Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Modulación de isoformas de la proteína asociada a microtúbulos TAU: rescate de fenotipos moleculares y funcionales en un modelo murino de taupatía

Espindola, Sonia Lorena

2019

Este documento forma parte de las colecciones digitales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en bibliotecadigital.exactas.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

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

Cita tipo APA:
Espindola, Sonia Lorena. (2019). Modulación de isoformas de la proteína asociada a microtúbulos TAU: rescate de fenotipos moleculares y funcionales en un modelo murino de taupatía. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6619_Espindola

Cita tipo Chicago:
Espindola, Sonia Lorena. "Modulación de isoformas de la proteína asociada a microtúbulos TAU: rescate de fenotipos moleculares y funcionales en un modelo murino de taupatía". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2019.
https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6619_Espindola

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. **Contacto:** bibliotecadigital.exactas.uba.ar
Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

“Modulación de isoformas de la proteína asociada a microtúbulos TAU: rescate de fenotipos moleculares y funcionales en un modelo murino de taupatía ”

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

Lic. Sonia Lorena Espindola

Director de Tesis: Dra. María Elena Avale

Consejero de estudios: Dr. Guillermo Alonso

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr. Hector Torres” (INGEBI)

Buenos Aires, 2018

Fecha de defensa: 07 de Marzo de 2019 Firma:

“Modulación de isoformas de la proteína asociada a microtúbulos TAU: rescate de fenotipos moleculares y funcionales en un modelo murino de taupatía”

Palabras claves: taupatías – neurodegeneración - hiperfosforilación

Resumen

Las enfermedades neurodegenerativas pueden ser causadas por una miríada de factores que conllevan a la muerte y/o disfunción de determinadas neuronas del cerebro humano. La enfermedad de Alzheimer (EA) y otras demencias similares se clasifican dentro del grupo de las taupatías, caracterizadas por el metabolismo anormal de la proteína tau asociada a los microtúbulos, la cual forma acumulaciones de depósitos insolubles neurofibrilares en las neuronas afectadas. La proteína Tau se expresa principalmente en neuronas, y en condiciones normales participa en la estabilización de los microtúbulos y en el transporte axonal. Los procesos patológicos que originan la formación de agregados de Tau no están completamente elucidados. En muchos casos se asocian a alteraciones postraduccionales de la proteína (por ejemplo, el estado de fosforilación) o a cambios en los procesamientos postranscripcionales del gen codificante para Tau (MAPT) (Lee et al., 2001). En particular, se han asociado taupatías con defectos en el procesamiento por splicing del ARN transcripto primario de Tau (Andreadis, 2012). En el cerebro humano adulto normal se detectan seis isoformas normales de Tau, derivadas del splicing alternativo de los exones 2, 3 y 10. El exón 10 (E10) en particular contiene un dominio clave de unión a los microtúbulos y su exclusión o inclusión genera dos isoformas de Tau presentes en cantidades equivalentes (conocidas como isoformas 3R y 4R) (Andreadis, 2005). En el gen MAPT, han sido identificadas más de 35 mutaciones asociadas con taupatías (Gallo et al., 2007); varias de las cuales no modifican la secuencia de la proteína, pero producen defectos en el mecanismo de splicing alternativo del E10, alterando el contenido relativo de las isoformas 3R y 4R de Tau en el cerebro de los pacientes afectados. En resumen, varias taupatías están asociadas con desequilibrios en las isoformas tau, por lo tanto, la

restauración del equilibrio 3R:4R podría representar una terapéutica plausible. Aquí se utilizó una estrategia molecular de reprogramación del ARN por trans-splicing para modular la inclusión del E10 en la corteza prefrontal de un modelo de ratón (hTau) de taupatía, el cual produce un exceso anormal de la isoforma 3R de tau. Luego de la ocurrencia del evento de trans-splicing, en los ratones tratados se alcanzó un equilibrio parcial 3R:4R, con una reducción significativa de tau insoluble e hiperfosforilada. Además, la activación neuronal y el comportamiento de estos ratones se restauraron a los niveles del grupo WT. Por otra parte, utilizando la misma estrategia de *trans-splicing* logramos modular la inclusión/exclusión del E10 de tau en neuronas humanas diferenciadas en cultivo, derivadas de células madre. Con los cambios en el contenido relativo de tau 3R: 4R, las neuronas no mostraron cambios morfológicos, sin embargo, los análisis de trayectorias individuales de las vesículas móviles revelaron trayectorias en el transporte axonal alteradas. En conjunto, nuestros resultados revelan que la modulación temprana del splicing del E10 en la transcripción de tau puede rescatar defectos fenotípicos relevantes asociados con el splicing incorrecto de tau, lo que plantea perspectivas prometedoras para el uso de la reprogramación de ARN para taupatías humanas.

Modulation of microtubule associated protein tau isoforms: rescue of functional and molecular phenotypes in a mouse model of tauopathy"

Key words: tauopathies – neurodegeneration - hyperphosphorylation

Abstract

Neurodegenerative diseases can be caused by a myriad of factors that lead to death or dysfunction of certain neurons in the human brain. Alzheimer's disease (AD) and other similar dementias are classified within the group of tauopathies, which are characterized by the abnormal metabolism of the tau microtubule-associated protein, leading to accumulations of insoluble neurofibrillary deposits in the affected neurons. Tau protein is mainly expressed in neurons, and under normal conditions participates in the stabilization of microtubules and axonal transport. The pathological mechanism that cause the formation of Tau aggregates are not completely elucidated. In many cases, they are associated with posttranslational alterations of the tau protein (for example, the state of phosphorylation) or changes in the posttranscriptional processes of the gene coding for Tau (MAPT) (Lee et al., 2001). In particular, the tauopathies have been associated with defects in the processing by splicing of the primary transcribed RNA of MAPT (Andreadis, 2012). In the adult human brain, six normal Tau isoforms are detected, derived from the alternative splicing of exons 2, 3 and 10. The exon 10 (E10) in particular encodes the second of four microtubule-binding repeats and its exclusion or inclusion by splicing gives rise to tau isoforms with 3 or 4 repeats, present in equal amounts in the normal adult human brain (known as 3R and 4R isoforms) (Andreadis, 2005). In the MAPT gene, more than 35 mutations associated with tauopathies have been identified (Gallo et al., 2007); most of them do not modify the protein sequence, but produce defects in the alternative splicing mechanism of E10, altering the relative content of the tau 3R and 4R isoforms in the brain of affected patients. In summary, several taupathies are associated with imbalances in tau isoforms, therefore, the restoration of the 3R: 4R equilibrium could represent a plausible therapeutic approach. Here we used a molecular strategy of RNA reprogramming by trans-splicing to modulate

the inclusion of E10 in the prefrontal cortex (PFC) of a mouse model (hTau) of tauopathy, which produces an abnormal quantity of the 3R tau isoform. After the trans-splicing event, a ratio 3R:4R partial equilibrium was achieved in the PFC of treated mice, with a significant decreased of insoluble and hyperphosphorylated tau. In addition, neuronal firing and behavior in this group were restored to the levels of the WT mice. On the other hand, using the same trans-splicing strategy we modulated the inclusion/exclusion of tau E10 in human differentiated neurons derived from stem cells. With changes in the relative content of tau 3R: 4R, neurons did no develop morphological changes; however, single trajectory analyses of the moving vesicles showed impairments in axonal transport. Taken together, our results reveal that early modulation of E10 splicing in tau transcription can rescue relevant phenotypic defects associated with incorrect splicing of tau, which raises promising prospects for the use of RNA reprogramming for human tauopathies.

Agradecimientos

Son muchas las personas que han contribuido durante el proceso de este trabajo. En primer lugar, quiero agradecer enormemente a la Dra. Elena Avale directora de esta tesis por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio, por sus enriquecedoras enseñanzas dentro y fuera del ámbito académico, y por haberme brindado múltiples oportunidades de crecimiento laboral a lo largo de estos 6 años. Pero en particular, por confiar en mi sin conocerme y darme las herramientas necesarias para iniciarme en el camino de la ciencia de una manera muy exitosa, en un ambiente hermoso del cual me llevo las mejores experiencias vividas. ¡Gracias Ele!

A los doctores Marcelo Rubinstein, Tomás Falzone, Juan Ferrario y Diego Gelman, por su constante ayuda, feedback y excelente predisposición ayudando en todo momento durante el desarrollo de este trabajo.

Agradezco al Dr. Pierre Marie-Lledo y a la Dra. Mariana Alonso, por abrirme las puertas de su laboratorio en el Instituto Pasteur, dándome la posibilidad de desarrollar parte de los experimentos de la presente tesis, sumado a la experiencia personal de trabajar en un laboratorio de excelencia.

Al resultado más positivo que sin dudas que he obtenido en esta tesis: todos los amigos del INGEBI y del laboratorio 222 y TEPN, quienes entre charlas, risas, cervezas y mates hicieron mucho más divertidos mis días dentro y fuera del laboratorio. Al maravilloso grupo de amigos de Buenos Aires y Misiones, que me bancaron desde que nos conocimos en la Facultad, y sobre todo durante el último año en mi estadía en Buenos Aires. Finalmente quiero agradecer a mis viejos, a Dani y a lo más importante que tengo en la vida mi familia, Pepe, Nahuel y Lupe. Los amo!

Parte de los resultados de la presente Tesis para optar por el título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área de Fisiología y Biología Celular y Molecular, fueron publicados en las siguientes publicaciones científicas:

Lacovich, V.*, **Espindola, S. L**.*, Alloatti, M.*, Pozo Devoto, V., Cromberg, L., Čarná, M., Falzone, T. L. (2016). Tau isoforms imbalance impairs the axonal transport of the amyloid precursor protein in human neurons. The Journal of Neuroscience, 37(1), 2305–2316. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2305-16.2016

Espindola, S. L., Damianich, A., Alvarez, R. J., Sartor, M., Belforte, J. E., Ferrario, J. E., Avale, M. E. (2018). Modulation of Tau Isoforms Imbalance Precludes Tau Pathology and Cognitive Decline in a Mouse Model of Tauopathy. Cell Reports, 23(3), 709–715. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.079

ÍNDICE

Abreviaturas 0

INTRODUCCIÓN

1. Breve introducción a las taupatías 1
2. La proteína tau 2
   - 2.1 Organización génica y proteica 3
   - 2.2 Mutaciones asociadas al gen *MAPT* 6
     - 2.2.1 Mutaciones que afectan el splicing alternativo del exón 10 de tau 8
   - 2.3 Múltiples funciones de tau 12
     - 2.3.1 Participación de tau en el transporte axonal 15
   - 2.4 Modificaciones postranscripcionales de *MAPT* 16
     - 2.4.1 *Splicing* alternativo 16
     - 2.4.2 Fosforilación 19
3. Disfunciones de la corteza prefrontal en las taupatías 23
4. Disfunción olfativa temprana en enfermedades neurodegenerativas 24
5. Modelos animales de taupatía 25
6. Estrategia de reprogramación de ARN mediante *trans-splicing* 30

HIPÓTESIS 34

OBJETIVO GENERAL 34

OBJETIVOS ESPECÍFICOS 35

RESULTADOS

CAPÍTULO I: REPROGRAMACIÓN DE ISOFORMAS TAU COMO ESTRATEGIA TERAPEUTICA EXPERIMENTAL EN UN MODELO DE TAUPATIA 36

1. Caracterización de tau hiperfosforilada en el cerebro del modelo hTau 37
2. Modulación de los contenidos de isoformas tau 3R:4R en la corteza prefrontal de los ratones hTau mediante *trans-splicing* 39
   - 2.1 Análisis del contenido de isoformas 3R y 4R en la corteza prefrontal 40
   - 2.2 Análisis del contenido de isoformas 3R y 4R en algunas áreas funcionalmente conectadas con la corteza prefrontal 43
3. Reducción de Tau insoluble e hiperfosforilada en la corteza prefrontal de los ratones hTau tratados por *trans-splicing* 45

4. Fenotipos electrofisiológicos y conductuales de los ratones hTau tratados por *trans-splicing* 50
4.1 Análisis de los fenotipos electrofisiológicos 50
4.2 Análisis de comportamiento 52

CAPÍTULO II: ANÁLISIS DE MARCADORES DE PATOLOGÍA TAU TEMPRANA EN EL MODELO HTAU..... 58

1. Caracterización neuroquímica de patología tau en el bulbo olfatorio en ratones hTau 58
2. Análisis de neurogénesis en el BO de ratones htau 61

CAPÍTULO III: REPROGRAMACIÓN DE ISOFORMAS TAU EN NEURONAS HUMANAS DIFERENCIADAS *IN VITRO* 65

1. Modulación de las isoformas tau 3R: 4R mediante *trans-splicing* en neuronas humanas diferenciadas 66
2. Validación de la herramienta de trans-splicing en neuronas humanas diferenciadas a nivel del ARNm y proteína 69
3. Polarización neuronal normal en neuronas derivadas de células humanas con un desequilibrio de isoformas tau 3R:4R 71
4. Alteración en el transporte axonal de APP luego de la inducción de desequilibrio de isoformas tau. Regulación diferencial anterógrada y retrógrada sobre el transporte axonal de APP por las isoformas tau 73

DISCUSIÓN

1. Discusión general 76
2. Modulación de isoformas 3R:4R in vivo: consecuencias funcionales y perspectivas terapéuticas 77
   Modelos animales de taupatía: estudio en el modelo experimental htau 80
3. Cambios en el transporte axonal in vitro mediado por el desbalance 3R:4R 88
4. Conclusiones y perspectivas 90

MATERIALES y MÉTODOS

1. Vectores Lentivirales 92
2. Modelo animal 93

3. Inyección estereotáxica …… 93
4. Inyección de BrdU …… 94
5. Microdisección por captura con láser …… 95
6. Cultivo celular y diferenciación neuronal …… 96
7. Cultivo, transducción y transfección neuronal …… 97
8. Detección de ARNm de isoformas de tau …… 98
9. Análisis inmunohistoquímicos …… 99
10. Extracción de proteína y Western blot …… 100
11. Ensayo de insolubilidad de Sarkosyl …… 102
12. Registros electrofisiológicos …… 102
13. Seguimiento y análisis de las trayectorias de las partículas en las imágenes de los cultivos neuronales …… 104
14. Inmunofluorescencias y morfología celular …… 105
15. Pruebas de comportamiento …… 106
15.1 Análisis de campo abierto …… 106
15.2 Análisis de Reconocimiento del objeto novedoso …… 107
15.3 Laberinto acuático de Morris …… 108
15.4 Laberinto en cruz elevado …… 108
15. 5 Análisis estadísticos …… 109

BIBLIOGRAFÍA …… 110

Introducción

1. Breve introducción a las taupatías

La proteína tau asociada a los microtúbulos es una proteína altamente compleja que se encuentra localizada principalmente en las neuronas, particularmente en los axones neuronales. Tau cumple funciones esenciales en la formación y estabilización de los microtúbulos, en el transporte axonal y la señalización del tráfico celular (Medina, Hernández, & Avila, 2016; Morris et al., 2011). En condiciones patológicas, tales como mutaciones genéticas o alteraciones en el procesamiento post-transcripcional o post-tarduccional, tau puede cambiar su estructura, conformación y/o plegamiento, lo cual lleva a la hiperfosforilación y agregación, formando agregados insolubles en forma de ovillos neurofibrilares, denominados en inglés *neurofibrillary tangles (*NFTs). Los agregados intracelulares de tau son la característica común de un grupo de trastornos neurológicos conocidos como taupatías, enfermedades neurodegenerativas que incluyen a varios tipos de demencias, entre ellas la enfermedad de Alzheimer (EA). Las taupatías representan la principal causa de incapacidad en las personas mayores de 60 años, y resulta muy llamativo que en los últimos años la prevalencia de demencias se incrementó notablemente en países de medio y bajos recursos, siendo Latinoamérica la región con mayor porcentaje de pacientes con EA en los últimos 5 años (8,5% de la población) (Prince *et al.* 2013). Otras taupatías con menor prevalencia que la EA pero con similar sintomatología son la enfermedad de Pick, la demencia frontotemporal con parkinsonismo asociado al cromosoma 17 (FTDP-17), la parálisis supranuclear progresiva (PSP) y la degeneración corticobasal (CBD) (Lee *et al.* 2001, Dickson *et al.* 2011). Éstas enfermedades pueden tener un origen esporádico o genético (Tsuboi 2004). Independientemente de su origen, todas las

taupatías se caracterizan por la presencia de inclusiones intracelulares de la proteína tau hiperfosforilada e insoluble (Lee *et al.* 2001, Ballatore *et al.* 2007, Goedert y Spillantini 2011). Si bien se desconoce la complejidad total de mecanismos causales de los agregados de tau, la presencia de NFTs (detectados en análisis *post mortem* de cerebros en pacientes afectados) se asocia a la degeneración y a la muerte neuronal en ciertas áreas del cerebro definidas (Ballatore *et al.* 2007, Goedert y Spillantini 2011).

En la mayoría de las taupatías los NFTs predominan en las áreas corticales, produciendo el deterioro cognitivo (demencia), sin embargo en EA aparecen también en el hipocampo (Gasparini *et al.* 2007), en tanto que en PSP y CBD predominan en los ganglios basales, provocando sintomatología de Parkinson atípico. Los procesos patológicos que originan la formación de agregados de Tau no están completamente elucidados. En varios casos se asocian a mutaciones en el gen codificante para tau (*MAPT*), lo cual genera proteínas aberrantes, aunque también pueden deberse a cambios en el procesamiento post-transcripcional por *splicing* alternativo, o a alteraciones en los procesamientos post-traduccionales de la proteína (por ejemplo, el estado de fosforilación) (Lee *et al.* 2001). En este trabajo nos centraremos particularmente en las taupatías asociadas con defectos en el procesamiento por *splicing* del ARN transcripto primario de Tau (Andreadis 2012, Qian y Liu 2014).

2. La proteína Tau

La proteína Tau pertenece a la familia de proteínas asociadas a microtúbulos (MAP) y fue identificada como un factor de ensamblado de microtúbulos a mediados de 1970

(Weingarten *et al.* 1975, Witman *et al.* 1976). Se expresa en forma abundante en el cerebro y en menor medida en riñones, testículos y pulmones (Trojanowski *et al.* 1989, Lee *et al.* 2001, Binder *et al.* 1985, Kempf *et al.* 1996). Su localización subcelular dentro de las neuronas corresponde principalmente a los axones, aunque también se la encuentra, en el compartimiento somatodendrítico (Loomis *et al.* 1990, Brady *et al.* 1995, Thurston *et al.* 1996, Thurston *et al.* 1997, Cross *et al.* 2000, Sjoberg *et al.* 2006, Liu y Götz 2013), y se la puede hallar unida a la membrana plasmática. Dentro de las neuronas, regula la dinámica de los microtúbulos, así como también un gran número de propiedades relacionadas a ellos, entre ellas, el crecimiento neurítico y el transporte axonal (Arendt et al., 2016; Morris et al., 2011; Medina et al., 2016; Mandelkow et al., 2011) entre las funciones más importantes. La sub-localización de Tau se encuentra altamente regulada por numerosos mecanismos, una vez sintetizada en el soma la proteína es transportada por kinesinas (Utton *et al.* 2005) y difunde a lo largo de los microtúbulos axonales (Hinrichs *et al.* 2012).

2.1 Organización génica y proteica

La proteína Tau es codificada por un único gen (el gen *MAPT*), que contiene 16 exones y en humanos se localiza en el cromosoma 17q21.31. El *splicing* alternativo de los exones 2, 3 y 10 del ARN primario da lugar a seis isoformas diferentes de Tau (Neve et al. 1986), las cuales presentan entre 352–441 residuos de aminoácidos. Las variantes de Tau difieren por la presencia de ninguno, uno o dos insertos de 29 aminoácidos en el extremo amino-terminal, codificados por los exones 2 y 3 (0N, 1N, 2N) (Goedert *et al.* 1989a, Goedert *et al.* 1989b) y por la presencia de 3 o 4 dominios repetidos en tándem de unión a microtúbulos de 31 aminoácidos altamente conservados (3R o 4R) en la región carboxilo-terminal de la

molécula, codificadas por los exones 9-12. El exón 10 en particular, codifica para el segundo de cuatro dominios de unión a microtúbulos (MBD, del inglés *Microtubule Binding Domain)*, por lo que su exclusión o inclusión por *splicing* alternativo genera las dos variantes de Tau con 3 o 4 repeticiones de MBD, denominadas Tau 3R y 4R respectivamente (Kosik 1990, Andreadis *et al.* 1992, Goedert *et al.* 1992).

Basándose en la composición de aminoácidos y en las interacciones funcionales, se pueden distinguir cuatro dominios estructurales y funcionalmente definidos a lo largo de la secuencia de aminoácidos: el dominio de proyección N-terminal, la región rica en prolinas, la región de unión a microtúbulos y la región C-terminal (Figura 1).

La expresión diferencial de las diferentes isoformas de Tau es específica del tejido y se encuentra regulada durante el desarrollo, lo que muy probablemente se relaciona con su función en la plasticidad del citoesqueleto durante la aparición de neuritas y la sinaptogenia (Goedert et al., 1989; Couchie et al., 1992; Nunez & Fischer, 1997). En el cerebro fetal, tanto de humanos como de roedores, solamente se encuentra presente la isoforma más corta 0N3R. Durante el desarrollo ocurre un cambio en el patrón de *splicing* (Hefti et al., 2018) llevando a que en el cerebro adulto de un ratón WT se genere exclusivamente la isoforma 4R, en tanto que en el cerebro humano adulto se generan las isoformas 3R y 4R en cantidades equivalentes mediante el *splicing* alternativo del E10 (Andreadis 2005). La isoforma fetal con solo tres repeticiones muestra una unión a microtúbulos más débil en comparación a la isoforma 4R (M Goedert & Jakes, 1990). El cambio del patrón de splicing del exón 10 del gen *MAPT*, que conduce a la incorporación de una repetición de unión a microtúbulos adicional, podría implicar una mayor estabilidad de

los microtúbulos. Contrariamente, la presencia exclusiva de isoformas 3R en el cerebro fetal podría estar relacionada con una mayor plasticidad de los microtúbulos, que se requiere para la formación de los procesos y la elongación de neuritas (Knowles et al., 1994; Shea et al., 1992) durante el desarrollo.

En cuanto a la naturaleza de la interacción, se ha postulado que los dominios de unión a microtúbulos de la proteína Tau se unen a bolsillos específicos de β-tubulina en la superficie interna (Arendt et al., 2016). Las regiones ricas en prolina, cargadas positivamente, interaccionan fuertemente con la superficie de los microtúbulos que están cargados negativamente, además esta región se encuentra involucrada en la señalización celular ya que se ha demostrado que se une distintas quinasas de la familia Src Lck, Fgr, c-Src y Fyn (Bhaskar et al., 2005; Brandt et al., 1993). El dominio de proyección, de carga negativa, forma “ramificaciones” en la superficie de los microtúbulos debido posiblemente a repulsiones electrostáticas (Kar *et al.* 2003). De este modo, el dominio de proyección podría mantener un espaciamiento entre los microtúbulos del axón gracias a su interacción con otras proteínas (Chen *et al.* 1992, Frappier *et al.* 1994).

Figura 1

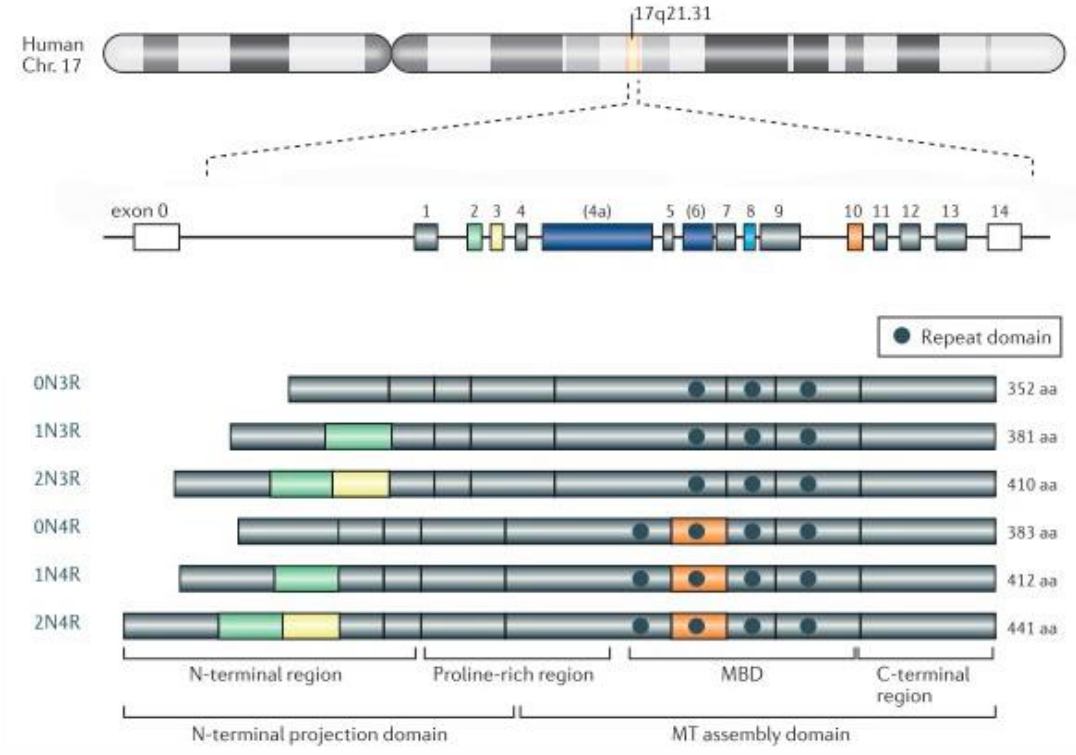

Figura 1. Estructura de las diferentes isoformas de la proteína Tau humana presentes en el SNC. El procesamiento alternativo del transcrito primario de Tau genera seis isoformas distintas que difieren por la ausencia o presencia de uno o dos insertos en el extremo N-terminal (0N, 1N o 2N) y por la presencia de 3 o 4 repeticiones (3R o 4R) de unión a microtúbulos en el extremo C-terminal. De modo que las seis isoformas de Tau son: 0N+3R; 1N+3R; 2N+3R; 0N+4R; 1N+4R; 2N+4R. Estas isoformas contienen entre 352 y 441 aminoácidos y sus pesos moleculares varían entre 45 y 62 kDa (adaptado de Li & Götz, 2017).

2.2 Mutaciones asociadas al gen *MAPT*

Hasta el momento han sido identificadas más de 60 mutaciones en el gen *MAPT* asociadas con taupatías (https://www.alzforum.org/mutations/mapt) (Qian & Liu, 2014) (Arendt et al., 2016) (Figura 2). Varias de ellas poseen un efecto pro-agregante como la mutación I260V (Grover et al., 2003). Algunas mutantes pueden producir defectos en el mecanismo de *splicing* alternativo del exón 10, alterando el equilibrio de las isoformas 3R y 4R en el cerebro de los pacientes afectados (como se detalla más adelante en la tabla 1).

La mayoría de las mutaciones están localizadas en los exones 9-12 que codifican para las repeticiones de unión a microtubulos, o en los intrones adyacentes (figura 2). Las mutaciones se pueden dividir en dos grupos: i) las mutaciones en la región codificante, que afectan a la secuencia aminoacídica de la proteína y algunas de ellas también alteran el *splicing* alternativo endógeno del transcripto primario de tau y ii) las mutaciones intrónicas o no codificantes que modifican el patrón del *splicing* alternativo del pre-ARNm de Tau. En el caso de las mutaciones codificantes, cambian o eliminan aminoácidos en la proteína Tau, reduciendo su capacidad para interactuar con los microtúbulos (G272V, P301L, P301S, V337M, G389R, R406W) (D'Souza et al., 1999; Hasegawa et al., 1998), lo cual provoca una pérdida parcial de la función de Tau que puede ser suficiente para causar su agregación anormal. El caso contrario, es decir mutaciones que promueven la unión de tau a los microtúbulos son un poco más raras (S305N, Q336R) (Iyer et al., 2013; Rossi et al., 2014). Otras mutaciones (V337M, G272V, P301L) convierten a tau en un mejor sustrato para las proteínas kinasas las cuales facilitan su hiperfosforilación (Alonso et al., 2004; Alonso et al., 2010).

Figura 2

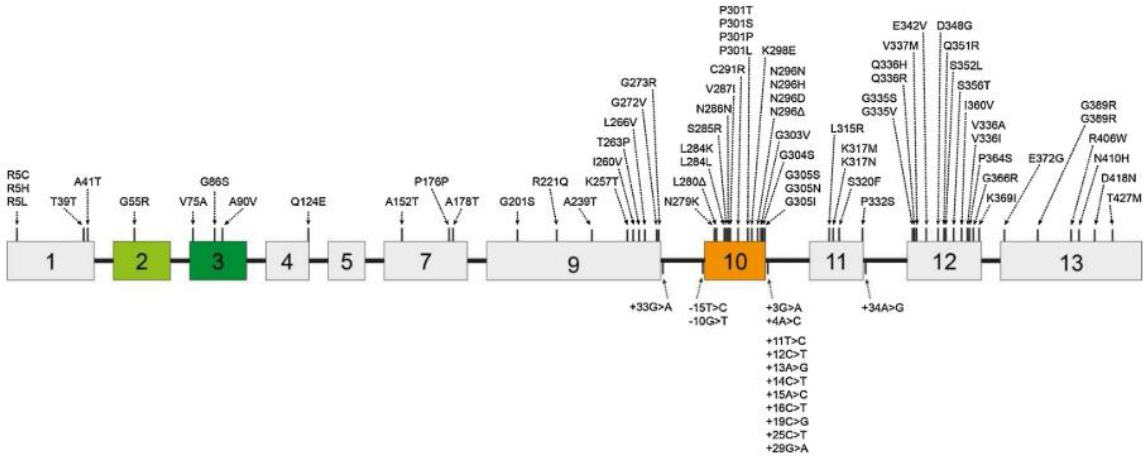

Figura 2: ilustración esquemática indicando la localización de mutaciones tau exónicas e intrónicas. Extraído de (Arendt et al., 2016)

2.2.1 Mutaciones que afectan el *splicing* alternativo del exón 10 de tau

De las más de 60 mutaciones reportadas para el gen *MAPT*, únicamente alrededor de 20, se tratan de mutaciones con un efecto sobre el procesamiento del ARN (tabla 1) (N279K, ΔK280, L284L, IVS 10+16, 10+14, entre otras). Éstas pueden ser intrónicas o exónicas, y según el caso desestabilizan el *loop* que regula el *splicing* del E10 (ver figura 4, se detalla más adelante), por lo tanto, se produce una alteración del patrón de *splicing* alternativo del E10 de *MAPT*, causando un cambio en la relación de isoformas 3R y 4R, lo que resulta en la sobreproducción de una u otra isoforma, rompiendo la relación de equilibrio (4R/3R) que se encuentra en el cerebro normal adulto. Algunas de las primeras mutaciones de este tipo reportada en el gen *MAPT* fue en la década de los 90 en pacientes con demencia frontotemporal y FTDP-17 (Hutton et al., 1998; Spillantini et al., 1998). El desbalance 3R:4R conlleva a una pérdida de función normal de tau y a la formación de los agregados fibrilares de Tau conteniendo a la isoforma dominante (Hutton et al., 1998; Spillantini et al., 1998). Si bien el desbalance no es condición necesaria en todas las taupatías, ya que existen muchos casos en los cuales se han observado agregados de Tau sin presentarse un desbalance entre éstas isoformas, la presencia de un desbalance 4R/3R en ciertas regiones del cerebro conduce a la disfunción y muerte neuronal (Gallo et al., 2007). Los fenotipos asociados con estas mutaciones en *MAPT* son bastante heterogéneos, e incluso diferentes individuos con la misma mutación, a menudo se presentan con diversos

síntomas, lo que sugiere que factores genéticos o epigenéticos y ambientales adicionales influyen en la manifestación fenotípica (Lee et al., 2001; Rossi y Tagliavini, 2015)

Asimismo, resulta particularmente interesante que éste desbalance conduce a la neurodegeneración independientemente de cuál sea la isoforma predominante (Gasparini et al., 2007). La mayoría de las taupatías muestran un predominio de la isoforma 4R sobre la 3R, como es el caso de FTDP-17, la PSP y la CBD, en tanto que en otras taupatías como la enfermedad de Pick existe un predominio de la isoforma 3R (Dickson et al., 2012).

