



Bocai, Nadia Irina

# Estudio de la neurotoxicidad de péptidos amiloides y proteína tau asociados a demencias humanas en el sistema nervioso de *Drosophila*



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.  
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

*Cita recomendada:*

Bocai, N. I. (2019). *Estudio de la neurotoxicidad de péptidos amiloides y proteína tau asociados a demencias humanas en el sistema nervioso de Drosophila*. (Tesis de doctorado). Bernal, Argentina : Universidad Nacional de Quilmes. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/1911>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

# **Estudio de la neurotoxicidad de péptidos amiloides y proteína tau asociados a demencias humanas en el sistema nervioso de *Drosophila***

*TESIS DOCTORAL*

**Nadia Irina Bocai**

[nbocai@leloir.org.ar](mailto:nbocai@leloir.org.ar)

## **Resumen**

La Enfermedad de Alzheimer (EA) esporádica es el principal tipo de demencia en la población adulta y sus causas aún no se conocen. En cambio, la Demencia Familiar Danesa (DFD) es una demencia poco frecuente asociada a una mutación autosómica dominante en el gen *bri2*. Ambas enfermedades se caracterizan por la acumulación progresiva de péptidos amiloides (A $\beta$  y ADan, respectivamente) y de la proteína tau hiperfosforilada. Nuestra hipótesis es que, a diferencia de A $\beta$  y la EA, la expresión y acumulación del péptido ADan en el cerebro es suficiente para el desarrollo de la neurotoxicidad en la DFD. Además, creemos que existen mecanismos de neurotoxicidad comunes y diferenciales entre los péptidos ADan y A $\beta$  que incluyen a la proteína tau y a la respuesta a proteínas mal plegadas. Con el uso de *Drosophila melanogaster* como modelo experimental, expresamos en neuronas al péptido ADan y encontramos que su toxicidad y acumulación es dependiente de la dosis; además induce una disminución en la fosforilación del sitio Ser262 de tau endógena, sugiriendo un mecanismo de toxicidad diferente al planteado para A $\beta$ . Mediante la disminución de tau endógena y la sobreexpresión de tau humana en presencia de ADan y A $\beta$ , se encontró que posiblemente la relación neurotóxica de cada péptido con tau sea diferente. Además, determinamos que la toxicidad de tau humana en *Drosophila* depende de la dosis y de la fosforilación de los sitios Ser262 y/o Ser356. Al analizar la respuesta a proteínas mal plegadas en moscas que sobreexpresan iguales niveles de ADan y A $\beta$  encontramos que el inicio y la intensidad de la activación de la vía de IRE1 correlaciona con la toxicidad inducida por cada péptido. De igual manera a lo propuesto para A $\beta$ , esta vía tendría un rol neuroprotectivo al sobreexpresar ADan, apuntando a un mecanismo común entre ambos péptidos.

Finalmente, determinamos que la proteína tau no activa la vía de IRE1 y posiblemente active la vía de PERK. Los resultados de nuestro trabajo pueden ser de utilidad para futuros estudios mecanísticos que contribuyan a dilucidar las bases moleculares de las demencias asociadas a amiloides.

Palabras claves: Enfermedad de Alzheimer, Demencia Familiar Danesa, A $\beta$ , ADan, tau, neurotoxicidad, *Drosophila melanogaster*.



Universidad  
Nacional  
de Quilmes

“Estudio de la neurotoxicidad de péptidos amiloides y  
proteína tau asociados a demencias humanas en el  
sistema nervioso de *Drosophila*”

Tesis presentada para optar al título de Doctora en Ciencia y Tecnología de la  
Universidad Nacional de Quilmes.

Lic. Nadia Irina Bocai

Director de tesis: Eduardo M. Castaño

Co-Directora de tesis: Dra. María Silvina Marcora

Consejero de estudios: Dr. Sebastián Fernández Alberti

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

Buenos Aires, junio 2019.

## Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a CONICET por financiar mi trabajo durante el desarrollo de mi doctorado y a UNQui por abrirme nuevamente las puertas permitiéndome ser parte de su notable comunidad.

Agradezco a Eduardo Castaño por recibirme en su laboratorio, por su dirección y enseñanzas.

A Laura Morelli le agradezco profundamente todo el apoyo que me brindó y su constante ayuda en todo lo que estuvo a su alcance.

A mis compañeros de laboratorio, Caro, Pame, Lautaro, Silcho, Pablo, Fede y Gise, les agradezco la complicidad, la amistad, la ayuda experimental y las risas que hicieron de mis momentos en el laboratorio 104 recuerdos felices. Afortunadamente puedo decir que encontré grandes amigos en este laboratorio que sin duda formarán parte del resto de mi vida.

Especialmente quiero reconocer y agradecer el apoyo y las enseñanzas que María Silvina Marcora (Silcho) me brindó durante todos estos años. Además de ser una gran compañera, fue una guía fundamental para el desarrollo de mi tesis y estoy inmensamente agradecida por todo lo que hizo por mí.

A todos los "Amigos del *Flyroom*", un grupo de personas hermosas que se ayuda y apoya constantemente; grandes científicos que además fueron parte de los momentos más divertidos en estos años.

A los laboratorios 102, 106 y 107/8, por su ayuda desinteresada y risas de almuerzos y pasillos.

A mi comité de seguimiento de tesis: Alejandro Rabossi, Fernando Pitossi y Martín Arán por sus sugerencias y consejos.

A la comunidad FIL: investigadores, becarios, técnicos, personal de administración, mantenimiento, biblioteca, droguero y limpieza, que hacen del Instituto un lugar excelente para trabajar.

Agradezco a todos mis amigos y familia que, aunque a veces entendían poco lo que significa llevar adelante un doctorado, me acompañaron e incentivaron. Su presencia en mi vida es fundamental para mis logros.

Finalmente le agradezco a mi marido, Dami, que tampoco entiende bien qué hago, por qué lo hago, ni cómo lo hago, pero basta el amor que nos une para que siempre me ayude y me apoye en mis decisiones, calmando ansiedades y frustraciones, acompañándome día a día para seguir avanzando y haciendo mi vida aún más feliz cada vez.

*A mi familia, en especial a mis padres,  
que me apoyan con todo  
lo que está a su alcance.*

*A Dami, que me acompaña incondicionalmente.*

Parte de los resultados de esta tesis doctoral fueron publicados en:

**“Endoplasmic Reticulum Stress in Tauopathies: Contrasting Human Brain Pathology with Cellular and Animal Models”** Bocai NI, Marcora MS, Belfiori-Carrasco LF, Morelli L, Castaño EM. J Alzheimers Dis. 2019;68(2):439-458. doi: 10.3233/JAD-181021.

## Índice

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	12
<b>1. Enfermedades neurodegenerativas asociadas a la acumulación de proteínas</b> .....	13
1.1. Proteínas amiloides y neurotoxicidad .....	13
1.2. Demencias asociadas a la acumulación de amiloides .....	15
1.2.1. <i>Enfermedad de Alzheimer (EA)</i> .....	16
1.2.2. <i>Demencia Familiar Danesa (DFD)</i> .....	20
1.2.3. <i>Patología asociada a tau</i> .....	24
<b>2. Evidencias sobre la relación neurotóxica entre A<math>\beta</math> y tau y sobre efectos tóxicos de ADan. Antecedentes en cultivos celulares y modelos animales</b> .....	28
2.1. Estudios sobre la relación neurotóxica entre A $\beta$ y tau en cultivos celulares y modelos animales.....	28
2.1.1 <i>Estudios en cultivos celulares</i> .....	28
2.1.2 <i>Estudios en modelos animales vertebrados</i> .....	29
2.1.3 <i>Estudios en modelos animales invertebrados</i> .....	31
2.2. Estudios sobre la toxicidad de ADan en cultivos celulares y modelos animales .....	33
<b>3. Estrés de retículo endoplásmico y respuesta a proteínas mal plegadas</b> .....	34
3.1. Evidencias de la activación de UPR asociada a la toxicidad de A $\beta$ y tau .....	37
<b>4. <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo animal</b> .....	38
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	42
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	44

1. Cría y mantenimiento de <i>Drosophila</i> .....	45
2. Manipulación de las moscas .....	45
<i>Selección de los individuos: Cromosomas balanceadores.</i> .....	46
3. Líneas utilizadas .....	47
<i>Combinaciones de mutantes y líneas recombinantes</i> .....	48
4. Genotipificación de las líneas transgénicas .....	49
<i>Extracción de ADN</i> .....	49
<i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i> .....	49
5. SDS-PAGE y <i>Western blot</i> .....	50
<i>Extracción de proteínas</i> .....	50
<i>Corrida electroforética en condiciones desnaturalizantes y Western blot</i> ..	50
6. Inmunofluorescencia en cerebros de moscas adultas .....	52
7. Ensayo de longevidad.....	53
8. Geotaxis negativa ( <i>Rapid Iterative Negative Geotaxis</i> , RING).....	54
9. Extracción secuencial de proteínas .....	55
10. Cuantificación de ARN mensajeros .....	56
<i>Extracción de ARN</i> .....	56
<i>Retrotranscripción</i> .....	56
<i>PCR en Tiempo Real</i> .....	56
11. Activación de la vía IRE1/XBP1 .....	57
12. Análisis estadísticos.....	58
<b>RESULTADOS</b> .....	59
<b>Capítulo 1. Caracterización de la sobre-expresión del amiloide ADan y comparación del efecto de la disminución de tau endógena de Dm al sobre-expresar ADan y A<math>\beta</math></b> .....	60

1.1. Efectos de la sobre-expresión de ADan en Sistema Nervioso (SN) de Dm .....	60
1.2. Efecto de la sobre-expresión de ADan en el SN sobre tau endógena de Dm .....	66
1.3. Relación entre la toxicidad de ADan en SN y tau endógena de Dm ...	68
1.4. Relación entre la toxicidad de A $\beta$ en SN y tau endógena de Dm.....	77
<b>Conclusiones del capítulo 1 .....</b>	<b>80</b>
<b>Capítulo 2. Sobre-expresión neuronal de tau humana y co-expresión con los péptidos amiloides ADan y A<math>\beta</math> en Dm .....</b>	<b>81</b>
2.1 Efecto de la sobre-expresión de tau humana en el SN de Dm .....	81
2.2. Efecto de la co-expresión de ADan y tau humana en SN de Dm.....	83
2.3. Efecto de la co-expresión de A $\beta$ y tau humana en SN de Dm .....	84
<b>Conclusiones del capítulo 2 .....</b>	<b>86</b>
<b>Capítulo 3. Activación de UPR al sobre-expresar ADan, A<math>\beta</math> y tau .....</b>	<b>87</b>
3.1. Activación de UPR asociada a la sobre-expresión de A $\beta$ y ADan .....	87
3.2. Modulación de la vía de IRE1 en las moscas que sobre-expresan ADan .....	91
3.3. Efecto de la sobre-expresión de tau humana en la vía de IRE1 .....	95
3.4. Modulación de la vía de PERK en las moscas que sobre-expresan tau humana .....	97
<b>Conclusiones del capítulo 3 .....</b>	<b>99</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>100</b>
Efectos de la sobre-expresión de ADan en Sistema Nervioso (SN) de Dm .....	101
Efecto de la sobre-expresión de ADan en el SN sobre tau endógena de Dm. ....	104

Relación entre la toxicidad de ADan en SN y tau endógena de Dm .....	105
Efecto de la sobre-expresión de tau humana en SN de Dm .....	108
Activación de las distintas vías de UPR asociada a la sobre-expresión de A $\beta$ y ADan.....	110
Modulación de la vía de IRE1 en las moscas que sobre-expresan ADan	113
Efecto de la sobre-expresión de tau humana en la vía de IRE1. ....	114
Modulación de la vía de PERK en las moscas que sobre-expresan tau humana .....	115
<b>Conclusiones generales</b> .....	117
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	118

## Abreviaturas

aa, aminoácidos

ADanPP, proteína precursora de ADan

ADN, ácido desoxirribonucleico

ADNasa, desoxirribonucleasa

ADNc, ADN complementario

APOE, apolipoproteína E

APP, proteína precursora del amiloide- $\beta$

Appl, símil precursor de la proteína  $\beta$ -amiloide

ARN, ácido ribonucleico

ARNm, ARN mensajero

ARNi, ARN de interferencia

ATF4, factor de transcripción 4

ATF6, activación del factor de transcripción 6

BACE,  $\beta$ -secretasa

BiP, proteína inmunoglobulina de unión

BDSC, Centro repositor de *Drosophila* de Bloomington

CBD, degeneración corticobasal

CO<sub>2</sub>, dióxido de carbono

DFB, Demencia Familiar Británica

DFD, Demencia Familiar Danesa

dNTP, desoxirribonucleótidos trifosfato

DTT, ditioneitol

Dm, *Drosophila melanogaster*

dTau, proteína tau de *Drosophila*

EA, Enfermedad de Alzheimer

EAE, Enfermedad de Alzheimer Esporádica

EAF, Enfermedad de Alzheimer Familiar

EDTA, ácido etilendiaminotetraacético

EGFP, proteína verde fluorescente mejorada

EGTA, ácido trietilenglicoldiaminatetraacético

eIF2 $\alpha$ , factor de iniciación de la traducción eucariótica 2 $\alpha$

ERAD, degradación asociada al retículo endoplásmico

ERSE, elementos de estrés del retículo endoplásmico

FTDP-17, Demencia Frontotemporal con Parkinsonismo asociada al cromosoma 17

GADD34, detención del crecimiento y proteína inducible por daños en el ADN 34 kDa

GDP, guanosina difosfato

GTP, guanosina trifosfato

HCl, ácido clorhídrico

HPR, peroxidasa de rábano

HSP, buffer de alto contenido de sal

hTau, proteína tau humana

IRE1, inositol que requiere enzima 1

KCl, cloruro de potasio

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, fosfato monopotásico

MAPs, proteínas asociadas a microtúbulos

NaCl, cloruro de sodio

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, fosfato disódico

oligodT, secuencia monocatenaria de desoxitima

PBS, buffer fosfato salino

PBS-T, PBS con tween

PBS-Tx, PBS con tritón

PCR, reacción en cadena de la polimerasa

PERK, quinasa de retículo endoplásmico similar a PKR

PFA, paraformaldehído

PiD, enfermedad de Pick

PHF, filamentos helicoidales pareados

PMSF, fluoruro de fenilmetilsulfonilo

pS262, fosfo-serina 262

PSN1, presenilina 1

PSN2, presenilina 2

PSP, parálisis supranuclear progresiva

PVDF, fluoruro de polivinilideno

RE, retículo endoplásmico

RIDD, regulación del decaimiento del ARNm dependiente de IRE1

RING, geotaxis negativa iterativa rápida

RIPA, buffer del ensayo de radioinmunoprecipitación

SDS, dodecilsulfato sódico

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

SNC, sistema nervioso central

SN, sistema nervioso

TA, temperatura ambiente

TBS, buffer salino con tris

TBS-T, TBS con tween

TEMED, tetrametiletilendiamina

UAS, secuencia de activación río arriba

UPR, respuesta a proteínas mal plegadas

VDRC, centro de recursos *Drosophila* de Vienna

XBP1, caja-X de unión a la proteína-1

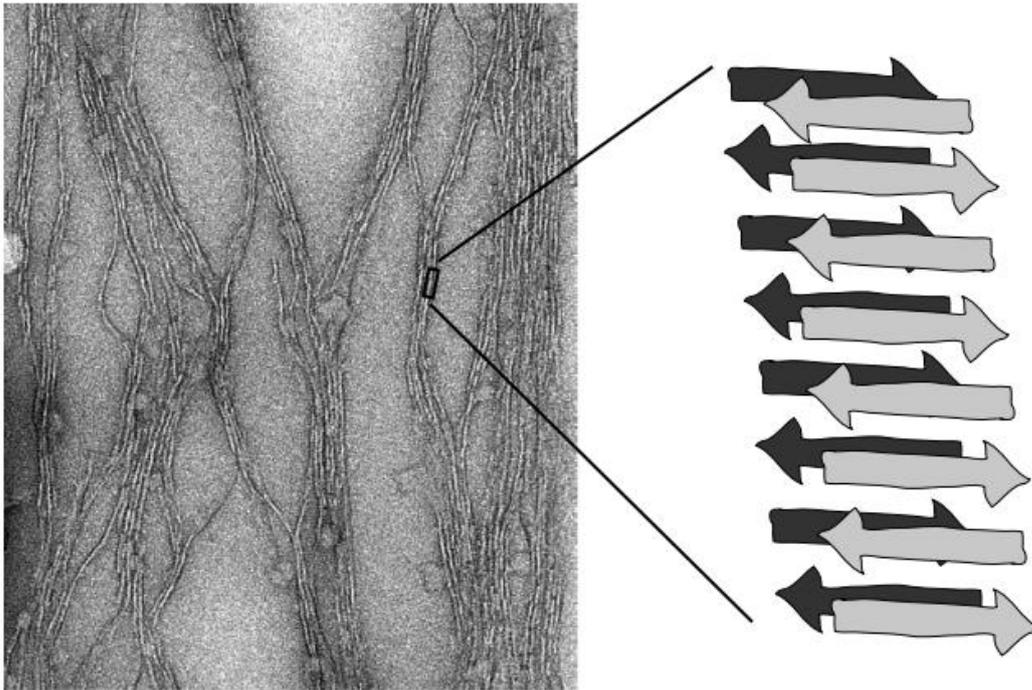
# INTRODUCCIÓN

## **1. Enfermedades neurodegenerativas asociadas a la acumulación de proteínas**

La acumulación progresiva de proteínas mal plegadas en el Sistema Nervioso Central (SNC) está asociada a la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas humanas. Entre ellas se destacan la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, las demencias frontotemporales, la esclerosis lateral amiotrófica y la enfermedad de Huntington<sup>1</sup>. Más allá de las especificidades de cada enfermedad, éstas presentan cambios neuropatológicos en común: i) la disrupción de circuitos sinápticos y muerte neuronal, ii) la selectividad del daño neuronal, ya que algunos grupos neuronales son especialmente vulnerables a la acumulación de proteínas específicas y iii) los síntomas y signos de cada enfermedad están asociados a esta vulnerabilidad diferencial<sup>2</sup>. Las enfermedades neurodegenerativas más frecuentes presentan una dicotomía etiológica, con formas familiares relativamente raras, por un lado, y formas esporádicas multifactoriales más frecuentes, por el otro. Se ha propuesto que podrían existir uno o varios denominadores comunes genéticos y mecanísticos involucrados en el proceso de neurodegeneración<sup>3</sup>.

### **1.1. Proteínas amiloides y neurotoxicidad**

En algunas enfermedades neurodegenerativas las proteínas se acumulan de manera intra o extra neuronal formando fibras amiloides. Los amiloides son agregados proteicos altamente ordenados de estructura filamentosa que se ensamblan en fibras no ramificadas, con diámetros de 6 a 12 nm y longitudes de hasta varios micrómetros. La “unidad estructural” que se repite en esos filamentos es una o más hebras- $\beta$  de un polipéptido, que se unen unas a otras a través de puentes de hidrógeno, formando láminas orientadas perpendicularmente al eje mayor de la fibra. A pesar de las grandes diferencias en el tamaño, la estructura nativa y la función de las proteínas amiloidogénicas, todas las fibras amiloides muestran un patrón característico de difracción de rayos X llamado “conformación  $\beta$  cruzada” que refleja la estructura básica de las mismas (figura 1)<sup>4</sup>.



**Figura 1. Estructura de los amiloides.** Microscopía electrónica de transmisión de un péptido amiloide y un esquema representativo de láminas- $\beta$  cruzadas, dónde cada flecha representa las hebras- $\beta$  de cada péptido o proteína. Tomado de Greenwald et al., 2018 <sup>5</sup>.

Para su identificación histológica o *in vitro*, se utiliza la tinción con rojo Congo, que muestra birrefringencia verde cuando los preparados se observan bajo luz polarizada<sup>6</sup>; también se utiliza tioflavina T o S, que al unirse con los amiloides muestran un máximo de emisión de fluorescencia a 482 nm y 426 nm, respectivamente, pero son menos específicas que la tinción con rojo Congo<sup>7</sup>.

Un concepto ampliamente aceptado en la formación de fibras amiloides es el modelo de polimerización dependiente de la nucleación, que separa el proceso de fibrilación en una fase de nucleación y una fase de alargamiento. La nucleación requiere el ensamblado de monómeros solubles, que ocurre al azar y es termodinámicamente desfavorable. En la fase de nucleación, los monómeros experimentan cambios conformacionales y se asocian para formar núcleos oligoméricos que son ricos en láminas  $\beta$ . Una vez que se forma el núcleo se favorece el ensamblaje de monómeros y el alargamiento de oligómeros y fibrillas que se desarrolla rápidamente hasta llegar a una fase estacionaria<sup>8</sup>.

Con respecto a las enfermedades neurodegenerativas, en los últimos 15 años se ha acumulado evidencia que sugiere que las formas oligoméricas de las proteínas que se acumulan son más tóxicas que las fibrilares. El o los mecanismos a través de los cuales ejercen su toxicidad no están bien definidos y son objeto continuo de estudio. Entre ellos se propuso que las especies oligoméricas extracelulares interactúan con receptores de membrana y activan distintas vías de señalización que promueven la disfunción neuronal; también que los oligómeros forman canales de membrana que alteran la homeostasis del calcio y finalmente, que la acumulación intracelular de oligómeros afecta a distintos procesos celulares como la degradación por el sistema ubiquitina-proteasoma, autofagia y función mitocondrial<sup>9-11</sup>.

