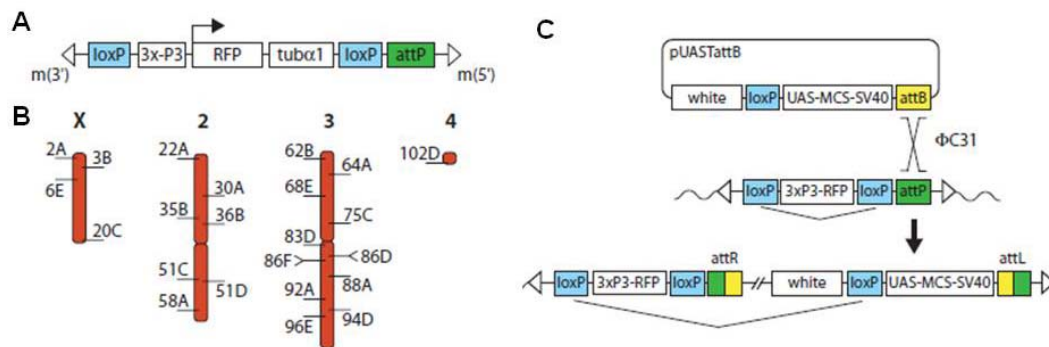


Figura 13: Integración mediada por phi-C31 en sitios attP targets. **A**, Diseño de la construcción aceptora pM {3xP3-RFPattP}, que incluye el sitio aceptor attP, el casete entre los sitios loxP contiene; marcador fluorescente con la región 3 UTR de tubulina 1 bajo el promotor 3xP3. **B**, Diagrama de los 4 cromosomas indicando los sitios que contienen la construcción aceptora ZH-attP. Se establecieron líneas aceptoras para cada uno de los sitios señalados. **C**, Esquema de integración del vector pUAST-attB en los sitios aceptores attP. Los vectores pUAST-attB contienen un casete UAS-MCS-SV40 tal que permite clonar el transgen de interés rio debajo de la secuencia UAS y un marcador fenotípico dado por el gen white, que proporciona color de ojo rojo, entre otras cosas. La recombinación mediada por phi-C31 en los sitios attB y attP generan 2 sitios nuevos híbridos, attL y attR, que no son reconocidos por la recombinasa. RFP, proteína roja fluorescente; UAS, (upstream activating sequence); MCS, sitio múltiple de clonado. Figura tomada de Bischof et al., PNAS, 2007.

Una vez obtenidos los vectores (pUAST-attB) con las construcciones clonadas, estos fueron secuenciados para corroborar la correcta inserción de las secuencias completas.

Luego, se procedió a microinyectar embriones de moscas y se recuperaron aquellos adultos en los cuales potencialmente ocurrió el evento de recombinación en el linaje germinal. Los individuos transgénicos se identificaron en la F1 por un marcador fenotípico de color de ojo. La estrategia se describe en la figura 14.

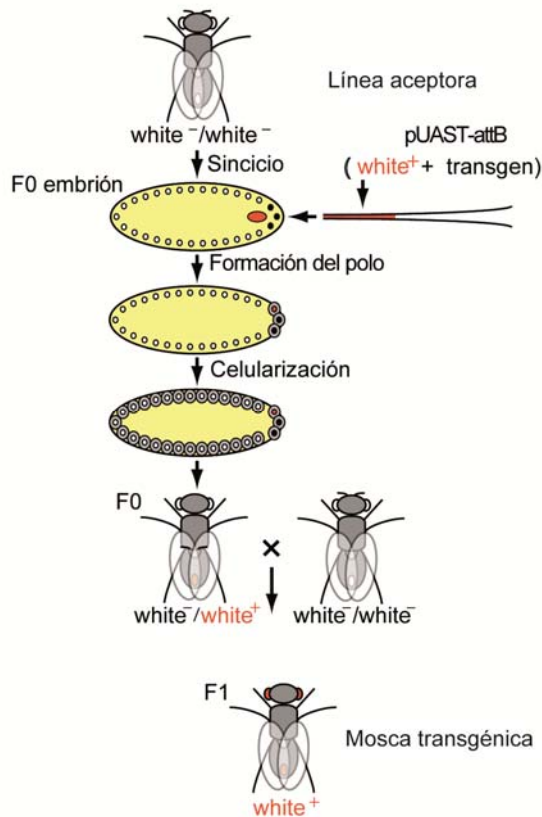


Figura 14: Esquema de transgénesis en

Drosophila. Se parte de una línea aceptora de color de ojo blanco (*white*⁻). El pUAST-attB, que contiene inserto el transgén de interés y un marcador fenotípico (gen *white*⁺), es inyectado en embriones de la línea aceptora en estadios tempranos del desarrollo donde ocurren múltiples divisiones nucleares sin celularización (sincio). Para obtener moscas transgénicas, la recombinación debe ocurrir en las células ubicadas en el polo posterior del embrión (negro), que dan origen al linaje germinal. Los adultos que provienen de embriones inyectados son potenciales portadores de gametas transgénicas y al cruzarlos con moscas de color de ojo blanco, el evento de recombinación se identifica en la F1 por medio del marcador fenotípico que da color de ojo rojo (gen *white*⁺) a las moscas transgénicas. Adaptado de Venken y Bellen. Development. Rev. 2007.

Se eligió la línea receptora ΦX-86Fb (y w M {eGFP.vas-int.Dm}ZH-2A; +; M{RFP.attP}ZH-86Fb; +) para obtener las moscas transgénicas dado que esta línea reportó niveles medios de expresión [143].

Tanto las construcciones de los plásmidos como la obtención de las líneas transgénicas fueron realizadas por la Dra. Amaranta Avendaño, durante su estadía post-doctoral en el laboratorio (2009-2011).

3.1.2 - Cría y mantenimiento de las líneas.

Las distintas líneas de *Drosophila* se mantuvieron en viales con alimento preparado a base de polenta, agar, sacarosa, levadura, nipagin y ácido propiónico. Al momento de amplificar las líneas se utilizaron botellas de 250 ml con el mismo alimento, dada su mayor capacidad.

Para seleccionar los individuos, éstos se anestesiaron utilizando CO₂ y fueron observados bajo lupa sobre una plataforma porosa con un flujo continuo de CO₂. En todos los casos se procuró minimizar el tiempo de exposición al CO₂, debido a que se ha reportado que este gas causa defectos en la fisiología y comportamiento de las moscas [144].

Para realizar los cruzamientos, unos días antes se recolectaron moscas vírgenes del genotipo deseado. Esto es imprescindible dado que las hembras cuentan con una espermateca que almacena esperma, y de no ser vírgenes, sería muy difícil determinar con precisión el genotipo de la descendencia. Posteriormente, se colocaron los individuos ~ 4-5 hembras vírgenes y 2-3 machos en los viales (a los que se les agrega una punta de espátula de levadura hidratada para optimizar la ovipuesta) permitiendo así la cruce entre los genotipos deseados. Todos los cruzamientos fueron realizados a 25°C o 28°C, según sea indicado, en incubadoras modelo I-30BLL (Percival) que permiten controlar la temperatura, humedad y ciclos de luz/oscuridad.

3.1.3 - Cromosomas balanceadores.

La utilización de cromosomas balanceadores permite mantener líneas mutantes que son letales en homocigosis y facilitar la combinación de distintos transgenes/mutaciones. Los cromosomas balanceadores están compuestos de múltiples inversiones y translocaciones, lo que impide el entrecruzamiento entre cromátidas hermanas. Además, poseen mutaciones dominantes asociadas a marcadores fenotípicos o marcadores moleculares (genes de proteínas fluorescentes, GFP y RFP, o Lac Z) que resultan sumamente útiles para el análisis de segregación de la progenie y la identificación de los genotipos deseados. Estos cromosomas también poseen mutaciones letales recesivas que impiden la generación de individuos homocigotas para los balanceadores en la progenie.

En esta tesis se utilizaron los cromosomas balanceadores CyO (pertenece al cromosoma II asociado al marcador fenotípico de alas curvas) y el TM3 (pertenece al cromosoma III, asociado al marcador fenotípico de quetas cortas). En particular, se

utilizó la línea dBw (doble balanceador en fondo genético w^{118}), que posee los balanceadores CyO y TM3 como complemento cromosómico de una fusión entre el segundo y tercer cromosoma denominada ES. Esta fusión no es un balanceador ya que no impide la recombinación en algunas regiones de los cromosomas II y III.

3.1.4 - Sistema bipartito de expresión: GAL4/UAS.

Una de las herramientas más utilizadas en *Drosophila* es el sistema binario GAL4/UAS. Este sistema heterólogo (proveniente de levaduras) permite la expresión de un gen de interés de manera tejido y tiempo específico. Se basa en la afinidad del factor de transcripción GAL4 por la secuencia UAS (Upstream Activating Sequence) [145]. Entonces, la expresión de un gen en un tejido dado se logra mediante la combinación de 2 líneas transgénicas, una que posee la construcción del promotor tejido-específico que dirige la expresión de GAL4 y otra con la secuencia del gen de interés río abajo de la secuencia regulatoria UAS; sólo aquellos individuos de la progenie que posean ambos elementos expresarán el gen de interés en el tejido deseado (Figura 15).

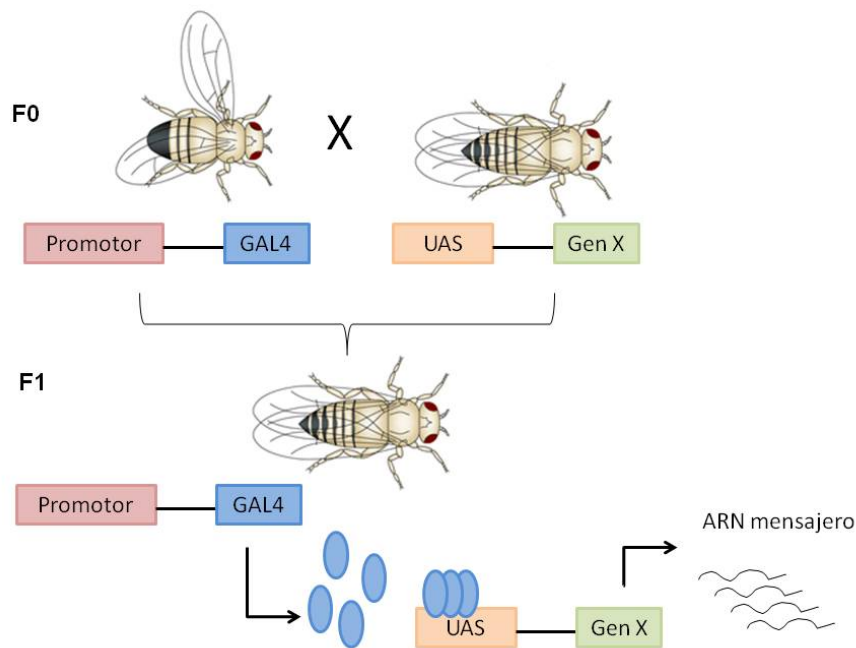


Figura 15: Sistema GAL4/UAS. Esquema del funcionamiento del sistema GAL4/UAS. A partir de 2 líneas transgénicas, una portando una construcción del promotor particular que dirige la expresión del GAL4 y otra, con la secuencia UAS río arriba del gen de interés, se cruzan y en la progenie (F1) se expresa el gen de interés en el patrón espacial y temporal del promotor elegido.

Existen grandes colecciones de líneas promotoras GAL4 (Bloomington Stock Center) y líneas UAS que permiten la sobre-expresión de un gen de interés o que dirigen la expresión de ARN de interferencia, para disminuir la expresión de una proteína dada por degradación del ARN mensajero. (VRDC, Bloomington Stock Center y Kyoto Stock Center).

3.1.5 - Líneas utilizadas.

Línea	Genotipo	Procedencia
w (1495)	y[1] w[1]	Bloomington Stock Center
<i>GMR-GAL4</i> (1104)	w[*]; P{w[+mC]=GAL4-ninaE.GMR}12	Bloomington Stock Center
<i>elav-GAL4C¹⁵⁵</i> (458)	P{w[+mW.hs]=GawB}elav[C155]	Bloomington Stock Center
<i>pdf-GAL4</i> (6900)	y[1] w[*]; P{w[+mC]=Pdf-GAL4.P2.4}2	Bloomington Stock Center
UAS- Bri ₂ -23	w; +; M{RFP, UAS-Bri ₂ -23}ZH-86Fb/TM3	Generadas en el laboratorio
UAS-HisBri ₂ -23	w; +; M{RFP, UAS-HisBri ₂ -23}ZH-86Fb/TM3	Generadas en el laboratorio
UAS-Aβ42	w; +; M{RFP, UAS-Aβ42}ZH-86Fb/TM3	Generadas en el laboratorio
UAS-HisAβ42	w; +; M{RFP, UAS- HisAβ42}ZH-86Fb/TM3	Generadas en el laboratorio
UAS-ABri	w; +; M{RFP, UAS-ABri}ZH-86Fb/TM3	Generadas en el laboratorio
UAS-HisABri	w; +; M{RFP, UAS-HisABri}ZH-86Fb/TM3	Generadas en el laboratorio
UAS-ADan	w; +; M{RFP, UAS-ADan}ZH-86Fb/TM3	Generadas en el laboratorio
UAS-HisADan	w; +; M{RFP, UAS-HisADan}ZH-86Fb/TM3	Generadas en el laboratorio
UAS-Aβ42 Hj2.12	yw; UAS- Aβ42 Hj2.12/CyO ; +	Cedida por Dr. Mary Konsolaki
UAS-XBP1-GFP	yw; UAS-XBP1-GFP/CyO; +	Cedida por Dr.Ryoo y Dr. Steller

3.2 - Biología molecular.

3.2.1 - Genotipificación de las líneas transgénicas.

3.2.1.1 - Extracción de ADN.

Se homogeneizaron 30 cabezas de moscas en 400 µl de Buffer A (Tris-HCl 100 mM pH 7,5, EDTA 100 mM, NaCl 100 mM, SDS 0,5%) en un tubo eppendorf de 1,5ml y se incubó a 65°C por 30 min. Luego, se agregaron 800 µl de una solución de KOAc 5 M: LiCl 6 M (1:2,5) y se mantuvo en hielo 10 min. Tras centrifugar a 14.000 rpm durante 15 min, se transfirió el sobrenadante (SN) a un tubo eppendorf nuevo y se le adicionaron 700 µl de isopropanol. Tras centrifugar a 14.000 rpm durante 15 min, se descartó el SN y se lavó el pellet con etanol 70% frío. Finalmente tras centrifugar nuevamente, el pellet se resuspendió en agua destilada estéril. La concentración de ADN se cuantificó mediante Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific Waltham, MA).

3.2.1.2 - Protocolo de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para amplificar los insertos correspondiente a las versiones de los péptidos con y sin tag de His, se utilizaron los siguientes pares de cebadores: Br_F1b y Br_R2 para Bri₂-23 y HisBri₂-23, Br_F1b y Br_R3 para ABri y HisABri, Br_F1b y Br_R5 para ADan y HisADan y Br_F1b y R-Aβ42 para Aβ42 y HisAβ42. El programa de PCR consistió en: un ciclo de 10 min de 95°C; 40 ciclos de 95°C 1min, 56°C 30 seg y 72°C 3 seg; un ciclo de 10 min a 72°C. Se utilizó la polimerasa KAPA Taq (Kapa Biosystems, Woburn, MA) y el ciclador Bio-Rad cyclyer (Bio-Rad, Hercules, CA). Los productos de PCR se resolvieron en un gel de agarosa 2% en TBE (Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM).

3.2.2. - Cuantificación de ARN mensajeros.

3.2.2.1 - Extracción de ARN mensajero.

Para cada experimento, se colectaron de 30-40 cabezas de moscas de la edad y genotipo estipulado, las cuales fueron colocadas en tubos eppendorf de 1,5 ml con 600 µl de Trizol (Invitrogen Carlsbad, USA) y procesadas mecánicamente. Se incubó 5 min a temperatura ambiente (TA) y luego se agregaron 200 µl de cloroformo. Se agitó por inversión y posteriormente, se centrifugó durante 10 min a 12.000 rpm a 4°C para lograr separar las fases. Se transfirió la fase acuosa (~350 µl) a un tubo eppendorf

nuevo y se le agregó 500 µl de isopropanol. Tras incubar 10 min a TA, se centrifugó nuevamente 10 min a 12.000 rpm a 4°C y descartó el SN. Se lavó el pellet con 150 µl de etanol 70% y luego se resuspendió en agua destilada estéril. Las muestras de ARN se guardaron a -80°C para evitar su degradación. La concentración de ARN se cuantificó mediante Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific Waltham, MA).

3.2.2.2 - Obtención de ADNc (Retrotranscripción, RT).

Se realizó la reacción de retrotranscripción a partir de 2,5 µg de ARN. Previamente se trataron las muestras con DNase I (Promega Madison, WI) siguiendo el protocolo de los fabricantes. Luego se realizó la retrotranscripción agregando 1 µl de Superscript II system (Invitrogen, Carlsbad, USA) para cada reacción con oligo(dT).

3.2.2.3 - PCR en Tiempo Real.

Las reacciones se realizaron usando KAPA SYBR[®] FAST qPCR Master Mix (2x) de KAPA BIOSYSTEMS (Woburn, MA) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Para correr las reacciones de amplificación se utilizó el Mx3005P Cyclor (Stratagene, Santa Clara, CA) y los datos fueron posteriormente analizados con el software MxPRO-Mx3005P.

Para cuantificar los ARN mensajeros de Bri₂-23, ABri and ADan se utilizaron los cebadores sentido nec: 5'-ATA CGA ATT CAT GGC GAG CAA AG-3' y anti-sentido 5'-GTT TCCACG GCA AAT TTG TT-3' (dado que los 3 comparten la secuencia C-terminal de Bri₂-23). Tubulina se utilizó como normalizador, empleando los cebadores sentido tubulina: 5'-GCC TGA ACA TAG CGG TGA AC-3' y anti sentido tubulina 5'-ATC CCC AAC AAC GTG AAG AC-3'.

3.2.3 - Electroforesis en SDS-PAGE y Western blot.

3.2.3.1 - Extracción de proteínas.

Se homogeneizaron con taladro 50-200 cabezas de moscas adultas en buffer RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, deoxicolato de sodio 0,5%, Triton X-100 1%), 1 µl/ cabeza y se le agregó al momento de usar SDS 1% e inhibidores de proteasas y fosfatasa (EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, leupeptina 5 µg/ml, aprotinina 10

µg/ml, pepstatina 1 µg/ml, fluoruro de sodio 50 mM y ortovanadato de sodio 5 mM). Luego, se sonicaron las muestras (30% de amplitud, con tip fino durante 10 seg, 5 veces, con intervalos de 20 seg en hielo), se dejaron reposar 30 min en hielo y luego de centrifugar a 14.000 rpm por 1 h a 4°C, se separó el sobrenadante, lo que corresponde a la fracción soluble en RIPA. En los casos indicados, los pellets remanentes fueron homogeneizados en ácido fórmico 90-100%. Tras centrifugar, se transfirió el SN a tubos eppendorf nuevos y evaporó en Speed Vac (Savant, SC100). El pellet fue resuspendido en buffer Laemmli (Tris/HCl 60 mM pH 6,8 SDS 2%, glicerol 10%, β mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0,01%) obteniendo así extractos de la fracción insoluble en RIPA.

3.2.3.2 - Corrida electroforética en condiciones desnaturalizantes y Western blots.

Las muestras fueron hervidas en buffer Laemmli con DTT 100 mM y resueltas en geles de poliacrilamida (BioRad) al 7,5-15% según se indique. Los geles fueron preparados en buffer Tris/HCl 3 M, SDS 0,3% pH 8,43 con glicerol 10,6% (v/v) persulfato de amonio 0,1% (p/v) y TEMED 0,05% (p/v). La electroforesis fue realizada con buffer cátodo (Tris/HCl 0,1 M, Tricina 0,1 M, SDS 1% pH 8,3) y buffer ánodo (Tris 0,2 M pH 8,9) a 80 V constantes. Las proteínas fueron transferidas a membradas de difluoro polivinilideno (PVDF, GE Bioscience) a 100V-400 mA constantes por 2 h, utilizando el buffer de transferencia Tris 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM, metanol 20%. Para verificar la transferencia, las membranas fueron teñidas con la solución de Rojo Ponceau (rojo ponceau 0,1% en ácido acético 5% en agua). Luego, se bloquearon con leche descremada 5% en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, NaHPO 10 mM, KHHPO 2 mM, pH 7,4) con Tween 0,1% (PBS-T 0,1%) 1h a T.A. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente en PBS-T 0,1%, leche 0,5% toda la noche a 4°C. Tras lavar 4x15 min con PBS-T 0,1%, se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente en PBS-T 0,1% leche 0,5% por 2 h a TA. Tras lavar 4x15 min con PBS-T 0,1% se procedió a revelar con ECL plus (Pierce) y a visualizar con el Storm 840 (GE Healthcare).

Las cuantificaciones de las intensidades de las bandas se realizaron utilizando el programa ImageQuant 5.1 software.

3.3 - Péptidos sintéticos.

-Aβ1-42 sintético fue obtenido del American Peptide Co.

-ABri y ADan sintéticos fueron gentilmente cedido por el Dr. Jorge Ghiso, de la Universidad de Nueva York.

3.4 - Ensayos de ELISA para A β 42.

Para el ensayo de ELISA se partió de 5-10 cabezas de moscas homogeneizadas en 50 μ l de Buffer Tris-HCl 50 mM, pH 8 conteniendo guanidina 5M e inhibidores de proteasas. Luego de centrifugar a 10.000 rpm, el sobrenadante fue colectado en un tubo eppendorf. La concentración de A β 42 fue determinada a partir de una dilución 1/50 del SN usando el kit comercial A β 42 human ELISA kit (Invitrogen Frederick, MD). Dichos valores fueron relativizados a la concentración de proteínas totales en las muestras medidas por Kit de BCA (Thermo Scientific, Rockford, IL).

3.5 - Toxicidad en el ojo.

Las moscas que sobre-expresan 1-2 copias de los péptidos en el ojo (*GMR-GAL4*) fueron criadas a 25°C o 28°C y analizadas bajo el microscopio óptico con luz transmitida (microscopio OLYMPUS Bx60) y por microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM). Para realizar ESEM, se usó un microscopio XL30 (Philips) a 20.0 kV y 0.9 Torr en modo auxiliar. Esta técnica no requiere de recubrimiento con metal del tejido. Se obtuvieron por lo menos 10 fotos de individuos de cada genotipo y se cuantificó el número total de omatidias, de omatidias fusionadas y de quetas en un área dada. Los análisis fueron hechos por el método de doble ciego y utilizando el programa Image J para visualizar las imágenes.

3.6 - Histología e Inmunohistoquímica.

3.6.1 - Armado del taco de parafina.

Para realizar los cortes de cerebros de moscas, las cabezas fueron fijadas en solución de Carnoy (etanol 60%, cloroformo 30%, ácido acético 10%) a 4°C toda la noche. Posteriormente, fueron deshidratadas con diluciones crecientes de etanol en agua (2x 70%, 2x 96%, 2x 100%). Luego, las muestras fueron tratadas 30 min con butanol: etanol (1:1), butanol: tolueno (1:1), tolueno y finalmente butanol: parafina (1:1) 30 min a 65°C. Luego de 2 incubaciones en parafina fresca a 65°C (1 h cada una), se armó el taco de parafina acomodando las cabezas bajo lupa y posteriormente, se cortaron en secciones frontales de 8 μ m con un micrótomos Microm HM 325.

3.6.2 – Desparafinización.

Previo a realizar las tinciones e inmunohistoquímicas, se removió la parafina de los cortes. Para ello se realizaron 3 lavados de 7 min c/u con xilol, bajo campana. Luego, se procedió a rehidratar los tejidos, con pasajes de 5 min por soluciones de etanol en concentraciones decrecientes: 100%, 96%, 90%, 80%, 70% y por último agua pura.

3.6.3 - Tinción con Hematoxilina/Eosina y cuantificación de la toxicidad tisular.

Una vez removida la parafina, se incubaron los cortes con hematoxilina en recipientes de “Coplin” por 1 min, luego se enjuagó con agua corriente e incubó con eosina por 15 seg. Tras una serie de pasajes por etanol 70% 96%, 100 % y xilol, se procedió a montar los cortes con Bálsamo de Canadá. Las imágenes fueron capturadas con un microscopio OLYMPUS Bx60 y visualizadas con el programa Image Pro Plus (Media Cybernetics).

Para cuantificar el área de tejido perdida se analizó la cantidad y tamaño de las vacuolas presentes. Se consideró vacuola a aquella mayor a 3 μ m de diámetro [146] y el porcentaje de tejido perdido se calculó dividiendo el total de área perdida sobre el área de la región de cerebro analizada. Se utilizó el software Image J para visualizar y contabilizar la imágenes. Al menos 8 cerebros de cada genotipo fueron analizados.

3.6.4 – Inmunohistoquímica.

Una vez removida la parafina, se realizó un tratamiento de recuperación de antígeno el cual consistió en incubar los cortes en buffer citrato (citrato de sodio 10 mM, Tween 20 0.05%, pH 6.0), durante 30 min a 92°C. Luego de lavar con agua, se permeabilizaron los tejidos con PBS-T 0,3% por 20 min y enjuagó con PBS. Se inactivaron las peroxidasas endógenas del tejido mediante la incubación con agua oxigenada 0,3% en metanol durante 30 min a TA. Se lavó con agua corriente y procedió a bloquear con suero normal de burro o cabra 10% en PBS-T 0,3% por 1 h. Luego se incubaron los tejidos con los anticuerpos primarios en PBS-T 0,3%, suero normal de burro o cabra 10%. Transcurrido el tiempo, se realizaron 5 lavados de 5 min con PBS-T 0,05% y se agregaron los anticuerpos secundarios conjugados a biotina en PBS-Tween 0,3% suero normal de burro o cabra 10% por 1 h. Luego de 5 lavados de 5 min, se incubaron los cortes con estreptavidina peroxidasa en PBS-Tween 0,3% en suero normal de burro o cabra 10% por 1h. Finalmente, tras 5 lavados de 5 min, se

procedió a revelar con diaminobencidina (DAB). Se preparó la solución de trabajo de DAB (DAB 0,05%, peróxido de hidrógeno 0,01%) y en algunos casos se agregó níquel para aumentar la señal. Los cortes se incubaron con la solución de DAB por no más de 8 min para evitar saturación y se frenó la reacción enjuagando con agua destilada. En los casos indicados se realizaron contra-tinciones con hematoxilina (60 seg de incubación). Por último, para montar los preparados, se deshidrataron los tejidos incubando los mismos con concentraciones crecientes de etanol (70%, 80%, 96%, 100%) y con 2 pasajes por xilol y finalmente, fueron montados con Bálsamo de Canadá.

3.6.5 - Tinción con Tioflavina S.

Para la detección de fibras amiloides en los cortes de tejido primero se removió la parafina (descrito en la sección anterior) y luego, se los incubó con una solución de Tioflavina S 1% en etanol 50% (Sigma St. Louis, MO) por 20 min. Se lavó 3 veces con etanol 50%, posteriormente con PBS y los cortes fueron montados con Mowiol (Sigma). Las tinciones se visualizaron con un microscopio Confocal (Carl Zeiss LSM510).

3.6.6 - Inmunofluorescencia del disco imaginal de ojo en larva 3 tardía.

Las larvas 3 fueron removidas de los viales con pincel humedecido en PBS y colocadas sobre placas de SYLGARD 184 (Dow Corning). Bajo lupa, se procedió a remover los discos imaginales de ojo y antena, utilizando pinzas de disección n°5 (Dumont) y colocarlos en una solución fijadora de paraformaldehído (PFA) 4% en buffer fosfato (PB) 0,1M durante 30 min a TA. Luego de enjuagar los discos con PBS para remover el excedente de fijador, se los bloqueó durante 1 h con suero normal de cabra 10% en PBS-Tritón 0,1%. Posteriormente, se los incubó con los anticuerpos primarios específicos diluidos en PBS-Tritón 0,1% con suero normal 10% según corresponda, a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se realizaron 5 lavados de 5 min, se agregaron los anticuerpos secundarios marcados con Cy2 y Cy5 diluidos en PBS-Tritón 0,1% con suero normal 10% e incubaron durante 2 h a TA. Luego de 5 lavados de 5 min, los discos fueron montados sobre portaobjetos en una solución de glicerol 80% en PBS y posteriormente sellados con un cubreobjetos remarcado con esmalte para uñas. Las imágenes fueron obtenidas con el microscopio Confocal Carl Zeiss Meta 510 (Carl Zeiss, Thornwood, NJ).

3.6.7 - Inmunofluorescencia en cerebros de moscas adultas.

Las moscas fueron decapitadas utilizando pinzas de disección nº5 (Dumont) bajo una lupa (Leica CLS 100X) y las cabezas fueron colocadas en la solución de fijación (PFA 4%, PB 0,1M) durante 40 min a TA. Luego, las mismas fueron enjuagadas con PBS-Tritón 0,1% y disecadas sobre placas de SYLGARD 184 (Dow Corning) bajo lupa. Los cerebros obtenidos fueron colocados en tubos eppendorf de 1,5 ml y para eliminar los restos de fijador se realizaron 3-5 lavados de 10 min en PBS-Tritón 0,1% a TA. Luego de bloquearse durante 1h con suero normal de cabra 10% en PBS-Tritón 0,1%, se los incubó con los anticuerpos primarios específicos diluidos en PBS-Tritón 0,1% con suero normal 10% según corresponda, a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se realizaron 5 lavados de 5 min, se agregaron los anticuerpos secundarios diluidos PBS-Tritón 0,1% con suero normal 10% e incubaron durante 2 h a TA. Luego de 5 lavados de 5 min, los cerebros fueron montados en portaobjetos en una solución de glicerol 80% en PBS y posteriormente sellados con un cubreobjetos enmarcado con esmalte para uñas. Las imágenes fueron obtenidas con el microscopio Confocal Carl Zeiss Meta 510 (Carl Zeiss, Thornwood, NJ).

3.7 - Anticuerpos.

3.7.1 - Anticuerpos primarios.

Nombre	Origen	Epitope	Aplicación	Dilución
Anti-Aβ	6E10, Signet	Monoclonal, en ratón	Western blot	1/1000
			Inmunohistoquímica	1/100
Anti-ABri	Cedido por Dr. Vidal	Policlonal, en conejo	Western blot	1/1000
			Inmunohistoquímica	1/100 del suero purificado.
Anti-ADan	Cedido por Dr. Vidal	Policlonal, en conejo	Western blot	1/1000
			Inmunohistoquímica	1/100 del suero purificado.
Anti-His	Abcam, Cambridge, MA	Monoclonal, en ratón	Western blot	1/500
Anti-His	Qiagen, Valencia	Monoclonal, en ratón	Western blot	1/500
Anti-BRP	nc82, DSHB	Monoclonal, en ratón	Western blot	1/100

Anti-ELAV	DSHB	Monoclonal, en ratón	Inmunofluorescencia	1/10
Anti-GFP	Sigma	Policlonal, en conejo	Inmunofluorescencia	1/500
Anti-PDF	Lab. Dra. Ceriani. *	Policlonal, en rata	Inmunofluorescencia	1/500

*, (Depetris Chauvin et al., 2011), DSHB, Developmental Studies Hybridoma Bank.

Para obtener los sueros purificados de ABri y ADan se realizó el siguiente procedimiento. Se incubaron 500 µl del suero con 10 µl de proteína A sefarosa en buffer Tris 100 mM, NaCl 0,135 M pH 8 (con agitación) toda la noche. Tras centrifugar 2 min a 3.000 rpm a TA, se descartó el SN y se realizaron lavados, 3 veces con Tris 100 mM pH 8 y 3 veces con Tris 10 mM pH 8. Luego, se agregaron 45 µl de glicina 100 mM pH 3 y se mantuvo en agitación por 20 min a TA. Tras centrifugar 1 min a 3.000 rpm, se transfirió el SN a tubos eppendorf con 5 µl de Tris 2 M pH 8 a los que se les agregaron 50 µl de NaCl 300 mM. La concentración de proteínas se midió en el Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific Waltham, MA).

3.7.2 - Anticuerpos secundarios.

Para Inmunohistoquímica (todos de Jackson IR):

- IgG anti ratón-Biotina, dilución 1/500.
- IgG anti conejo- Biotina, dilución 1/500.
- IgG Streptavidina-HRP, dilución 1/500.

Para inmunofluorescencia (todos de Jackson IR).

- IgG anti ratón-Cy5, dilución 1/500.
- IgG anti conejo-Cy2, dilución 1/500.
- IgG anti rata-Cy5, dilución 1/500.

Para Western blots, (todos de Santa Cruz).

- IgG anti conejo-HRP, dilución 1/5000.
- IgG anti ratón-HRP, dilución 1/10.000.

3.8 - Análisis del comportamiento.

3.8.1 – Longevidad.

Las moscas que sobre-expresaron 1 ó 2 copias de Bri₂-23, Aß42, ABri y ADan de manera pan-neural (*elav-GAL4*) se mantuvieron a 25°C durante su desarrollo (~10 días) y fueron envejecidas a 25°C ó 28°C. Se partió de 100 individuos de cada genotipo, los cuales se repartieron en 5 viales de 20 individuos para evitar el hacinamiento y se los repicó cada 2-3 días a viales con comida fresca registrando a su vez, el número de individuos muertos a lo largo del tiempo. Los datos se analizaron con el test de Log-Rank (Mantel-Cox), utilizando el GraphPad Prism v 5.0.