Tabla 1

Mutación	fenotipo clínico	Efecto biológico	Región genómica	Tipo de mutación	Modelos disponibles
266V	Demencia frontotemporal	Aumento de los niveles de tau soluble de cuatro repeticiones (4R) E10+; disminución de tasa y extensión en el ensamblado de microtúbulos inducido por tau	Codificante Exón 9	Point, Missense CTG to GTG	1
N279K	Demencia frontotemporal	Afecta el *splicing* como muchas de las mutaciones intrónicas, lo que resulta en la inclusión más frecuente del E10 en los ARNm	Codificante Exón 10	Point, Missense AAT to AAG	0
K280del	EA, Demencia frontotemporal,Taupatía consistente con enfermedad de Pick	La variante K280del es inusual ya que inhibe la inclusión de E10 y conduce a un exceso de transcripciones tau de 3 repeticiones (3R). También reduce la capacidad de tau para promover el ensamblaje de microtúbulos	Codificante Exón 10	Deletion A AG to ---	2
L284L	Demencia frontotemporal	Aumenta las transcripciones E10+. Se cree que la mutación destruye un elemento *exon-splicing silencing*	Codificante Exón 10	Point, Silent CTT to CTC	0
S285R	PSP	In vitro, esta mutación da como resultado la sobreproducción de isoformas 4R de tau	Codificante Exón 10	Point, Missense AGC to AGA	0

N296H	Demencia frontotemporal	Esta mutación induce el aumento de isoformas 4R de tau. Reduce la capacidad de tau de promover la polimerización de tubulina y el ensamblaje de microtúbulos.	Codificante Exón 10	Point, Missense AAT to CAT	0
N296N	Demencia frontotemporal, PSP	Aumenta la inclusión del E10, produciendo mayo cantidad final de isoformas 4R de tau	Codificante Exón 10	Point, Silent AAT to AAC	0
S305I	Argyrophilic Grain	Causa una sobreproducción de isoformas de tau 4R	Codificante Exón 10	Point, Missense AGT to ATT	0
S305N	Demencia frontotemporal	La inestabilidad del *loop*, conduce a alteraciones en la relación de 3R y 4R de tau	Codificante Exón 10	Point, Missense AGT to AAT	0
S305S	Demencia frontotemporal, PSP	Esta mutación silenciosa da como resultado la sobreproducción de isoformas 4R de tau	Codificante Exón 10	Point, Silent AGT to AGC	0
IVS9-10 G>T (g(-10)t)	Demencia frontotemporal	Esta mutación intrónica refuerza el sitio del aceptor de *splicing*, lo que da como resultado una inclusión más frecuente del E10 en el ARNm	No Codificante Intrón 9	Point G to T	0
IVS9-15 T>C	Demencia frontotemporal	Esta mutación disminuye la inclusión del E10, generando una sobreproducción de isoformas 3R de tau	No codificante Intrón 9	Point T to C	0
IVS10+3 G>A	Demencia frontotemporal	Desestabiliza la estructura de bucle que regula el *splicing* alternativo del E10, lo que resulta en la inclusión más frecuente del E10 y una mayor proporción de isoformas 4	No codificante Intrón 10	Point G to A	0
IVS10+4 A>C	Demencia frontotemporal	Desestabiliza la estructura de bucle que regula el *splicing* alternativo delE10, lo que resulta en la inclusión más frecuente del E10 y una mayor proporción de isoformas 4R de tau	No codificante Intrón 10	Point A to C	0
IVS10+11 T>C	Demencia frontotemporal	Altera el *splicing*, resultando en un incremento de isoformas 4R de tau	No codificante Intrón 10	Point, Missense T to C	0
IVS10+12 C>T	Demencia frontotemporal	Desestabiliza la estructura de bucle, resultando en un incremento en la inclusión del E10, por lo tanto mayor cantidad de isoformas 4R	No codificante Intrón 10	Point C to T	0
IVS10+13 A>G	Demencia frontotemporal	Desestabiliza la estructura de bucle, resultando en un incremento en la inclusión del E10, por lo tanto mayor cantidad de isoformas 4R	No codificante Intrón 10	Point A to G	0

IVS10+14 C>T	Demencia frontotemporal	Desestabiliza la estructura de bucle, resultando en un incremento en la inclusión del E10, por lo tanto mayor cantidad de isoformas 4R	No codificante Intrón 10	Point C to T	0
IVS10+15 A>C	Demencia frontotemporal	Desestabiliza la estructura de bucle, resultando en un incremento en la inclusión del E10, por lo tanto mayor cantidad de isoformas 4R	No codificante Intrón 10	Point A to C	0
IVS10+16 C>T	EA, Demencia frontotemporal, PSP	Desestabiliza la estructura de bucle, resultando en un incremento en la inclusión del E10, por lo tanto mayor cantidad de isoformas 4R	No codificante Intrón 10	Point C to T	1
IVS10+19 C>G	Demencia frontotemporal	Altera el *splicing* del E10, resultando en una mayor proporción de isoformas 3R	No codificante Intrón 10	Point C to G	0

Tabla 1. Las mutaciones patogénicas que alteran la producción relativa de isoformas de tau y conducen a cambios en el ensamblaje de microtúbulos y / o la propensión de tau a agregarse. Fuente: www.alzforum.org/mutations/mapt

2.3 Múltiples Funciones de Tau

Tal como se dijo anteriormente, en el cerebro adulto, Tau se encuentra predominantemente en los axones, donde se une a la tubulina promoviendo su polimerización, regulando la estabilidad de los microtúbulos y determinando la distancia entre ellos (Weingarten *et al.* 1975, Witman *et al.* 1976, Cleveland *et al.* 1977, Chen *et al.* 1992, Drechsel *et al.* 1992). La interacción de Tau con tubulina es un proceso dinámico involucrado en la regulación de la morfogénesis y la diferenciación neuronal, el crecimiento y la polaridad de las neuritas (Drubin *et al.* 1985, Ferreira *et al.* 1989), la extensión y elongación de los axones, la plasticidad neuronal y el transporte axonal mediado por proteínas motoras de kinesina y dineína (Esmaeli-Azad *et al.* 1994, Hirokawa *et al.* 1996, Liu *et al.* 1999, Samsonov *et al.* 2004, Dixit *et al.* 2008). En resumen, la principal función de Tau es participar en la estabilización de los microtúbulos axonales y regular su dinámica.

La unión dinámica de Tau a los microtúbulos se encuentra finamente regulada por múltiples factores, entre ellos, por el número de MBD determinados por *splicing* alternativo del ARN de Tau y por modificaciones post-traduccionales tanto de Tau como de tubulina. La interacción de Tau con los microtúbulos depende de las isoformas específicas (Felgner *et al.* 1997; Dayanandan *et al.* 1999; Bunker *et al.* 2004). Además, la afinidad de Tau a los microtúbulos es mayor si la región C-terminal de la proteína está fosforilada, ocurre lo contrario si la fosforilación de Tau se localiza en la región rica en prolinas (Biernat *et al.* 1993; Mandelkow *et al.* 1995; Biernat y Mandelkow 1999). Por otro lado, se ha demostrado que la secuencia con mayor capacidad de unión a los microtúbulos está constituida por la isoforma con mayor número de repeticiones, es decir, 4R (Goedert y Jakes 1990).

Introducción

En condiciones fisiológicas, más del 80% de Tau se encuentra unida a los microtúbulos (Igaev *et al.* 2014). Tanto a través de la interacción directa con los microtúbulos como con proteínas motoras (como kinesina y dineína), tau se encuentra involucrada en la regulación del transporte axonal de moléculas de señalización, factores tróficos e incluso orgánulos celulares, como mitocondrias o vesículas (Ballatore *et al.,* 2007) . Se ha demostrado recientemente que Tau posee un tiempo de interacción muy corto con los microtúbulos, menor a 40ms (Janning *et al.,* 2014), esto explicaría porque Tau, aun cuando se encuentra mayormente unida a los microtúbulos, no interfiere con el transporte axonal (Morfini *et al.* 2007; Yuan *et al.* 2008). La fuerza de unión de Tau a los microtúbulos está determinada por el balance entre las isoformas 3R y 4R, siendo las isoformas 4R las que presentan mayor fuerza de unión (Panda et al., 2003). Recientemente un trabajo realizado en colaboración con nuestro laboratorio ha demostrado que el balance entre isoformas 3R:4R es crucial para la regulación de la velocidad y polaridad del transporte axonal (Lacovich *et al.,* 2017).

Además de encontrarse en el axón (su localización primordial), Tau también puede hallarse en las dendritas, en la sinapsis o en el núcleo (Arendt *et al.* 2016), puede interaccionar con la membrana plasmática y con un gran número de proteínas incluyendo moléculas de señalización, elementos del citoesqueleto y lípidos, lo que sugiere que ésta es una proteína multifuncional y que puede llegar a tener un papel aún desconocido en una gran variedad de funciones (Lee 2005). Se ha demostrado que en el cerebro humano Tau se encuentra presente en la mayoría de los sitios tanto pre- como post-sinápticos (Tai *et al.* 2012) y por lo tanto se piensa que cumple alguna función durante la sinapsis. Aunque

todavía está en discusión cómo llega Tau a dicha localización, se sabe que uno de los factores involucrados sería la fosforilación sitio específica de Tau (Frandemiche *et al.* 2014). Tau también ha sido observada en el núcleo y en el centrosoma de las neuronas, así como en los microtúbulos del huso mitótico de algunas células en división (Loomis *et al.* 1990, Thurston *et al.* 1997, Lu *et al.* 2014). La interacción de Tau con el ADN probablemente se encuentre mediada por la región rica en prolinas (Qi *et al.* 2015) y se sabe que la hiperfosforilación de Tau impide su unión al ADN (Hua y He 2002, Qi *et al.* 2015) y altera el plegamiento del ADN (Lu *et al.* 2013). Dentro de las consecuencias patológicas descriptas en las taupatías, como en el Alzheimer, se encuentra la deslocalización de la proteína tau, ya que aumenta su concentración en el soma respecto a los axones (figura 3) (Zempel & Mandelkow, 2014).

Figura 3

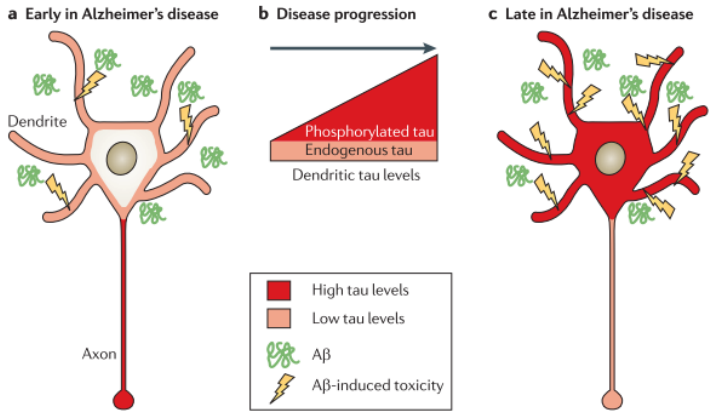

Figura 3. Deslocalización de tau en taupatías. La exposición de las neuronas a β-amiloide desencadena el aumento progresivo de la hiperfosforilación de tau. Como consecuencia, la unión de tau a los microtúbulos se ve comprometida, lo que provoca un aumento anormal en la acumulación de tau en el compartimento somatodendrítico de las neuronas afectadas. Extraído de (Ittner & Götz, 2011)

En resumen, la proteína Tau parece contribuir directa o indirectamente en la modulación estructural y regulatoria de las funciones neuronales, siendo de vital

importancia su acción sobre la red de microtúbulos para mantener la morfología apropiada de las neuronas y su correcto funcionamiento.

2.3.1 Participación de tau en el transporte axonal

Entre la variedad de funciones neuronales afectadas por el metabolismo anormal de tau, evidencia creciente sugiere que la disfunción neuronal es resultante de la falla en el transporte axonal y esto constituye un mecanismo importante de neurodegeneración en las taupatías (Ishihara et al., 1999; L. M. Ittner et al., 2008). El transporte dependiente de microtúbulos (MT) se logra a través de proteínas motoras tales como dineínas y kinesinas (Hirokawa, 1998; Waterman-Storer & Salmon, 1997). La kinesina es un motor dirigido al extremo positivo, responsable del transporte anterógrado; mientras que las proteínas motoras relacionadas con la dineína se mueven en la dirección opuesta, es decir hacia el extremo negativo o responsables del transporte retrógrado (Brady & Sperry, 1995). Los orgánulos están vinculados a los motores a través de proteínas adaptadoras de membrana/orgánulo tales como kinectina o dinactina (Burkhardt et al., 1997; Kumar et al., 1995); las redes de microtúbulos se estabilizan mediante proteínas asociadas a microtúbulos (MAP) tales como MAP2, MAP4 y tau entre otras. Éstas son proteínas filamentosas que tienen dominios de unión a la superficie de los microtúbulos (Mandelkow & Mandelkow, 1995); por lo tanto, cualquier falla en estas proteínas estabilizadoras, como tau, podría interferir con el correcto movimiento de las proteínas motoras o también afectar el transporte axonal indirectamente alterando la dinámica de los MT. La fosforilación y desfosforilación de las proteínas asociadas a los microtúbulos es un factor clave que regula la afinidad por los microtúbulos, regulando procesos celulares vitales tales como proliferación, diferenciación y tráfico a través de la estabilización de las cadenas de proteínas motoras (Drewes et al., 1997; Lopez & Sheetz, 1993; Mandell & Banker, 1996). Esto requiere un equilibrio regulado entre quinasas y fosfatasas, así como

un gradiente ajustado de la concentración de tau, reforzando aún más la importancia del control adecuado de las modificaciones postraduccionales, la localización y la concentración intracelular de tau *in vivo*. Ha sido demostrado que un aumento de la expresión de tau *in vitro* conduce a la pérdida de polarización y retraso del crecimiento celular, además de un predominio en el transporte dirigido hacia el extremo negativo (por motores de tipo dineínas), inhibiéndose el transporte anterógrado (Mandelkow et al., 2011). Por lo tanto, Tau puede interferir en la regulación del transporte axonal interactuando directamente con los motores moleculares, alterando la dinámica de los MT y/o compitiendo con los motores por la unión a los MT. En las taupatías estos mecanismos mediados por tau podrían estar perturbados. Además, es importante destacar que la proteína precursora de amiloide (APP), se encuentra significativamente vinculada a la enfermedad de Alzheimer, llevando a la generación de patología amiloide en presencia de mutaciones, sobreexpresión o defectos de transporte (Goldstein 2012; Stokin et al., 2005). Las vesículas de APP experimentan un transporte axonal rápido constitutivo, interactuando con los motores de kinesina y dineína (M. M. Fu & Holzbaur, 2013; Reis et al., 2012). Los defectos en el transporte de APP ocurren de forma temprana en enfermedades neurodegenerativas (De Vos et al., 2008; Stokin et al., 2005); por lo tanto, medir las dinámicas de APP es un método de referencia para detectar déficits de transporte asociados con condiciones patológicas (Falzone & Stokin, 2012; Goldsbury et al., 2007).

2.4 Modificaciones postranscripcionales de *MAPT*

2.4.1 *Splicing* alternativo

El *splicing* alternativo es un proceso co- o post-transcripcional, mediante el cual se generan múltiples variantes de ARNm a partir de un único gen. Tanto el *splicing* constitutivo

como el alternativo se llevan a cabo mediante el spliceosoma, que se compone de cinco pequeñas moléculas de ARN nuclear (snRNA) (U1, U2, U4, U5 y U6) y más de 150 proteínas. Este proceso se encuentra altamente regulado por un sistema de factores en *trans* que se unen a elementos *cis* del gen que regulan. Dependiendo de las ubicaciones (exón o intrón) y de cómo afectan al exón, los elementos en *cis* se clasifican en silenciadores o potenciadores, llamados a partir de sus siglas en inglés a los elementos exónicos como: *exonic splicing enhancers* (ESEs), *exonic splicing silencers* (ESS), y a los intrónicos: *intronic splicing enhancers* (ISE) y *intronic splicing silencers* (ISS). Los factores en *trans* que interaccionan con los elementos en *cis* son grupos de proteínas conservadas en eucariotas que incluyen proteínas ricas en serina y arginina (SR) y ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNP), así como factores específicos de tejido (Kornblihtt et al., 2013). Algunos factores de *splicing* promueven la inclusión de un determinado exón alternativo (*enhancers*), mientras que otros la suprimen (*silencers*); sin embargo, en la mayoría de los casos, los factores de *splicing* actúan como represores o activadores al mismo tiempo, dependiendo de la ubicación de su sitio de unión, del tipo de secuencia y de su interacción con otros elementos en *cis* y/o en *trans*. En particular, el *splicing* alternativo del gen *MAPT* es un proceso altamente complejo y finamente regulado. El E10 (exón 10) del gen *MAPT*, está flanqueado por el intrón 9 inusualmente grande de 13,6 kb y un intrón 10 de 3,8 kb, tiene sitios de *splicing* 5' y 3´ débiles (Hutton et al., 1998; Ian D'Souza & Schellenberg, 2000). Por lo tanto, el E10 puede ser incluido o excluido, dependiendo de la acción de las proteínas que actúan en *trans* en los elementos *cis* ubicados dentro del E10 o en los intrones 9 y 10, de *MAPT*. Varios elementos cortos en *cis* ubicados en el E10 o intrón 10 (I10) regulan el

splicing del E10 (figura 4). La deleción del primer elemento *SC-35 like* en el extremo 5´del E10, por ejemplo, promueve la exclusión del mismo y una mutación (A4G) en la cuarta base del elemento, en cambio, promueve la inclusión del E10 (Qian et al., 2011). Seguido a este encontramos un elemento importante, para el cual se han reportado dos mutaciones FTDP-17 (N279K and Δ280) (D'Souza et al., 1999), el elemento *PPE* por sus siglas en inglés *polypurine enhancer* (PPE). La eliminación de las bases AAG del PPE observadas en la mutación Δ280 conlleva a la exclusión del E10 y un cambio de timina (T) a guanina (G) en la mutación N279K promueve la inclusión del E10 (D'Souza et al., 1999), dos tipos de patologías de la misma enfermedad con desbalances de distintas isoformas tau (figura 4). El tercer elemento en el E10 es el elemento *ACE* por sus siglas en inglés *A/C-rich enhancer (ACE).* Es un potenciador ya que mutaciones en su secuencia promueven la inclusión del E10, lo que resulta en un aumento de la relación de isoformas 4R:3R de tau en el cerebro humano (Coulter et al., 1997). En el extremo 5 ' I10, hay un *ISS* y un *modulador de splicing intrónico (ISM*) (Figura 4). El ISM no es un potenciador en sí mismo, sino que funciona solo en presencia del ISS y contrarresta la inhibición mediada por el ISS del sitio 5´de *splicing*. Un alto grado de autocomplementariedad conduce a la formación de una estructura de tipo lazo o *loop* en la interfaz exón-intrón en el extremo 3 'del E10 y el extremo 5' del I10 (Figura 4). La interrupción de esta autocomplementariedad o desestabilización de esta estructura de bucle hace que esta región esté más disponible para snRNP U1, lo que resulta en la inclusión del E10 y consecuentemente, la producción de 4R-tau. En roedores, esta estructura de bucle se desestabiliza por el reemplazo de adenina (A) con guanina (G) en la posición E10+13, lo mismo también se ve en FTDP-17T (Figura 4) (D'Souza et al., 2000). Por

lo tanto, tal vez este reemplazo podría ser la explicación por la cual los roedores adultos expresan isoformas 4R-tau predominantemente (Qian & Liu, 2014). Numerosas mutaciones que causan FTDP-17 se han detectado en esta región de lazo. La mayoría de ellos interrumpe la complementariedad o desestabilizan la estructura de lazo y promueve la inclusión del exón 10 y tal vez esto podría estar explicando también la frecuencia más alta de taupatías que involucran desequilibrios de isoformas hacia un exceso de 4R-tau.

Figura 4

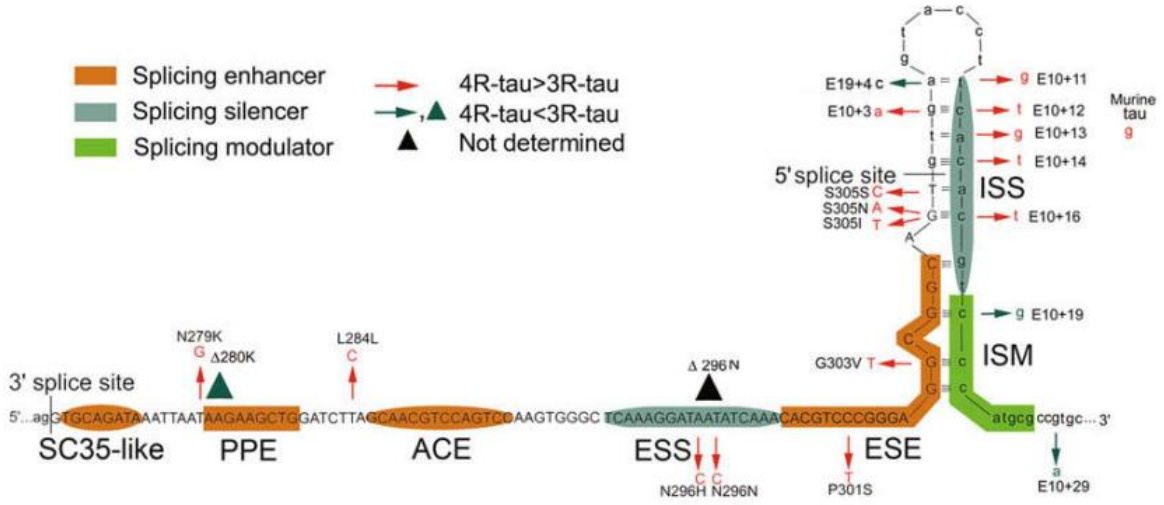

Figura 4: **Estructura del exón 10 y sus regiones flanqueantes en el gen *MAPT.*** El exón 10 se muestra en mayúsculas y parte de los intrones 9 y 10 flanqueantes se muestran en minúsculas. Hay tres ESE (potenciadores tipo SC35, PPE y ACE) en el extremo 5 'del E10 y dos elementos cis (un ESS y un ESE) en su extremo 3'. Los elementos de I10 incluyen un ISS y un ISM. Hay una estructura de bucle en la interfaz entre el E10 y el I10. Mutaciones que causan un aumento (rojo), disminución (verde oscuro) o un cambio aún no conocido (negro) en la relación 4R-tau: 3R-tau están indicadas. Los triángulos indican mutaciones de deleción. Extraído de (Qian & Liu, 2014).

2.4.2 Fosforilación

Además del *splicing* alternativo de ARN, las interacciones funcionales de tau están altamente reguladas en el nivel postranscripcional, principalmente por fosforilación y una

gran variedad de otras modificaciones como acetilación y sumoilación (Biernat et al., 1993; Morris et al., 2015; Noble et al., 2013). Esta combinación de *splicing* alternativo con modificaciones postraduccionales sitio específicas de tau da lugar a una enorme heterogeneidad de moléculas tau individuales, de las cuáles apenas se comprenden sus implicaciones funcionales.

Tau se modifica postraduccionalmente en condiciones fisiológicas en numerosos sitios, principalmente a través de la fosforilación, proceso que se encuentra altamente regulado. La isoforma más larga (2N4R) posee 85 sitios potenciales de fosforilación (Figura 5). Dada la naturaleza lábil de las fosforilaciones resulta difícil hacer correlaciones de fosforilaciones sitio especificas a funciones determinadas. Sin embargo, se ha demostrado que la fosforilación de tau regula su distribución subcelular, y gran parte de las interacciones moleculares involucradas en el transporte axonal (LaPointe et al., 2013), su asociación con la membrana plasmática, la entrega de cargos en los terminales dendríticos (Mandelkow et al., 2011). Por ejemplo la fosforilación en S396 por la quinasa GSK3β, es necesaria para la depresión a largo plazo del hipocampo (Regan et al., 2015), mientras que la actividad sináptica que induce cambios sinápticos de potenciación a largo plazo lo provoca la fosforilación de tau en T205 (Frandemiche et al., 2014). No solamente es importante el sitio patológico específico de fosforilación, es decir el fosfoepitope dentro de la proteína que es fosforilado de *novo*, sino también la cantidad total de fosfatos en cada sitio. Mientras que en condiciones fisiológicas hay en promedio 2-3 moles de fosfato por mol de tau en el cerebro humano, en condiciones patológicas esta relación aumenta a 7-8 moles (Kopke et al., 1993) y esto es lo que se denomina hiperfosforilación de tau. De hecho se sugiere que

un aumento en la fosforilación neta, en lugar de la fosforilación de epítopes definidos es más relevante en las taupatías (Steinhilb et al., 2007). Esto último podría relacionarse con el hecho que un aumento en la fosforilación de tau reduce su afinidad por los microtúbulos, en este contexto el resultado de la hiperfosforilación de tau incrementaría el desprendimiento de la proteína a los microtúbulos generando un aumento en los niveles de tau citoplasmático, la deslocalización de tau en el soma neuronal, lo que conlleva a la formación de filamentos y agregación de la proteína tau libre (Braak et al., 2011). Además, es importante remarcar que ciertos motivos hiperfosforilados son importantes herramientas de diagnóstico porque se encuentran entre los primeros signos de degeneración neuronal (Augustinack et al., 2002). En resumen, tau está ampliamente modificada postraduccionalmente en condiciones fisiológicas, siendo la fosforilación la más frecuente de las modificaciones; sin embargo, en condiciones patológicas, existe un grado aún mayor de modificaciones, lo que hace a tau más propensa a la agregación.

Además de los aminoácidos que se modifican por hiperfosforilación. Ocurren una variedad de otras modificaciones postraduccionales que están involucradas en la regulación de la función tau y la patología (Morris et al., 2015). Incluyen la O-glicosilación (Arnold et al., 1996), la glicación (Ledesma, Bonay, Colaço, & Avila, 1994), ubiquitinización (Mori et al., 1987), Sumoilación (Dorval & Fraser, 2006), metilación y acetilación (Cohen et al., 2011).

Figura 5

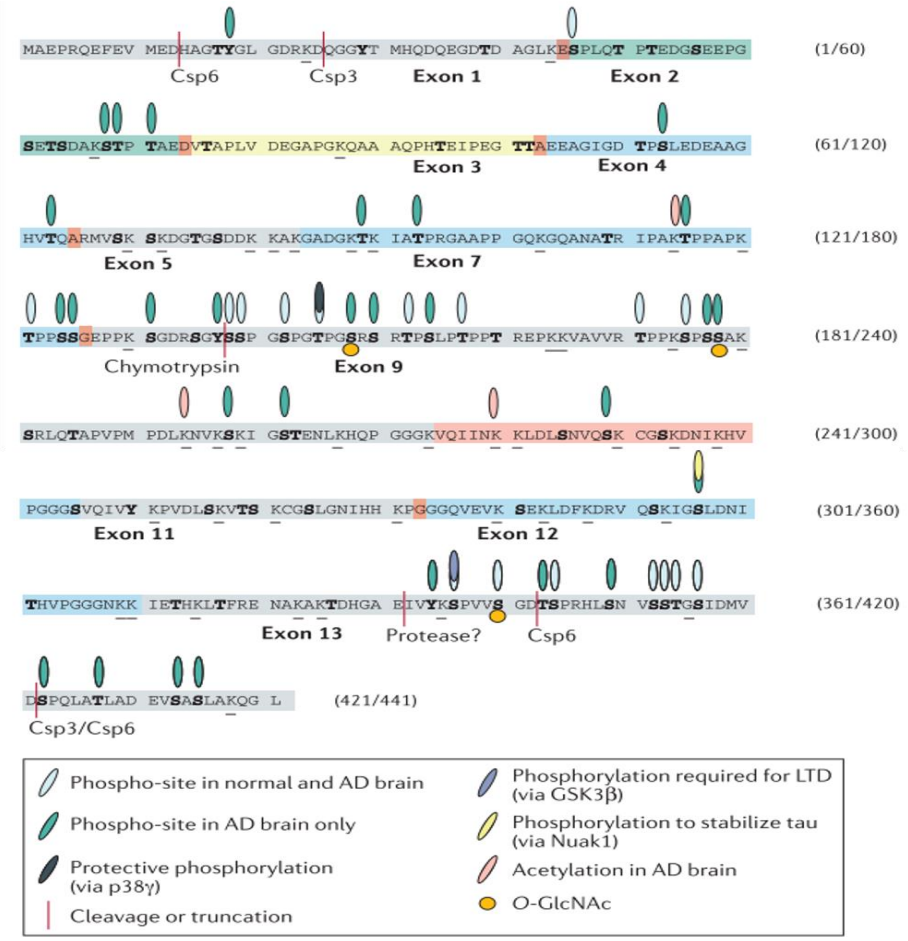

Figura 5: Sitios de modificaciones post-traduccionales de tau. Se muestra la isoforma de tau humana más larga (441 aminoácidos), indicando los exones con *splicing* alternativo y los sitios con modificaciones postraduccionales. El sombreado azul resalta los exones alternativos. Los símbolos sombreados rojos indican aminoácidos codificados a través de una unión de empalme. El sombreado verde, amarillo y rosa indican exones con splicing alternativo. S, T e Y indican posibles sitios de fosforilación (residuos de serina, treonina y tirosina). K indica residuos de lisina. Csp, caspasa; GSK3β, glucógeno sintasa quinasa 3β; LTD, depresión a largo plazo; O-GlcNAc, N-acetilglucosamina O-ligada, Extraído de (Li & Götz, 2017).

3. Disfunciones de la corteza prefrontal en las taupatías

La corteza prefrontal (CPF) es considerada como el centro de cognición, está involucrada en el control ejecutivo de los procesos cognitivos de alto nivel como la memoria de trabajo que implica almacenamiento activo de la información y el procesamiento de la misma, la toma de decisiones, el razonamiento y anticipación (Fuster, 1997; Baddeley, 1992; Jurado and Rosselli, 2007). Para esto, los mecanismos neuronales en la CPF deben presentar interacciones dinámicas y flexibles (Funahashi, 2001; J M Fuster, 1997; Goldman-Rakic, 1995; Knight, Grabowecky, & Scabini, 1995; Shimamura, 2000). Daños o fallas en la CPF en humanos, conducen a la pérdida de memoria reciente o memoria de trabajo, hiperactividad, déficit de atención, modificaciones de la conducta social y alteración del proceso de inhibición interna (Luria et al., 1964). También se han informado alteraciones similares en animales con lesiones prefrontales, tanto en primates no humanos (Gold- man-Rakic, 1987; Petrides, 1994; Fuster, 1997), como en roedores (Avale et al., 2011).

En este trabajo nos interesamos en analizar funciones relacionadas a la CPF dado que en varias taupatías existen alteraciones funcionales debido a la presencia de agregados neurofibrilares de tau visualizados con tinción de plata en esta región, que conllevan a síntomas clínicos como deshinbición, problemas de memoria asociativa o memoria de trabajo (Spillantini & Goedert, 2013). Además, como veremos en la sección resultados, el modelo murino utilizado en esta tesis presenta la presencia de tau hiperfosofirlada predominate en la CPF, por lo cual constituye el núcleo cerebral en el cual enfocaremos los estudios funcionales.

A pesar del enfoque particular que haremos en la corteza prefrontal es importante destacar que ninguna región del cerebro opera como una entidad separada y discutir el papel de la CPF necesariamente implica un rol importante para otras regiones cerebrales con las cuales comparte interconexiones extensas, incluyendo los ganglios basales, el tálamo, el tallo cerebral, el hipocampo, la amígdala y otras regiones neocorticales (Ghashghaei y Barbas, 2002; Thorpe y Fabre-Thorpe, 2001).

4. Disfunción olfativa temprana en enfermedades neurodegenerativas

En pacientes con enfermedades neurodegenerativas, existe un espectro de disfunciones del olfato que van desde una pérdida grave, como se observa en la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (Hawkes, 2006), hasta una pérdida relativamente pequeña, como se observa en la parálisis supranuclear progresiva (Doty, 2017). La disfunción olfativa ha sido reportada también en pacientes con la enfermedad de Huntington (Doty, 2017) y con esclerosis lateral amiotrófica (Günther et al., 2018), en etapas tempranas de la enfermedad, incluso antes del desarrollo de los déficits cognitivos y de la aparición de lesiones neuropatológicas, características de estas enfermedades (Devanand et al., 2000). En muchos estudios *post mortem* de pacientes con EA, se ha descrito patología tau en el sistema olfativo, incluyendo el bulbo olfativo, el núcleo olfativo anterior y la corteza piriforme (Attems et al., 2014; Saiz-Sanchez et al., 2016). También en otras taupatías como la demencia frontotemporal, enfermedad de Pick y PSP, se reportaron alteraciones olfativas asociadas a la progresión de la patología tau (Luzzi et al., 2007; Pardini et al., 2009). Dada la diferencia en la etiología de tales patologías, es concebible pensar en alguna falla de un sustrato neuropatológico primordial común que provoque estas

deficiencias en la función olfatoria. Sin embargo, los mecanismos responsables de dicha disfunción siguen siendo poco claros. Por lo tanto, descifrar las rutas moleculares que subyacen a los síntomas del DO temprano es esencial para desarrollar diagnósticos tempranos y nuevos blancos terapéuticos. Además, los agregados de proteínas afectan las regiones olfativas antes que otras regiones, lo que sugiere que el sistema olfativo es particularmente vulnerable en las enfermedades neurodegenerativas (Rey, Wesson, & Brundin, 2018) y podría ser un lugar de inicio de la neuropatología. En este contexto, dada la evidencia existente que demuestra la presencia de patología tau junto al desarrollo de déficits olfativos, resulta relevante analizar los procesos patológicos en el bulbo olfativo, tanto en pacientes como en los modelos animales de taupatía. Existe evidencia reciente que muestra disfunción olfativa en los ratones transgénicos portadores de la mutación *MAPT* P301S que está asociada a patología tau progresiva y neurodegeneración, incluyendo el bulbo olfatorio y en la corteza piriforme a una edad temprana (Yang et al., 2016).