## **1.2. Demencias asociadas a la acumulación de amiloides**

La demencia es un síndrome crónico y progresivo, causado por patologías del cerebro, en las que ocurre un deterioro en las funciones cognitivas, incluyendo la memoria y el aprendizaje, el pensamiento, la orientación, el lenguaje, el juicio, entre otras. El principal factor de riesgo es la edad, con una prevalencia que se duplica cada cinco años, a partir de los 65 años. Los casos que se manifiestan antes de esa edad son la minoría (2%) y en general están asociados a mutaciones. En los casos esporádicos, las causas aún no se conocen, pero se considera que la interacción entre factores genéticos y ambientales son fundamentales para su inicio<sup>12</sup>.

Actualmente cerca de 50 millones de personas en todo el mundo padecen algún tipo de demencia y se estima que este número aumente hasta los 152 millones de personas hacia 2050. Cerca de dos tercios del total de los pacientes con demencia padecen enfermedad de Alzheimer (EA)<sup>13</sup>. Sin embargo, existen otras enfermedades menos frecuentes que comparten características con la EA y cuya comparación resulta de interés para poder entender mecanismos de toxicidad comunes entre las demencias asociadas a amiloides. A continuación, se expondrán las características patológicas de la EA y de una enfermedad poco frecuente llamada Demencia Familiar Danesa. Se desarrollará en otro apartado la patología asociada a la proteína tau, ya que

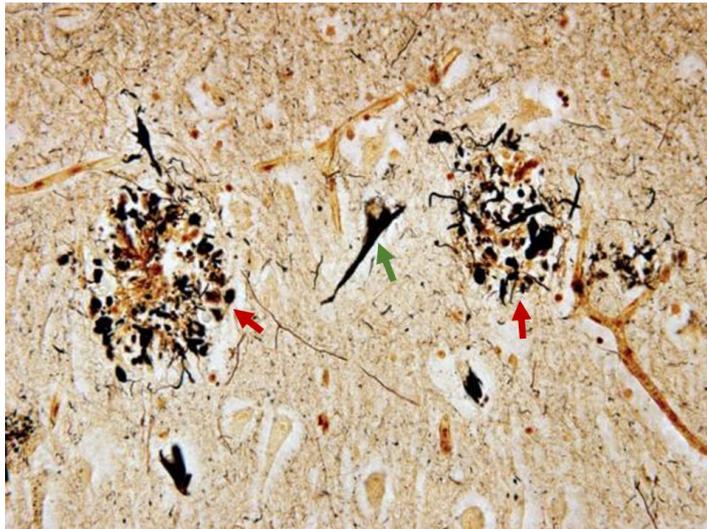
su acumulación anormal intraneuronal es un factor en común de ambas enfermedades.

### 1.2.1. Enfermedad de Alzheimer (EA)

La EA fue descrita por primera vez en 1906 en una reunión de psiquiatras de Alemania donde Aloysius Alzheimer expuso la clínica y la neuropatología de una paciente con demencia<sup>14</sup>. Más de un siglo después todavía no se conocen las causas, ni existen tratamientos efectivos.

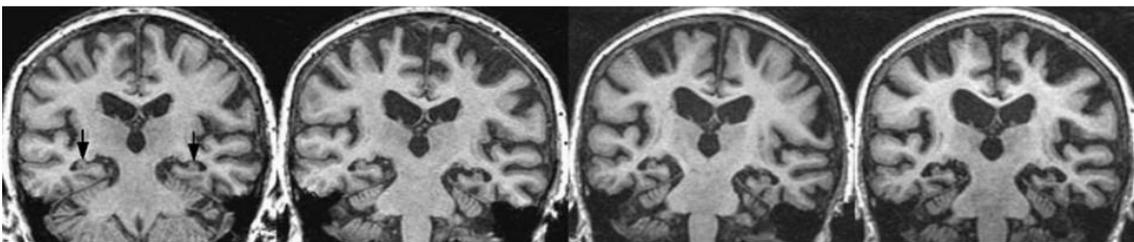
La sintomatología comienza con fallas leves en la memoria (deterioro cognitivo leve), que a veces son difíciles de notar para el entorno del paciente, y lentamente progresa hasta llegar a ser incapacitante. En etapas avanzadas, además de la pérdida de memoria, los síntomas incluyen alteración del lenguaje, alteraciones visuo-espaciales, desorientación, agitación y alucinaciones. La causa de muerte en los pacientes que sufren EA suele relacionarse a inanición, desnutrición o neumonía. La duración clínica típica de la enfermedad es de ocho a diez años, con un rango de uno a 25 años<sup>15</sup>.

Las lesiones cerebrales que constituyen la firma distintiva de la enfermedad son: (a) placas neuríticas, que son lesiones extracelulares aproximadamente esféricas de entre 10 y 100  $\mu\text{m}$ , compuestas principalmente por depósitos de amiloide  $A\beta$  y prolongaciones neuronales distróficas, (b) ovillos neurofibrilares, que son depósitos citoplásmicos intraneuronales de proteína tau hiperfosforilada en forma de filamentos helicoidales pareados (ver sección “patología asociada a tau”, página 24), (c) depósitos de  $A\beta$  en la vasculatura cerebral, y (d) pérdida sináptica<sup>16</sup>. (Figura 2).



**Figura 2. Histopatología de la EA.** Fotomicrografía de la corteza temporal de un paciente con EA (tinción con plata de Bielschowski modificada; aumento 400X). Se muestran dos placas neuríticas (flechas rojas) con un ovillo neurofibrilar entre ellas (flecha verde). Modificado de Pearl, et al., 2010 <sup>17</sup>.

La pérdida sináptica y neuronal provoca una disminución progresiva del tejido cerebral que se puede visualizar a través de resonancia magnética nuclear (figura 3).



**Figura 3. Imagen de resonancia magnética de un paciente con EA.** Progresión de la atrofia cerebral año a año. A la izquierda se señala con flechas el hipocampo. Tomado de Lehericy, et al., 2007 <sup>18</sup>.

Es importante destacar que la acumulación de A $\beta$  y de tau en el cerebro es un proceso común a edades avanzadas y que existen individuos con placas amiloides y ovillos neurofibrilares que no son dementes<sup>19</sup>. Es posible que factores de riesgo modificables estén relacionados con la “resistencia” de estos individuos a padecer EA. Entre estos se destacan la actividad física, prevención de factores de riesgo cardiovasculares (como diabetes, tabaquismo, obesidad, hipertensión y/o hiperlipidemia), una dieta saludable y el entrenamiento

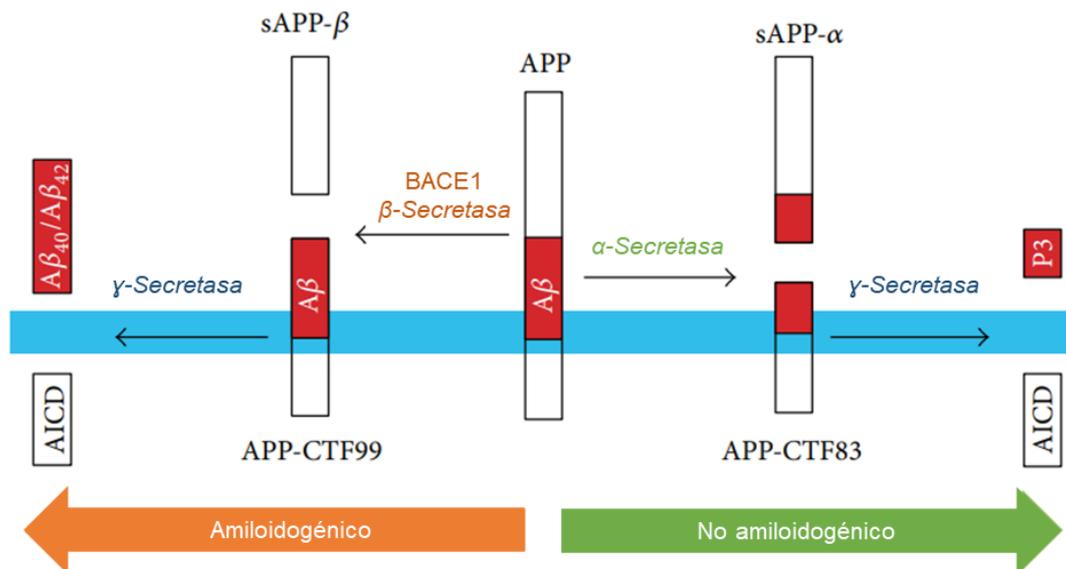
intelectual<sup>20</sup>. También podrían existir mecanismos compensatorios aún desconocidos.

La mayoría de los casos esporádicos de EA (EAE), son de inicio tardío (más de 65 años) y no están asociados a mutaciones dominantes. Actualmente se postula que la susceptibilidad a padecer EAE está asociada a numerosos factores de riesgo genéticos de frecuencia relativamente alta, pero de baja penetrancia con un tamaño de efecto pequeño. La suma de estos factores de riesgos genéticos de baja penetrancia y el estilo de vida, podrían ser predictores del desarrollo de la enfermedad<sup>3</sup>. Sin embargo, se destaca el alelo 4 de la apolipoproteína E (*ApoE*), que es el factor de riesgo genético más importante en EAE. La penetrancia del alelo *ApoE4* es incompleta pero el tamaño del efecto es grande. Se ha estimado que el riesgo de padecer EAE es de 3-4 veces en los hemicigotas y de 10-12 veces en homocigotas para dicho alelo<sup>21</sup>.

Por otro lado, cerca de un 5% de los casos de EA están asociados a mutaciones con transmisión mendeliana y conforman los llamados casos “familiares” (EAF). Éstos son de inicio temprano (antes de los 60 años) y comprenden mutaciones en los genes que codifican la proteína precursora de amiloide (APP), presenilina 1 (PSN1) y presenilina 2 (PSN2). Las mutaciones asociadas a la EAF enfocan al péptido A $\beta$  y/o al procesamiento celular de APP, como factores principales en el desarrollo de la enfermedad. Además, existe un vínculo entre la EA y el Síndrome de Down, siendo altamente probable que personas que presenten trisomía del cromosoma 21, que incluye al gen de APP, desarrollen Alzheimer alrededor de los 40 años<sup>22</sup>.

Como se ilustra en la figura 4, APP es una proteína transmembrana de tipo I que puede ser procesada por dos vías, una que conduce a la producción del péptido A $\beta$  (amiloidogénica) y otra que no (no amiloidogénica). En la vía no amiloidogénica, APP es cortada por  $\alpha$ -secretasa y luego por  $\gamma$ -secretasa, liberándose tres fragmentos: sAPP $\alpha$ , AICD (del inglés “*APP intracelular domain*”) y p3. En la vía amiloidogénica, APP es primero cortada por BACE1 (del inglés “ *$\beta$ -secretase APP cleaving enzyme 1*”) y luego por  $\gamma$ -secretasa, liberando también tres fragmentos: sAPP $\beta$ , AICD y A $\beta$ <sup>23</sup>. Dependiendo del sitio

de corte de  $\gamma$ -secretasa, el péptido  $A\beta$  puede tener distintas longitudes, entre 38 y 43 aminoácidos (aa)<sup>24</sup>. A pesar de que se ha estudiado durante años, las funciones de APP y de los fragmentos liberados luego de su procesamiento se desconocen. Se ha sugerido un papel de APP en el crecimiento de neuritas y la sinaptogénesis, el tráfico de proteínas neuronales a lo largo del axón, la transducción de señales transmembrana, la adhesión celular y el metabolismo del calcio, entre otros <sup>25,26</sup>.



**Figura 4. Procesamiento de APP.** La proteína transmembrana APP puede procesarse por la vía amiloidogénica (flecha naranja) o por la vía no amiloidogénica (flecha verde). En la figura se representan los distintos sitios de corte de cada enzima y el nombre de los fragmentos que se liberan. Modificado de Pająk, et al., 2016 <sup>27</sup>.

Las mutaciones en el gen APP pueden alterar la secuencia primaria de  $A\beta$ , aumentar la producción de  $A\beta$  total, o dar como resultado ciertas formas particularmente amiloidogénicas de  $A\beta$ <sup>28</sup>. Presenilina 1 y 2 contienen los sitios catalíticos del complejo  $\gamma$ -secretasa, y mutaciones en la misma impactan en el procesamiento de APP, favoreciendo la producción de la isoforma  $A\beta_{42}$  por sobre  $A\beta_{40}$ , siendo la primera el principal componente de las placas amiloides<sup>29</sup>.

En la década del noventa se planteó la llamada “Hipótesis de la cascada amiloide”, que ha influenciado fuertemente la investigación sobre EA. La misma propone que la acumulación del péptido  $A\beta$  induce neurotoxicidad y formación

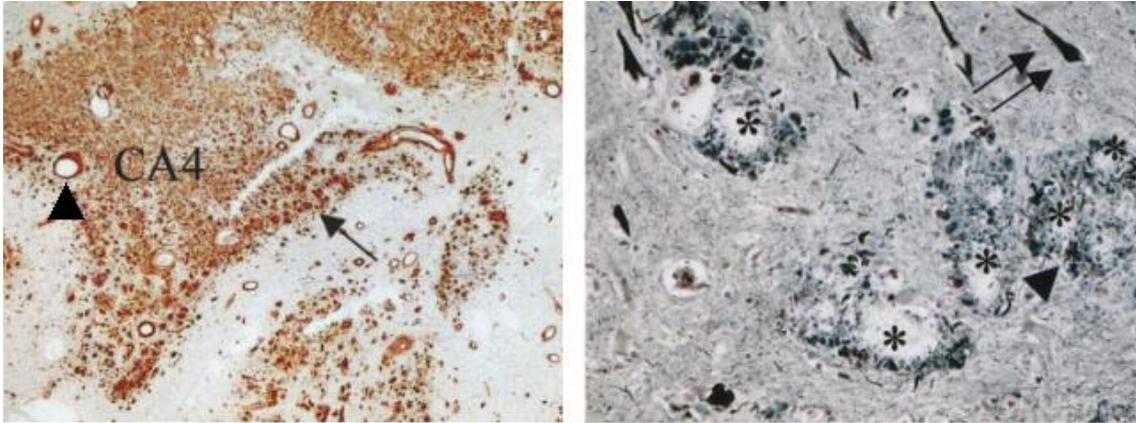
de ovillos neurofibrilares, llevando a la muerte neuronal y posteriormente a la demencia<sup>28,30</sup>. Sin embargo, esta hipótesis ha recibido numerosas críticas debido a que muchas evidencias parecen no encajar en lo propuesto. Entre ellas se destaca el hecho de que la localización y magnitud de los depósitos amiloides en el cerebro no correlacionan con el grado de deterioro cognitivo que manifiesta el paciente, mientras que la acumulación de ovillos neurofibrilares sí<sup>31</sup>. A pesar de las críticas, no se ha planteado una hipótesis alternativa que sea sustentada por la evidencia disponible.

En este escenario, dónde las causas y la secuencia de los eventos que determinan al desarrollo de la EA no se conocen, se han llevado a cabo numerosos ensayos clínicos que han fracasado. Desde 1998, 100 medicamentos han sido probados y solo cuatro han sido autorizados para su uso. Estas drogas, que aumentan la disponibilidad de acetilcolina o disminuyen el efecto neurotóxico mediado por glutamato, pueden ayudar a controlar algunos de los síntomas de la demencia de manera parcial y transitoria pero no modifican el curso de la enfermedad<sup>13</sup>. Últimamente, se han enfocado las investigaciones en el descubrimiento de marcadores tempranos de la enfermedad, para poder tratarla en estadios previos al desarrollo de la patología severa e irreversible<sup>32</sup>. Sin embargo, mientras no se conozcan los mecanismos exactos que desembocan en el desarrollo de la enfermedad será muy difícil encontrar tratamientos para evitar o retardar su progresión.

### 1.2.2. Demencia Familiar Danesa (DFD)

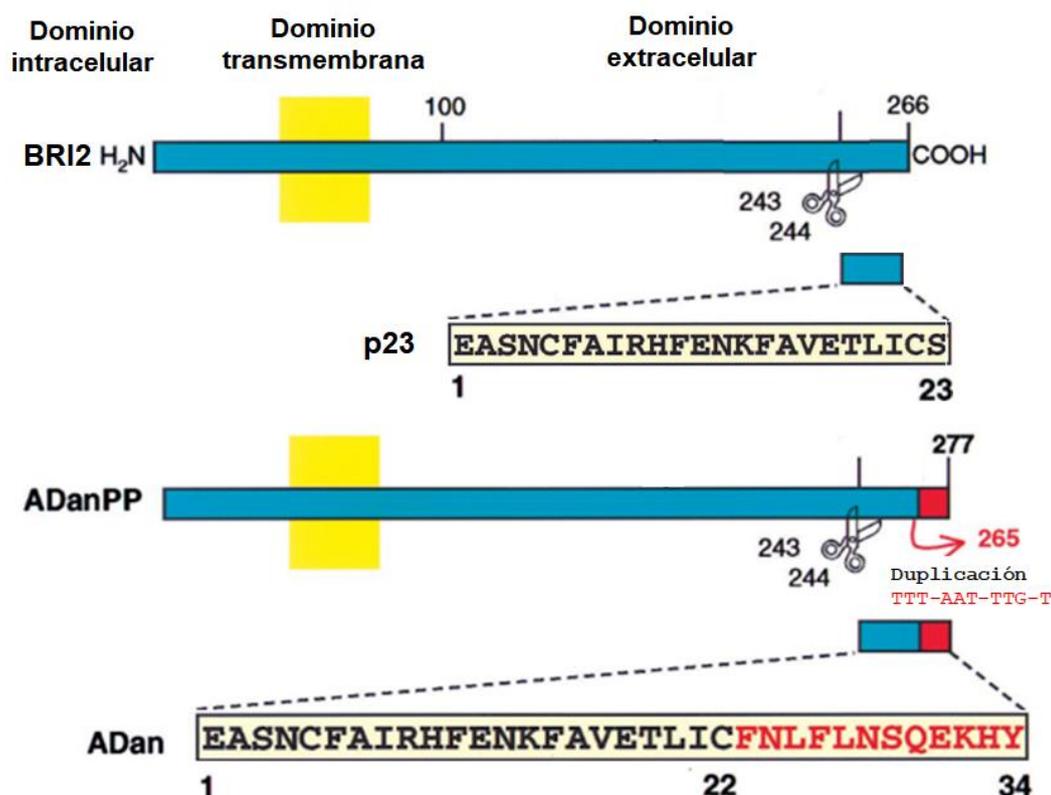
La DFD, también llamada heredopatía oftalmo-encefálica, fue descrita por primera vez por Strömngren y colaboradores en 1970, a partir de nueve individuos de tres generaciones en una familia danesa. Se caracteriza por el desarrollo antes de los 30 años de cataratas y otros desórdenes oculares (incluyendo hemorragias), seguido de discapacidad auditiva, luego de 10 a 20 años. Poco después de los 40 años de edad, se evidencia ataxia cerebelosa, seguida de psicosis paranoide y, 10 años después, demencia progresiva. La mayoría de los pacientes muere cerca de los 50-60 años. Al igual que ocurre en los pacientes con EA, el cerebro sufre atrofia general con presencia de acumulación de un péptido amiloide (en este caso es llamado ADan) y ovillos

neurofibrilares compuestos por la proteína tau, principalmente en el hipocampo (Figura 5)<sup>33</sup>.



**Figura 5. Histopatología de la DFD.** Fotografías de hipocampo de un paciente con DFD. Izquierda: Inmunohistoquímica con anticuerpo específico contra Aβ<sub>42</sub>; aumento 5X. La flecha indica placas con estructura bien definida, aunque predominan estructuras difusas (arriba). La punta de flecha señala un vaso sanguíneo cargado de amiloide. Derecha: tinción con plata de Bielschowski; aumento 60X. Se muestran ovillos neurofibrilares (flecha doble) y neuritas distróficas (punta de flecha) rodeando vasos sanguíneos (asteriscos). Modificado de Holton, et al., 2002 <sup>34</sup>.

El origen genético de la enfermedad es una duplicación de 10 nucleótidos en el gen que codifica a la proteína BRI2 (también conocida como ITM2B), ubicado en el cromosoma 13, que produce la pérdida de un codón de *stop*, traduciéndose una proteína de 277 aa, en lugar de los 266 aa que corresponden a la proteína silvestre. Luego de la proteólisis de la proteína precursora mutante (ADanPP), se libera el péptido amiloide ADan, de 34 aa (figura 6). A diferencia de lo que ocurre en EA, no se conocen casos que presenten acumulación del péptido ADan en el cerebro y no padezcan la enfermedad DFD.

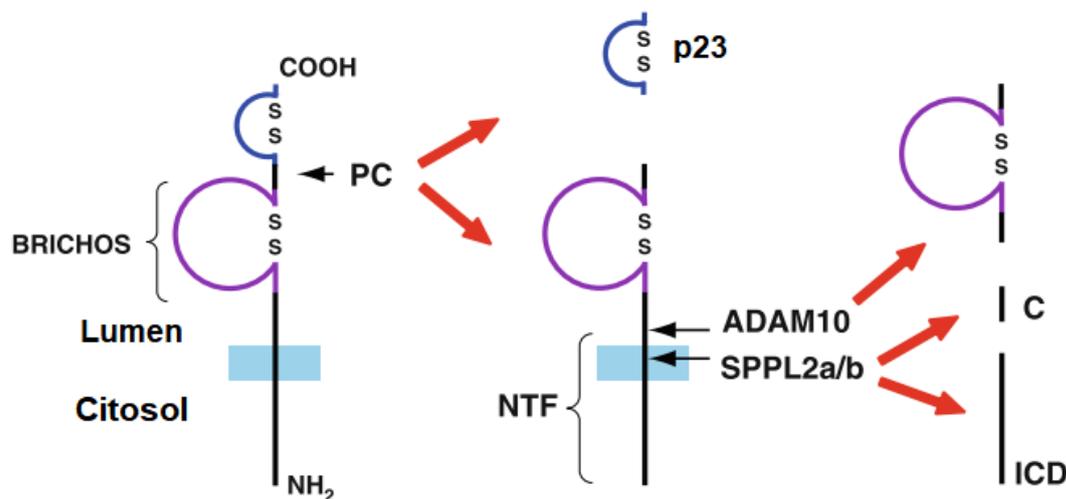


**Figura 6. Representación de la proteína BRI2 y de la proteína precursora del amiloide ADan (ADanPP).** Ambas proteínas tienen un dominio transmembrana y son cortadas entre los aa 243 y 244, liberando péptidos de distinto tamaño (23 aa y 34 aa, respectivamente) que son idénticas en los primeros 22 aa. En rojo se destaca la secuencia de aminoácidos producto de la pérdida del codón de terminación. En este trabajo nombramos “p23” al péptido de 23 aa que se libera luego de la proteólisis de la proteína BRI2 silvestre. Modificado de R. Vidal et al., 2000<sup>34</sup>.