3.8.2 - Geotaxis negativa (*Rapid Iterative Negative Geotaxis, RING*).

Las moscas que sobre-expresaron 1 ó 2 copias de Bri₂-23, Aß42, ABri y ADan de manera pan-neuronal (*elav-GAL4*) se mantuvieron a 25°C durante su desarrollo (~10 días) y fueron envejecidas a 25°C o 28°C en grupos de 40 machos en viales con alimento, los cuales fueron repicados cada 2-3 días. El comportamiento de escalada fue evaluado utilizando el método de RING [147]. Brevemente, un día antes del ensayo, 10 machos de cada genotipo seleccionados al azar fueron transferidos a viales nuevos. Al día siguiente, 30 min antes de realizar el ensayo, los machos fueron transferidos sin anestesia a viales de vidrio limpios y cargados en el aparato RING (como se muestra en la figura 16). Este aparato permite mantener rígidos y juntos a 6 viales de vidrios. Para iniciar el ensayo, el aparato es golpeado suavemente (contra la mesada en sentido vertical 3 veces), de tal manera que todas las moscas se ubiquen en el fondo de cada tubo. A partir de allí, se evalúa la capacidad de respuesta de las moscas, mediante la toma de una fotografía a un tiempo dado. El procedimiento se repitió al menos 7 veces, con intervalos de 1 minuto. Las 2 primeras repeticiones no se incluyeron en el análisis ya que se consideró que forman parte de la habituación. Con la utilización del software Scion Image se calculó la altura promedio de cada genotipo (promedio obtenido por la altura alcanzada por 10 individuos) y luego, se reportó el promedio general de 5 repeticiones para cada genotipo.



Figura 16: Dispositivo RING. El aparato permite colocar 6 viales de vidrio (aquí se muestran solo 5), los cuales contienen a las moscas. El dispositivo es golpeado suavemente para asegurar que las moscas estén abajo al comenzar la prueba y se las deja escalar por un tiempo dado, al cual se toma una fotografía. Las flechas indican las moscas dentro de cada vial.

Para los análisis comparativos entre los genotipos Bri₂.23, Aβ42, ABri y ADan se calculó la altura alcanzada a los 4 seg de iniciado el ensayo, mientras que para los experimentos del rastrillaje genético (se describe a continuación), se calculó la altura alcanzada a los 10 seg de iniciado el ensayo. Esta variación en el tiempo de análisis se fundamentó en que tomamos como referencia que las moscas controles para cada caso escalen entre 4-6 cm en el tiempo establecido, así podríamos registrar mejorías y empeoramientos de dicha condición.

3.8.3 - Fototaxis positiva.

Las moscas que sobre-expresan 1 copia de Bri₂-23, Aβ42, ABri y ADan de manera pan-neuronal (*elav-GAL4*) fueron criadas y envejecidas a 25°C. Para realizar la prueba se utilizó el dispositivo mostrado en la figura 17 y se adaptó el protocolo descrito en [148]. Un día antes del ensayo, 30 machos de cada genotipo fueron seleccionados al azar y transferidos a viales nuevos. Al día siguiente, 30 min antes de realizar el ensayo, los machos fueron transferidos a un cuarto con luz roja. Posteriormente, las moscas fueron transferidas a un tubo de vidrios vacío y, por 2 min se les permitió moverse hacia los tubos colectores iluminados con luz blanca. Se analizó de a un genotipo a la vez. Se registró el número de moscas que se movieron hacia la luz, expresándolo como porcentaje de moscas que respondieron a la luz sobre el total de individuos utilizados en el ensayo.

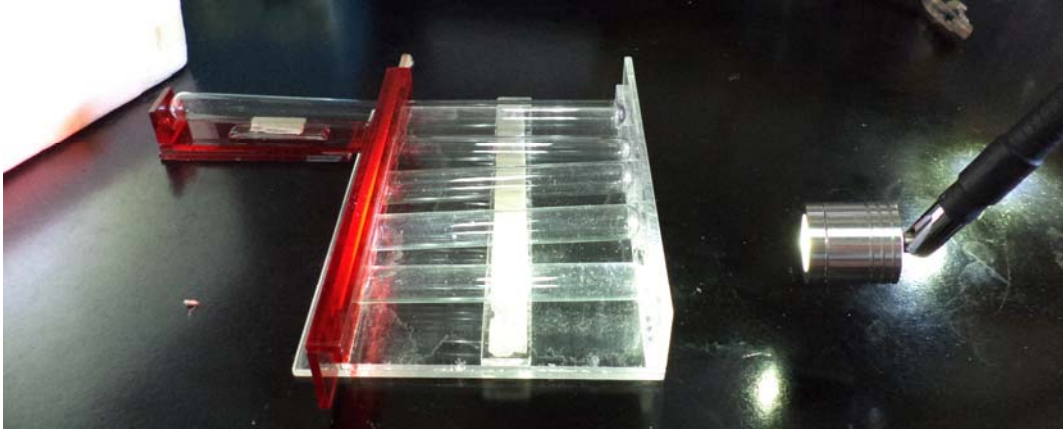


Figura 17: Dispositivo para el ensayo de fototaxis. Las moscas se colocan dentro de un tubo (tubo a la izquierda de la foto) que luego es protegido de la luz. En el otro extremo se coloca una fuente de luz que se enciende una vez iniciado el ensayo y se deja a los individuos moverse libremente a los tubos iluminados por el tiempo estipulado deslizando a suavemente el tubo de la izquierda. Una vez finalizado el ensayo, se cuenta el número de individuos que se desplazaron a los tubos iluminados y los remanentes en el original.

3.8.4 - Actividad locomotora circadiana.

Para registrar la actividad locomotora de las moscas, cada individuo fue colocado en tubos de vidrio de 3 mm de diámetro interno y, éstos a su vez, en monitores de actividad locomotora (TriKinetics Waltham, MA) con 32 posiciones (Figura A y B). Cada posición se encuentra flanqueada por un emisor y detector de luz infrarroja que permite registrar el movimiento individual de cada mosca en cada tubo y así, obtener su patrón de actividad. La luz infrarroja no afecta el patrón de comportamiento estudiado, ya que tanto el sistema visual como el sistema circadiano de *Drosophila* son insensibles a la luz de longitud de onda entre 850 y 950 nm. Una vez completados los monitores, estos fueron colocados en incubadoras que controlan la temperatura y la luz; y se los conectó a la computadora que adquiere los datos de cada canal (es decir de cada mosca individualizada) e integra la actividad registrada en intervalos predeterminados (5 o 30 min). Esto permite un monitoreo automatizado de la actividad locomotora (Figura 18 C y D).



Figura 18. Registro automatizado de la actividad locomotora. **A**, Se muestra una mosca colocada en el tubo que contiene alimento en un extremo. **B**, Se muestra un monitor de actividad con conteniendo los tubos individuales, cada uno con una mosca en su interior. En cada posición del monitor la actividad es registrada con un emisor y un detector de luz infrarroja; el desplazamiento de las moscas dentro del tubo interrumpe el haz de luz y cada interrupción es contabilizada como un evento. **C-D**, Los monitores se colocan dentro de la incubadora y conectan al sistema de detección los cuales se registran en la computadora.

Los datos obtenidos fueron analizados con el software comercial Matlab (una aplicación ClockLab, Actimetric, USA), el cual permite visualizar el patrón de actividad de cada individuo mediante la generación de “actogramas” y el cálculo del período asociado a cada individuo a través de “periodogramas” (Figura 19). Asimismo, este programa cuenta con un paquete estadístico que permite validar cada observación con un cálculo de probabilidad asociada.

Para este tipo de experimentos las moscas fueron sincronizadas a un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad por 4 días a 25°C, denominada fase de entrenamiento o sincronización. Al 5to día los animales fueron transferidos a oscuridad constante entrando en lo que se determina como fase de libre curso.

De acuerdo con el periodograma, y mediante inspección visual de los actogramas, es posible categorizar los distintos comportamientos en: **1-** Individuos Rítmicos: cuando los datos se ajustan a una función con un período de una sola frecuencia (entre 14 y 34 h); **2-** Individuos Débilmente Rítmicos: cuando existe uno o más componentes rítmicos pero la probabilidad asociada a esta determinación es cercana a $p=0,05$; **3-** Individuos Arrítmicos: cuando los datos no se ajustan a ninguna función periódica. En la figura 19 hay ejemplos de ellos.

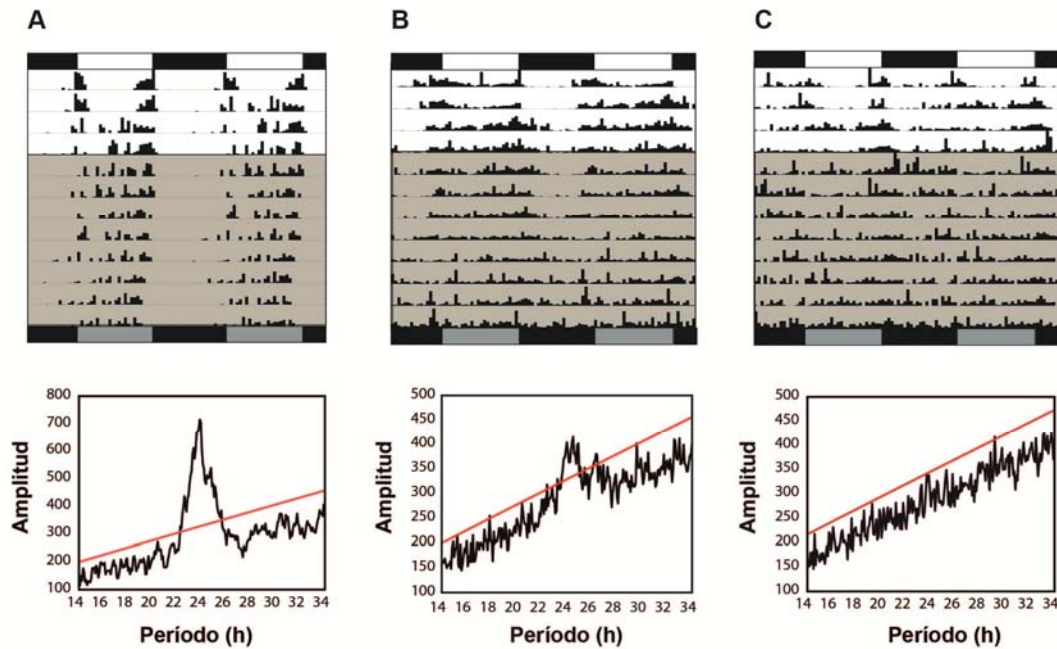


Figura 19. Visualización de la actividad locomotora. Clocklab permite evaluar el comportamiento locomotor circadiano, determinando parámetros de Ritmicidad y Periodicidad. En la parte superior se encuentran los actogramas, cada uno muestra la actividad de un individuo en 4 días en luz/oscuridad (fondo blanco) y 8 días oscuridad constante (fondo gris); las barras blancas y grises indican los días y días subjetivos, respectivamente y las barras negras indican noche y noche subjetiva. En la parte inferior se muestran los periodogramas; la barra diagonal indica la línea de corte para una significancia de 0,05 en la determinación del período. Al categorizar de patrones comportamentales se pueden definir: A) ejemplo de una mosca con actividad consolidada y período de 24 h; B) un animal débilmente rítmico en el que se observa la desconsolidación de la actividad locomotora con elevados niveles de actividad durante la noche subjetiva. Nótese que la significancia de la asignación del período es baja. C) un ejemplo de animal arrítmico (nulo para un componente del reloj) e imposible de asignarle un período.

En esta tesis se evaluó la sobre-expresión de 2 copias de *Bri₂-23*, *Aβ42*, *ABri* y *ADan* en las neuronas circadianas PDF positivas (*pdf-GAL4*) o de manera pan-neuronal (*elav-GAL4*) en moscas envejecidas a 25°C. Los machos fueron mantenidos en condiciones de luz-oscuridad hasta el comienzo del experimento. Machos jóvenes (3-5 días de edad) y envejecidos (15-25 días de edad) fueron colocados en los monitores de actividad dentro de la incubadora y conectados a la computadora. Se registró la actividad locomotora en condiciones de luz/oscuridad por 4 días y luego se cambió a condición de oscuridad constante por 8-10 días adicionales. A partir de los registros en oscuridad constante, se estimaron los parámetros de ritmicidad y período promedio.

3.9 - Activación y cuantificación de la respuesta a estrés de RE.

Ryoo y Steller desarrollaron una herramienta genética que permite medir *in vivo* activación de la respuesta de estrés de RE vía IRE-1 mediada por XBP1 en diversos tejidos de *Drosophila*. Para ello generó una construcción que contiene una porción de la secuencia de XBP1, que incluye el sitio de unión al ADN y el sitio del splicing por IRE-1, fusionada a GFP (Figura 20) y obtuvieron líneas transgénicas UAS-XBP1-GFP. Al sobre-expresar esta construcción, mediante el sistema binario GAL4/UAS, se puede evidenciar la activación de la vía de IRE-1, dado que el ARNm de XBP1 sufre un splicing no convencional provocando que la secuencia codificante de GFP quede en marco de lectura y pueda ser traducida. En condiciones basales, al no producirse el splicing, no se traduce GFP.

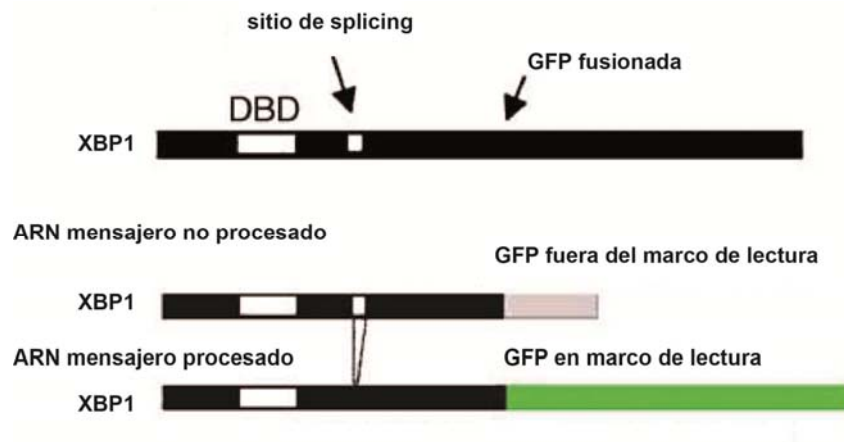


Figura 20: Esquema del reportero de splicing no convencional de XBP1. Cuando el ARN mensajero no es procesado, la GFP queda fuera del marco de lectura y no se traduce, mientras que cuando ocurre el procesamiento del ARN mensajero, la proteína GFP queda en marco de lectura, generando una proteína funcional. DBD, dominio de unión al ADN. Adaptada de Ryoo y Steller 2007.

Se analizó la activación de la respuesta a estrés de RE por co-expresión del reportero UAS-XBP1-GFP con los péptidos. Para ello se disecaron discos imaginales de ojo y cerebro de mosca, como se describió en la sección 3.6.6 y 3.6.7.

Para cuantificar la fluorescencia a partir de las inmunohistoquímicas de cerebros enteros, se analizaron las fotos con el software Image J, cuantificando la máxima intensidad dada en un área pre-seleccionada y restándole el fondo.

3.10 - Identificación de genes moduladores de la toxicidad de A β 42.

Para la realización del rastrillaje genético se plantearon los siguientes pasos y controles:

3.10.1 – Protocolo.

1- Ensayo de geotaxis:

Se cruzó la línea *elav-GAL4>A β 42Hj2.12* con líneas mutantes pertenecientes a la colección “Deficiency Kit” (Bloomington Deficiency Kit, Parks et al., 2004) y evaluó el fenotipo de escalada dentro de paradigma de geotaxis negativa. La colección de deficientes está compuesta por ~ 500 líneas de moscas, cada una de ellas presenta deleciónado una porción del genoma que abarca, en promedio, 30 genes. En total, toda la colección presenta una cobertura del 98% del genoma de *Dm*.

2- Selección de líneas deficientes que modulan el fenotipo tóxico de A β 42:

Se evaluó si la combinación entre A β 42 y cada línea deficiente afecta el fenotipo comportamental de geotaxis negativa provocado por la sobre-expresión de A β 42, en moscas jóvenes y envejecidas. Una vez cuantificada la altura promedio que alcanzaron las moscas de cada genotipo, se seleccionan aquellas líneas deficientes que mejoraron o empeoraron el fenotipo de escalada respecto de la línea que sobre-expresó solo A β 42, como se muestra en el esquema de la figura 21. Cabe destacar que, a los fines de un rastrillaje de alto rendimiento, se seleccionaron las líneas deficientes que provocaron cambios en aproximadamente $\pm$ 50% del promedio escalado respecto de la línea *elav-Gal4>A β 42Hj2.12*.

3- Chequeo de las líneas deficientes candidatas:

Dado que aquí nos interesó encontrar interacciones génicas, una vez seleccionadas aquellas líneas deficientes que mejoraron o empeoraron el fenotipo tóxico de A β 42, se procedió a evaluar si dichas líneas deficientes presentan defectos en la escalada por sí solas. Esto permitió descartar efectos independientes de a la toxicidad de A β 42.

4- Análisis y evaluación de los genes candidatos incluidos en las líneas deficientes:

A partir de las líneas deficientes que modularon el fenotipo tóxico de A β 42, se procedió a identificar los genes que poseen deleciónados y mediante análisis bioinformáticos se seleccionaron aquellos que cumplen con los criterios establecidos; genes que presenten ortólogos en humanos y se expresen en el SNC. Luego, se

evaluó la interacción directa entre la disminución de la expresión del gen candidato (mediante ARN de interferencia) y la sobre-expresión de A β 42.

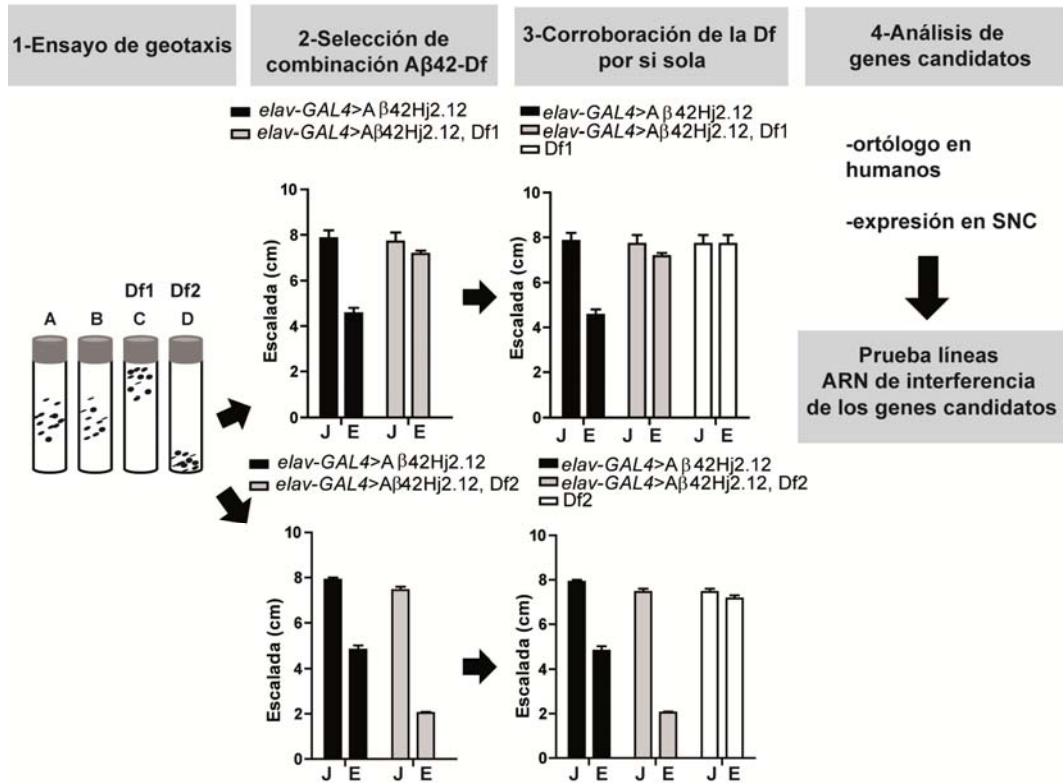


Figura 21: Esquema representativo de los pasos a seguir en el ensayo. 1-Se realiza el ensayo de geotaxis. Siempre se incluye la línea *elav-GAL4>A β 42Hj2.12* (A) como control interno del experimento. Se muestran los 3 efectos que pueden encontrarse al combinar *elav-GAL4>A β 42Hj2.12* x Df: que no haya modulación (B), que el mejore la escalada (C, Df1) o que empeore (D, Df2) respecto de la línea *elav-GAL4>A β 42Hj2.12* (A). 2-Cuantificación y selección de las Df que modulan el fenotipo tóxico de A β 42. J, individuos jóvenes. E, individuos envejecidos. 3- Corroboração que la Df no tenga defectos en la escalada por sí sola. 4- Análisis de genes candidatos incluidos en las Df seleccionadas. Criterios de elección: que presenten ortólogos en humanos y expresión en SNC. Se realizan análisis de interacción génica mediante líneas de ARN de interferencia específicos de dichos genes.

3.11 - Análisis estadísticos.

Los resultados fueron expresados como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM). Se utilizaron los softwares Graph Pad Prism v.5.0 e Infostat (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) para realizar los análisis estadísticos. Los datos fueron analizados mediante pruebas-t de Student, ANOVA de 1

y 2 factores, asociados a medidas repetidas, contrastados con test post hoc. Un valor $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Los supuestos del ANOVA de normalidad y homogeneidad de varianza se evaluaron mediante la prueba de Shapiro-Wilks y de Levene, respectivamente.

4 – Resultados.

4.1 - Capítulo 1: Estudio comparativo de la toxicidad de A β 42, ABri y ADan en *Drosophila*

4.1.1 - Producción y acumulación de los amiloides A β 42, ABri y ADan *in vivo*.

4.1.1.1 - Generación de las líneas transgénicas.

Se generaron líneas de moscas transgénicas que sobre-expresan los péptidos amiloides A β 42, ABri, ADan y el producto normal de la proteína BRI₂, el péptido Bri₂-23, en la vía secretoria. Para ello, se fusionó la secuencia señal de exportación al retículo endoplásmico de la proteína Necrotic (nec) de *Drosophila* a cada una de las secuencias de los péptidos. Esta estrategia fue descrita y utilizada anteriormente por Crowther y colaboradores [122]. Además, se generó un set de construcciones de fusión que incluyeron un tag de 6 Histidina (His) en el extremo N-terminal de cada péptido con el objetivo de poder comparar por Western blot sus niveles de acumulación usando un mismo anticuerpo.

En la figura 22 se muestra un esquema de las construcciones utilizadas.



Figura 22: Esquema representativo de las construcciones utilizadas para generar las líneas transgénicas. Secuencias de los péptidos usando el código de una letra de los aminoácidos. Nec es el péptido señal de la proteína Necrotic de *Drosophila* (MASKVSILLLLTVHLLAAQTFAQ), (H)₆ indica seis Histidinas que conforman el tag. La flecha indica el corte del péptido señal en la vía secretoria. En rojo se muestra la secuencia común entre Bri₂-23, ABri y ADan.

La estrategia más utilizada para generar líneas transgénicas implica la inserción al azar de un plásmido que contiene el transgen de interés en el genoma de la mosca. Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado estrategias de inserción sitio-dirigidas de los plásmidos [149]. Dado que el objetivo principal del trabajo fue realizar estudios comparativos entre los 3 péptidos amiloides, la estrategia de inserción sitio-dirigida se consideró la opción más adecuada ya que permite obtener niveles de expresión comparables entre los transgenes.

En este caso, se decidió utilizar el sistema de inserción sitio-dirigido modificado por Bischof y colaboradores [143]. Para ello se clonaron las construcciones descritas en el vector pUAST-attB (Materiales y Métodos) y posteriormente se microinyectaron en embriones de la línea aceptora 86Fb (yw M{eGFP.vas-int.Dm}ZH-2A; +; M{RFP.attP}ZH-86Fb; +) obteniendo en la progenie las moscas transgénicas.

Una vez establecidas las líneas transgénicas, se corroboró por PCR a partir de ADN genómico que las mismas posean las construcciones del tamaño esperado (Figura 23).

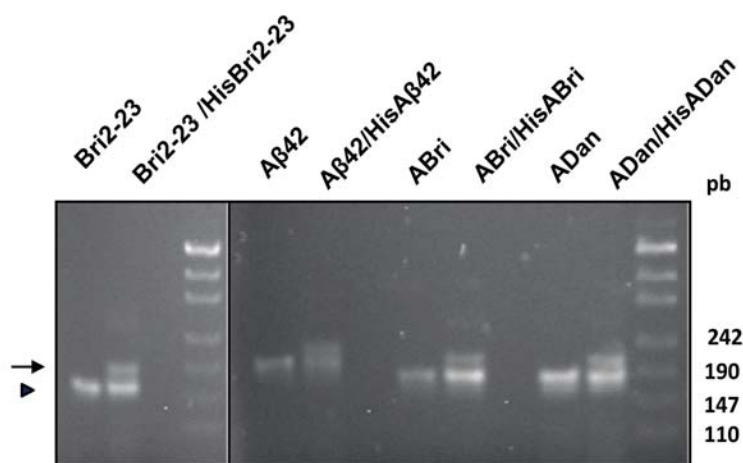


Figura 23: Productos de PCR obtenidos a partir de ADN genómico de moscas transgénicas. La cabeza de flecha muestra los productos sin tag de His, mientras que la flecha señala las versiones con tag de His. Los productos fueron obtenidos con cebadores específicos para los 4 péptidos y resueltos en un gel de agarosa 2% en TBE. pb, pares de bases.

Las líneas transgénicas establecidas y corroboradas fueron posteriormente combinadas con líneas promotoras para dirigir la expresión de los péptidos al tejido a estudiar.

4.1.1.2 - Expresión y procesamiento de Bri₂-23, Aβ₄₂, ABri y ADan.

Para evaluar el correcto procesamiento proteolítico de Bri₂-23, Aβ₄₂, ABri y ADan, se sobre-expresaron los péptidos de fusión en fotorreceptores del ojo de *Drosophila* mediante el sistema GAL4/UAS (sistema que permite la expresión tejido-específica de los transgenes, descrito en Materiales y Métodos). Para ello se utilizó el promotor GMR (del inglés "Glass Multiple Reporter") que consta de la región regulatoria del gen *glass* el cual codifica para una proteína de unión a ADN y se

expresa en los fotorreceptores durante los primeros estadios de desarrollo del ojo [150].

En primer lugar se evaluó si los niveles de expresión de los ARN mensajeros de los péptidos eran similares. Para ello, se sobre-expresaron los péptidos usando el promotor *GMR-GAL4*, se extrajo ARN de cabezas de moscas que se retrotranscribió a ADNc y se realizaron PCRs en Tiempo Real para su cuantificación. Dado que Bri₂-23, ABri y ADan comparten la secuencia N-terminal, se diseñó un par de cebadores para medir los niveles de expresión de los mismos. Como era de esperar, no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de los 3 péptidos (Figura 24), permitiendo así comparar los posibles efectos tóxicos en forma independiente de sus tasas de transcripción. Asimismo, es importante mencionar que los niveles de expresión de A β 42 fueron similares, aunque no es correcto incluirlos en el análisis dado que se utilizó un juego distinto de cebadores.

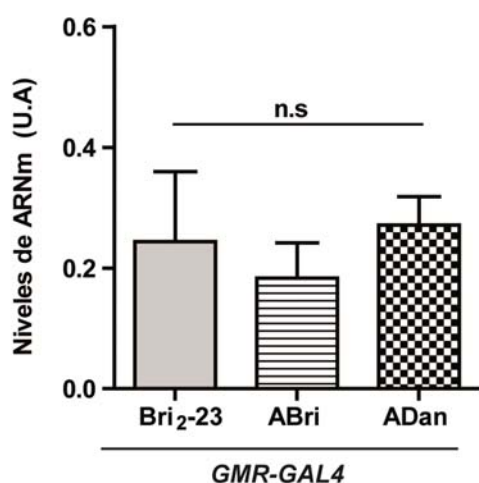


Figura 24: Niveles de expresión de los ARN mensajeros de Bri₂-23, ABri y ADan. ARN mensajeros medidos por PCR en Tiempo Real, normalizados con ARN mensajeros de tubulina. Se muestran las medias $\pm$ error estándar de 3 experimentos independientes. ANOVA de 1 factor. U.A = unidades arbitrarias. ns, diferencias no significativas ($p > 0,05$).

Luego, se analizó el correcto procesamiento proteolítico de los péptidos de fusión en la vía secretoria y su acumulación *in vivo*. Se prepararon homogenatos de proteína en buffer RIPA SDS 1% a partir de cabezas de moscas y se analizaron por Western blot. Dado que para Bri₂-23 no se contaba con un anticuerpo específico, se utilizó la versión HisBri₂-23. En extractos *GMR-GAL4*>HisBri₂-23 se observó una banda débil de ~3 kDa, compatible con el tamaño teórico del péptido procesado (post-remoción de la secuencia nec). A partir de extractos de *GMR-GAL4*>A β 42, *GMR-GAL4*>ABri y *GMR-GAL4*>ADan se evidenció inmunoreactividad positiva concordante con las masas moleculares aparentes de los monómeros de A β 42, ABri y ADan, respectivamente utilizando anticuerpos específicos para cada péptido (Figura 25).

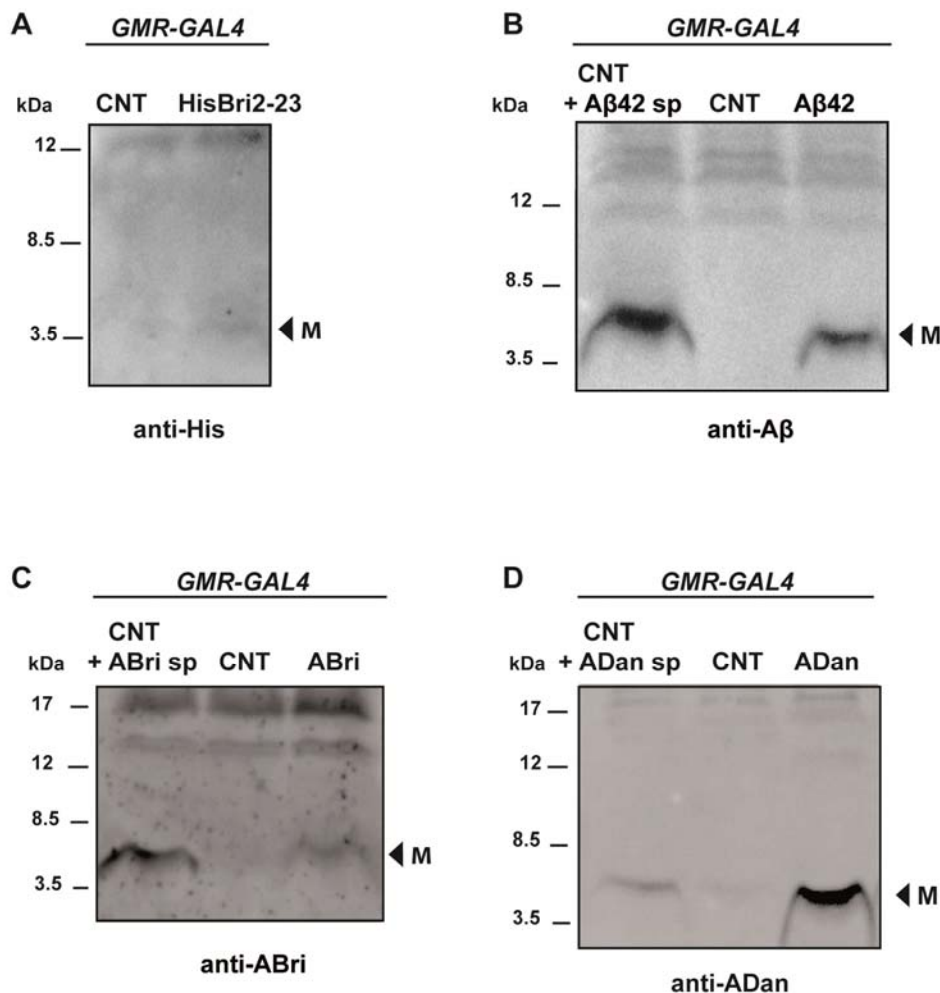


Figura 25: Procesamiento de los péptidos. Geles representativos de Western blots a partir de extractos proteicos solubles en RIPA SDS 1% obtenidos moscas que expresaron con *GMR-GAL4* 2 copias de Aβ42 y ADan (~15 cabezas) y HisBri₂-23 y ABri (~25 cabezas). **A**, Detección de una banda muy tenue de 3 kDa consistente con el monómero de HisBri₂-23, utilizando anti-His **B**, Aβ42 de ~4,5 kDa detectado con anti-Aβ (6E10). CNT+ Aβ42 sp, corresponde a un extracto proteico de moscas control con péptido sintético de Aβ42 añadido a la muestra para asegurar una migración comparable. **C**, ABri detectado con suero anti-ABri (338), en la calle de la izquierda del gel se muestra un extracto proteico control con péptido ABri sintético adicionado. **D**, ADan detectado con suero policlonal anti-ADan (5282). CNT+ ADan sp, corresponde al extracto proteico control con péptido sintético de ADan adicionado. CNT, extracto proteico de moscas control. Las cabezas de flecha indican monómeros de los péptidos (M). Se realizaron al menos 3 experimentos independientes por genotipo.