5. Modelos animales de taupatía

Para el estudio de las taupatías existen numerosos modelos en roedores que representan la pérdida (*knockout*) o ganancia de función patológica de Tau (Tabla 2). La mayoría de estos modelos murinos de patología tau consisten en ratones transgénicos con una o varias mutaciones puntuales en el gen *MAPT* para sobreexpresar alguna de las formas mutantes de tau humana, en algunos casos combinado con otros transgenes con mutaciones implicadas en demencias en humanos. Estos modelos generalmente presentan fenotipos patológicos muy robustos y a edades tempranas (Lewis et al., 2000; Oddo et al., 2003), aunque muchas veces es difícil discriminar el efecto de cada una de las formas

mutantes respecto de la sobreexpresión de proteínas potencialmente patológicas. Además, en la mayoría de los modelos se expresa el gen *MAPT* a partir de cDNA, bajo promotores ubicuos, lo cual no permite analizar los mecanismos intrínsecos de la regulación post transcripcional, particularmente el *splicing* alternativo. Solo unos pocos modelos de ratón disponibles expresan un gen *MAPT* de longitud completa (Duff et al., 2000; Andorfer et al., 2003; Wobst et al., 2017; Dawson et al., 2007), bajo control de su propio promotor y sus regiones regulatorias, y conteniendo los intrones, en los cuales sea posible analizar y modular la regulación del *splicing* alternativo del E10. En este trabajo elegimos utilizar el modelo murino de taupatía hTau (*human Tau*) validado previamente (Andorfer et al., 2003, polydoro 2009) porque representa una excelente herramienta para estudiar el efecto neuroquímico y funcional del desbalance entre las isoformas de Tau 3R y 4R, relacionado al *splicing* incorrecto de tau, sin sobreexpresión de formas mutantes de la proteína. El ratón hTau fue diseñado para expresar únicamente isoformas tau humanas, por lo tanto, expresa el gen humano *MAPT* normal y completo a partir de un cromosoma artificial (PAC) con haplotipo humano H1 (Duff et al., 2000), el cual fue introducido por microinyección pronuclear en bajo número de copia en el ratón mutante nulo *Mapt -/-* (Tucker et al., 2001); por lo tanto en estos ratones la única proteína tau presente, proviene de la expresión del transgén humano, que es procesado post-transcripcionalmente y genera las seis isoformas tau humanas. Es importante destacar que el contenido total de Tau en este modelo es solamente 2 veces superior al contenido presente en un cerebro adulto de ratones *wild type* (WT) (Andorfer et al., 2003). Además fue demostrado que aunque los ratones hTau expresan más proteína tau total que los ratones WT, los fenotipos patológicos asociados a

este modelo probablemente no se deben a la sobreexpresión de tau, debido a que el mismo transgén en un fondo de ratón de tipo salvaje (ratón 8C) no recapitula fenotipos de taupatía (Duff et al., 2000), lo que sugiere que la presencia de isoformas tau 4R murinas endógenas podrían equilibrar el exceso de isoformas tau 3R humanas expresadas a partir del transgén humano. Por lo tanto, el ratón htau resulta un modelo excelente para estudiar las taupatías por desbalances de isoformas, ya que presentan un contenido aberrante de isoformas tau, mostrando el doble de contenido de isoforma 3R sobre la isoforma 4R de tau. Dado que el PAC utilizado como transgén porta la secuencia completa de *MAPT* humano, con todos sus intrones y exones, promotor y regiones regulatorias, la expresión del transgén sigue un patrón de expresión de Tau similar al endógeno en el cerebro humano. El transcripto primario del transgén humano *MAPT* se procesa por *splicing* alternativo de manera que las seis isoformas de Tau están presentes en el cerebro de los ratones hTau, al igual que el cerebro humano adulto. Sin embargo, las isoformas 3R tau se producen con un exceso de 2 a 3 veces superior a las isoformas 4R tau (Andorfer et al., 2003; Avale et al., 2013), probablemente por defecto en algunos factores requeridos en *trans* para el procesamiento post transcripcional del transcripto humano. Nuestra hipótesis de trabajo se basa en las evidencias previas que sugieren que el contenido 3R>4R podría ser la causa subyacente al desarrollo de patología tau en este modelo y se asociaría también a los fenotipos observados en los ratones htau seniles. Dichos fenotipos patológicos observados en este modelo a partir de los 9-12 meses de edad son: redistribución de tau a cuerpos celulares y dendritas, hiperfosforilación de tau, acumulación de depósitos de tau insolubles (Andorfer et al., 2003; Andorfer et al., 2005), con patología de Tau más severa en la corteza prefrontal

y el hipocampo (Andorfer et al., 2003) (Polydoro et al., 2009) (Figura 6). Además, también se observaron cambios en la morfología de las espinas sinápticas en la corteza prefrontal de estos ratones (Dickstein et al., 2010) y cierta pérdida neuronal regional (Andorfer et al., 2005). En cuanto a los fenotipos conductuales, los ratones htau muestran déficits en la memoria de reconocimiento de objetos y la memoria de aprendizaje espacial a los 12 meses de edad (Polydoro et al., 2009). En conjunto, los fenotipos tardíos observados en los ratones hTau tienen una distribución y curso temporal consistentes con las taupatías humanas y el desbalance entre las isoformas de Tau 3R y 4R ha sido propuesto como una de las causas de la formación de agregados de Tau y neurodegeneración en este modelo. Esta hipótesis se sustenta en la presencia exclusiva de la isoforma en exceso (Tau 3R) en los agregados intracelulares de los ratones hTau seniles (Andorfer *et al.* 2003).

Figura 6

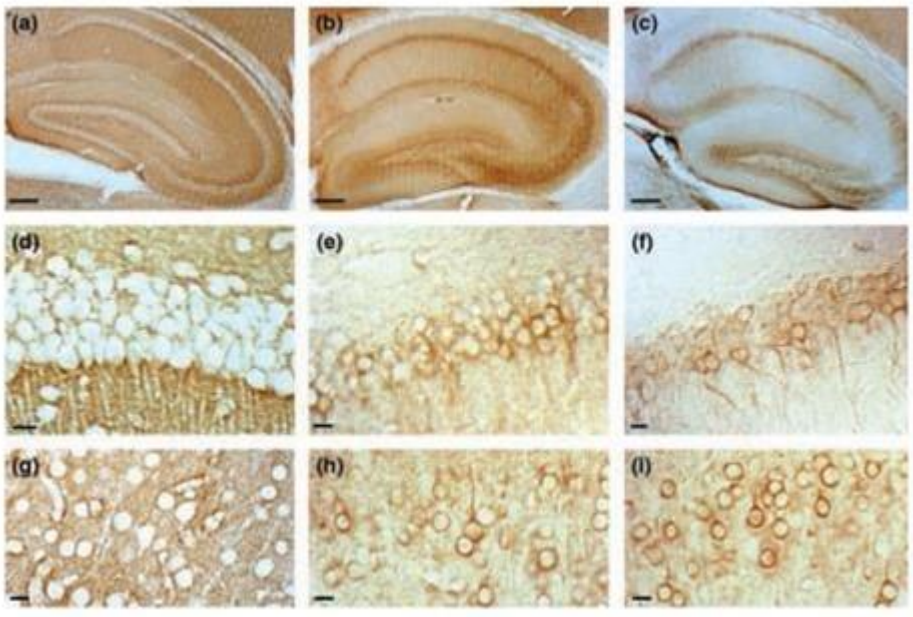

Figura 6: La acumulación anormal de tau fosforilada en cuerpos celulares y dendritas de ratones htau ocurre con el envejecimiento. La inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo CP13 (Ps202) muestra una ausencia de tinción del cuerpo celular en el hipocampo cerebral de ratón htau de 6 semanas de edad (a y d) y neocorteza (g). Se observa la acumulación del cuerpo celular de tau positivo para CP13 detectado en ratones htau a los 3 meses de edad en el hipocampo (b y e) y neocorteza (h). La tinción de CP13 fue fuerte en los ratones htau más viejos, ejemplificada en las secciones del hipocampo del ratón htau de 13 meses de edad (c y f) y neocorteza (i). Extraído de (Andorfer et al., 2003).

Tabla 2

Modificaciones en más de un gen			
Nombre	Genes	Mutación	
hTau	**MAPT, Mapt**		
3xtg	MAPT, APP. PSEN1	APP KM670/671NL (Swedish), MAPT P301L, PSEN1 M146V	
APP/PS1/rTg21221	MAPT, APP. PSEN1	APP KM670/671NL (Swedish), PSEN1: deltaE9	
PLB1-triple (hAPP/hTau/hPS1)	MAPT, APP. PSEN1	APP V717I (London), APP KM670/671NL (Swedish), PSEN1 A246E, MAPT P301L, MAPT R406W	
TauPS2APP	MAPT, APP. PSEN2	APP KM670/671NL (Swedish), MAPT P301L, PSEN2 N141I (Volga German)	
Tg2576/Tau(P301L) (APPSwe-Tau)	MAPT, APP	APP KM670/671NL (Swedish), MAPT P301L	
Trem2 KO (Colonna) x PS19	MAPT, Trem2	MAPT P301S	
Trem2 KO (KOMP) x htau	Mapt, MAPT, Trem2		
Modificaciones en el gen MAPT			
Nombre	Mutación		
hTau-A152T	MAPT A152T		
hTau-AT (hTau40-AT)	MAPT A152T		
hTau.P301S	MAPT P301S		
JNPL3(P301L)	MAPT P301L		
mThy-1 3R Tau (line 13)	MAPT L266V, MAPT G272V		
rTgTauEC	MAPT P301L		
rTg(tauP301L)4510	MAPT P301L		
RW Tg mice	MAPT R406W		
Tau264			
Tau35			
Tau4RTg2652			
Tau609 (Tau 10 + 16)	MAPT IVS10+16 C>T		
TauC3 (Transgenic caspase-cleaved tau)			
Tau Exon 10 Knock-out			
TauΔK280 ("Proaggregation mutant")	MAPT K280del		
Tau P301L	MAPT P301L		

Tau P301S (Line PS19)	MAPT P301S	
Tau R406W transgenic	MAPT R406W	
TauRDΔK280 (“Proaggregation mutant”)	MAPT K280del	
Tau V337M	MAPT V337M (Seattle Family A)	
THY-Tau22	MAPT G272V, MAPT P301S	
TMHT (Thy-1 mutated human tau)	MAPT V337M (Seattle Family A), MAPT R406W	

Tabla 2. Modelos de estudio de taupatías disponibles. Fuente (https://www.alzforum.org/research-models/)

6. Estrategia de reprogramación de ARN mediante *trans-splicing*

Asumiendo que el contenido aumentado de isoformas 3R de tau subyace a los fenotipos patológicos de los ratones htau envejecidos, nuestro abordaje experimental consistirá en modular la inclusión del E10, a nivel del ARN, utilizando una estrategia para reprogramar el ARN a nivel del transcripto primario endógeno , mediante *trans*-splicing (Mansfield et al., 2003). Esta metodologia, también denominada SMaRT (por sus siglas en inglés, *Spliciosome Mediated RNA Trans-splicing* (Puttaraju et al., 1999; Garcia-Blanco, 2003), se optimizó previamente para impulsar la inclusión de E10 y convertir tau endógena 3R a isoformas 4R, lo cual fue logrado eficientemente tanto en cultivos neuronales como en cerebro adulto (Avale et al., 2013). La estrategia SMaRT, se basa en diseñar fragmentos de ARN artificiales (PTM, *pre-transplicing motifs*) que una vez sintetizados dentro de la célula son capaces de interactuar con el ARN endógeno para producir moléculas de ARN quimérico (Figura 7). La molécula de pre-*trans-splicing* (PTM) contiene el dominio de trans-*splicing* formado por una secuencia de 125 nt complementaria al extremo 3´del intrón 9 endógeno del transcripto primario de tau, un punto de ramificación necesario para la ocurrencia correcta del *splicing*, un sitio aceptor de *splicing* fuerte 3´AG, seguido de la secuencia de codificación de la PTM que consiste en un *cassette* de expresión que contiene

los exones del 10 al 13, sin intrones, bajo el control del promotor neuronal de la Sinapsina 1 humana (figura 7A). La misma construcción es utilizada para el grupo control, pero con un casssette excluyendo el dominio de *trans-splicing* complementario al intrón 9, por lo tanto, la reacción de *trans-splicing* en este caso no puede ocurrir (figura 7B). Luego del evento de *trans-splicing* el ARN quimera es traducido en una proteína normal y funcional. La estrategia SMaRT ha sido utilizada en numerosos trabajos utilizando distintos modelos experimentales y para reparar mutaciones en diferentes genes, mediante la reprogramación a nivel del ARN (Mansfiel et al., 2000; Puttaraju et al., 1999; Wally et al., 2012). El uso de *trans-splicing* en el sistema nervioso central también ha sido utilizado en un modelo animal, para desarrollar una estrategia de reparación de mutaciones del gen *SMN2*, causales de distrofia muscular hereditaria (Coady et al., 2007).

Figura 7

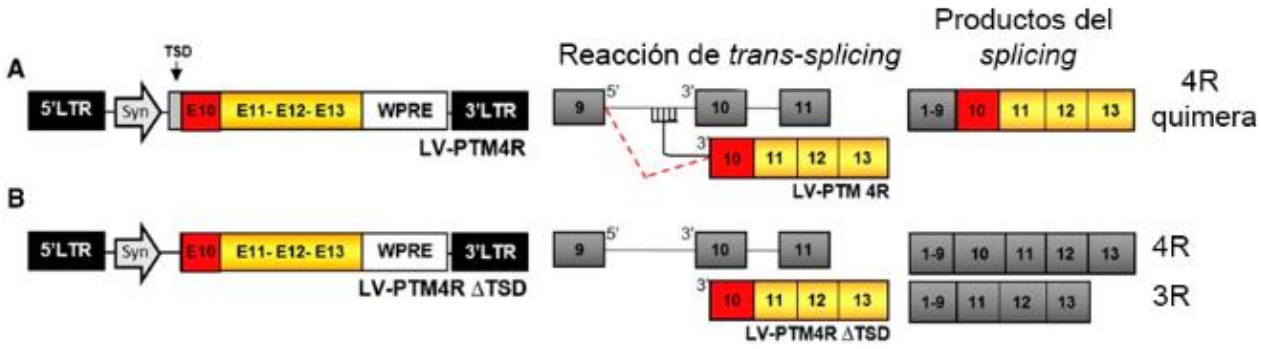

Figura 7: A y B) Mapa de los vectores lentivirales. A) LV-PTM4R usado para que ocurra el trans-*splicing* y el transcripto quimérico (4R) funcional esperado, con los exones 1-9 provenientes del transcripto endógeno y los exones 10-13 provenientes de la PTM. B) Vector lentiviral LV-PTM4RΔTSD, sin capacidad de unirse al transcripto primario, utilizado como control.

Bajo nuestro paradigma experimental, el transcripto primario de Tau puede ser procesado por dos vías alternativas, puede ocurrir *cis-splicing* si el transcripto primario no

interactúa con el PTM; en este caso ocurre el *splicing* alternativo del exón 10 en el cual la maquinaria de *splicing* utiliza los sitios donores y aceptores propios del ARN endógeno, dando lugar a las isoformas 3R o 4R endógenas. O bien, puede ocurrir*, trans-splicing* si el ARN transcripto primario de Tau interactúa con el PTM; en este escenario ocurre el evento de *splicing* entre el sitio 5' donor del intrón 9 del transcripto endógeno y el sitio 3' aceptor del PTM, generando un ARN maduro quimérico que contiene los exones 1 al 9 provenientes del transcripto endógeno y los exones 10 al 13 provenientes del cassette del PTM. Dado que el cassette de expresión del PTM (10-13) no contiene intrones no existe la posibilidad de que el exón 10 sea eliminado. De este modo independientemente de los eventos intrínsecos de *cis splicing* alternativo que pudiesen ocurrir en el transcripto primario de Tau, aquellas moléculas en las que ocurre *trans-splicing* únicamente producen la isoforma de 4R.

En resumen, las taupatías son un grupo de enfermedades neurodegenerativas altamente incapacitantes, caracterizadas por el metabolismo anormal de la proteína asociada a los microtúbulos tau, la cual forma acumulaciones de depósitos insolubles neurofibrilares e hiperfosforilados dentro de las neuronas, en regiones definidas del cerebro, particularmente en regiones corticales e hipocampo. Bajo condiciones normales, la proteína tau participa en la estabilización de los microtúbulos y cumple un importante rol en el transporte axonal. Las condiciones patológicas que originan la disfunción de Tau y/o la formación de agregados no están completamente elucidadas, pero en muchos casos se asocian a cambios en los procesamientos postranscripcionales del gen codificante para Tau (*MAPT*). En particular, se han asociado taupatías con defectos en el procesamiento por *splicing* del ARN transcripto primario de Tau cambiando la proporción normal de isoformas

tau en el cerebro adulto. En el gen *MAPT*, han sido identificadas numerosas mutaciones asociadas con taupatías, varias de las cuales producen defectos en el mecanismo de *splicing* alternativo del E10, alterando el equilibrio normal de las isoformas 3R y 4R de Tau en el cerebro de los pacientes afectados; por lo tanto, la restauración del equilibrio 3R:4R podría representar una terapéutica plausible.

HIPÓTESIS

En base a las evidencias que muestran que la perturbación del balance de isoformas tau 3R y 4R subyace a los fenotipos patológicos en ciertas taupatías, la hipótesis de trabajo de este estudio asume que la corrección del desbalance de isoformas de la proteína tau en el cerebro adulto previene el desarrollo de fenotipos patológicos, como ser, la formación de agregados, hiperfosforilación de tau y consecuentemente, los déficits funcionales.

Asimismo, para este trabajo también postularemos una hipótesis complementaria a la anterior, que asume que el desbalance 3R:4R tiene un efecto directo sobre la funcionalidad neuronal, independientemente de la formación de agregados de tau y/o de la muerte neuronal.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de esta tesis se enmarcó en profundizar y comprender los mecanismos moleculares que subyacen a la patología de tau, analizando las consecuencias funcionales del desbalance 3R:4R en modelos experimentales de taupatía. Para esto, se optimizó el uso *in vivo* e *in vitro* de la estrategia de *trans-splicing*, validando su potencial para modular los contenidos relativos de isoformas de tau en un modelo murino de taupatía y en neuronas humanas diferenciadas en cultivo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Caracterizar los fenotipos patológicos conductuales, histopatológicos y funcionales del modelo murino de taupatía htau.

2- Utilizar la estrategia de *trans-splicing* mediado por vectores lentivirales para modular el contenido de las isoformas 3R y 4R de Tau en la corteza prefrontal del ratón htau y evaluar si esta regulación temprana previene la patología tau y/o los fenotipos funcionales en los ratones htau seniles.

3- Identificar fenotipos bioquímicos tempranos en el modelo htau analizando los núcleos cerebrales del sistema olfativo potencialmente afectados por la patología Tau.

4- Inducir desequilibrio de isoformas 3R: 4R de tau de neuronas humanas diferenciadas en cultivo y analizar las consecuencias funcionales en el transporte axonal.

CAPÍTULO I: REPROGRAMACIÓN DE ISOFORMAS TAU COMO ESTRATEGIA TERAPEUTICA EXPERIMENTAL EN UN MODELO DE TAUPATIA

1. Caracterización de tau hiperfosforilada en el cerebro del modelo hTau

Los análisis de la patología tau que habían sido realizados previamente en el modelo de ratón htau habían reportado la presencia de agregados de proteína tau hiperfosforilada tanto en la corteza como en el hipocampo de los ratones htau seniles, de 9-12 meses, (Andorfer et al., 2003; Polydoro et al., 2009), aunque sin realizar una determinación cuantitativa de los niveles de acumulación de tau ni la distinción anatómica de las subregiones corticales analizadas. Por lo tanto, al iniciar este trabajo de investigación en el que planteamos utilizar este modelo para ensayos de terapéutica experimental, fue necesario replicar esos experimentos de manera más precisa, a fin de determinar las estructuras que estuviesen mayormente afectadas por la patología tau y que representen potenciales blancos terapéuticos. Inicialmente realizamos un análisis por inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo específico contra las formas de tau con hiperfosforilación patológica tardía en T231/S235 (anticuerpo AT-180) en ratones hTau de 12 meses. En este estudio, la mayor acumulación de tau hiperfosforilada se observó en la corteza prefrontal medial (mCPF; Figura 1A) en tanto que se observó una muy baja detección en el hipocampo. Al mismo tiempo analizamos otras estructuras con las cuales la mCPF se halla relacionada funcionalmente, tanto de manera directa como es el caso del cuerpo estriado, así como no directamente relacionadas a la mCPF, como la *sustantia nigra pars compacta*. No se evidenció marcado positivo para AT180 en ninguna de éstas áreas

del cerebro. En los ratones control de genotipo salvaje (*wild-type*) no se encontraron marcas tau AT180 positivas en ninguna de las estructuras estudiadas.

A continuación, realizamos un análisis cuantitativo y comparativo de la acumulación de tau hiperfosforilada entre la corteza prefrontal y el hipocampo, a lo largo del envejecimiento del modelo htau. Analizamos mediante *western blot* los niveles de proteína tau hiperfosforilada positivas AT180 en ambas estructuras, disecadas de ratones htau de 3, 6 y 12 meses. Los valores obtenidos indicaron un incremento del 100% de tau hiperfosforilada patológica (AT180 positiva), en la corteza prefrontal de los ratones htau a los 12 meses de edad respecto al mismo grupo a los 3 meses (Figura 1B). En el hipocampo, en cambio, si bien se observa una tendencia hacia el incremento de proteína tau AT180 positiva a medida que aumenta la edad del animal, las diferencias observadas no resultaron estadísticamente significativas entre los grupos etarios (Figura 1C). Además, los niveles de acumulación de tau patológica a los 12 meses resultaron mayores (aproximadamente en un 90%) en la mCPF respecto del hipocampo. Esto resulta consistente con algunos de los fenotipos observados previamente en este modelo que sugieren una disfunción prefrontal, aunque previamente también se habían adjudicado los fenotipos observados a la acumulación de patología tau en el hipocampo (Polydoro 2009).

En base a los resultados obtenidos en nuestros ensayos bioquímicos, que indicaron mayor patología tau en el área cortical prefrontal seleccionamos esta estructura (mCPF) para realizar los estudios de modulación de la relación de isoformas tau 3R:4R y analizar el potencial rescate funcional en el modelo htau. Asimismo, este experimento nos permitió establecer la ventana experimental para realizar los ensayos de tratamiento; ya que la

mayor acumulación patológica de tau hiperfosforilada se observa entre los 6 y 12 meses, por lo tanto, establecimos realizar la administración del tratamiento a los 3 meses y evaluar los fenotipos funcionales a los 10-12 meses de edad.

Figura 1

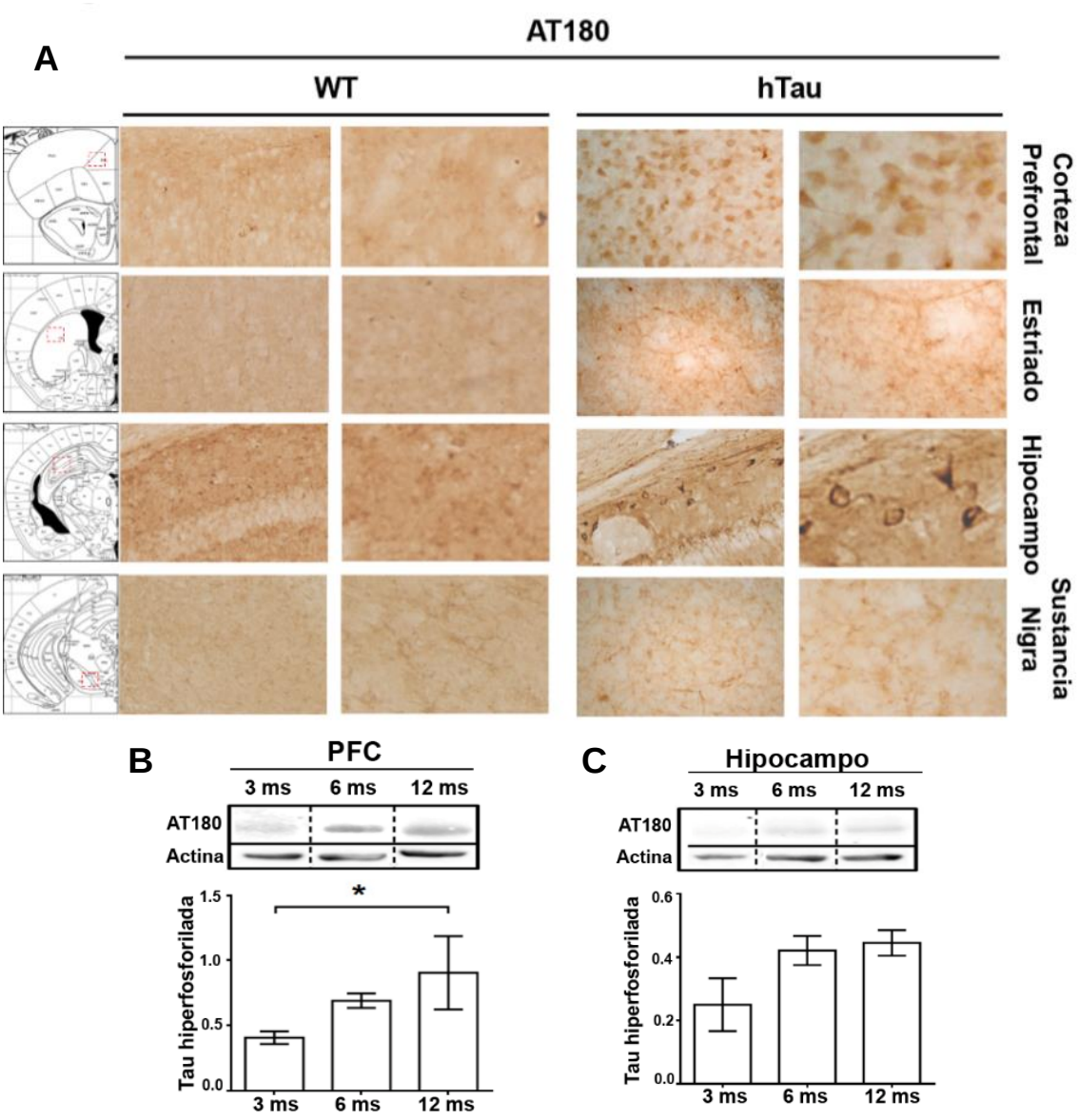

Figura 1: **Caracterización del estado de hiperfosforilación (AT180 positivo) en ratones WT y hTau adultos**. A) A la izquierda, detección de inmunohistoquímica positiva para AT180 en cortes coronales de la corteza prefrontal, estriado, hipocampo, y *substantia nigra*. Se detectaron neuronas AT180 positivas en la corteza e hipocampo de los ratones hTau de 12 meses de edad, sin embargo, el marcado más fuerte se detectó en la corteza. Las demás regiones del cerebro de los ratones hTau de 12 meses no evidenciaron marcado AT180

positivo, al igual que en los ratones WT. B y C) Cuantificación de contenidos de tau hiperfosforilada por *western blot* en corteza prefrontal e hipocampo a distintas edades (3, 6 y 12 meses) respecto de actina. Se evidencia un aumento significativo del contenido relativo de AT180 en la corteza a partir de los 3 meses, respecto al hipocampo donde no se observaron incrementos significativos. Los valores se indican en unidades relativas respecto del contenido de actina (Media ± SEM *$p \geq 0.05$; ANOVA de una vía, seguido del test de Bonferroni; n=3 por grupo).

2. Modulación de los contenidos de isoformas tau 3R:4R en la corteza prefrontal de los ratones hTau mediante *trans*-splicing

Tal como fue descripto en la introducción, el modelo htau produce un exceso de la isoforma tau 3R en el cerebro del ratón adulto, lo cual, según nuestra hipótesis de trabajo, podría mediar algunos de los fenotipos patológicos observados en este modelo. Con el objetivo de modular los niveles relativos de tau 3R:4R utilizamos la estrategia de reprogramación por *trans-splicing* a nivel del ARN, para promover la inclusión del E10 dentro de los transcriptos endógenos de tau. Utilizamos moléculas de *pre-trans-splicing* (PTM) que contienen el E10, las cuales fueron expresadas en la CPF mediante vectores lentivirales (LV) para lograr una expresión estable en el tiempo, tal como se describió previamente (Avale et al., 2013). Para el grupo control se utilizaron las mismas moléculas PTM pero sin el dominio de unión al intrón 9, por lo cual la reacción de *trans-splicing* no puede llevarse a cabo (LV-PTM4R-ΔTSD; ver introducción Figura 6). Los LVs-PTMs fueron administrados mediante cirugía estereotáxica en la CPF de los ratones a los 2 a 3 meses de edad, antes del inicio de la acumulación patológica de tau. Los análisis bioquímicos, registros electrofisiológicos y las pruebas de comportamiento ulteriores fueron realizadas entre los 10 a 12 meses de los animales, momento en el cual los fenotipos patológicos son muy marcados.

2.1. Análisis del contenido de isoformas 3R y 4R en la corteza prefrontal

El primer análisis consistió en validar a nivel molecular la eficiencia del *trans-splicing* para modificar los contenidos relativos de tau 3R:4R en la mCPF. Inicialmente se extrajo ARN total de la región de la mCPF de ratones htau de cada grupo experimental. Para visualizar los niveles de ARNm de las distintas isoformas de tau se realizó una PCR tiempo final usando *primers* que hibridan en los exones 9 y 13 del transcripto de tau (Figura 2A). Como se reportó previamente (Avale et al. 2013), los ratones htau producen cantidades muy bajas de isoformas 4R (E10+), luego de la reacción de *trans-splicing* los niveles de ARNm de isoformas 4R se incrementan. Sin embargo, mediante la PCR de punto final no fue posible discriminar los contenidos relativos de cada isoforma. Seguidamente, para poder realizar un análisis cuantitativo de los cambios mediados por el *trans-splicing*, realizamos PCR en tiempo real, tomando únicamente las regiones de la corteza prefrontal que mostrasen transducción efectiva con el vector viral. Estas regiones fueron obtenidas mediante la técnica de microdisección por captura laser (Figura 2B), realizada por el servicio técnico brindado por el IBYME. Para realizar la PCR cuantitativa se diseñaron *primers* específicos cuya eficiencia fue determinada mediante el método de la curva estándar correspondiente (véase materiales y métodos).

Tal como se esperaba los animales htau controles mostraron un exceso de isoformas 3R (E10-) por sobre las isoformas 4R (E10+), dando una relación de E10+/E10- = 0,4. En tanto que los ratones inyectados con el LV-PTM-4R (grupo hTau-PTM4R) mostraron un incremento en las cantidades relativas de isoformas 4R (E10+), dando una relación E10+/E10- = 0,8 (Figura 2C). Como experimento control sobre las mismas muestras se

determinó que la inyección de las moléculas de *trans-splicing* no modifica los niveles de ARNm de tau total (Figura 2D), ambos tanto el hTau-PTM4R y hTau PTMΔTSD control, mostraron niveles similares de tau total, al igual que los animales controles no inyectados.

Figura 2

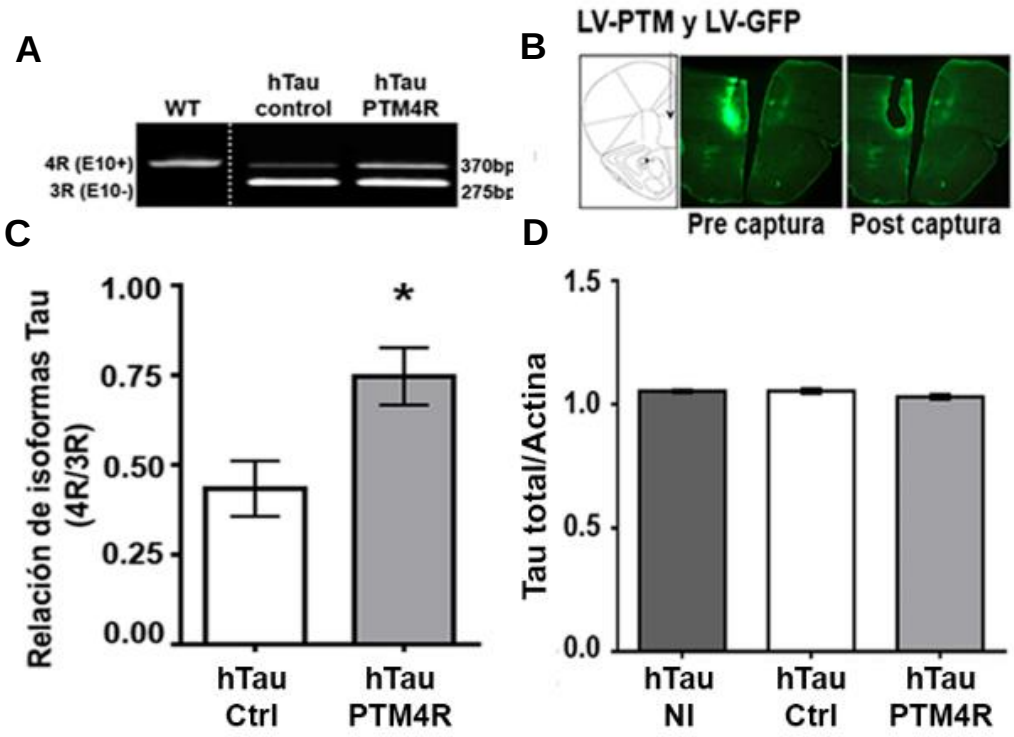

Figura 2: Reprogramación local del ARNm de isoformas tau 3R y 4R en la corteza prefrontal de los ratones htau. A) Análisis de las isoformas de tau mediante PCR tiempo final con *primers* flanqueando los E9-E13. B) Captura por microdisección laser de la CPF de ratones hTau coinyectados con LVs conteniendo GFP en su *cassette* de expresión. C) contenido relativo de las isoformas de tau determinadas por PCR en tiempo real con primers específicos para 3R y 4R. Los datos estan expresados como la relación 4R/3R; media±SEM, *$p \leq 0.05$, *t student* test, n=4 por grupo. D) ARNm de tau total, no muestra diferencias entre los tratamientos.

Para analizar si las diferencias observadas a nivel del ARNm se correlacionan con cambios a nivel proteico, realizamos una determinación por ensayo de *western blot* sobre homogenatos de mCPF de los grupos experimentales, usando anticuerpos específicos anti-3R y 4R (Figuras 3A y 3B). Los animales htau control exhibieron 2 veces más contenido de

isoformas 3R, consistente con los resultados de PCR. En tanto, los ratones hTau-PTM4R mostraron niveles similares de isoformas 3R y 4R en la corteza prefrontal (Figura 3C), indicando que la conversión obtenida de moléculas endógenas 3R a 4R fue de aproximadamente un 50%.

Como esperábamos, el grupo WT mostró altas cantidades de isoformas 4R y muy poco de 3R, ya que los ratones WT adultos solo expresan tau 4R. En la Figura 2F se observan las cantidades relativas de tau total similares entre los distintos grupos, hTau-PTM4R, hTau-control y hTau no inyectado, lo que demuestra que la inyección en sí no genera cambios en la cantidad de tau total, ni tampoco existe un efecto del *trans*-splicing sobre el contenido total de proteína tau. Sin embargo, cabe destacar que los 3 grupos de ratones htau muestran niveles de tau total aumentados de aproximadamente un 40% respecto al grupo WT (Figura 3D), lo cual era esperable debido al hecho de ser transgénicos (con más de una copia del transgen *MAPT*) y además es consistente con otros trabajos previos (Andorfer et al., 2003; Duff et al., 2000).