La función de BRI2 todavía no se conoce, aunque se ha sugerido un rol en transporte y crecimiento axonal, a raíz de su localización<sup>36</sup>. También, la secuencia de esta proteína transmembrana tipo II, incluye un dominio BRICHOS, cuya función podría estar relacionada con la asistencia en el procesamiento de otras proteínas, incluyendo APP, o una especie de chaperona intramolecular<sup>37</sup>. Es destacable que BRI2 interactúa con APP de manera que inhibe la producción de A $\beta$  *in vivo*<sup>38</sup>.

Estudios en cultivos celulares indican que furina es la pro-proteinconvertasa más eficiente para realizar el corte de BRI2 y las variantes mutantes, entre los aa 243 y 244, para liberar la sección carboxilo-terminal<sup>39</sup>. Sin embargo, otros estudios *in vitro* indican que la proteólisis ocurre en *cis*- o *medio*-Golgi, y no en

*trans*- donde predomina la actividad furina, sugiriendo que otra pro-teínconvertasa sería la encargada del corte. Una vez cortada la sección carboxilo-terminal, el resto de la proteína es separada en tres partes: el corte de SPPL2a/b libera el dominio intracelular (ICD) y el corte de ADAM10 libera el dominio BRICHOS y un péptido de bajo peso molecular que es secretado (C). Se ha demostrado que el segmento carboxilo-terminal es liberado al espacio extracelular a través de la vía secretoria<sup>40</sup>. En la figura 7 se esquematiza el procesamiento propuesto para BRI2.



**Figura 7. Procesamiento de BRI2.** El corte de una pro-teínconvertasa (PC) libera un péptido de 23 aminoácidos (p23). El procesamiento por ADAM10 en el ectodominio de BRI2 libera el dominio BRICHOS y un fragmento N-terminal (NTF). El procesamiento adicional del fragmento unido a la membrana por SPPL2a/SPPL2b libera un dominio intracelular (ICD) y un péptido C-terminal de bajo peso molecular que es secretado (C). Se indican los bucles unidos por puente disulfuro en el dominio BRICHOS y en el extremo carboxilo de BRI2. Modificado de Garringer, et al., 2010<sup>41</sup>.

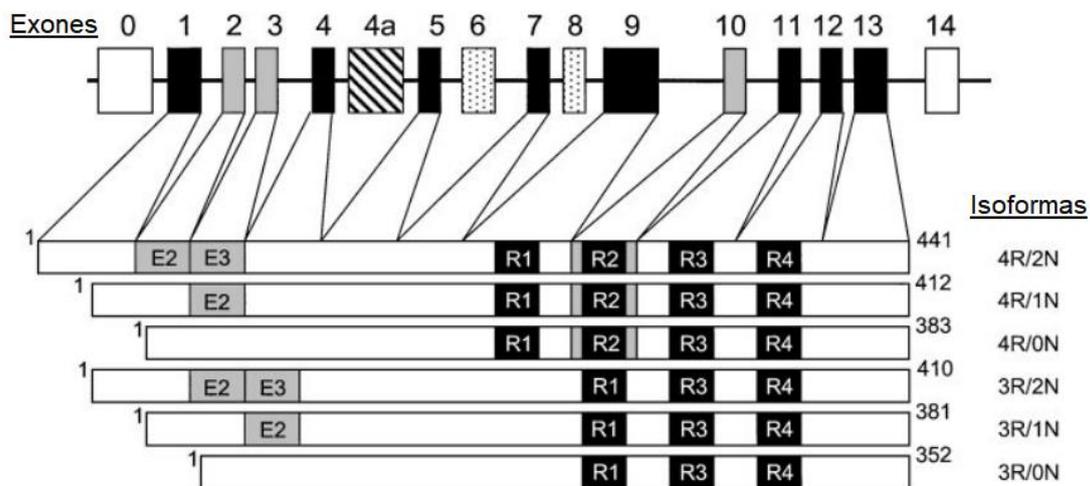
Cabe destacar que existe otra enfermedad asociada a una mutación en el gen *bri2*, llamada Demencia Familiar Británica (DFB). Esta enfermedad comienza cerca de los 50 años de edad, y la sintomatología se caracteriza por el desarrollo de demencia progresiva, espasticidad y ataxia cerebelosa. En este caso se detectó una mutación puntual (T→A267) que elimina el codón de *stop* de BRI2. Lo interesante es que la proteína traducida tiene el mismo número de aa que ADanPP, y al ser proteolizada en el mismo sitio que BRI2 y ADanPP, se libera un péptido de 34 aa (ABri), que es idéntico a ADan en los primeros 22

aa<sup>42</sup>. Ambas enfermedades presentan características en común, entre ellas una angiopatía amiloide grave en el cerebro y el cerebelo, con placas extensas en el hipocampo que incluyen placas no neuríticas y ovillos neurofibrilares. Sin embargo, al contrario de lo que ocurre con ABri, la mayoría de los depósitos de amiloide ADan son negativos para la tinción rojo de Congo (salvo los vasculares o en la zona subpial), indicando el predominio de una estructura no fibrilar. También se detectó co-inmunoreactividad de A $\beta$  con ADan (y no con ABri), principalmente en la zona perivascular de los cerebros de pacientes con DFD<sup>34,35</sup>. Los estudios *in vitro* con péptidos sintéticos indican que ADan tiene gran capacidad de agregarse, aunque con una cinética más lenta que ABri<sup>43</sup>. Además, la variante con la modificación postranscripcional piroglutamato en la región amino-terminal presenta mayor capacidad de oligomerización y es más tóxica. Por su parte, p23 no oligomeriza ni mostró toxicidad alguna<sup>44</sup>.

Al igual que en la EA, no ocurre una superposición completa de la patología de tau y de ADan, que indicaría que, aunque los depósitos de amiloide (en EA) y preamiloide (en DFD) son de suma importancia, el mecanismo de neurodegeneración es complejo y probablemente implica factores adicionales y/o interrelaciones entre diferentes vías celulares. El hecho de que ocurra formación de ovillos neurofibrilares sin formación previa de fibras amiloides podría indicar que la patología de tau está asociada a formas oligoméricas solubles de los péptidos amiloidogénicos. Alternativamente, las dos proteinopatías podrían ocurrir por mecanismos independientes.

### 1.2.3. Patología asociada a tau

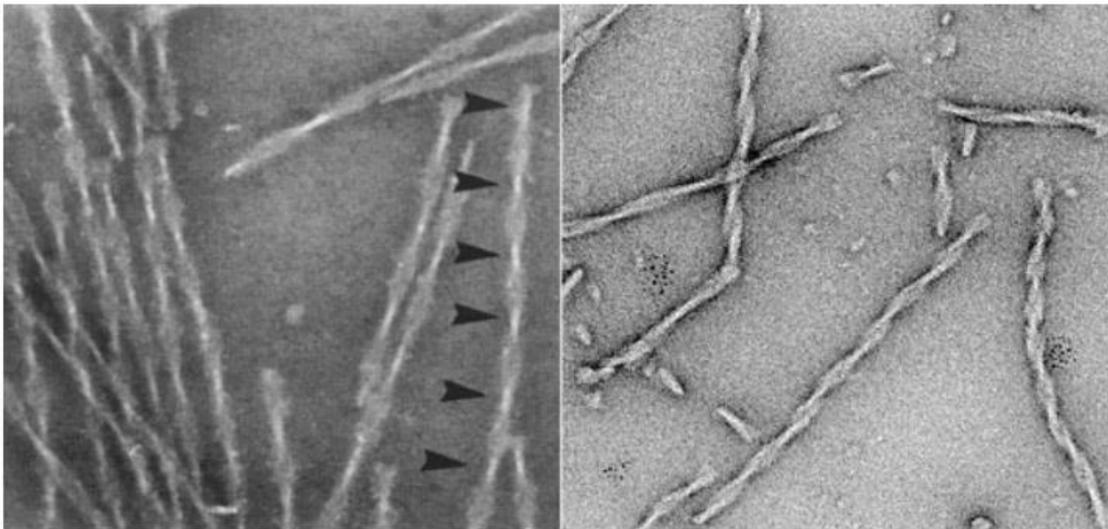
La proteína tau pertenece a la familia de proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs, por sus siglas en inglés) y cumple su función principal en el ensamblado y estabilización de los microtúbulos<sup>45</sup>. El gen que la codifica se ubica en el cromosoma 17 y se pueden generar 6 isoformas a través de *splicing* alternativo, que tienen entre 352 y 441 aa<sup>46</sup> (Figura 8).



**Figura 8. Isoformas de la proteína tau en el cerebro humano.** Las seis isoformas de tau se generan a través de diferentes combinaciones de *splicing* de los exones 2, 3 y 10. En el dominio amino-terminal pueden estar presentes una, dos o ninguna repetición (1N, 2N, 0N) a raíz del *splicing* de los exones 2 y 3. Dependiendo de la ausencia o presencia del dominio R2, codificado por el exón 10, las proteínas tau se convierten en 3R o 4R, respectivamente. Los exones 6 y 8 no se transcriben. El exón 4a sólo se transcribe en el sistema nervioso periférico. Modificado de Lee, et al., 2001 <sup>47</sup>.

En la región carboxilo-terminal se encuentra el dominio de unión a microtúbulos, que puede tener 3 (isoformas 3R) o 4 (isoformas 4R) repeticiones, de alrededor de 30 aa cada una; en la región amino-terminal se encuentran otras repeticiones que pueden estar presentes (1N, 2N) o no (0N)<sup>48</sup>. Durante el desarrollo fetal sólo se expresa la isoforma 0N3R, mientras que en el cerebro adulto se expresan las seis isoformas<sup>46</sup>. Se detectó que las isoformas 4R promueven el ensamblado de los microtúbulos más rápido que la isoformas 3R, mientras que las repeticiones amino-terminales no parecen contribuir a este proceso<sup>49</sup>. Las repeticiones amino-terminales tienen características ácidas, y están seguidas de una región básica rica en prolinas. Esta región suele llamarse “dominio de proyección”, ya que proyecta desde la superficie de los microtúbulos y podría interactuar con otros elementos del citoesqueleto y de la membrana plasmática<sup>50</sup>. Además, los dominios de proyección de tau determinan las distancias entre los microtúbulos en el axón y podría modular el diámetro axonal<sup>51</sup>.

La estructura nativa de tau es desordenada y, aunque muestra poca tendencia a la agregación, es el componente principal de los ovillos neurofibrilares. En estos agregados se encuentra formando filamentos helicoidales pareados (PHF, por sus siglas en inglés), que son básicamente dos fibrillas enrolladas con una periodicidad de cerca de 80 nm (Figura 9)<sup>52</sup>. Los agregados de tau también pueden tener otras estructuras, como filamentos lineales o fibrillas en forma de cinta. Tanto los PHF como los otros tipos de agregados están formados por tau hiperfosforilada<sup>53</sup>. Los mecanismos que subyacen a la formación de los PHF en las neuronas aún no están claros, pero es posible que la hiperfosforilación de tau provoque que se disocie de los microtúbulos. La tau no unida a microtúbulos podría ser más resistente a la degradación y más propensa a agregarse, favoreciendo la formación de los PHF.



**Figura 9. Micrografías electrónicas de filamentos helicoidales pareados.** Izquierda: aislados de cerebro de paciente con EA. Derecha: ensamblados *in vitro* a partir de tau recombinante. Se destaca el típico aspecto de fibras enroscadas con una periodicidad continua (puntas de flecha). Tomado de Mandelkow, et al., 2007<sup>54</sup>.

Si bien la fosforilación no es necesaria para el auto-ensamblaje de tau *in vitro*, esta modificación juega un rol importante en su patología, ya que en los ovillos neurofibrilares *in vivo* tau se encuentra hiperfosforilada<sup>55</sup>. Existen 85 potenciales sitios de fosforilación en la isoforma más larga (2N4R), de los cuales cerca de 30 fueron reportados como fosforilados en condiciones normales. Los sitios de fosforilación de tau se agrupan en regiones que

flanquean las repeticiones de unión a microtúbulos y está bien establecido que el aumento de la fosforilación de tau regula negativamente la unión a los mismos<sup>56</sup>. La importancia de la fosforilación de sitios individuales para regular la unión de tau a los microtúbulos ha sido tema de debate. En particular, se comprobó que la fosforilación de la serina 262, que se encuentra dentro del primer dominio de unión a microtúbulos, desempeña un papel dominante en la reducción de la unión de tau a microtúbulos<sup>57</sup>. Además, se ha detectado hiperfosforilación de este sitio en PHF extraídos de cerebros de pacientes con EA<sup>58</sup>.

Los dos factores que impactan directamente en el nivel de fosforilación de tau son la actividad de quinasas y la actividad de fosfatasas. Se han estudiado varias quinasas (GSK3, CDK5, MAPK, MARK, PKA, etc.)<sup>59</sup> y fosfatasas (PP2A, PP1, PP2B, PP5 y PTEN)<sup>60</sup> que podrían estar involucradas en la patogenia de tau, pero aún se requieren más estudios para definir el papel específico de cada enzima en la regulación *in vivo* del estado de fosforilación de tau.

En 1994 se relacionó por primera vez a la proteína tau con una demencia familiar, hoy llamada Demencia Frontotemporal con Parkinsonismo asociada al cromosoma 17 (FTDP-17, por sus siglas en inglés)<sup>61</sup>. Actualmente se detectaron más de 20 mutaciones en tau en pacientes con FTDP-17. Los datos sugieren que las mutaciones conducen a la disfunción de tau por uno o más de tres mecanismos distintos. Por un lado, las mutaciones intrónicas y algunas exónicas afectan el *splicing* alternativo del exón 10 y, en consecuencia, alteran la proporción relativa de tau 4R y 3R. Por otro lado, las otras mutaciones exónicas afectan la capacidad de tau para unirse a microtúbulos y promover su ensamblaje. Finalmente, algunas de estas mutaciones promueven el ensamblaje de tau en filamentos<sup>62</sup>. Además de estas tauopatías familiares, existen otras tauopatías esporádicas. Entre ellas se destacan la parálisis supranuclear progresiva (PSP), la degeneración corticobasal (CBD) y la enfermedad de Pick (PiD). Más allá de la clínica particular de cada enfermedad, todas presentan acumulación de PHF, aunque con distinta distribución, afectando diferentes grupos celulares, incluyendo a células gliales<sup>47</sup>. La importancia de esta observación radica en el hecho de que la agregación e hiperfosforilación de tau por sí sola está asociada a la demencia, sin la

coexistencia de péptidos amiloides extracelulares. Sin embargo, no se han detectado demencias asociadas a mutaciones en tau que involucren acumulación de A $\beta$  o ADan, volviendo a enfocar a dichos péptidos como un factor de importancia en la EA y la DFD.

## **2. Evidencias sobre la relación neurotóxica entre A $\beta$ y tau y sobre efectos tóxicos de ADan. Antecedentes en cultivos celulares y modelos animales**

Las características patológicas de la EA y la DFD se determinaron a partir de muestras de cerebros humanos *post-mortem*. Además, se realizaron numerosos ensayos *in vitro* para entender las características fisicoquímicas, termodinámicas y cinéticas del proceso de agregación de las proteínas y péptidos involucrados en estas enfermedades. Pero para poder proponer hipótesis sobre mecanismos de neurotoxicidad es necesario trabajar con cultivos celulares y modelos animales. A continuación, se resumirán los antecedentes sobre el estudio de la relación entre A $\beta$  y tau y la neurotoxicidad asociada a ADan.

### **2.1 Estudios sobre la relación neurotóxica entre A $\beta$ y tau en cultivos celulares y modelos animales**

#### 2.1.1. Estudios en cultivos celulares

En el caso de A $\beta$  y tau existe evidencia en cultivos celulares que sostienen una relación importante en la citotoxicidad. Por un lado, se detectó que el efecto neurotóxico de A $\beta$  fibrilar ocurre solo en presencia de tau, evidenciado por falta de degeneración de neuritas en cultivo de neuronas de hipocampo de ratón *knock-out* para tau y la restauración del efecto neurotóxico en cultivo de hipocampo de ratón que sobre-expresa tau<sup>63</sup>. Es decir que, de acuerdo a estos estudios, la proteína tau es necesaria para que se manifieste la toxicidad de A $\beta$ , tal como propone la hipótesis de la cascada amiloide en su forma original. También se detectó que oligómeros de A $\beta$  aislados directamente de la corteza de pacientes con EA, son suficientes para inducir hiperfosforilación de tau en sitios relevantes de la EA (incluyendo a serina 262) y distrofia de neuritas en cultivos primarios de hipocampo de rata, transfectados con tau humana<sup>64</sup>. En

otros estudios se trataron células SH-SY5Y que expresaban tau humana con preparaciones fibrilares de A $\beta$ , y se encontró un aumento en la insolubilidad de tau, dependiente de la fosforilación en sitios específicos (Ser202, Thr205, Thr231, Ser422)<sup>65,66</sup>. También se ha encontrado que los oligómeros de A $\beta$  causan el desensamblado de microtúbulos mediado por tau, además de inhibición del transporte mitocondrial a lo largo de los microtúbulos, daños en los microtúbulos dendríticos y reinicio del ciclo celular en neuronas<sup>67</sup>. En conjunto, estos resultados sostienen la hipótesis de que la acumulación anormal de A $\beta$  promueve de alguna manera la hiperfosforilación de tau y su separación de los microtúbulos.

### 2.1.2. Estudios en modelos animales vertebrados

Si bien se han detectado placas amiloides y/o acumulación de fosfo-tau en algunos perros, gatos, felinos salvajes y osos, entre otros, el trabajo de investigación con este tipo de animales es inviable o demasiado costoso. Entre los roedores, ni la rata ni el ratón muestran acumulación espontánea de A $\beta$  o tau con la edad, mientras que un roedor endémico en el centro de Chile llamado *Octodon degus* o “degu”, es un modelo natural que presenta ambos tipos de agregados<sup>68</sup>. Aunque no hay muchos estudios realizados en degu, se demostró que la patología que manifiestan presenta similitudes con la EAE. Sin embargo, el inicio del proceso de acumulación proteica cerebral parece estar muy retrasado (unos 60 meses de edad), y a veces ausente en el degu criado en el laboratorio en comparación con los animales salvajes<sup>69</sup>. Aunque este modelo de investigación es muy interesante porque reproduce varios aspectos de la EA detectados en humanos, no es posible predecir si un individuo padecerá o no la patología, ya que tiene un carácter esporádico, y por lo tanto es un factor limitante para su uso.

Es por eso que para estudiar la toxicidad asociada a A $\beta$  se utilizan principalmente animales transgénicos. El descubrimiento de las mutaciones en las formas familiares de la EA permitió crear modelos transgénicos que reproducen algunos aspectos críticos de la enfermedad. Por ejemplo, el pez cebra (*Danio rerio*) que, si bien es filogenéticamente más distante al humano que los roedores, presenta características que lo hacen un modelo versátil. Son

muy útiles para las pruebas de drogas antes de las pruebas clínicas en roedores<sup>70</sup>.

Los modelos vertebrados más utilizados son los ratones y las ratas transgénicos, que sobre-expresan versiones mutantes de APP, así como animales que co-expresan APP con mutantes de presenilina-1, BACE1 y tau, dando origen a modelos con múltiples transgenes. Algunos de estos animales presentan depósitos de A $\beta$  intracelular, mientras que todos muestran acumulación extracelular; sin embargo la acumulación significativa de tau hiperfosforilada se detectó sólo en animales que también sobre-expresan tau mutante<sup>71,72</sup>. Aunque ninguno de los modelos transgénicos recapitula completamente la enfermedad humana, han sido útiles en la generación de nuevos conocimientos sobre la fisiopatología de la toxicidad de A $\beta$ , y en particular con respecto a los efectos de diferentes especies del péptido y el posible papel patógeno de los oligómeros solubles<sup>73</sup>. Además, coinciden en que existe una relación neurotóxica entre la acumulación de A $\beta$  y la acumulación progresiva de fosfo-tau. Por ejemplo, al co-expresar versiones mutantes de APP y de tau humana los efectos tóxicos se aceleran y potencian<sup>74,75</sup>. Asimismo, la disminución de los niveles de tau endógena (+/- y -/-) en ratones que sobre-expresan APP (con mutaciones asociadas a EAF) revierte defectos en memoria, aprendizaje, hiperactividad y muerte prematura detectados en condiciones silvestre de tau<sup>76</sup>. Por otro lado, la expresión condicional de una versión mutante de tau asociada a la FTDP-17, induce la formación de ovillos neurofibrilares a lo largo del tiempo, asociada a la pérdida neuronal y a defectos comportamentales. Tras una reducción de tau transgénica del 80%, la función de la memoria se recuperó y el número de neuronas se estabilizó, pero continuó la acumulación de ovillos neurofibrilares, sugiriendo que estos depósitos no generan daño irreversible, por lo menos en este modelo animal<sup>77</sup>. Para determinar si A $\beta$  puede impactar en la patología de tau, se inyectaron preparaciones de A $\beta$ 42 fibrilar sintético en la corteza y la región CA1 del hipocampo de ratones transgénicos para tau humana silvestres, tau mutante P301L (asociada a la FTDP-17) y controles no transgénicos. Se detectó un aumento de cinco veces el número de ovillos neurofibrilares en la amígdala de ratones tau P301L, pero no en los ratones transgénicos de tau

silvestre ni en los ratones control<sup>78</sup>. En un estudio donde se inyectó A $\beta$  en cerebros de ratones y células que expresaban tau mutante P301L, se analizó la proteómica y se detectó que A $\beta$  causa una alteración general en procesos de estrés celular, metabolismo energético y transcripción. Algunos de estos resultados fueron comprobados mediante inmunohistoquímica y *Western blot* en muestras de cerebro de pacientes con EA; entre ellos se destacan el aumento de los niveles de peroxiredoxinas 1 y 6 y disminución de isocitrato deshidrogenasa citoplasmática NADP (ICDH), todas proteínas relacionadas con el estrés oxidativo, disminución en la proteína de transporte de hierro transferrina, y disminución en los niveles de BiP (*Binding immunoglobulin protein*) y VCP (*Valosin-containing Protein*), componentes del sistema de control de calidad de proteínas durante el estrés de retículo endoplásmico<sup>79</sup>.