Para evaluar la presencia de especies de mayor grado de agregación e insolubilidad, se realizaron extracciones con ácido fórmico 90% a partir de las fracciones insolubles en RIPA SDS 1% (Figura 26). Se detectó inmunoreactividad para

A β 42 y ADan en la fracción soluble en ácido fórmico, evidenciando su mayor capacidad de acumulación y agregación en este tejido. La inmunoreactividad fue mayor para ADan donde también se detectaron especies agregadas, en su mayoría con masa molecular correspondiente a tetrámeros. No se pudo detectar ABri en las fracciones solubles en ácido fórmico.

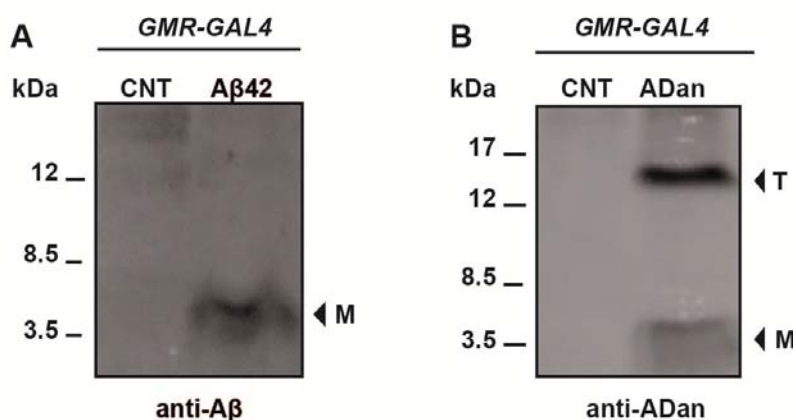


Figura 26: Detección de especies resistentes a detergentes de A β 42 y ADan. Western blots representativos de la fracción insoluble en RIPA SDS 1% y soluble en ácido fórmico obtenidos a partir de 200 cabezas de moscas. **A**, Inmunoreactividad positiva con anti-A β (6E10) en extractos de cabeza de moscas *GMR-GAL4>A β 42*. **B**, Anti-ADan detectó presencia de ADan en extractos *GMR-GAL4>ADan*. CNT, extracto control. M, monómeros, T tetrámeros.

Para estimar cuantitativamente el grado de agregación de los péptidos se comparó la inmunoreactividad obtenida en los Western blots realizados a partir de la fracción soluble en RIPA SDS 1% con los de la fracción soluble en ácido fórmico. Cabe destacar que en los Western blots realizados a partir de extractos solubles en RIPA SDS 1% (mostrados en la Figura 25) se sembraron unos 150 μ g de proteínas totales que se obtuvieron a partir de ~15 cabezas, mientras que los extractos solubles en ácido fórmico (Figura 26) se obtuvieron a partir de ~200 cabezas. Entonces, al relativizar la inmunoreactividad de cada péptido en las distintas fracciones al número total de cabezas, observamos que la mayor proporción de A β 42 y ADan se halla en la fracción soluble en RIPA 1% SDS (85-95%) y sólo un 5-15% en la fracción soluble en ácido fórmico.

Estos resultados sugieren que los péptidos son procesados correctamente por peptidasas de señal en la vía secretoria y que se encuentran mayormente solubles, probablemente agregados en una forma no-fibrilar.

4.1.1.3 - Acumulación *in vivo* de los amiloides.

Dado que la inmunoreactividad de los anticuerpos depende no sólo de su especificidad sino también del título, avidéz, afinidad, etc., no es posible comparar el grado de acumulación de cada péptido *in vivo* utilizando anticuerpos péptido-específicos e interpretando la intensidad de las señales obtenidas.

Con el objetivo de analizar y comparar la acumulación de los péptidos amiloides *in vivo*, se sobre-expresaron las versiones con tag de His de los 4 péptidos en el ojo de *Drosophila* y a partir de extractos proteicos, se realizaron Western blots revelando con un anticuerpo anti-His. En la figura 27 se muestran los niveles de acumulación de los distintos péptidos en individuos de 10 días de edad. Se cuantificó la inmunoreactividad obtenida y se evidenció que HisADan y HisA β 42 se acumulan aproximadamente 4 y 3 veces más que HisABri, respectivamente.

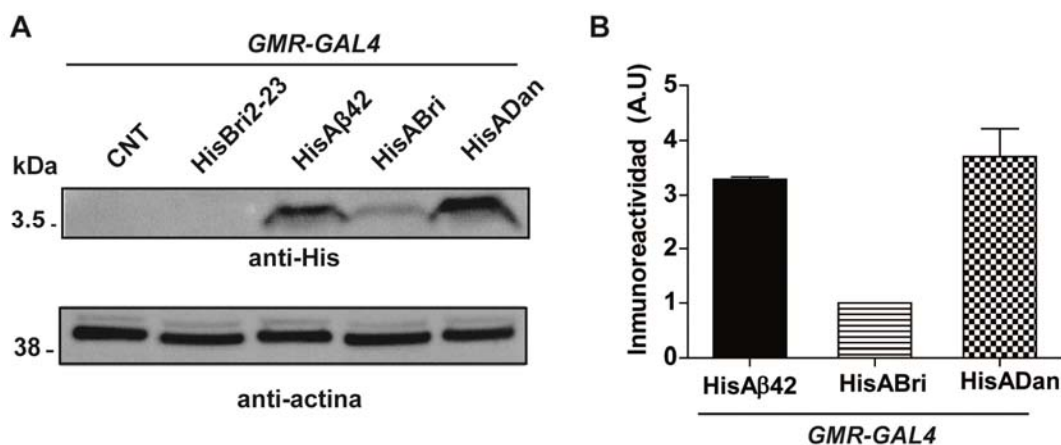


Figura 27: Comparación de los niveles de acumulación *in vivo* de los péptidos amiloides.

A, Western blots representativos a partir de extractos proteicos solubles en RIPA SDS 1% de moscas *GMR-GAL4*>His-péptidos utilizando anticuerpos anti-His y anti-actina. **B**, Cuantificación de la inmunoreactividad detectada, normalizada con actina y relativizada a HisABri. Se realizaron al menos 3 experimentos independientes.

Como A β 42, ABri y ADan son péptidos pequeños de 34-42 aminoácidos y si bien está descrito que la capacidad amiloidogénica de los 3 está dada principalmente por

los aminoácidos C-terminales, podría ocurrir que la secuencia N-terminal de 6 His afectara sus propiedades de agregación.

Para evaluar el posible efecto del tag de His sobre la capacidad de agregación/acumulación de los péptidos amiloides, se realizaron Western blots a partir de extractos proteicos de cabezas de moscas que sobre-expresan A β 42, ABri y ADan con y sin el tag de His, y se revelaron con anticuerpos específicos para cada péptido (Figura 28).

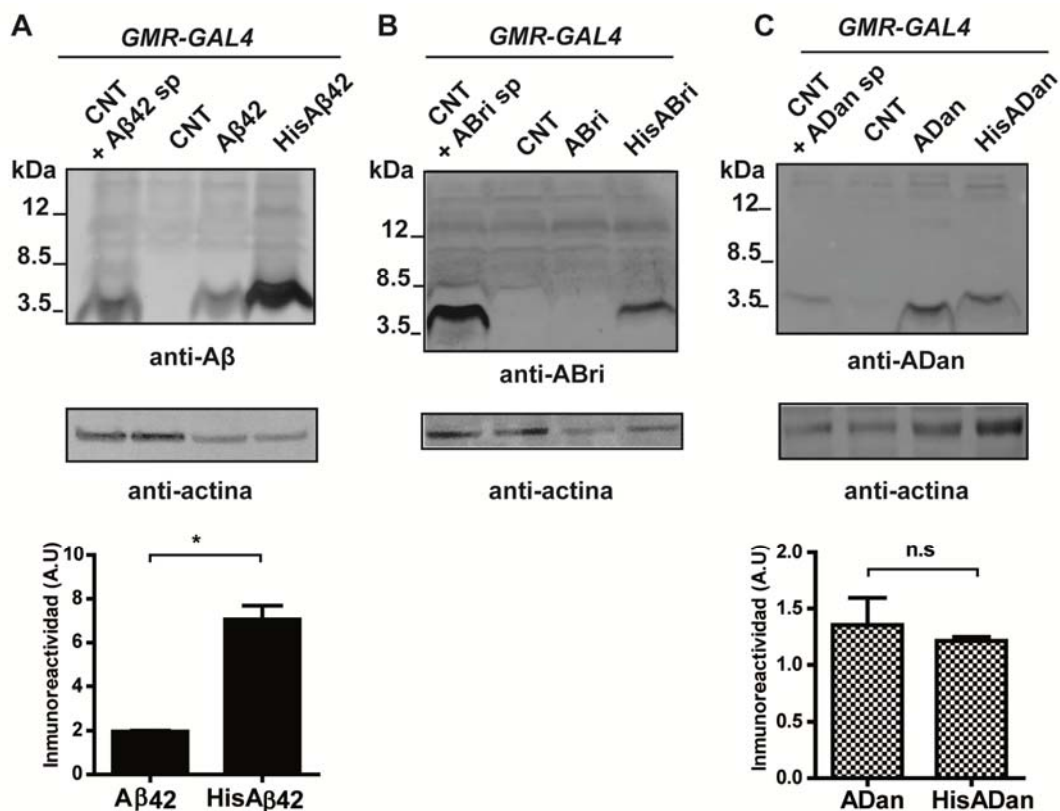


Figura 28: Efectos del tag de His en la acumulación de los péptidos amiloides. En el panel superior se muestran los Western blots representativos a partir de extractos proteicos (150 μ g) de cabezas de moscas que sobre-expresan los péptidos en el ojo, con o sin el tag de His comparado con muestras de animales no transgénicos. CNT+ sp, señala extractos proteicos de individuos no transgénicos con el agregado del péptido sintético correspondiente, lo que permite comparar los perfiles de corrida. **A**, Anti-A β 42; **B**, Anti-ABri; **C**, Anti-ADan. En el panel inferior, la cuantificación de las bandas de A β 42 y ADan con sus versiones con y sin tag de His. La inmunoreactividad de ABri para estas condiciones fue muy baja por lo que no se pudo comparar. Las barras representan los promedios $\pm$ error estándar de 3 experimentos independientes. Prueba t de Student. Los asteriscos marcan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). n.s = no significativo.

En el caso de A β 42 se vió que HisA β 42 se acumula aproximadamente 3 veces más que su versión sin tag, mientras que para ADan, no se observaron diferencias significativas en la acumulación de ambos péptidos (con y sin tag de His). En el caso de ABri, se observó una muy baja reactividad respecto del HisABri para la misma concentración de proteínas sembradas (150 μ g de proteínas totales), de modo tal que no se pudo realizar la comparación cuantitativa.

Los resultados obtenidos en las figuras 27 y 28 permite estimar que la acumulación *in vivo* de ADan es 2-3 veces mayor que la de A β 42, y a su vez ambos, se acumulan en mayor medida que ABri.

4.1.2 -Neurotoxicidad causada por los péptidos amiloides en tejidos de Drosophila.

4.1.2.1 - La sobre-expresión de A β 42, ABri y ADan genera leves desarreglos en la estructura externa e interna del ojo.

El ojo compuesto de *Drosophila* es una estructura altamente organizada, dada por el perfecto arreglo de aproximadamente 800 omatidias hexagonales, cada una formada por 8 fotorreceptores de origen neuronal y 12 células accesorias y, asociada a una queta mecanosensorial (Figura 29).

Como se mencionó anteriormente, la sobre-expresión de proteínas asociadas a enfermedades neurodegenerativas humanas en el ojo de *Drosophila* suele causar alteraciones estructurales en los fotorreceptores [151]. Esto se evidencia fácilmente ya que frente a perturbaciones fisiológicas causadas por dichas proteínas se observa un desarreglo de la estructura externa e interna del ojo.

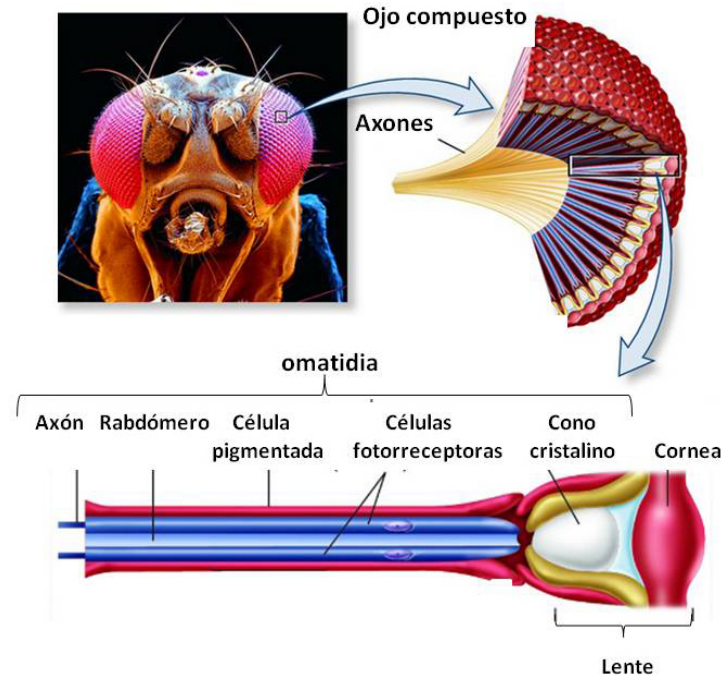


Figura 29: Esquema del ojo compuesto de *Drosophila*. Es una estructura muy organizada, compuesta por ~ 800 omatidias ubicadas en un perfecto arreglo ordenado. Cada omatidia consta de 8 células fotorreceptoras y 12 accesorias, entre ellas las células pigmentadas. Cada célula fotorreceptora proyecta un rabdómero cuya membrana posee un alto porcentaje de rodopsinas, pigmentos sensibles a la luz.

La sobre-expresión de los péptidos con *GMR-GAL4* en heterocigosis (no mostrado) u homocigosis, no provocó desorganización de la estructura externa del ojo en individuos crecidos a 25°C. Al elevar la temperatura a 28°C, de modo tal que aumentan los niveles de expresión de los transgenes y se sensibiliza el sistema, se pudieron evidenciar defectos sutiles en la organización de las omatidias en moscas que sobre-expresaron de los péptidos amiloides respecto al control Bri₂-23 (Figura 30 A). Este efecto se aprecia mejor en la figura 30 B, donde se dibujaron líneas que describen una hilera de omatidias. En el caso de Bri₂-23 observamos líneas que tienden a ser paralelas, mientras que para ADan se pierde dicha alineación.

Cabe destacar que la línea *GMR-GAL4* a 28°C, presentó *per se* cierto grado de desarreglo, presumiblemente debido a la toxicidad causada por el exceso de GAL4 libre, efecto previamente descrito por varios autores [152, 153]. Sin embargo, las moscas *GMR-GAL4*>Bri₂-23 presentaron un patrón ordenado, posiblemente debido a la titulación del GAL4 por el UAS sumado al escaso o nulo efecto tóxico de Bri₂-23. Por

ello consideramos que Bri₂-23 representa un mejor control para nuestros experimentos que las líneas *GMR-GAL4* que carecen de secuencia UAS.

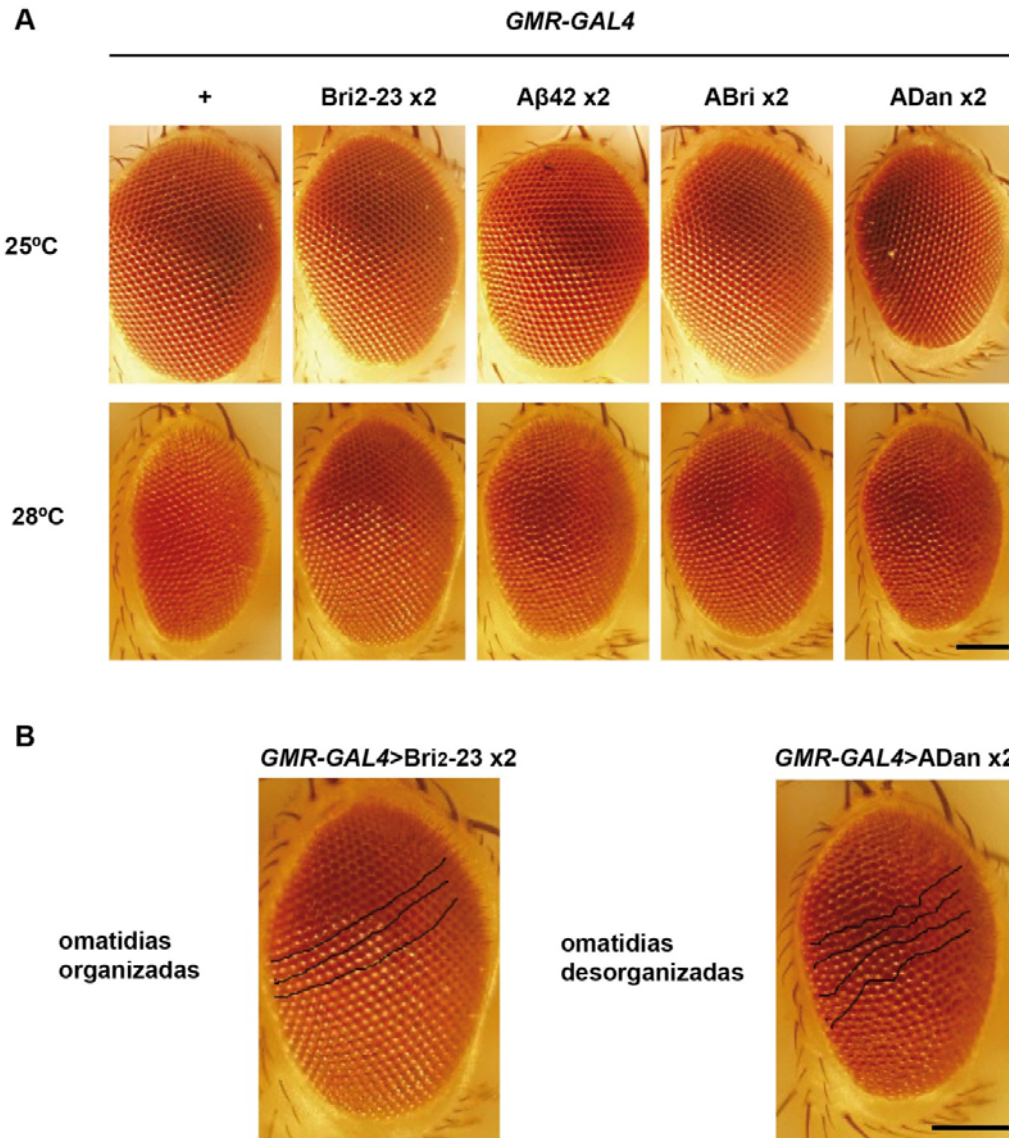


Figura 30: Micrografías representativas de ojos de moscas obtenidas al microscopio óptico con luz transmitida. A, Se muestran ojos de moscas que sobre-expresan 2 copias de los péptidos utilizando *GMR-GAL4*, crecidas a 25°C (panel superior) y a 28°C (panel inferior). **B,** Ejemplificación del desarreglo. En un ojo normal se pueden trazar líneas paralelas a lo largo de las ommatidias, mientras que esto no es factible en caso de desarreglo. Barra = 100 μ m.

Con el objetivo de caracterizar en profundidad estos fenotipos se procedió a cuantificar el desarreglo observado por la sobre-expresión de los péptidos empleando la técnica de microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM). Esta técnica

permite analizar en detalle la organización externa del ojo y así cuantificar los desarreglos sutiles.

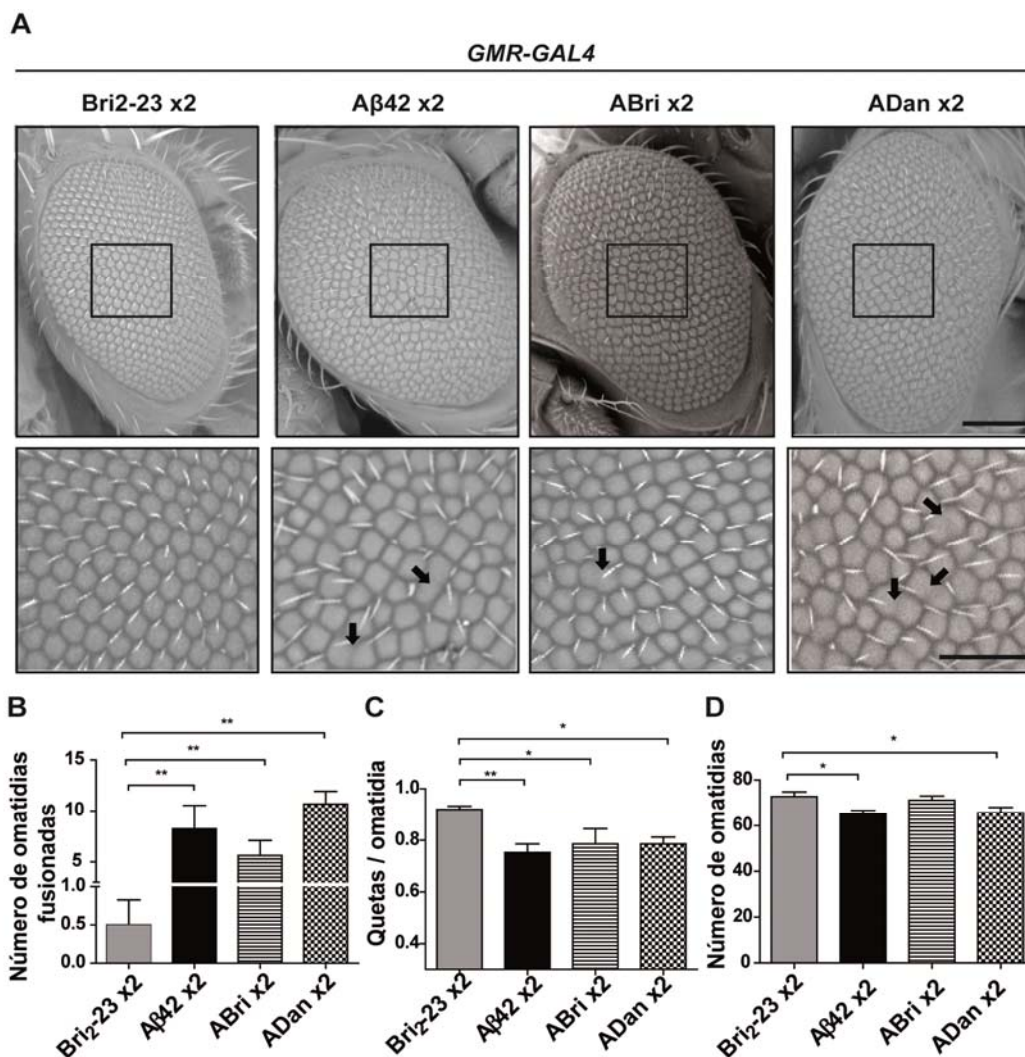


Figura 31: Toxicidad diferencial causada por A β 42, ABri y ADan en el ojo de *Drosophila*.

A, Análisis morfológico de la estructura externa del ojo de moscas, crecidas a 28°C, que expresan Bri₂-23, A β 42, ABri y ADan. En el panel superior, se muestran fotos representativas de ESEM y en el panel inferior un área ampliada para el análisis cuantitativo, donde se indican con flechas las omatidias fusionadas. Panel superior barra= 100 μ m. Panel inferior barra= 50 μ m. **B**, Cuantificación de omatidias fusionadas en el área central de cada ojo (195 x 170 μ m) para cada genotipo. **C**, Cuantificación de quetas relativas al número de omatidias y **D**, número total de omatidias en un área central del ojo de 135 x135 μ m. Se eligió un área central para evitar el efecto de la curvatura semiesférica y facilitar un recuento comparable. Los datos se expresan como promedios $\pm$ error estándar. ANOVA de un factor, seguido de comparaciones de Dunnett. Los asteriscos marcan diferencias estadísticamente significativas con el control Bri₂-23x2 (* p <0.05, ** p <0,01).

Se obtuvieron al menos 10 fotografías independientes para cada genotipo y se procedió a cuantificar el número de omatidias fusionadas, el número de omatidias por área y el número de quetas por omatidia en áreas comparables (Figura 31). El número de omatidias fusionadas resultó ser significativamente mayor en las moscas que sobre-expresan los péptidos amiloides respecto de Bri₂-23, mientras que el número de quetas fue significativamente menor para las moscas ADan, A β 42 y ABri ($p < 0,05$). Además, se evidenció una leve disminución del número total de omatidias en las moscas que expresan A β 42 y ADan respecto a Bri₂-23 ($p < 0,05$).

La moderada toxicidad provocada por la sobre-expresión de los péptidos amiloides en el ojo contrasta con lo reportado para otras líneas de A β 42 [123], sugiriendo que los niveles de expresión de los péptidos en nuestras líneas sitio-dirigidas son relativamente bajos. Al comparar la toxicidad generada por nuestra línea *GMR-GAL4>A β 42x2* con la línea *GMR-GAL4>A β 42Hj2.12* (de alta expresión y gentilmente cedida por la Dra. Mary Konsolaki), se observó en esta última una mayor desorganización del ojo, fenotipo denominado “ojo rugoso” (producto de la fusión entre omatidias contiguas) y aparición de punto necróticos (Figura 32). Los niveles de A β 42 medidos por ELISA a partir de homogenatos de cabezas de la línea Hj2.12 fueron ~2,5 veces mayores que los encontrados para A β 42x2 (7.5 vs 17.5 ng de A β 42 /mg de proteínas totales, respectivamente).

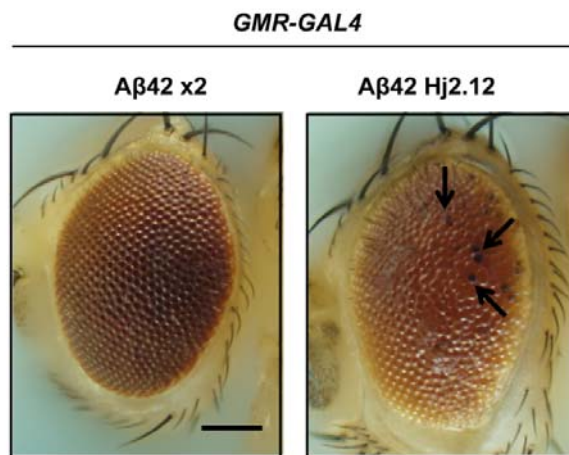


Figura 32: Micrografías representativas de ojos de moscas obtenidas al microscopio óptico con luz transmitida. Comparación de la toxicidad en el ojo dada por distintos niveles de A β 42 en moscas *GMR-GAL4> A β 42x2* y *GMR-GAL4> A β 42Hj2.12*, crecidas a 28°C. Las flechas marcan puntos negros, posiblemente indicativos de necrosis. Barra= 100 μ m.

Para analizar el estado de la estructura interna de la retina se efectuaron cortes de cabezas de moscas embebidas en parafina y se realizaron tinciones con hematoxilina y eosina (H&E). Las retinas pertenecientes a *GMR-GAL4>A β 42x2*, *GMR-GAL4>ABri2* y *GMR-GAL4>ADanx2* presentaron leves daños en la estructura interna (desorganización de los rabdómeros, Figura 33 B) comparado con *GMR-GAL4>Bri2-23*, destacando un mayor grado de pérdida tisular a nivel de rabdómeros para ADan.

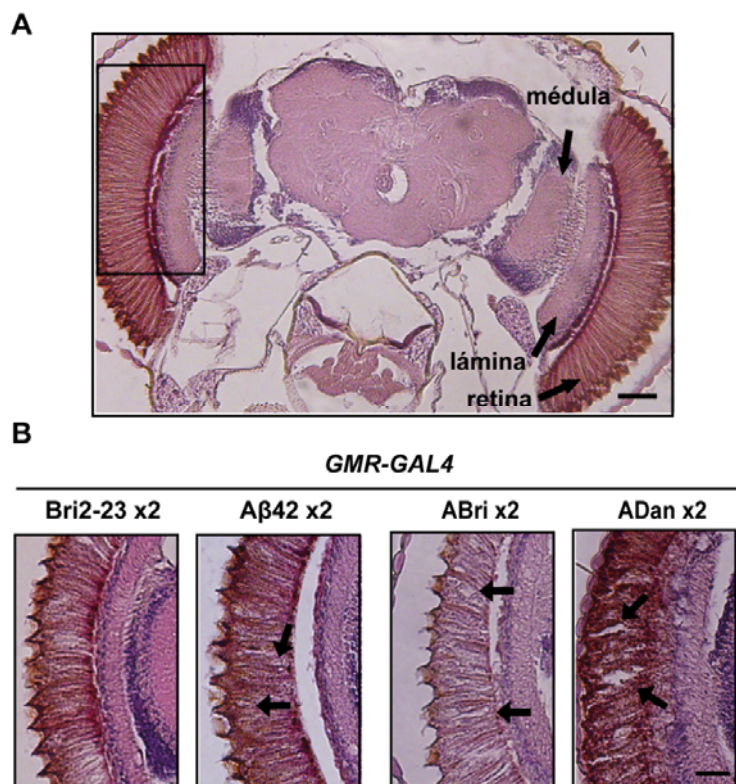


Figura 33: Análisis de la estructura interna de la retina. Secciones en parafina de cabezas de moscas *GMR-GAL4* > péptidos crecidas a 28°C, teñidos con H&E. **A**, Se muestra una sección de cabeza entera señalando las regiones correspondientes a la retina, lámina y médula. A la izquierda se recuadra la zona de la retina analizada para los distintos genotipos. Barra= 50 μ m. **B**, Secciones representativas de cada genotipo. Las flechas muestran desarreglos en la retina. Barra= 25 μ m.

Estos resultados sostienen que los bajos niveles de expresión alcanzados por nuestras líneas sitio-dirigidas explican la leve o moderada toxicidad en comparación con los niveles alcanzados por otras líneas de A β 42 que presentan fenotipos más severos.

4.1.2.2 - Acumulación no-fibrilar de los péptidos amiloides en la retina.

Se analizó el depósito de los péptidos amiloides en la retina mediante inmunohistoquímica en cortes de cabezas embebidos en parafina utilizando anticuerpos específicos. En el caso de A β 42, se evidenció una marca discreta siguiendo la topología de los rabdómeros, siendo más abundantes en la región basal de las omatidias (retina). En cuanto a ABri, éste presentó una inmunoreactividad discreta, cerca de la lámina, mientras que ADan presentó una distribución más amplia a lo largo de los rabdómeros. Las tinciones realizadas con Tioflavina S fueron negativas, indicando que los péptidos acumulados no adoptan la típica forma fibrilar amiloide (Figura 34).

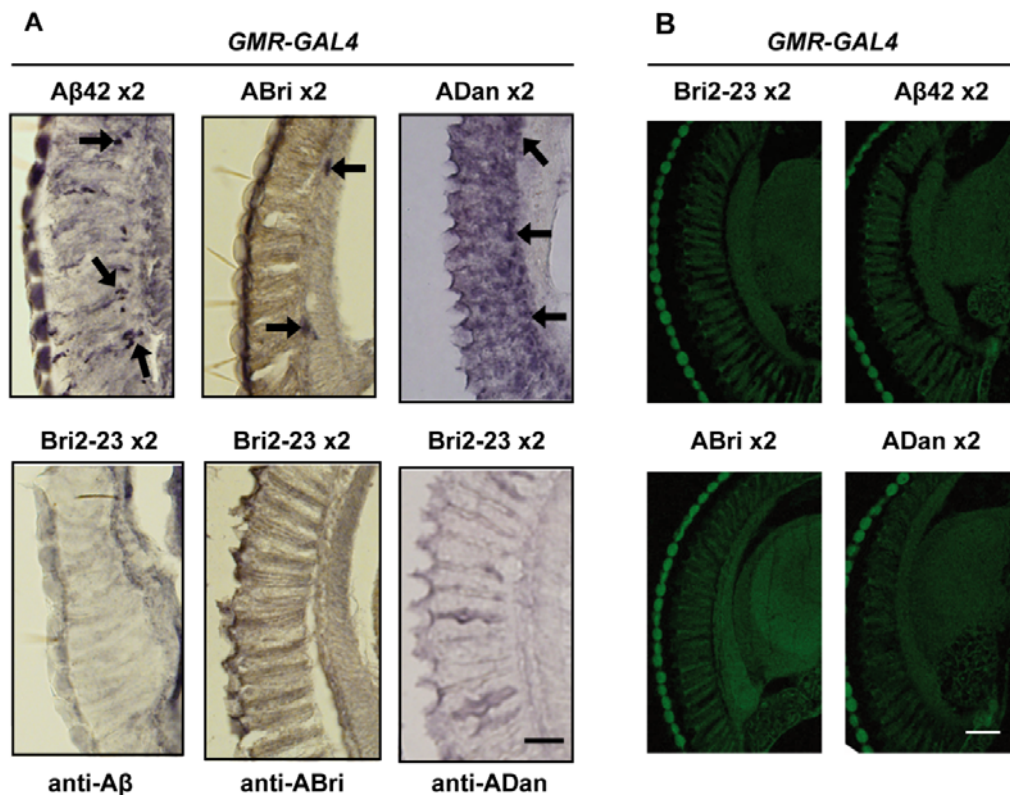


Figura 34: Acumulación no-fibrilar de los péptidos amiloides en la retina. Secciones de retinas de moscas *GMR-GAL4>Bri₂23x2*, *GMR-GAL4>A β 42x2*, *GMR-GAL4>ABri₂x2* y *GMR-GAL4>ADanx2* crecidas a 28°C. **A**, Inmunohistoquímicas utilizando anti-A β 42 (6E10), anti-ABri y anti-ADan, respectivamente y sobre cortes de *GMR-GAL4>Bri₂23x2* como control de especificidad de los anticuerpos. Se reveló con DAB agregando níquel a la reacción para intensificar la señal. Las flechas indican la inmunoreactividad consistente con depósitos de péptidos amiloides. Barra= 25 μ m. **B**, Tinción con tioflavina S, la ausencia de fluorescencia indica la naturaleza no-fibrilar de los diferentes péptidos. Barra= 50 μ m.