Figura 3

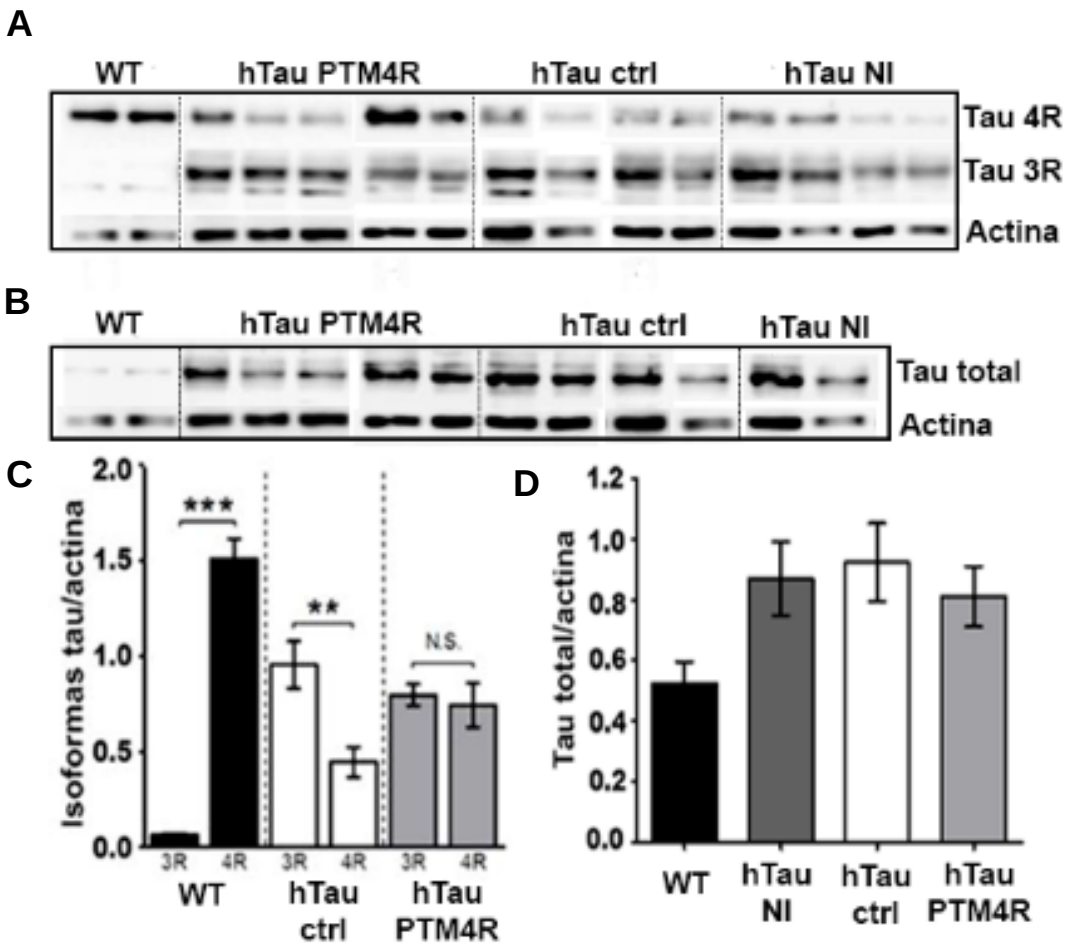

Figura 3: Reprogramación local de isoformas tau 3R y 4R en la corteza prefrontal de los ratones htau. A y B) Fotografías de las membranas de WB a partir de las cuales se realizaron las cuantificaciones. C) Detección del contenido relativo de isoformas 3R y 4R medidas por western blot y D) cantidad relativa total de tau medida por western blot, relativizadas a actina como control de carga. Media±SEM, $^{**}p \leq 0.01$, $^{***}p \leq 0.001$, *t* student test de dos colas, (WT = 3, htau-control = 4, and htau-PTM4R = 5, htauNi = 3)

2.2. Análisis del contenido de isoformas 3R y 4R en algunas áreas funcionalmente conectadas con la corteza prefrontal

Para analizar si el cambio de isoformas tau 3R a 4R en la corteza prefrontal observado, se trata de un cambio localizado en esa estructura o bien si la inyección de LV-PTM4R genera

un cambio global en el contenido de dichas isoformas en el cerebro del ratón durante los 9 meses post- inyección, analizamos los niveles de isoformas tau en otras estructuras relacionadas funcionalmente con la corteza a los 12 meses de edad. En la Figura 4 se muestra el análisis por *western blot* en el cual la detección de isoforma 4R se observa incrementada en los homogenatos obtenidos de la corteza motora M2 adyacente anatómicamente a la corteza frontal, pero no en las otras áreas del cerebro analizadas, en las cuales el desequilibrio 3R>4R se observó de manera equivalente en todos los ratones htau-PTM4R como en los htau-control. Tal como esperábamos, todas las estructuras analizadas en el grupo de ratones hTau-control mostraron un incremento marcado en isoformas tau 3R. Juntos, estos datos indican que el cambio de isoformas 3R a 4R mediados por el *trans-splicing* ocurre únicamente en la región abarcada por la inyección del vector viral portador del PTM4R, con lo cual resaltan la eficiencia y especificidad logradas con la estrategia de *trans-splicing* para modular localmente la relación 3R/4R en el cerebro adulto htau.

Figura 4

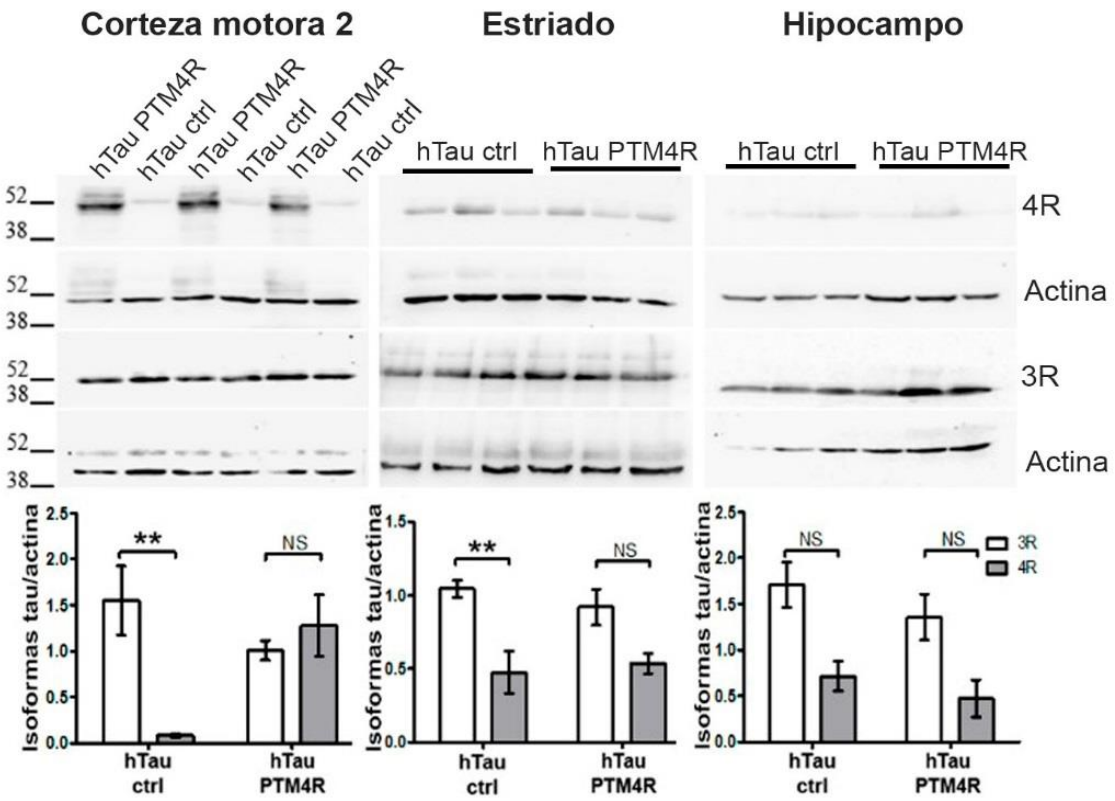

Figura 4: **Caracterización de la expresión de isoformas en algunas áreas funcionalmente conectadas con la corteza prefrontal**. Contenido relativo de isoformas 3R y 4R de tau en las estructuras adyacentes a la corteza prefrontal. Media±SEM;**p<0.01 two-way ANOVA;n=3 por grupo. La inyección del LV-PTM4R indujo la inclusión del E10 también en la corteza motora 2, adyacente a CPF, pero no en las demás estructuras del cerebro.

3. Reducción de Tau insoluble e hiperfosforilada en la corteza prefrontal de los ratones hTau tratados por *trans-splicing*

La acumulación de tau hiperfosforilada e insoluble es una característica distintiva de la patología tau humana, recapitulada en los ratones htau (Andorfer et al., 2003; Castillo-Carranza et al., 2015; Duff et al., 2000; Noble et al., 2009). Para determinar si la restauración temprana del balance 3R/4R podría prevenir la patología tau, analizamos la acumulación de

tau hiperfosforilada en cortes de cerebro abarcando la mCPF de ratones htau envejecidos (>12 meses) los cuales fueron inyectados a los 3 meses con LV-PTM4R (htau-PTM4R) o vector LV-PTM4R-ΔTSD (htau-control).

En la Figura 5A y 5C se visualiza que los ratones hTau-control analizados mostraron un intenso marcado de tau hiperfosforilada en la CPF, detectado mediante dos anticuerpos monoclonales diferentes que reconocen epítopes de tau hiperfosforilados patológicamente, uno de fosforilación temprana en Ser 202 (CP13; Figura 5A y 5B) y otro de fosforilación tardía en Thr231/Ser235 (AT180; Figura 5C y 5D). El análisis cuantitativo de los ensayos de inmunohistoquímica realizados revela que en el grupo hTau-PTM4R, el número de células con marcado positivo para ambos anticuerpos se redujo significativamente comparado con los grupos controles (hTau-PTM4R-ΔTSD) (Figuras 5B y 5D). Para el anticuerpo CP13 se observó una reducción de aproximadamente el 38% de células marcadas en las áreas analizadas, en tanto que con el marcado con AT180 se redujo en aproximadamente el 44% para las células del grupo hTau-PTM4R.

Figura 5

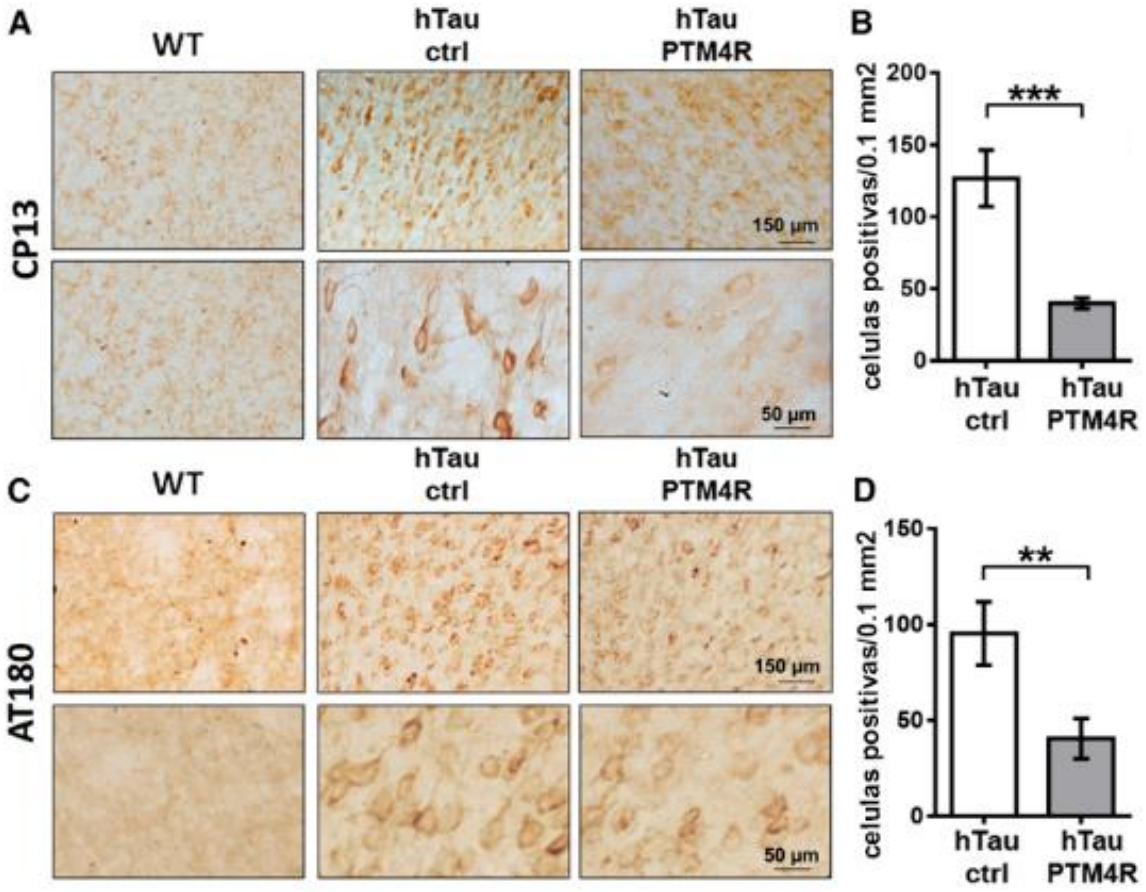

Figura 5: Tau hiperfosforilada en la CPF. A-D) Tau hiperfosforilada detectada por inmunohistoquímica usando los anticuerpos CP13 (Ser 202; **A y B)**, y AT180 (T231/S235; **C y D)** en secciones coronales de la CPF. **B y D)** Cuantificación de las células positivas para CP13 y AT180 respectivamente, en los ratones hTau control y hTau PTM4R.CP13, n=3 por grupo; AT180, n=4 por grupo; dos de cuatro secciones por ratón; mean ± SEM; $^{**}p < 0.01$ y $^{***}p < 0.001$, *two-tailed t test*.

A fin de obtener una detección cuantitativa más precisa de los contenidos de tau hiperfosforilada realizamos un ensayo por *western blot* en homogenatos de CPF de ratones seniles htau-PTM4R, htau-control y WT utilizando los mismos dos anticuerpos (CP13 y AT-180) que se usaron en los ensayos inmunohistoquímicos. En las Figuras 6C y 6D se observó un aumento significativo, 3,5 veces superior de tau hiperfosforilada en ratones htau-control en comparación con ratones WT, en Ser 202, CP13 (Figura 6C) y 2 veces más en Thr231 /

Ser235, AT180 (Figura 6D), al mismo tiempo que los ratones htau-PTM4R mostraron valores similares a los animales WT, es decir en el grupo de ratones hTau-PTM4R se redujo la cantidad total de tau hiperfosforilada en ambos epítopes de manera significativa estadísticamente.

A continuación, estudiamos si el cambio en los niveles de hiperfosforilación se correlacionaría con una reducción en los niveles de tau insolubles, ya que ambos eventos se relacionan a la patología tau, tanto en humanos como en el modelo htau. Para ello, cuantificamos los niveles de la proteína tau soluble e insoluble obtenidas de homogenatos de CPF mediante la técnica de fraccionamiento con Sarcosyl. Se obtuvieron ambas fracciones por centrifugación diferencial, y fueron analizadas por *western blot* utilizando un anticuerpo policlonal contra tau total (véase metodología). Como se observa en las Figuras 6E y 6F, los ratones htau-control mostraron cantidades significativamente mayores de proteína tau insoluble (agregados), produciendo un aumento de 4 veces en la relación insoluble/soluble en comparación con el grupo WT, mientras que los animales inyectados htau-PTM4R mostraron una reducción significativa en la fracción de tau insoluble, que conduce a una proporción de tau insoluble/soluble similar al control ratones WT (Figura 6F).

Tomados en conjunto, estos resultados indican que la modulación temprana local del contendido de isoformas tau mediante *trans*-splicing que genera un balance local de las isoformas 3R:4R previene la acumulación de tau insoluble e hiperfosforilada en la CPF de ratones htau envejecidos.

Figura 6

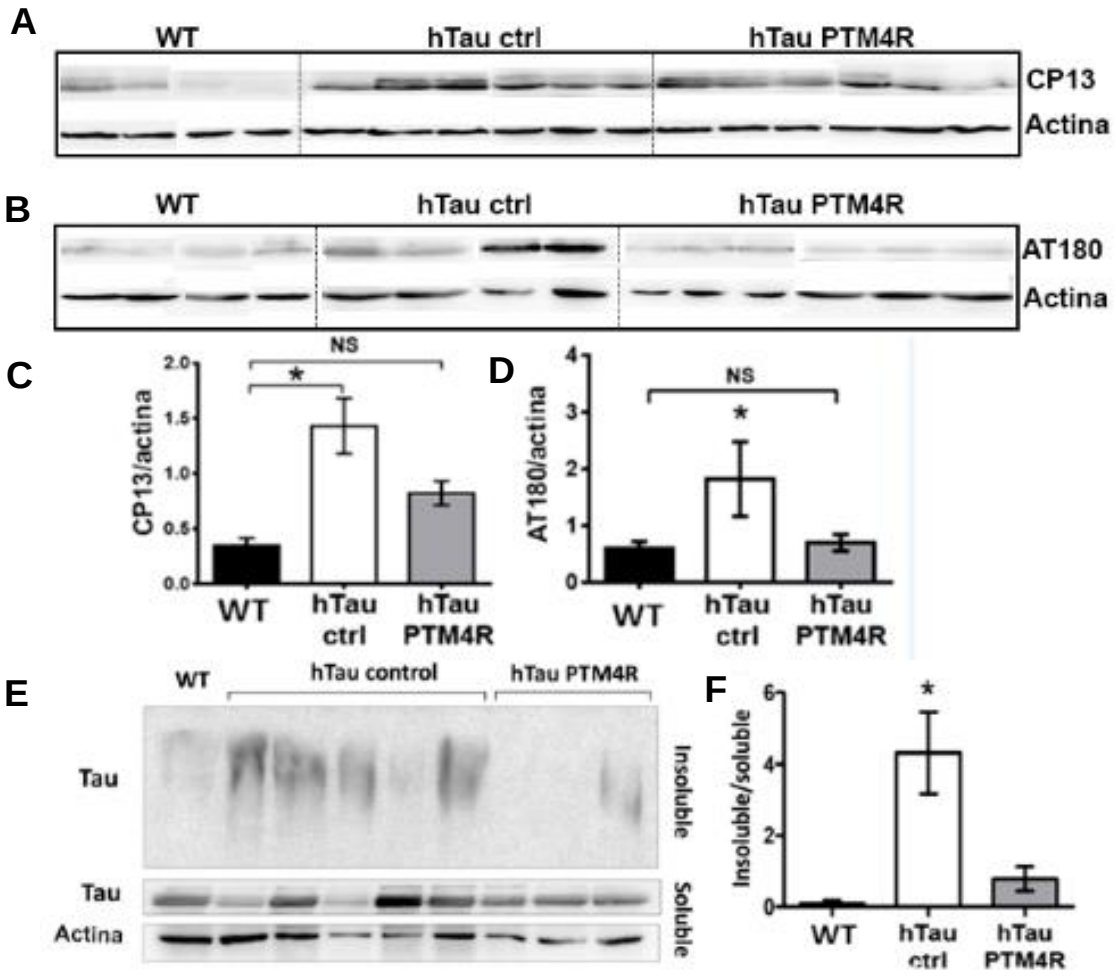

Figura 6: Tau insoluble e hiperfosforilada en la PFC. A y B) Contenido relativo de tau hiperfosforilada determinado por western blot en homogenatos de PFC usando CP13 (A y C) en WT, hTau ctrol y hTau PTM4R y en los mismos grupos usando AT180 (B y D). Mean ±SEM; *p < 0.05, ANOVA de una vía seguido de Tukey's post hoc test. E y F) Ensayo de insolubilidad de Sarkosyl. Las fracciones solubles e insolubles obtenidas de homogenatos de PFC fueron analizadas por western blot. Se cuantificó tau total en cada fracción, WT n=2; htau-control n=4; htau-PTM4R n=3; mean± SEM; *p ≤ 0.05, ANOVA de una vía seguido de la comparación mediante Tukey's .

4. Fenotipos electrofisiológicos y conductuales de los ratones hTau tratados por *trans-splicing*

4.1 Análisis de los fenotipos electrofisiológicos

Seguidamente nos propusimos evaluar si la modulación temprana de las isoformas 3R y 4R de tau en la CPF permite lograr una recuperación funcional de la CPF en ratones seniles del modelo htau. Para realizar los estudios de electrofisiología realizamos una colaboración con el grupo del Dr. Juan Belforte para caracterizar la activación neuronal en ratones envejecidos, registrando la actividad electrofisiológica de neuronas piramidales excitatorias, de gran abundancia en la mCPF. Se colocaron tres tetrodos en la CPFm en ratones anestesiados, de los grupos experimentales htau control, htau-PTM4R, o grupo WT. A través de estos tetrodos se registró la actividad individual de varias unidades extracelulares simultáneamente, según los criterios y protocolos publicados por el grupo colaborador (de Almeida et al., 2013). Los resultados mostraron que la actividad neuronal normal se encuentra afectada en el grupo htau-control, que mostró una disminución significativa en el promedio de disparos en comparación con los controles WT de la misma edad (Figuras 7A, 7B, y 7D). Sorprendentemente, restaurando el equilibrio de isoformas tau 3R:4R en el grupo htau-PTM4R dio como resultado una recuperación de la actividad neuronal, con una tasa de disparo promedio similar a la observada en los ratones WT (Figura 7B). Además, la población de neuronas activas que disparan a más de 4 Hz disminuyó en ratones htau-control en comparación con WT (WT, 21,4%; htau, 7,7%; chi-cuadrado p =0.034) y fue recuperado en hTau-PTM4R (WT, 21.4%; htau- PTM4R, 25,5%; chi-cuadrado p = 0.59) (Figura 7B).

Figura 7

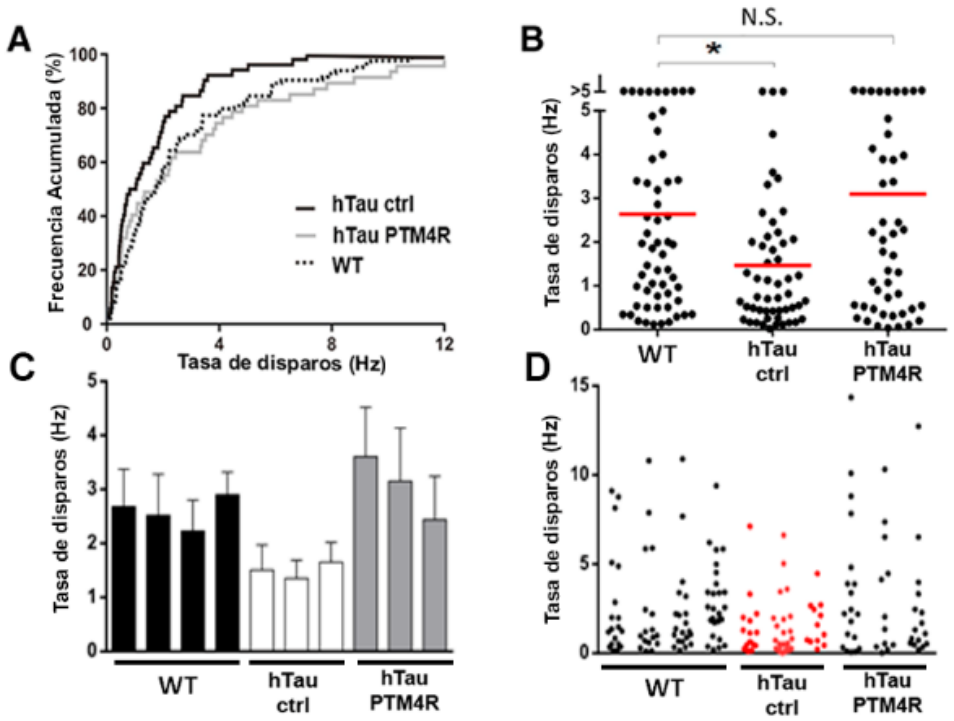

Figura 7. Actividad electrofisiológica en la CPF. A) Frecuencia acumulada de disparos en neuronas piramidales putativas durante 30 minutos en ratones WT (n = 4), htau-control (n = 3) y htau-PTM4R (n = 3) **B)** Tasa de disparo de todas las unidades registradas para cada grupo experimental. Cada punto representa la velocidad de disparo promedio de una unidad piramidal putativa registrada en la CPF durante 30 min. Las barras rojas indican la tasa de disparo promedio de la población total de unidades individuales registradas por grupo; el grupo htau-ctrl fue significativamente diferente ($p < 0.05$ versus WT, Kruskal-Wallis $H2.183 = 6.8$, $p = 0.0329$). WT, n = 84; control de htau, n = 52; y htau-PTM4R, n = 47 neuronas de cuatro, tres y tres ratones, respectivamente en cada grupo. **C)** Tasa promedio de disparo observada en cada ratón utilizado en el análisis. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas dentro de un grupo determinado. ANOVA de una vía: WT $F3,80 = 0.25$ $p = 0.86$; control de hTau $F2,49 = 0,15$ $p = 0,85$; hTau-PTM4R$F2,44 = 0,45$; $p = 0,63$. **D)** Diagrama de puntos que muestra la tasa de disparos de todas las unidades registradas por ratón, individualizada para cada animal. Se puede observar una distribución similar entre los animales con un cambio hacia valores más bajos para los animales htau del grupo control (resaltado en rojo).

4.2 Análisis de comportamiento

A continuación, se realizó un estudio de diferentes aspectos de la conducta de los ratones htau, focalizando en aquellos comportamientos que se encuentran directa o indirectamente regulados por la CPF. Se analizaron ratones envejecidos de los grupos experimentales WT, hTau-control y htau-PTM4R, comenzando los análisis a partir de los 10 meses de edad. En primer lugar, analizamos el rendimiento cognitivo en la prueba de reconocimiento del objeto novedoso (NOR), una tarea que depende de la integridad de la CPFm (Morici et al., 2015), la cual se encuentra severamente afectada en ratones htau adultos (Castillo-Carranza et al., 2014; Polydoro et al., 2009). Como se reportó anteriormente, los ratones htau-control envejecidos mostraron un bajo rendimiento de reconocimiento, exhibiendo un índice de discriminación del 50%, comparado con el 80% observado en el grupo WT (Figura 8A). Sorprendentemente, los ratones htau-PTM4R evidenciaron un rendimiento similar al del grupo WT para discriminar el objeto nuevo (Figura 8A), demostrando una recuperación completa en esta tarea respecto de grupo htau-control. Cabe destacar que no se observaron diferencias en los niveles totales de exploración entre los tres grupos, ya que el tiempo dedicado a la exploración de ambos objetos fue similar entre los grupos (Figura 8B). Esto indica que el fenotipo de los ratones htau no se debe a un déficit en la locomoción y/o la motivación por la exploración sino en el reconocimiento del objeto novedoso.

Figura 8

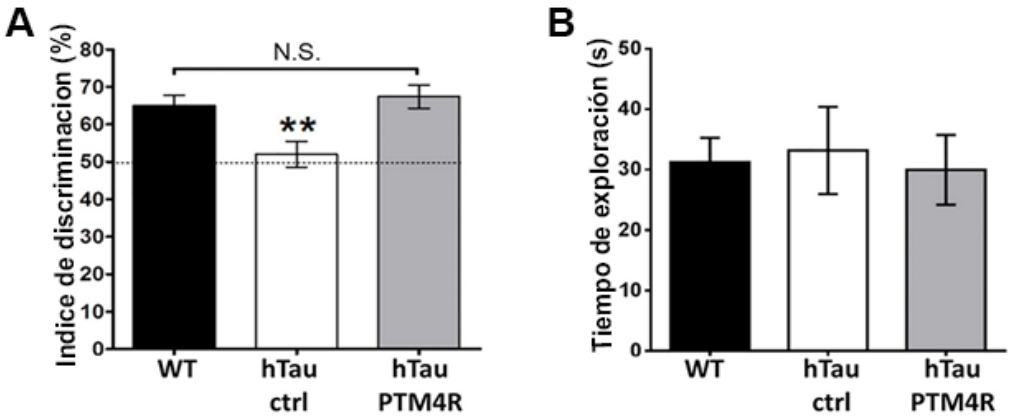

Figura 8: **Reconocimiento del objeto novedoso**. (A) Índice de discriminación del objeto novedoso y (B) Tiempo total de exploración de ambos objetos, novedoso y familiar (WT, n = 16; htau-control, n = 14; htau-PTM4R, n = 13).

Luego decidimos analizar la locomoción espontánea en otro paradigma que permita discriminar potenciales diferencias en la conducta exploratoria de ambientes novedosos, para lo cual se realizó un ensayo de campo abierto (*open field*) registrando la actividad total y las trayectorias recorridas durante los primeros 30 minutos de exposición a la arena novedosa. En este ensayo se observó un aumento leve pero significativo en la locomoción total en ratones htau-control en comparación con el grupo WT medida por la distancia total recorrida (Figura 9A), y a su vez, al discriminar las trayectorias recorridas se registró una mayor actividad en el centro de la arena (Figura 9B). Sin embargo, estos fenotipos fueron solo parcialmente rescatados en el grupo htau-PTM4R que no mostraron diferencias significativas con los grupos WT y htau-control. Esto indicaría que el tratamiento con PTM4R solo produce un rescate parcial en las tareas de exploración del campo abierto, consistente con la participación de la CPF en estas conductas.

En base a los resultados observados en las trayectorias centro/periferia procedimos a determinar los niveles de ansiedad y/o desinhibición comportamental en un ensayo más preciso para analizar estas conductas. Se realizó el ensayo del laberinto en cruz elevado, un test que permite cuantificar los niveles de ansiedad en los animales determinando su actividad en los brazos abiertos respecto de los brazos cerrados. En los animales WT se observó menor cantidad de entradas en brazos abiertos respecto de los brazos cerrados (36%), consistente con la inhibición natural de los roedores al ambiente que genera peligro. Resulta interesante que se observó que los ratones htau-control mostraron aproximadamente el 50% de las entradas a los brazos abiertos (Figuras 9C y 9D), sugiriendo que no hay preferencia por los brazos cerrados. Esto podría sugerir que la disfunción de la CPF altera la percepción del peligro en los brazos abiertos. En tanto, los ratones htau-PTM4R mostraron una reducción de este fenotipo, evidenciando un 33% de entradas a los brazos abiertos, similar a los ratones WT. Si bien estas diferencias observadas no resultaron estadísticamente significativas entre los grupos en esta tarea (probablemente debido al bajo número de animales utilizados para este ensayo), es posible sugerir que la modulación temprana de isoformas tau 3R 4R en la CPF de los ratones htau genere una recuperación parcial del fenotipo de desinhibición comportamental de este modelo.

Paralelamente, para el estudio del comportamiento de ansiedad se utilizó también el test de enterramiento de bolitas (*Marble buryng*), que analiza el comportamiento repetitivo y perseverante (Nicolas et al., 2006). Se entiende en este contexto que una reducción en el número de bolitas enterradas indicaría niveles de ansiedad reducidas en los animales. Los resultados obtenidos mostraron un reducido número de bolitas enterradas

por el grupo WT, con un promedio de 8 bolitas enterradas, a diferencia de los grupos htau-control y htau-PTM4R que evidenciaron un mayor número de bolitas enterradas, con un promedio de 15 y 12 respectivamente, sin mostrar diferencias significativas entre estos dos grupos (Figuras 9E y 9F). En conjunto estos resultados, nos indican que el grupo hTau-control exhibe niveles de ansiedad y comportamiento compulsivo aumentados respecto al grupo WT y dichos parámetros si bien mostraron una leve disminución en el grupo htau-PTM4R, no es posible determinar efectivamente si la modulación de isoformas tau previene estos fenotipos, ya que las diferencias observadas no resultaron estadísticamente significativas. Es probable que estos fenotipos analizados como indicadores de impulsividad y/o ansiedad se deban a disfunciones en diferentes núcleos del cerebro del modelo htau, por lo cual no se observa una prevención total al realizar una modulación local de isoformas tau únicamente en la PFC.

Figura 9

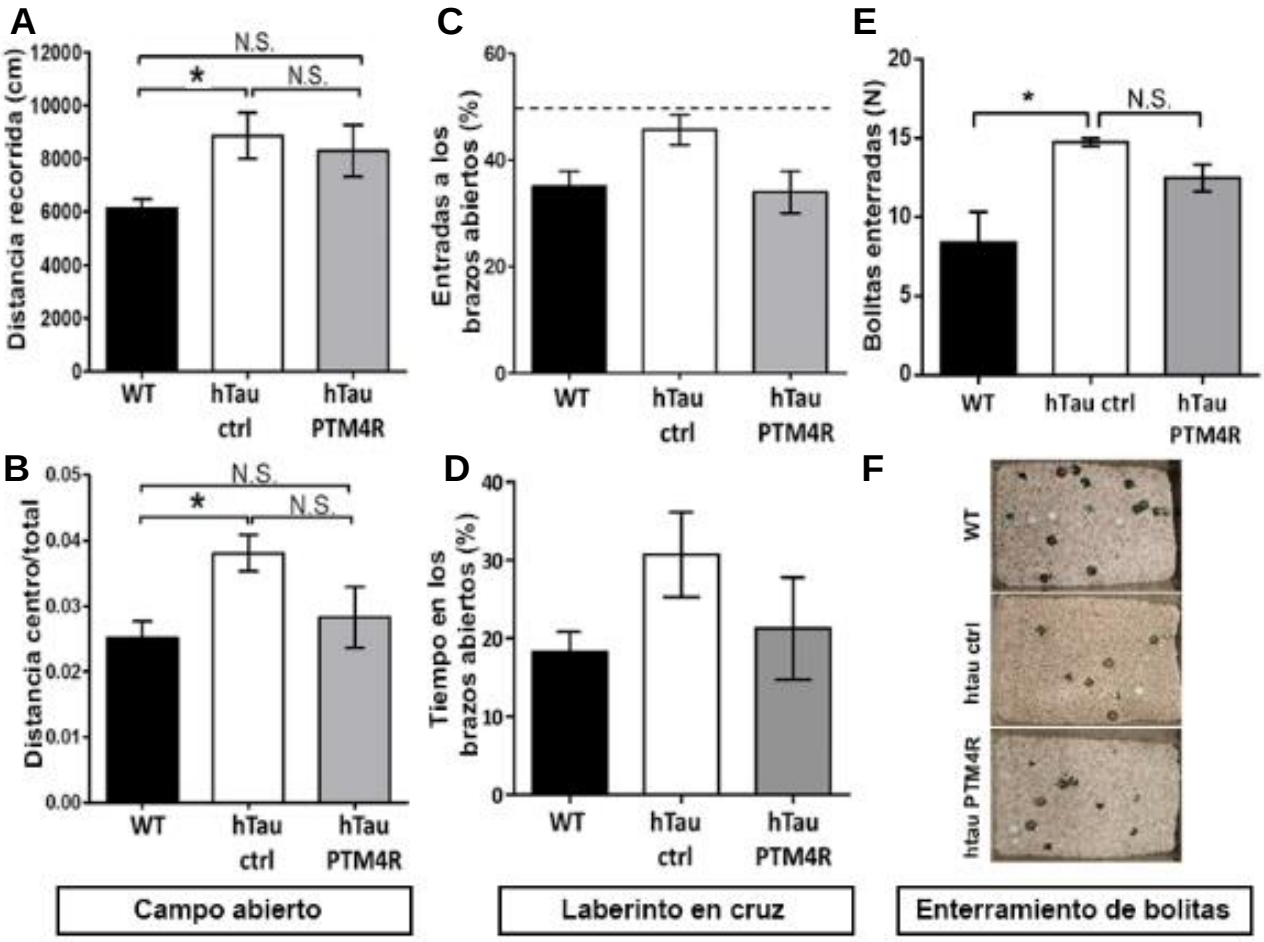

Figura 9. A y B) Locomoción espontánea en el campo de arena abierto. (A) Distancia total recorrida y (B) Relación de actividad en el centro de la arena registrada durante 30 min. WT, n = 11; htau-control, n = 8; and htau-PTM4R, n = 4. Datos en son mean ± SEM; *p < 0.05 and **p < 0.01, ANOVA de una vía seguido de Tukey's test. **(C y D)** Test del laberinto en cruz elevado. (C) Porcentaje de entradas a los brazos abiertos y (D) Tiempo de permanencia en los brazos abiertos. Mean ± SEM, n = 4. No se observaron diferencias significativas entre los grupos (Kruskal-Wallis test no-parametrico). **(E y F)** Estudio del enterramiento de bolitas. E) Promedio del número de bolitas enterradas por cada grupo. Mean ± SEM, ANOVA de una vía seguido de Tukey. E) Fotografía de las jaulas con bolitas luego de finalizada la prueba.