### 2.2.3. Estudios en modelos animales invertebrados

Los animales invertebrados más utilizados como modelos de investigación son *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* (Dm). Estos organismos presentan varios de los genes implicados en enfermedades humanas conservados, así como muchos mecanismos de señalización celular, que permiten extrapolar los resultados encontrados en estos modelos a mamíferos. Pese a diferencias en cuanto a la complejidad de su sistema nervioso, presentan comportamientos complejos<sup>80</sup>. El objetivo de la utilización de modelos invertebrados es desarrollar contextos en los que se puedan replicar los procesos moleculares y celulares elementales que subyacen a las enfermedades humanas y someterlos a una investigación directa.

*C. elegans* es un nematodo cuyo genoma está totalmente secuenciado y cuenta con herramientas de manipulación genética sencillas. Su sistema nervioso consiste en un conjunto definido de 302 neuronas, perfectamente mapeadas y caracterizadas, y se conocen las principales interacciones entre ellas. Es muy útil para rastrillajes químicos de alto rendimiento. Tanto la expresión de A $\beta$  como de mutantes de tau humanas inducen efectos tóxicos, con fibras amiloides de A $\beta$  y acumulación de tau<sup>81,82</sup>.

*Drosophila* contiene un ortólogo de la proteína APP humana conocida como Appl ( *$\beta$  amyloid protein precursor like*) que conserva los dominios

característicos. La expresión de la proteína APP humana en el mutante nulo de la mosca ayuda a disminuir los defectos de comportamiento observados por la deficiencia, indicando cierta conservación funcional entre ambas proteínas<sup>83</sup>. La región correspondiente a A $\beta$  en Appl (dA $\beta$ ) presenta baja similitud de secuencia con el péptido amiloide  $\beta$  humano. Sin embargo, al sobre-expresar el homólogo de BACE en *Drosophila* (dBACE) y Appl se produce dA $\beta$  que es capaz de agregarse, generar defectos comportamentales con el envejecimiento y neurodegeneración<sup>84</sup>. Por otro lado, *Drosophila* posee un homólogo de tau (dTau) que presenta un 46% de identidad y 66% de similitud de secuencia con respecto a tau humana. Comparten la misma estructura, aunque dTau contiene cinco dominios de unión a microtúbulos, en lugar de cuatro. Muchos sitios de fosforilación están conservados entre tau humana (hTau) y dTau, entre ellos se destacan serina 262 y serina 356, ubicados dentro de los dominios de unión a microtúbulos<sup>85</sup>. En estudios comparativos de sobre-expresión de hTau y dTau se detectó que ambas pueden provocar disfunción neuronal, sin embargo presentan ciertas diferencias en cuanto a propiedades físicas y capacidad de interacción con microtúbulos<sup>86</sup>.

Varios grupos de investigación han generado líneas transgénicas de *Drosophila* para mutantes de APP humana, de Appl, de A $\beta$ , de hTau y de dTau (revisado en Bouleau & Tricoire, 2015<sup>87</sup>) La co-expresión de A $\beta$  con hTau conduce a una exacerbación de los defectos en el transporte axonal y en las aberraciones morfológicas detectadas en la unión neuromuscular de *Drosophila*, inducidos por cada uno por separado<sup>88</sup>. Lo mismo se observó al analizar la estructura de la retina y del cerebro y al cuantificar células apoptóticas<sup>89</sup>. Además se sugirió que la quinasa GSK-3 $\beta$  podría estar involucrada en el mecanismo por el cual A $\beta$  interactúa con tau para producir estos fenotipos<sup>88</sup>. Ijima et al. (2010), mostraron en líneas transgénicas de *Drosophila* que la expresión de A $\beta$  genera un aumento en la fosforilación de hTau en sitios relacionados con la EA, incluido serina 262, y aumenta la neurodegeneración inducida por tau<sup>88</sup>. Además, el bloqueo en la fosforilación del sitio serina 262 evita el efecto tóxico inducido por A $\beta$ <sup>90</sup>. En conjunto, se ha estudiado ampliamente la toxicidad asociada a A $\beta$  y a tau utilizando a Dm como modelo animal, aportando evidencias que sostienen la relación neurotóxica entre A $\beta$  y fosfo-tau.

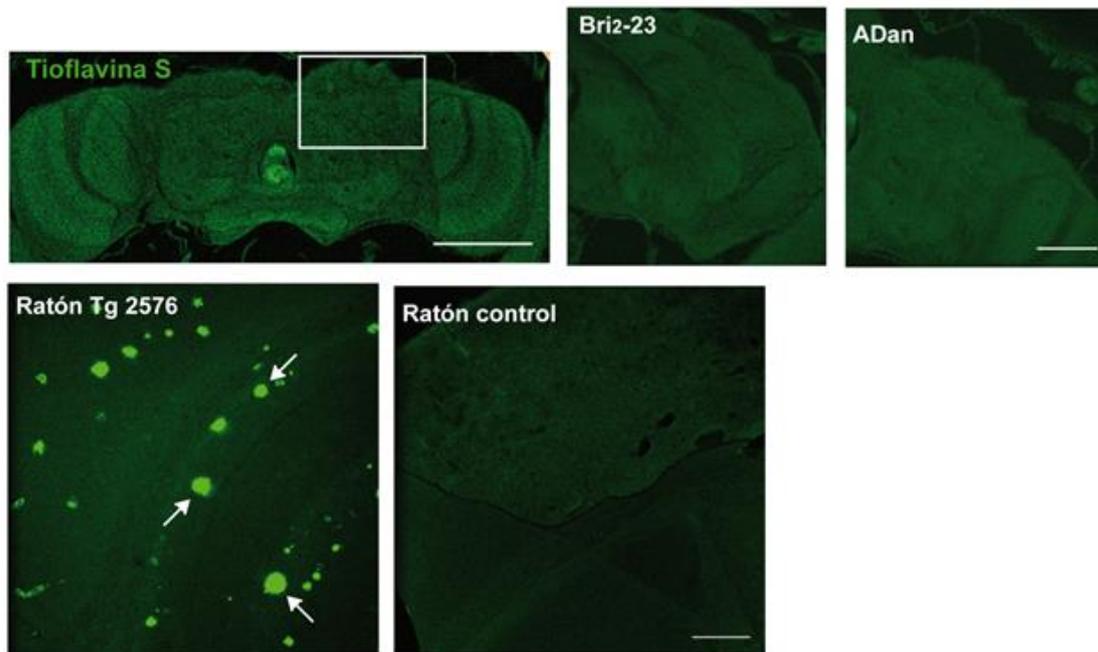
## 2.2. Estudios sobre la toxicidad de ADan en cultivos celulares y modelos animales

Los ensayos en cultivos celulares para estudiar la toxicidad de ADan son muy restringidos. Los factores limitantes son la insolubilidad y la rápida agregación de este péptido *in vitro* (observaciones de nuestro laboratorio no publicadas). El tratamiento de células SH-SY5Y con 200-300  $\mu\text{M}$  de péptido ADan (preparado fresco o incubado por 20 días) durante 24 h induce muerte celular, medida por liberación de lactato deshidrogenasa y por activación de caspasas. Los preparados “frescos” inducen más toxicidad que los preparados “envejecidos”, lo que sugiere que especies menos agregadas serían responsables de estos efectos<sup>91,92</sup>. Estudios similares fueron realizados con una concentración de 50  $\mu\text{M}$  de péptido ADan obteniéndose resultados análogos<sup>44</sup>. No se han realizado estudios en células sobre la participación de tau en los efectos inducidos por ADan o sobre la relación de ambos.

Los estudios sobre la neurotoxicidad de ADan con modelos animales también son muy acotados. Existen tres cepas de ratones transgénicos y un ratón nulo de *bri2*. Los ratones *bri2*-nulos, homo y heterocigotas, son viables, fértiles y no tienen un fenotipo anormal obvio<sup>38</sup>. Dos de los ratones transgénicos expresan la proteína precursora de ADan (ADanPP) bajo distintos promotores. Ambos presentan defectos comportamentales asociados a la edad, acumulación del péptido ADan principalmente asociado a los vasos sanguíneos y algunas tinciones discretas positivas para tioflavina, indicando ADan fibrilar<sup>93,94</sup>. El otro modelo es un ratón *knock-in*, creado por recombinación homóloga del exón 6 del gen *bri2*, pero con la mutación que deriva en la producción de ADan. Estos animales no mostraron acumulación del péptido ADan, aunque presentaron déficits en la memoria<sup>95,96</sup>. Ninguno de estos ratones mostró alteraciones de tau endógena, pero al co-expresar ADanPP con una mutante de tau humana, aumentó la presencia y acumulación de especies fosforiladas de tau<sup>41,94,97,98</sup>

En nuestro laboratorio se desarrolló el único modelo de *Drosophila* que sobre-expresa los péptidos derivados de BRI2 (p23, ADan y ABri). Estas líneas presentan insertos los transgenes en el mismo sitio del genoma, asociados a la secuencia del péptido *Necrotic* de *Drosophila*, que los dirige a la vía secretoria.

Aunque los niveles de expresión son relativamente bajos, se detectó toxicidad en retina y SNC sólo en el caso de la sobre-expresión de ADan y ABri en comparación con el control p23. Además, tinciones de cortes de cerebro con tioflavina S fueron negativas, indicando que no ocurre acumulación de especies fibrilares (figura 10)<sup>99</sup>. *Drosophila* no posee caracterizado ningún gen homólogo de *bri2*.



**Figura 10. Tinción con tioflavina S.** Arriba: Izquierda, se recuadra la sección del cerebro analizada. Barra= 100  $\mu$ m. Derecha, no se detectó tinción positiva en cortes de cerebros de p23 (Bri2-23) ni de ADan. Barra= 50  $\mu$ m. Abajo, izquierda: Control positivo, corte de cerebro de ratones transgénicos Tg2576; las flechas indican típicos depósitos fibrilares de A $\beta$  revelados con tioflavina S. Derecha: Control negativo, corte de cerebro de ratón no transgénico de 20 meses. Barra= 200  $\mu$ m.

### 3. Estrés de retículo endoplásmico y respuesta a proteínas mal plegadas

El retículo endoplásmico (RE) es una organela dinámica con múltiples funciones que incluyen desde almacenamiento de calcio y el metabolismo de los lípidos, hasta ser el principal compartimiento de síntesis y plegamiento de las proteínas de secreción, de las integrales de membrana y de algunas proteínas citosólicas. Las interrupciones en la homeostasis del plegamiento de proteínas conducen a la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE, lo

que resulta en la activación de tres vías de transducción de señales altamente conservadas, que se conocen colectivamente como la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, por su nombre en inglés, *Unfolded Protein Response*). Esta respuesta es el principal mecanismo de control de calidad en el RE y, a través de ella, la célula intenta mantener o recuperar la proteostasis. Sin embargo, el estrés del RE no resuelto y prolongado conduce a perturbaciones en la homeostasis del calcio, aumento de la acumulación de proteínas, pérdida de la función del RE y activación de cascadas apoptóticas<sup>100</sup>.

La activación de UPR se desencadena a partir de tres proteínas “sensores” transmembrana ubicadas en el retículo: IRE1 (*inositol requiring enzyme 1*), PERK (*PKR-like endoplasmic reticulum kinase*, también llamada *pancreatic eucaryotic initiation factor 2 $\alpha$  kinase*, PEK) y ATF6 (*activating transcription factor 6*). En la figura 11 se resumen los principales componentes de la activación de cada vía.

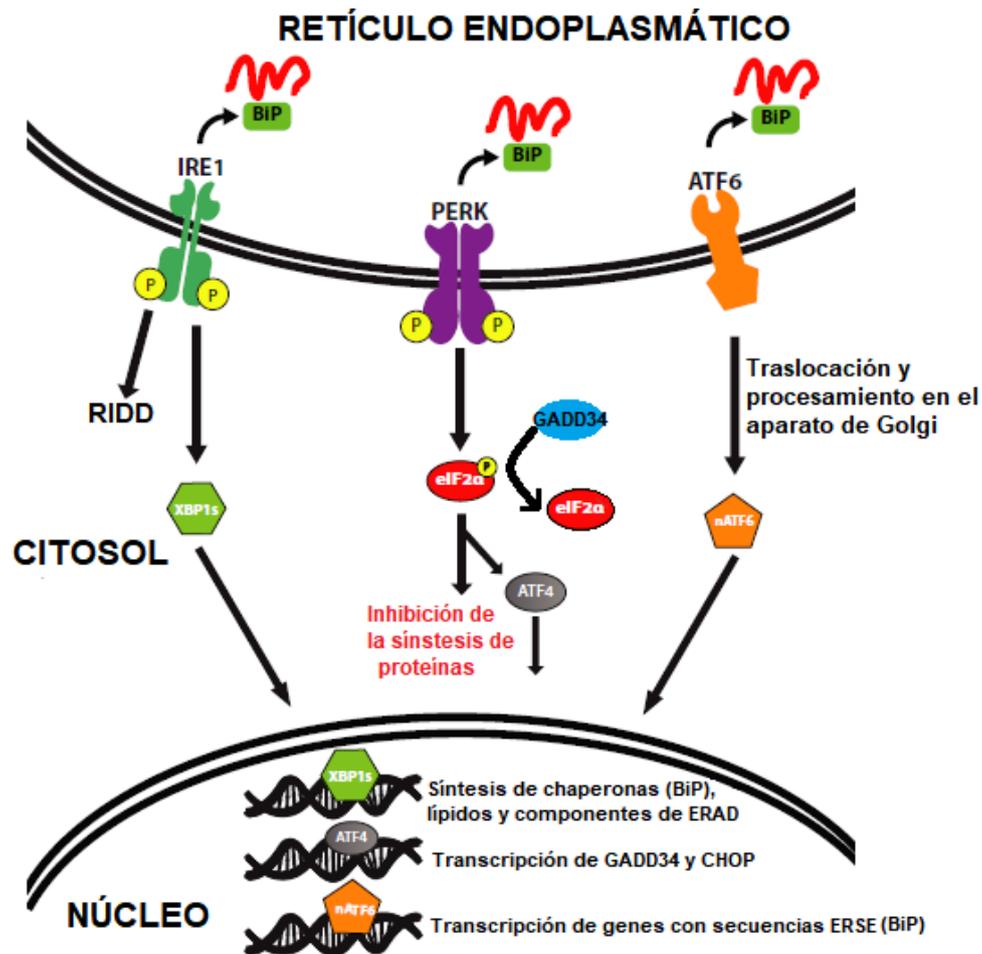
En condiciones normales, las regiones intraluminales de IRE1, PERK y ATF6 se encuentran unidas a la chaperona BiP (*Binding immunoglobulin Protein*, también conocida como Grp78) y permanecen inactivas. Cuando ocurre acumulación de proteínas mal plegadas en el RE, BiP se disocia de los tres sensores para ejercer su función de chaperona estabilizando y evitando la agregación intra o intermolecular de las proteínas que no pudieron plegarse correctamente<sup>101</sup>. Esto inicia la activación de las distintas vías de UPR por estrés de retículo.

IRE1 es una proteína transmembrana tipo I, con un dominio de dimerización RE-luminal y un dominio endoribonucleasa citosólico. Al disociarse de BiP, IRE1 se dimeriza y se autofosforila, activando su dominio de ARNasa. De esta manera, IRE1 corta y empalma el ARNm del factor de transcripción XBP1 (*X-box binding protein-1*), que luego de traducirse trasloca al núcleo y se une a secuencias ERSE (*endoplasmic reticulum stress elements*) en el ADN promoviendo la inducción de varios genes objetivo de UPR, incluido el que codifica a BiP, componentes de degradación asociada al retículo endoplásmico (ERAD) y XBP1 mismo<sup>102</sup>. Además, IRE1 degrada ARNm asociados al RE, a

través del sistema RIDD (*regulated IRE1-dependent decay of mRNA*), para disminuir la carga de plegado de proteínas en el retículo<sup>103</sup>.

PERK también es una proteína transmembrana de tipo I que contiene un dominio de dimerización en la cara luminal del RE. Cuando BiP se disocia, PERK se dimeriza y ocurre una trans-fosforilación entre dímeros<sup>104</sup>. El dominio quinasa citosólico de PERK fosforila a eIF2 $\alpha$  (*eukaryotic translation initiation factor 2  $\alpha$* ) permitiendo su unión a eIF2 $\beta$ , un factor de intercambio de nucleótidos de guanina, y de ese modo se inhibe el intercambio de eIF2 $\alpha$ -GDP a eIF2 $\alpha$ -GTP; como eIF2 $\alpha$ -GTP es un componente clave para el inicio de la traducción, la misma se interrumpe como consecuencia de la fosforilación de eIF2 $\alpha$ <sup>105</sup>. A pesar de la disminución de la traducción global, ciertos transcriptos se traducen preferentemente, entre ellos el del factor de transcripción 4 (ATF4), que regula varios genes, incluidos GADD34 (*growth arrest and DNA damage-inducible protein 34 kDa*) y CHOP (*proapoptotic C/EBP Homologous protein*)<sup>106</sup>. GADD34 es una subunidad reguladora de la proteína-fosfatasa 1 que dirige la defosforilación de p-eIF2 $\alpha$  como parte de un circuito de retroalimentación negativa, cuya función es restaurar la síntesis de proteínas después del estrés de RE<sup>107</sup>. Si la homeostasis no se puede restaurar, la rama de PERK inicia la apoptosis<sup>108</sup>.

La rama menos conservada de UPR es la que involucra a la proteína transmembrana tipo II ATF6. Cuando BiP se encuentra unido a ATF6 bloquea dos secuencias de localización en Golgi que se encuentran en la cara luminal de ATF6, evitando su traslocación hacia dicha organela. Tras la disociación de BiP, ATF6 se exporta al aparato de Golgi, donde se procesa hasta su forma activa. Se escinde dos veces, primero por la serina-proteasa luminal S1P (*site 1 protease*), luego por la metaloproteasa intramembrana S2P (*site 2 protease*). El fragmento citosólico (nATF6) trasloca al núcleo donde actúa como un factor de transcripción de genes que codifican a proteínas chaperonas (incluida BiP) y a proteínas de ERAD (*endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*)<sup>109</sup>.



**Figura 11. Activación de las tres vías de UPR.** La presencia de proteínas mal plegadas en el RE provoca la disociación de BiP de los tres sensores de respuesta de proteínas mal plegadas: IRE1, PERK y ATF6, lo que lleva a su activación. La activación de IRE1 da como resultado el corte y empalme de XBP1 (XBP1s), que activa muchos genes objetivo de UPR relacionados con el plegamiento de proteínas, la síntesis de lípidos, la translocación de proteínas en el RE y la degradación asociada al RE (ERAD). Además, IRE1 degrada ARNm asociados al RE (RIDD). PERK fosforila a eIF2 $\alpha$ , lo que resulta en la represión de la traducción general de proteínas y la activación específica de un subconjunto de genes, incluido el factor de activación de transcripción 4 (ATF4). La activación de ATF6 activa genes bajo el control de un elemento de respuesta al estrés endoplásmico (ERSE), incluidas chaperonas de retículo (como BiP) y los componentes del sistema ERAD. Modificado de Hughes & Mallucci, 2019 <sup>100</sup>.

### 3.1. Evidencias de la activación de UPR asociada a la toxicidad de A $\beta$ y tau

Durante los últimos años se han reportado evidencias que indican activación de UPR en cerebros de pacientes con enfermedades neurodegenerativas. Las herramientas más útiles para detectarla son los anticuerpos específicos contra

formas activas de PERK e IRE1, así como para evidenciar la traslocación al núcleo de XBP1s y nATF6. El análisis de efectores río abajo de PERK no son específicos de la activación de UPR ya que eIF2 $\alpha$  puede ser fosforilado por otras vías<sup>110</sup>.

En cerebros de pacientes con EA se detectaron niveles aumentados, respecto de controles no dementes, de BiP, pPERK, pIRE y peIF2 $\alpha$ , principalmente en el hipocampo y en relación a especies fosforiladas de tau. La evidencia indicaría que la activación de UPR está involucrada en las primeras etapas de la patología de la EA<sup>111,112</sup>. De igual manera se detectó principalmente pPERK y peIF2 $\alpha$  en cerebros de pacientes con patologías asociadas a la acumulación de tau. En menor medida se reportó aumento de los niveles de pIRE, BiP y ATF6<sup>113-115</sup>.