Los datos sugieren que *in vivo* se acumula más ADan y A β 42 respecto de ABri y de manera no-fibrilar, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Western blots en homogenatos de cabezas (sección anterior).

4.1.2.3 - La acumulación de los péptidos amiloides en el SNC provoca defectos comportamentales asociados al envejecimiento.

Con el objetivo de estudiar la neurotoxicidad de los péptidos en el sistema nervioso central (SNC) éstos fueron expresados utilizando un promotor pan-neuronal, en este caso *elav-GAL4*.

ELAV (del inglés, “embryonic lethal abnormal visual system”) es una proteína de unión al ARN [154] predominantemente de ubicación nuclear, que se expresa durante todo el desarrollo neuronal y está involucrada en el mantenimiento neuronal durante el estadio adulto [155]. Las líneas transgénicas *elav-GAL4* generadas presentan expresión del GAL4 mayoritariamente en neuronas post-mitóticas, por lo que dichos promotores son extensamente utilizados para evaluar desregulación de genes de manera pan-neuronal [156].

En primer lugar, se evaluó si la sobre-expresión pan-neuronal de los amiloides afectaba la longevidad de las moscas. Dado que el efecto tóxico de los amiloides suele ser dosis-dependiente, se evaluaron 2 condiciones: individuos mantenidos a 25°C que sobre-expresaron 1 copia de los amiloides e individuos mantenidos a 28°C que sobre-expresaron 2 copias de los mismos. Cabe destacar que el aumento de la temperatura a 28°C favorece el aumento en la transcripción de GAL4 y por consiguiente, una mayor expresión de los transgenes; asimismo, provoca una disminución en la sobrevivencia general de las moscas de aproximadamente 90 días a 25°C a ~40 días a 28°C, como se observa en la figura 35. Esto permite acortar los tiempos de los ensayos y, en algunos casos, intensificar el fenotipo. Se observó que la sobre-expresión en heterocigosis (1 copia) de los amiloides no afectó la longevidad de los individuos con respecto a su control Bri₂-23. Sin embargo, al aumentar las dosis de péptidos amiloides (2 copias en homocigosis) y la temperatura, se evidenció una disminución de la sobrevivencia de los individuos que sobre-expresan los péptidos amiloides respecto del control Bri₂-23 ($p < 0,05$), siendo este efecto más evidente para ADan que para ABri y A β 42. En la figura 35 se muestran las curvas de longevidad y una tabla con los valores de vida media (tiempo transcurrido hasta que muere el 50% de la población analizada) obtenidos en cada caso.

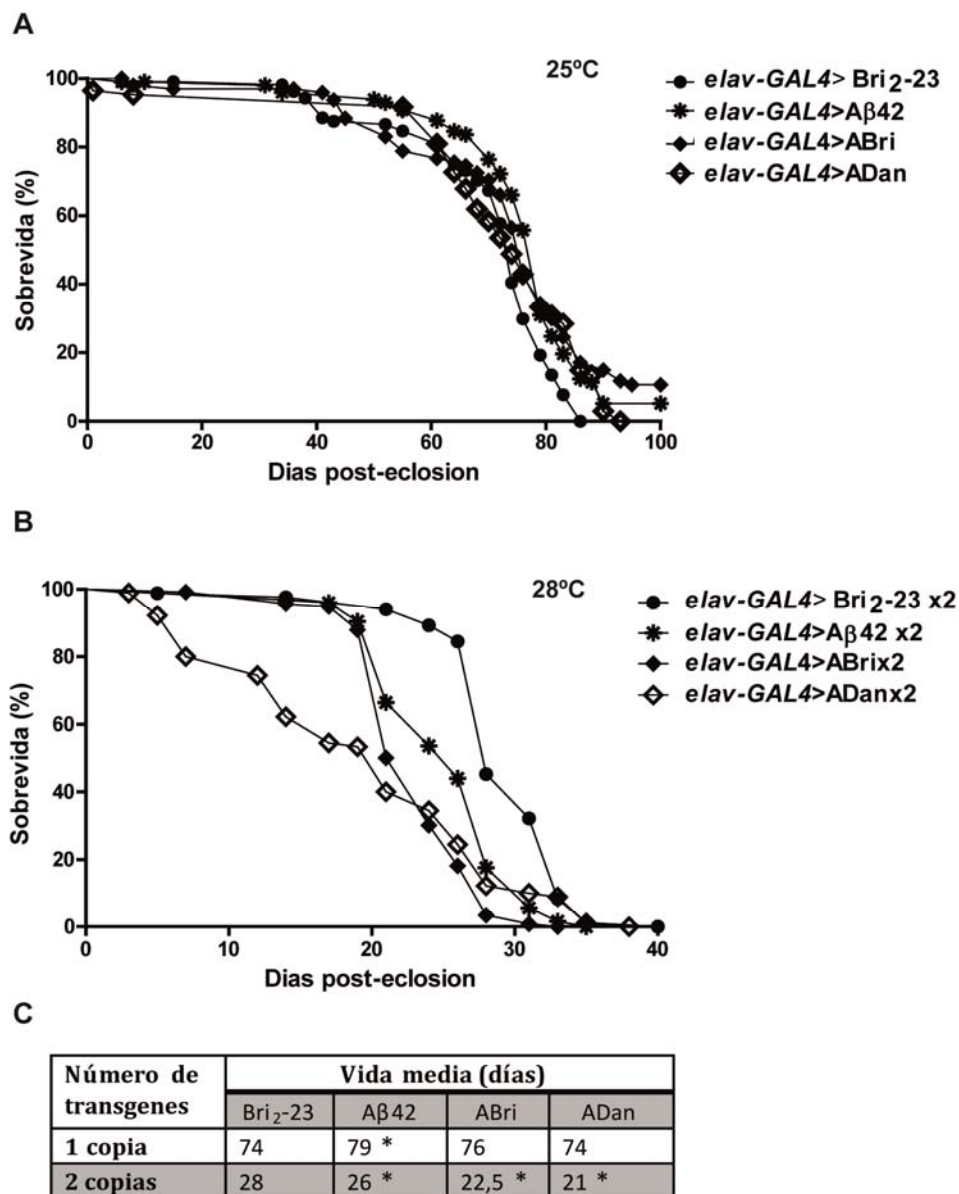


Figura 35: Efecto de la sobre-expresión pan-neuronal de los péptidos sobre la longevidad de los individuos. **A**, Sobre-expresión pan-neuronal de los transgenes en heterocigosis usando *eLav-GAL4* en moscas envejecidas a 25°C. **B**, Sobre-expresión de 2 copias de los transgenes (homocigosis) usando *eLav-GAL4* en moscas envejecidas a 28°C. **C**, En la tabla se muestran los valores de vida media obtenidos para cada genotipo en ambas condiciones. Se realizó un análisis de Log-Rank (Mantel-Cox). Los asteriscos muestran diferencias significativas con el control Bri₂-23 ($p < 0,05$).

A continuación se evaluaron 2 paradigmas comportamentales controlados por el SNC y asociados al envejecimiento. Por un lado, geotaxis negativa (que evalúa

coordinación motora frente a una respuesta de escape) y por otro, fototaxis positiva (que evalúa la respuesta a la luz).

Al ensayar el paradigma de geotaxis negativa, hay que resaltar que este comportamiento está influenciado por el envejecimiento, tal que las moscas presentan naturalmente una disminución en la respuesta locomotora anti-gravitatoria con el aumento de la edad [147]. En cuanto al efecto de los péptidos amiloides sobre este paradigma, se observó que la sobre-expresión de 1 copia de los péptidos no provocó defectos en la respuesta de escape a ninguna de las edades evaluadas, mientras que la sobre-expresión de 2 copias de los péptidos en homocigosis mostró un fenotipo tóxico progresivo con la edad y diferencial para cada amiloide (Figura 36). La sobre-expresión de 2 copias de ADan provocó defectos en la escalada en individuos jóvenes, a los 7 días post-eclosión, comparado con el control Bri₂-23 ($2,5 \pm 0,7$ vs $4,6 \pm 0,2$ respectivamente, $p < 0,01$), mientras que A β 42 ($4,6 \pm 0,2$) y ABri ($3,8 \pm 0,2$) no presentaron defectos estadísticamente significativos respecto del control. Al envejecer, se pudieron evidenciar los efectos tóxicos de ABri comparado con Bri₂-23 ($2,3 \pm 0,3$ vs $3,8 \pm 0,1$ respectivamente, $p < 0,05$) a los 15 días post eclosión y de A β 42 comparado con Bri₂-23 ($1,5 \pm 0,3$ vs $3 \pm 0,2$, respectivamente, $p < 0,01$) a partir de los 21 días de edad.

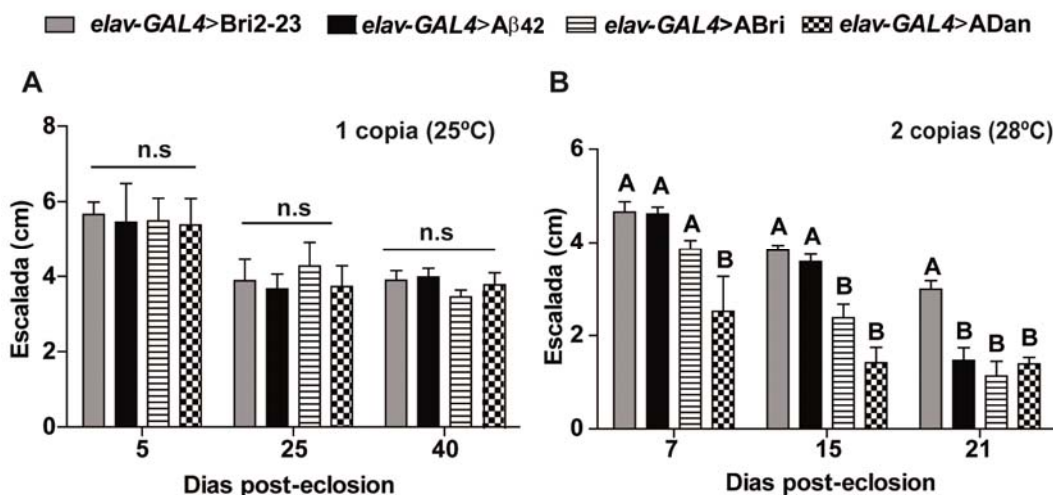


Figura 36: Efecto de la sobre-expresión pan-neuronal de los péptidos sobre la respuesta geotáctica. A, Ensayo de geotaxis negativa en moscas heterocigotas a los 5, 25, 40 días de edad a 25°C. B, Ensayo de geotaxis negativa a los 7, 15, 21 días de edad en moscas envejecidas a 28°C. La distancia escalada se expresó como media $\pm$ error estándar. ANOVA de 2 factores, medidas repetidas, seguido de comparaciones por Bonferroni. Las letras distintas denotan diferencias significativas, para cada edad ($p < 0,05$). ns, no significativo.

Las moscas poseen fototaxis positiva, es decir, son atraídas y tienden a movilizarse hacia una fuente de luz. La sobre-expresión de ADan provocó una disminución en la respuesta fototáctica respecto de A β 42, ABri y Bri₂-23, al evaluar el comportamiento de moscas envejecidas ($p < 0,05$), no así en moscas jóvenes (Figura 37). Este efecto no se debió a dificultades de locomoción ya que los mismos genotipos no presentaron defectos en el paradigma de escalada bajo las mismas condiciones genéticas y de crecimiento (Figura 36). Estos resultados sugieren un efecto progresivo en el tiempo para ADan, presentando una mayor toxicidad y susceptibilidad de grupos neuronales asociados a los centros de integración de la información lumínica a nivel de SNC.

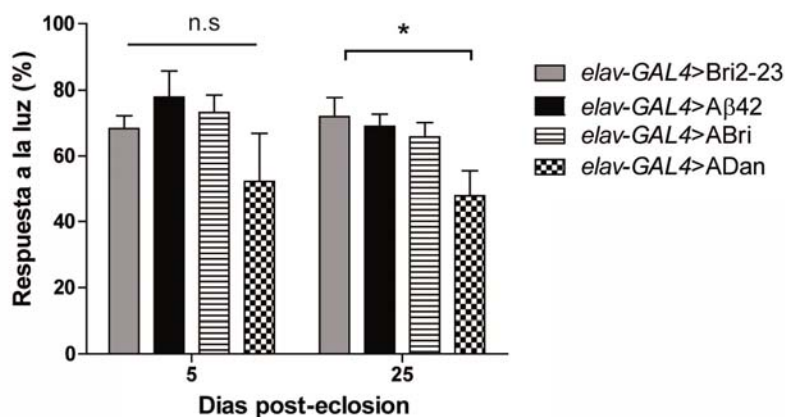


Figura 37: Efecto de la sobre-expresión pan-neuronal de los péptidos sobre la respuesta fototáctica. Ensayo de fototaxis positiva en moscas de 5 y 25 días de edad, crecidas a 25°C. Valores expresados como porcentaje de moscas que responden a la luz. ANOVA de 2 factores, medidas repetidas, seguido de comparaciones de Dunnett. Los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas ($*p < 0.05$). n.s, no significativo.

Los ensayos de longevidad, geotaxis y fototaxis mostraron que a niveles similares de transcripción de los transgenes (Figura 24) ADan presentó mayor toxicidad y a muy temprana edad, mientras que para ABri y A β 42 la toxicidad fue menor y progresiva con el envejecimiento. Esto va en concordancia con el mayor nivel de acumulación del péptido ADan respecto de A β 42 y ABri evidenciado por Western blots a partir de extractos proteicos de moscas que sobre-expresan los péptidos en el SNC (resultados no mostrados). Sin embargo, los resultados sugieren que aún con bajos niveles de acumulación, ABri es más tóxico que A β 42.

4.1.2.4 - La acumulación no-fibrilar de los péptidos amiloides en el SNC provoca escasa vacuolización.

Dado que la sobre-expresión pan-neuronal de los péptidos amiloides provocó defectos comportamentales dependientes de la dosis y la edad, se procedió a evaluar el estado morfológico del cerebro de dichos individuos.

Un parámetro ampliamente utilizado para evaluar neurodegeneración es la presencia de vacuolización en el cerebro, como indicador de pérdida de tejido (revisado en [157]). Para evaluar la integridad de los cerebros de las moscas que expresan los péptidos, se realizaron cortes de cabezas embebidas en parafina y se tiñeron con H&E (Figura 38). Los cerebros evaluados corresponden a moscas de 21 días, edad en la cual ya se evidenciaron defectos comportamentales para los 3 péptidos amiloides. Los cortes se observaron bajo microscopio de luz transmitida, se fotografiaron y luego se cuantificó el área de tejido perdida como consecuencia de la vacuolización. Si bien las moscas a los 21 días presentaron un porcentaje pequeño de tejido perdido ($< 10\%$), los cerebros con A β 42 mostraron mayor pérdida de tejido respecto del control ($p < 0,05$), mientras que para ABri y ADan se observó una tendencia estadísticamente no significativa.

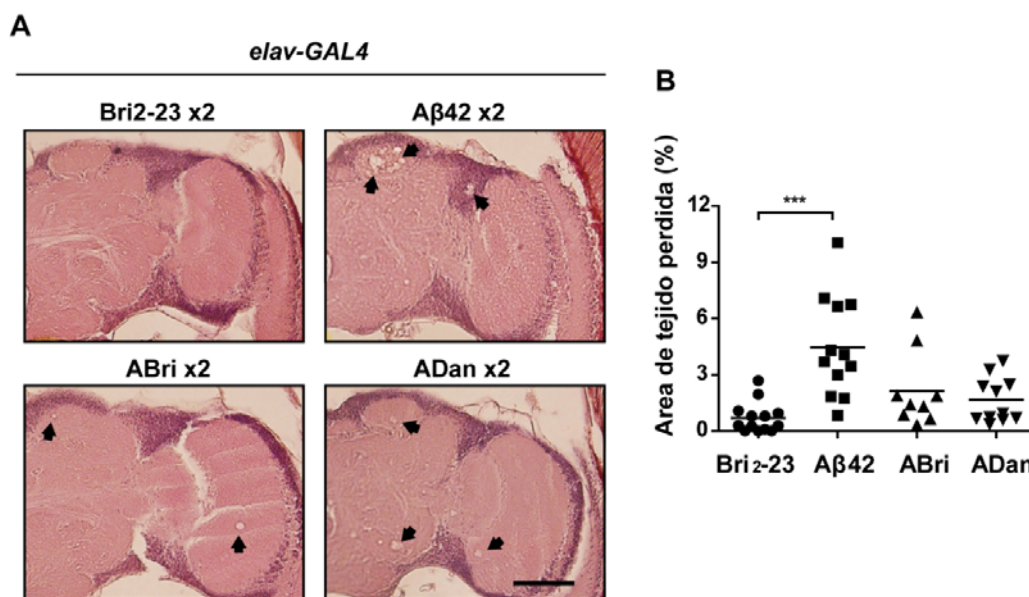


Figura 38: Efecto de la sobre-expresión pan-neuronal de los péptidos sobre la integridad de cerebro. **A**, Secciones representativas de cortes de cerebros de moscas crecidas a 28°C que sobre-expresan los péptidos con *elav-Gal4*, teñidos con H&E. Barra= 50 μ m. **B**, Porcentaje del área de tejido perdida, se analizaron 8-10 hemiserebros por genotipo y la línea horizontal marca la media de cada genotipo. Barra= 50 μ m. ANOVA de 1 factor, seguido de comparaciones de Dunnett. Los asteriscos muestran diferencias significativas (***) $p < 0,001$.

Luego, se evaluó la acumulación y el estado de agregación de los péptidos amiloides en dichas zonas del cerebro mediante inmunohistoquímica. En cerebros que sobre-expresaron A β 42 se evidenció inmunoreactividad positiva con anticuerpos específicos, revelando una acumulación discreta, aparentemente intraneuronal, consistente con lo previamente descrito por otros autores [122]. En el caso de ABri y ADan se detectó una marca con distribución más amplia y difusa, consistente con acumulación intracelular y extracelular (Figura 39). En los 3 casos, la inmunohistoquímica mostró una clara tendencia a localización dorsal, en regiones con abundancia de somas neuronales.

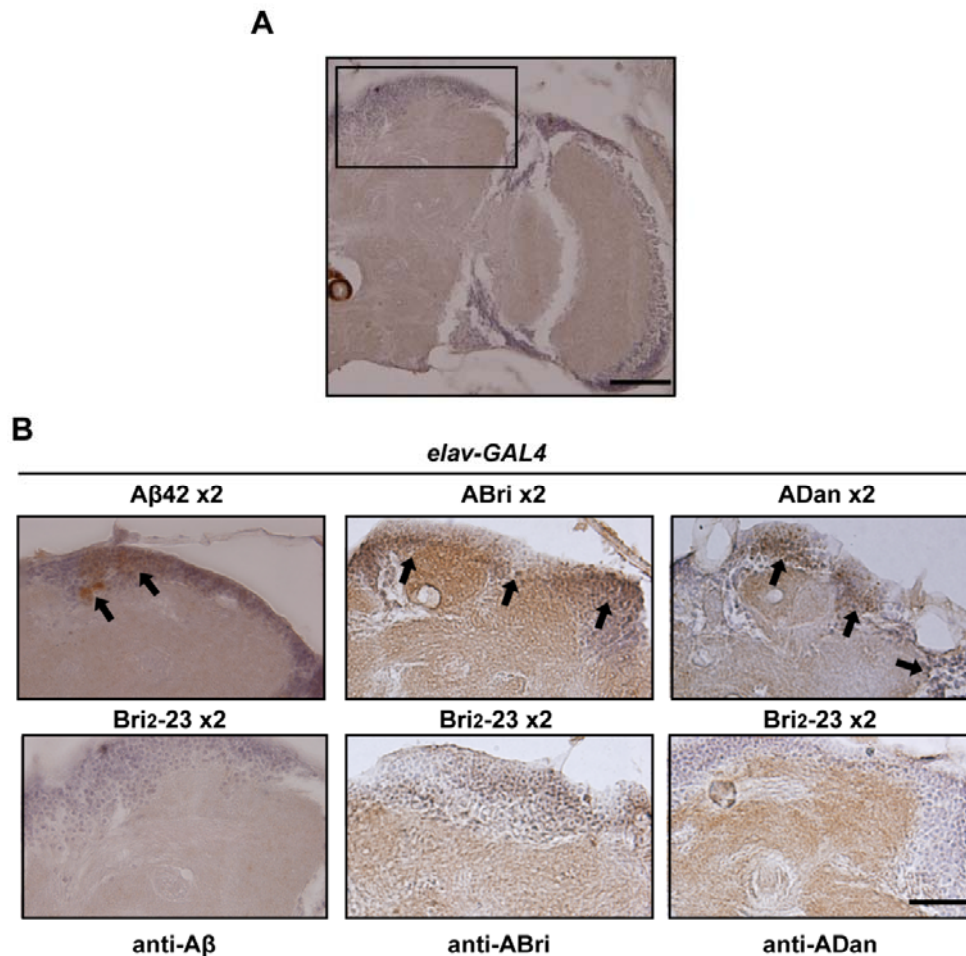


Figura 39: Acumulación de los péptidos en SNC. **A**, Sección de un hemiserebro de mosca, el rectángulo delimita el área ampliada. Barra= 50 μ m. **B**, Depósitos de amiloides en SNC analizados mediante inmunohistoquímica con anticuerpos específicos y contra-tinción con Hematoxilina. Las flechas marcan los agregados discretos de A β 42, mientras que para ABri y ADan se ven agregados más difusos. No se detectó marca con ninguno de los 3 anticuerpos en cortes de moscas Bri₂-23, mostrando la especificidad de los mismos. Barra= 25 μ m.

La tinción con tioflavina S fue negativa para todos los casos, apoyando la noción de depósitos no-fibrilares de los péptidos amiloides en el SNC de nuestras líneas (Figura 40).

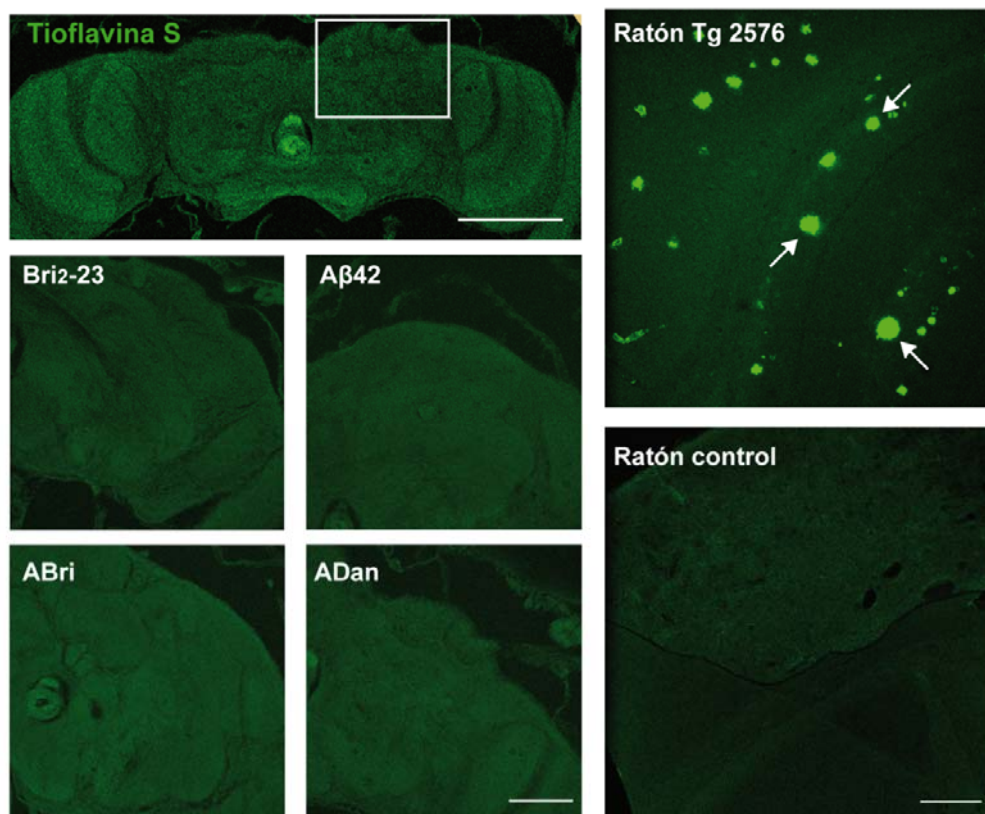


Figura 40: Tinción con tioflavina S en cortes de cerebro. Se sobre-expresaron los péptidos de manera pan-neuronal y se analizó la misma región del cerebro que presentó acumulación de los péptidos amiloides (recuadro blanco). Barra= 100 μ m. No se detectó tinción positiva en ninguno de los genotipos analizados. Barra= 50 μ m. Como control positivo y negativo de tinción con tioflavina S se utilizaron cortes de cerebro de ratones transgénicos Tg2576 y no transgénicos de 20 meses. Las flechas indican típicos depósitos fibrilares de A β 42 revelados con tioflavina S. Barra= 200 μ m.

En conjunto, estos resultados muestran que los fenotipos comportamentales se asocian con una acumulación no-fibrilar de péptidos amiloides, con patrones diferentes entre genotipos y con escasa pérdida tisular.

4.1.2.5 - La sobre-expresión de los péptidos amiloides podría ocasionar defectos sinápticos.

Con el objetivo de evaluar si la sobre-expresión de A β 42, ABri, ADan genera defectos sinápticos, se analizaron los niveles de la proteína Bruchpilot (BRP) como marcador de disfunción sináptica [126]. BRP es una proteína involucrada con la formación y la liberación de las vesículas pre sinápticas en la zonas activas. Se ha reportado que la proteína BRP presenta 2 isoformas de ~190 y 170 kDa [158, 159].

Se realizaron Western blots a partir de extractos proteicos de cabezas de moscas crecidas a 28°C que sobre-expresaron los péptidos en homocigosis y se revelaron con anticuerpos anti-BRP (Figura 41). Se analizaron muestras de moscas jóvenes y envejecidas. Se observó una tendencia (estadísticamente no significativa) a una disminución de los niveles de BRP (ambas isoformas) en moscas envejecidas que sobre-expresan los 3 péptidos amiloides respecto de Bri₂-23 (disminución de ~ 10-20% para los 3 péptidos amiloides) y no así en moscas jóvenes.

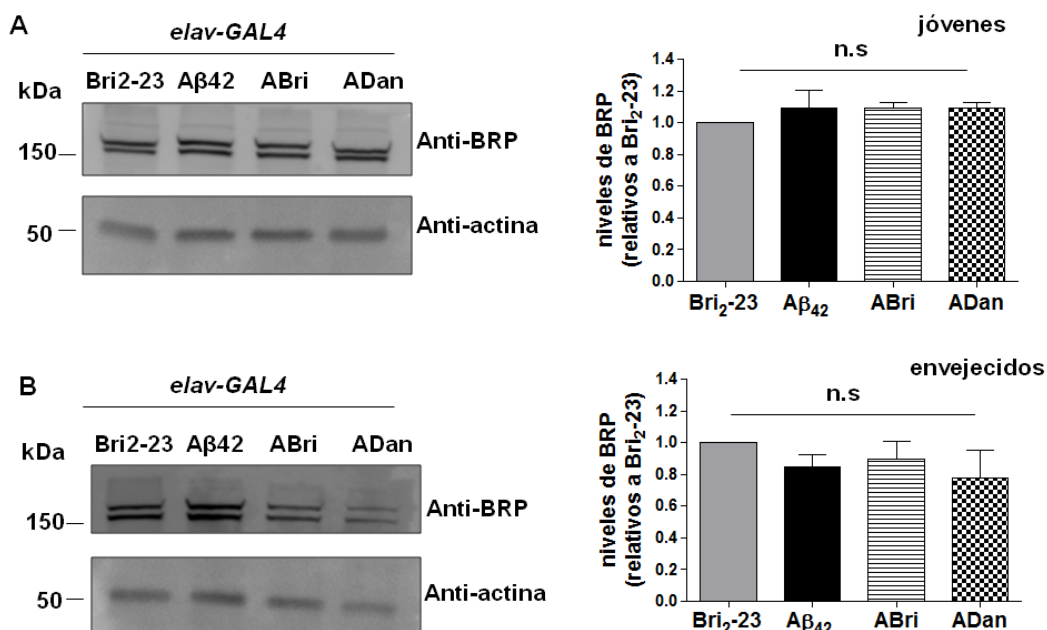


Figura 41: Impacto de la sobre-expresión de A β 42, ABri y ADan en el SNC sobre los niveles de BRP. A partir de extractos proteicos de cabezas de moscas de 7 (A) y 21 (B) días de edad se realizaron los Western blots revelados con anticuerpo anti-BRP (nc82) y se relativizó la señal a los niveles de actina. A la derecha, la cuantificación de 3-4 ensayos independientes, relativizados a Bri₂-23. ANOVA 1 factor ($p > 0,05$).

Estos resultados podrían sugerir que los péptidos amiloides A β 42, ABri y ADan generan defectos sinápticos asociados con el envejecimiento aunque se requiere de otros ensayos para corroborarlo.

4.1.3 -Resumen e interpretación de los resultados.

Generamos líneas transgénicas de *Drosophila* sitio-dirigidas que permitieron estudiar y comparar la neurotoxicidad provocada por A β 42, ABri y ADan en el ojo y en el SNC.

Mostramos una acumulación diferencial *in vivo* de los 3 péptidos amiloides, siendo ADan el de mayor grado de acumulación, seguido por A β 42 y a su vez, ABri. Esto sugiere que habría mecanismos de degradación más eficientes para ABri respecto de ADan y/o que las dinámicas de agregación intrínsecas de cada péptido estarían directamente involucradas en su acumulación diferencial.

Encontramos que la sobre-expresión de niveles moderados de los péptidos amiloides son suficientes para causar toxicidad tanto en ojo como en el SNC, examinado mediante distintos paradigmas. El patrón general indica una mayor toxicidad de ADan respecto de ABri y A β 42. Además, a pesar de los bajos niveles de acumulación de ABri, éste fue más tóxico que A β 42.

Evidenciamos acumulación no-fibrilar de los péptidos amiloides, lo que sugiere la presencia de especies con menor grado de agregación, posiblemente oligoméricas y solubles en detergentes. Estos resultados están en concordancia con lo reportado para varias enfermedades neurodegenerativas asociadas a la acumulación de péptidos amiloidogénicos, incluyendo la EA, en las cuales las especies oligoméricas solubles serían más tóxicas que el producto final de agregación de tipo fibrilar [160].

4.2 - Capitulo 2: Vulnerabilidad selectiva de grupos neuronales a los péptidos amiloides.

4.2.1 –Las neuronas laterales ventrales resisten a los efectos neurotóxicos de los péptidos amiloides A β 42, ABri y ADan.

El ritmo circadiano es un mecanismo autónomo de célula, basado en oscilaciones intrínsecas de 24 h de los productos de 4 genes, en *Drosophila*: *period*, *timeless*, *clock* y *cycle*, que se controlan mediante ciclos de retroalimentación negativa [161]. En la mosca hay ~150 neuronas, clasificadas en 7 grupos por su ubicación anatómica y expresión de neuropéptidos, que controlan el ritmo circadiano. Entre ellas, las neuronas laterales ventrales (LNV) de *Drosophila* liberan el neuropéptido “pigment dispersing factor” (PDF) para sincronizar las oscilaciones moleculares del resto de la red circadiana [162-164].

En relación a EA, Rezaval y colaboradores demostraron que la sobre-expresión de APP humano en las LNV provoca desconsolidación de la actividad rítmica circadiana con el envejecimiento, asociado a un proceso neurodegenerativo de dichas neuronas [148].

Con el objetivo de evaluar si tanto A β 42 como ABri y ADan provocan neurotoxicidad en las LNV (Figura 42 A) se procedió a expresar los péptidos utilizando el promotor *pdf-GAL4* [165] y analizar el efecto producido por los mismos en el comportamiento locomotor circadiano. La sobre-expresión de los amiloides en las LNV ya sea en heterocigosis (no mostrado) o en homocigosis no afectó el patrón locomotor circadiano de las moscas, evidenciado por los parámetros de porcentaje de ritmicidad de la población y el periodo promedio correspondiente a cada genotipo, ni aún en individuos envejecidos. (Figura 42 B y C).