A fin de analizar potenciales déficits en la memoria espacial en este modelo realizamos la prueba del laberinto de agua de Morris o *Morris Water Maze.* Dado que la memoria a largo plazo también requiere un componente de la CPF y teniendo en cuenta que en el modelo htau existían reportes previos que indicaban déficits en esta tarea nos

pareció apropiado analizar los tres grupos experimentales utilizados en este estudio para evaluar por un lado la existencia de déficits en la memoria espacial de ratones htau y por otro la potencial recuperación de dichos déficits al balancear los contenidos 3R 4R en la CPF.

Los animales fueron entrenados durante 5 días consecutivos a encontrar una plataforma escondida en uno de los 4 cuadrantes en los que la pileta circular fue dividida, colocando claves espaciales para su reconocimiento, luego de 1 minuto se registró el tiempo en el cual cada animal tardó en encontrarla. Este test nos permitió evaluar el aprendizaje espacial que se evalúa por los ensayos de repetidos durante los 5 días y la memoria de referencia espacial que se determina al 6to por preferencia para el área de la plataforma cuando la plataforma está ausente. Sin embargo, en nuestras manos el modelo htau control no mostró deterioros en la memoria espacial dado que los ratones htau control presentaron una performance similar a los ratones WT esta tarea (Figuras 10A y 10B). Por otra parte, tampoco observamos diferencias en la performance del grupo htau-PTM4R indicando que no fue posible medir un déficit de la CPF en el paradigma utilizado.

Figura 10

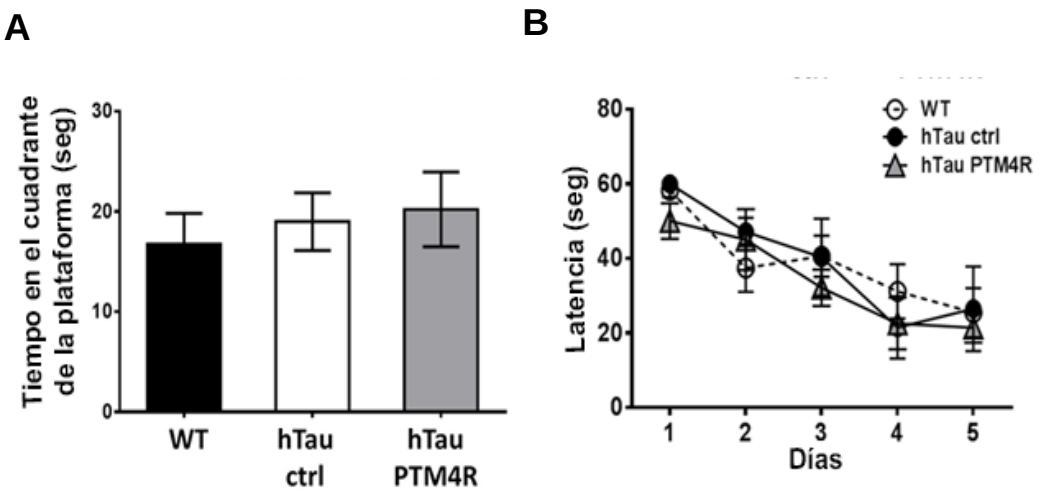

Figura 10. A y B) Memoria de aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris. Se analizó el rendimiento de los animales a los 12 meses de edad al igual que en los anteriores test de comportamiento. **(A)** Al sexto día se realizó el test. Se registró el tiempo total invertido por el animal nadando en el cuadrante en el cual se encontraba la plataforma. **(B)** Aprendizaje de la plataforma con claves. Latencia para encontrar la plataforma en cada día de la capacitación (5 pruebas de 1 minuto por día). (WT:n = 8; hTau control:n=6; hTau-PTM4R:n=7). Datos: Mean ±S.E.M. No se encontraron diferencias entre los grupos.

En conjunto, los resultados presentados en esta sección correspondientes a los análisis electrofisiológicos y de comportamiento indican que la modulación local temprana de las isoformas de tau mediante *trans*-splicing, que genera el equilibrio 3R:4R en la CPF de los ratones htau previene las deficiencias funcionales de la CPF en los ratones htau seniles.

CAPÍTULO II: ANÁLISIS DE MARCADORES DE PATOLOGÍA TAU TEMPRANA EN EL MODELO HTAU

1. Caracterización neuroquímica de patología tau en el bulbo olfatorio en ratones hTau

Tal como se mencionó en la introducción, el sistema olfatorio es una de las primeras regiones cerebrales afectadas en varias patologías neurodegenerativas, incluyendo la EA, lo cual genera un déficit olfatorio (DO) que generalmente precede al deterioro cognitivo (Devanand DP et al., 2000). Sin embargo, los mecanismos responsables de dicha disfunción siguen siendo en parte desconocidos. La expresión de tau no se ha investigado en estructuras olfativas en humanos. Los únicos estudios que exploraron regiones olfativas se realizaron en ratas y mostraron que tau está altamente expresado en las neuronas receptoras olfativas (NRO) y en los axones de las NRO en el BO (Schoenfeld & Obar, 1994) y también está presente en células mitrales e interneuronas del BO (Viereck et al., 1989), sugiriendo que la presencia de agregados tau en esta estructura podría estar involucrada

en el DO. Además, se ha sugerido que la acumulación de tau podría comenzar en el bulbo olfatorio a edades tempranas y luego propagarse a otras regiones del cerebro, directamente inervadas por las neuronas de proyección olfativa. Esta hipótesis se articula con las evidencias que muestran que la proteína Tau patológica puede propagarse a través de las sinápsis en un mecanismo de tipo priónico (Goedert et al. 2014; Goedert et *al*.; 2016), probablemente mediadas por la liberación y captación de tau mal plegada (Jucker and Walker 2013). Por lo tanto, el sistema olfativo podría contribuir a la etiología de las taupatías a través de la transmisión de tau patológica en una etapa temprana de la enfermedad.

Para analizar si la patología tau en el BO aparece en estadios previos a los descriptos para otras estructuras en el modelo htau, analizamos la presencia de déficits en el metabolismo de TAU en el BO (desequilibrios en los niveles de isoformas Tau y/o hiperfosforilación patológica) de ratones hTau a edades de 3, 6 y 12 meses. Para ello realizamos ensayos de *Western blot* comparando los bulbos olfatorios (BO) y corteza prefrontal (CPF) de ratones htau. A los 3 meses de edad en el BO se observó un desbalance con un incremento de aproximadamente el 56% de isoformas tau 3R respecto de 4R (Figura 11A), sin embargo, esta diferencia observada no resultó estadísticamente significativa, hecho que quizás pudo deberse al número reducido de animales analizados. A los 6 meses de edad tampoco se observaron diferencias entre las isoformas tau en los BO. Sin embargo, a las 3 edades analizadas se observaron desbalances de isoformas hacia un aumento de 3R, incluso a los 12 meses el aumento de tau 3R resultó significativo. Paralelamente, se analizaron las CPF de los mismos animales, tal como esperábamos observamos la producción en exceso isoformas tau 3R a partir de los 6 meses de edad (Figura 11B), pero

curiosamente a los 3 meses la producción de isoformas tau 3R resultó significativamente inferior a la cantidad relativa presente en los mismos animales en el bulbo olfatorio. Este resultado sugiere que podría existir un aumento de la isoforma 3R acumulada en BO del modelo htau precedente al incremento en la CPF.

Figura 11

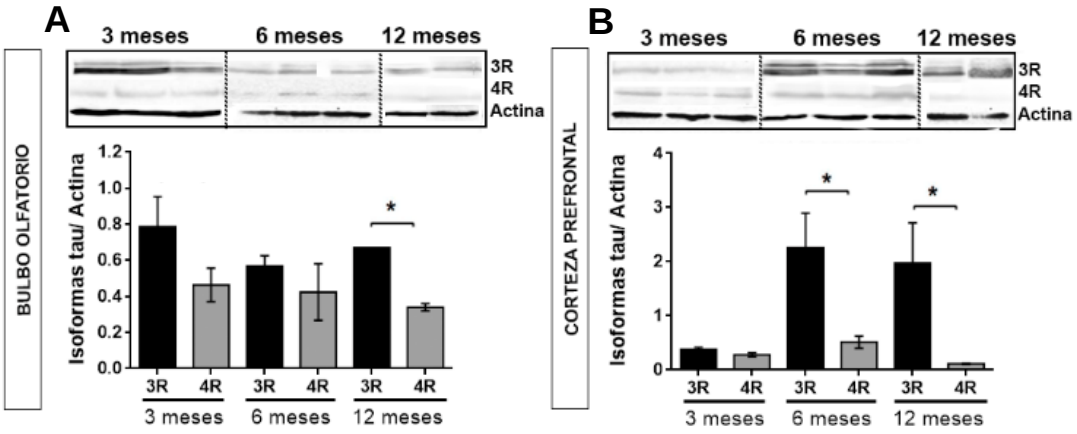

Figura 11. Caracterización de isoformas tau en el bulbo olfatorio. **A)** Caracterización de los niveles relativos de isoformas tau 3R y 4R en el bulbo olfatorio de los ratones htau a los 3, 6 y 12 meses de edad. **B)** Análisis cuantitativo relativo de las cortezas prefrontales de los mismos ratones htau analizados para el bulbo. *p≤0.05, Mean ±SEM, ANOVA de una vía, seguido del test de comparaciones múltiples, (htau 3 meses, n=3, 6 meses n=3 y 12 meses n=2).

La presencia de desbalance temprano hacia un exceso de isoformas 3R en BO, nos llevó a analizar los niveles de tau hiperfosforilada en esta estructura. Para esto, realizamos un ensayo por western blot en homogenatos de BO a las mismas 3 edades analizadas anteriormente (3, 6 y 12 meses). Para la detección de hiperfosforilación patológica, se utilizó el mismo anticuerpo utilizado para los análisis realizados en la CPF (AT180). Observamos una tendencia de aumento de AT180 positivo en los BO de los ratones htau a los 3 meses de edad de aproximadamente el 40% respecto a la edad de 6 meses (Figura 12),

sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Los otros dos grupos etarios 6 y 12 meses no presentaron diferencias de hiperfosforilación entre ellos.

Figura 12

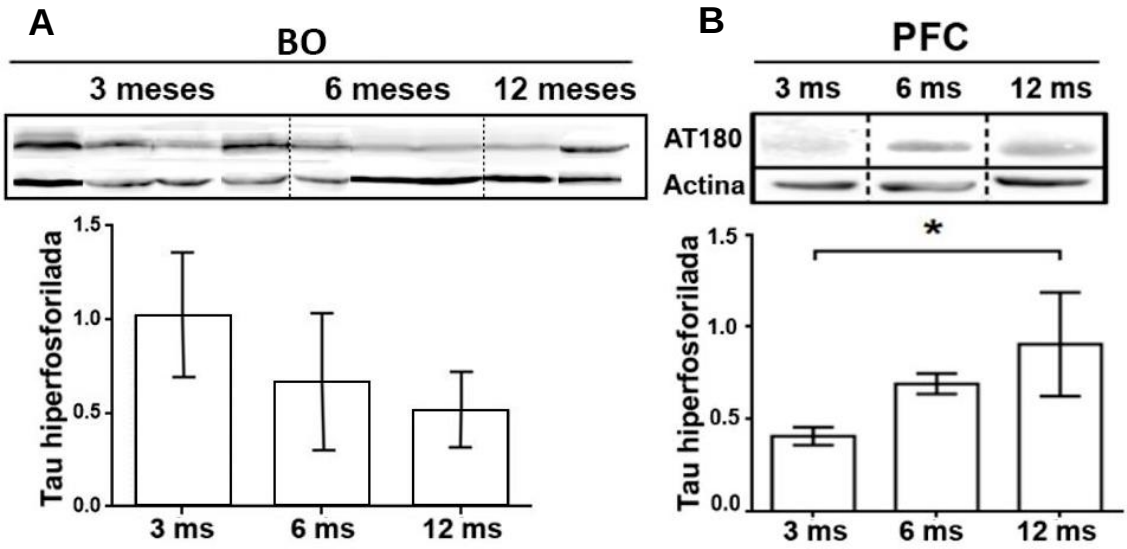

Figura 12. A) Caracterización del estado de hiperfosforilación (AT180+) en el bulbo olfatorio de los ratones hTau a los 3, 6 y 12 meses. **B)** Caracterización del estado de hiperfosforilación en la corteza prefrontal de los ratones htau a las mismas edades (extraído de la figura 1).

2- Análisis de neurogénesis en el BO de ratones htau

En base a algunas evidencias que establecen una relación entre desbalances de isoformas tau y neurogénesis adulta (Komuro et al., 2015), hipotetizamos que los fenotipos neuroquímicos observados en el BO del modelo htau en estadios tempranos podrían estar relacionados con los procesos de neurogénesis adulta en esta estructura. Para probar esta hipótesis decidimos evaluar la neurogénesis, en ratones htau comparándolos con el grupo WT a las mismas edades anteriormente estudiadas (Figura 13). Los ratones fueron inyectados con BrdU siguiendo un protocolo descripto para analizar proliferación celular (véase materiales y métodos) y se realizaron análisis de inmunohistoquímica en cortes

seriados. Mediante este análisis se determinó que no existen diferencias entre el número de células BrdU positivas a los 3 y 12 meses. Sin embargo, a los 6 meses curiosamente se observó un aumento significativo del número de células $BrdU^+$ por mm^2 en los ratones htau (Figura 13).

Figura 13

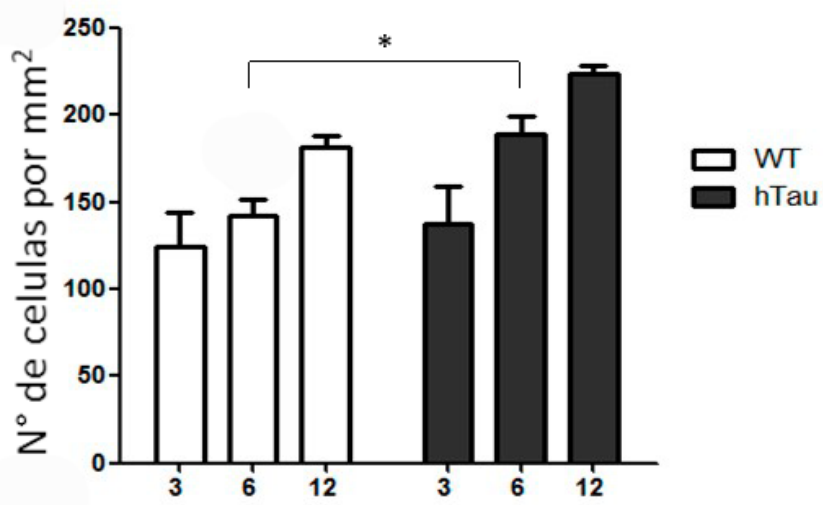

Figura 13: Cuantificación del número de células BrdU+ por mm2 en el bulbo olfatorio. Cuantificación del número total de células BrdU+ presentes en el bulbo, utilizando el Software del microscopio ApoTome. Mean±SEM, ANOVA de dos vías seguido de comparaciones múltiples, (3 meses, WT n=5, htau n=4; 6 meses, WT n=6, htau n=5; 12 meses, WT n=5 y htau n=3).

A continuación, evaluamos si el aumento de las células BrdU+ correlaciona con el el marcado de células neuronales (NeuN), para confirmar que se trate de un cambio en la neurogénesis en dicha estructura. Para esto realizamos un ensayo de inmunohistoquímica con doble marcado para BrdU (rojo) y NeuN (azul) en 3 cortes sagitales de cada animal incluyendo el BO. El área de análisis para la toma de la imagen confocal, se realizó teniendo en cuenta las zonas con mayor marca de BrdU+, para tener representado en cada corte el

mayor número de células comarcadas. En cada campo se observaron entre 10 a 20 células BrdU+, a los 3 y 6 meses de edad en ambos genotipos WT y hTau. Sin embargo, a los 12 meses los campos con células BrdU+ disminuyó significativamente, observándose un promedio de 6 células BrdU+ en para ambos genotipos WT y htau (Figura 14A), esto podría deberse a la edad avanzada de los animales, lo cual se correlaciona con un deterioro importante de las estructuras cerebrales, más que a un fenotipo patológico. Cuando se analizó la colocalización BrdU+/NeuN+, se encontraron muy pocas células marcadas para ambos anticuerpos, únicamente colocalizaban entre 2 a 4 células por campo en ambos genotipos (Figuras 14B y 14C), además no se observaron diferencias significativas entre los genotipos a ninguna edad.

Figura 14

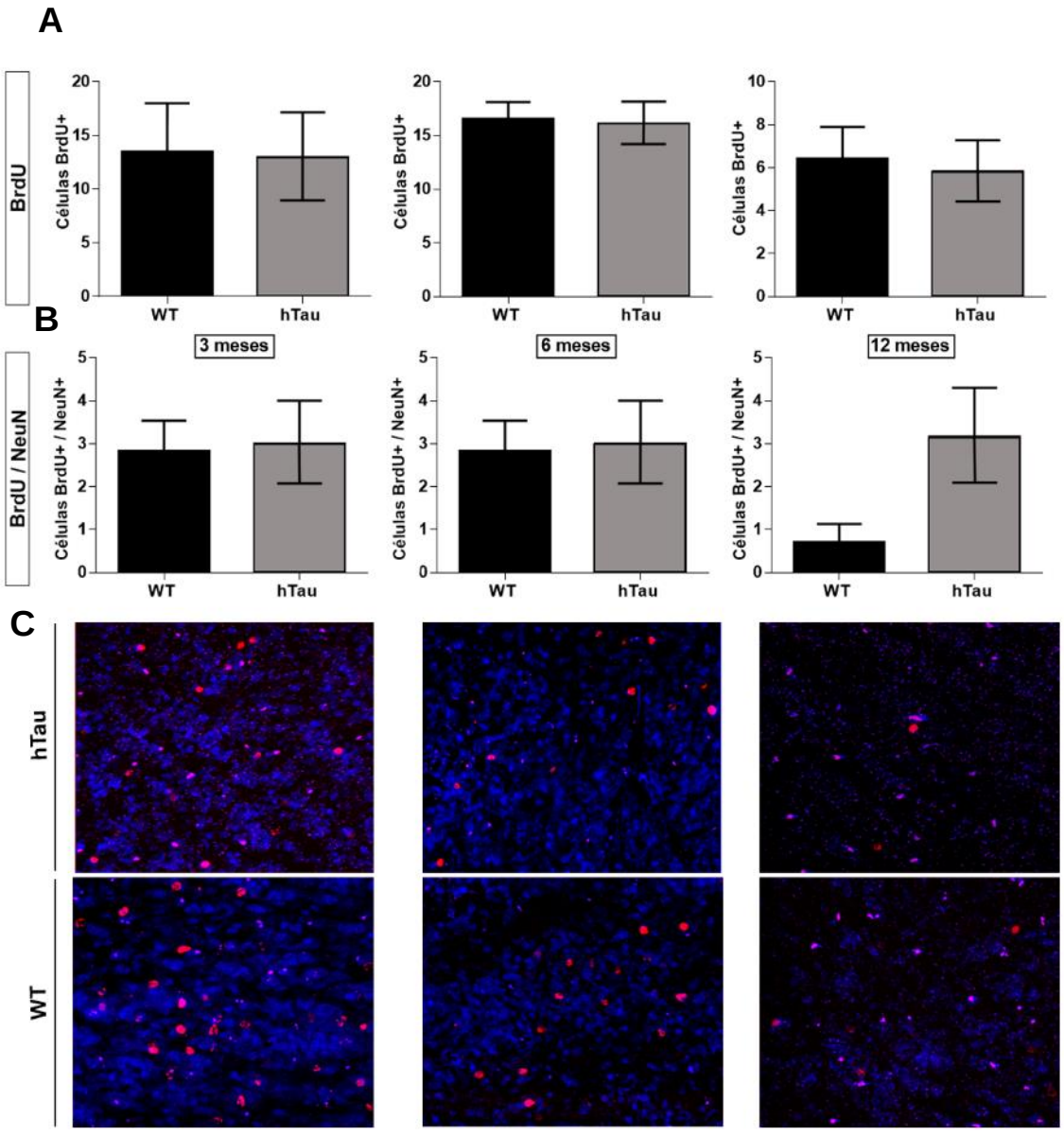

Figura 14. Caracterización de la neurogénesis en el bulbo olfativo de los ratones htau. A) Cuantificación del número total de células BrdU+ en cada campo elegido, en ambos genotipos htau y WT. **B)** Cuantificación relativa del número total de células BrdU+/NeuN+; Mean±SEM ANOVA de una vía ; promedio de 3 campos para cada animal de cada genotipo (3 meses, WT n=5, htau n=4; 6 meses, WT n=6, htau n=5; 12 meses, WT n=5 y htau n=3). **C)** Imágenes confocales a partir de las cuales se realizaron las cuantificaciones en (B) donde se muestra BrdU+ (en rojo) y las células tipo neuronales NeuN+ (en azul).

En resumen, los ratones hTau jóvenes mostraron fenotipos indicadores de taupatía en el BO a partir de los 3 a 6 meses de edad, previo a la manifestación del déficit cognitivo observable a partir de 12 meses, entre los fenotipos patológicos se detectó desbalances de isoformas tau, con exceso de 3R, hiperfosforilación de tau a partir de los 3 meses de edad y mayor número de células BrdU+ en toda la estructura del BO. Sin embargo, no pudimos demostrar que el aumento de BrdU se deba a un aumento en la neurogénesis de los ratones htau a los 6 meses. Esto último, podría deberse a que el tiempo transcurrido entre la inyección del BrdU y el sacrificio de los animales (2 semanas), no resulte suficiente para detectar colocalización con NeuN. Por lo tanto, aún quedan muchos experimentos por realizar para evaluar más minuciosamente el BO en el modelo htau y así describir su participación en el desarrollo de los fenotipos patológicos, algunos de ellos serán retomados en la discusión.

CAPÍTULO III: REPROGRAMACIÓN DE ISOFORMAS TAU EN NEURONAS HUMANAS DIFERENCIADAS *IN VITRO*

El siguiente objetivo de este trabajo de Tesis fue estudiar si la presencia del desequilibrio de isoformas tau 3R o 4R desencadena un cambio en el mecanismo de transporte axonal. Este objetivo se enmarca dentro de este estudio a fin de describir los potenciales cambios funcionales tempranos mediados por un desbalance de isoformas 3R:4R, que podrían preceder a la formación de agregados, a la muerte neuronal y a los fenotipos cognitivos.

Para llevar a cabo este objetivo, se estableció una colaboración con el Laboratorio de Transporte Axonal y Enfermedades Neurodegenerativas, dirigido por el Dr. Tomas Falzone. En el marco de dicha colaboración, dentro del laboratorio del Dr. Falzone se generaron cultivos de neuronas humanas mediante diferenciación de células embrionarias (Hues9); las cuales luego de varias etapas de diferenciación, mostraron desarrollo de estructuras altamente polarizadas, proyecciones axonales y dendríticas definidas, y presencia de isoformas tau con 3R y 4R, por lo cual constituyeron un buen modelo experimental para estudiar la modulación de isoformas 3R/4R *in vitro*. El grupo colaborador tiene amplia experiencia en el estudio de los mecanismos de transporte de la proteína precursora de amiloide (APP). Tal como se mencionó en la introducción, APP se encuentra significativamente vinculada a la enfermedad de Alzheimer, llevando a la generación de patología amiloide. Varias evidencias indican que los defectos en el transporte de APP ocurren de forma temprana en las enfermedades neurodegenerativas. Por lo tanto, medir las dinámicas de APP constituye un método de referencia para detectar déficits de transporte asociados con condiciones patológicas (Goldsbury et al., 2007; Stokin et al., 2005).

1- Modulación de las isoformas tau 3R: 4R mediante trans-*splicing* en neuronas humanas diferenciadas

Los cultivos neuronales fueron obtenidos por diferenciación de hESCs (Hues9) utilizando un protocolo estándar descrito anteriormente (Zhang, 2010) (detallado en materiales y métodos). Para evaluar la correcta polarización celular, se realizó una tinción por inmunofluorescencia 5 días después de la siembra (dia *in vitro* 5; DIV5); en esta etapa,

las neuronas humanas mostraron un desarrollo temprano de estructuras altamente polarizadas con proyecciones axonales definidas (tau-positivas) y dendríticas (MAP2-positivas) como se muestra en la Figura 15B. A los 19 días (DIV19), los cultivos neuronales enriquecidos mostraban una conectividad densa y una arborización axonal junto con tinción detectable de tau en los axones y dendritas (Figura 15C).

Para modular el contenido relativo de isoformas 3R:4R en las neuronas diferenciadas en cultivo, utilizamos las moléculas de pre-*trans-splicing* (PTMs), administradas mediante vectores lentivirales de expresión estable (LVs). El objetivo de esta parte del trabajo fue utilizar las PTMs para favorecer, en ensayos paralelos, la producción de cada una de las dos isoformas, y de ese modo poder evaluar el efecto de los desbalances de las isoformas tau 3R y 4R en el proceso de transporte axonal, sin alterar el contenido total de proteína tau. Por lo tanto, usamos dos LVs distintos: i) LV-Tau-PTM3R, que contiene los exones 11–13 para excluir el exón 10 de la transcripción de tau, y de esta manera aumentar la producción de isoformas tau 3R, y ii) el LV-Tau-PTM4R, idéntico al utilizado para los experimentos *in vivo* en los ratones htau, que lleva los exones 10–13 para inducir la inclusión del exón 10 en el producto quimera resultante del *trans-splicing* y por lo tanto aumentar la producción de las isoformas 4R de tau. También se utilizó un vector control (LV-control) que porta un gen reportero rojo (dsRED) dentro del mismo esqueleto del vector lentiviral (Figura 15E). La eficiencia de la transducción se evaluó mediante la expresión del reportero fluorescente dsRED del LV-control (Figura 15D). La transducción de los cultivos neuronales se llevaron a cabo a los 11 días *in vitro* (DIV11) con los LVs correspondientes. Los análisis moleculares, de

inmunofluorescencia y funcionales se realizaron en DIV19 para permitir la máxima expresión de los LVs.

Figura 15

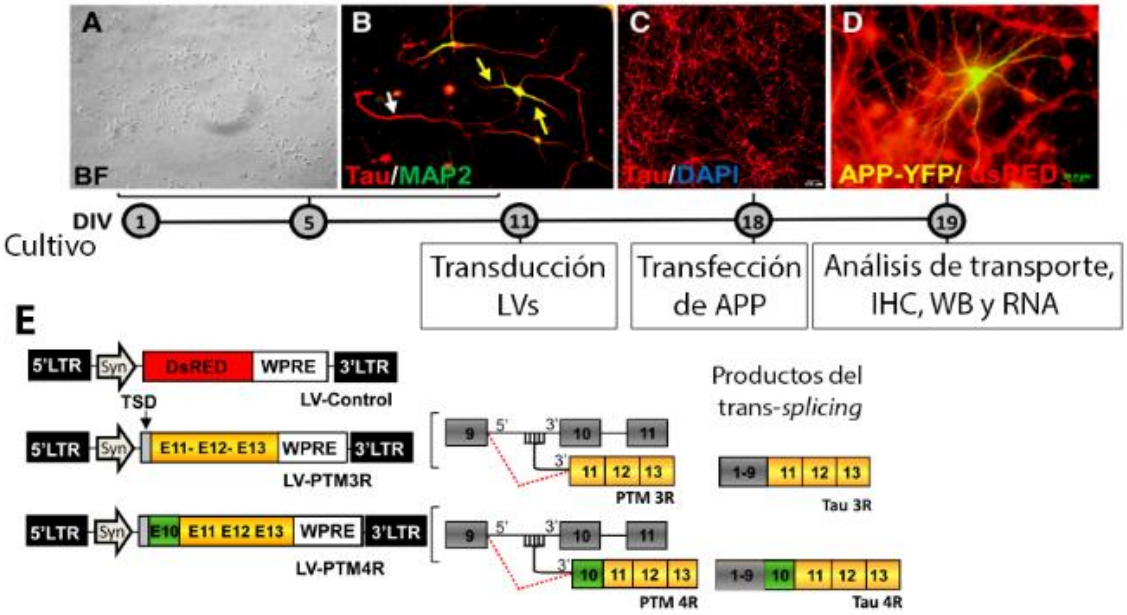

Figura 15: Caracterización de cultivos de neuronas humanas diferenciadas y mapa de los vectores lentivirales utilizados para los ensayos. A y B) cultivos neuronales humanos cinco días después de la siembra (DIV5) que muestran alto contenido de proyecciones y polarización en campo claro **(A)** y luego de la inmunofluorescencia con marcadores axonales y dendríticos (tau y MAP2) **(B)**. La flecha blanca indica el axón sin tinción MAP2 y las flechas amarillas muestran las dendritas. **C)** cultivos neuronales humanos enriquecidos en DIV18 que muestran neuronas densas y altamente polarizadas. **D)** Neuronas en DIV19 que muestran el marcado simultáneo de APP–YFP (verde) con transducción de LV-dsRED (rojo). **E)** Mapas de los LVs utilizados para la transducción neuronal en DIV11. LV-dsRED: vector de control que lleva el *cassette* reportero rojo; LV-PTM3R: LV que lleva la secuencia de codificación para la molécula de *pre-trans-splicing* con los exones 11–13; o LV-PTM4R: con los exones 10 –13. TSD: dominio de *trans-splicing* que consiste en un dominio de unión complementario al extremo 3´ del intrón 9, un punto de ramificación y un sitio aceptor de *splicing* 3´.

2- Validación de la herramienta de *trans-splicing* en neuronas humanas diferenciadas a nivel del ARNm y proteína

Para validar el sistema de *trans-splicing* en neuronas derivadas de células humanas, primero analizamos las isoformas tau 3R y 4R midiendo el contenido relativo del ARNm de tau con o sin el E10 (Figuras 16A y 16B). Las RT-PCR de punto final con *primers* que amplifican ambas isoformas simultáneamente a partir del ARN de las neuronas transducidas, mostraron un cambio cualitativo en el contenido relativo de las isoformas tau en cualquiera de las dos transducciones de 4R-PTM o 3R-PTM, en comparación con el control (Figura 16A). A continuación, realizamos un análisis cuantitativo, mediante RT-PCR en tiempo real utilizando *primers* específicos para detectar las isoformas tau 3R y 4R, con la finalidad de analizar los cambios en los contenidos relativos de ambas isoformas (Figura 16B). Las neuronas control en DIV19 mostraron una relación 4R/3R de 0,6 ± 0,07, lo que sugiere madurez neuronal evidenciada por la presencia de 4R tau, aunque el equilibrio de isoformas 3R: 4R aún no se habia alcanzado en esta etapa. Como se esperaba, la transducción con LVs que portaban PTM3R o PTM4R indujo un sesgo en la proporción 4R/3R endógena; es decir, las neuronas transducidas con LV-PTM3R mostraron una reducción neta de la relación tau 4R/3R a 0,34 ± 0,17 debido a un aumento relativo del 30% de isoformas tau 3R, aunque la reducción observada de isoformas tau 4R no resultó estadísticamente significativa. A la inversa, las neuronas transducidas con LV-PTM4R mostraron un aumento de 2 veces de isoformas tau 4R en comparación con las neuronas control, mientras se evidenció una reducción del 50% en isoformas tau 3R, lo que generó un aumento relativo de la relación 4R/3R igual a 3,9 ± 0,18 (Figura 16B).

Para evaluar si el cambio en el contenido relativo de las isoformas de tau observado a nivel del ARN se tradujo al contenido de proteínas, se detectó tau 3R y 4R separadamente mediante ensayos de *Western blot* con lisados de proteínas de los cultivos neuronales en DIV19 para cada LV transducido, utilizando anticuerpos específicos para cada una de las isoformas 3R o 4R (Figura 16C y 16D). Debido a posibles diferencias en las afinidades de los anticuerpos, consideramos incorrecto estimar la proporción de tau 4R/3R con precisión al nivel de la proteína, por lo que los cambios en cada isoforma tau se analizaron de forma independiente, comparando las neuronas transducidas con PTM-3R o PTM-4R con las neuronas bajo condiciones control, transducidas con PTM-dsRED. Las neuronas transducidas con LVPTM3R mostraron un aumento significativo en la cantidad de proteína tau 3R en comparación con la transducción con el LV control (Figura 16C). A la inversa, el contenido de proteína tau 4R aumentó significativamente, después de la transducción con PTM4R (Figura 16D) y disminuyó en las neuronas transducidas con PTM3R. En conjunto, estos resultados sugieren que la estrategia de *trans-splicing* fue eficiente para modular el contenido relativo de las isoformas tau en neuronas diferenciadas humanas tanto a nivel del ARN como a nivel de proteína.