Los trabajos realizados en modelos animales transgénicos para A $\beta$  o para tau coinciden, aunque con ciertas controversias, con lo detectado en cerebros de pacientes. En modelos de toxicidad de A $\beta$  se detectó activación de las tres vías, mientras que en el caso de tau predomina la activación de la vía de PERK<sup>116,117</sup>. A raíz de esta evidencia se ha propuesto la modulación de componentes de esta respuesta como posibles blancos terapéuticos en la EA y otras tauopatías<sup>118,119</sup>. Hasta el momento no se publicaron trabajos con modelos animales donde se evalúe en conjunto el efecto de la expresión de A $\beta$  y de tau sobre UPR, ni donde se evalúe la activación de UPR en relación a la toxicidad inducida por ADan.

#### **4. *Drosophila melanogaster* como modelo animal**

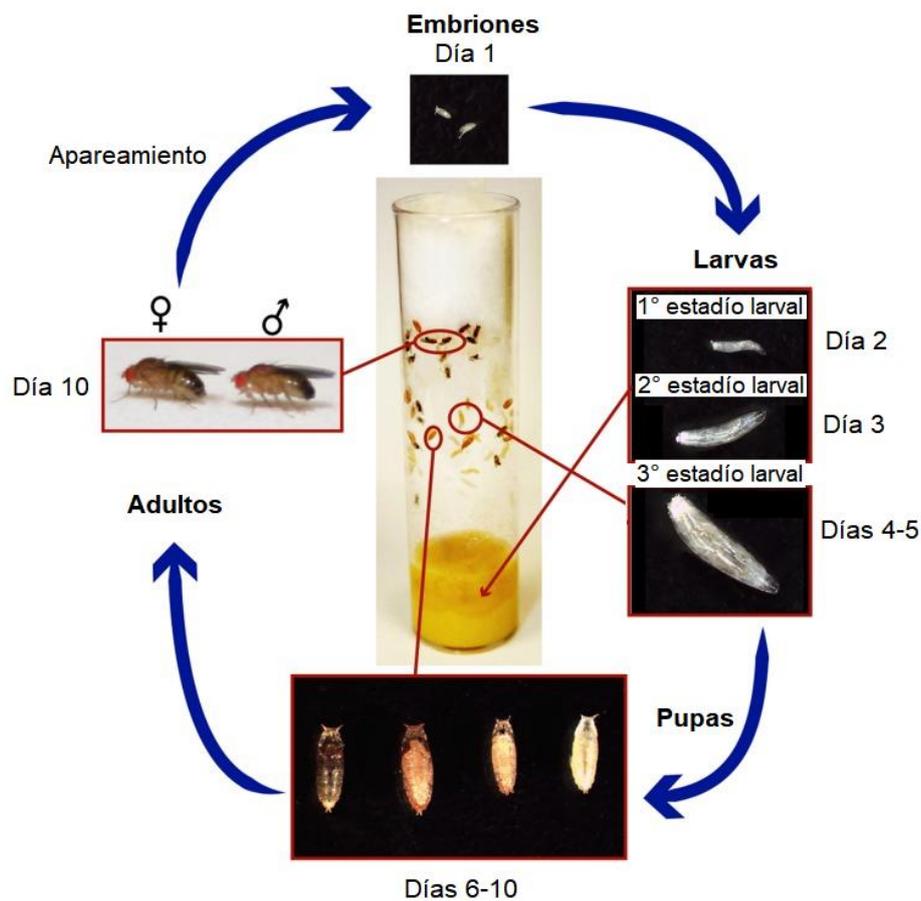
El uso de *Drosophila* como modelo animal de investigación se remonta a 1910, cuando Thomas Hunt Morgan detectó por primera vez una mutación fenotípicamente visible, que permitió confirmar la teoría cromosómica de la herencia<sup>120</sup>.

Actualmente la mosca de la fruta es utilizada en gran cantidad de laboratorios para estudiar tópicos de amplia variedad. Las moscas se cultivan fácilmente en el laboratorio y tienen muchas crías en tiempos de generación cortos. Además,

tienen un genoma compacto, son fáciles de manipular genéticamente y tienen muchos genes ortólogos asociados con enfermedades humanas.

Entre las principales características de *Drosophila* como modelo animal se destacan:

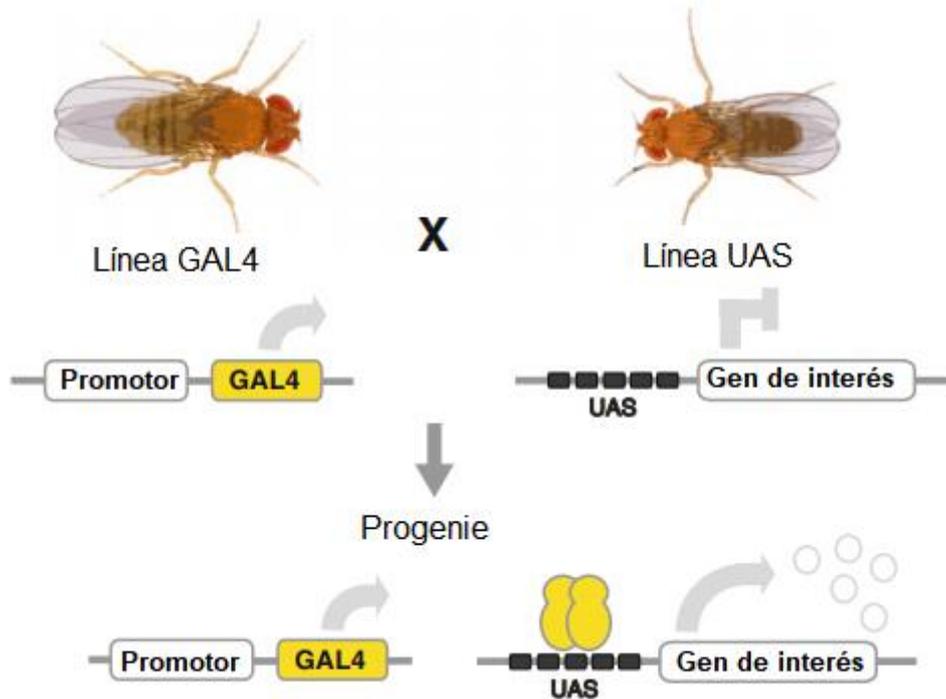
- El proceso de desarrollo desde un huevo fertilizado a un adulto requiere en promedio de 9 a 10 días a 25°C (figura 12). La temperatura influye en gran medida en la velocidad de este proceso, ya que las moscas cultivadas a 18°C requieren aproximadamente 19 días para su completo desarrollo. Las moscas a 25°C viven alrededor de 3 meses y a 28°C alrededor de un mes y medio.
- El mantenimiento es muy sencillo y económico, con una prolifera descendencia por cada cruzamiento (una hembra puede poner cerca de 1500 huevos en toda su vida).
- Su genoma, que está totalmente secuenciado, incluye cerca de 14.000 genes que se distribuye en 4 cromosomas: un par de cromosomas sexuales, que incluyen al cromosoma X y el cromosoma Y, que contiene pocos genes y está compuesto casi en su totalidad por heterocromatina. Los tres pares restantes son autosómicos, siendo los cromosomas 2 y 3 los más utilizados para la manipulación genética. El cromosoma 4 es muy pequeño y no suele utilizarse en el trabajo de laboratorio<sup>121</sup>.
- Existen gran variedad de herramientas genéticas que permiten obtener líneas transgénicas fácilmente, así como inducir desregulación génica de manera espacio-temporal específica<sup>122</sup>.
- Posee una amplia variedad de comportamientos complejos cuantificables que incluyen ritmos circadianos, sueño, aprendizaje y memoria, cortejo sexual, agresión y vuelo<sup>123</sup>.
- Cuenta con baja redundancia funcional y alto grado de conservación génica con los vertebrados, con más del 75% de homología con genes humanos asociados a enfermedades<sup>124</sup>.



**Figura 12. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* a 25°C.** Las moscas se cultivan en viales con alimentos en la parte inferior y un tapón de algodón en la parte superior (foto central). Se muestra cada etapa principal del ciclo de vida, que se completa en 9-10 días a 25°C. Los embriones salen del huevo después de aproximadamente 1 día y pasan cerca de 4 días como larvas en el alimento. Alrededor del día 5, las larvas del tercer estadio se arrastran fuera de la comida para pupar en las paredes del vial. Durante los días 5 a 9, se produce la metamorfosis. Las moscas adultas eclosionan alrededor de los días 9-10. Modificado de Hales et al., 2015 <sup>122</sup>.

La estrategia más utilizada para sobre-expresar genes o ARN de interferencia (ARNi) en *Drosophila* se basa en el sistema de expresión binario GAL4/UAS. Este sistema proveniente de levaduras permite la expresión de un gen de interés de manera tejido específica. Se basa en la afinidad del factor de transcripción GAL4 por la secuencia UAS (*Upstream Activating Sequence*)<sup>125</sup>. Básicamente, una línea parental contiene un promotor tejido específico que dirige la expresión de GAL4 y la otra línea parental contiene la secuencia que se desea expresar río abajo de la secuencia UAS. Luego del apareamiento,

una proporción de la progenie de ambas líneas poseerá ambas secuencias, adquiriendo la expresión tejido dirigida del objetivo (figura 13).



**Figura 13. Sistema de expresión GAL4/UAS en *Drosophila melanogaster*.** En un sistema básico, el promotor tejido específico que dirige la expresión de GAL4 y las líneas UAS-gen de interés, se generan y se mantienen como *stocks* separados. En ausencia de GAL4 no hay expresión del gen objetivo. Al cruzar las moscas que expresan GAL4 con las que incluyen el gen de interés río abajo de la secuencia UAS, se obtiene la progenie que expresa de manera dirigida el gen objetivo. Modificado de Walker, et al., 2016 <sup>126</sup>.

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## **HIPÓTESIS**

La acumulación progresiva del péptido ADan en el cerebro es necesaria y suficiente para el desarrollo de la Demencia Familiar Danesa.

Existen mecanismos de neurotoxicidad comunes y diferenciales entre los péptidos ADan y A $\beta$ , que incluyen a la patología asociada a tau y a la respuesta a proteínas mal plegadas.

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la neurotoxicidad de los péptidos ADan y A $\beta$ , así como de la proteína tau y su relación con la respuesta proteostática mediada por UPR en el sistema nervioso de *Drosophila melanogaster*.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Caracterizar el efecto de la sobre-expresión del péptido ADan en el sistema nervioso de *Drosophila melanogaster*.
- 2) Determinar si la proteína tau endógena de *Drosophila* es necesaria para el efecto tóxico de ADan y A $\beta$ .
- 3) Caracterizar el efecto de la sobre-expresión de tau humana en el sistema nervioso de *Drosophila melanogaster* y el efecto de su co-expresión con ADan y A $\beta$ .
- 4) Estudiar una respuesta celular particular, la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR), en moscas que sobre-expresan el péptido ADan y compararlo con lo reportado en moscas que sobre-expresan A $\beta$ .
- 5) Estudiar la respuesta a proteínas mal plegadas frente a la sobre-expresión de tau humana en el cerebro de *Drosophila*.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. Cría y mantenimiento de *Drosophila*

Todas las líneas se mantuvieron en viales de polipropileno (2,5 cm de diámetro y 10 cm de alto) con aproximadamente 8 ml de comida *standard*: 66,5 g/l de polenta común, 20 g/l de levadura en polvo Levex (Lesaffre & Co, Marcq-en-Baroeul, Francia), 6,5 ml/l de solución 1,22 M en etanol de nipagin (Van Rossum, CABA, Argentina), 4 ml/l de ácido propiónico (Cicarelli, Santa Fe, Argentina), 10 g/l de agar-agar (Van Rossum, CABA, Argentina) y 40 g/l de sacarosa (Anedra, Research AG, Buenos Aires, Argentina). Para obtener mayor cantidad de moscas se utilizaron botellas de plástico (250 ml) con 40 ml de comida por botella, aproximadamente.

Los viales *stock* se mantuvieron a 18°C y se pasaron los adultos a viales con comida fresca (a este procedimiento habitual lo llamamos “repicar”) una vez al mes; las botellas y los cruzamientos se mantuvieron a 25°C. Para realizar los experimentos, las moscas adultas se mantuvieron a 25°C o a 28°C, dependiendo del ensayo. Las botellas se repicaron una vez por semana, para obtener buena cantidad y calidad de progenie. Los viales con individuos envejeciendo se repicaron tres veces por semana.

Los cruzamientos y el mantenimiento de adultos para experimentos, se realizaron en incubadoras modelo I-30BLL (Percival Scientific, Inc., Iowa, Estados Unidos) con control de temperatura y ciclo de 12 horas luz/12 horas oscuridad, entre las 8 de la mañana y las 8 de la noche. Las botellas y los viales *stock* se mantuvieron en cuartos con temperatura regulada por equipos de aire acondicionado y sin control estricto de luz/oscuridad.

## 2. Manipulación de las moscas

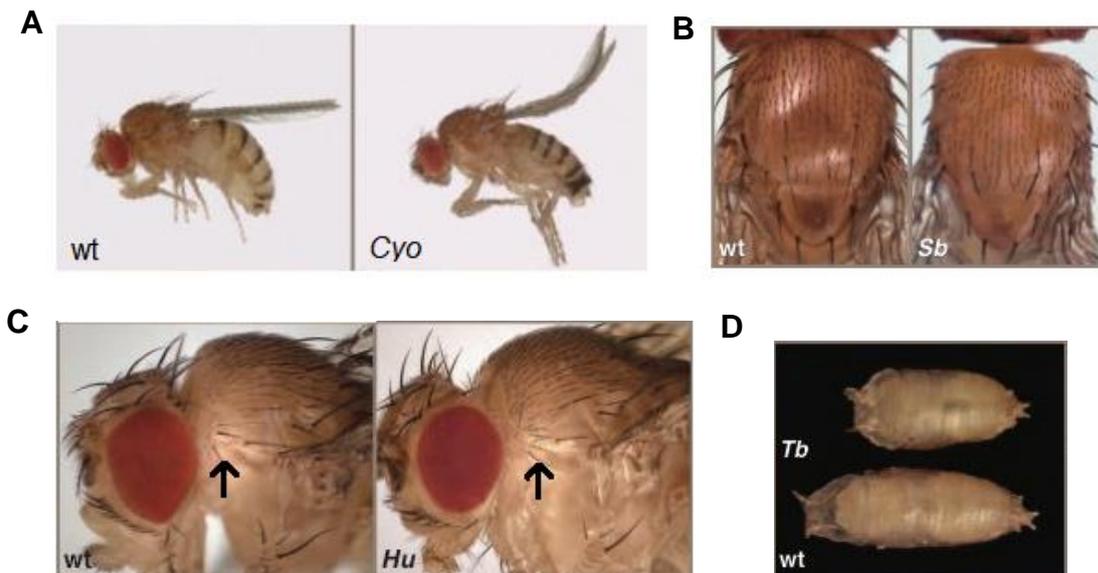
La selección de los animales se realizó utilizando CO<sub>2</sub> como anestesia sobre una plataforma porosa con un flujo continuo de gas y observando con lupa (S6 E, Leica, Wetzlar, Alemania). En todos los casos se procuró minimizar el tiempo de exposición al CO<sub>2</sub>, debido a que se ha reportado que causa defectos en la fisiología y comportamiento de las moscas<sup>127–129</sup>. Entre 3 y 5 días antes de los cruzamientos se recolectaron hembras vírgenes del genotipo deseado.

Dado que las hembras cuentan con un órgano llamado espermateca donde pueden almacenar espermatozoides luego de cada cópula, es imprescindible asegurarse que no se hayan apareado previo al cruzamiento deseado. Posteriormente, se colocaron entre 4 y 5 hembras vírgenes con 2 ó 3 machos en los viales con comida común, adicionada con unos granos de levadura en polvo para optimizar la ovipuesta.

#### *Selección de los individuos: Cromosomas balanceadores.*

Los cromosomas balanceadores presentan inversiones en las zonas de recombinación con el objetivo de evitar la pérdida de las mutaciones de interés durante el proceso de recombinación homóloga que ocurre en la meiosis. La mayoría de los balanceadores está asociado a mutaciones dominantes que generan un fenotipo visible y permiten “seguir” las mutaciones de interés a través de esquemas de apareamiento de genética clásica. Además, cuentan con mutaciones recesivas deletéreas que disminuyen la variedad de progenie obtenida, facilitando la selección de los animales.

En esta tesis se utilizaron principalmente los siguientes cromosomas balanceadores: CyO (*Curly derivative of Oster*, figura 14, A) del cromosoma 2, asociado a un fenotipo de alas curvas; TM3 (*3<sup>rd</sup> multiply-inverted 3*) del cromosoma 3, asociado a un fenotipo de quetas cortas (Sb, figura 14, B). Para trabajar con una de las líneas deficientes de tau endógena ( $\Delta$ Tau, ver sección de líneas utilizadas, página 47) se utilizaron los balanceadores SM6 (*2<sup>nd</sup> multiply-inverted 6*), del cromosoma 2 asociado a un fenotipo de alas curvas, y TM6 (*3<sup>rd</sup> multiply-inverted 6*), del cromosoma 3, asociado a un fenotipo de quetas cortas (Sb, figura 14, B), a aumento de quetas en la zona lateral del tórax (Hu, figura 14, C) y a pupas pequeñas (Tb, figura 14, D).



**Figura 14. Fenotipo asociado a los cromosomas balanceadores utilizados.** A.

Comparación de las alas de individuos sin balanceador (wt, izquierda) y con Cyo o SM6 (Cyo, derecha). B. Comparación de las quetas del tórax de individuos sin balanceador (wt, izquierda) y con TM3 o TM6 (Sb, derecha). C. Comparación de la cantidad de quetas en la zona lateral del tórax (flecha) en individuos sin balanceador (wt, izquierda) y con TM6 (Hu, derecha). D. Comparación del tamaño de las pupas en individuos sin balanceador (wt, abajo) y con TM6 (Tb, arriba).

### 3. Líneas utilizadas

Existen grandes colecciones de líneas estables que pueden obtenerse de centros repositorios. En este trabajo todas las líneas promotoras (GAL4) y la mayoría de las líneas con mutaciones e inserción de genes (UAS) fueron obtenidas del “*Bloomington Drosophila Stock Center*” (BDSC). Las líneas que permiten expresar ARN de interferencia se obtuvieron de “*Vienna Drosophila Resource Center*” (VDRC). Algunas líneas UAS fueron gentilmente enviadas desde distintos laboratorios. En la tabla 1 se detallan las líneas utilizadas en este proyecto.

Nombre	Genotipo/ Cromosoma (Cr)	Procedencia
elav	P{w[+mW.hs]=GawB}elav[C155], Cr I	BDSC #458
p23	w; +; M{RFP, UAS-Bri2-23}ZH-86Fb/TM3, Cr III	Generada en nuestro laboratorio <sup>130</sup>
ADan	w; +; M{RFP, UAS-ADan}ZH-86Fb/TM3, Cr III	Generada en nuestro laboratorio <sup>130</sup>

Δtau	w[*]; Df(3R)MR22, e[s] tau[MR22]/TM3, P{w[+mC]=ActGFP}JMR2, Ser[1], Cr III	BDSC #9530
TauEP	w[1118]; P{w[+mC]=EP}tau[EP3203], Cr III	BDSC #17098
KOTau	w[*]; Tl{w[+mC]=Tl}tau[KO], Cr III	BDSC #64782
ARNiTau	w1118; P{GD8682}v25024, Cr III	VDRC #25024
AβK	yw; UAS- Aβ42 H <sub>2</sub> .12/CyO ; +, Cr II	Cedida por Dr. Mary Konsolaki <sup>131</sup>
hTauLow	w[1118]; P{w[+mC]=UAS- MAPT.VTR}12D, Cr II	BDSC #33819
hTauHigh	w[1118]; P{w[+mC]=UAS-Tau.wt}1.13, Cr II	BDSC #51362
hTauS2A	y[1] w[1118]; P{w[+mC]=UAS- Tau.S2A}1.33, Cr II	BDSC #51364
Aβ	w; +; M{RFP, UAS-Aβ42}ZH- 86Fb/TM3, Cr III	Generada en nuestro laboratorio <sup>130</sup>
XBP1-EGFP	yw; UAS-XBP1-EGFP/CyO; +, Cr II	Cedida por Dr.Ryoo y Dr. Steller <sup>132</sup>
XBP1-EGFP	yw; +; UAS-XBP1-EGFP/TM3, Cr III	Cedida por Dr.Ryoo y Dr. Steller <sup>132</sup>
HSC3	w[126]; P{w[+mC]=UAS-Hsc70- 3.WT}B, Cr II	BDSC #5843
VGlut	w[1118]; P{w[+mW.hs]=GawB}VGlut[OK371], Cr II	BDSC #26160
ARNiXBP1	P{KK109312}VIE-260B, Cr II	VDRC #109312
XBP1s	UAS-XBP1s/CyO; +, Cr II	Cedida por Dr. Diego Rincon Limas <sup>133</sup>
ARNiATF4	y[1] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.JF02007}attP2, Cr III	BDSC #25985
ARNiGADD34	y[1] sc[*] v[1]; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMS00811}attP2, Cr III	BDSC #33011

**Tabla 1. Líneas de *Drosophila* utilizadas en el proyecto.** En la primera columna se indica el nombre al que se refiere en los resultados, en la segunda el detalle de las inserciones genéticas y en la tercera la fuente de donde se obtuvieron.

### *Combinaciones de mutantes y líneas recombinantes*

Para la generación de combinaciones estables de dos mutaciones en distintos cromosomas, se utilizaron “líneas balanceadoras” que contenían los cromosomas balanceadores CyO y TM3 ó SM6 y TM6, junto con una fusión del cromosoma 2 y 3 (llamada ES), que no impide la recombinación durante la meiosis, pero cuenta con un marcador fenotípico visible y facilita la combinación de interés.