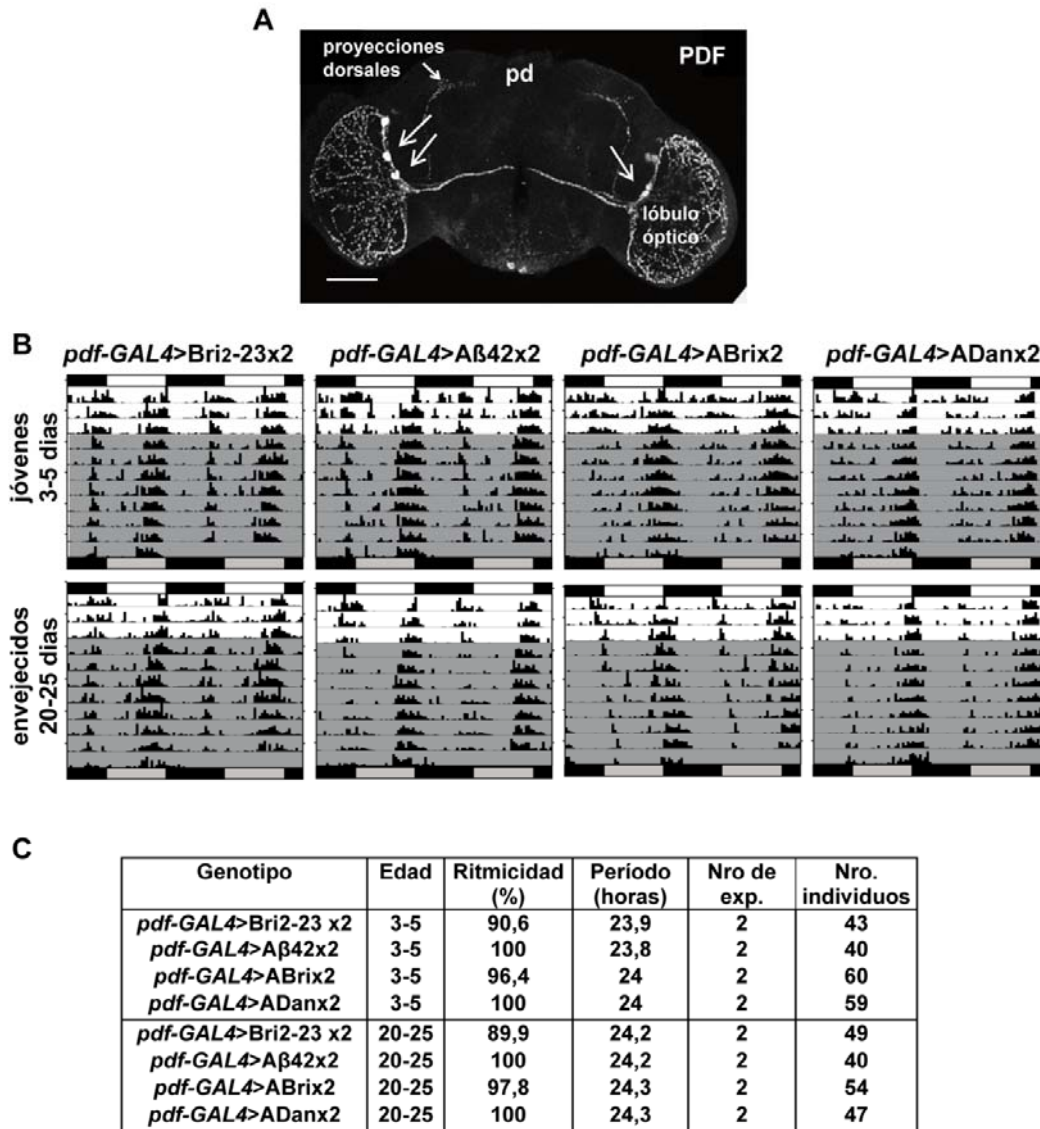


Figura 42: Efecto de la sobre-expresión de los péptidos en las neuronas laterales ventrales, PDF positivas, sobre el comportamiento locomotor circadiano. **A**, Inmunofluorescencia anti-PDF, las flechas marcan los cuerpos neuronales y las proyecciones de las neuronas al protocerebro dorsal (pd) y lóbulos ópticos. Barra= 100 μ m. **B**, Actogramas representativos de los 4 genotipos correspondientes a individuos jóvenes (3-5 días) y envejecidos (20-25 días) que sobre-expresan los péptidos utilizando *pdf-Gal4*. Se muestran los 3 primeros días de luz/oscuridad y los siguientes corresponden a oscuridad constante (fondo sombreado en gris). **C**, Cálculo del porcentaje de moscas rítmicas, período promedio del genotipo, número de experimentos y número de individuos totales en moscas jóvenes y envejecidas. No se detectaron diferencias significativas entre las moscas que sobre-expresan los amiloides respecto a su control Bri₂-23, para ninguno de los 2 parámetros evaluados. ANOVA de 2 factores ($p > 0,05$).

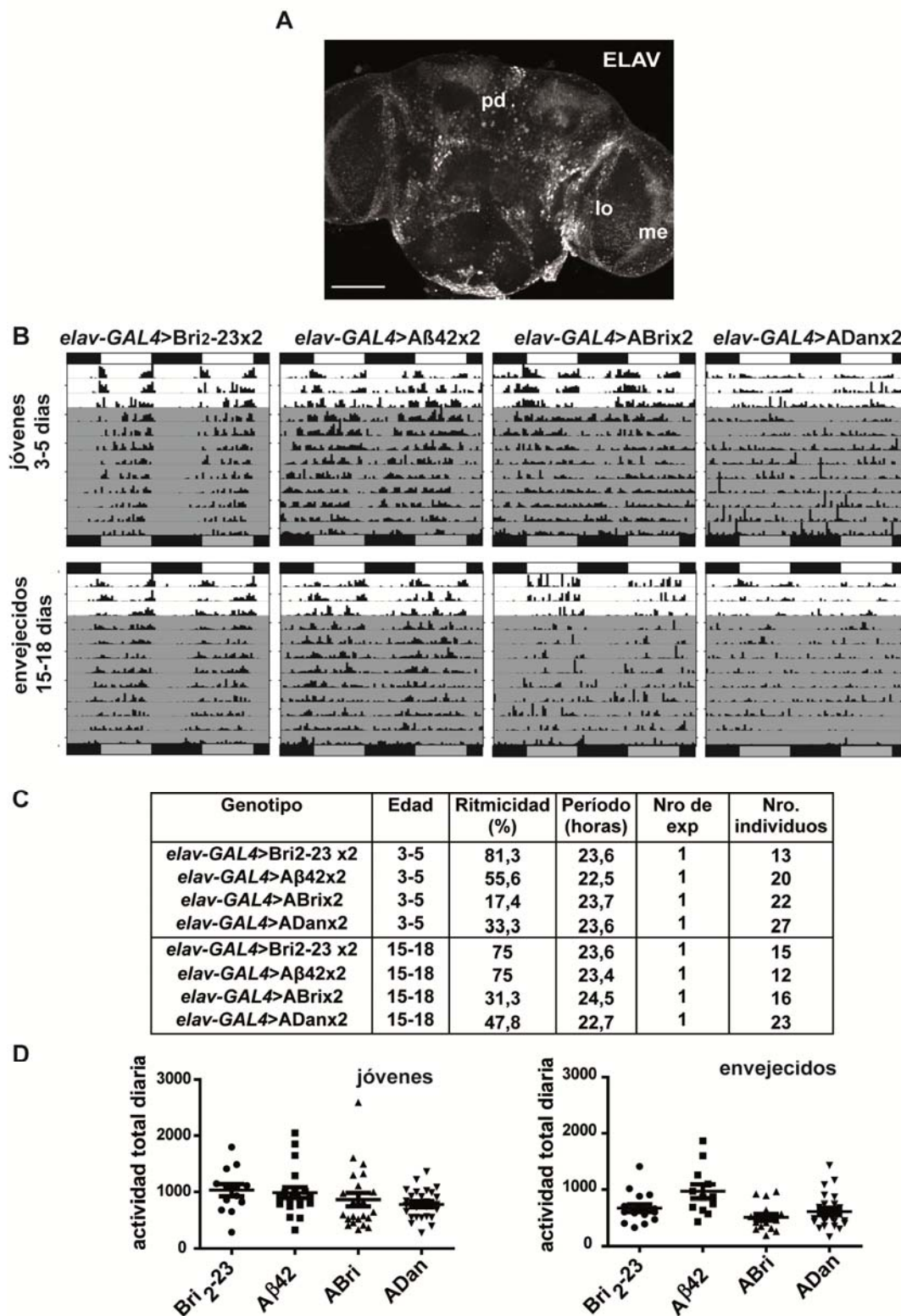


Figura 43: Efecto de la sobre-expresión pan-neuronal de los péptidos sobre el patrón de actividad locomotora rítmica. A, Inmunofluorescencia anti-ELAV, marca los núcleos de las neuronas en las distintas áreas del cerebro, aquí sólo se marcó pd, protocerebro dorsal; lo,

lóbulo óptico; me, medula. Barra= 100 μ m. **B**, Actogramas representativos de los 4 genotipos correspondientes a individuos jóvenes (3-5 días) y envejecidos (15-18 días). Se muestran los 3 primeros días bajo ciclos de luz/oscuridad y los siguientes en oscuridad constante (fondo sombreado en gris). **C**, Cálculo del porcentaje de moscas rítmicas, período promedio del genotipo, número de experimentos y número de individuos totales en moscas jóvenes y envejecidas. **D**, Cuantificación de la actividad total diaria para cada genotipo en individuos jóvenes y envejecidos. ANOVA de 1 factor ($p>0,05$).

Si bien las LNV forman parte del marcapasos central que controla el comportamiento locomotor circadiano, deben enviar y recibir información al resto de la red circadiana para mantener su correcto funcionamiento. Entonces se procedió a evaluar si la sobre-expresión pan-neuronal de los amiloides podría afectar el comportamiento rítmico circadiano (Figura 43 A). En una primera aproximación (1 sólo experimento) se observó que la sobre-expresión pan-neuronal de ABri y ADan provocó desconsolidación de la actividad locomotora rítmica respecto el control Bri₂-23 tanto en individuos jóvenes como en envejecidos, mientras que para A β 42 no sería tan evidente el fenotipo tóxico (Figura 43 B y C). Cabe destacar que se descartó que los efectos se deban a diferencias en la actividad total registrada para cada genotipo (Figura 43 D).

En conjunto estos resultados indican una llamativa resistencia por parte de las LNV a la toxicidad de niveles moderados de los 3 péptidos amiloides, mientras que la sobre-expresión pan-neuronal sería capaz de afectar dicho comportamiento.

4.2.2 - Búsqueda de grupos neuronales susceptibles a los péptidos amiloides tóxicos.

En la sección anterior mostramos la alta resistencia a la toxicidad amiloide de un subgrupo de neuronas (LNV, PDF positivas) involucradas en el control de la actividad locomotora circadiana.

El fenómeno de vulnerabilidad selectiva de grupos neuronales es prácticamente universal en las enfermedades neurodegenerativas. No se conoce por qué la acumulación de una determinada proteína afecta selectivamente a un subgrupo neuronal y/o una zona específica del cerebro, mientras otros subgrupos neuronales son altamente resistentes. Se cree que las características propias de cada subgrupo neuronal, así como su ubicación y conexiones neuronales, influyen su destino

durante el envejecimiento [166]. Sin embargo, los factores moleculares y celulares que determinan si una neurona sucumbe o resiste no han sido identificados.

Las células poseen mecanismos de defensa frente a la presencia de “estresores”. Éstas pueden experimentar diferentes tipos de estrés, incluyendo proteínas mal plegadas, altas demandas biosintéticas y de secreción, alteraciones en el balance redox, alteraciones en los niveles de calcio, respuestas inflamatorias y envejecimiento [167-170]. Notablemente, los sensores de estrés asociados al sistema de membranas del retículo endoplásmico (RE) juegan un rol importante en las respuestas de adaptación frente a alteraciones fisiológicas y en respuesta a estresores [168, 169]. La acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE es la mayor fuente de estrés del RE, lo que conlleva a un amplio espectro de respuestas celulares denominadas “Respuesta a Proteínas mal Plegadas” (UPR: por sus siglas en inglés “Unfolded Protein Response”).

En células de mamíferos hay 3 vías de respuesta de UPR mediadas por “inositol-requiring enzyme 1” (IRE-1), “protein kinase RNA-like endoplasmatic reticulum kinase” (PERK) y “Activating Transcription Factor 6” (ATF6) (revisado en [171]). La respuesta de IRE-1 es la más conservada entre especies y una vez activada la vía, IRE-1 provoca el splicing no convencional del ARN mensajero de “X-box binding protein 1” (XBP-1) promoviendo la transcripción de genes efectores de UPR. En *Drosophila* los mecanismos de activación de UPR están relativamente conservados. Se identificaron y caracterizaron las vías de IRE-1 y PERK y aunque se describió una proteína con identidad de secuencia con ATF6 (CG3136) aún se desconoce su participación en la respuesta UPR [172].

En este trabajo, se utilizó la respuesta a UPR mediada por IRE-1 como una aproximación al problema de la vulnerabilidad o resistencia neuronal a los depósitos amiloides.

4.2.2.1 - Los péptidos amiloides disparan respuesta de UPR, vía IRE-1.

Casas-Tinto y colaboradores reportaron que la sobre-expresión de A β 42 en el ojo de *Drosophila* induce activación de la respuesta a estrés de RE mediante la vía de IRE-1 a través del splicing no convencional del ARN mensajero de XBP1 [173].

Se procedió a evaluar si la co-expresión de los péptidos con UAS XBP1-GFP (reportero estrés de RE, ver Materiales y Métodos) inducía estrés de RE en el ojo de *Drosophila*. Para ello se realizaron inmunofluorescencias de disco imaginal de ojo a

partir de larvas 3. La Figura 44 muestra, en primer lugar, el patrón de expresión de GFP nuclear dirigido por *GMR* en fotorreceptores. Al sobre-expresar los péptidos A β 42, ABri y ADan en dicho tejido se observó activación de la respuesta a estrés RE en la zona esperada, no así con Bri₂-23 (Figura 44).

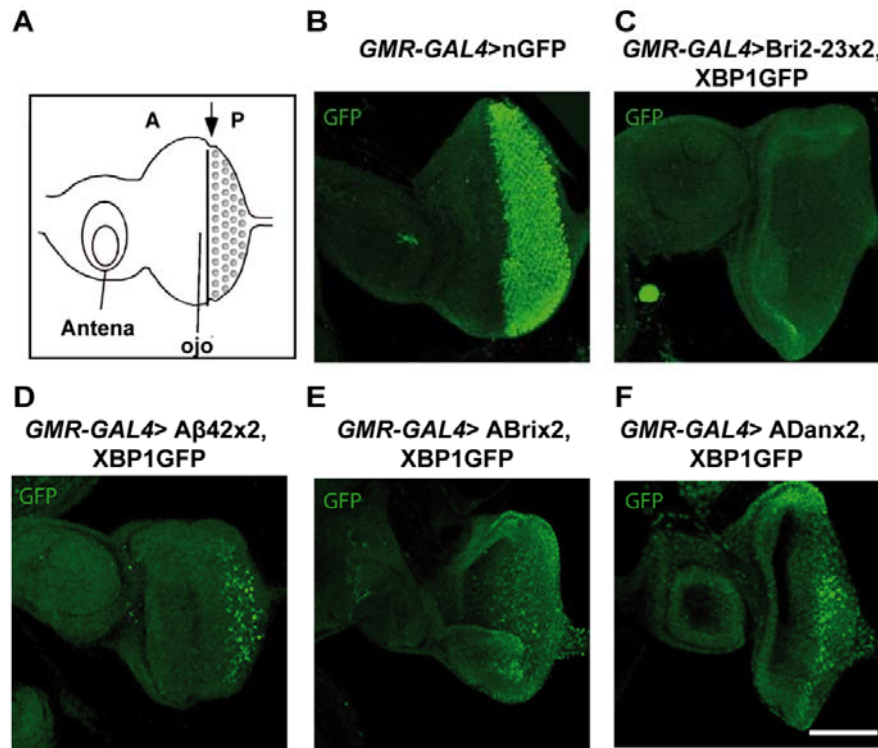


Figura 44: Efecto de la expresión de los péptidos sobre la inducción del splicing no convencional de XBP1. Los discos imaginales son grupos de células presentes en la larva que van a dar origen a todas las estructuras externas definidas en el adulto, luego de la metamorfosis. **A**, Esquema del disco imaginal de antena-ojo en larva 3 tardía. En la zona posterior (P) del ojo se produce una oleada de diferenciación en la que participa la proteína GLASS. **B**, Inmunofluorescencia anti-GFP muestra el patrón de expresión de GFP nuclear bajo el promotor *GMR-GAL4*. Inmunofluorescencias anti-GFP muestran el patrón de activación del reportero XBP1-GFP en líneas que sobre-expresan **C**, Bri₂-23x2 **D**, A β 42x2, **E**, ABrix2 y **F**, ADanx2. Barra= 50 μ m.

Si bien los 3 péptidos amiloides fueron capaces de inducir la respuesta a estrés de RE, se observó superposición parcial con la marca de GFP nuclear, sugiriendo que los precursores de fotorreceptores provocan una respuesta de estrés de RE heterogénea y diferencial frente a la sobre-producción de los péptidos amiloides.

Posteriormente utilizamos esta metodología para evaluar si la sobre-expresión de los péptidos amiloides inducía activación de respuesta de estrés de RE y/o afectaba diferencialmente algún subgrupo neuronal en particular. Para ello se co-expresaron los 4 péptidos y el reportero XBP1-GFP de manera pan-neuronal (mediante *elav-GAL4*) y se evaluó la activación del reportero de estrés de RE por inmunofluorescencia en cerebros enteros de moscas adultas crecidas a 28°C.

Se evidenció la activación de XBP1 por co-expresión de los amiloides; A β 42, ABri y ADan y prácticamente ninguna por parte de Bri₂-23. En la figura 45 se muestran imágenes representativas de los 4 genotipos; en rojo se observa la marca de RFP bajo el promotor de Pax6 (construcción que pertenece a las líneas sitio-dirigidas y que aquí fue utilizado únicamente para ubicar la misma zona del cerebro entre genotipos) y en verde la presencia de inmunoreactividad positiva para GFP, reportera de activación de la respuesta de estrés de RE vía IRE-1. Dado que XBP1 es un factor transcripcional, la construcción de fusión XBP1-GFP reporta inmunoreactividad de GFP mayormente en el núcleo. Por ello, al realizar una doble marcación con anti-ELAV observamos co-localización con la marca GFP (Figura 45, panel inferior). Sin embargo, no todas las neuronas ELAV positivas presentaron colocalización con GFP, indicando que la activación de la respuesta de estrés de RE fue restringida a ciertos grupos neuronales. Este patrón acotado podría estar asociado a una respuesta diferencial de las neuronas a la presencia de los amiloides tóxicos. A su vez, cabe destacar que el hecho que Bri₂-23 provoque muy baja o nula activación de la respuesta de estrés de RE es indicativo de que dicha respuesta no es mero producto de la sobre-expresión de proteínas en la vía secretoria.

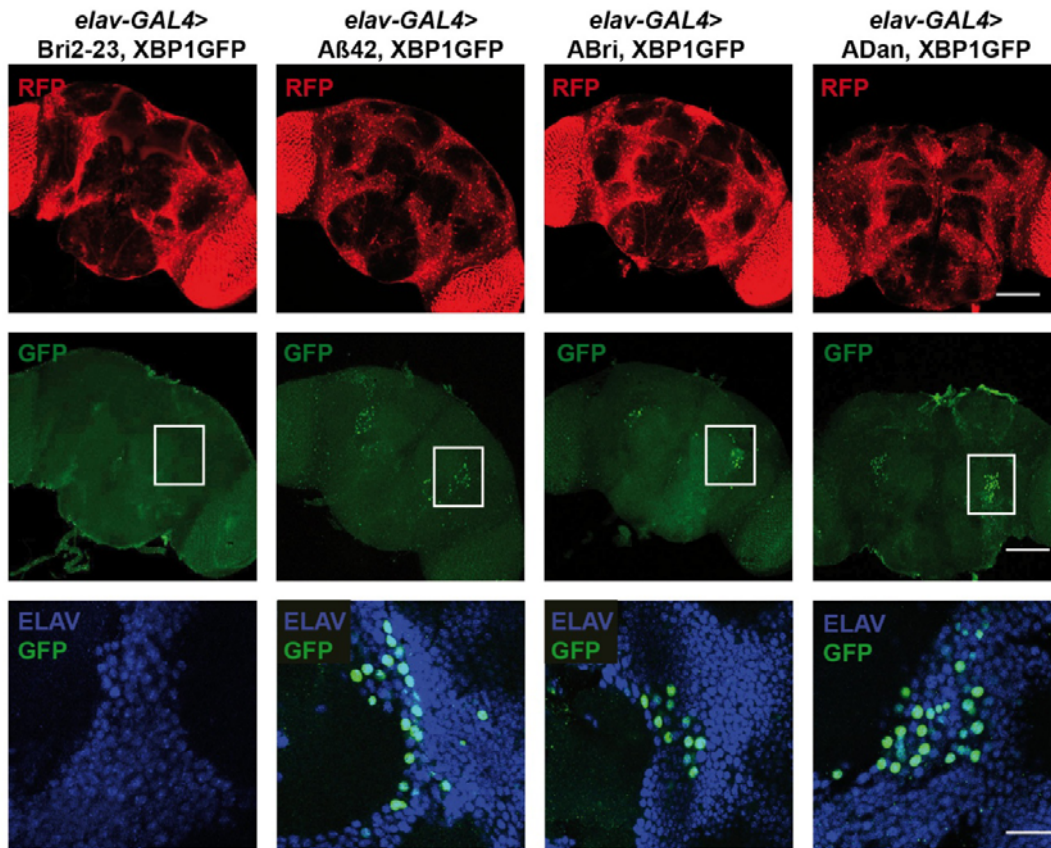


Figura 45: Efecto de la sobre-expresión pan-neuronal de Bri₂-23, Aβ42, ABri y ADan sobre la respuesta a estrés de retículo vía XBP1. Imágenes representativas de la co-expresión de los péptidos con el reportero XBP1-GFP. Barra= 50 μm. En el panel superior se muestra la marca RFP que corresponde al patrón de Pax6, únicamente utilizado para ubicar el mismo plano del cerebro. En el panel intermedio se muestra la marca anti-GFP. Barra= 50 μm. En el panel inferior se muestra una ampliación de la zona recuadrada en el panel intermedio que corresponde a la doble marcación de anti-GFP (activación del reportero de XBP1) y anti-ELAV. Barra= 20 μm.

A continuación, con el objetivo de analizar la progresión de la respuesta en el tiempo, se procedió a evaluar en distintas edades el patrón de activación del reportero XBP1-GFP y a cuantificar la intensidad de la fluorescencia de GFP. En cuanto a la localización de la marca, se observó mayoritariamente activación de la respuesta a estrés de RE en la zona del protocerebro dorsal, en regiones posteriores a los lóbulos antenales (LA) y los cuerpos pedunculados (CP), como se muestra en la figura 46 A y B. En cuanto a la intensidad de la marca registrada en dicha zona, las moscas jóvenes que sobre-expresaron ADan presentaron una mayor activación del XBP1 respecto del resto ($p < 0,05$), mientras que las moscas que sobre-expresaron A β 42 reportaron una activación creciente en intensidad con el envejecimiento. En el caso de ABri, las moscas presentaron niveles de activación similares a todas las edades, mientras que Bri₂-23 prácticamente no mostró activación del reportero (Figura 46 C).

En conjunto, estos resultados muestran que *in vivo* A β 42, ABri y ADan son capaces de inducir respuesta de estrés de RE, evidenciada por activación de la líneas reportera XBP1-GFP. Esta respuesta esta presumiblemente asociada a la acumulación de péptidos agregados en el RE, dado que la sobre-expresión de un péptido no amiloidogénico, Bri₂-23, no provocó activación de la vía. Además, se evidenció que bajos niveles de amiloides son suficientes para provocar una típica respuesta celular frente a proteínas mal plegadas con distinta intensidad y en distintos grupos neuronas, indicando una clara respuesta diferencial cualitativa y cuantitativa

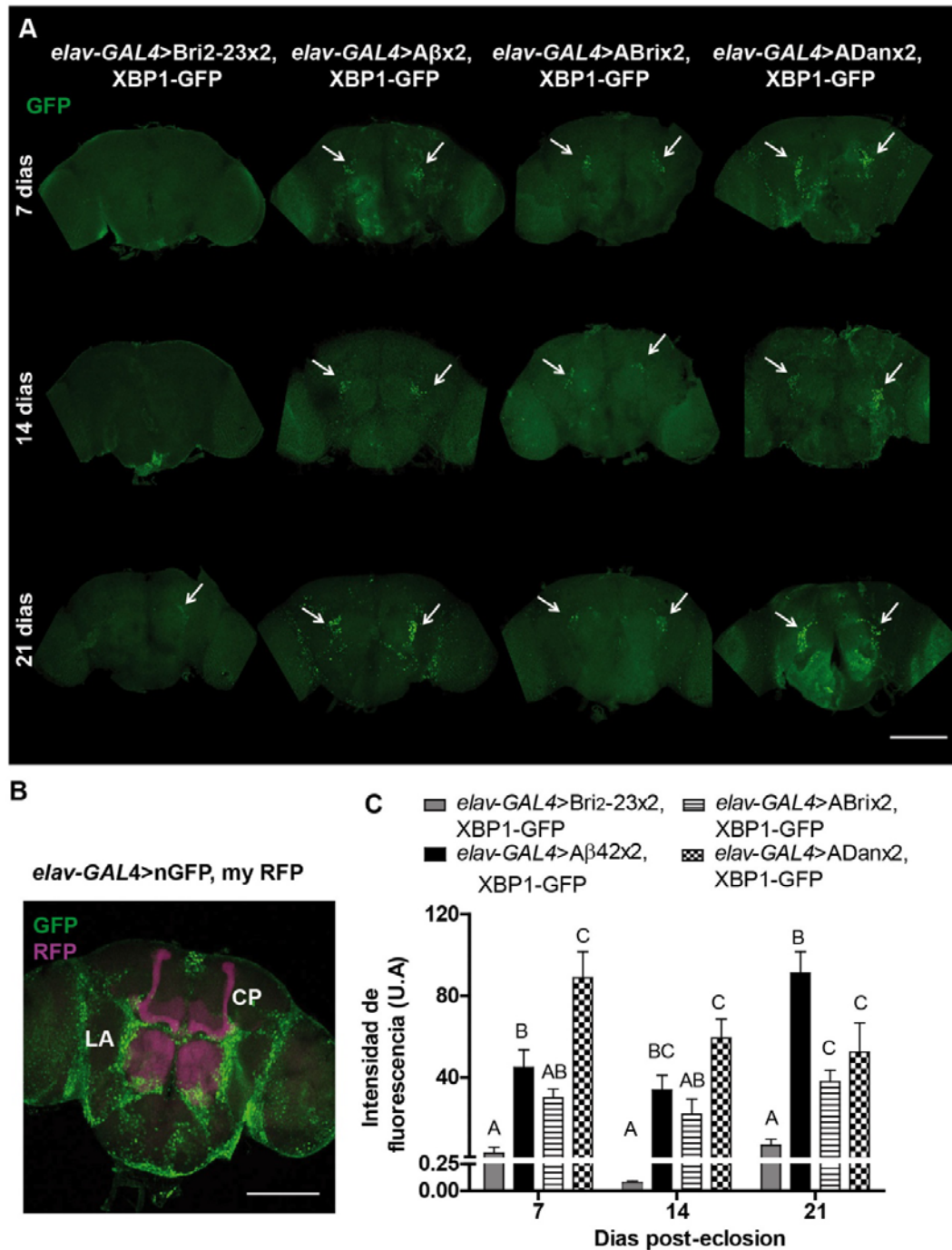


Figura 46: Activación temporal de la respuesta a estrés de RE en neuronas por sobre-expresión de los péptidos amiloides. **A**, Imágenes representativas de inmunohistoquímicas anti-GFP de cerebro de moscas adultas a 7,14 y 21 días de edad. Las flechas marcan las zonas de mayor señal de GFP. Barra= 100 μ m. **B**, Patrón de expresión de GFP nuclear (verde) y RFP de membrana (violeta) bajo el promotor *elav-GAL4*. Barra= 100 μ m. **C**, Cuantificación de la intensidad de fluorescencia registrada como consecuencia de la activación del reportero XBP1-GFP en zonas comparables del cerebro y a distintas edades. Se muestran las medias $\pm$

error estándar. ANOVA de 2 factores seguido de comparaciones de Bonferroni. Las letras distintas indican diferencias significativas para cada edad ($p < 0.05$). U.A= unidades arbitrarias.

4.2.3 - Resumen e interpretación.

Mediante 2 estrategias distintas encaramos el estudio de la respuesta neuronal a diferentes péptidos amiloides.

Encontramos que las neuronas marcapaso central de *Drosophila* (LNV) resultan resistentes a los agregados tóxicos amiloides, mientras que la sobre-expresión pan-neuronal de los amiloides logra desconsolidar los ciclos de actividad/reposo en las moscas. Estos resultados denotan que las neuronas centrales en el control de la actividad locomotora circadiana parecen resistir a los amiloides tóxicos, mientras que otras neuronas que participan en el control de los ritmos circadianos serían vulnerables.

Mostramos que A β 42, ABri y ADan son capaces de inducir estrés en el RE y promover activación de la vía IRE-1/ XBP1, no así el péptido no amiloidogénico Bri₂-23, señalando un claro efecto asociado a la acumulación de proteínas agregadas en el RE. Sin embargo, y de acuerdo con el concepto de vulnerabilidad y/o resistencia selectiva, la respuesta de estrés de RE por la vía de IRE-1 fue restringida a pesar de la expresión pan-neuronal de los péptidos amiloides, señalando susceptibilidad diferencial por parte de distintos grupos neuronales, aún no identificados.

4.3 - Capítulo 3: Búsqueda de genes moduladores de la toxicidad de A β 42.

4.3.1 - Rastrillaje genético en busca de moduladores de la toxicidad de A β 42.

Con la intención de desarrollar un método de rastrillaje genético eficiente que permita identificar nuevos moduladores de la toxicidad de A β 42 y teniendo en cuenta que el envejecimiento es el mayor factor de riesgo para EA, decidimos utilizar el comportamiento de escalada (geotaxis negativa) para evaluar interacciones génicas a distintas edades.

4.3.1.1 - Caracterización de la línea de A β 42 elegida.

Los niveles de A β 42 alcanzados por la línea *elav-GAL4>A β 42Hj2.12* provocaron un fenotipo intermedio de escalada que podría ser mejorado o empeorado por efecto de las interacciones génicas (Figura 47). Además, el fenotipo tóxico se evidenció con el envejecimiento, de tal manera que permitía testear nuestra hipótesis de que la acumulación de A β 42 es un factor importante pero no suficiente para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, debiendo existir otros factores relacionados con el envejecimiento cerebral.

Cabe destacar que dado que la línea A β 42Hj2.12 fue generada por inserciones al azar en el genoma, se incluyeron los controles pertinentes en el análisis. Es decir que se descartó que tanto la línea promotora *elav-GAL4* como la línea transgénica A β 42Hj2.12 presenten defectos en la escalada por si solas. Por otra parte, se corroboró que la sobre-expresión *elav-GAL4>A β 42Hj2.12* provoque una disminución en la respuesta geotáctica sólo en moscas envejecidas ($p < 0,05$) y no en moscas jóvenes, cumpliendo con las condiciones deseadas para el rastrillaje genético (Figura 47).

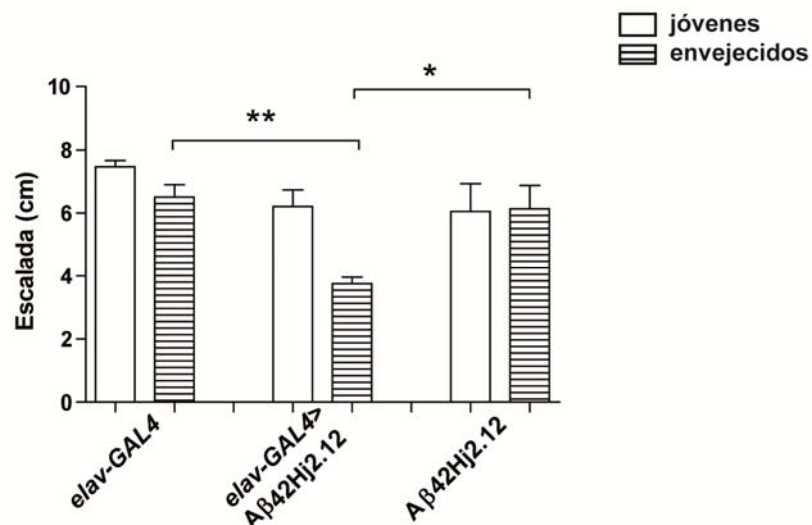


Figura 47: Efecto de la sobre-expresión pan-neuronal de AβHj2.12. Cuantificación de la distancia recorrida en 10 seg por los genotipos *elav-GAL4*, *elav-GAL4>Aβ42Hj2.12* y *Aβ42Hj2.12* en moscas jóvenes y envejecidas, crecidas a 25°C. Se muestran las medias ± error estándar. ANOVA de 2 factores, seguido de comparaciones de Bonferroni. Los asteriscos indican diferencias significativas. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Una vez caracterizado el comportamiento de la línea *elav-GAL4>Aβ42Hj2.12*, se procedió a realizar el rastillaje genético siguiendo los pasos y cuidados descritos en materiales y métodos.

4.3.1.2 - Resultados preliminares del rastillaje genético

Hasta el momento se evaluaron 90 de ~ 500 líneas de la colección de Deficientes del “Deficiency Kit” obtenido de Bloomington Stock Center. (<http://flystocks.bio.indiana.edu/Browse/df/dfextract.php?num=all&symbol=bloomdef>). Se identificaron 10 líneas potenciales moduladoras de la toxicidad de Aβ42: la línea 7676 mejoró el fenotipo y las siguientes 9 lo empeoraron: 27369, 6755, 8059, 8060, 24392, 24923, 7682, 8967 y 9152.