Figura 16

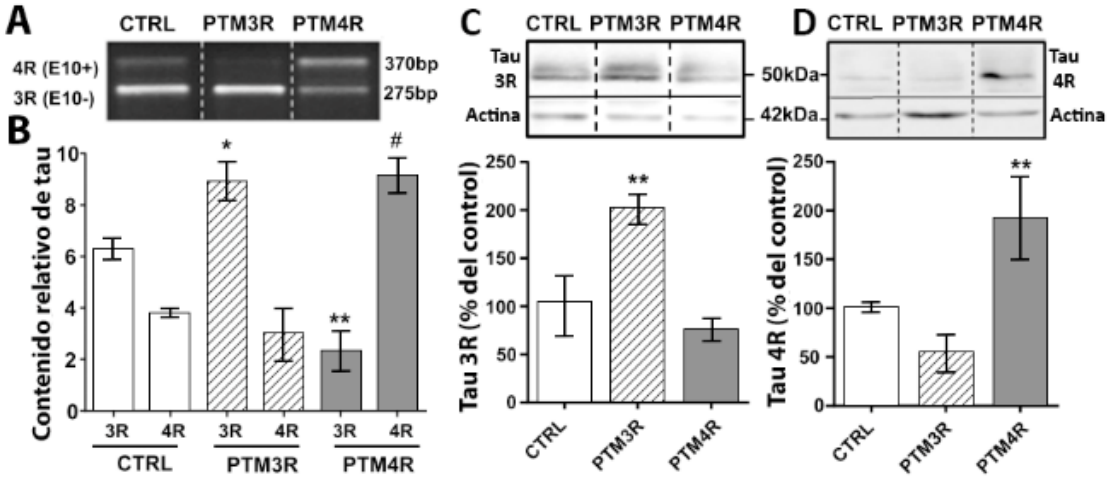

Figura 16: Modulación de isoformas tau 3R y 4R mediante *trans-splicing* en cultivo de neuronas humanas diferenciadas *in vitro* A) Gel de agarosa representativo de los productos de RT-PCR obtenidos con los *primers* que flanquean los exones tau 9–13 y amplifican simultáneamente las isoformas 3R y 4R de tau. Las RT-PCRs fueron realizadas con ARNm extraído de neuronas transducidas con cada LV. **B)** Contenido relativo de isoformas tau 3R y 4R determinado por PCR en tiempo real con *primers* específicos para cada isoforma, 3R (E10-) y 4R (E10+). El ΔCt se calculó en relación a la expresión del gen humano ApoB (media ± SEM; n=3) en tres experimentos independientes. Se realizó ANOVA de una via seguido del test de *Dunnett,* para cada isoforma en comparación con las neuronas control; * p≤0.05 y ** p≤0.001 contra 3R CTRL; # p≤0.001 contra 4R CTRL. **C y D)** Análisis de Western blot de homogenatos de neuronas humanas. Se muestra la detección de la proteína tau 3R (C) y 4R (D) con anticuerpos específicos para cada isoforma, normalizados a actina y cuantificados por densidad óptica; ** p≤0.001 (n=3); *ANOVA* de una via seguido del test de *Dunnett*.

3-Polarización neuronal normal en neuronas derivadas de células humanas con un desequilibrio de isoformas tau 3R:4R

A continuación, en el laboratorio del Dr. Tomás Falzone se analizó si los cambios en la proporción de isoformas tau afectan la supervivencia neuronal y / o la morfología celular. La estructura neuronal y la polarización en neuronas transducidas se analizaron mediante tinción de inmunofluorescencia en DIV19. La tinción de Tau y APP mostró un número similar de neuronas en los cultivos transducidos con LV-PTM3R y LV-PTM4R en comparación con los controles no transducidos (NTC), mostrando un grado similar de ramificación y

arborización (Figuras 17A y 17B). Además, las neuronas transducidas no mostraron evidencia de retracción axonal, hinchazón o acumulación de tau en sus proyecciones (Figura 17B). Estos resultados indican que ni la transducción con los LVs, ni los desbalances inducidos en la relación de isoformas tau alteran la supervivencia o la morfología de las neuronas humanas en cultivo.

Figura 17

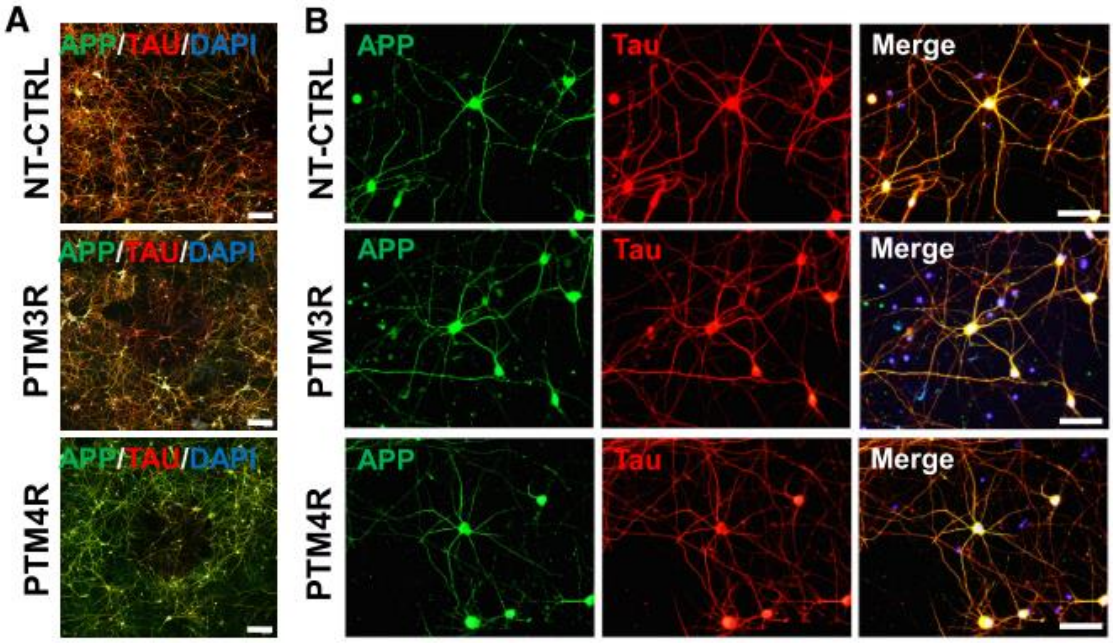

Figura 17. Polarización neuronal normal después de la modulación de las isoforma tau 3R y 4R. A) Imágenes confocales de cultivos neuronales enriquecidos en DIV19 sin transducción (NT-ctrl) o transducidos con LV-PTM3R o LV-PTM4R. La tinción de inmunofluorescencia muestra APP, tau y Hoechst para los núcleos. **B)** Imágenes confocales de gran aumento de las neuronas control y transducidas teñidas para APP y tau que muestran la polarización y la integridad de las extensiones (n=10). Imágenes cedidas gentilmente por el Dr. Tomas Falzone.

4- Alteración en el transporte axonal de APP luego de la inducción de desequilibrio de isoformas tau. Regulación diferencial anterógrada y retrógrada sobre el transporte axonal de APP por las isoformas tau.

Después de determinar que el contenido de isoformas tau 3R:4R se puede modular de manera eficiente mediante la herramienta de *trans-splicing* mediado por LVs, y que la generación del desbalance hacia una u otra isoforma tau no genera cambios en la morfología celular. A continuación, investigamos si el desequilibrio en las isoformas tau perturba el transporte axonal de APP. Para responder a esta pregunta, en el laboratorio del Dr. Tomás Falzone, se realizaron los análisis de las dinámicas de APP en DIV19 mediante grabaciones continuas de imágenes de alta definición para generar películas a partir de los axones identificados por morfología, como se describió anteriormente (Otero et al., 2014). Las neuronas se transdujeron en DIV11 con los LV-PTM3R, LV-PTM4R o control LV-dsRED y se transfectaron en DIV18 con el vector de expresión fluorescente hAPP695-YFP (pCDNA3-APP-YFP) para rastrear las vesículas fluorescentes de APP, como se indica en la línea de tiempo experimental en la Figura 15. La marcación simultanea de las señales de YFP y dsRED en los controles transducidos mostró que el 99% de las células transfectadas con APP-YFP también se transdujeron con el LV como se pudo ver en la Figura 15D. También se incluyó en el experimento un grupo de neuronas que no habían sido transducidas con LV (NTC) para descartar cualquier efecto sobre el transporte de APP debido a la transducción con los vectores lentivirales. Las películas se obtuvieron de los axones en su parte media (a al menos 200 µm de distancia del cuerpo celular o del extremo final) para generar gráficas de movimiento (en inglés: *kymograph*) detalladas de tiempo frente a distancia para los análisis

cualitativos y cuantitativos. Las neuronas humanas NTC revelaron una distribución uniforme de vesículas de APP en movimiento anterógrado y retrógrado. La proporción de vesículas de APP en movimiento anterógrado y retrógrado en condiciones NTC (Figura 18) fue consistente con los valores obtenidos para el transporte axonal en otros sistemas (T. L. Falzone et al., 2009; Stokin et al., 2005), sin embargo, la transducción con LV-PTM3R o LV-PTM4R afectó significativamente el transporte axonal de APP (Figura 18). Más específicamente, los niveles aumentados de la isoforma 3R (por transducción LV-PTM3R) llevaron a reducciones del movimiento de APP anterógrado y retrógrado de 30 a 50%, respectivamente, y aumentaron significativamente la proporción de vesículas estacionarias en un 30% (Figura 18B). Interesantemente, el desplazamiento del equilibrio hacia la sobreproducción de isoformas 4R (transducción LV-PTM4R) produjo una reducción similar del transporte anterógrado y retrógrado de APP al tiempo que aumenta la proporción estacionaria (Figura 18 A, B y C).

En conjunto, estos resultados demuestran que ocurren cambios significativos en el movimiento de las vesículas de APP cuando se modifica la proporción endógena de las isoformas tau 3R: 4R, lo que sugiere que el transporte axonal de APP está estrechamente regulado por la proporción de isoformas tau unidas a MT o solubles en el eje axonal.

Figura 18

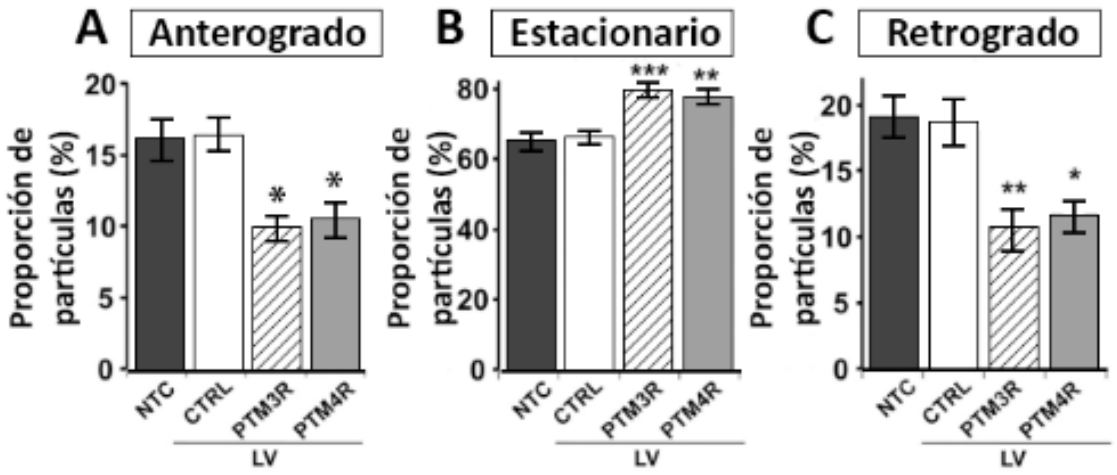

Figura 18. Deterioro del transporte axonal de vesículas de APP en neuronas diferenciadas bajo desbalance de isoformas tau 3R:4R. Proporción promedio de las vesículas de APP-YFP por grafica de movimiento anterógrada (A), estacionarias (B) y retrógradas (C) de células no transducidas (NTC) o transducidas con LV que llevan dsRED, PTM3R o PTM4R. ANOVA de una vía, seguida de la comparación de Dunnett's, *p≤0.05, **p≤0.02, ***p≤0.01. Gráficas de movimiento analizadas: n=59 NTCs, 78=dsRED-CTRL, 57=PTM3R, y 58=PTM4R.

1. Discusión general

En el curso de este trabajo, analizamos los efectos funcionales y patológicos subyacentes a los desbalances endógenos en el contenido relativo de isoformas de la proteína tau, con particular énfasis en la posibilidad de modular dichos contenidos mediante la estrategia de *trans*-splicing.

Nuestro trabajo consistió en dos abordajes experimentales complementarios, por un lado, el análisis *in vivo* en el modelo de taupatía htau, y por otro un estudio *in vitro* en neuronas humanas en cultivo. El estudio *in vivo* se centró en el análisis del desequilibrio de isoformas 3R:4R que presentan los ratones htau, con un aumento anormal de la isoforma 3R y del desarrollo de la patología de tau progresiva con la edad en este modelo; los resultados mostraron acumulación insoluble e hiperfosforilación de tau que progresa a una etapa más avanzada de la patología, caracterizada por la acumulación de tau hiperfosforilada, disminución de la función cognitiva y de la actividad electrofisiológica de las neuronas piramidales de la corteza prefrontal. Además, como resultado central de esta tesis comprobamos que la restauración del equilibrio de isoformas tau 3R:4R, de forma localizada en la corteza prefrontal (CPF) a edades tempranas, es suficiente para prevenir la patología tau y los fenotipos de disfunción cortical relacionados, en este modelo. Nuestros resultados sugieren además que la patología tau (desequilibrio de isoformas y aumento de hiperfosforilación de tau) podría iniciarse en las áreas olfativas del cerebro en estadios tempranos, previo al desarrollo de los déficits cognitivos, e hipotetizamos que a partir de allí la patología podría propagarse a través de las sinapsis a las áreas corticales más afectadas, aunque esto último es el gran interrogante que aún no ha sido demostrado.

Finalmente, los estudios efectuados en neuronas humanas en cultivo permitieron realizar un análisis detallado de los efectos funcionales del desbalance 3R:4R en el mecanismo de transporte axonal, aportando una nueva perspectiva para comprender los mecanismos moleculares subyacentes a las patologías asociadas al déficit en el *splicing* alternativo del E10 de tau.

Los resultados de ambos estudios aportan conclusiones complementarias para la comprensión de los mecanismos moleculares implicados en las taupatías con desbalance 3R:4R y permiten sentar las bases de potenciales abordajes terapéuticos futuros. En conjunto, los resultados obtenidos nos permitieron comprobar nuestra hipótesis de trabajo, confirmando que la restauración del balance de isoformas tau en etapas tempranas, antes del inicio de la patología tau, previene varios de los fenotipos patológicos observados en el modelo de estudio.

A continuación, se discutirán algunos aspectos generales y específicos, relativos a los modelos experimentales utilizados *in vivo* e *in vitro*, a los resultados obtenidos y a las potenciales perspectivas terapéuticas.

2. Modulación de isoformas 3R:4R *in vivo*: consecuencias funcionales y perspectivas terapéuticas

Durante las últimas dos décadas, desde que fuera reportada la mutación intrónica 10+16 afectando el *splicing* del E10 en un *pedigree* de pacientes con FTDP-17 (Hutton et al. 1998), ha sido ampliado el estudio de los déficits en el *splicing* del E10 del transcripto primario de *MAPT* que conducen a desbalances en los contenidos relativos de las isoformas

3R y 4R, los cuales se relacionaron con numerosas taupatías (Niblock & Gallo, 2012), incluidas la mayoría de las demencias. Recientemente también se han encontrado desbalances 3R:4R en pacientes de enfermedad de Huntington (Gratuze et al., 2016). Tal como se describió en la introducción, existen numerosas mutaciones en *cis* presentes en el transcripto *MAPT* asociadas a taupatías y su efecto sobre el *splicing* alternativo del E10 varía en función del tipo y localización de las mutaciones, según sean intrónicas o exónicas, y pueden generar distinto tipo y grado de desbalance en la relación 3R:4R (Arendt et al., 2016). Por otra parte se han reportado efectos de factores ambientales (como la hipotermia) y de algunos compuestos químicos que también interfieren con el correcto patrón de *splicing* alternativo del E10 (Whittington et al., 2015) (Planel et al., 2008). Es destacable el caso de la anonacina, un inhibidor lipofílico del complejo I mitocondrial, que induce a la patología tau tanto *in vitro* (Lannuzel et al., 2003), como *in vivo* (Yamada et al., 2014), produciendo un aumento de isoformas 4R de tau debido a un incremento del factor de splicing SRSF2, el cual es un mediador esencial para la inclusión del E10 de tau (Bruch, Xu, De Andrade, & Höglinger, 2014). En conjunto los estudios clínicos, genéticos y epidemiológicos sugieren la existencia de un cúmulo de factores genéticos y ambientales que pueden interferir con el correcto procesamiento post-transcripcional de tau.

En este escenario, la estrategia de reprogramación de ARN mediante *trans-splicing* utilizada en este trabajo, resulta una herramienta útil y versátil, ya que permite corregir de manera estable el desequilibrio de isoformas a nivel del transcripto primario, independientemente de cual sea la isoforma que se halle en exceso e independientemente de cual sea el origen del desequilibrio. Por lo cual la reprogramación del ARN por *trans-*

splicing resultaría una terapia génica plausible para las taupatías en las cuales la etiología subyacente sea el desbalance 3R:4R tanto por factores genéticos como epigenéticos o ambientales. La intervención a nivel de ARN sugiere múltiples ventajas, la primera de ellas es que permite la incorporación o exclusión de un determinado exón de manera independiente a la o las mutaciones presentes en la secuencia, de esta forma podemos corregir más de una mutación presente al mismo tiempo, ya que el desarrollo de un vector terapéutico específico para cada una de las mutaciones puede ser difícilmente factible desde una perspectiva experimental. Por otra parte, no se altera el control transcripcional, ya que el transcripto primario es producido a partir del gen endógeno y además, el mecanismo de *trans-splicing* utiliza los componentes de la maquinaria celular endógena para llevar a cabo el *splicing*.

Por otra parte, hemos demostrado en este estudio que el ARN quimérico generado se traduce a una proteína completa y funcional, y que no se alteran los niveles endógenos de proteína tau, lo cual indica que el efecto fenotípico observado se debería exclusivamente a la modulación del equilibrio 3R:4R. En los últimos años, varios trabajos han reportado el uso del *trans-splicing* como estrategia terapéutica en diferentes modelos preclínicos, por ejemplo, para la enfermedad de Huntington, se desarrollaron PTMs expresados con vectores virales con el fin de reemplazar a nivel del transcripto primario de huntingtina las expansiones de CAG que conducen a la patología (*HTT*). La estrategia fue optimizada tanto en ratones (Rindt, Tom, Lorson, & Mattis, 2017) como en neuronas derivadas de iPSC de pacientes, aunque la eficiencia ha sido leve y aún queda por determinar el potencial efecto terapéutico. También ha sido reportada la aplicación de

trans-splicing para corregir defectos en el gen *CEP90* responsable de distintas enfermedades oculares (Dooley et al., 2018), y se ha reportado el *trans-splicing* como metodología para interrumpir un gen diana asociado a la epidermolisis ampollosa distrófica recesiva (RDEB), una enfermedad hereditaria del epitelio que conlleva a la susceptibilidad de desarrollar carcinoma de células escamosas (SCC) altamente agresivo (Gruber et al., 2011). En todos los casos se ha logrado una reprogramación exitosa del ARNm, indicando que esta estrategia podría tener una aplicación clínica en el mediano plazo.

Modelos animales de taupatía: estudio en el modelo experimental htau

Aunque los déficits en el *splicing* del E10 del gen *MAPT* se han observado hasta el momento exclusivamente en humanos (Medina et al., 2016), para poder analizar los mecanismos moleculares subyacentes y las potenciales estrategias terapéuticas se requiere de modelos animales adecuados. Desafortunadamente, la mayoría de los modelos de patología tau en ratones transgénicos consisten en la sobreexpresión de un tipo de isoforma tau normal o mutada (https://www.alzforum.org/research-models), generalmente a partir de transgenes basados en ADNc sin la presencia de intrones. Se ha demostrado que varios de estos modelos recapitulan elementos claves de las taupatías, como la hiperfosforilación de tau, la formación de agregados neurofibrilares, pérdida neuronal y diversos fenómenos de comportamiento (alteraciones cognitivas de corto y largo plazo, ansiedad, entre otros) , por lo tanto, estos modelos presentan validez para investigar varios aspectos de las taupatías y posibles intervenciones terapéuticas (Götz & Ittner, 2008) (Noble et al., 2010). Sin embargo, la falta de intrónes en el transgén anula la posibilidad de análisis de las

consecuencias funcionales debidas al *splicing* del E10. Por lo tanto, el uso de modelos de ratón para analizar el desequilibrio de las isoformas tau es desafiante, ya que además 4R es la única isoforma normal presente en el cerebro de ratones WT adultos sin generar patología tau. Unos pocos modelos de ratón expresan un gen *MAPT* humano completo (Duff et al., 2012) (Cathy Andorfer et al., 2003)(Dawson et al., 2007) (Wobst et al., 2017), sobre el cual es posible modular la regulación del *splicing* del E10 de tau. Para este estudio, elegimos el modelo de ratón hTau que porta un cromosoma artificial (PAC) conteniendo el transgén *MAPT* humano normal. A pesar de no tener mutaciones, el procesamiento post-transcripcional de este transgén favorece la exclusión del E10 y produce un exceso de isoformas 3R en el cerebro del ratón adulto. Esto podría deberse a la falta de regulación específica de elementos de *splicing* en las neuronas del ratón (o a una combinación diferente de factores de *splicing* en el entorno del ratón), lo que impide el correcto procesamiento del transcripto de *MAPT* humano proveniente del transgén. De tal manera, tanto en comparación con el cerebro adulto humano que produce ambas isoformas en una relación equimolar o con el cerebro adulto de los ratones WT, que solo expresan isoformas 4R de tau murina, el cerebro del modelo htau tiene un contenido aberrante de isoformas tau humanas que se correlaciona con la patología de taupatías (Andorfer et al., 2003). Por otra parte, aunque los ratones htau, al ser transgénicos expresan aproximadamente 2,5 veces más proteína tau total que los ratones del tipo salvaje, los fenotipos patológicos asociados a este modelo no es probable que se deban a la sobreexpresión de tau, ya que el mismo transgén en un fondo WT no recapitula los fenotipos patológicos típicos de las taupatías (Duff et al., 2000), lo que sugiere que la isoforma 4R murina endógena de tau

puede equilibrar el exceso de isoformas 3R tau humana. Estas características y el hecho de que el curso temporal del desarrollo de los fenotipos patológicos sea progresivo con la edad, hacen que el modelo htau sea particularmente apropiado para probar estrategias *in vivo* que modulan el *splicing* del E10 y evaluar las consecuencias fenotípicas de tal modulación.

Por otra parte, los ratones htau desarrollan una patología tau del cerebro anterior exclusivamente, sin afectar el tronco cerebral ni la médula espinal. Por lo tanto, estos ratones exhiben un fenotipo de comportamiento general normal sin déficit motor grueso y capacidades locomotoras similares en comparación con los controles de la misma edad (Polydoro et al., 2009). Según los reportes de otros grupos en los que realizaron análisis anatómicos exhaustivos en este modelo, sabemos que la distribución de la patología tau en los ratones htau incluye regiones cerebrales subcorticales, como el tabique medial y el núcleo de la banda diagonal, que suministran inervación colinérgica al hipocampo y al neocórtex, y son susceptibles de atrofia extensa y muerte celular en cerebros con EA (Rasool et al., 1985; Saper et al., 1985; Tagliavini & Pilleri, 1983; Whitehouse et al., 1982). Por lo tanto, la ausencia de déficits sensoriomotores, junto con la distribución cortical regional de la patología tau que coincide bien con la observada en pacientes con EA, hace que el ratón htau sea un buen modelo para estudiar las consecuencias funcionales de la patología tau.

El análisis neuroquímico y funcional que se hizo en el curso de este estudio mostró hiperfosforilación patológica en los ratones adultos htau, principalmente en las áreas corticales (corteza prefrontal y corteza motora), lo que correlaciona con los déficits cognitivos en la memoria de trabajo a corto plazo observados en los mismos animales. Si bien se han reportado con anterioridad déficits cognitivos dependientes del área

hipocampal en este mismo modelo (Polydoro et al., 2009), en nuestras condiciones experimentales los ratones htau adultos seniles (12-18 meses) no mostraron fenotipos funcionales asociados a fallas en el hipocampo, acorde a lo encontrado en la prueba del laberinto de agua de Morris en el cual los animales htau viejos exhibieron una *performance* similar al grupo WT. Además, si bien se detectó marcado positivo para tau patológica hiperfosforilada (AT180+), no se observó el incremento significativo de este marcador acorde al aumento de la edad de los animales. Es posible que el fondo C57BL6 de nuestros animales transgénicos htau se haya desviado genéticamente de la línea original de Duff y col., una explicación que puede aclarar los fenotipos de ratones que varían entre los laboratorios.

Los análisis funcionales de los ratones htau adultos (10-12 meses) revelaron fenotipos de comportamiento comparables a los desarrollados en las taupatías humanas. Encontramos grave deterioro en la memoria a corto plazo, según lo evaluado por el paradigma del reconocimiento del objeto novedoso, consistentemente con los reportes previos (Polydoro et al., 2009). Además, los ratones htau mostraron un fenotipo de hiperactividad y ansiedad en un entorno de campo abierto y según lo evaluado en el ensayo de enterramiento de bolitas; y por otra parte, el aumento en las entradas y permanencia en los brazos abiertos de un laberinto en cruz elevado en comparación al grupo de ratones WT, sugiere también un fenotipo de desinhibición comportamental, el cual ya ha sido descrito en otros modelos de ratón de taupatía (Schindowski et al., 2006). Este fenotipo podría ser el resultado del deterioro cortical potencialmente relacionado en los fenotipos de desinhibición observados, por ejemplo, en pacientes FTDP-17. Por otra parte, en este

estudio realizamos por primera vez la caracterización de la actividad electrofisiológica de las neuronas piramidales excitatorias de la corteza prefrontal en el modelo htau, lo cual reveló que la actividad neuronal normal se halla afectada en los ratones htau de 12 meses de edad, mostrando una disminución significativa en el promedio de disparos en comparación con los controles WT de la misma edad. Este fenotipo resulta consistente con los reportes recientes que sugieren una vulnerabilidad particular de las neuronas excitatorias glutamatérgicas a la patología tau (Fu, Hardy, & Duff, 2018).

Es particularmente destacable que en nuestro análisis hemos demostrado que al aumentar la inclusión del E10 mediante *trans-splicing* en los ratones htau jóvenes (2-3 meses), alcanzamos una relación equilibrada de 3R/4R en la CPF de ratones htau-PTM4R, cercana a 1, que previene los fenotipos patológicos observados bajo exceso de isoformas 3R en el grupo de ratones htau-control. Este equilibrio localizado resultó suficiente para prevenir los déficits cognitivos, disminuir las cantidades relativas de tau hiperfosforilada e insoluble y normalizar la actividad electrofisiológica de las neuronas piramidales particularmente en la corteza prefrontal. Cabe destacar que esta estrategia de *trans-splicing* reduce la patología tau sin cambios en la cantidad total de proteína tau comparada con el control htau y con el raton hTau sin inyectar, por lo cual también demostramos que la inyección de vectores lentivirales no induce cambios en la producción de isoformas tau. De hecho, en nuestras condiciones, el aumento de la isoforma 4R por medio de la herramienta de *trans-splicing* no indujo a la patología tau; en cambio, se observó un rescate consistente en análisis histológicos, funcionales y de comportamiento en el grupo de ratones htau con equilibrio de isoformas. Aunque no está claro por qué el simple hecho de

desbalancear la proporción de isoformas tau normales debería ser tan perjudicial para las células neuronales, los ratones htau proporcionan un sistema modelo adecuado en el que explorar más este problema. Nuestros resultados actuales, sugieren que el desequilibrio 3R/4R a largo plazo podría subyacer a la patología tau, particularmente a la disfunción prefrontal, en ratones htau envejecidos. Otros modelos de taupatía más recientes, que también expresan el gen *MAPT* completo con sus regiones promotoras e intrónicas, como el ratón N51 (MAPT-N296H) (Wobst et al., 2017) refuerzan la hipótesis del desequilibrio de isoformas tau como condición subyacente de la patología tau a edades tempranas, pero en este caso expresando la sobreproducción de isoformas 4R tau humana, con disminución significativa dependiente de la edad en la actividad locomotora, aumento de tau hiperfosforilada en los animales adultos y aumento de la conducta de hiperactividad. Por lo tanto, independientemente de la isoforma tau predominante (3R o 4R) o del origen del desequilibrio, la proporción de isoformas tau alterada es una condición patológica de varias taupatías que precede al deterioro neurodegenerativo, ya sea por una ganancia de función toxica a partir de los agregados neurofibrilares que se forman de la isoforma en exceso o bien debido a una pérdida de función fisiológica normal de la proteína, o a una combinación de ambas condiciones. En consiguiente, revertir a edades tempranas tal desequilibro patológico podría significar una estrategia terapéutica plausible para el tratamiento de las taupatías con desequilibrio de isoformas.

Sin embargo, es importante destacar que esta estrategia no apuntaría a revertir los fenotipos patológicos desarrollados, sino a detener la progresión de la

neurodegeneración mediada por los desbalances de tau. En este escenario, una potencial aplicación terapéutica preventiva requiere determinar algunos fenotipos asociados, que permitan establecer un estadio temprano de la patología y predecir el pronóstico clínico previamente al desarrollo de déficits cognitivos. Si bien existen actualmente diversos análisis de imágenes y biomarcadores capaces de establecer el inicio de una demencia por ejemplo, a través de imagen de resonancia magnética (MRI) o mediante tomografía de emisión de positrones (PET) cerebral (Russo et al., 2016; Schöll et al., 2018), generalmente al ser examinados por estos análisis, ya existe en los pacientes cierto déficit cognitivo, y además hasta la actualidad se continúan investigando cómo los diferentes biomarcadores y ligandos de tau pueden operarse de manera óptima. Por lo tanto, la posibilidad de detección no invasiva de signos clínicos indicadores de alguna pérdida de funcionalidad neuronal precoz que pudiera estar afectada previamente a las áreas cognitivas, permitiría incrementar el diagnóstico temprano. Este es el caso de muchos pacientes que desarrollan déficits olfativos de forma muy precoz, como los detectados en pacientes con EA, los cuales pueden preceder por varios años a los síntomas de déficit cognitivo (Devanand et al., 2000). Desde una aproximación de investigación básica translacional, en nuestro laboratorio nos proponemos como desafío analizar la presencia de algunos de fenotipos precoces en el modelo htau. En este contexto se enmarcó el estudio preliminar realizado en esta tesis a fin de analizar el potencial desbalance de isoformas tau 3R:4R y la presencia de formas patológicas de tau en el bulbo olfatorio de los ratones htau jóvenes y adultos. Los resultados, aunque aún preliminares, indican la presencia de un exceso de isoformas 3R e hiperfosforilación de tau a partir de los 3 meses de edad, previo a la acumulación patológica

en zonas corticales que se inicia a los 6 meses de edad. Por lo cual, hipotetizamos que el inicio de la patología podría generarse en estructuras olfativas y a partir de aquí las especies tóxicas de tau podrían propagarse de forma tipo priónica a otras áreas del cerebro, con las cuales las estructuras olfativas interaccionan (Goedert et al., 2014; Goedert & Spillantini, 2017). Este mecanismo de acumulación y propagación de formas tóxicas de tau podría interferir en los procesos de neurogénesis que ocurren en el bulbo olfatorio (BO), ya que la producción constante de neuronas en el BO contribuye de manera significativa a la plasticidad funcional (Lepousez et al., 2015). Esta idea se basa en reportes previos en el ratón hTau en que se observara un descenso temprano de la neurogénesis en el hipocampo (Komuro et al., 2015). En base a este trabajo nuestro objetivo fue analizar si el desbalance e hiperfosforilación de tau en el BO podría conducir a un fenotipo similar al observado por Komuro y col. en el hipocampo; sin embargo, los resultados obtenidos no indican que exista un efecto sobre la neurogénesis a nivel del del BO, ya que solo se observó una disminución de la neurogénesis en los ratones htau y WT adultos, a los 12 meses, resultado que puede deberse a la edad avanzada de los animales más que a la presencia de un fenotipo patológico. Por otro lado, podría ocurrir que el proceso de neurogénesis no estuviera afectado, y sí presentarse un cambio en la sobrevida neuronal de esta estructura. Sin embargo, estos resultados no son suficientes para establecer con esta hipótesis.

En experimentos futuros, se plantea, investigar más en detalle los mecanismos moleculares subyacentes a los potenciales déficits olfativos tempranos en este modelo.

3. Cambios en el transporte axonal *in vitro* mediado por el desbalance 3R:4R

Los estudios *in vitro* del rol funcional del desbalance de tau que planteamos en este trabajo apuntaron a comprender en mayor detalle el papel fisiopatológico la proteína tau en las taupatías. Una gran cantidad de datos sugiere que la formación de agregados de tau es un evento crítico en el mecanismo patológico de las taupatías; además de esta "ganancia de función tóxica" de las especies patológicas de tau (Arriagada, Growdon, Hedley-Whyte, & Hyman, 1992), evidencia creciente sugiere que una pérdida de la función normal de tau en el axón y la sinapsis, desempeña un papel importante en el mecanismo patológico de tau en la EA (Ballatore et al., 2007; Trojanowski et al., 2005). Para elucidar el efecto de la pérdida de la función normal de tau en el axón, decidimos utilizar un sistema *in vitro,* en un paradigma experimental en el cual se indujo desbalance 3R:4R en neuronas diferenciadas en cultivo, en el cual no ocurre la acumulación de tau hiperfosforilada ni efectos de neurodegeneración. Esto nos permitió analizar el efecto de los desbalances de tau en el proceso de transporte axonal, sin afectarse la sobrevida ni la morfología neuronal.

Existen numerosas evidencias que indican la ocurrencia de defectos del transporte axonal que subyacen a varias taupatías humanas (De Vos et al., 2008; Goldstein LS 2012, 2012; Stokin et al., 2005); estos defectos podrían deberse a varios mecanismos como el deterioro axonal, fallas en el funcionamiento de los motores moleculares, en los cargos e incluso en las mitocondrias (que suministran la energía o ATP para que el mecanismo de transporte se lleve a cabo). Sin embargo, no está muy claro si las deficiencias representan un efecto causante temprano de la neurodegeneración, o se trata de una consecuencia tardía en la enfermedad (Bodea et al. 2016; Goldstein et al., 2012; Götz et al., 2006).