Para combinar mutaciones ubicadas en el mismo cromosoma (como el caso de ADan con  $\Delta$ Tau, TauEP y ARNiTau) se generaron líneas recombinantes. En *Drosophila* la recombinación meiótica normalmente sólo ocurre en hembras. Es por eso que, en presencia de las mutaciones de interés del mismo cromosoma en una hembra que no posea cromosomas balanceadores, ocurrirán los eventos de recombinación homóloga, con posibilidad de obtener la combinación deseada. Luego se cruzan con machos que aporten los cromosomas balanceadores y posteriormente se comprueba la presencia de cada una de las mutaciones con los métodos disponibles.

Para comprobar la presencia de la secuencia que codifica el péptido ADan se realizaron PCR tiempo final de ADN genómico. Para verificar la presencia de las mutaciones  $\Delta$ Tau, TauEP y ARNiTau, se realizaron *Western Blots* para comprobar la disminución de la proteína tau endógena (ver resultados, sección 1.3. "Relación entre la toxicidad de ADan en SN y tau endógena de Dm", páginas 74 y 76).

#### **4. Genotipificación de las líneas transgénicas**

##### ***Extracción de ADN***

Se homogenizó mecánicamente una mosca en 50  $\mu$ l de buffer de extracción de ADN (Tris-HCl 10 mM pH 8,2, EDTA 1 mM, NaCl 25 mM) con 200  $\mu$ g/ml de proteinasa K (Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos), en un tubo tipo Eppendorf de 1,5 ml. Se incubó a 37°C por 20 min. La proteinasa K se inactivó incubando 8 min a 95°C. Luego de centrifugar a 10.000 rpm durante 5 min (Centrífuga Eppendorf 5417R, Hamburgo, Alemania), se transfirió el sobrenadante a un tubo tipo Eppendorf nuevo y se almacenó a -20°C hasta su uso.

##### ***Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)***

Para amplificar el inserto correspondiente al péptido ADan, se utilizó el par de cebadores Br\_F1b (5'-ATA CGA ATT CAT GGC GAG CAA AG-3') y Br\_R5 (5'-

GAT TCT CGA GTC AAT AAT GTT TTT CTT GAC TGT-3'). El programa de PCR consistió en: un ciclo de 10 min de 95°C; 40 ciclos de 95°C 30 seg, 56°C 45 seg y 72°C 45 seg; un ciclo de 10 min a 72°C. Se utilizó la polimerasa de ADN KAPA Taq (Kapa Biosystems, Massachusetts, Estados Unidos) y el *Mastercycler Personal 5332* (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Los productos de PCR se resolvieron en un gel de agarosa 2% en TBE (89 mM Tris-borato, 2 mM EDTA, pH 8,3).

## **5. SDS-PAGE y Western blot**

### ***Extracción de proteínas***

Se machacaron 20-100 cabezas de moscas adultas con taladro con punta de homogenizador plástico en 1 µl por cabeza de buffer RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, deoxicolato de sodio 0,5%, Tritón X-100 1%) que al momento de usar se le agregó SDS 1% e inhibidores de proteasas y fosfatasa (EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, leupeptina 5 µg/ml, aprotinina 10 µg/ml, pepstatina 1 µg/ml, fluoruro de sodio 50 mM y ortovanadato de sodio 5 mM). Luego de centrifugar a 14.000 rpm por 45 min a 4°C min (centrífuga Eppendorf 5417R, Hamburgo, Alemania), se separó el sobrenadante, que corresponde a la fracción soluble en RIPA.

### ***Corrida electroforética en condiciones desnaturalizantes y Western blot***

Las muestras fueron hervidas 5 min con buffer Laemmli y DTT 0,1 M. Se resolvieron en geles de poliacrilamida (solución 40%/AcrilamidaBis, BioRad, California, Estados Unidos) al 12%, para detectar el péptido ADan, y 7,5%, en los demás casos. Los geles fueron preparados con buffer Tris/HCl 3M, SDS 0,3% pH 8,43 con glicerol 10,6% (v/v), persulfato de amonio 0,1% (p/v) y TEMED 0,05% (p/v). La electroforesis fue realizada con buffer cátodo (Tris/HCl 0,1 M, Tricina 0,1 M, SDS 1% pH 8,3, BioRad, California, Estados Unidos) y buffer ánodo (Tris 0,2 M pH 8,9) a 80 V constantes. Las proteínas fueron transferidas a membradas de difluoro polivinilideno (PVDF, GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra) a 100 V y 400 mA constantes por 2 h, utilizando el buffer de transferencia (Tris 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM, metanol 20%).

Luego, se bloquearon con leche en polvo descremada 5% en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, pH 7,4) con Tween 0,1% (PBS-T 0,1%) 1 h a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente en PBS-T 0,1%, leche descremada 0,5% toda la noche a 4°C. En el caso del uso del anticuerpo contra el sitio serina 262 fosforilado de la proteína tau, se utilizó buffer TBS (50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, pH 7,6) con 0,1% de Tween (TBS-T 0,1%). Además, se bloqueó toda la noche con una solución 5% de BSA (seroalbúmina bovina, Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos) en buffer TBS-T 0,1% y se incubó con anticuerpo primario 3 h a TA, para disminuir el pegado inespecífico del anticuerpo primario.

Tras lavar 3 veces durante 10 min con buffer, se incubaron las membranas con los anticuerpos secundarios correspondientes (ligados a peroxidasa de rábano) en solución de bloqueo por 2 h a TA. Tras lavar nuevamente, 3 veces por 10 min se procedió a revelar incubando con volumen suficiente para cubrir la membrana con el reactivo *ECL Prime Western Blotting System* (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra) y se visualizó a los 2-3 minutos con *ImageQuant LAS4000* (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra).

Para cuantificar la proporción de tau fosforilada en el sitio 262 relativa a tau total, se realizó un *stripping* (remoción), con el objetivo de disociar los anticuerpos utilizados y volver a incubar con otros anticuerpos. Para ello se incubaron las membranas 1 h a 50°C en agitación con buffer de *stripping* (Tris 62,5 mM, SDS 2%, pH 6,7) con 70 µl de β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos) cada 10 ml. Se lavó con agua corriente 2 min y se dejó estabilizar la membrana en PBS-T 0,1%. Se comprobó la ausencia de señal y se continuó con el protocolo como los demás casos.

El péptido ADan sintético fue gentilmente cedido por el Dr. Jorge Ghiso, de la Universidad de Nueva York.

A partir de las fotos adquiridas con el equipo *ImageQuant LAS4000*, se utilizó el programa ImageJ 1.43u para definir un área de interés y se cuantificó la densidad óptica de cada banda.

*Anticuerpos utilizados*

Primarios:

Nombre (Anti-)	Origen	Tipo	Dilución
ADan (5282)	Cedido por el Dr. Vidal <sup>35</sup>	Policlonal, conejo	1/1000
Tubulina (12G10)	DSHB (Iowa, Estados Unidos)	Monoclonal, ratón	1/10.000
pS262 (Ab131354)	AbCam (Cambridge, Inglaterra)	Policlonal, conejo	1/1000
dTau	Cedido por Dr. Nick Lowe <sup>134</sup>	Policlonal, conejo	1/1000
hTau (HT7)	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos)	Monoclonal, ratón	1/1000
Actina (A2066)	Sigma-Aldrich (Merck, Darmstadt, Alemania)	Policlonal, conejo	1/500
HSC3	Cedido por el Dr. Ryoo <sup>132</sup>	Policlonal, cobayo	1/40.000

Secundarios:

- IgG anti conejo-HPR (Jackson IR, Pensilvania, Estados Unidos), dilución 1/5000.
- IgG anti ratón-HPR (Santa Cruz Biotechnology, Texas, Estados Unidos), dilución 1/10.000.
- IgG anti cobayo-HRP (Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Alemania), dilución 1/10.000

**6. Inmunofluorescencia en cerebros de moscas adultas**

Las moscas fueron decapitadas utilizando pinzas de disección nº5 (Dumont, Montignez, Suiza) bajo una lupa (S6 E, Leica, Wetzlar, Alemania) y las cabezas fueron colocadas en la solución de fijación (PFA 4%, PB 0,1M) durante 40 min en hielo. Luego, se lavaron con PBS-T 0,3% y se disecaron sobre placas de SYLGARD 184 (Dow Corning, Michigan, Estados Unidos) bajo lupa. Los cerebros obtenidos fueron colocados en tubos tipo Eppendorf de 1,5 ml y para eliminar los restos de fijador se realizaron 3-5 lavados de 10 min en PBS-T 0,3% a TA. Luego de bloquearse durante 1 h con suero normal de cabra 10% en PBS-Tritón 0,1% (PBS-Tx 0,1%), se los incubó con los anticuerpos

primarios específicos diluidos en solución de bloqueo, a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se realizaron 5 lavados de 5 min con PBS-T 0,3%, se agregaron los anticuerpos secundarios diluidos PBS-Tx 0,1% con suero normal 10% e incubaron durante 2 h a TA. Luego de 5 lavados de 5 min, los cerebros fueron montados sobre portaobjetos en Mowiol (Mowiol 4-88 Sigma-Aldrich 10% p/v, glicerol 25% p/v, 0,1M Tris HCl pH 8,5) y posteriormente sellados con un cubreobjetos enmarcado con esmalte para uñas transparente. Las imágenes fueron obtenidas con el microscopio confocal Meta 510 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania).

#### *Anticuerpos utilizados*

Primarios:

Nombre (Anti-)	Origen	Tipo	Dilución
ADan (5282)	Cedido por el Dr. Vidal	Policlonal, conejo	1/50
ELAV (9F8A9)	DSHB (Iowa, Estados Unidos)	Monoclonal, ratón	1/10
GFP (A6455)	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos)	Policlonal, conejo	1/500

Secundarios (todos Jackson IR, Pensilvania, Estados Unidos)

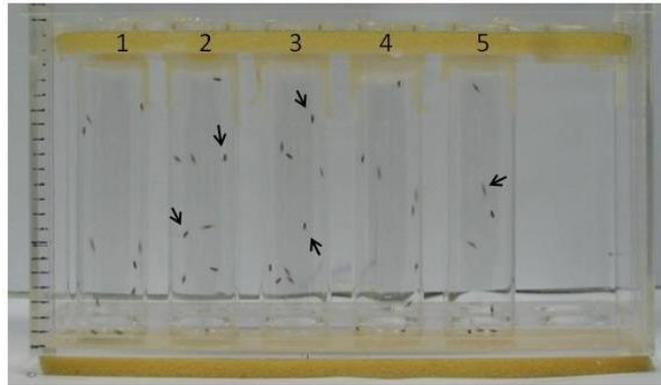
- IgG anti ratón-Cy2, dilución 1/500.
- IgG anti conejo-Cy5, dilución 1/500.
- IgG anti conejo-Alexa 488, dilución 1/500.

## **7. Ensayo de longevidad**

Las moscas se desarrollaron a 25°C (~10 días) y luego se mantuvieron a 28°C. Se partió de aproximadamente 100 individuos de cada genotipo, los cuales se repartieron en 5 viales de 20 individuos para evitar el hacinamiento y se los repicó cada 2-3 días registrando a su vez el número de individuos muertos a lo largo del tiempo.

### **8. Geotaxis negativa (*Rapid Iterative Negative Geotaxis*, RING)**

Las moscas se desarrollaron a 25°C (~10 días) y luego se mantuvieron a 25°C o 28°C en grupos de 40 machos en viales con alimento, los cuales fueron repicados cada 2-3 días. El comportamiento de escalada fue evaluado utilizando el método de RING<sup>135</sup>. Brevemente, un día antes del ensayo, 10 machos de cada genotipo fueron seleccionados al azar y transferidos a viales nuevos. Al día siguiente, los machos fueron transferidos sin anestesia a viales de vidrio limpios y cargados en la gradilla de RING (figura 15). Este aparato permite mantener rígidos, juntos y verticales, a 6 viales de vidrios. El ensayo consiste en golpear el aparato suavemente contra la mesada (en sentido vertical, 3 veces) de manera que todas las moscas se ubiquen en el fondo de cada tubo. Al mismo tiempo se filma por 20 segundos con una cámara fijada a 55 cm de la gradilla. El procedimiento se repite 7 veces, con intervalos de 1 minuto. Las 2 primeras repeticiones no se incluyeron en el análisis ya que se considera que forman parte de la habituación de los individuos. Se utilizó el software Avidemux 2.6.8 para tomar una fotografía luego de determinada cantidad de segundos desde que todas las moscas estaban en el fondo de los tubos: para el análisis de la línea A $\beta$ K se tomaron las fotografías a los 10 seg y en los demás casos se tomaron a los 5 seg, de acuerdo al tiempo que le toma a cada genotipo escalar hasta aproximadamente la mitad del tubo. Con la utilización del software Scion Image Alpha 4.0.3.2. se calculó la altura promedio de escalada de cada genotipo (para cada experimento: altura promedio alcanzada por 10 individuos, y promedio de 5 repeticiones) y se reportó el promedio de al menos 3 experimentos independientes.



**Figura 15. Dispositivo RING.** El aparato permite colocar 6 viales de vidrio (aquí se muestran solo 5), los cuales contienen a las 10 moscas. Las flechas indican las moscas dentro de cada vial.

### 9. Extracción secuencial de proteínas

Se colocaron 100 cabezas de moscas en tubos tipo Eppendorf de 1,5 ml, y se machacaron mecánicamente con 200  $\mu$ l HSB (*High Salt Buffer*, 50mM Tris, pH 7,4, 750 mM NaCl, 5mM EDTA, pH 8) junto con inhibidores de proteasas (1mM PMSF, 1  $\mu$ g/ml leupeptina, 1  $\mu$ g/ml pepstatina). Se centrifugó 1 h a 40.000 rpm a 4°C en ultracentrífuga (Beckman L765 *ultracentrifuge*, Beckman Coulter, California, Estados Unidos). Se recuperó el sobrenadante como la fracción soluble en HSB. Al pellet se le agregó 100  $\mu$ l de HSB-Tx 1% y se agitó con *vórtex* 5 minutos. Se centrifugó 1 h a 40.000 rpm y 4°C y se recuperó el sobrenadante como fracción soluble en HSB-Tx. Nuevamente se agregó al pellet 100  $\mu$ l de TBS-SDS 2% y se centrifugó 1 h a 40.000 rpm y 4°C. El sobrenadante se recuperó como la fracción soluble en TBS-SDS 2%. Finalmente, se agregaron 100  $\mu$ l de ácido fórmico 100% (AF 100%), se incubó 30 min a 37°C y se centrifugó 1 h a 15.000 rpm y 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se secó con *Speed Vac* (HetoVac centrífuga VR-1 y concentrador de vacío CT 60e). El precipitado resuspendido en la solución para sembrar en el gel de electroforesis se consideró la fracción soluble en AF 100%.

## 10. Cuantificación de ARN mensajeros

### ***Extracción de ARN***

Se colocaron 30-40 cabezas de moscas en tubos tipo Eppendorf de 1,5 ml, se agregaron 600 µl de Trizol (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos) y se machacaron mecánicamente. Luego de 5 min a TA, se agregaron 200 µl de cloroformo (Anedra, Research AG, Buenos Aires, Argentina). Se agitó por inversión y posteriormente, se centrifugó durante 10 min a 12.000 rpm a 4°C para lograr la separación de fases. Se transfirió la fase acuosa (~350 µl) a un tubo tipo Eppendorf nuevo y se le agregó 500 µl de isopropanol (Sintorgan S.A., Buenos Aires, Argentina). Tras incubar 10 min a TA, se centrifugó nuevamente 10 min a 12.000 rpm a 4°C y se descartó el sobrenadante. Se lavó el pellet dos veces con 150 µl de etanol 70% (Sintorgan S.A., Buenos Aires, Argentina) y luego se resuspendió en agua destilada estéril. Las muestras de ARN se guardaron a -80°C para evitar su degradación. La concentración de ARN se cuantificó mediante *Nanodrop 2000 spectrophotometer* (Thermo Scientific, Waltham, Estados Unidos). Se consideró aceptable la calidad del ARN con relaciones de absorbancia a 260nm/280nm entre 1,6-2,0 y a 260nm/230nm lo más cercana a 2.

### ***Retrotranscripción***

Se trataron 2,5 µg de ARN con ADNasa I (Promega, Wisconsin, Estados Unidos) siguiendo el protocolo de los fabricantes. Luego se realizó la retrotranscripción con 0,5 µl de *Superscript II system* para cada reacción junto con 1 µl de oligo(dT), 1 µl de dNTP's, 2 µl de DTT 0,1M, en un volumen final de 20 µl (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos). Se incubó en termociclador 2 h a 42°C y 15 min a 72°C.

### ***PCR en Tiempo Real***

Las reacciones se realizaron usando *PowerUp SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems, Thermo Fisher, Waltham, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones de los fabricantes, en un volumen final de 10 µl. Para correr las

reacciones de amplificación se utilizó el equipo *LightCycler 480* (Roche Molecular Systems, Basilea, Suiza).

#### Cebadores:

##### Tubulina (normalizador)

Sentido 5' GCC TGA ACA TAG CGG TGA AC 3'

Anti sentido 5' ATC CCC AAC AAC GTG AAG AC 3'

##### XBP1s

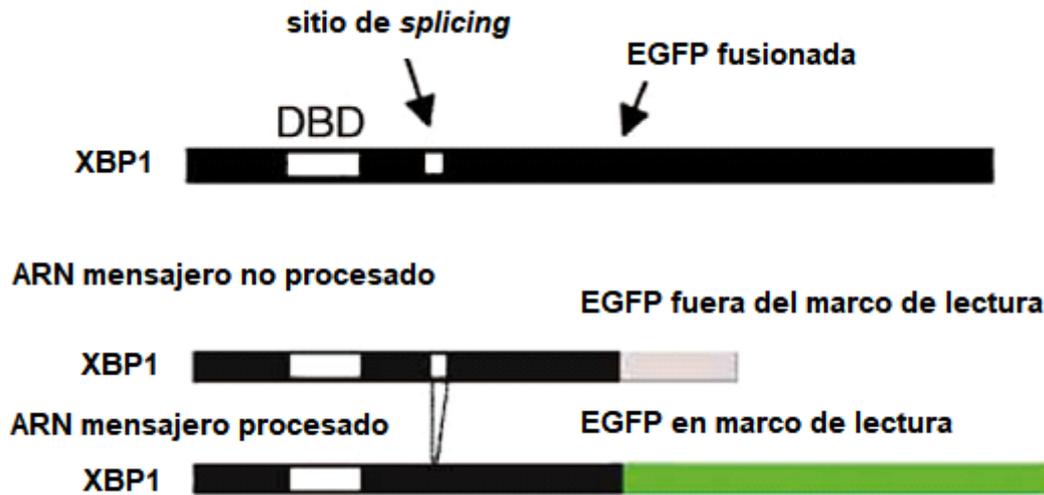
Sentido 5' GCA CAA CAC CAG ATG CAT CAG CCA A 3'

Anti sentido 5' TGT TGT ATA CCC TGC GGC AGA TCC AA 3'

Condiciones de corrida: un ciclo de 5 min a 95°C y 40 ciclos de 15 seg a 95°C, 30 seg a 60°C y 30 seg a 72°C. Luego se incubó 95°C-50°C-95°C para determinar el perfil de disociación, con el objetivo de asegurar la presencia de un solo amplicón. Se utilizó el método de cuantificación absoluta, con curvas de calibración de eficiencias de amplificación de 100±10%, generadas a partir de *pool* de ADNc de todas las muestras de cada *set* de experimentos.

## **11. Activación de la vía IRE1/XBP1**

Ryoo y Steller<sup>132</sup> desarrollaron una herramienta genética que permite detectar *in vivo* la activación de la respuesta de estrés de retículo endoplásmico vía IRE-1 en diversos tejidos de *Drosophila*. Dicha construcción contiene la secuencia de XBP1 que incluye el sitio de unión al ADN y el sitio del *splicing* por IRE-1, fusionada a EGFP (figura 16) (ver cuadro de líneas utilizadas, página 48). Al sobre-expresar esta construcción mediante el sistema binario GAL4/UAS, se puede evidenciar la activación de la vía de IRE-1, dado que el ARNm de XBP1 sufre un *splicing* no convencional provocando que la secuencia codificante de EGFP quede en marco de lectura y pueda ser traducida. En condiciones basales, al no producirse el *splicing*, no se traduce EGFP.



**Figura 16. Esquema del reportero de *splicing* no convencional de XBP1.** Cuando el ARN mensajero no es procesado, la secuencia de EGFP queda fuera del marco de lectura y no se traduce, mientras que cuando ocurre el procesamiento del ARN mensajero, la secuencia de EGFP queda en marco de lectura, generando una proteína funcional. DBD, dominio de unión al ADN. Adaptada de Ryoo, et al., 2007 <sup>132</sup>.

Para potenciar la señal de EGFP se realizaron inmunofluorescencias de cerebros enteros (con anti-GFP, policlonal de conejo 1/500, Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos) y se obtuvieron imágenes con el microscopio confocal Meta 510 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania).

## 12. Análisis estadísticos

Los resultados de al menos tres repeticiones independientes se expresaron como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). Se utilizó el software Graph Pad Prism v.5.0 para realizar los análisis estadísticos. Los datos fueron analizados mediante pruebas t de Student, ANOVA de 1 y 2 factores, asociados a medidas repetidas, contrastados con *test post hoc*. Para el análisis del ensayo de longevidad se compararon las curvas con el método Gehan-Breslow-Wilcoxon. Un valor  $p < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo.