Confirmamos que la línea 27369 combinada con *elav-GAL4>Aβ42Hj2.12* provocó un empeoramiento del fenotipo de escalada en moscas envejecidas respecto de *elav-GAL4>Aβ42Hj2.12* ($p < 0.05$) y que la línea 27369 por sí sola no presentó defectos en la escalada, aún en moscas envejecidas (Figura 48). Esto significa que identificamos un hit positivo del rastillaje genético, tal que cumple con todos los requisitos propuestos. Resta aún confirmar las otras 9 líneas potenciales candidatas.

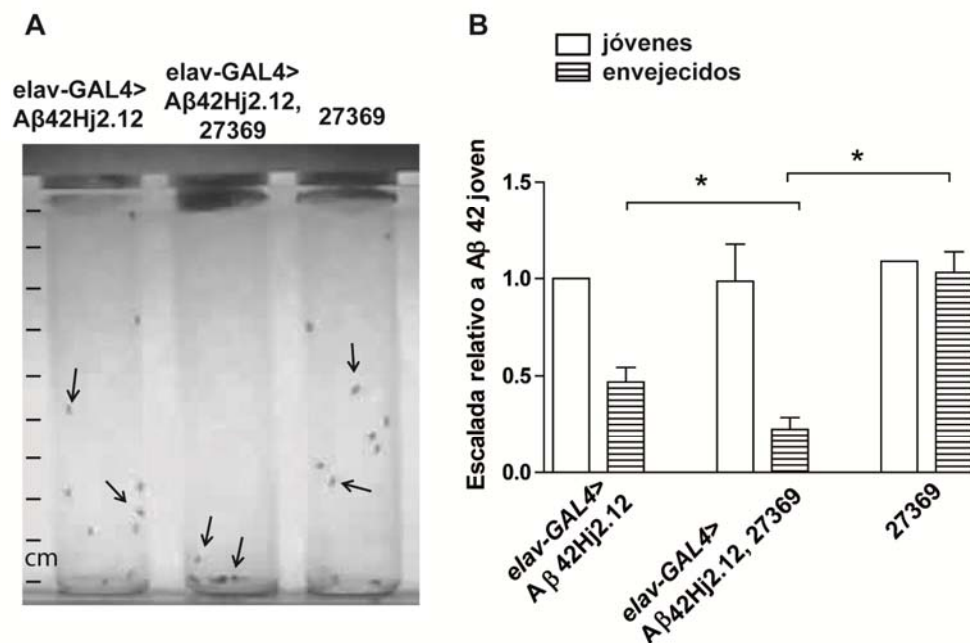


Figura 48: Efecto de la combinación entre Aβ42 y la línea deficiente 27369 sobre el fenotipo de escalada. **A**, Fotografía representativa del ensayo de geotaxis en moscas envejecidas a 25°C, donde se muestra los genotipos *elav-GAL4>Aβ42Hj2.12*, *elav-GAL4>Aβ42Hj2.12, 27369* y *27369* (línea deficiente por sí sola). Las flechas marcan las moscas dentro de los tubos de vidrio. **B**, Se graficó el promedio de altura alcanzado por cada genotipo a los 10 seg de iniciado el ensayo, relativos a los valores de *elav-GAL4>Aβ42Hj2.12* en individuos jóvenes. ANOVA de 1 factor seguido de comparaciones de Bonferroni para moscas envejecidas. Los asteriscos muestran diferencias significativas (* $p < 0.05$).

Una vez confirmado que el fenotipo estaba determinado por la combinación entre Aβ42Hj2.12 y la línea 27369, se procedió a analizar los genes incluidos en dicha deleción. El fragmento del genoma delecionado corresponde a 77C3-78A1 del cromosoma 3L (<http://flybase.org/reports/FBab0045889.html>). Los genes incluidos en la deleción 27369 se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: Genes incluidos en la línea deficiente nro. 27369.

Nombre	Anotación	Citología
<u>atk</u>	Artichoke	CG5195
<u>CG5199</u>	-	CG5199
<u>CG5872</u>	-	CG5872
<u>CG5910</u>	-	CG5910
<u>CG11796</u>	-	CG11796
<u>CR43943</u>	-	CR43943
<u>CR45176</u>	-	CR45176
<u>Las</u>	Sintetasa de ácido lipóico	CG5231
<u>mRpL15</u>	Proteína ribosomal mitocondrial L15	CG5219
<u>dPS</u>	Presenilina	CG18803
<u>snoRNA:Me18S-U1356a</u>	snoRNA:Me18S-U1356a	CR34644
<u>snoRNA:Me18S-U1356b</u>	snoRNA:Me18S-U1356b	CR34645
<u>snoRNA:Me18S-U1356c</u>	snoRNA:Me18S-U1356c	CR34646
<u>snoRNA:Or-CD11</u>	-	CR34711
<u>Uhg8</u>	Uhg8	CR42454

CG, "protein coding-gene". CR, non- protein coding-gene.

Al analizar los genes incluidos en dicha deficiente se vio que posee 15 genes mapeados. Dado que nuestro interés original se basa en poder identificar genes moduladores de la toxicidad de A β 42 que presenten expresión génica en SNC y posean ortólogos humanos, la lista incluye 4 genes candidatos que cumplen con los requisitos para un posterior análisis. Estos son:

- PS, Presenilina (CG18803).
- Las, Sintetasa de ácido lipóico (CG5231).
- mRpL 15, Proteína ribosomal mitocondrial L15 (CG5219).
- 4-hidroxi-fenil piruvato dioxigenasa (CG11796).

A continuación se describe brevemente la función de cada uno de los 4 genes de interés.

Tabla 3: Función de los genes candidatos

Gen	Función/es
Presenilina (PS)	Enzima que forma parte de complejo de γ secretasa, involucrada en la proteólisis de APP, así como de otros sustratos Notch, ErbB4, CD44, N-E caderinas.
Sintetasa de ácido lipoico (LAS)	Enzima involucrada en el último paso de síntesis de ácido lipoico (inserción de azufre en los C6 y C8 del residuo octanoilo).
Proteína ribosomal mitocondrial L15 (mRpL15)	Ribonucleoproteína mitocondrial, función aún no caracterizada. Se postula su interacción con ciclofilina D, un componente del poro mitocondrial.
4-Hidroxi-fenil-piruvato dioxigenasa (HPPD)	Enzima que participa en el catabolismo del aminoácido tirosina mediante la conversión de 4-hidroxi fenil piruvato a ácido homogentísico.

LAS, lipoic acid synthase. mRpL15, mitochondrial ribosomal protein L15. HPPD, 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase.

En estudios posteriores identificaremos, mediante la utilización de ARN de interferencia, cual/es de los genes incluidos en la delección son los responsables del aumento de la toxicidad de A β 42.

Estos resultados preliminares nos sugieren que el método de rastillaje genético es potencialmente eficiente y nos permite identificar genes que modulen la toxicidad de A β 42 en el SNC.

4.3.2 - Resumen e interpretación.

El método de rastillaje genético aquí propuesto presentó resultados preliminares promisorios para identificar nuevos moduladores de la toxicidad de A β 42.

Se utilizó un comportamiento directamente asociado con el SNC y sensible al envejecimiento, concordante con el hecho de que la edad es el mayor factor de riesgo en las enfermedades neurodegenerativas.

5 - Discusión

5 - Discusión

En este trabajo utilizamos *Drosophila melanogaster* como modelo animal para estudiar aspectos básicos de la toxicidad de péptidos amiloides asociados a demencias humanas. Particularmente elegimos estudiar y comparar los péptidos amiloides asociados a EAE, que es la forma más frecuente de demencias, DFB y DFD, enfermedades hereditarias y muy poco frecuentes. La primera está asociada a la acumulación cerebral de péptido A β 42 y las dos restantes a los péptidos ABri y ADan, respectivamente. Es destacable que DFD y DFB son las únicas enfermedades neurodegenerativas en las cuales las respectivas mutaciones causan la producción de péptidos amiloidogénicos por alteración de los marcos de lectura en el precursor BRI₂ [74, 79]. Su altísima penetrancia, la relación causal mutación-amiloide y el fenotipo clínico-patológico con similitudes importantes con la EA, apoyan fuertemente la hipótesis amiloide.

Sin embargo, en EAE, el péptido A β salvaje se produce y acumula en todos los cerebros humanos con el envejecimiento. Aunque dicha acumulación es mucho mayor en los enfermos que en los individuos no dementes, tampoco es suficiente para que se desarrolle EA, como lo demuestran un 30% de ancianos sanos con “alta resiliencia” en los que la neuropatología es indistinguible a la de EA [174-176]. El problema de esta resistencia o vulnerabilidad neuronal a la potencial toxicidad de A β ha sido muy poco estudiado experimentalmente.

La utilización de modelos animales permite estudiar diversos aspectos de las patologías. Sin embargo, debemos remarcar que ninguno de los modelos animales transgénicos desarrollados (vertebrados e invertebrados) pueden considerarse “modelos de enfermedad neurodegenerativa” ya que sólo reproducen ciertos aspectos muy elementales de estas enfermedades. Es en este contexto en el que deben interpretarse nuestros resultados.

Nuestras líneas se diseñaron específicamente para el estudio de la neurotoxicidad de los péptidos A β 42 (salvaje) ABri y ADan. Esto difiere de varios modelos animales de estas enfermedades en los que se sobre-expresa y/o se reemplaza un precursor salvaje por su versión mutada, debiendo ser procesado y cuya eficiencia influye en los niveles de péptidos producidos y por consiguiente, en la toxicidad amiloide. Esto implica que nuestros modelos de sobre-expresión de los péptidos amiloides permiten estudiar los aspectos relacionados sólo a la toxicidad amiloide, independientemente de los posibles efectos en los que están implicados las proteínas precursoras y/o sus otros productos de proteólisis. Además, nosotros

contamos con una línea transgénica control que sobre-expresa un péptido no amiloidogénico Bri₂-23, que tiene el mismo procesamiento en la vía secretoria que los péptidos amiloides. Esto implica que al comparar los efectos producidos por la sobre-expresión de los amiloides con el péptido control, nos independizamos de los posibles efectos no controlados asociados a la sobre-expresión general de proteínas.

Es así que la comparación controlada de la toxicidad entre péptidos, la detección de respuesta diferencial neuronal a los mismos y la posibilidad de encontrar interacciones genéticas que modulen dichos efectos son muy factibles en *Drosophila* y pueden contribuir a comenzar a comprender estos interrogantes.

5.1 - Acumulación y toxicidad diferencial de Aβ, ABri y ADan.

En nuestros modelos de *Drosophila* pudimos evidenciar producción y acumulación de los péptidos amiloides Aβ₄₂, ABri y ADan asociados a neurotoxicidad.

Los fenotipos neurotóxicos encontrados por la sobre-expresión de los péptidos amiloides en el ojo fueron moderados, sin presentar el desarreglo grosero típicamente llamado “ojo rugoso” (que involucra fusión de omatidias contiguas, pérdida de quetas mecanosensociales y hasta apoptosis de fotorreceptores) reportado para otras proteinopatías inducidas por transgénesis en *Drosophila* [177]. Destacamos que sólo podemos comparar en la bibliografía lo reportado con Aβ ya que no hay modelos de mosca descriptos para ABri y ADan. Al correlacionar la toxicidad en el ojo con los niveles de Aβ₄₂ alcanzados, medidos por ELISA, se evidenció un claro efecto tóxico dosis dependiente, concordante con lo reportado previamente [123]. Dado que los fenotipos neurotóxicos encontrados para Aβ₄₂, ABri y ADan fueron sutiles (algunas omatidias fusionadas y pérdida de quetas), los datos sugieren que nuestras líneas expresan niveles relativamente bajos de los péptidos. Sin embargo, dichos niveles alcanzados fueron suficientes para provocar daños sutiles en la retina, los cuales fueron evidentes al estudio con microscopía electrónica de barrido ambiental.

A nivel bioquímico, encontramos que los péptidos, correctamente procesados en la vía secretoria, se acumularon en forma diferencial. Cabe destacar que observamos que la adición N-terminal del tag de His provocó un aumento en la acumulación *in vivo* tanto para Aβ₄₂ como en ABri, no así para ADan. Creemos que esto posiblemente se deba a que ADan presenta una muy rápida cinética de la agregación, como se ha reportado en estudios *in vitro* [90, 91]. De todas maneras, combinando los resultados de Western blots de los péptidos con y sin tag de His e inmunohistoquímica podemos

concluir que ADan se acumuló más que A β 42 y ABri, lo cual se asociaría con su mayor toxicidad evidenciada por los resultados del fenotipo externo e interno de la retina. A su vez, los niveles de acumulación de ABri resultaron menores que los de A β 42. De hecho, la difícil detección de ABri con anti-His o con su anticuerpo específico sugiere que su vida media es más corta que ADan y A β 42, indicando una eficiente remoción celular. En los modelos de ratones transgénicos con el precursor BRI₂ mutado y aún con niveles de alta expresión de su precursor, no se ha podido detectar presencia del péptido ABri [82] lo que apoya la idea de un metabolismo distinto para éste péptido, aún no estudiado en detalle. Sin embargo, a pesar de sus bajos niveles, en nuestro modelo se pudo evidenciar toxicidad al sobre-expresar ABri en ojo.

En cuanto al estado de agregación de los péptidos, en los tres casos, fueron solubilizados en su mayor parte con detergentes (>85% del total) y no se detectaron depósitos con tioflavina S lo que indica que *in vivo* no adoptaron la forma fibrilar amiloide.

En el SNC, al utilizar un promotor de expresión pan-neuronal, se pudo detectar funcionalmente la neurotoxicidad de los péptidos amiloides en diversos paradigmas incluidos la sobrevida, geotaxis negativa y fototaxis positiva. Estos últimos son comportamientos motores complejos que requieren integración de señales mecánicas o lumínicas en circuitos neuronales del SNC que no están completamente caracterizados. Se evidenciaron diferencias importantes en cuanto al grado de toxicidad inducida por cada péptido. El efecto en el acortamiento de sobrevida fue mayor para ADan, seguido por ABri y A β 42. En individuos jóvenes, a los 7 días post eclosión, ADan indujo defecto en el comportamiento de geotaxis negativa mientras que dicho efecto apareció a los 14 y 21 días de edad con ABri y A β 42, respectivamente. El compromiso del reflejo fototáctico fue sólo inducido por ADan en individuos envejecidos. Los niveles de expresión de los 3 péptidos en SNC fueron probablemente menores que en el ojo ya que bajo las mismas condiciones de extracción de proteínas y número de cabezas, sólo pudimos detectar por Western blot inmunoreactividad para ADan, identificando monómeros y posibles tetrámeros. La acumulación de A β 42 en SNC pudo detectarse mediante ELISA de captura con anticuerpos específicos. Estas diferencias entre los niveles de péptidos en ojo y SNC podrían atribuirse a las eficiencias relativas de los promotores, siendo GMR más eficiente que ELAV quizás por los patrones temporales de expresión (*glass* con un alto pico de expresión en precursores de fotorreceptores y *elav* en forma constitutiva en neuronas post mitóticas). A su vez, los distintos tejidos pueden generar distintas respuestas frente a niveles similares de péptidos amiloides.

Nuevamente, pese a niveles bajos/moderados de expresión, los péptidos fueron capaces de inducir neurotoxicidad, aquí más claramente asociada al envejecimiento destacando que ADan mostró mayor toxicidad que ABri y a su vez que A β 42. Esto nos sugiere nuevamente que los bajos niveles de de acumulación alcanzados por ABri, son suficientes para provocar neurotoxicidad, reflejando una propiedad quizás relacionada a la estructura primaria de este péptido.

El análisis histológico e inmunohistoquímico cerebral permitió ver efectivamente depósitos de los 3 péptidos amiloides. Estos depósitos estaban principalmente restringidos a la región del protocerebro dorsal, quizás por la mayor abundancia de somas neuronales y no hubo una distribución homogénea a lo largo y ancho del corte de cerebro. En el caso de A β 42, los depósitos parecieron mayormente intracelulares, con un patrón similar al descrito en un trabajo anterior de otro grupo [122]. Para ABri y ADan, la inmunotinción fue un poco más difusa, sugiriendo acumulación intra y extracelular, resultados concordantes con ensayos en cultivos celulares en los cuales detectan ABri y ADan tanto en medio condicionado como intracelular.[86].

Repitiendo el patrón encontrado en el ojo, en ninguna de las líneas se detectaron depósitos tioflavina S positivos en cerebro, indicando la ausencia de conformación fibrilar. Estos resultados de depósitos restringidos no-fibrilares son compatibles con mecanismos de toxicidad asociadas a oligómeros solubles de bajo orden con alta capacidad de difusión. [178, 179].

La escasa vacuolización observada para A β 42 y casi nula para ADan y ABri apuntan a mecanismos de toxicidad funcionales, probablemente a nivel sináptico, que no llegan a provocar daño estructural y pérdida masiva de tejido. Ensayos electrofisiológicos y bioquímicos con mutantes de A β mostraron disfunción sináptica tanto en modelos de *Drosophila* [126] [128] como en ratones transgénicos para APP [180]. Como una aproximación a estos resultados evaluamos el efecto de la sobre-expresión de los péptidos amiloides sobre los niveles la proteína pre-sináptica BRP. Estos mostraron una tendencia a una disminución de las dos isoformas de BRP sobre todo en el modelo de sobre-expresión de ADan; aunque no fue estadísticamente significativa respecto del control Bri₂-23. Creemos que los efectos neurotóxicos evidenciados por el comportamiento podrían estar causados por una disfunción sináptica en zonas específicas del cerebro, quizás la técnica de Western blot pierde sensibilidad al no permitir discriminar regiones afectadas. El empleo de técnicas de inmunohistoquímica e electrofisiología podrían permitir un mejor estudio de la pérdida de conectividad sináptica.

Los resultados muestran que tanto para A β 42 como para ADan los grados de toxicidad se correlacionan directamente con los niveles de acumulación. En cambio ABri provocó toxicidad leve, comparable a la de A β 42, pero presentó una menor acumulación *in vivo*. Estos resultados concuerdan ampliamente con la hipótesis actual de que la neurotoxicidad, en estas enfermedades neurodegenerativas, estaría relacionada con la presencia de oligómeros solubles de proteínas o péptidos, quizás intermediarios en la vía de agregación hacia el producto final amiloide el cual sería mucho menos tóxico [91, 181]. Además, se ha reportado que los oligómeros de A β 42 bloquean la transmisión sináptica, provocando una disminución en la liberación de vesículas pre-sinápticas [182]. A su vez, se ha postulado que la toxicidad de oligómeros de ABri, ADan y A β podría relacionarse con su capacidad de formar estructuras en membrana similares a canales iónicos de baja selectividad [95].

En resumen, nuestros modelos de *Drosophila* de inserción sitio-dirigida y bajos niveles de expresión fueron adecuados para mostrar acumulación y toxicidad moderadas pero significativas en el ojo y en el SNC con los 3 péptidos amiloides. La neurotoxicidad fue dependiente de la edad y concuerda con resultados publicados por Roger y colaboradores quienes mostraron que la inducción de la expresión pan-neuronal de la variante genética A β 42 “ártico” (A β E22G), asociada a EA hereditaria [183] en moscas envejecidas provoca mayor toxicidad que al inducirlo en moscas jóvenes, mostrando un fuerte componente del envejecimiento a la vulnerabilidad neuronal [184]. En nuestro caso, las moscas producen bajos niveles de péptidos que se acumulan con la edad, evidenciando los fenotipos con el envejecimiento. A su vez, nuestros modelos presentan acumulación de péptidos no-fibrilar y ADan resultó más agresivo que ABri y A β 42. Esto es consistente con algunos componentes de los fenotipos observados en pacientes con EAE, DFB y DFD.

Mientras que EAE es una enfermedad de comienzo tardío e insidioso con muchos años o décadas previas de acumulación de A β salvaje, DFB y DFD son de comienzo más precoz y de mayor agresividad. Más aún, DFD precede en casi 2 décadas el comienzo respecto de DFB. En todos los portadores de mutaciones en BRI₂ se produce una copia de ABri o ADan y se desarrolla la enfermedad, mientras que no todos los individuos que acumulan masivamente A β 42 desarrollan EA. En las tres patologías, especialmente en DFD y DFB, abundan los depósitos de péptidos en estado no-fibrilar [74, 79]. Una situación similar se encuentra en los modelos de *Drosophila* que sobre-expresan la variante genética A β ártica [185]. En cierto modo, parecería existir una correlación entre algunos aspectos de estas enfermedades y el tipo de péptido amiloide que se acumula en cada una de ellas.

Nuestro trabajo muestra la primera comparación de los efectos de estos péptidos amiloides en un modelo animal con cerebro complejo pasible de manipulación genética para estudios controlados *in vivo*.

5.2 - Resistencia y vulnerabilidad selectiva neuronal a péptidos amiloides.

Habiendo caracterizado los modelos de neurotoxicidad de A β 42, ABri y ADan en *Drosophila*, la segunda parte de nuestro trabajo experimental se dedicó a explorar el problema de la resistencia y vulnerabilidad selectiva de las neuronas a péptidos amiloides. Es de destacar que esta selectividad neuronal es una propiedad común a todas las enfermedades neurodegenerativas asociadas a proteínas mal plegadas pero hay muy poco trabajo experimental reportado sobre los posibles mecanismos subyacentes. Nuestras líneas transgénicas, expresando 3 péptidos amiloides con diferente grado de toxicidad son adecuadas para, en primer término, testear si alguno de los péptidos se comporta como “neurotoxina” universal y segundo, identificar poblaciones neuronales con respuesta diferencial a amiloides.

Para ello utilizamos dos estrategias diferentes: 1) dirigir los péptidos a grupos neuronales con promotores específicos y 2) expresar los péptidos en forma pan-neuronal y observar una respuesta celular particular, en este caso la de estrés de RE.

Mediante el promotor *pdf* se expresaron 2 copias de Bri₂-23, A β 42, ABri y ADan en las neuronas laterales ventrales que controlan la actividad locomotora circadiana. Estudios previos de nuestro grupo colaborador mostraron que la sobre-expresión de la proteína APP humana produce toxicidad en este circuito que se evidencia por pérdida de la actividad locomotora rítmica [148]. Dado que *Drosophila* presenta baja actividad proteolítica de β -secretasa [115] que corta el amino-terminal para generar A β , el efecto tóxico posiblemente no se deba a acumulación de este péptido y se atribuye a un defecto en el transporte axonal [120]. Estos resultados concuerdan con reportes de Stokin y colaboradores donde señalan los defectos ocasionados por sobre-expresión de APP en transporte axonal independiente de A β [186].

La sobre-expresión de A β 42, ABri y ADan en neuronas PDF+ no produjo ninguna toxicidad detectable en este comportamiento ni en individuos jóvenes ni en envejecidos. Posteriormente a la publicación de nuestros resultados se reportó que la sobre-expresión de distintas variantes de A β con capacidad de agregación creciente en las neuronas laterales ventrales no produjo alteraciones en la actividad locomotora rítmica circadiana [187]. Estos resultados indican que por lo menos este subgrupo

neuronal, al ser directamente desafiado con péptidos amiloides, presenta una notable resistencia a la toxicidad. Se podría especular que las neuronas PDF tienen un sistema de degradación y/o eliminación de péptidos amiloides altamente eficiente, aunque este mecanismo deberá ser explorado experimentalmente.

El mismo paradigma comportamental fue estudiado al sobre-expresar los 3 péptidos amiloides en forma pan-neuronal. En este caso, los péptidos más amiloidogénicos, ADan y ABri, provocaron la desconsolidación de la actividad locomotora circadiana en individuos jóvenes y envejecidos. En estudios similares utilizando la variante genética agresiva de A β (A β “ártica”) o A β expresado en tándem [188] evidenciaron resultados semejantes [187, 189]. A pesar de la desconsolidación de la actividad locomotora rítmica, el funcionamiento del reloj molecular en la neuronas PDF no se encontró afectado, indicando nuevamente su resistencia a la toxicidad amiloide. Tanto en nuestro estudio como en los reportados se descartó un defecto general de la actividad locomotora de los individuos. Estos resultados indican que el comportamiento específico de actividad locomotora circadiana es vulnerable a la sobre-expresión de péptidos amiloides en el SNC, posiblemente por mecanismos río debajo de las neuronas marcapasos central.

En condiciones fisiológicas el correcto plegamiento de proteínas en el RE es sensible a diversos factores incluidos el estado redox, los niveles de Ca²⁺, de ATP, la capacidad de glucosilación, entre otros. La respuesta a estrés es un hallazgo común en las enfermedades neurodegenerativas y diversos mecanismos se han propuesto para explicar la respuesta de estrés de RE que se observa en la EA, incluida la producción de A β 42 [190-192]. En nuestro modelo experimental, la sobre producción constitutiva de péptidos de fusión conteniendo una secuencia señal de vía secretoria y una secuencia amiloidogénica es probable que sometan al RE a una situación de estrés. En el disco imaginal del ojo, la expresión de los 3 péptidos amiloides utilizando el promotor GMR reveló la señal de activación mediada por IRE-1 y visualizada por GFP debido al reportero de splicing de XBP1. Cabe destacar que al comparar la marcación obtenida con la expresión directa de GFP nuclear, dicha activación no fue homogénea y sólo evidenciable en grupos celulares, sugiriendo que los precursores de fotorreceptores no presentan una respuesta uniforme de estrés de RE a amiloides. A su vez, la sobre-expresión pan-neuronal de los péptidos amiloides mostró patrones de activación de la respuesta a estrés de RE más heterogéneos, encontrándose importantes diferencias cualitativas y cuantitativas en neuronas dependiendo de su localización, los péptidos expresados y la edad.

Uno de los objetivos de evaluar la activación de estrés de RE fue identificar neuronas que se activen diferencialmente, denotando cierto grado de susceptibilidad o resistencia a los péptidos amiloides. La identificación de las mismas podría aportar conocimiento sobre estas propiedades selectivas. Debido al método utilizado, la señal fluorescente fue de localización nuclear (por la translocación de XBP1-GFP), por lo que esta herramienta nos brinda información respecto de la ubicación de los cuerpos neuronales que responden, no así de hacia dónde proyectan. Una de las primeras regiones que presentó marca de GFP positiva corresponde a grupos neuronales posteriores a los lóbulos antenales (figura 46B), presentando una localización medial y ligeramente dorsal, aunque la información por el momento no es suficiente para identificarlos. Por otra parte, ciertas estructuras pueden ser excluidas; como el lóbulo óptico, la médula, la zona central del calyx y la región más rostral del lóbulo antenal, entre otros. Tampoco tienen el patrón típico de las neuronas del reloj central (LNV). La utilización de promotores específicos complementará este estudio para identificar las neuronas involucradas.

Es interesante remarcar que, a pesar de ser constitutivamente sobre-expresado, el péptido Bri₂-23 no generó una respuesta detectable. Es muy probable que Bri₂-23, un péptido sin tendencia a la auto-agregación, no imponga una carga al sistema de chaperonas de RE.

Por otra parte, la aparente correlación temporal entre la intensidad y extensión de la respuesta de estrés de RE con la toxicidad relativa de los péptidos amiloides podría sugerir que se puso en evidencia un mecanismo patogénico. Sin embargo, estos resultados deben ser interpretados con cautela hasta no manipular genéticamente la respuesta a estrés de RE y observar el grado de respuesta tóxica. Es probable, como se ha postulado anteriormente [118, 173] que la respuesta de estrés de RE, al promover la autofagia y degradación de proteínas mal plegadas, sea un mecanismo protector. También es plausible que exista un límite temporal, quizás relacionado con el envejecimiento neuronal, en el que la persistencia del estímulo de estrés lleve a daños irreversibles funcionales y estructurales. El estudio de la relación entre los procesos de respuesta a estrés de RE, autofagia, disfunción mitocondrial y toxicidad de péptidos amiloides tiene potencial relevancia para buscar nuevas estrategias terapéuticas en estas enfermedades. Para discernir experimentalmente cuándo y por qué un mecanismo proteostático deja de ser protector, los modelos de *Drosophila* pueden ser de gran utilidad.

5.3 - Rastrillaje genético en busca de moduladores de la toxicidad de A β 42 en SNC.

Nuestra estrategia de rastrillaje genético para la búsqueda de genes moduladores de la toxicidad de A β 42 es la primera en utilizar un paradigma comportamental que refleja neurotoxicidad en el SNC. Los trabajos publicados en este sentido han utilizado el efecto tóxico en el ojo y en uno de ellos, el acortamiento de sobrevida [140-142]. En relación a los rastrillajes genéticos realizados en el ojo los resultados encontrados en este trabajo muestran que los fenotipos de “ojo rugoso” ampliamente utilizados son muy agresivos debido a la alta sobre-expresión de A β . Ello impone un sesgo hacia la detección de “supresores” en detrimento de genes que empeoren el fenotipo. En segundo lugar, no son cuantitativos ya que la selección se realiza mediante inspección visual bajo lupa y, por lo tanto, depende mucho de la pericia del observador. Finalmente, y quizás lo más importante para la significación de los hallazgos en relación con enfermedades neurodegenerativas, no se explora el impacto de moduladores sobre neurotoxicidad en el SNC asociada al envejecimiento.

De hecho, un estudio realizado por Ghosh y Feany mostró que no todos los moduladores de genes asociados a enfermedades neurodegenerativas identificados en un rastrillaje genético en el ojo, produjeron el mismo efecto al ser evaluados en SNC [193]. Esto resalta que si bien hay muchos mecanismos conservados entre distintos tejidos, no son todos. Por lo que un comportamiento asociado directamente al SNC podría permitir identificar moduladores de la toxicidad de A β 42 tejido específico, que no fueron detectados anteriormente.

Con respecto al uso de la sobrevida, este fenotipo es muy complejo y excede el efecto neurotóxico incluyendo múltiples variables fisiológicas. Por otra parte, los ensayos se realizaron bajo un persistente estrés térmico que, como modelo, no refleja condiciones de envejecimiento normal. Sin desmerecer las contribuciones ya reportadas mediante estos rastrillajes genéticos realizados y sin idealizar nuestra estrategia, optamos por dedicar un importante esfuerzo metodológico a optimizarla bajo la hipótesis de una mayor relevancia de los resultados que fueran aplicables a la EAE.

Habiendo cubierto aproximadamente un quinto del genoma de *Drosophila* (~2700 genes delecionados), hemos encontrado 9 líneas deficientes que podrían modular la toxicidad de A β 42 y hasta el momento hemos confirmado una de ellas.

En principio, estos resultados sugieren que el método es bastante astringente y minimiza falsos positivos, un tipo de resultado que es preferible en estos estudios masivos.

De acuerdo a los criterios impuestos de selección de candidatos, la línea confirmada (27369) incluye 4 genes con ortólogos humanos y expresión en el SNC adulto. Es interesante destacar que, en teoría, la línea 27369 presenta una disminución del 50% de dosis génica que no es suficiente para provocar un fenotipo tóxico de geotaxis con el envejecimiento. Tres de estos genes están asociados a enfermedades humanas hereditarias con compromiso del SNC y uno de ellos a la forma más común de EAF. A continuación analizaremos brevemente cada candidato en el marco del envejecimiento y el proceso neurodegenerativo.

5.3.1 - Presenilina (PS).

Las formas más frecuentes de EAF se deben a mutaciones en los genes de PS 1 y PS 2. Uno de los mecanismos propuestos, basado en la “hipótesis amiloide” es que estas mutaciones aumentan en forma relativa la producción de A β 42, la isoforma que se acumula masivamente en el cerebro. Actualmente se sostiene que este efecto se debería a una pérdida de función proteolítica sobre el sitio mayoritario de corte en APP, que es 7 residuos río abajo (equivalente a la posición teórica en A β 49-50), favoreciendo el corte entre 42-43 [194, 195]. Sin embargo, la actividad proteolítica de PS es necesaria para otros sustratos incluidos Notch, APPL1-2, ErbB4, CD44, N-E caderinas, entre otros, cuyos efectos en el envejecimiento cerebral y su posible participación en EAE han sido muy poco estudiados. [196]. Más aún, PS tiene funciones independientes de proteólisis, particularmente en la regulación de la homeostasis de calcio intracelular, directamente actuando como canal pasivo en el RE o regulando al receptor InsP3R que estarían comprometidas en presencia de mutaciones asociadas a EAF [197-200]. De modo que la pérdida de funciones de PS es en la actualidad el mecanismo propuesto para la patogenia de EAF asociada a sus mutaciones. En ausencia de mutaciones, la disminución de PS por delección condicional en ratones o mutantes heterocigotas en *Drosophila* (con una reducción del 50%) producen defectos cognitivos con la edad [201-203]. Es interesante que en *Drosophila* la reducción condicional de Notch en individuos adultos provoca un fenotipo de pérdida motora y un acortamiento de sobrevivencia [204]. La evolución de los niveles de PS endógena y/o su actividad durante el envejecimiento normal han sido poco estudiados. En ratones machos se encontró una marcada disminución de la

actividad de γ -secretasa sobre APP dependiente del envejecimiento. En machos y hembras, por otra parte, hubo una disminución de los niveles de PS1 y nicastrina y una profunda caída en la actividad proteolítica sobre Notch a los 24 meses de edad [205]. Un estudio *in vitro* sugiere que la inhibición del metabolismo energético provoca una menor transcripción de presenilina 2 por una disminución de la actividad de su promotor y que este efecto es reversible con antioxidantes [206]. Con respecto a cerebros humanos, no hay reportes sobre la actividad o niveles de PS con el envejecimiento y los estudios en muestras de pacientes con EAE son contradictorios. Mientras algunos indican una disminución de presenilina en regiones muy vulnerables del cerebro (hipocampo) en pacientes comparados con controles, otros muestran lo contrario aunque en corteza frontal [207-209]. Es importante destacar que los estudios sobre tejido cerebral de pacientes y controles deben ser tomados con cautela debido al estadio terminal de la enfermedad, la heterogeneidad en el tiempo transcurrido post-mortem, las regiones examinadas y en las técnicas utilizadas (hibridación *in situ*, RT-PCR, Western blots y ensayos de actividad con sustratos sintéticos). En el contexto de nuestros hallazgos en el rastillaje genético y por los antecedentes mencionados, la disminución de la actividad de PS tiene sustento funcional para explicar el aumento del efecto neurotóxico provocado por A β y sugieren la interesante hipótesis de que la pérdida de funciones proteolíticas y no-proteolíticas de PS durante el envejecimiento cerebral podrían ser un factor de riesgo para el desarrollo de EAE.