Discusión

En base a lo anterior, en este trabajo postulamos la hipótesis en la cual asumimos que el desbalance 3R:4R tiene un efecto directo sobre la funcionalidad neuronal, específicamente sobre el transporte axonal, que es independiente de la formación de agregados de tau y de la muerte neuronal. El análisis *in vitro*, obtenido en neuronas humanas diferenciadas por un lado, destacó la viabilidad de la estrategia de *trans-splicing* para modular el contenido de isoformas tau 3R y 4R, y mediante éste mecanismo, mostramos que efectivamente los cambios en las proporciones de isoformas tau 3R: 4R, ya sea hacia un exceso de 3R o de 4R, son suficientes para alterar el transporte normal de vesículas de APP de manera significativa en las neuronas humanas. Tal como se mencionó, los déficits en el transporte axonal no se relacionaron con cambios morfológicos en las estructuras axonales y de hecho las células exhibieron estructuras altamente polarizadas con proyecciones axonales definidas (Lacovich et al., 2017), por lo cual estos resultados no indicarían que el déficit de transporte se deba a algún tipo de alteración o falla estructural en los axones; sin embargo, podrían indicar que tales déficits se deban a una pérdida de función normal de tau debida al desbalance de isoformas 3R y 4R, en una etapa temprana del análisis, que luego podría generar paulatinamente la deslocalización de tau, desde su ubicación axonal normal hacia el compartimento somatodendrítico, en una etapa posterior (Ittner and Götz 2011), donde luego esas formas patológicas de tau podrían agregarse incrementando la vulnerabilidad celular a los efectos tóxicos de los agregados neurofibrilares.

Nuestros resultados son consistentes con trabajos previos en los que se han reportado defectos de transporte axonal bajo sobreexpresión de isoformas tau 3R o 4R en

cultivos diferenciados de neuronas, mediadas por fallas en el transporte mitocondrial y condiciones de estrés oxidativo (Mertens et al., 2013). Además, hay evidencia que apoya que los cambios en el contenido relativo de 3R y 4R tau alteran el ensamblaje de MT y podrían afectar el desarrollo adecuado de la polaridad neuronal (Panda et al., 2003).

Asimismo, se sabe que el transporte de APP y su mala localización subcelular, tienen implicancias en la EA, y la proteína tau al funcionar como estabilizador de los microtúbulos desempeña un papel crucial en el control del tráfico de APP (Goldsbury et al., 2007; Stamer, Vogel, Thies, Mandelkow, & Mandelkow, 2002). Por lo tanto, nuestros resultados abren nuevas perspectivas para comprender cómo las isoformas tau podrían afectar no solo la dinámica, sino también el metabolismo de la APP, que está íntimamente vinculado a su transporte intracelular (Goldstein, 2012).

4. Conclusiones y perspectivas

Los resultados obtenidos en los abordajes experimentales realizados en esta tesis refuerzan las evidencias que sustentan que el desbalance de isoformas tau en el cerebro adulto desencadena el desarrollo de déficits cognitivos y funcionales. El uso de la estrategia de *trans*-splicing empleada en este estudio, nos permitió corroborar nuestra hipótesis, según la cual la corrección del desequilibrio de isoformas tau previene de manera eficaz el desarrollo de los fenotipos patológicos típicos de las taupatías.

Finalmente, continúa siendo un gran desafío para nuestro laboratorio detectar aquellos fenotipos tempranos indicadores de la patología tau, que permitan identificar los núcleos cerebrales y la ventana temporal óptima para realizar intervenciones terapéuticas

basadas en la modulación del metabolismo de tau, con el fin de evitar el inicio y/o la propagación de la patología.

Dra. María Elena Avale
Directora

Sonia Lorena Espindola
Doctorando

1. Vectores Lentivirales

El vector lentiviral (LV) para la entrega e integración de la molécula de PTM para inducir *trans-splicing* ha sido previamente generado y validado (Avale et al., 2013; Lacovich et al., 2016). Brevemente, la molécula de PTM4R contiene el dominio de *trans-splicing* (125 nt) complementario al extremo 3 'del intrón 9 de tau, un punto de ramificación y el sitio fuerte aceptor de *splicing* 3'AG. La secuencia de codificación de la PTM-4R consiste en los exones tau 10 al 13 bajo el control del promotor neuronal de la sinapsina 1 humana, precedida por una secuencia de integración y la secuencia de codificación de la PTM-3R (utilizado para los ensayos de transporte axonal en células humanas) es igual al anterior con la excepción de poseer los exones tau del 11 al 13, de esta manera queda excluido el E10. Se incluyó una secuencia WPRE en el extremo 3 '. El vector de control (LV-PTM4R-ΔTSD) porta la misma PTM pero carece del dominio de *trans-splicing* complementario al intrón 9, de manera que la reacción de *trans-splicing* no pueda ocurrir. Las partículas lentivirales se generaron como se describió previamente (Avale et al., 2013). Brevemente, las células HEK-293T se cultivaron en DMEM, suplementado con suero bovino fetal al 10% (v/v) (Natocor, Argentina), L-glutamina 0,5 mM, penicilina 100 U / ml y estreptomicina 100 µg / ml. Las células con una confluencia del 80-85% se co-transfectaron con un vector de integración lentiviral (TauPTM4R, TauPTM3R, TauPTM4R ΔTSD o GFP) junto con vectores auxiliares que codifican las proteínas de empaquetamiento y envoltura (CMVΔ8.9 y CMV-VSVg, respectivamente). Las partículas virales se recogieron del medio de cultivo 36 horas después de la transfección, se trataron con ADNasa I libre de ARNasa (Invitrogen), se filtraron y concentraron mediante ultracentrifugación a 100.000 x g (rotor Ti 90, Beckman).

Finalmente se almacenaron alícuotas de 10 ul de partículas virales a -80 ° C.

2. Modelo animal

Todos los procedimientos con animales se diseñaron de acuerdo con las pautas del NIH para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Los protocolos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, e INGEBI-CONICET. Los ratones se alojaron en condiciones estándares en un ciclo de luz/oscuridad de 12 hs con acceso *ad libitum* a alimentos y agua. Los ratones transgénicos htau, en un fondo C57BL / 6, se obtuvieron del Laboratorio Jackson (Bar Harbor, Maine, EE.UU .; B6.Cg-Mapttm1 (EGFP) Klt Tg (MAPT) 8cPdav / J. Número de inventario: 005491). Para confirmar la presencia del transgén MAPT humano y el fondo nulo de Mapt de ratón, todos los ratones usados en este estudio se genotipificaron mediante PCR como se describió previamente (Andorfer et al, 2003, Avale 2013). Los cebadores utilizados para detectar el gen MAPT humano fueron (forward: 5'-ACTTTGAACCAGGATGGCTGAGCCC - 3 ' y reverso: 5'-CTGTGCATGG CTGTCCCTACCTT- 3'), el gen Mapt de ratón (forward: 5'-CTCAGCATC CCACCTGTAAC-3' y reverso: 5'-CCAGTTGTGTATGTCCACCC-3'), y para el gen Mapt interrumpido (forward: 5'-CAGGCTTTGAACCAGTATGG-3' y reverso: 5'-TGAACTTGTGGC CGTTTACG-3').

3. Inyección estereotáxica

Los ratones machos 10-12 semanas de edad (peso 18-20g) fueron anestesiados con ketamina (80-100 mg/kg; Ketaset, i.p.) y xylazina 2% (10 mg/kg; Alfasan, i.p.) y colocados en el marco estereotáxico (Stoelting CO.). La incisión se realizó a través de la línea media para

exponer el cráneo. Se identificó el bregma y se procedió a realizar el orificio en el sitio correspondiente según las coordenadas. Mediante la jeringa de 10.0 µl Hamilton acoplada a una aguja de 36G se inyectó 2 µl de suspensión lentiviral (0.6 $\times 10^7$ TU) en ambos hemisferios dentro de la corteza prelimbica en las siguientes coordenadas medidas desde el bregma (Paxinos and Franklin 2001); antero-posterior: +2.5 mm, lateral: ± 0.5 mm, dorso-ventral: -2.5 mm y -1.5 mm. La velocidad de inyección fue de 0.2 µl/min. Durante la cirugía y la posterior recuperación, los animales fueron mantenidos en condiciones de temperatura constante (30ºC – 37ºC). Inmediatamente luego de la cirugía y al siguiente día, todos los animales recibieron analgésico Aplonal (1mg/kg, s.c.).

Entre seis y ocho meses después de la inyección estereotáxica se llevaron a cabo estudios de comportamiento y análisis neuroquímicos como se indica a continuación. Para los ensayos moleculares y bioquímicos, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y el área inyectada se disecó, se congelaron rápidamente y almacenaron a -80 °C hasta la extracción de ARN o proteína. Para análisis inmunohistoquímicos, los ratones se perfundieron transcardiacamente, se fijaron en paraformaldehído al 4% O.N, se incubaron en tampón crioprotector (sacarosa al 30%) y se congelaron a -20 ° C, para finalmente proceder al corte por micrótomo de congelación (Leica) de todo el cerebro (40 um).

4. Inyección de BrdU

Para el análisis de la proliferación celular en las estructuras olfativas se procedió a la inyección de bromodesoxiuridina (5-bromo-2'-desoxiuridina, BrdU – Sigma Aldrich), el cual es un análogo sintético del nucleósido timidina y se usa para identificar células

proliferantes. La BrdU fue inyectada intraperitonealmente a 100 mg/kg (150 µl, ip.) Se efecturaon 6 inyecciones en total para cada animal con un intervalo de 2 horas entre cada una, y 2 semanas más tarde se procedió al sacrificio de los animales por perfusión transcardíaca y posterior fijación (PFA 4% - Sigma Aldrich).

5. Microdisección por captura con láser

Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, los cerebros fueron disecados y congelados instantáneamente en isopentano enfriado. Los bloques congelados se cortaron en un criostato (Thermo Scientific, Sandom Cryotome E) en secciones de 30 µm. Todas las secciones, incluida la PFC, se montaron en portaobjetos de membrana PEN (Thermo Fisher Scientific) y se deshidrataron con EtOH 75% durante 45 s, 95% durante 45 s, 100% durante 1 minuto y finalmente con xileno durante 10 minutos. La región fluorescente se cortó de una serie de 8-10 secciones utilizando el sistema de microdisección por captura de láser ArcturusXT (Thermo Fisher Scientific), como se describió previamente (Rossi et al 2012). Brevemente, se usó energía láser infrarroja (IR) combinada con láser de corte ultravioleta (UV) para la circunscripción de áreas positivas para GFP. A continuación, se colocó una tapa de microdisección de captura de láser CapSure de alta sensibilidad (HS) (Applied Biosystems) que contenía una película termoplástica sobre el área objetivo que se recogió por adhesión del láser IR al tapón. Se aisló el ARN total del tejido recogido (0,5-1 mm3) adherido al capuchón, usando un sistema de extracción de ARN (Arcturus Picopure, Thermo Fisher Scientific). El rendimiento promedio fue de 0.5 -1 µg de ARN por muestra.

6. Cultivo celular y diferenciación neuronal

Los experimentos que involucraron diferenciación de células humanas fueron realizados por el grupo del Dr. Tomas Falzone en el Laboratorio de Transporte Axonal y Enfermedades Neurodegenerativas del IBCN – Facultad de Medicina – UBA -, en el marco de una colaboración. Las neuronas se derivaron de hESCs (por sus siglas en inglés: *human embrionic stem cells*). Brevemente, los fibroblastos embrionarios murinos irradiados se colocaron en placas de *Petri* recubiertas con gelatina, 24 horas antes del recubrimiento con hESCs y se mantuvieron en DMEM completo (DMEM alto en glucosa, FBS al 10%, Glutamax al 1%, estreptomicina-penicilina al 1%). Las hESCs se cultivaron a 37 ° C, 95% de humedad y 5% de CO2 en medio de hESC (KO DMEM, 20% de reemplazo de suero KO, 1% de Glutamax, 1% de aminoácidos no esenciales, 0,1% de beta-mercaptoetanol, 4 ng / ml bFGF) para permitir la formación de colonias. Cuando las colonias alcanzaron un tamaño óptimo, fueron transferidas a una placa de *Petri* y luego de 12 a 18 horas, a botellas de 25 cm^2 para su cultivo en suspensión, y de ésta manera permitir la formación de cuerpos embrioides, que fue inducida por el medio de inducción neural (NIM; DMEM / F12, 1% de suplemento de N2, 1% de aminoácidos no esenciales, 280 UI / ml de heparina y 1% de penicilina-estreptomicina). Los cuerpos embrioides se transfirieron luego a placas de seis pocillos recubiertas con laminina para la formación de rosetas neuronales. Después de 7 a 14 días de crecimiento, las rosetas neurales se recogieron, se transfirieron a botellas de 25 cm^2 y se mantuvieron en medio NIM completo (suplemento de B27 al 2%, ácido ascórbico) hasta 1 mes, cambiando el medio de crecimiento cada 2 días. Luego se seleccionaron las rosetas neuronales y disociaron durante 5 minutos con un tratamiento de accutasa y tripsina. La

reacción se bloqueó con un inhibidor de tripsina y la suspensión se centrifugó durante 5 minutos a 1000 rpm. El sedimento se lavó con DMEM / F12 y finalmente se resuspendió en medios de diferenciación neural (NDM; Neurobasal, suplemento de N2 al 1%, suplemento de B27 al 2% y penicilina-estreptomicina al 1%). Las células se sembraron en placas de poli-ornitina y cubreobjetos recubiertos con laminina en placas de 24 pocillos y se mantuvieron en 500 µl de medio completo NDM (laminina, cAMP, ácido ascórbico, BDNF, GDNF).

7. Cultivo, transducción y transfección neuronal

Las neuronas ya diferenciadas se mantuvieron en cultivo, cambiando 3/4 del medio cada 7 días. En el día 11 *in vitro* (DIV11), las neuronas fueron transducidas con los vectores control (dsRED), PTM-4R (Rodriguez-Martin et al., 2005), o PTM-3R (anteriormente PTM9) (Rodriguez-Martin et al. al., 2009). Luego, se agregó 5 µl de cada LV concentrado (~10^7 TU / ml) en 200 µl de medio por pocillo que contiene 150.000 neuronas para lograr una multiplicidad de infección entre 5 y 10, como se informó anteriormente (Avale et al., 2013). Después de 12 horas, se completó con medio NDMc nuevo cada pocillo, hasta un volumen final de 500 µl. Siete días después de la transducción de LV (en DIV18), las neuronas se transfectaron con 1 µl con pcDNA3-APP-YFP (Falzone et al., 2009) en una mezcla de transfección de OptiMEM y Lipofectamina 2000. Dos horas después de la transfección, se reemplazó el medio de cultivo y, 24 horas más tarde (en DIV19) con una parte de las células, se procedió en el laboratorio del Dr. Tomás Falzone al análisis de imágenes para estudiar el transporte axonal, y al mismo tiempo con la otra parte de las células, se procedió a la fijación

y procesamiento para obtener ARN y proteínas para análisis de qPCR y Western blot, los cuales fueron llevados a cabo en nuestro laboratorio.

8. Detección de ARNm de isoformas de tau

Se extrajo el ARN total de los cerebros de ratón usando el kit de tejido lipídico RNeasy (Qiagen), en el caso de tejido diseccionado con LCM, con el *kit* de extracción de ARN PicoPure (Thermo Fisher Scientific) o en el caso de las neuronas en cultivo a DIV19 con otro *kit* de extracción de ARN, el AllPrep DNA/RNA mini kit (Qiagen). En todos los casos se procedió a la cuantificación del ARN usando un Nenodrop. La transcripción inversa se realizó con el *kit* TaqMan RT (Applied Biosystems). Cada reacción contenía 0,5 µg de ARN en un volumen total de 10 µl. Las condiciones de transcripción inversa fueron: 10 min a 25 ° C, 30 min a 48 ° C, y un paso final de 5 min a 95 ° C. Para detectar simultáneamente isoformas de tau mediante PCR de punto final, se amplificaron 0,2 µg de ARN retrotranscrito mediante PCR usando la polimerasa Go Taq (Promega) con *primers* que abarcan los exones 9-13, previamente validados (Avale et al., 2013). Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% (p / v) y se marcaron con bromuro de etidio (Sigma). Para realizar la cuantificación relativa de las isoformas de ARNm 4R y 3R mediante PCR en tiempo real, se usaron pares específicos de *primers* por cada isoforma, abarcando los exones E9-E10 o E9/11-E11, respectivamente. Las secuencias de *primers* para la isoforma de Tau humana 3R detectada (directo: 5'-AGGCGGGAAGGTGCAAATAG-3´ e inverso: 5'-TCCTGGTTTATGATGGATGTT-3 '), se obtuvieron de informes previos para detección de Tau humana 3R (Ingelsson y otros, 2005) y los *primers* 4R se diseñaron utilizando un software de diseño de cebadores disponible gratuitamente (SIGMA) (directo: 5 '-

TCCACTGAGAACCTGAAG - 3' e inverso: 5 '- AGTGTGGCTCAAAGGATA - 3'). Los genes constitutivos usados fueron ciclofilina B para las muestras murinas (directo: 5 '- TGGAGATGAATCTGTAGGACGA - 3' e inverso: 5 '- GAAGTCTCCACCCTGGATCA - 3') y Apopoliproteína B humana, para las células humanas (directo: 5´-TGGTGCTCACAAGGCGA-CACTAA-3´ e inverso: 5´-GGCGGCTTTCCCATCCAGACTA-3´). La eficacia de los *primers* diseñados por nosotros (para la detección de isoformas tau4R) se validaron haciendo una curva estándar con ARN extraído de CPF de ratones no inyectados. Las reacciones de qPCR se realizaron por triplicado con 15 ng de ADNc y 5 ul de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystem) en un volumen final de 10 ul usando un ciclador térmico MJ Research Opticon 2 qPCR en las siguientes condiciones de ciclado: Después de la desnaturalización inicial a 95 ° C (3 min), 50 ciclos a 95 ° C (30 s), la temperatura de hibridación específica de los *primers* fue de 58 ° C (30 s) y 72 ° C (45 s) antes de una incubación final a 95 ° C (1 min). Los datos se analizaron con el software Opticon Monitor 3 (Biorad) para obtener los ΔCT por muestra. Los valores para cada isoforma se estandarizaron con el gen de referencia correspondiente según la muestra.

9. Análisis inmunohistoquímicos

Para las inmunohistoquímicas de tau hiperfosforilada, se recogieron secciones coronales del cerebro de 12 meses de ratones hTau (40 µm) con un microtomo de congelación (Leica, SM 2000 R). Se incubaron secciones flotantes en H2O2 para inactivar las peroxidasas endógenas y luego se incubaron durante toda la noche a 4 °C con anticuerpos monoclonales CP13 (1: 100, donado gentilmente por Peter Davis) o AT180 (1: 500; Thermo Scientific) para la detección de tau hiperfosforilada en Ser 202 o T231/S235,

respectivamente. Se incubó un anticuerpo secundario IgG antiratón biotinilado a temperatura ambiente durante 2 h, seguido de una reacción estándar de estreptavidina-biotina peroxidasa usando el kit ABC (Vector) desarrollado con 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich). Las células positivas fueron cuantificadas en la PFC entre +1.54 y +2.5 mm desde el bregma. Para analizar el estado de neurogénesis en el BO, se recogieron secciones sagitales del cerebro de ratones hTau de 3, 6 y 12 meses (40 µm) con micrótomo de congelación. Se procedió al bloqueo de secciones flotantes, seguido del tratamiento con HCl 2N a 37°C durante 30 minutos para el correcto marcado de BrdU, para lo cual se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo anti-BrdU (1:1000, abcam) para la detección de las células en proliferación y NeuN (1:2000, abcam) para la detección de las neuronas. Se incubaron los anticuerpos secundarios IgG anti-rata alexa 568 y IgG anti-conejo alexa 405 a temperatura ambiente durante 2 h. El análisis de la cantidad total de BrdU en el BO de los ratones hTau y WT control, a las 3 edades se realizó con el microscopio ApoTome (Zeiss), el cual nos permitió hacer un screening de toda la estructura, cuantificando el contenido total de BrdU en un determinado stack. Los análisis de la colocalización de BrdU/NeuN se realizaron con el microscopio confocal (Zeiss) en 3 campos elegidos al azar en cada corte, con un total de 3 cortes por animal, cada uno conformado por un stack de 20 imagenes.

10. Extracción de proteína y Western blot

Se extrajo el contenido de proteína total de los cultivos de neuronas a DIV19 y se diseccionaron las áreas del cerebro estudiadas (CPF, hipocampo, estriado y sustancia nigra)

de los ratones htau y WT de 12 a las distintas edades estudiadas. Todas las muestras, tanto las áreas cerebrales como las células humanas neuronales se homogeneizaron con *buffer* de extracción (Tris-HCl mM, NaCl 150 mM, Triton X 1%, SDS 0,05%, EDTA 2 mM pH 7,5, y un cóctel de inhibidor de proteasas y fosfatasas) (Thermo Scientific). Se separaron cantidades iguales de proteína total (determinadas por Bradford assay, BioRad) en geles de SDS-Poliacrilamida al 12% (preparados con Acrilamida y N, N`-Methylenebisacrilamide 30%, Invitrogen) durante 2 horas y se transfirieron usando una transferencia húmeda a membranas de nitrocelulosa (BioRad) durante 45 minutos a 100 voltios. Las membranas fueron bloqueadas en leche en polvo descremada al 5% (p / v), Tween 20 al 0,05% v / v en TBS (leche / 1xTBS-T) durante 1 hora, excepto las membranas destinadas a la incubación con el anticuerpo AT180, en este caso la solución bloqueante fue 5% Albúmina bovina sérica BSA (Sigma). Después del bloqueo, las membranas se incubaron durante una noche a 4°C con los anticuerpos primarios correspondientes en la misma solución de bloqueo. Los anticuerpos primarios utilizados en este trabajo se dirigieron contra 3R Tau (1: 2000 Anti-Tau 3-repeat isoforma RD3, ratón monoclonal, Millipore), 4R tau (1: 1000 Anti-Tau 4-repetición de isoforma RD4, ratón monoclonal, Millipore), tau total (1: 10000; policlonal de conejo; Dako, Dinamarca), Phospho-Ser202 (monoclonal CP13, 1: 100), AT-180 (1: 1000 Thermo Sientific), β-actina de ratón (monoclonal de ratón, 1: 10000; abcam). Después de 3 lavados en TBS/Tween 20 al 0,05%, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario apropiado anti-raton (1:2000, Cell Signaling) o anti-conejo (1: 2000, Cell Signaling) durante 2 horas a temperatura ambiente. Las proteínas se visualizaron usando el reactivo de quimioluminiscencia ECL (Thermo Scientific) exponiendo las membranas en el

equipo GeneGnomeXRQ (Syngene). La densidad óptica se cuantificó utilizando el software Image J (Rasband, n.d.) y en todos los casos relativizando a los niveles de densidad óptica de la proteína β-actina.

11. Ensayo de insolubilidad de Sarkosyl

El fraccionamiento de las proteínas solubles e insolubles se realizó como se detalla brevemente. Los cerebros se homogeneizaron en 200 µl de la siguiente mezcla tampón: solución salina Tris 50 mM (TBS), pH 7,4, que contenía fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM, sodio 1 mM. Orthovanadate y fluoruro de sodio 10 mM. Después de la primera centrifugación a 12000 g (20 min) a 4ºC, se mantuvo la mitad del homogeneizado de superficie para la preparación de fracción de proteína tau total. La otra parte del homogeneizado se incubó con reactivo de sarcosyl al 1% (Sigma) durante 30 minutos con agitación mínima a temperatura ambiente, luego se ultracentrifugó a 45000 g (1 h) a 21ºC para obtener una fracción de proteína soluble (sobrenadante) y fracción insoluble (sedimento). La fracción insoluble (sedimento) se lavó tres veces con reactivo de sarcosyl al 1% antes de resuspenderse en 40 µl de guanidina 8M. Se prepararon fracciones totales de tau, solubles e insolubles para realizar el ensayo de western mediante la adición de NaCl 150 mM, glicerol al 0,2%, azul de bromofenol al 2% y β-mercaptoetanol al 10% y se calentó a 100ºC (5 minutos).

12. Registros electrofisiológicos

Los experimentos electrofisiológicos *in vivo* se llevaron a cabo de manera similar a como se describió anteriormente (De Almeida et al., 2013). Brevemente, los ratones fueron

anestesiados con uretano (1.6 g / kg, ip), tratados con anestesia local en el cuero cabelludo y puntos de presión (solución de bupivacaína hidrocloruro, 5% v / v, Durocaine, AstraZeneca SA, Argentina 0.1-0.3 ml) y asegurados a un marco estereotáxico (Stoelting Co, Wood Dale, IL, EE. UU.). La temperatura se mantuvo entre 36-37ºC. Se administró uretano adicional según sea necesario para mantener el nivel de anestesia. Un conjunto de tres tetrodos (cable de tetrodo: Kanthal 755768. I.D.12 µm, enchapado en oro a la impedancia final de 200 y 500 kΩ) se avanzó estereotáxicamente a lo largo de la PFC para registrar la actividad neuronal cada 300-400 micras. La actividad neuronal se registró durante 30-45 minutos por sitio y la actividad unitaria, así como los potenciales de campo locales del hipocampo y la corteza cerebral se registraron como se describió anteriormente (de Almeida et al., 2013). Las señales fueron amplificadas, filtradas (0.5-6kHz) y digitalizadas (25 kHz) con un amplificador diferencial (RHA2000-EVAL Board Intan Technologies, EE. UU.) Y almacenadas en una PC para el análisis fuera de línea. La clasificación de espigas y la clasificación neuronal se realizaron como se describe (de Almeida et al., 2013), utilizando rutinas de Matlab hechas a medida y un paquete de software publicado (Hazan et al., 2006). El índice de encendido se calculó a partir de marcas de tiempo cargadas en un software comercial Neuroexplorer (Nex Technologies, EE. UU.). Dado que la tasa de disparos no se ajustó a una distribución de Gauss, se usaron estadísticas no paramétricas como descriptores de población y para las comparaciones de grupos.

13. Seguimiento y análisis de las trayectorias de las partículas en las imágenes de los cultivos neuronales.

Los análisis de las imágenes obtenidas *in vivo* de los cultivos neuronales (a DIV 18) y del transporte axonal mediante los kimogramas, fueron realizados por los miembros del grupo del Dr. Tomás Falzone, en el marco de una colaboración, como se describió previamente en (Falzone and Stokin, 2012). En resumen, se grabaron películas de 30 segundos de partículas móviles de APP–YFP en neuronas utilizando un microscopio de epifluorescencia invertido (Olympus IX81) conectado a una cámara CCD (Olympus DP71 / 12.5 megapixeles). Los cultivos se observaron bajo una lente de 60X (apertura numérica, NA: 1,40) y se mantuvieron a 37 °C, 5% de CO2 y 10% de humedad usando una cámara húmeda de CO_2. La direccionalidad se determinó mediante el seguimiento de axones fluorescentes. Para evitar la introducción de sesgos debido a la concentración del gradiente de tau en los axones, se realizaron imágenes en los axones en su parte media separados por al menos dos campos de distancia de visión (aproximadamente 200 m) desde los cuerpos celulares y desde las puntas axonales. Los kimogramas se generaron a partir de las grabaciones con ImageJ utilizando el complemento de kymograph múltiple (Otero et al., 2014) y se procesaron usando Image-Pro Plus 6 (Media Cybernetics) y scripts de MATLAB (The Mathworks) para rastrear vesículas fluorescentes individuales con Precisión de subpíxeles, como se describió anteriormente (Otero et al., 2014). Los kimogramas fueron codificados a ciegas para el seguimiento de partículas y la recolección de datos, con el fin de evitar introducir sesgos. Para el cálculo de las velocidades segmentarias, las trayectorias procesivas se dividieron en segmentos y la velocidad media del segmento se calculó a partir

de la pendiente utilizando un algoritmo MATLAB. Las trayectorias entre esos puntos se consideran segmentos continuos y se clasifican en movimiento anterógrado o retrógrado si muestran la velocidad positiva o negativa respectivamente (las velocidades son la pendiente de una aproximación lineal de la trayectoria).

14. Inmunofluorescencias y morfología celular

Estos ensayos fueron realizados por los miembros del laboratorio del Dr. Tomas Falzone, en el marco de una colaboración. Brevemente, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con paraformaldehído 4% y sacarosa 4% en PBS durante 30 minutos a 37ºC. Después de la fijación, las células fueron lavadas con PBS y luego se permeabilizaron con Triton X-100 0,1% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se procedió al bloqueo mediante la incubación de las células durante 1 hora en solución de bloqueo (BSA al 3%, Triton X-100 al 0,1% y suero de cabra al 10% en PBS). Posteriormente, se las incubó con los anticuerpos primarios en solución de bloqueo, durante la noche a 4 °C. Cuando se usaron dos anticuerpos primarios, la incubación se realizó de forma secuencial; se realizaron los enjuagues y la posterior incubación con anticuerpos secundarios a temperatura ambiente durante 2 horas. Finalmente, las células se tiñeron durante 30 minutos con Hoechst y se montaron en portaobjetos con glicerol al 70%. Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes: anti-tau CP13 (1: 800), anti tau total (1: 800), APP (1:800) y anticuerpos secundarios contra IgG de ratón y conejo conjugados con Alexa Fluor 564 (1:400) o Alexa Fluor 488 (1:400). Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal Zeiss LSM 780 invertido utilizando un objetivo de inmersión en aceite (40X/ 0.55

NA). La morfología neuronal se evaluó cuantitativamente con tres parámetros que describen el tamaño de la neurona y la complejidad de la ramificación de la proyección. En resumen, la extensión de la proyección se estimó midiendo la suma de todas las proyecciones de imágenes de neuronas individuales importadas en ImageJ después de que los píxeles se convirtieran en micrómetros. También se estimó el número de proyecciones primarias y la complejidad de la ramificación se investigó utilizando el complemento Sholl en Neuron-J, del cual se obtuvo el número de intersecciones a lo largo de anillos consecutivos y se representó en gráficos de intersección de proyección versus distancia soma en micrómetros. La significación estadística de los datos se determinó con la prueba *t* de dos colas. Los valores se expresan como media $\pm$ SEM.

15. Pruebas de comportamiento

Todos los ratones evaluados fueron cohortes hermanas de ratones machos de 9-12 meses de edad. Los experimentos se realizaron entre las 13:00 hs y las 18:00 hs bajo iluminación controlada, en una sala de comportamiento separada, donde los ratones se transfirieron con varios meses de anticipación. Los experimentos conductuales fueron analizados por operadores doble ciego.

15.1 Análisis de campo abierto

Se usaron cuadros de actividad (Med Associates Inc., St Albans, VT, EE. UU.) acoplados a una interfaz de computadora para evaluar la actividad horizontal y vertical. Los ratones se colocaron en el centro de las cajas acrílicas vacías (40x40x40 cm) y sus trayectorias se registraron durante 30 minutos mediante la interrupción de los rayos infrarrojos separados por 2,5 cm que cruzan el plano x-y en dos niveles z. El videotrack se

usó para determinar la distancia total recorrida (cm). Las trayectorias de campo abierto también se analizaron para evaluar la ansiedad mediante la cuantificación de las trayectorias en el centro de la arena (un cuadrado virtual de 20 x 20 x 20 cm) y el tiempo pasado en la periferia. Las cajas se limpiaron cuidadosamente entre las pruebas para minimizar las señales de olor en la arena.

15.2 Análisis de Reconocimiento del objeto novedoso

El protocolo utilizado se realizó con modificaciones mínimas tal como se describió anteriormente (Polydoro et al, 2009). Durante tres días consecutivos, los ratones se habituaron individualmente a la cámara vacía (30x23x25cm) durante 10 minutos. El procedimiento comprendió una fase de entrenamiento seguida de una fase de prueba de preferencia después de un retraso de 5 horas. Durante la prueba de entrenamiento, los ratones se colocaron en la cámara que contenía dos objetos idénticos colocados cerca de las esquinas opuestas y se les permitió explorar durante 10 minutos. 5 horas después del entrenamiento, los ratones fueron probados durante 5 minutos en la misma cámara con dos objetos en las mismas posiciones que la prueba de entrenamiento, pero uno de los objetos fue reemplazado por un objeto nuevo de una forma, color y textura diferente. El tiempo dedicado a explorar cada objeto fue grabado. La preferencia anotada se calculó como el tiempo que el ratón pasa explorando el nuevo objeto dividido por el tiempo total dedicado a explorar ambos objetos (familiar y novedoso). La posición del objeto nuevo fue alternado entre los ratones para eliminar el posible sesgo derecha-izquierda y el uso del

objeto como novedoso o familiar fue aleatorizado, con el fin de evitar preferencia por uno u otro. La cámara y los objetos se limpiaron entre cada prueba.

15.3 Laberinto acuático de Morris

La memoria espacial se evaluó en la prueba del laberinto acuático de Morris (MWM). Los ratones fueron entrenados individualmente en una pileta circular (100 cm de diámetro) llena de agua blanca utilizando una pintura blanca no tóxica, mantenida a 27ºC. El conjunto se dividió en cuatro cuadrantes, en cada uno de los cuales se colocó un patrón diferente para el reconocimiento visual de los ratones. La plataforma de escape oculta bajo el agua (15 cm) se colocó en el centro de uno de los cuadrantes siempre de manera fija en el mismo cuadrante. Durante la etapa de entrenamiento, los ratones fueron pseudoaleatorizados para cada prueba. La prueba incluyó cinco días de aprendizaje y una prueba el día 6. En cada día de los primeros cinco, el animal se sometió a seis ensayos con un intervalo de 10 minutos entre los ensayos. Cada prueba duró 60 s a menos que el animal llegara primero a la plataforma, en ese momento permitimos explorar 30 s. Si un animal no pudo encontrar la plataforma dentro de los 60 s, se finalizó la prueba y el animal fue suavemente navegado a la plataforma a mano, dejándolo explorar durante 30 s para el reconocimiento de los patrones. El último día (día 6), se quitó la plataforma y se les dio a los animales una prueba de sonda en la que tuvieron 3 minutos para buscar la plataforma. Se registró la cantidad de veces que los animales cruzaron la ubicación de la plataforma.