# RESULTADOS

## **Capítulo 1. Caracterización de la sobre-expresión del amiloide ADan y comparación del efecto de la disminución de tau endógena de Dm al sobre-expresar ADan y A $\beta$**

### **1.1. Efectos de la sobre-expresión de ADan en Sistema Nervioso (SN) de Dm**

El primer objetivo consistió en caracterizar el efecto de la sobre-expresión del péptido ADan en el sistema nervioso de Dm. Para ello, se utilizó el promotor del gen *elav* que dirige la expresión a todas las neuronas. La proteína ELAV (del inglés “*Embryonic lethal abnormal visual system*”) se une al ARN en neuronas<sup>136</sup> y se expresa desde el comienzo del desarrollo del sistema nervioso. En adultos, se detectó a lo largo de todo el sistema nervioso, sin involucrar a neuroblastos ni glía<sup>137</sup>. Sin embargo, se ha detectado una expresión transitoria en células gliales, neuroblastos y glioblastos, durante una ventana estrecha del desarrollo embrionario, al igual que en células epiteliales durante los estadios larvales<sup>138,139</sup>. El promotor *elav-GAL4* del cromosoma 1 es un *enhancer-trap* ampliamente utilizado en el estudio del SN de Dm.

Las líneas de Dm utilizadas fueron generadas y parcialmente caracterizadas previamente en nuestro laboratorio<sup>130</sup>. Las mismas se crearon a través de un sistema basado en la recombinasa- $\phi$  para la inserción directa de los transgenes en un sitio específico del genoma de Dm<sup>140</sup>. La secuencia de los péptidos ADan y Bri2-23 (p23) fusionadas en su región amino-terminal a la secuencia de un péptido señal (*Necrotic*) para su transporte a la vía secretoria, se insertaron en el cromosoma 3. Esto permitió un nivel de expresión de los péptidos comparable, sin efectos no controlables debido a la inserción al azar en el genoma y una localización subcelular similar a la propuesta en neuronas humanas. Además, los niveles de expresión obtenidos en nuestro sistema no son elevados, en comparación con otras líneas transgénicas que expresan A $\beta$ <sup>131,141</sup>

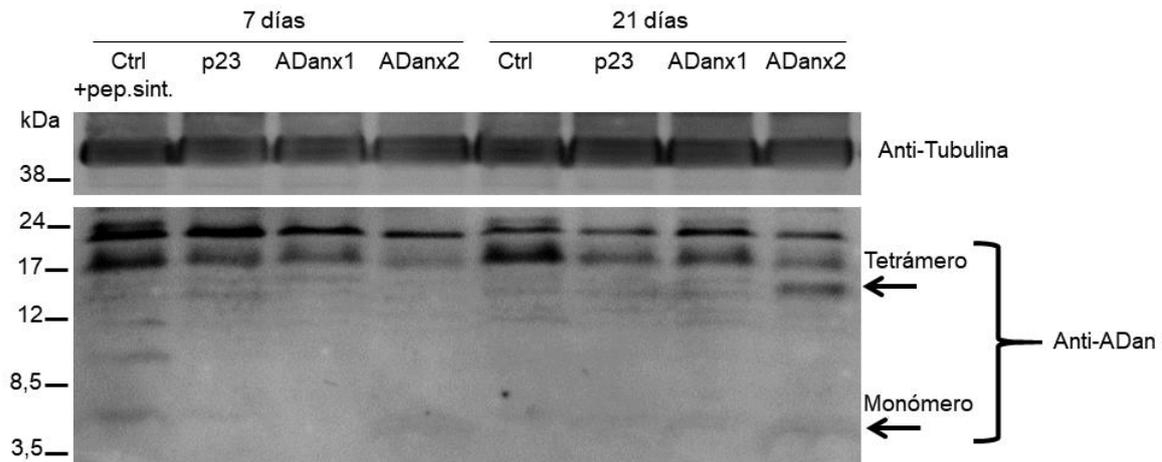
Es así que se combinó la línea *elav-GAL4* (*elav*) con las líneas que contienen la secuencia de los péptidos y se expresaron en homocigosis y en hemicigosis, para evaluar el efecto de la “dosis” génica. Como control se utilizaron moscas que sobre-expresan el péptido p23 en homocigosis y hemicigosis, ya que este

péptido es el que se libera en condiciones fisiológicas luego del procesamiento de la proteína BRI2 silvestre y no es amiloidogénico. Este control resulta de gran utilidad ya que permite un nivel de sobre-expresión similar de ambos péptidos en la vía secretoria, evitando confundir efectos relacionados con la expresión *per se* con efectos asociados a la toxicidad de cada péptido.

Las moscas se desarrollaron a 25°C, que es la temperatura óptima de crecimiento para *Dm*. El aumento de la temperatura cerca de los 28-30°C induce un aumento en la transcripción de GAL4 y un estrés fisiológico que permite intensificar ciertos fenotipos tóxicos. Debido a que las líneas que utilizamos son de expresión media, los adultos fueron envejecidos a 28°C.

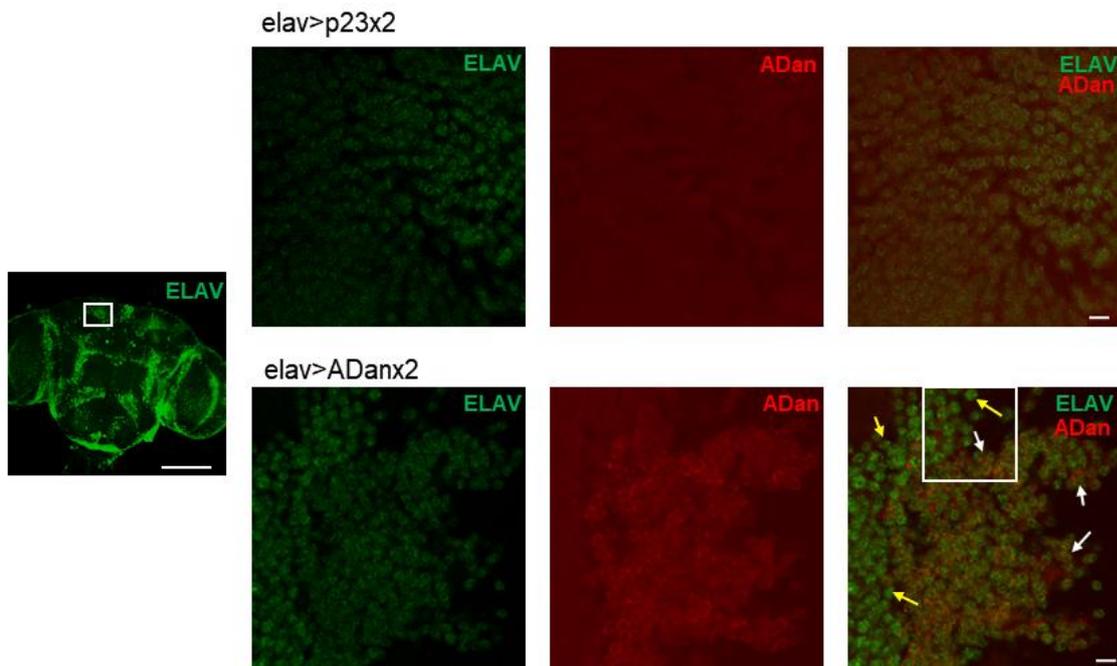
Empleando la técnica *Western Blot*, a partir de homogenatos de cabezas y utilizando un anticuerpo específico contra el péptido ADan, se pudo detectar una banda de aproximadamente 4 kDa, correspondiente al monómero del péptido, tanto en los extractos provenientes de individuos hemicigotas a los 21 días como en homocigotas a los 7 y 21 días post-eclosión. Además, se detectó un posible tetrámero (alrededor de los 16 kDa) sólo en los extractos correspondientes a los individuos homocigotas para ADan y envejecidos por 21 días (figura 17). Estos resultados indican un correcto procesamiento del péptido señal y una correlación entre las variables “dosis” génica y tiempo y la acumulación del péptido en el cerebro.

Además del control directo de ADan (p23), en este ensayo se incluyó un extracto no relacionado (moscas *elav*), que en la primera calle se sembró junto con péptido ADan sintético, para obtener el patrón de corrida del mismo.



**Figura 17. Acumulación del péptido ADan en el SNC de *Drosophila*.** *Western Blot* representativo de extractos provenientes de cabezas de individuos jóvenes (7 días) y envejecidos (21 días), expresando una o dos copias del péptido ADan, en comparación con los controles correspondientes. Ctrl: moscas elav. pep. sint.: péptido ADan sintético. Las bandas de 17 a 24 kDa son inespecíficas. Las flechas indican bandas específicas de ADan (monómero y tetrámero resistente a SDS).

Para comprobar la acumulación del péptido ADan en el cerebro de las moscas a través de un método independiente, se realizó una inmuno-fluorescencia en cerebros de individuos homocigotas a una edad intermedia (14 días) y con anticuerpos específicos anti-ADan y anti-ELAV, que permite identificar los núcleos de las neuronas. Como se muestra en la figura 18, se detectó una marca específica con el anticuerpo anti-ADan sólo en los cerebros de las moscas que expresan dicho péptido, con distribución peri-nuclear en neuronas positivas para ELAV. Además, se encontraron neuronas sin marca positiva para ADan, posiblemente porque la acumulación no llega a ser detectable con este método o porque el péptido no se acumula en ciertas neuronas.

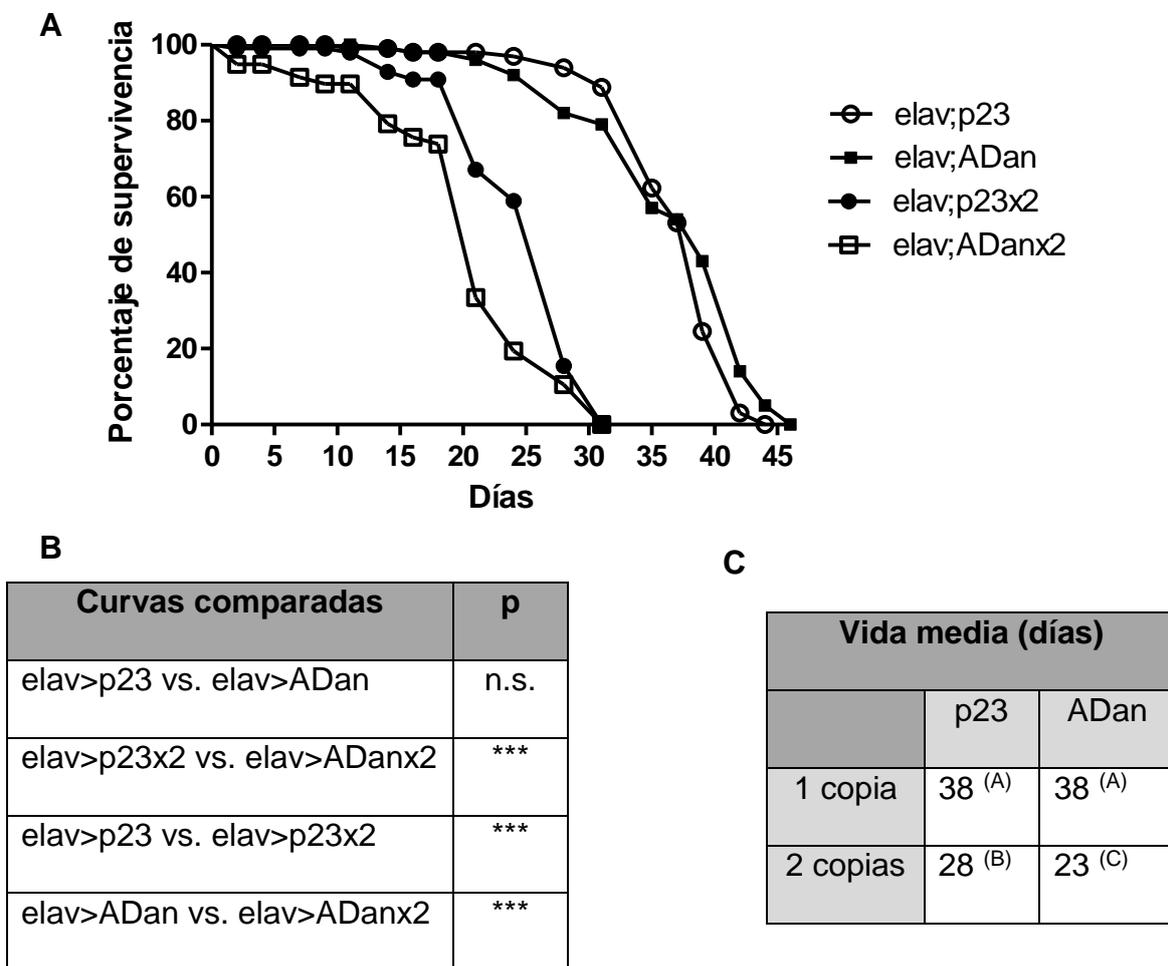


**Figura 18. Acumulación de ADan en cerebro de *Drosophila*.**

Inmuno-fluorescencia representativa de cerebros de moscas de 14 días con anticuerpos contra el marcador de neuronas ELAV (verde) y contra ADan (rojo). Izquierda, cerebro entero, escala= 100  $\mu$ m. A su lado, ampliación de la zona recuadrada en los distintos genotipos. En la foto del cerebro de la mosca *elav>ADanx2* se indican con flechas blancas algunas neuronas con marca positiva para ADan y en amarillo algunas sin marca de ADan. A la derecha abajo se amplió la zona recuadrada. Escala: 5  $\mu$ m. Para detectar neurotoxicidad en nuestro modelo utilizamos dos ensayos comportamentales: el ensayo de longevidad, mediante el cual se puede determinar una curva de sobrevivencia que refleja el número de individuos muertos día a día y permite establecer la vida media de una población, y el ensayo de RING (*Rapid Iterative Negative Geotaxis Assay*) para detectar defectos en la geotaxis negativa, que es una respuesta de escape anti-gravitatoria innata provocada por una estimulación mecánica, en la que las moscas ascienden por la pared de un contenedor después de ser golpeado contra una superficie en su parte inferior<sup>142</sup>.

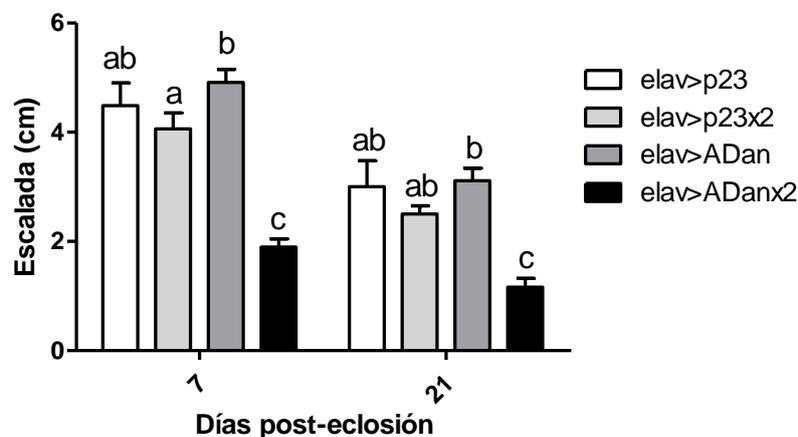
Para determinar si la sobre-expresión del péptido ADan ejerce algún efecto tóxico que repercuta en la vida media de la población, se sobre-expresaron los péptidos ADan y p23, en homo y hemicigosis a 28°C. En primer lugar, al comparar tanto las curvas como la vida media de *elav>p23* y *elav>p23x2*, se detectó un claro efecto de disminución de la sobrevivencia que podría deberse a

una exacerbación en los niveles de expresión en homocigosis, que ya ha sido reportado<sup>143</sup>, reforzando la importancia de utilizar a p23 como control específico en cada experimento (Figura 19, C, \*\*\* $p < 0,001$  en la comparación de la vida media). Por otro lado, la sobre-expresión en hemicigosis no mostró diferencias entre los péptidos ADan y p23, ni al comparar las curvas ni al comparar las vidas medias, mientras que en homocigosis se observó que la sobre-expresión de ADan provocó mayor mortalidad en las primeras dos semanas respecto del control, obteniendo diferencias significativas al comparar las curvas (figura 19, A, B) y la vida media (figura 19, C \*\* $p < 0,01$ ).



**Figura 19. Efecto de la sobre-expresión pan-neural de los péptidos p23 y ADan en la supervivencia.** A. Curva de supervivencia al sobre-expresar una copia y dos copias de ADan y del control p23. B. Comparación de las curvas por el método Gehan-Breslow-Wilcoxon,  $p^{***} < 0,001$ . C. Vida media de cada genotipo. ANOVA de una vía, seguida de comparaciones por Bonferroni. Las letras distintas denotan diferencias significativas entre los genotipos ( $p < 0,05$ ).

A continuación, realizamos ensayos de geotaxis negativa para determinar si la sobre-expresión de ADan induce un fenotipo tóxico detectable y cuantificable por un método sencillo y más rápido que el ensayo de longevidad. En la figura 20 se muestran los resultados obtenidos al realizar el ensayo con moscas que expresan en hemi y homocigosis los péptidos p23 y ADan, a los 7 y 21 días post-eclosión. La sobre-expresión de una copia de ADan no mostró toxicidad respecto del control *elav>p23* en ninguno de los días analizados ( $4,91 \pm 0,24$  vs  $4,47 \pm 0,42$  a los 7 días y  $3,11 \pm 0,23$  vs  $3,00 \pm 0,47$  a los 21 días). Sin embargo, se observó una disminución significativa de la distancia escalada en individuos que sobre-expresan dos copias de ADan desde al menos los 7 días post-eclosión, comparado con el control *elav>p23x2* ( $1,90 \pm 0,15$  vs  $4,06 \pm 0,29$  \*\*\* $p < 0,001$  a los 7 días y  $1,17 \pm 0,16$  vs  $2,50 \pm 0,15$  \*\*\* $p < 0,001$  a los 21 días). Además, si bien se habían detectado diferencias en la longevidad entre la expresión en hemicigosis y en homocigosis de p23, en el ensayo de geotaxis negativa ambos genotipos presentan un desempeño similar ( $4,47 \pm 0,42$  vs  $4,06 \pm 0,29$  a los 7 días y  $3,00 \pm 0,47$  vs  $2,50 \pm 0,15$  a los 21 días, respectivamente).



**Figura 20. Efecto de la sobre-expresión de ADan en geotaxis negativa.** La distancia escalada se expresó como media  $\pm$  error estándar. ANOVA de 2 factores, medidas repetidas, seguido de comparaciones por Bonferroni. Las letras distintas denotan diferencias significativas entre genotipos para cada edad ( $p < 0,05$ ).

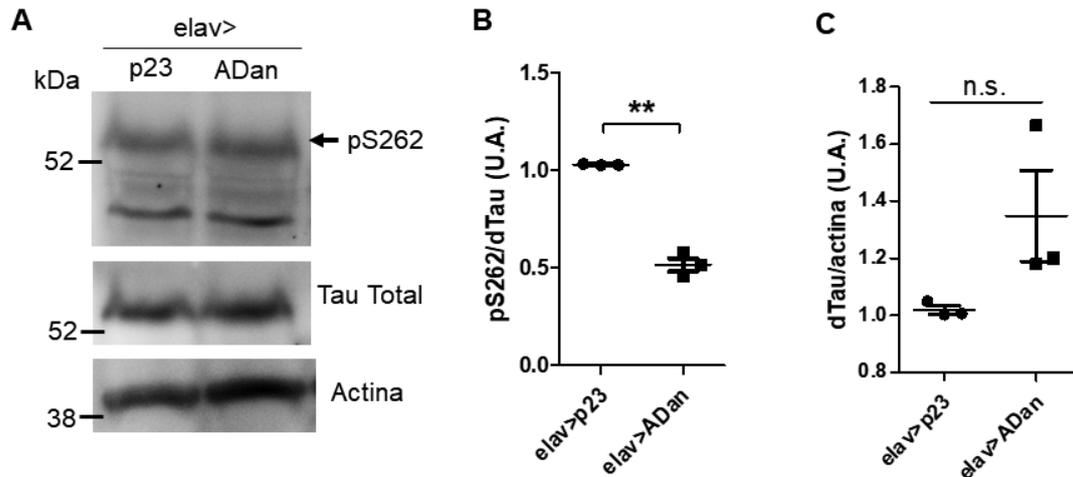
En conjunto, estos resultados muestran que la expresión y acumulación neuronal de ADan impactan en la sobrevivencia y el comportamiento en geotaxis negativa de las moscas que sobre-expresan el péptido en homocigosis.

A partir de estos resultados se decidió seguir trabajando únicamente con la línea de ADan homocigota, ya que la que expresa una sola copia no muestra diferencias con el control ni en longevidad ni en geotaxis negativa. Es por eso que ya no se hará referencia al número de copias de los transgenes: en todos los casos utilizaremos ADan<sup>x2</sup> y, como su control, p23<sup>x2</sup>.

### 1.2. Efecto de la sobre-expresión de ADan en el SN sobre tau endógena de Dm

Como se mencionó en la introducción, en los cerebros de pacientes con DFD, de manera similar a lo que se observa en EA, se encuentran ovillos neurofibrilares formados por acumulación de la proteína tau hiper-fosforilada. La relación entre tau y el péptido A $\beta$  ha sido ampliamente estudiada y los resultados se han resumido en la introducción (sección 2, páginas 28-33). La relación entre ADan y tau ha sido estudiada únicamente en ratones que sobre-expresan tau humana con mutaciones asociadas a FTDP-17.