5.3.2 - Sintetasa de ácido lipoico (LAS).

EL R- α -ácido lipoico (LA) es un cofactor esencial para la actividad de complejos enzimáticos que intervienen en la decarboxilación de α -cetoácidos, un paso clave en el metabolismo energético. Estos complejos incluyen a los de piruvato-deshidrogenasa y α -cetoglutarato deshidrogenasa. Además, es cofactor de tres complejos del metabolismo aminoacídico: deshidrogenasa de cetoácidos ramificados, 2-oxo adipato deshidrogenasa y el sistema de degradación de glicina. Su síntesis mitocondrial en mamíferos ha sido descubierta en forma relativamente reciente y el último paso catalítico, la inserción de azufre en los C6 y C8 del residuo octanoilo es catalizado por LAS.

En cuanto a la enzima que lo sintetiza, se vio que la deficiencia de LAS en ratones KO es letal en estadios embrionarios tempranos [210, 211]. En humanos, la mutación en LAS R249H en homocigosis causa un grave cuadro desde las primeras semanas de vida, caracterizado por acidosis láctica, convulsiones, cardiomiopatía,

encefalomiopatía con edema cerebral progresando hacia microcefalia, paraparesia espástica y muerte a los 4 años. Los defectos metabólicos específicos que orientaron hacia LAS fueron la falta de oxidación de piruvato y la acumulación de glicina en plasma. Además de su rol como cofactor esencial, tanto el ácido lipoico como su forma reducida son potentes antioxidantes endógenos, reaccionando con las mayores especies reactivas de oxígeno y regenerando glutatión reducido [212]. Los ratones heterocigotas LAS +/- se desarrollan normalmente pero tienen menor contenido de glutatión en sus eritrocitos [211]. Estudios muy recientes utilizando sondas específicas mediante tomografía de emisión de positrones han podido medir in vivo la actividad del complejo I mitocondrial [213]. En este estudio se comprobó la disminución de la actividad de dicho complejo en el cerebro de monos con el envejecimiento. Aunque no hay estudios sobre los niveles de actividad de LAS cerebral durante el envejecimiento, células con inhibición del complejo I de la cadena respiratoria muestran que la síntesis de “clusters” de Fe-S, de los cuales depende la actividad de LAS, entre otras, está severamente alterada [214].

En relación a EA, estudios recientes en ratones triple transgénico (3xTg-AD) mostraron el agregado de LA en la dieta provocó un incremento en la incorporación de glucosa al cerebro y la plasticidad sináptica, 2 eventos afectados en las primeras etapas de la patología [215]. Además estudios en modelos animales y pacientes apuntan a su rol anti inflamatorio y neuroprotector.[216].

De manera que un defecto parcial de LAS con el envejecimiento cerebral merece ser estudiado como factor de riesgo y/o modulador de la toxicidad de A β .

5.3.3 - 4-Hidroxi-fenil piruvato dioxigenasa (HPPD).

Esta enzima participa en el catabolismo del aminoácido tirosina mediante la conversión de 4-hidroxi fenil piruvato a ácido homogentísico. Mutaciones en el gen de HPPD han sido asociadas causalmente a dos diferentes enfermedades metabólicas, la tirosinemia tipo III, autosómica recesiva y a la llamada hawkinsinuria, autosómica dominante [217]. Son menos graves que otros tipos de tirosinemias, sobre todo la tipo I, pero presentan ataxia y retraso mental de variada severidad. Los mecanismos se desconocen, pero estudios en ratas sugieren que la acumulación de L-tirosina disminuye la capacidad antioxidante enzimática y no-enzimática y promueve el daño de ADN en la corteza cerebral asociado a estrés oxidativo [218]. El herbicida NTCB, un potente inhibidor de HPPD es utilizado para el tratamiento de las complicaciones hepatorenales en la tirosinemia tipo I al disminuir la formación de maleilacetoacetato, fumarilacetoacetato y sus derivados. Sin embargo, este tratamiento puede provocar

deterioro cognitivo a largo plazo y este efecto se atribuye a niveles elevados persistentes de tirosina en el SNC [219]. Hay dos estudios tempranos que reportan aumento de tirosina en el líquido cerebroespinal en pacientes con EAE [220] y demencia vascular [221]. No hay estudios sobre esta enzima relacionados con neurodegeneración ni su actividad con el envejecimiento cerebral.

5.3.4 - 39S proteína ribosomal L15, mitocondrial (mRPL15).

Es una ribonucleoproteína mitocondrial con posible unión a secuencias poli-A. Un estudio bioinformático sobre la búsqueda de genes que contribuyen a mantener la pluripotencialidad y capacidad de auto-renovación en células madre embrionarias sugiere que un grupo de proteínas mitocondriales podrían ser importantes en estas funciones. Una de las detectadas fue mRPL15 y se postuló su interacción con ciclofilina D, un componente del poro mitocondrial de transición que media la ruptura de la membrana externa y la liberación de factores apoptóticos [222]. Sin embargo, aún no hay evidencias experimentales reportadas de dicha interacción por lo que no es pertinente especular sobre la función de mRPL15 en este proceso. Es interesante mencionar que mRPL15 ha sido detectada como modulador supresor de la toxicidad de A β en un rastillaje genético realizado en ojo (publicado en la tesis “Genome-wide screen for modifiers of A β 42-induced neurodegeneration in *Drosophila*” Katja Prüßing, 2012). Estos resultados en apariencia contradictorios con los nuestros, ilustran el problema mencionado anteriormente sobre las diferentes respuestas celulares entre el SNC y otros tejidos frente a péptidos amiloides similares.

Creemos que los genes candidatos encontrados en nuestro rastillaje genético, son lo suficientemente interesantes para, una vez validado su efecto mediante el uso de ARN de interferencia específicos, puedan ser estudiados durante el envejecimiento normal cerebral en *Drosophila* y mamíferos. De demostrarse su pérdida de función con el envejecimiento, estos genes serían entonces estudiados en el contexto patológico, en roedores transgénicos y en muestras de enfermos con EA, individuos normales e individuos resilientes con alta acumulación de A β . Es interesante la posibilidad de explorar la actividad de las 3 enzimas en tejidos o células periféricas en individuos sanos y en estadios tempranos de deterioro cognitivo. Desde el aspecto mecanístico, una vez validada su posible relevancia, se podrán diseñar estudios en cultivos celulares o en *Drosophila* para dilucidar interacciones que expliquen su efecto modulador sobre la toxicidad amiloide.

5.4 - Perspectivas futuras.

-Los modelos de *Drosophila* generados presentaron toxicidad con bajos niveles de acumulación de los péptidos amiloides. Estos modelos podrán ser útiles para completar los estudios comparativos de toxicidad ahondando en procesos celulares comúnmente afectados, como disfunción mitocondrial, defectos sinápticos, y el estudio de diversos comportamientos como ciclos de actividad y reposo, sueño, memoria, aprendizaje, etc., que permitan establecer mecanismos comunes y alternativos de toxicidad entre los péptidos amiloides.

-Como ya mencionamos anteriormente, la respuesta de estrés de RE es un evento temprano en las enfermedades neurodegenerativas. La activación diferencial de la respuesta de estrés de RE provocado por los distintos péptidos amiloides abre la posibilidad a estudios que permitan comprender si la respuesta es protectora y cuando deja de serlo, cuales son los grupos neuronales que responden y si la respuesta está asociado a una mayor resistencia o vulnerabilidad a los amiloides. Para ello *Drosophila* dispone de una gran variedad de herramientas genéticas, desde promotores tejido específicos, ARN interferencia de todos sus genes, así como líneas reporteras de una gran variedad de procesos celulares.

-La finalización del rastillaje genético complementado con un análisis bioinformático permitirán tener una visión global de los mecanismos involucrados en la toxicidad de A β 42. Se espera encontrar vías afectadas previamente descritas así como nuevos genes moduladores. Dichos genes podrán ser luego estudiados en otros modelos animales de EA y muestras de tejido humano, a fin de aportar nuevo conociendo al campo de este grupo de enfermedades, especialmente la EAE.

6 – Bibliografía.

1. Ross, C.A. and M.A. Poirier, *Protein aggregation and neurodegenerative disease*. Nat Med, 2004. **10 Suppl**: p. S10-7.
2. Bertram, L. and R.E. Tanzi, *The genetic epidemiology of neurodegenerative disease*. J Clin Invest, 2005. **115**(6): p. 1449-57.
3. McKhann, G.M., M.S. Albert, M. Grossman, B. Miller, D. Dickson, and J.Q. Trojanowski, *Clinical and pathological diagnosis of frontotemporal dementia: report of the Work Group on Frontotemporal Dementia and Pick's Disease*. Arch Neurol, 2001. **58**(11): p. 1803-9.
4. Brun, A., *Frontal lobe degeneration of non-Alzheimer type. I. Neuropathology*. Arch Gerontol Geriatr, 1987. **6**(3): p. 193-208.
5. Bird, T., D. Knopman, J. VanSwieten, S. Rosso, H. Feldman, H. Tanabe, N. Graff-Raford, D. Geschwind, P. Verpillat, and M. Hutton, *Epidemiology and genetics of frontotemporal dementia/Pick's disease*. Ann Neurol, 2003. **54 Suppl 5**: p. S29-31.
6. Hutton, M., C.L. Lendon, P. Rizzu, M. Baker, S. Froelich, H. Houlden, S. Pickering-Brown, S. Chakraverty, A. Isaacs, A. Grover, J. Hackett, J. Adamson, S. Lincoln, D. Dickson, P. Davies, R.C. Petersen, M. Stevens, E. de Graaff, E. Wauters, J. van Baren, M. Hillebrand, M. Joosse, J.M. Kwon, P. Nowotny, L.K. Che, J. Norton, J.C. Morris, L.A. Reed, J. Trojanowski, H. Basun, L. Lannfelt, M. Neystat, S. Fahn, F. Dark, T. Tannenberg, P.R. Dodd, N. Hayward, J.B. Kwok, P.R. Schofield, A. Andreadis, J. Snowden, D. Craufurd, D. Neary, F. Owen, B.A. Oostra, J. Hardy, A. Goate, J. van Swieten, D. Mann, T. Lynch, and P. Heutink, *Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17*. Nature, 1998. **393**(6686): p. 702-5.
7. Rosen, D.R., T. Siddique, D. Patterson, D.A. Figlewicz, P. Sapp, A. Hentati, D. Donaldson, J. Goto, J.P. O'Regan, H.X. Deng, and et al., *Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis*. Nature, 1993. **362**(6415): p. 59-62.
8. Wood, J.D., T.P. Beaujeux, and P.J. Shaw, *Protein aggregation in motor neurone disorders*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2003. **29**(6): p. 529-45.
9. Gusella, J.F. and M.E. MacDonald, *Huntington's disease: CAG genetics expands neurobiology*. Curr Opin Neurobiol, 1995. **5**(5): p. 656-62.
10. Bieschke, J., P. Weber, N. Sarafoff, M. Beekes, A. Giese, and H. Kretzschmar, *Autocatalytic self-propagation of misfolded prion protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(33): p. 12207-11.
11. Prusiner, S.B., *Prions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(23): p. 13363-83.
12. Ridge, P.G., M.T. Ebbert, and J.S. Kauwe, *Genetics of Alzheimer's disease*. Biomed Res Int. **2013**: p. 254954.
13. Alzheimer, A., R.A. Stelzmann, H.N. Schnitzlein, and F.R. Murtagh, *An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde"*. Clin Anat, 1995. **8**(6): p. 429-31.
14. Glenner, G.G. and C.W. Wong, *Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein*. Biochem Biophys Res Commun, 1984. **120**(3): p. 885-90.
15. Khachaturian, Z.S., *Diagnosis of Alzheimer's disease*. Arch Neurol, 1985. **42**(11): p. 1097-105.
16. Goedert, M., C.M. Wischik, R.A. Crowther, J.E. Walker, and A. Klug, *Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(11): p. 4051-5.
17. Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, Y.C. Tung, M. Quinlan, H.M. Wisniewski, and L.I. Binder, *Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(13): p. 4913-7.
18. Haass, C., M.G. Schlossmacher, A.Y. Hung, C. Vigo-Pelfrey, A. Mellon, B.L. Ostaszewski, I. Lieberburg, E.H. Koo, D. Schenk, D.B. Teplow, and et al., *Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism*. Nature, 1992. **359**(6393): p. 322-5.

19. Goldgaber, D., M.I. Lerman, O.W. McBride, U. Saffiotti, and D.C. Gajdusek, *Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease*. Science, 1987. **235**(4791): p. 877-80.
20. Kang, J., H.G. Lemaire, A. Unterbeck, J.M. Salbaum, C.L. Masters, K.H. Grzeschik, G. Multhaup, K. Beyreuther, and B. Muller-Hill, *The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor*. Nature, 1987. **325**(6106): p. 733-6.
21. Breen, K.C., M. Bruce, and B.H. Anderton, *Beta amyloid precursor protein mediates neuronal cell-cell and cell-surface adhesion*. J Neurosci Res, 1991. **28**(1): p. 90-100.
22. Nishimoto, I., T. Okamoto, Y. Matsuura, S. Takahashi, Y. Murayama, and E. Ogata, *Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o)*. Nature, 1993. **362**(6415): p. 75-9.
23. Kamal, A., G.B. Stokin, Z. Yang, C.H. Xia, and L.S. Goldstein, *Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I*. Neuron, 2000. **28**(2): p. 449-59.
24. Small, S.A. and S. Gandy, *Sorting through the cell biology of Alzheimer's disease: intracellular pathways to pathogenesis*. Neuron, 2006. **52**(1): p. 15-31.
25. Vassar, R., B.D. Bennett, S. Babu-Khan, S. Kahn, E.A. Mendiaz, P. Denis, D.B. Teplow, S. Ross, P. Amarante, R. Loeloff, Y. Luo, S. Fisher, J. Fuller, S. Edenson, J. Lile, M.A. Jarosinski, A.L. Biere, E. Curran, T. Burgess, J.C. Louis, F. Collins, J. Treanor, G. Rogers, and M. Citron, *Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE*. Science, 1999. **286**(5440): p. 735-41.
26. Francis, R., G. McGrath, J. Zhang, D.A. Ruddy, M. Sym, J. Apfeld, M. Nicoll, M. Maxwell, B. Hai, M.C. Ellis, A.L. Parks, W. Xu, J. Li, M. Gurney, R.L. Myers, C.S. Himes, R. Hiesch, C. Ruble, J.S. Nye, and D. Curtis, *aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation*. Dev Cell, 2002. **3**(1): p. 85-97.
27. Steiner, H., E. Winkler, D. Edbauer, S. Prokop, G. Basset, A. Yamasaki, M. Kostka, and C. Haass, *PEN-2 is an integral component of the gamma-secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin*. J Biol Chem, 2002. **277**(42): p. 39062-5.
28. Wolfe, M.S., W. Xia, B.L. Ostaszewski, T.S. Diehl, W.T. Kimberly, and D.J. Selkoe, *Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity*. Nature, 1999. **398**(6727): p. 513-7.
29. Yan, Y. and C. Wang, *Abeta42 is more rigid than Abeta40 at the C terminus: implications for Abeta aggregation and toxicity*. J Mol Biol, 2006. **364**(5): p. 853-62.
30. Allinson, T.M., E.T. Parkin, A.J. Turner, and N.M. Hooper, *ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases*. J Neurosci Res, 2003. **74**(3): p. 342-52.
31. Haass, C., A.Y. Hung, M.G. Schlossmacher, D.B. Teplow, and D.J. Selkoe, *beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms*. J Biol Chem, 1993. **268**(5): p. 3021-4.
32. Bertram, L., C.M. Lill, and R.E. Tanzi, *The genetics of Alzheimer disease: back to the future*. Neuron. **68**(2): p. 270-81.
33. Corder, E.H., A.M. Saunders, W.J. Strittmatter, D.E. Schmechel, P.C. Gaskell, G.W. Small, A.D. Roses, J.L. Haines, and M.A. Pericak-Vance, *Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families*. Science, 1993. **261**(5123): p. 921-3.
34. Hardy, J., *The Alzheimer family of diseases: many etiologies, one pathogenesis?* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(6): p. 2095-7.
35. Lendon, C.L., F. Ashall, and A.M. Goate, *Exploring the etiology of Alzheimer disease using molecular genetics*. JAMA, 1997. **277**(10): p. 825-31.
36. Jankowsky, J.L., D.J. Fadale, J. Anderson, G.M. Xu, V. Gonzales, N.A. Jenkins, N.G. Copeland, M.K. Lee, L.H. Younkin, S.L. Wagner, S.G. Younkin, and D.R. Borchelt, *Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(2): p. 159-70.
37. Jarrett, J.T., E.P. Berger, and P.T. Lansbury, Jr., *The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease*. Biochemistry, 1993. **32**(18): p. 4693-7.

38. Iwatsubo, T., A. Odaka, N. Suzuki, H. Mizusawa, N. Nukina, and Y. Ihara, *Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43)*. *Neuron*, 1994. **13**(1): p. 45-53.
39. Weller, R.O., A. Massey, Y.M. Kuo, and A.E. Roher, *Cerebral amyloid angiopathy: accumulation of A beta in interstitial fluid drainage pathways in Alzheimer's disease*. *Ann N Y Acad Sci*, 2000. **903**: p. 110-7.
40. Yoon, S.S. and S.A. Jo, *Mechanisms of Amyloid-beta Peptide Clearance: Potential Therapeutic Targets for Alzheimer's Disease*. *Biomol Ther (Seoul)*. **20**(3): p. 245-55.
41. Leal, M.C., A. Fernandez Gamba, L. Morelli, and E.M. Castano, *[Cerebral proteolysis of amyloid-beta peptide: relevance of insulin-degrading enzyme in Alzheimer's disease]*. *Medicina (B Aires)*, 2009. **69**(4): p. 466-72.
42. Rogers, J., R. Strohmeier, C.J. Kovelowski, and R. Li, *Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid beta peptide*. *Glia*, 2002. **40**(2): p. 260-9.
43. Farris, W., S. Mansourian, Y. Chang, L. Lindsley, E.A. Eckman, M.P. Frosch, C.B. Eckman, R.E. Tanzi, D.J. Selkoe, and S. Guenette, *Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(7): p. 4162-7.
44. Iwata, N., H. Mizukami, K. Shirohani, Y. Takaki, S. Muramatsu, B. Lu, N.P. Gerard, C. Gerard, K. Ozawa, and T.C. Saido, *Presynaptic localization of neprilysin contributes to efficient clearance of amyloid-beta peptide in mouse brain*. *J Neurosci*, 2004. **24**(4): p. 991-8.
45. Leissring, M.A., W. Farris, A.Y. Chang, D.M. Walsh, X. Wu, X. Sun, M.P. Frosch, and D.J. Selkoe, *Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death*. *Neuron*, 2003. **40**(6): p. 1087-93.
46. Poirier, R., D.P. Wolfer, H. Welzl, J. Tracy, M.J. Galsworthy, R.M. Nitsch, and M.H. Mohajeri, *Neuronal neprilysin overexpression is associated with attenuation of Abeta-related spatial memory deficit*. *Neurobiol Dis*, 2006. **24**(3): p. 475-83.
47. Perez, A., L. Morelli, J.C. Cresto, and E.M. Castano, *Degradation of soluble amyloid beta-peptides 1-40, 1-42, and the Dutch variant 1-40Q by insulin degrading enzyme from Alzheimer disease and control brains*. *Neurochem Res*, 2000. **25**(2): p. 247-55.
48. Wang, D.S., R.B. Lipton, M.J. Katz, P. Davies, H. Buschke, G. Kuslansky, J. Verghese, S.G. Younkin, C. Eckman, and D.W. Dickson, *Decreased neprilysin immunoreactivity in Alzheimer disease, but not in pathological aging*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2005. **64**(5): p. 378-85.
49. Hardy, J. and D. Allsop, *Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease*. *Trends Pharmacol Sci*, 1991. **12**(10): p. 383-8.
50. Haass, C. and D.J. Selkoe, *Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide*. *Cell*, 1993. **75**(6): p. 1039-42.
51. Hardy, J.A. and G.A. Higgins, *Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis*. *Science*, 1992. **256**(5054): p. 184-5.
52. Baglioni, S., F. Casamenti, M. Bucciantini, L.M. Luheshi, N. Taddei, F. Chiti, C.M. Dobson, and M. Stefani, *Prefibrillar amyloid aggregates could be generic toxins in higher organisms*. *J Neurosci*, 2006. **26**(31): p. 8160-7.
53. Haass, C. and D.J. Selkoe, *Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. **8**(2): p. 101-12.
54. Tomic, J.L., A. Pensalfini, E. Head, and C.G. Glabe, *Soluble fibrillar oligomer levels are elevated in Alzheimer's disease brain and correlate with cognitive dysfunction*. *Neurobiol Dis*, 2009. **35**(3): p. 352-8.
55. Gouras, G.K., J. Tsai, J. Naslund, B. Vincent, M. Edgar, F. Checler, J.P. Greenfield, V. Haroutunian, J.D. Buxbaum, H. Xu, P. Greengard, and N.R. Relkin, *Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain*. *Am J Pathol*, 2000. **156**(1): p. 15-20.
56. Leon, W.C., F. Canneva, V. Partridge, S. Allard, M.T. Ferretti, A. DeWilde, F. Vercauteren, R. Atifeh, A. Ducatenzeiler, W. Klein, M. Szyf, L. Alhonen, and A.C. Cuellar, *A novel transgenic rat model with a full Alzheimer's-like amyloid pathology displays pre-plaque intracellular amyloid-beta-associated cognitive impairment*. *J Alzheimers Dis*. **20**(1): p. 113-26.

57. Skovronsky, D.M., R.W. Doms, and V.M. Lee, *Detection of a novel intraneuronal pool of insoluble amyloid beta protein that accumulates with time in culture*. J Cell Biol, 1998. **141**(4): p. 1031-9.
58. Wirths, O., G. Multhaup, C. Czech, V. Blanchard, S. Moussaoui, G. Tremp, L. Pradier, K. Beyreuther, and T.A. Bayer, *Intraneuronal Abeta accumulation precedes plaque formation in beta-amyloid precursor protein and presenilin-1 double-transgenic mice*. Neurosci Lett, 2001. **306**(1-2): p. 116-20.
59. Xu, H., P. Greengard, and S. Gandy, *Regulated formation of Golgi secretory vesicles containing Alzheimer beta-amyloid precursor protein*. J Biol Chem, 1995. **270**(40): p. 23243-5.
60. Bulloj, A., M.C. Leal, H. Xu, E.M. Castano, and L. Morelli, *Insulin-degrading enzyme sorting in exosomes: a secretory pathway for a key brain amyloid-beta degrading protease*. J Alzheimers Dis. **19**(1): p. 79-95.
61. Kinoshita, A., H. Fukumoto, T. Shah, C.M. Whelan, M.C. Irizarry, and B.T. Hyman, *Demonstration by FRET of BACE interaction with the amyloid precursor protein at the cell surface and in early endosomes*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 16): p. 3339-46.
62. Wang, X., B. Su, G. Perry, M.A. Smith, and X. Zhu, *Insights into amyloid-beta-induced mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease*. Free Radic Biol Med, 2007. **43**(12): p. 1569-73.
63. Carrillo-Mora, P., R. Luna, and L. Colin-Barenque, *Amyloid beta: multiple mechanisms of toxicity and only some protective effects?* Oxid Med Cell Longev. **2014**: p. 795375.
64. Snyder, E.M., Y. Nong, C.G. Almeida, S. Paul, T. Moran, E.Y. Choi, A.C. Nairn, M.W. Salter, P.J. Lombroso, G.K. Gouras, and P. Greengard, *Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta*. Nat Neurosci, 2005. **8**(8): p. 1051-8.
65. Nagele, R.G., M.R. D'Andrea, W.J. Anderson, and H.Y. Wang, *Intracellular accumulation of beta-amyloid(1-42) in neurons is facilitated by the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease*. Neuroscience, 2002. **110**(2): p. 199-211.
66. Wang, H.Y., D.H. Lee, M.R. D'Andrea, P.A. Peterson, R.P. Shank, and A.B. Reitz, *beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology*. J Biol Chem, 2000. **275**(8): p. 5626-32.
67. Mucke, L., E. Masliah, G.Q. Yu, M. Mallory, E.M. Rockenstein, G. Tatsuno, K. Hu, D. Kholodenko, K. Johnson-Wood, and L. McConlogue, *High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid precursor protein transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation*. J Neurosci, 2000. **20**(11): p. 4050-8.
68. Oddo, S., A. Caccamo, M. Kitazawa, B.P. Tseng, and F.M. LaFerla, *Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 2003. **24**(8): p. 1063-70.
69. Lin, H., R. Bhatia, and R. Lal, *Amyloid beta protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology*. FASEB J, 2001. **15**(13): p. 2433-44.
70. Arispe, N., H.B. Pollard, and E. Rojas, *Giant multilevel cation channels formed by Alzheimer disease amyloid beta-protein [A beta P-(1-40)] in bilayer membranes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(22): p. 10573-7.
71. Arispe, N., E. Rojas, and H.B. Pollard, *Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(2): p. 567-71.
72. Caspersen, C., N. Wang, J. Yao, A. Sosunov, X. Chen, J.W. Lustbader, H.W. Xu, D. Stern, G. McKhann, and S.D. Yan, *Mitochondrial Abeta: a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer's disease*. FASEB J, 2005. **19**(14): p. 2040-1.
73. Worster-Drought, C., T.R. Hill, and W.H. McMenemey, *Familial Presenile Dementia with Spastic Paralysis*. J Neurol Psychopathol, 1933. **14**(53): p. 27-34.
74. Vidal, R., B. Frangione, A. Rostagno, S. Mead, T. Revesz, G. Plant, and J. Ghiso, *A stop-codon mutation in the BRI gene associated with familial British dementia*. Nature, 1999. **399**(6738): p. 776-81.
75. Mead, S., M. James-Galton, T. Revesz, R.B. Doshi, G. Harwood, E.L. Pan, J. Ghiso, B. Frangione, and G. Plant, *Familial British dementia with amyloid angiopathy: early clinical, neuropsychological and imaging findings*. Brain, 2000. **123** (Pt 5): p. 975-91.
76. Plant, G.T., T. Revesz, R.O. Barnard, A.E. Harding, and P.C. Gautier-Smith, *Familial cerebral amyloid angiopathy with nonneuritic amyloid plaque formation*. Brain, 1990. **113** (Pt 3): p. 721-47.

77. Revesz, T., J.L. Holton, B. Doshi, B.H. Anderton, F. Scaravilli, and G.T. Plant, *Cytoskeletal pathology in familial cerebral amyloid angiopathy (British type) with non-neuritic amyloid plaque formation*. Acta Neuropathol, 1999. **97**(2): p. 170-6.
78. Stromgren, E., A. Dalby, M.A. Dalby, and B. Ranheim, *Cataract, deafness, cerebellar ataxia, psychosis and dementia--a new syndrome*. Acta Neurol Scand, 1970. **46**: p. Suppl 43:261+.
79. Vidal, R., T. Revesz, A. Rostagno, E. Kim, J.L. Holton, T. Bek, M. Bojsen-Moller, H. Braendgaard, G. Plant, J. Ghiso, and B. Frangione, *A decamer duplication in the 3' region of the BRI gene originates an amyloid peptide that is associated with dementia in a Danish kindred*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(9): p. 4920-5.
80. Holton, J.L., T. Lashley, J. Ghiso, H. Braendgaard, R. Vidal, C.J. Guerin, G. Gibb, D.P. Hanger, A. Rostagno, B.H. Anderton, C. Strand, H. Ayling, G. Plant, B. Frangione, M. Bojsen-Moller, and T. Revesz, *Familial Danish dementia: a novel form of cerebral amyloidosis associated with deposition of both amyloid-Dan and amyloid-beta*. J Neuropathol Exp Neurol, 2002. **61**(3): p. 254-67.
81. Deleersnijder, W., G. Hong, R. Cortvriendt, C. Poirier, P. Tylzanowski, K. Pittois, E. Van Marck, and J. Merregaert, *Isolation of markers for chondro-osteogenic differentiation using cDNA library subtraction. Molecular cloning and characterization of a gene belonging to a novel multigene family of integral membrane proteins*. J Biol Chem, 1996. **271**(32): p. 19475-82.
82. Pickford, F., J. Coomaraswamy, M. Jucker, and E. McGowan, *Modeling familial British dementia in transgenic mice*. Brain Pathol, 2006. **16**(1): p. 80-5.
83. Pittois, K., W. Deleersnijder, and J. Merregaert, *cDNA sequence analysis, chromosomal assignment and expression pattern of the gene coding for integral membrane protein 2B*. Gene, 1998. **217**(1-2): p. 141-9.
84. Choi, S.I., R. Vidal, B. Frangione, and E. Levy, *Axonal transport of British and Danish amyloid peptides via secretory vesicles*. FASEB J, 2004. **18**(2): p. 373-5.
85. Latil, A., L. Chene, P. Mangin, G. Fournier, P. Berthon, and O. Cussenot, *Extensive analysis of the 13q14 region in human prostate tumors: DNA analysis and quantitative expression of genes lying in the interval of deletion*. Prostate, 2003. **57**(1): p. 39-50.
86. Kim, S.H., J.W. Creemers, S. Chu, G. Thinakaran, and S.S. Sisodia, *Proteolytic processing of familial British dementia-associated BRI variants: evidence for enhanced intracellular accumulation of amyloidogenic peptides*. J Biol Chem, 2002. **277**(3): p. 1872-7.
87. Sanchez-Pulido, L., D. Devos, and A. Valencia, *BRICHOS: a conserved domain in proteins associated with dementia, respiratory distress and cancer*. Trends Biochem Sci, 2002. **27**(7): p. 329-32.
88. Garringer, H.J., J. Murrell, L. D'Adamio, B. Ghetti, and R. Vidal, *Modeling familial British and Danish dementia*. Brain Struct Funct. **214**(2-3): p. 235-44.
89. Ghiso, J., A. Rostagno, Y. Tomidokoro, T. Lashley, M. Bojsen-Moller, H. Braendgaard, G. Plant, J. Holton, R. Lal, T. Revesz, and B. Frangione, *Genetic alterations of the BRI2 gene: familial British and Danish dementias*. Brain Pathol, 2006. **16**(1): p. 71-9.
90. Morelli, L., R.E. Llovera, L.G. Alonso, B. Frangione, G. de Prat-Gay, J. Ghiso, and E.M. Castano, *Insulin-degrading enzyme degrades amyloid peptides associated with British and Danish familial dementia*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **332**(3): p. 808-16.
91. El-Agnaf, O.M., S. Nagala, B.P. Patel, and B.M. Austen, *Non-fibrillar oligomeric species of the amyloid ABri peptide, implicated in familial British dementia, are more potent at inducing apoptotic cell death than protofibrils or mature fibrils*. J Mol Biol, 2001. **310**(1): p. 157-68.
92. Gibson, G., N. Gunasekera, M. Lee, V. Lelyveld, O.M. El-Agnaf, A. Wright, and B. Austen, *Oligomerization and neurotoxicity of the amyloid ADan peptide implicated in familial Danish dementia*. J Neurochem, 2004. **88**(2): p. 281-90.
93. Saul, A., T. Lashley, T. Revesz, J. Holton, J.A. Ghiso, J. Coomaraswamy, and O. Wirths, *Abundant pyroglutamate-modified ABri and ADan peptides in extracellular and vascular amyloid deposits in familial British and Danish dementias*. Neurobiol Aging. **34**(5): p. 1416-25.
94. Schlentzig, D., S. Manhart, Y. Cinar, M. Kleinschmidt, G. Hause, D. Willbold, S.A. Funke, S. Schilling, and H.U. Demuth, *Pyroglutamate formation influences solubility and amyloidogenicity of amyloid peptides*. Biochemistry, 2009. **48**(29): p. 7072-8.