15.4 Laberinto en cruz elevado

Esta prueba se realizó como se describió anteriormente (Avale et al., 2003). Brevemente, se colocaron ratones en el área central del laberinto (aparato de Perspex

negro en forma de cruz elevada de 500 cm, brazos: 35 cm de largo x 5 cm de ancho, cuadrado central: 5 × 5 cm, brazos cerrados rodeados por paredes verticales y brazos abiertos) con bordes desprotegidos. El tiempo transcurrido y el número de entradas a los brazos abiertos y cerrados durante un período de exploración de 5 minutos fue registrado por una cámara aérea. El tiempo pasado por los animales en los brazos abiertos de la arena se utilizó como índice de ansiedad. Los videos fueron analizados por dos operadores cegados al genotipo y al tratamiento.

16. Análisis estadísticos

Los datos se analizaron con el software Prism graphPad. Cuando se asumieron muestras grandes y una distribución normal, los tres grupos experimentales se analizaron mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey. Cuando se indicó, las comparaciones pareadas se realizaron mediante la prueba *t* de Student de dos colas. Cuando no se asumió la distribución normal, en experimentos con tamaño de muestra pequeño, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparar los grupos.

Alonso, A. D. C., Mederlyova, A., Novak, M., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (2004). Promotion of hyperphosphorylation by frontotemporal dementia tau mutations. *Journal of Biological Chemistry*. https://doi.org/10.1074/jbc.M405131200

Alonso, A. D., Di Clerico, J., Li, B., Corbo, C. P., Alaniz, M. E., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (2010). Phosphorylation of Tau at Thr212, Thr231, and Ser262combined causes neurodegeneration. *Journal of Biological Chemistry*. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.110957

Andorfer, C., Acker, C. M., Kress, Y., Hof, P. R., Duff, K., & Davies, P. (2005). Cell-cycle reentry and cell death in transgenic mice expressing nonmutant human tau isoforms. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *25*(22), 5446–5454. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4637-04.2005

Andorfer, C., Kress, Y., Espinoza, M., de Silva, R., Tucker, K. L., Barde, Y. A., … Davies, P. (2003). Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms. *J Neurochem*, *86*(3), 582–590. https://doi.org/1879 [pii]

Andorfer, C., Kress, Y., Espinoza, M., De Silva, R., Tucker, K. L., Barde, Y. A., … Davies, P. (2003). Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms. *Journal of Neurochemistry*, *86*(3), 582–590. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01879.x

Arendt, T., Stieler, J. T., & Holzer, M. (2016). Tau and tauopathies, *126*, 238–292. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.08.018

Arriagada, P. V., Growdon, J. H., Hedley-Whyte, E. T., & Hyman, B. T. (1992). Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology*. https://doi.org/10.1038/186476a0

Attems, J., Walker, L., & Jellinger, K. A. (2014). Olfactory bulb involvement in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathologica*. https://doi.org/10.1007/s00401-014-1261-7

Augustinack, J. C., Schneider, A., Mandelkow, E. M., & Hyman, B. T. (2002). Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, *103*(1), 26–35. https://doi.org/10.1007/s004010100423

Avale, M. E., Chabout, J., Pons, S., Serreau, P., De Chaumont, F., Olivo-Marin, J.-C., … Granon, S. (2011). Prefrontal nicotinic receptors control novel social interaction between mice. *The FASEB Journal*. https://doi.org/10.1096/fj.10-178558

Avale, M. E., Rodríguez-Martín, T., & Gallo, J. M. (2013). Trans-splicing correction of tau isoform imbalance in a mouse model of tau mis-splicing. *Human Molecular Genetics*, *22*(13), 2603–2611. https://doi.org/10.1093/hmg/ddt108

Ballatore, C., Lee, V. M.-Y., & Trojanowski, J. Q. (2007). Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, *8*(9), 663–672. https://doi.org/10.1038/nrn2194

Bhaskar, K., Yen, S. H., & Lee, G. (2005). Disease-related modifications in tau affect the interaction between Fyn and tau. *Journal of Biological Chemistry*.

https://doi.org/10.1074/jbc.M505895200

Biernat, J., Gustke, N., Drewes, G., Mandelkow, E., & Mandelkow, E. (1993). Phosphorylation of Ser262strongly reduces binding of tau to microtubules: Distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron*. https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90279-Z

Bodea, L. G., Eckert, A., Ittner, L. M., Piguet, O., & Götz, J. (2016). Tau physiology and pathomechanisms in frontotemporal lobar degeneration. *Journal of Neurochemistry*, *138*, 71–94. https://doi.org/10.1111/jnc.13600

Braak, H., Thal, D. R., Ghebremedhin, E., & Del Tredici, K. (2011). Stages of the pathologic process in Alzheimer's disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *70*(11), 960–969. https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e318232a379

Brady, S. T., & Sperry, A. O. (1995). Biochemical and functional diversity of microtubule motors in the nervous system. *Current Opinion in Neurobiology*. https://doi.org/10.1016/0959-4388(95)80058-1

Brandt, R., & Lee, G. (1993). Functional organization of microtubule-associated protein tau. Identification of regions which affect microtubule growth, nucleation, and bundle formation in vitro. *Journal of Biological Chemistry*.

Bruch, J., Xu, H., De Andrade, A., & Höglinger, G. (2014). Mitochondrial complex 1 inhibition increases 4-Repeat isoform tau by SRSF2 upregulation. *PLoS ONE*, *9*(11), 1–8. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113070

Burkhardt, J. K., Echeverri, C. J., Nilsson, T., & Vallee, R. B. (1997). Overexpression of the dynamitin (p50) subunit of the dynactin complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution. *Journal of Cell Biology*. https://doi.org/10.1083/jcb.139.2.469

Castillo-Carranza, D. L., Gerson, J. E., Sengupta, U., Guerrero-Muñoz, M. J., Lasagna-Reeves, C. A., & Kayed, R. (2014). Specific targeting of tau oligomers in Htau mice prevents cognitive impairment and tau toxicity following injection with brain-derived tau oligomeric seeds. *Journal of Alzheimer's Disease*. https://doi.org/10.3233/JAD-132477

Coady, T. H., Shababi, M., Tullis, G. E., & Lorson, C. L. (2007). Restoration of SMN Function : Delivery of a Trans -splicing RNA Re-directs SMN2 Pre-mRNA Splicing, *15*(8), 1471–1478. https://doi.org/10.1038/sj.mt.6300222

Cohen, T. J., Guo, J. L., Hurtado, D. E., Kwong, L. K., Mills, I. P., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (2011). The acetylation of tau inhibits its function and promotes pathological tau aggregation. *Nature Communications*. https://doi.org/10.1038/ncomms1255

Couchie, D., Mavilia, C., Georgieff, I. S., Liem, R. K., Shelanski, M. L., & Nunez, J. (1992). Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. https://doi.org/10.1073/pnas.89.10.4378

Coulter, L. R., Landree, M. A., & Cooper, T. A. (1997). Identification of a New Class of Exonic Splicing Enhancers by In Vivo Selection, *17*(4), 2143–2150.

D'Souza, I., Poorkaj, P., Hong, M., Nochlin, D., Lee, V. M.-Y., Bird, T. D., & Schellenberg, G. D. (1999). Missense and silent tau gene mutations cause frontotemporal dementia with parkinsonism-

chromosome 17 type, by affecting multiple alternative RNA splicing regulatory elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(10), 5598–5603. https://doi.org/10.1073/pnas.96.10.5598

D'Souza, I., & Schellenberg, G. D. (2000). Determinants of 4-repeat tau expression. Coordination between enhancing and inhibitory splicing sequences for exon 10 inclusion. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(23), 17700–17709. https://doi.org/10.1074/jbc.M909470199

Dawson, H. N., Cantillana, V., Chen, L., & Vitek, M. P. (2007). The tau N279K exon 10 splicing mutation recapitulates frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 tauopathy in a mouse model. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *27*(34), 9155–9168. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5492-06.2007

de Almeida, J., Jourdan, I., Murer, M. G., & Belforte, J. E. (2013). Refinement of Neuronal Synchronization with Gamma Oscillations in the Medial Prefrontal Cortex after Adolescence. *PLoS ONE*. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062978

De Vos, K. J., Grierson, A. J., Ackerley, S., & Miller, C. C. J. (2008). Role of Axonal Transport in Neurodegenerative Diseases. *Annual Review of Neuroscience*, *31*(1), 151–173. https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.061307.090711

Dennis W. Dickson, M. D. ., , Naomi Kouri, B. S. ., , Melissa E. Murray, P. D. ., A., and K., & Josephs, M.DManuscript, A. (2012). Neuropathology of1. Dennis W. Dickson, M. D. ., , Naomi Kouri, B. S. ., , Melissa E. Murray, P. D. ., A., and K. & Josephs, M.DManuscript, A. Neuropathology of Frontotemporal Lobar Degeneration–Tau (FTLD-Tau). J Mol Neurosci. ges Mol Neurosci. ges 29, 997. *J Mol Neurosci. Ges Mol Neurosci. Ges*, *29*(6), 997–1003. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted

Devanand DP, Michaels-Marston KS, Liu X, Pelton GH, Padilla M, Marder K, Bell K, Stern Y, M. R. (n.d.). Olfactory Deficits in Patients With Mild Cognitive Impairment Predict Alzheimer's Disease at Follow-Up, 1399–1405.

Dooley, S. J., McDougald, D. S., Fisher, K. J., Bennicelli, J. L., Mitchell, L. G., & Bennett, J. (2018). Spliceosome-Mediated Pre-mRNA trans-Splicing Can Repair CEP290 mRNA. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, *12*(September), 294–308. https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.05.014

Dorval, V., & Fraser, P. E. (2006). Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of natively unfolded proteins tau and α-synuclein. *Journal of Biological Chemistry*. https://doi.org/10.1074/jbc.M510127200

Doty, R. L. (2017). Personal View Olfactory dysfunction in neurodegenerative diseases : is there a common pathological substrate ? *The Lancet Neurology*, *16*(6), 478–488. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30123-0

Drewes, G., Ebneth, A., Preuss, U., Mandelkow, E. M., & Mandelkow, E. (1997). MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule- associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell*. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80208-1

Duff, K., Knight, H., Refolo, L. M., Sanders, S., Yu, X., Picciano, M., … Davies, P. (2000). Characterization of pathology in transgenic mice over-expressing human genomic and cDNA tau transgenes. *Neurobiology of Disease*, *7*(2), 87–98. https://doi.org/10.1006/nbdi.1999.0279

Falzone, T. L., & Stokin, G. B. (2012). Imaging amyloid precursor protein in vivo: An axonal transport

assay. *Methods in Molecular Biology*. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-536-7_25

Falzone, T. L., Stokin, G. B., Lillo, C., Rodrigues, E. M., Westerman, E. L., Williams, D. S., & Goldstein, L. S. B. (2009). Axonal Stress Kinase Activation and Tau Misbehavior Induced by Kinesin-1 Transport Defects. *Journal of Neuroscience*. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0780-09.2009

Frandemiche, M. L., De Seranno, S., Rush, T., Borel, E., Elie, A., Arnal, I., … Buisson, A. (2014). Activity-Dependent Tau Protein Translocation to Excitatory Synapse Is Disrupted by Exposure to Amyloid-Beta Oligomers. *Journal of Neuroscience*, *34*(17), 6084–6097. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4261-13.2014

Fu, H., Hardy, J., & Duff, K. E. (2018). Selective vulnerability in neurodegenerative diseases. *Nature Neuroscience*, *21*(10), 1350–1358. https://doi.org/10.1038/s41593-018-0221-2

Fu, M. M., & Holzbaur, E. L. F. (2013). JIP1 regulates the directionality of APP axonal transport by coordinating kinesin and dynein motors. *Journal of Cell Biology*. https://doi.org/10.1083/jcb.201302078

Funahashi, S. (2001). Neuronal mechanisms of executive control by the prefrontal cortex. *Neuroscience Research*, *39*(2), 147–165.

Fuster, J. M. (1997). Network memory. *Trends in Neurosciences*, *20*(10), 451–459.

Fuster, J. M. (1997). Network memory. *Trends in Neurosciences*, *20*(10), 451–459. https://doi.org/10.1016/S0166-2236(97)01128-4

Gallo, J. M., Noble, W., & Martin, T. R. (2007). RNA and protein-dependent mechanisms in tauopathies: Consequences for therapeutic strategies. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *64*(13), 1701–1714. https://doi.org/10.1007/s00018-007-6513-4

Gasparini, L., Terni, B., & Spillantini, M. G. (2007). Frontotemporal dementia with tau pathology. *Neurodegenerative Diseases*, *4*(2–3), 236–253. https://doi.org/10.1159/000101848

Goedert, M., Falcon, B., Clavaguera, F., & Tolnay, M. (2014). Prion-like mechanisms in the pathogenesis of tauopathies and synucleinopathies. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, *14*(11), 1–11. https://doi.org/10.1007/s11910-014-0495-z

Goedert, M., & Jakes, R. (1990). Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *The EMBO Journal*. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07870.x

Goedert, M., & Spillantini, M. G. (2017). Propagation of Tau aggregates, 1–9. https://doi.org/10.1186/s13041-017-0298-7

Goedert, M., Spillantini, M. G., Jakes, R., Rutherford, D., & Crowther, R. A. (1989). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron*. https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90210-9

Goldman-Rakic, P. S. (1995). Architecture of the prefrontal cortex and the central executive. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *769*, 71–83.

Goldsbury, C., Thies, E., Konzack, S., & Mandelkow, E.-M. (2007). Quantification of Amyloid Precursor Protein and Tau for the Study of Axonal Traffic Pathways. *Journal of Neuroscience*,

27(13), 3357–3363. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5024-06.2007

Goldstein LS 2012. (2012). Axonal transport and neurodegenerative disease: Can we see the elephant? *Prog Neurobiol*, *6*(9), 2166–2171. https://doi.org/10.1021/nl061786n.Core-Shell

Götz, J., & Ittner, L. M. (2008). Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nature Reviews Neuroscience*, *9*(7), 532–544. https://doi.org/10.1038/nrn2420

Götz, J., Ittner, L. M., & Kins, S. (2006). Do axonal defects in tau and amyloid precursor protein transgenic animals model axonopathy in Alzheimer's disease? *Journal of Neurochemistry*. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03955.x

Gratuze, M., Cisbani, G., Cicchetti, F., & Planel, E. (2016). Is Huntington's disease a tauopathy? *Brain*, *139*(4), 1014–1025. https://doi.org/10.1093/brain/aww021

Grover, A., England, E., Baker, M., Sahara, N., Adamson, J., Granger, B., … Hutton, M. (2003). A novel tau mutation in exon 9 (1260V) causes a four-repeat tauopathy. *Experimental Neurology*. https://doi.org/10.1016/S0014-4886(03)00393-5

Gruber, C., Gratz, I. K., Murauer, E. M., Mayr, E., Koller, U., Bruckner-Tuderman, L., … Bauer, J. W. (2011). Spliceosome-Mediated RNA Trans-Splicing Facilitates Targeted Delivery of Suicide Genes to Cancer Cells. *Molecular Cancer Therapeutics*. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0669

Günther, R., Schrempf, W., Hähner, A., Hummel, T., Wolz, M., Storch, A., & Hermann, A. (2018). Impairment in respiratory function contributes to olfactory impairment in amyotrophic lateral sclerosis. *Frontiers in Neurology*, *9*(FEB). https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00079

Hasegawa, M., Smith, M. J., & Goedert, M. (1998). Tau proteins with FTDP-17 mutations have a reduced ability to promote microtubule assembly. *FEBS Letters*. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01217-4

Hawkes, C. (2006). Olfaction in Neuro-degenerative Diseases, *63*, 133–151.

Hefti, M. M., Farrell, K., Kim, S. H., Bowles, K. R., Fowkes, M. E., Raj, T., & Crary, J. F. (2018). High-resolution temporal and regional mapping of MAPT expression and splicing in human brain development. *PLoS ONE*, *13*(4), 1–14. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195771

Hirokawa, N. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science*. https://doi.org/10.1126/science.279.5350.519

Hutton, M., Lendon, C. L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., … Heutink, P. (1998). Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature*, *393*(6686), 702–705. https://doi.org/10.1038/31508

Ishihara, T., Hong, M., Zhang, B., Nakagawa, Y., Lee, M. K., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (1999). Age-dependent emergence and progression of a tauopathy in transgenic mice overexpressing the shortest human tau isoform. *Neuron*, *24*(3), 751–762. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81127-7

Ittner, L. M., Fath, T., Ke, Y. D., Bi, M., van Eersel, J., Li, K. M., … Gotz, J. (2008). Parkinsonism and impaired axonal transport in a mouse model of frontotemporal dementia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(41), 15997–16002. https://doi.org/10.1073/pnas.0808084105

Bibliografía

Ittner, L. M., & Götz, J. (2011). Amyloid-β and tau - A toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *12*(2), 67–72. https://doi.org/10.1038/nrn2967

Iyer, A., LaPointe, N. E., Zielke, K., Berdynski, M., Guzman, E., Barczak, A., … Zekanowski, C. (2013). A Novel MAPT Mutation, G55R, in a Frontotemporal Dementia Patient Leads to Altered Tau Function. *PLoS ONE*. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076409

Knight, R. T., Grabowecky, M. F., & Scabini, D. (1995). Role of human prefrontal cortex in attention control. *Advances in Neurology*, *66*, 21-34; discussion 34-6.

Knowles, R., Leclerc, N., & Kosik, K. S. (1994). Organization of actin and microtubules during process formation in tau-expressing sf9 cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. https://doi.org/10.1002/cm.970280308

Komuro, Y., Xu, G., Bhaskar, K., & Lamb, B. T. (2015). Human tau expression reduces adult neurogenesis in a mouse model of tauopathy. *Neurobiology of Aging*, *36*(6), 2034–2042. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.03.002

Kopke, E., Tung, Y. C., Shaikh, S., Del Alonso, C. A., Iqbal, K., & Grundke-Iqbal, I. (1993). Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non- paired helical filament pool in Alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(32), 24374–24384. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.11.056

Kornblihtt, A. R., Schor, I. E., Alló, M., Dujardin, G., Petrillo, E., & Muñoz, M. J. (2013). Alternative splicing: A pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. https://doi.org/10.1038/nrm3525

Kumar, J., Yu, H., & Sheetz, M. (1995). Kinectin, an Essential Anchor for Kinesin-Driven Vesicle Motility. *ScienceNew Series*. https://doi.org/10.1126/science.7892610

Lacovich, V., Espindola, S. L., Alloatti, M., Pozo Devoto, V., Cromberg, L., Čarná, M., … Falzone, T. L. (2016). Tau isoforms imbalance impairs the axonal transport of the amyloid precursor protein in human neurons. *The Journal of Neuroscience*, *37*(1), 2305–2316. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2305-16.2016

Lannuzel, A., Michel, P. P., Höglinger, G. U., Champy, P., Jousset, A., Medja, F., … Ruberg, M. (2003). The mitochondrial complex I inhibitor annonacin is toxic to mesencephalic dopaminergic neurons by impairment of energy metabolism. *Neuroscience*. https://doi.org/10.1016/S0306-4522(03)00441-X

Ledesma, M. D., Bonay, P., Colaço, C., & Avila, J. (1994). Analysis of microtubule-associated protein tau glycation in paired helical filaments. *Journal of Biological Chemistry*. https://doi.org/10.1046/j.1540-8167.2005.40665.x

Lepousez, G., Nissant, A., & Lledo, P. M. (2015). Adult neurogenesis and the future of the rejuvenating brain circuits. *Neuron*. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.01.002

Lewis, J., McGowan, E., Rockwood, J., Melrose, H., Nacharaju, P., Van Slegtenhorst, M., … Hutton, M. (2000). Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L)tau protein. *Nature Genetics*. https://doi.org/10.1038/78078

Li, C., & Götz, J. (2017). Tau-based therapies in neurodegeneration: Opportunities and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*, *16*(12), 863–883. https://doi.org/10.1038/nrd.2017.155

Lopez, L. A., & Sheetz, M. P. (1993). Steric inhibition of cytoplasmic dynein and kinesin motility by MAP2. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. https://doi.org/10.1002/cm.970240102

Luzzi, S., Snowden, J. S., Neary, D., Coccia, M., Provinciali, L., & Lambon Ralph, M. A. (2007). Distinct patterns of olfactory impairment in Alzheimer's disease, semantic dementia, frontotemporal dementia, and corticobasal degeneration. *Neuropsychologia*. https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2006.12.008

M, M. (2011). The main faces of Tau. *Neuron*, *29*(6), 997–1003. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted

Mandelkow, E., Ebneth, a, Godemann, R., Stamer, K., Illenberger, S., & Trinczek, B. (2011). of Tau Protein Inhibits Kinesin-dependent Overexpression of Vesicles , Mitochondria , and Endoplasmic Trafficking Reticulum : for Alzheimer ' s Disease Implications. *Cell*, *143*(3), 777–794. https://doi.org/10.1083/jcb.143.3.777

Mandelkow, E., & Mandelkow, E. M. (1995). Microtubules and microtubule-associated proteins. *Current Opinion in Cell Biology*. https://doi.org/10.1016/0955-0674(95)80047-6

Mandell, J. W., & Banker, G. a. (1996). A spatial gradient of tau protein phosphorylation in nascent axons. *Journal of Neuroscience*. https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.1988.TB03051.X

Mansfiel, S., Kole, J., Yang, C., & Mitchell, L. (2000). Repair of CFTR mRNA by spliceosome-mediated RNA, 1885–1895.

Medina, M., Hernández, F., & Avila, J. (2016). New features about tau function and dysfunction. *Biomolecules*, *6*(2), 1–12. https://doi.org/10.3390/biom6020021

Mertens, J., Stüber, K., Poppe, D., Doerr, J., Ladewig, J., Brüstle, O., & Koch, P. (2013). Embryonic stem cell-based modeling of tau pathology in human neurons. *American Journal of Pathology*, *182*(5), 1769–1779. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.01.043

Mori, H., Kondo, J., & Ihara, Y. (1987). Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Science*. https://doi.org/10.1126/science.3029875

Morici, J. F., Bekinschtein, P., & Weisstaub, N. V. (2015). Medial prefrontal cortex role in recognition memory in rodents. *Behavioural Brain Research*, *292*, 241–251. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.06.030

Morris, M., Knudsen, G. M., Maeda, S., Trinidad, J. C., Ioanoviciu, A., Burlingame, A. L., & Mucke, L. (2015). Tau post-translational modifications in wild-type and human amyloid precursor protein transgenic mice. *Nature Neuroscience*. https://doi.org/10.1038/nn.4067

Niblock, M., & Gallo, J.-M. (2012). Tau alternative splicing in familial and sporadic tauopathies. *Biochemical Society Transactions*, *40*(4), 677–680. https://doi.org/10.1042/BST20120091

Nicolas, L. B., Kolb, Y., & Prinssen, E. P. M. (2006). A combined marble burying-locomotor activity test in mice: A practical screening test with sensitivity to different classes of anxiolytics and antidepressants. *European Journal of Pharmacology*. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.07.015

Noble, W., Hanger, D. P., Miller, C. C. J., & Lovestone, S. (2013). The importance of tau phosphorylation for neurodegenerative diseases. *Frontiers in Neurology*. https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00083

Nunez, J., & Fischer, I. (1997). Microtubule-Associated Proteins (MAPs) in the Peripheral Nervous System during Development and Regeneration. *Journal of Molecular Neuroscience*. https://doi.org/10.1007/BF02736834

Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kayed, R., … LaFerla, F. M. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's Disease with plaques and tangles: Intracellular Aβ and synaptic dysfunction. *Neuron*. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00434-3

Otero, M. G., Alloatti, M., Cromberg, L. E., Almenar-Queralt, A., Encalada, S. E., Pozo Devoto, V. M., … Falzone, T. L. (2014). Fast axonal transport of the proteasome complex depends on membrane interaction and molecular motor function. *Journal of Cell Science*. https://doi.org/10.1242/jcs.140780

Panda, D., Samuel, J. C., Massie, M., Feinstein, S. C., & Wilson, L. (2003). Differential regulation of microtubule dynamics by three- and four-repeat tau: Implications for the onset of neurodegenerative disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. https://doi.org/10.1073/pnas.1633508100

Pardini, M., Huey, E. D., Cavanagh, A. L., & Grafman, J. (2009). Olfactory function in corticobasal syndrome and frontotemporal dementia. *Archives of Neurology*. https://doi.org/10.1001/archneurol.2008.521

Planel, E., Krishnamurthy, P., Miyasaka, T., Liu, L., Herman, M., Kumar, A., … Duff, K. E. (2008). Anesthesia-Induced Hyperphosphorylation Detaches 3-Repeat Tau from Microtubules without Affecting Their Stability In Vivo. *Journal of Neuroscience*, *28*(48), 12798–12807. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4101-08.2008

Polydoro, M., Acker, C. M., Duff, K., Castillo, P. E., & Davies, P. (2009). Age-Dependent Impairment of Cognitive and Synaptic Function in the htau Mouse Model of Tau Pathology, *29*(34), 10741–10749. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1065-09.2009

Puttaraju, M., Jamison, S. F., Mansfield, S. G., Garcia-blanco, M. A., & Mitchell, L. G. (1999). Spliceosome-mediated RNA trans -splicing as a tool for gene therapy, *17*(March).

Qian, W., Liang, H., Shi, J., Jin, N., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., … Liu, F. (2011). Regulation of the alternative splicing of tau exon 10 by SC35 and Dyrk1A. *Nucleic Acids Research*, *39*(14), 6161–6171. https://doi.org/10.1093/nar/gkr195

Qian, W., & Liu, F. (2014). Regulation of alternative splicing of tau exon 10. *Neuroscience Bulletin*, *30*(2), 367–377. https://doi.org/10.1007/s12264-013-1411-2

Rasool, C. G., Svendsen, C. N., & Selkoe, D. J. (1986). Neurofibrillary degeneration of cholinergic and noncholinergic neurons of the basal forebrain in Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*. https://doi.org/10.1002/ana.410200407

Regan, P., Piers, T., Yi, J.-H., Kim, D.-H., Huh, S., Park, S. J., … Cho, K. (2015). Tau Phosphorylation at Serine 396 Residue Is Required for Hippocampal LTD. *Journal of Neuroscience*, *35*(12), 4804–4812. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2842-14.2015

Reis, G. F., Yang, G., Szpankowski, L., Weaver, C., Shah, S. B., Robinson, J. T., … Goldstein, L. S. B. (2012). Molecular motor function in axonal transport in vivo probed by genetic and computational analysis in Drosophila. *Molecular Biology of the Cell*. https://doi.org/10.1091/mbc.E11-11-0938

Rey, N. L., Wesson, D. W., & Brundin, P. (2018). Neurobiology of Disease The olfactory bulb as the entry site for prion-like propagation in neurodegenerative diseases. *Neurobiology of Disease*, *109*, 226–248. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.12.013

Rindt, H., Tom, C. M., Lorson, C. L., & Mattis, V. B. (2017). Optimization of trans-splicing for Huntington's disease RNA therapy. *Frontiers in Neuroscience*, *11*(OCT), 1–13. https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00544

Rogers, J. D., Brogan, D., & Mirra, S. S. (1985). The nucleus basalis of Meynert in neurological disease: A quantitative morphological study. *Annals of Neurology*. https://doi.org/10.1002/ana.410170210

Rossi, G., Bastone, A., Piccoli, E., Morbin, M., Mazzoleni, G., Fugnanesi, V., … Tagliavini, F. (2014). Different mutations at V363 MAPT codon are associated with atypical clinical phenotypes and show unusual structural and functional features. *Neurobiology of Aging*. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.08.004

Russo, M. J., Cohen, G., Mendez, P. C., Campos, J., Nahas, F. E., Surace, E. I., … Sevlever, G. (2016). Predicting episodic memory performance using different biomarkers: Results from Argentina-Alzheimer's disease neuroimaging initiative. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, *12*, 2199–2206. https://doi.org/10.2147/NDT.S107051

Saiz-Sanchez, D., Flores-Cuadrado, A., Ubeda-Bañon, I., de la Rosa-Prieto, C., & Martinez-Marcos, A. (2016). Interneurons in the human olfactory system in Alzheimer's disease. *Experimental Neurology*, *276*, 13–21. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.11.009

Saper, C. B., German, D. C., & White III, C. L. (1985). Neuronal pathology in the nucleus basalis and associated cell groups in senile dementia of the Alzheimer's type: possible role in cell loss. *Neurology*.

Schindowski, K., Bretteville, A., Leroy, K., Bégard, S., Brion, J. P., Hamdane, M., & Buée, L. (2006). Alzheimer's disease-like tau neuropathology leads to memory deficits and loss of functional synapses in a novel mutated tau transgenic mouse without any motor deficits. *American Journal of Pathology*, *169*(2), 599–616. https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.060002

Schoenfeld, T. A., & Obar, R. A. (1994). Diverse Distribution and Function of Fibrous Microtubule-Associated Proteins in the Nervous System. *International Review of Cytology*. https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62631-5

Schöll, M., Maass, A., Mattsson, N., Ashton, N., Blennow, K., Zetterberg, H., & Jagust, W. (2018). Biomarkers for tau pathology. *Molecular and Cellular Neuroscience*, #pagerange#. https://doi.org/10.1016/J.MCN.2018.12.001

Shane Arnold, C., Johnson, G. V. W., Cole, R. N., Dong, D. L. Y., Lee, M., & Hart, G. W. (1996). The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O- linked N-acetylglucosamine. *Journal of Biological Chemistry*. https://doi.org/10.1074/jbc.271.46.28741

Shea, T. B., Beermann, M. L., Nixon, R. A., & Fischer, I. (1992). Microtubule-associated protein tau is required for axonal neurite elaboration by neuroblastoma cells. *Journal of Neuroscience Research*. https://doi.org/10.1002/jnr.490320308

Shimamura, A. P. (2000). Toward a Cognitive Neuroscience of Metacognition. *Consciousness and Cognition*, *9*(2), 313–323. https://doi.org/10.1006/ccog.2000.0450

Bibliografía

Spillantini, M. G., & Goedert, M. (2013). Tau pathology and neurodegeneration. *The Lancet Neurology*, *12*(6), 609–622. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70090-5

Spillantini, M. G., Murrell, J. R., Goedert, M., Farlow, M. R., Klug, a, & Ghetti, B. (1998). Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(13), 7737–7741. https://doi.org/10.1073/pnas.95.13.7737

Stamer, K., Vogel, R., Thies, E., Mandelkow, E., & Mandelkow, E. M. (2002). Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *Journal of Cell Biology*. https://doi.org/10.1083/jcb.200108057

Steinhilb, M. L., Dias-Santagata, D., Fulga, T. A., Felch, D. L., & Feany, M. B. (2007). Tau Phosphorylation Sites Work in Concert to Promote Neurotoxicity In Vivo. *Molecular Biology of the Cell*, *19*(1), 308–317. https://doi.org/10.1091/mbc.E07

Stokin, G. B., Lillo, C., Falzone, T. L., Brusch, R. G., Rockenstein, E., Mount, S. L., … Goldstein, L. S. B. (2005). Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's diseases. *Science*, *307*(5713), 1282–1288. https://doi.org/10.1126/science.1105681

Tagliavini, F., & Pilleri, G. (1983). Basal nucleus of meynert. A neuropathological study in Alzheimer's disease, simple senile dementia, Pick's disease and Huntington's chorea. *Journal of the Neurological Sciences*. https://doi.org/10.1016/0022-510X(83)90203-4

Trojanowski, J. Q., Smith, A. B., Huryn, D., & Lee, V. M.-Y. (2005). Microtubule-stabilising drugs for therapy of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders with axonal transport impairments. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. https://doi.org/10.1517/14656566.6.5.683

Viereck C, Tucker Rp, & Matus A. (1989). The adult rat olfactory system expresses microtubule-associated proteins found in the developing brain. *Journal of Neuroscience*.

Walker, J. M. &. (2013). Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *PCIM Europe Conference Proceedings*, *501*(7465), 525–532. https://doi.org/10.1038/nature12481

Wally, V., Murauer, E. M., & Bauer, J. W. (2012). Spliceosome-Mediated Trans-Splicing : The Therapeutic Cut and Paste, *132*(8), 1959–1966. https://doi.org/10.1038/jid.2012.101

Waterman-Storer, C. M., & Salmon, E. D. (1997). Microtubule dynamics: Treadmilling comes around again. *Current Biology*. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(06)00177-1

Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. Y., & Kirschner, M. W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *72*(5), 1858–1862. https://doi.org/10.1073/pnas.72.5.1858

Whitehouse, P. J., Struble, R. G., Clark, A. W., & Price, D. L. (1982). Alzheimer disease: Plaques, tangles, and the basal forebrain. *Annals of Neurology*. https://doi.org/10.1002/ana.410120517

Whittington, R. a., Virág, L., Gratuze, M., Petry, F. R., Noël, A., Poitras, I., … Planel, E. (2015). Dexmedetomidine increases tau phosphorylation under normothermic conditions in vivo and in vitro. *Neurobiology of Aging*, *36*(8), 2414–2428. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.05.002

Bibliografía

Witman, G. B., Cleveland, D. W., Weingarten, M. D., & Kirschner, M. W. (1976). Tubulin requires tau for growth onto microtubule initiating sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *73*(11), 4070–4074. https://doi.org/10.1073/pnas.73.11.4070

Wobst, H. J., Denk, F., Oliver, P. L., Livieratos, A., Taylor, T. N., Knudsen, M. H., … Wade-Martins, R. (2017). Increased 4R tau expression and behavioural changes in a novel MAPT-N296H genomic mouse model of tauopathy. *Nature Publishing Group*. https://doi.org/10.1038/srep43198

Yamada, E. S., Respondek, G., Müssner, S., de Andrade, A., Höllerhage, M., Depienne, C., … Höglinger, G. U. (2014). Annonacin, a natural lipophilic mitochondrial complex I inhibitor, increases phosphorylation of tau in the brain of FTDP-17 transgenic mice. *Experimental Neurology*. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.12.017

Yang, S., Kuan, W., & Spillantini, M. G. (2016). Progressive tauopathy in P301S tau transgenic mice is associated with a functional deficit of the olfactory system. https://doi.org/10.1111/ejn.13333

Zempel, H., & Mandelkow, E. (2014). Lost after translation: Missorting of Tau protein and consequences for Alzheimer disease. *Trends in Neurosciences*, *37*(12), 721–732. https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.08.004

Zhang, X.-Q. Z. and S.-C. (2010). Differentiation of Neural Precursors and Dopaminergic Neurons from Human Embryonic Stem Cells, *28*(7), 1–12. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5242-07.2008.Axonal