95. Quist, A., I. Doudevski, H. Lin, R. Azimova, D. Ng, B. Frangione, B. Kagan, J. Ghiso, and R. Lal, *Amyloid ion channels: a common structural link for protein-misfolding disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(30): p. 10427-32.
96. Fotinopoulou, A., M. Tsachaki, M. Vlavaki, A. Pouloupoulos, A. Rostagno, B. Frangione, J. Ghiso, and S. Efthimiopoulos, *BRI2 interacts with amyloid precursor protein (APP) and regulates amyloid beta (Abeta) production*. J Biol Chem, 2005. **280**(35): p. 30768-72.
97. Matsuda, S., L. Giliberto, Y. Matsuda, P. Davies, E. McGowan, F. Pickford, J. Ghiso, B. Frangione, and L. D'Adamio, *The familial dementia BRI2 gene binds the Alzheimer gene amyloid-beta precursor protein and inhibits amyloid-beta production*. J Biol Chem, 2005. **280**(32): p. 28912-6.
98. Matsuda, S., L. Giliberto, Y. Matsuda, E.M. McGowan, and L. D'Adamio, *BRI2 inhibits amyloid beta-peptide precursor protein processing by interfering with the docking of secretases to the substrate*. J Neurosci, 2008. **28**(35): p. 8668-76.
99. Kim, J., V.M. Miller, Y. Levites, K.J. West, C.W. Zwizinski, B.D. Moore, F.J. Troendle, M. Bann, C. Verbeeck, R.W. Price, L. Smithson, L. Sonoda, K. Wagg, V. Rangachari, F. Zou, S.G. Younkin, N. Graff-Radford, D. Dickson, T. Rosenberry, and T.E. Golde, *BRI2 (ITM2b) inhibits Abeta deposition in vivo*. J Neurosci, 2008. **28**(23): p. 6030-6.
100. Price, D.L. and S.S. Sisodia, *Cellular and molecular biology of Alzheimer's disease and animal models*. Annu Rev Med, 1994. **45**: p. 435-46.
101. Duyckaerts, C., M.C. Potier, and B. Delatour, *Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences*. Acta Neuropathol, 2008. **115**(1): p. 5-38.
102. Schaeffer, E.L., M. Figueiro, and W.F. Gattaz, *Insights into Alzheimer disease pathogenesis from studies in transgenic animal models*. Clinics (Sao Paulo). **66 Suppl 1**: p. 45-54.
103. Oddo, S., A. Caccamo, J.D. Shepherd, M.P. Murphy, T.E. Golde, R. Kaye, R. Metherate, M.P. Mattson, Y. Akbari, and F.M. LaFerla, *Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction*. Neuron, 2003. **39**(3): p. 409-21.
104. Do Carmo, S. and A.C. Cuervo, *Modeling Alzheimer's disease in transgenic rats*. Mol Neurodegener. **8**: p. 37.
105. Coomaraswamy, J., E. Kilger, H. Wolfing, C. Schafer, S.A. Kaeser, B.M. Wegenast-Braun, J.K. Hefendehl, H. Wolburg, M. Mazzella, J. Ghiso, M. Goedert, H. Akiyama, F. Garcia-Sierra, D.P. Wolfer, P.M. Mathews, and M. Jucker, *Modeling familial Danish dementia in mice supports the concept of the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A. **107**(17): p. 7969-74.
106. Vidal, R., A.G. Barbeito, L. Miravalle, and B. Ghetti, *Cerebral amyloid angiopathy and parenchymal amyloid deposition in transgenic mice expressing the Danish mutant form of human BRI2*. Brain Pathol, 2009. **19**(1): p. 58-68.
107. Garringer, H.J., J. Murrell, N. Sammeta, A. Gnezda, B. Ghetti, and R. Vidal, *Increased tau phosphorylation and tau truncation, and decreased synaptophysin levels in mutant BRI2/tau transgenic mice*. PLoS One. **8**(2): p. e56426.
108. Giliberto, L., S. Matsuda, R. Vidal, and L. D'Adamio, *Generation and initial characterization of FDD knock in mice*. PLoS One, 2009. **4**(11): p. e7900.
109. Tamayev, R., N. Akpan, O. Arancio, C.M. Troy, and L. D'Adamio, *Caspase-9 mediates synaptic plasticity and memory deficits of Danish dementia knock-in mice: caspase-9 inhibition provides therapeutic protection*. Mol Neurodegener. **7**: p. 60.
110. Tamayev, R., S. Matsuda, M. Fa, O. Arancio, and L. D'Adamio, *Danish dementia mice suggest that loss of function and not the amyloid cascade causes synaptic plasticity and memory deficits*. Proc Natl Acad Sci U S A. **107**(48): p. 20822-7.
111. Tamayev, R., L. Giliberto, W. Li, C. d'Abramo, O. Arancio, R. Vidal, and L. D'Adamio, *Memory deficits due to familial British dementia BRI2 mutation are caused by loss of BRI2 function rather than amyloidosis*. J Neurosci. **30**(44): p. 14915-24.
112. Link, C.D., *Invertebrate models of Alzheimer's disease*. Genes Brain Behav, 2005. **4**(3): p. 147-56.
113. Luo, L., T. Tully, and K. White, *Human amyloid precursor protein ameliorates behavioral deficit of flies deleted for Appl gene*. Neuron, 1992. **9**(4): p. 595-605.
114. Fossgreen, A., B. Bruckner, C. Czech, C.L. Masters, K. Beyreuther, and R. Paro, *Transgenic Drosophila expressing human amyloid precursor protein show gamma-*

- secretase activity and a blistered-wing phenotype*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(23): p. 13703-8.
115. Carmine-Simmen, K., T. Proctor, J. Tschape, B. Poeck, T. Triphan, R. Strauss, and D. Kretzschmar, *Neurotoxic effects induced by the Drosophila amyloid-beta peptide suggest a conserved toxic function*. Neurobiol Dis, 2009. **33**(2): p. 274-81.
 116. Heidary, G. and M.E. Fortini, *Identification and characterization of the Drosophila tau homolog*. Mech Dev, 2001. **108**(1-2): p. 171-8.
 117. Chen, X., Y. Li, J. Huang, D. Cao, G. Yang, W. Liu, H. Lu, and A. Guo, *Study of tauopathies by comparing Drosophila and human tau in Drosophila*. Cell Tissue Res, 2007. **329**(1): p. 169-78.
 118. Fouillet, A., C. Levet, A. Virgone, M. Robin, P. Dourlen, J. Rieusset, E. Belaidi, M. Ovize, M. Touret, S. Nataf, and B. Mollereau, *ER stress inhibits neuronal death by promoting autophagy*. Autophagy. **8**(6): p. 915-26.
 119. Wittmann, C.W., M.F. Wszolek, J.M. Shulman, P.M. Salvaterra, J. Lewis, M. Hutton, and M.B. Feany, *Tauopathy in Drosophila: neurodegeneration without neurofibrillary tangles*. Science, 2001. **293**(5530): p. 711-4.
 120. Gunawardena, S. and L.S. Goldstein, *Disruption of axonal transport and neuronal viability by amyloid precursor protein mutations in Drosophila*. Neuron, 2001. **32**(3): p. 389-401.
 121. Greeve, I., D. Kretzschmar, J.A. Tschape, A. Beyn, C. Brellinger, M. Schweizer, R.M. Nitsch, and R. Reifegerste, *Age-dependent neurodegeneration and Alzheimer-amyloid plaque formation in transgenic Drosophila*. J Neurosci, 2004. **24**(16): p. 3899-906.
 122. Crowther, D.C., K.J. Kinghorn, E. Miranda, R. Page, J.A. Curry, F.A. Duthie, D.C. Gubb, and D.A. Lomas, *Intraneuronal Abeta, non-amyloid aggregates and neurodegeneration in a Drosophila model of Alzheimer's disease*. Neuroscience, 2005. **132**(1): p. 123-35.
 123. Finelli, A., A. Kelkar, H.J. Song, H. Yang, and M. Konsolaki, *A model for studying Alzheimer's Abeta42-induced toxicity in Drosophila melanogaster*. Mol Cell Neurosci, 2004. **26**(3): p. 365-75.
 124. Iijima, K., H.P. Liu, A.S. Chiang, S.A. Hearn, M. Konsolaki, and Y. Zhong, *Dissecting the pathological effects of human Abeta40 and Abeta42 in Drosophila: a potential model for Alzheimer's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(17): p. 6623-8.
 125. Iijima, K. and K. Iijima-Ando, *Drosophila models of Alzheimer's amyloidosis: the challenge of dissecting the complex mechanisms of toxicity of amyloid-beta 42*. J Alzheimers Dis, 2008. **15**(4): p. 523-40.
 126. Huang, J.K., P.L. Ma, S.Y. Ji, X.L. Zhao, J.X. Tan, X.J. Sun, and F.D. Huang, *Age-dependent alterations in the presynaptic active zone in a Drosophila model of Alzheimer's disease*. Neurobiol Dis. **51**: p. 161-7.
 127. Iijima-Ando, K., S.A. Hearn, C. Shenton, A. Gatt, L. Zhao, and K. Iijima, *Mitochondrial mislocalization underlies Abeta42-induced neuronal dysfunction in a Drosophila model of Alzheimer's disease*. PLoS One, 2009. **4**(12): p. e8310.
 128. Zhao, X.L., W.A. Wang, J.X. Tan, J.K. Huang, X. Zhang, B.Z. Zhang, Y.H. Wang, H.Y. YangCheng, H.L. Zhu, X.J. Sun, and F.D. Huang, *Expression of beta-amyloid induced age-dependent presynaptic and axonal changes in Drosophila*. J Neurosci. **30**(4): p. 1512-22.
 129. Gistelink, M., J.C. Lambert, P. Callaerts, B. Deraut, and P. Dourlen, *Drosophila models of tauopathies: what have we learned?* Int J Alzheimers Dis. **2012**: p. 970980.
 130. Shulman, J.M. and M.B. Feany, *Genetic modifiers of tauopathy in Drosophila*. Genetics, 2003. **165**(3): p. 1233-42.
 131. Folwell, J., C.M. Cowan, K.K. Ubhi, H. Shiab, T.A. Newman, D. Shepherd, and A. Mudher, *Abeta exacerbates the neuronal dysfunction caused by human tau expression in a Drosophila model of Alzheimer's disease*. Exp Neurol. **223**(2): p. 401-9.
 132. Iijima, K., A. Gatt, and K. Iijima-Ando, *Tau Ser262 phosphorylation is critical for Abeta42-induced tau toxicity in a transgenic Drosophila model of Alzheimer's disease*. Hum Mol Genet. **19**(15): p. 2947-57.
 133. Celniker, S.E. and G.M. Rubin, *The Drosophila melanogaster genome*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2003. **4**: p. 89-117.
 134. Greenspan, R.J. and H.A. Dierick, *'Am not I a fly like thee?' From genes in fruit flies to behavior in humans*. Hum Mol Genet, 2004. **13 Spec No 2**: p. R267-73.
 135. Greenspan, R.J. and B. van Swinderen, *Cognitive consonance: complex brain functions in the fruit fly and its relatives*. Trends Neurosci, 2004. **27**(12): p. 707-11.

136. Reiter, L.T., L. Potocki, S. Chien, M. Gribskov, and E. Bier, *A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in Drosophila melanogaster*. Genome Res, 2001. **11**(6): p. 1114-25.
137. Prussing, K., A. Voigt, and J.B. Schulz, *Drosophila melanogaster as a model organism for Alzheimer's disease*. Mol Neurodegener. **8**: p. 35.
138. Kazemi-Esfarjani, P. and S. Benzer, *Genetic suppression of polyglutamine toxicity in Drosophila*. Science, 2000. **287**(5459): p. 1837-40.
139. Lenz, S., P. Karsten, J.B. Schulz, and A. Voigt, *Drosophila as a screening tool to study human neurodegenerative diseases*. J Neurochem. **127**(4): p. 453-60.
140. Cao, W., H.J. Song, T. Gangi, A. Kelkar, I. Antani, D. Garza, and M. Konsolaki, *Identification of novel genes that modify phenotypes induced by Alzheimer's beta-amyloid overexpression in Drosophila*. Genetics, 2008. **178**(3): p. 1457-71.
141. Tan, L., P. Schedl, H.J. Song, D. Garza, and M. Konsolaki, *The Toll-->NFkappaB signaling pathway mediates the neuropathological effects of the human Alzheimer's Abeta42 polypeptide in Drosophila*. PLoS One, 2008. **3**(12): p. e3966.
142. Rival, T., R.M. Page, D.S. Chandraratna, T.J. Sendall, E. Ryder, B. Liu, H. Lewis, T. Rosahl, R. Hider, L.M. Camargo, M.S. Shearman, D.C. Crowther, and D.A. Lomas, *Fenton chemistry and oxidative stress mediate the toxicity of the beta-amyloid peptide in a Drosophila model of Alzheimer's disease*. Eur J Neurosci, 2009. **29**(7): p. 1335-47.
143. Bischof, J., R.K. Maeda, M. Hediger, F. Karch, and K. Basler, *An optimized transgenesis system for Drosophila using germ-line-specific phiC31 integrases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(9): p. 3312-7.
144. Seiger, M.B. and J.F. Kink, *The effect of anesthesia on the photoresponses of four sympatric species of Drosophila*. Behav Genet, 1993. **23**(1): p. 99-104.
145. Brand, A.H. and N. Perrimon, *Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes*. Development, 1993. **118**(2): p. 401-15.
146. Lang, M., L. Wang, Q. Fan, G. Xiao, X. Wang, Y. Zhong, and B. Zhou, *Genetic inhibition of solute-linked carrier 39 family transporter 1 ameliorates abeta pathology in a Drosophila model of Alzheimer's disease*. PLoS Genet. **8**(4): p. e1002683.
147. Gargano, J.W., I. Martin, P. Bhandari, and M.S. Grotewiel, *Rapid iterative negative geotaxis (RING): a new method for assessing age-related locomotor decline in Drosophila*. Exp Gerontol, 2005. **40**(5): p. 386-95.
148. Rezaval, C., J. Berni, E.A. Gorostiza, S. Werbach, M.M. Fagilde, M.P. Fernandez, E.J. Beckwith, E.J. Aranovich, C.A. Sabio y Garcia, and M.F. Ceriani, *A functional misexpression screen uncovers a role for enabled in progressive neurodegeneration*. PLoS One, 2008. **3**(10): p. e3332.
149. Ringrose, L., *Transgenesis in Drosophila melanogaster*. Methods Mol Biol, 2009. **561**: p. 3-19.
150. Moses, K. and G.M. Rubin, *Glass encodes a site-specific DNA-binding protein that is regulated in response to positional signals in the developing Drosophila eye*. Genes Dev, 1991. **5**(4): p. 583-93.
151. Bonini, N.M. and M.E. Fortini, *Human neurodegenerative disease modeling using Drosophila*. Annu Rev Neurosci, 2003. **26**: p. 627-56.
152. Kramer, J.M. and B.E. Staveley, *GAL4 causes developmental defects and apoptosis when expressed in the developing eye of Drosophila melanogaster*. Genet Mol Res, 2003. **2**(1): p. 43-7.
153. Rezaval, C., S. Werbach, and M.F. Ceriani, *Neuronal death in Drosophila triggered by GAL4 accumulation*. Eur J Neurosci, 2007. **25**(3): p. 683-94.
154. Yao, K.M., M.L. Samson, R. Reeves, and K. White, *Gene elav of Drosophila melanogaster: a prototype for neuronal-specific RNA binding protein gene family that is conserved in flies and humans*. J Neurobiol, 1993. **24**(6): p. 723-39.
155. Robinow, S. and K. White, *Characterization and spatial distribution of the ELAV protein during Drosophila melanogaster development*. J Neurobiol, 1991. **22**(5): p. 443-61.
156. Lin, D.M., R.D. Fetter, C. Kopczynski, G. Grenningloh, and C.S. Goodman, *Genetic analysis of Fasciclin II in Drosophila: defasciculation, refasciculation, and altered fasciculation*. Neuron, 1994. **13**(5): p. 1055-69.
157. Iijima-Ando, K. and K. Iijima, *Transgenic Drosophila models of Alzheimer's disease and tauopathies*. Brain Struct Funct. **214**(2-3): p. 245-62.
158. Kittel, R.J., C. Wichmann, T.M. Rasse, W. Fouquet, M. Schmidt, A. Schmid, D.A. Wagh, C. Pawlu, R.R. Kellner, K.I. Willig, S.W. Hell, E. Buchner, M. Heckmann, and S.J.

- Sigrist, *Bruchpilot promotes active zone assembly, Ca²⁺ channel clustering, and vesicle release*. Science, 2006. **312**(5776): p. 1051-4.
159. Wagh, D.A., T.M. Rasse, E. Asan, A. Hofbauer, I. Schwenkert, H. Durrbeck, S. Buchner, M.C. Dabauvalle, M. Schmidt, G. Qin, C. Wichmann, R. Kittel, S.J. Sigrist, and E. Buchner, *Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in Drosophila*. Neuron, 2006. **49**(6): p. 833-44.
 160. Glabe, C.G. and R. Kaye, *Common structure and toxic function of amyloid oligomers implies a common mechanism of pathogenesis*. Neurology, 2006. **66**(2 Suppl 1): p. S74-8.
 161. Allada, R. and B.Y. Chung, *Circadian organization of behavior and physiology in Drosophila*. Annu Rev Physiol. **72**: p. 605-24.
 162. Cusumano, P., A. Klarsfeld, E. Chelot, M. Picot, B. Richier, and F. Rouyer, *PDF-modulated visual inputs and cryptochrome define diurnal behavior in Drosophila*. Nat Neurosci, 2009. **12**(11): p. 1431-7.
 163. Peng, Y., D. Stoleru, J.D. Levine, J.C. Hall, and M. Rosbash, *Drosophila free-running rhythms require intercellular communication*. PLoS Biol, 2003. **1**(1): p. E13.
 164. Renn, S.C., J.H. Park, M. Rosbash, J.C. Hall, and P.H. Taghert, *A pdf neuropeptide gene mutation and ablation of PDF neurons each cause severe abnormalities of behavioral circadian rhythms in Drosophila*. Cell, 1999. **99**(7): p. 791-802.
 165. Kaneko, M., J.H. Park, Y. Cheng, P.E. Hardin, and J.C. Hall, *Disruption of synaptic transmission or clock-gene-product oscillations in circadian pacemaker cells of Drosophila cause abnormal behavioral rhythms*. J Neurobiol, 2000. **43**(3): p. 207-33.
 166. Morrison, B.M., P.R. Hof, and J.H. Morrison, *Determinants of neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases*. Ann Neurol, 1998. **44**(3 Suppl 1): p. S32-44.
 167. Hotamisligil, G.S., *Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease*. Cell. **140**(6): p. 900-17.
 168. Lin, J.H., P. Walter, and T.S. Yen, *Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis*. Annu Rev Pathol, 2008. **3**: p. 399-425.
 169. Roth, D.M. and W.E. Balch, *Modeling general proteostasis: proteome balance in health and disease*. Curr Opin Cell Biol. **23**(2): p. 126-34.
 170. Rutkowski, D.T. and R.S. Hegde, *Regulation of basal cellular physiology by the homeostatic unfolded protein response*. J Cell Biol. **189**(5): p. 783-94.
 171. Hetz, C., *The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond*. Nat Rev Mol Cell Biol. **13**(2): p. 89-102.
 172. Ryoo, H.D. and H. Steller, *Unfolded protein response in Drosophila: why another model can make it fly*. Cell Cycle, 2007. **6**(7): p. 830-5.
 173. Casas-Tinto, S., Y. Zhang, J. Sanchez-Garcia, M. Gomez-Velazquez, D.E. Rincon-Limas, and P. Fernandez-Funez, *The ER stress factor XBP1s prevents amyloid-beta neurotoxicity*. Hum Mol Genet. **20**(11): p. 2144-60.
 174. Maarouf, C.L., I.D. Daus, T.A. Kokjohn, D.G. Walker, J.M. Hunter, J.C. Kruchowsky, R. Woltjer, J. Kaye, E.M. Castano, M.N. Sabbagh, T.G. Beach, and A.E. Roher, *Alzheimer's disease and non-demented high pathology control nonagenarians: comparing and contrasting the biochemistry of cognitively successful aging*. PLoS One. **6**(11): p. e27291.
 175. Perez-Nievas, B.G., T.D. Stein, H.C. Tai, O. Dols-Icardo, T.C. Scotton, I. Barroeta-Espar, L. Fernandez-Carballo, E.L. de Munain, J. Perez, M. Marquie, A. Serrano-Pozo, M.P. Frosch, V. Lowe, J.E. Parisi, R.C. Petersen, M.D. Ikonovic, O.L. Lopez, W. Klunk, B.T. Hyman, and T. Gomez-Isla, *Dissecting phenotypic traits linked to human resilience to Alzheimer's pathology*. Brain. **136**(Pt 8): p. 2510-26.
 176. Lu, T., L. Aron, J. Zullo, Y. Pan, H. Kim, Y. Chen, T.H. Yang, H.M. Kim, D. Drake, X.S. Liu, D.A. Bennett, M.P. Colaiacovo, and B.A. Yankner, *REST and stress resistance in ageing and Alzheimer's disease*. Nature. **507**(7493): p. 448-54.
 177. Sang, T.K. and G.R. Jackson, *Drosophila models of neurodegenerative disease*. NeuroRx, 2005. **2**(3): p. 438-46.
 178. Jin, M., N. Shepardson, T. Yang, G. Chen, D. Walsh, and D.J. Selkoe, *Soluble amyloid beta-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A. **108**(14): p. 5819-24.

179. Watson, D., E. Castano, T.A. Kokjohn, Y.M. Kuo, Y. Lyubchenko, D. Pinsky, E.S. Connolly, Jr., C. Esh, D.C. Luehrs, W.B. Stine, L.M. Rowse, M.R. Emmerling, and A.E. Roher, *Physicochemical characteristics of soluble oligomeric Abeta and their pathologic role in Alzheimer's disease*. *Neurol Res*, 2005. **27**(8): p. 869-81.
180. Mucke, L. and D.J. Selkoe, *Neurotoxicity of amyloid beta-protein: synaptic and network dysfunction*. *Cold Spring Harb Perspect Med*. **2**(7): p. a006338.
181. Cleary, J.P., D.M. Walsh, J.J. Hofmeister, G.M. Shankar, M.A. Kuskowski, D.J. Selkoe, and K.H. Ashe, *Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function*. *Nat Neurosci*, 2005. **8**(1): p. 79-84.
182. Moreno, H., E. Yu, G. Pigino, A.I. Hernandez, N. Kim, J.E. Moreira, M. Sugimori, and R.R. Llinas, *Synaptic transmission block by presynaptic injection of oligomeric amyloid beta*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(14): p. 5901-6.
183. Basun, H., N. Bogdanovic, M. Ingelsson, O. Almkvist, J. Naslund, K. Axelman, T.D. Bird, D. Nochlin, G.D. Schellenberg, L.O. Wahlund, and L. Lannfelt, *Clinical and neuropathological features of the arctic APP gene mutation causing early-onset Alzheimer disease*. *Arch Neurol*, 2008. **65**(4): p. 499-505.
184. Rogers, I., F. Kerr, P. Martinez, J. Hardy, S. Lovestone, and L. Partridge, *Ageing increases vulnerability to abeta42 toxicity in Drosophila*. *PLoS One*. **7**(7): p. e40569.
185. Iijima, K., H.C. Chiang, S.A. Hearn, I. Hakker, A. Gatt, C. Shenton, L. Granger, A. Leung, K. Iijima-Ando, and Y. Zhong, *Abeta42 mutants with different aggregation profiles induce distinct pathologies in Drosophila*. *PLoS One*, 2008. **3**(2): p. e1703.
186. Stokin, G.B., A. Almenar-Queralt, S. Gunawardena, E.M. Rodrigues, T. Falzone, J. Kim, C. Lillo, S.L. Mount, E.A. Roberts, E. McGowan, D.S. Williams, and L.S. Goldstein, *Amyloid precursor protein-induced axonopathies are independent of amyloid-beta peptides*. *Hum Mol Genet*, 2008. **17**(22): p. 3474-86.
187. Chen, K.F., B. Possidente, D.A. Lomas, and D.C. Crowther, *The central molecular clock is robust in the face of behavioural arrhythmia in a Drosophila model of Alzheimer's disease*. *Dis Model Mech*. **7**(4): p. 445-58.
188. Speretta, E., T.R. Jahn, G.G. Tartaglia, G. Favrin, T.P. Barros, S. Imarisio, D.A. Lomas, L.M. Luheshi, D.C. Crowther, and C.M. Dobson, *Expression in drosophila of tandem amyloid beta peptides provides insights into links between aggregation and neurotoxicity*. *J Biol Chem*. **287**(24): p. 20748-54.
189. Long, D.M., M.R. Blake, S. Dutta, S.D. Holbrook, J. Kotwica-Rolinska, D. Kretschmar, and J.M. Giebultowicz, *Relationships between the circadian system and Alzheimer's disease-like symptoms in Drosophila*. *PLoS One*. **9**(8): p. e106068.
190. Chafekar, S.M., R. Zwart, R. Veerhuis, H. Vanderstichele, F. Baas, and W. Scheper, *Increased Abeta1-42 production sensitizes neuroblastoma cells for ER stress toxicity*. *Curr Alzheimer Res*, 2008. **5**(5): p. 469-74.
191. Hoozemans, J.J., E.S. van Haastert, D.A. Nijholt, A.J. Rozemuller, P. Eikelenboom, and W. Scheper, *The unfolded protein response is activated in pretangle neurons in Alzheimer's disease hippocampus*. *Am J Pathol*, 2009. **174**(4): p. 1241-51.
192. Hoozemans, J.J., E.S. van Haastert, D.A. Nijholt, A.J. Rozemuller, and W. Scheper, *Activation of the unfolded protein response is an early event in Alzheimer's and Parkinson's disease*. *Neurodegener Dis*. **10**(1-4): p. 212-5.
193. Ghosh, S. and M.B. Feany, *Comparison of pathways controlling toxicity in the eye and brain in Drosophila models of human neurodegenerative diseases*. *Hum Mol Genet*, 2004. **13**(18): p. 2011-8.
194. Pinnix, I., J.A. Ghiso, M.A. Pappolla, and K. Sambamurti, *Major carboxyl terminal fragments generated by gamma-secretase processing of the Alzheimer amyloid precursor are 50 and 51 amino acids long*. *Am J Geriatr Psychiatry*. **21**(5): p. 474-83.
195. Robakis, N.K., *Cell signaling abnormalities may drive neurodegeneration in familial Alzheimer disease*. *Neurochem Res*. **39**(3): p. 570-5.
196. Vetrivel, K.S., Y.W. Zhang, H. Xu, and G. Thinakaran, *Pathological and physiological functions of presenilins*. *Mol Neurodegener*, 2006. **1**: p. 4.
197. Honarnejad, K. and J. Herms, *Presenilins: role in calcium homeostasis*. *Int J Biochem Cell Biol*. **44**(11): p. 1983-6.
198. Kipanyula, M.J., L. Contreras, E. Zampese, C. Lazzari, A.K. Wong, P. Pizzo, C. Fasolato, and T. Pozzan, *Ca²⁺ dysregulation in neurons from transgenic mice expressing mutant presenilin 2*. *Aging Cell*. **11**(5): p. 885-93.

199. Supnet, C. and I. Bezprozvanny, *Neuronal calcium signaling, mitochondrial dysfunction, and Alzheimer's disease*. J Alzheimers Dis. **20 Suppl 2**: p. S487-98.
200. Tu, H., O. Nelson, A. Bezprozvanny, Z. Wang, S.F. Lee, Y.H. Hao, L. Serneels, B. De Strooper, G. Yu, and I. Bezprozvanny, *Presenilins form ER Ca²⁺ leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer's disease-linked mutations*. Cell, 2006. **126**(5): p. 981-93.
201. McBride, S.M., C.H. Choi, B.P. Schoenfeld, A.J. Bell, D.A. Liebelt, D. Ferreira, R.J. Choi, P. Hinchey, M. Kollaros, A.M. Terlizzi, N.J. Ferrick, E. Koenigsberg, R.L. Rudominer, A. Sumida, S. Chiorean, K.K. Siwicki, H.T. Nguyen, M.E. Fortini, T.V. McDonald, and T.A. Jongens, *Pharmacological and genetic reversal of age-dependent cognitive deficits attributable to decreased presenilin function*. J Neurosci. **30**(28): p. 9510-22.
202. Watanabe, H., M. Iqbal, J. Zheng, M. Wines-Samuelson, and J. Shen, *Partial loss of presenilin impairs age-dependent neuronal survival in the cerebral cortex*. J Neurosci. **34**(48): p. 15912-22.
203. Wines-Samuelson, M., E.C. Schulte, M.J. Smith, C. Aoki, X. Liu, R.J. Kelleher, 3rd, and J. Shen, *Characterization of age-dependent and progressive cortical neuronal degeneration in presenilin conditional mutant mice*. PLoS One. **5**(4): p. e10195.
204. Presente, A., A. Andres, and J.S. Nye, *Requirement of Notch in adulthood for neurological function and longevity*. Neuroreport, 2001. **12**(15): p. 3321-5.
205. Placanica, L., L. Zhu, and Y.M. Li, *Gender- and age-dependent gamma-secretase activity in mouse brain and its implication in sporadic Alzheimer disease*. PLoS One, 2009. **4**(4): p. e5088.
206. Ghidoni, R., L. Gasparini, A. Alberici, L. Benussi, L. Barbiero, F. Mazzoli, F. Nicosia, D. Finazzi, L. Benerini Gatta, A. Albertini, O. Zanetti, and G. Binetti, *Inhibition of energy metabolism down-regulates the Alzheimer related presenilin 2 gene*. J Neural Transm, 2003. **110**(9): p. 1029-39.
207. Borghi, R., A. Piccini, E. Barini, G. Cirmena, M. Guglielmotto, E. Tamagno, M. Fornaro, G. Perry, M.A. Smith, A. Garuti, and M. Tabaton, *Upregulation of presenilin 1 in brains of sporadic, late-onset Alzheimer's disease*. J Alzheimers Dis. **22**(3): p. 771-5.
208. McMillan, P.J., J.B. Leverenz, and D.M. Dorsa, *Specific downregulation of presenilin 2 gene expression is prominent during early stages of sporadic late-onset Alzheimer's disease*. Brain Res Mol Brain Res, 2000. **78**(1-2): p. 138-45.
209. Takami, K., K. Terai, A. Matsuo, D.G. Walker, and P.L. McGeer, *Expression of presenilin-1 and -2 mRNAs in rat and Alzheimer's disease brains*. Brain Res, 1997. **748**(1-2): p. 122-30.
210. Morikawa, T., R. Yasuno, and H. Wada, *Do mammalian cells synthesize lipoic acid? Identification of a mouse cDNA encoding a lipoic acid synthase located in mitochondria*. FEBS Lett, 2001. **498**(1): p. 16-21.
211. Yi, X. and N. Maeda, *Endogenous production of lipoic acid is essential for mouse development*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(18): p. 8387-92.
212. Biewenga, G.P., G.R. Haenen, and A. Bast, *The pharmacology of the antioxidant lipoic acid*. Gen Pharmacol, 1997. **29**(3): p. 315-31.
213. Tsukada, H., H. Ohba, M. Kanazawa, T. Kakiuchi, and N. Harada, *Evaluation of 18F-BCPP-EF for mitochondrial complex 1 imaging in the brain of conscious monkeys using PET*. Eur J Nucl Med Mol Imaging. **41**(4): p. 755-63.
214. Gielisch, I. and D. Meierhofer, *Metabolome and Proteome Profiling of Complex I Deficiency Induced by Rotenone*. J Proteome Res.
215. Sancheti, H., G. Akopian, F. Yin, R.D. Brinton, J.P. Walsh, and E. Cadenas, *Age-dependent modulation of synaptic plasticity and insulin mimetic effect of lipoic acid on a mouse model of Alzheimer's disease*. PLoS One. **8**(7): p. e69830.
216. Maczurek, A., K. Hager, M. Kenkies, M. Sharman, R. Martins, J. Engel, D.A. Carlson, and G. Munch, *Lipoic acid as an anti-inflammatory and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease*. Adv Drug Deliv Rev, 2008. **60**(13-14): p. 1463-70.
217. Tomoeda, K., H. Awata, T. Matsuura, I. Matsuda, E. Ploechl, T. Milovac, A. Boneh, C.R. Scott, D.M. Danks, and F. Endo, *Mutations in the 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase gene are responsible for tyrosinemia type III and hawkinsinuria*. Mol Genet Metab, 2000. **71**(3): p. 506-10.
218. Sgaravatti, A.M., B.A. Vargas, B.R. Zandona, K.B. Deckmann, F.J. Rockenbach, T.B. Moraes, J.M. Monserrat, M.B. Sgarbi, C.D. Pederzoli, A.T. Wyse, C.M. Wannmacher,

- M. Wajner, and C.S. Dutra-Filho, *Tyrosine promotes oxidative stress in cerebral cortex of young rats*. Int J Dev Neurosci, 2008. **26**(6): p. 551-9.
219. Thimm, E., R. Richter-Werkle, G. Kamp, B. Molke, D. Herebian, D. Klee, E. Mayatepek, and U. Spiekerkoetter, *Neurocognitive outcome in patients with hypertyrosinemia type I after long-term treatment with NTBC*. J Inher Metab Dis. **35**(2): p. 263-8.
 220. Degrell, I., K. Hellsing, E. Nagy, and F. Niklasson, *Amino acid concentrations in cerebrospinal fluid in presenile and senile dementia of Alzheimer type and multi-infarct dementia*. Arch Gerontol Geriatr, 1989. **9**(2): p. 123-35.
 221. Martinez, M., A. Frank, E. Diez-Tejedor, and A. Hernanz, *Amino acid concentrations in cerebrospinal fluid and serum in Alzheimer's disease and vascular dementia*. J Neural Transm Park Dis Dement Sect, 1993. **6**(1): p. 1-9.
 222. Mason, M.J., G. Fan, K. Plath, Q. Zhou, and S. Horvath, *Signed weighted gene co-expression network analysis of transcriptional regulation in murine embryonic stem cells*. BMC Genomics, 2009. **10**: p. 327.