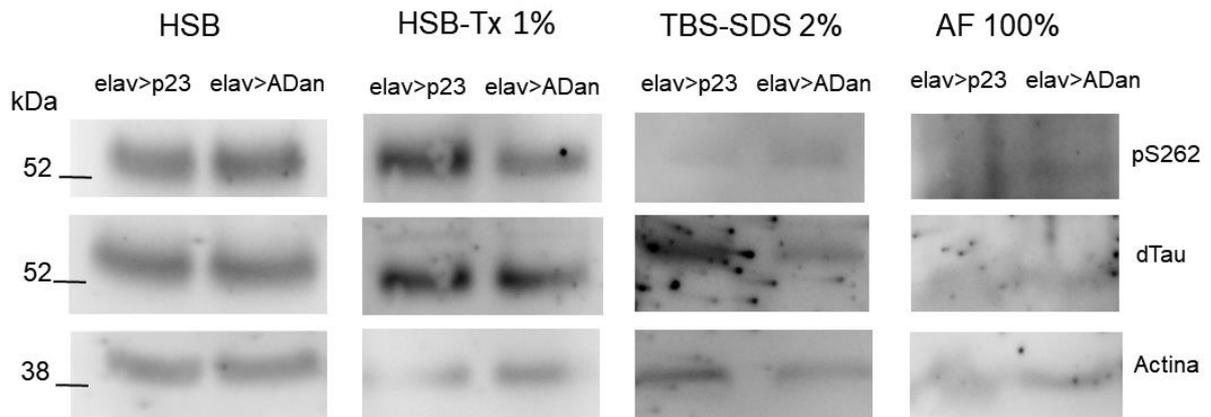
Para estudiar en nuestro modelo el efecto de la sobre-expresión de ADan sobre tau, analizamos si ocurren cambios en tau endógena de Dm. En primer lugar, analizamos por *Western blot* el estado de fosforilación en el sitio serina 262 (Ser262) y la cantidad de tau total en moscas que sobre-expresan ADan. Se encontró una disminución en los niveles de fosfo-serina-262 (pS262) asociados a un aumento no significativo de tau total, es decir, que si bien ocurre una disminución significativa de pS262 total (no se muestra,  $p=0,046$ ) el leve aumento de tau total impacta en la relación pS262/tau total generando una disminución de casi un 50% en las moscas que sobre-expresan ADan respecto del control p23 (figura 21, B).



**Figura 21. Nivel de fosforilación de la serina-262 y nivel de proteína tau total en las cabezas de las moscas que sobre-expresan ADan.** A. *Western Blot* representativo de extractos de cabezas provenientes de individuos de 14 días de edad. B. Comparación de los niveles de fosfo-serina-262 (pS262) en relación a los niveles de tau total, relativos a actina. C. Comparación de los niveles de tau total (dTau) entre las moscas control y las elav>ADan,  $p=0,075$ . Prueba t de *Student*, de dos colas,  $**p=0,0042$ .

A primera vista y tomando como referencia lo que ocurre con A $\beta$ , este resultado es contrario a lo esperado, ya que la toxicidad de tau está asociada a un aumento de la fosforilación del sitio Ser262<sup>58,90</sup>. Además, se detectó un leve aumento de tau total que pareciera no fosforilarse en dicho sitio. Sin embargo, este resultado está representando la fracción de tau soluble en buffer RIPA-SDS 0,1%, y es posible que esté ocurriendo una hiper-fosforilación y, por consiguiente, una acumulación de fosfo-tau en fracciones más insolubles. De esta manera, se propuso realizar extracciones secuenciales en buffers de solubilización creciente (HSB, HSB-Tritón 1%, TBS-SDS 2% y ácido fórmico 100%). Lamentablemente no se pudieron obtener resultados cuantificables a partir de las extracciones. Como se ve en la figura 22, si bien en las dos primeras fracciones (HSB y HSB-Tx 1%) se pudieron detectar las proteínas de interés, en las fracciones de TBS-SDS 2% y de AF 100%, la cantidad de proteínas no fue suficiente para visualizar claramente la señal de los anticuerpos, y en algunas fotos aparecieron agregados que interfieren en la visualización de las bandas. Aunque podría haber una banda de tau pS262 en la fracción soluble en ácido fórmico en el límite de detección, no se evidenció

una clara acumulación de esta especie en fracciones insolubles.



**Figura 22. Extracción secuencial de proteínas de cabezas de moscas.** *Western blots* representativos de las extracciones con los distintos buffers. HSB= *High Salt Buffer*. HSB-Tx 1%= *High Salt Buffer* + 1% tritón. TBS-SDS 2%= *Buffer tris-salino* + SDS 2%. AF 100%= *Ácido fórmico* 100%.

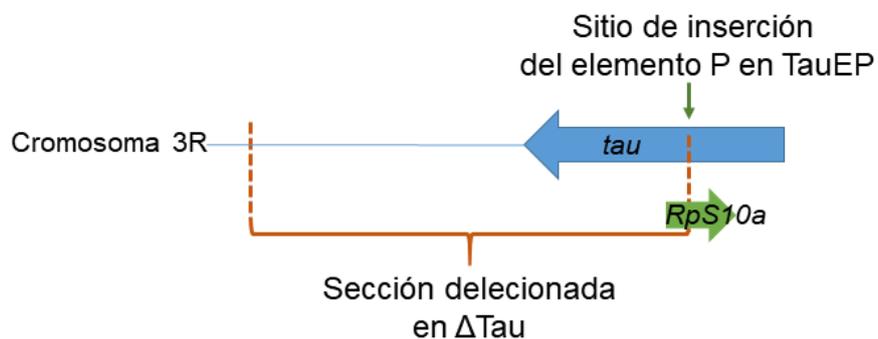
En resumen, la sobre-expresión de ADan estaría impactando en los niveles de tau endógena, induciendo una disminución relativa de su fosforilación en el sitio Ser262.

### 1.3. Relación entre la toxicidad de ADan en SN y tau endógena de Dm

A continuación, se planteó la posibilidad de que, como ha sido reportado para A $\beta$  en modelos murinos, la toxicidad de ADan en Dm sea dependiente de tau. Para poder evaluarlo se utilizaron tres líneas que, a través de diferentes herramientas genéticas, disminuyen los niveles de la proteína tau endógena.

Para disminuir los niveles de tau, en primer lugar, se combinaron dos líneas: 'TauEP' y ' $\Delta$ Tau' (figura 23). La línea TauEP es parte de la colección del proyecto "*Gene Disruption Project*" del grupo *Berkeley Drosophila Genome Project*. La línea presenta un elemento P insertado al azar, que una vez mapeado se detectó que interrumpe el gen *tau*<sup>144</sup>. Los elementos P son transposones detectados en *Drosophila* en los años 80 en el curso de la investigación del fenómeno de la "digénesis híbrida", un síndrome de rasgos anormales de la línea germinal, como alta tasa de mutación y recombinación<sup>145</sup>. Luego de caracterizarlos se modificaron para detectar genes, no solo a través de un fenotipo mutante sino también mediante la revelación de patrones de expresión de proteínas o ARN, con las técnicas *enhancer-trap* y *gene-trap*.

Además, debido a la movilización imprecisa de los elementos P, se utilizan para generar mutantes por escisión<sup>146</sup>. Es así que, para generar una línea con una deleción en el gen de tau se indujo la recombinación, entre el cromosoma que contenía la inserción TauEP y un homólogo con marcadores visibles; de la progenie se seleccionó y caracterizó a  $\Delta$ Tau<sup>134,147</sup>. Esta línea presenta una deleción de aproximadamente 72,5 kb que afectaría a 10 genes, entre ellos tau (<http://flybase.org/reports/FBab0037763>). Su combinación con TauEP implica la deficiencia en hemicigosis de estos genes, excepto *tau* y *RpS10a* que estarían afectados en su totalidad. *RpS10a* es una proteína ribosomal que se expresa principalmente en ovario y testículo (<http://flybase.org/reports/FBgn0027494>). Además, existe un gen con 70% de identidad ubicado en el cromosoma X (*RpS10b*) que se expresa en todos los tejidos (<http://flybase.org/reports/FBgn0285947>). Estos dos factores sugieren que *a priori* la falta de expresión de *RpS10a* no impactaría de manera directa en los estudios relacionados con tau en el SN.



**Figura 23. Dibujo representativo de la ubicación de la deleción  $\Delta$ Tau y la inserción TauEP.** La deleción involucra más genes además de *tau* (flecha azul), pero al combinarla con TauEP el único otro gen que posiblemente está totalmente delecionado es *RpS10a* (flecha verde).

En *Drosophila* se han detectado 13 isoformas de tau, a través de la técnica RNAseq, que se generan por *splicing* alternativo. La mayoría tendría un peso molecular cercano a 30-40 kDa (tabla 2). Sin embargo, al realizar *Western blots* con un anticuerpo específicos anti-tau de Dm, se detectó una banda de aproximadamente 55 kDa (figura 24, A). Hasta ahora, no se ha determinado cuál de todas las isoformas corresponde a dicha banda, ni cuáles isoformas son funcionales. Es probable que la banda de 55 kDa detectable por *Western*

*blot* esté compuesta por varias isoformas, algunas de las cuales estarían fosforiladas<sup>85</sup>.

La combinación de las líneas ‘ $\Delta$ Tau’ y ‘TauEP’ fue utilizada para el estudio de la polaridad del epitelio folicular en Dm y se encontró que la deficiencia de tau induce degeneración en la retina y en el cerebro, medidos por presencia de vacuolas<sup>134,148</sup>. La doble hemicigota  $\Delta$ Tau/TauEP fue considerada como *knock-out* total de tau, pero luego se detectó un promotor alternativo que permitiría la expresión de la isoforma más larga predicha para tau en Dm (tabla 2, tau-PG)<sup>149</sup>. En la primera publicación en la que se analizó esta combinación de deficientes en SNC<sup>148</sup>, se presentaron resultados utilizando una línea TauEP semejante a la que se utilizó en nuestro trabajo, pero que dejó de estar disponible en el centro repositor de moscas de Bloomington. Dichas líneas presentan la misma inserción con una distancia de unos cientos de pares de bases, según lo reportado en el sitio oficial ‘Flybase’ (<http://flybase.org/reports/FBti0011379>, <http://flybase.org/reports/FBti0016569>).

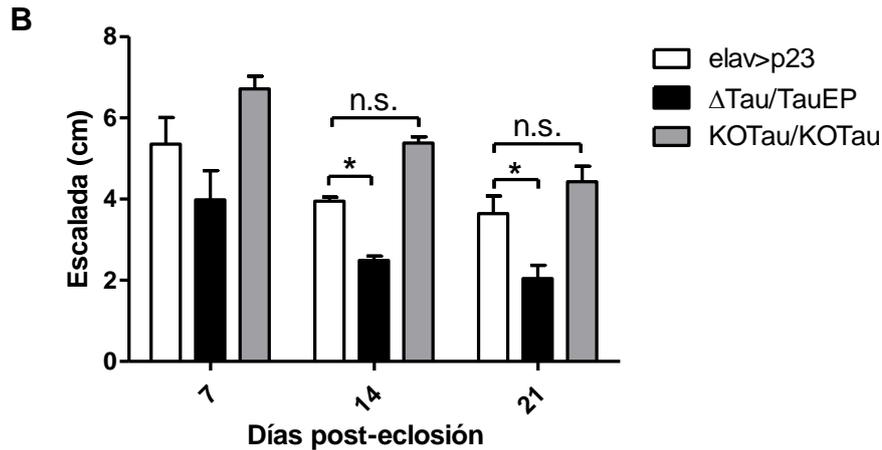
Isoforma	Peso molecular (kDa)	Largo (aa)	RefSeq ID
tau-PA	38,5	361	NP_651575
tau-PB	38,5	361	NP_001263017
tau-PC	37,6	349	NP_001263018
tau-PE	10	93	NP_001263020
tau-PF	43,3	403	NP_001287563
tau-PG	78	717	NP_733224
tau-PH	30,9	288	NP_001287564
tau-PI	37,5	350	NP_001287565
tau-PJ	32,7	308	NP_001263019
tau-PK	29,7	278	NP_001287566
tau-PL	29,7	278	NP_001287567
tau-PM	39,2	367	NP_001287568
tau-PN	40,3	375	NP_001303549

**Tabla 2. Isoformas predichas para tau de *Drosophila*.** La última columna indica la identificación de cada isoforma en la base de datos de secuencias de nucleótidos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), donde se citan todos los trabajos donde se detectaron las secuencias de ARN. Se resaltaron en color naranja la isoforma más pequeña y en verde la isoforma más larga. Los demás grupos de isoformas con el mismo color tienen pesos moleculares similares entre ellas. Adaptado de *Flybase* (<http://flybase.org/reports/FBgn0266579>).

Un año después de comenzar nuestro trabajo con la línea  $\Delta$ Tau/TauEP, Partridge y colaboradores, generaron una nueva línea deficiente de tau llamada KOTau. Esta línea se obtuvo eliminando por recombinación homóloga los exones 2 a 6, que contienen los dominios de unión a microtúbulos. De esa manera se evita la transcripción de todas las isoformas y no se interrumpe ningún otro gen. Esta línea no presenta defectos en sobrevivencia, geotaxis ni función neuronal en registros de electrofisiología<sup>149</sup>.

Para estudiar el efecto de la deficiencia de tau endógena se realizó una caracterización comparativa de las líneas descritas, bajo nuestras condiciones de trabajo. En primer lugar, se realizaron *Western Blots* para evaluar los niveles de tau. Efectivamente, no se detectó dicha proteína en extractos provenientes de la línea  $\Delta$ Tau/TauEP, mientras que para  $\Delta$ Tau, por un lado, y TauEP, por el otro, se vieron niveles disminuidos, pero detectables por *Western Blot*. Lo mismo ocurrió con la línea KOTau, que en hemicigosis mostró niveles disminuidos respecto del control elav>p23, pero no pudo detectarse marca positiva en extractos provenientes de moscas homocigotas para la deficiencia (figura 24, A). Por otro lado, se analizó el fenotipo en geotaxis negativa a 25°C de las líneas que mostraron disminución total de tau. Las moscas  $\Delta$ Tau/TauEP presentaron un efecto tóxico desde los 14 días que no empeoró a los 21 días (elav>p23 vs  $\Delta$ Tau/TauEP, 14 días  $3,95 \pm 0,10$  vs  $2,49 \pm 0,11$ ; 21 días  $3,64 \pm 0,43$  vs.  $2,04 \pm 0,33$ ). A su vez, la línea KOTau/KOTau no mostró toxicidad alguna, tal como fue previamente reportado (figura 24, B). Cabe destacar que el anticuerpo que utilizamos para detectar tau reconoce distintos epítopes que los utilizados en los trabajos de Bolkan & Kretzschmar (2014)<sup>148</sup> y de Burnouf et al. (2016)<sup>149</sup> (los primeros que caracterizaron la deficiencia de tau en SNC de Dm), por lo cual el patrón de bandas identificadas no es similar, excepto por la banda de 55kDa.



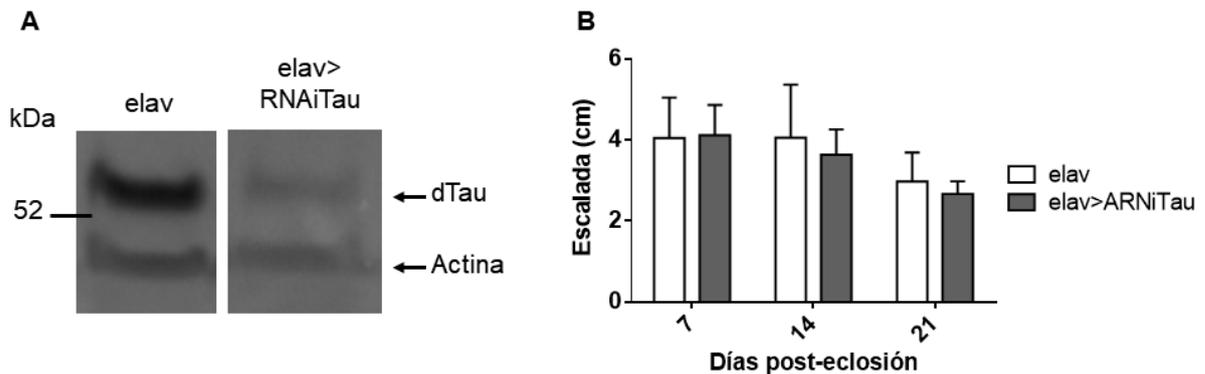


**Figura 24. Caracterización de las líneas deficientes de tau endógena  $\Delta$ Tau, TauEP y KOTau.** A. *Western blots* representativos con los niveles de tau endógena en extractos provenientes de moscas de 21 días. B. Ensayo de geotaxis negativa en moscas de 7, 14 y 21 días envejecidas a 25°C. ANOVA de 2 factores, medidas repetidas, seguido de comparaciones por Bonferroni. \* $p < 0,05$ .

Es importante destacar que estas herramientas genéticas disminuyen los niveles de tau de forma sistémica, y si bien tau se expresa principalmente en SNC, se ha reportado expresión en sistema digestivo, cuerpo graso, carcasa y testículos (<http://flybase.org/reports/FBgn0266579>). Una manera más restringida de disminuir los niveles de una proteína es a través de la expresión tejido-específica de un ARN de interferencia (ARNi). La línea #25023 contiene un elemento P en el cromosoma 2 que permite la expresión de un ARN que forma una horquilla y desencadena la interferencia de los ARNm de tau que incluyen el exón 4 (todos excepto tau-E). Esta línea fue descrita anteriormente, y se detectó alta letalidad al dirigir la expresión con el promotor elav (con un 45% de eclosión) junto con presencia de vacuolas en cerebro de moscas envejecidas<sup>148</sup>. La línea #25024 (ARNiTau) presenta el mismo elemento P, pero el sitio de inserción está ubicado en el cromosoma 3, por lo que los niveles de expresión son distintos, particularmente resultaron ser menores

([https://stockcenter.vdrc.at/control/product/~VIEW\\_INDEX=0/~VIEW\\_SIZE=100/~product\\_id=25024](https://stockcenter.vdrc.at/control/product/~VIEW_INDEX=0/~VIEW_SIZE=100/~product_id=25024)). Esto permitió que la progenie obtenida al sobre-expresar con el promotor elav no se vea disminuída, facilitando el trabajo experimental.

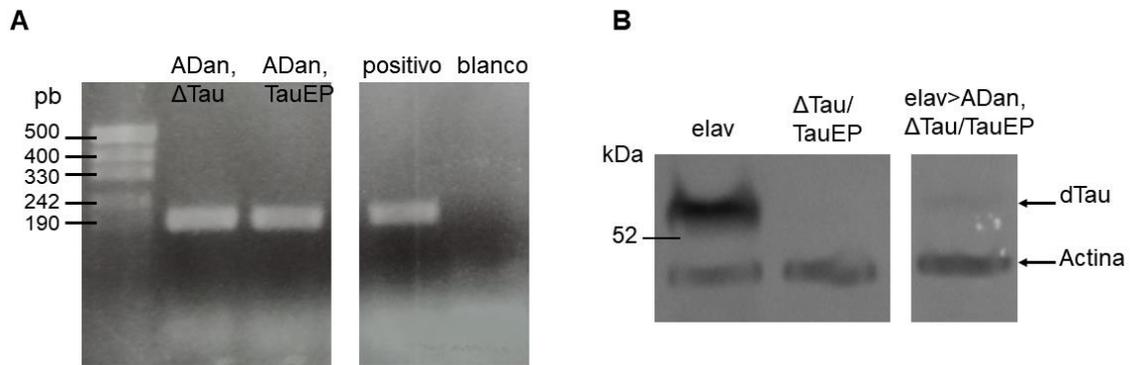
Mediante *Western blots* se corroboró que la expresión del ARNi específico #25024 disminuye los niveles de tau a un nivel apenas detectable (figura 25, A), y al analizar el desempeño de estas moscas en el ensayo de geotaxis negativa no se vieron diferencias con el control, incluso a las tres semanas post-eclosión (figura 25, B). Debe destacarse que este ensayo se realizó a 28°C, condición que empeora posibles efectos tóxicos.



**Figura 25. Caracterización de la línea deficiente de tau endógena ARNiTau.** A. Niveles tau endógena en extractos provenientes de moscas de 21 días. B. Ensayo de geotaxis negativa en moscas de 7, 14 y 21 días envejecidas a 28°C.

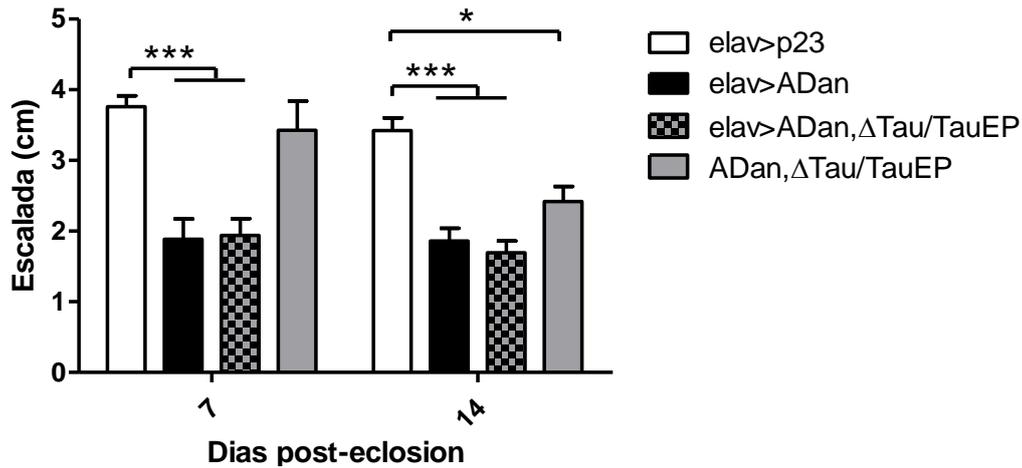
Estas tres líneas nos permitieron disminuir los niveles de tau mediante distintas herramientas, lo que resultaría útil para determinar si tau es necesaria para que ADan ejerza un efecto tóxico en Dm.

A continuación, se procedió a analizar el efecto de la sobre-expresión de ADan en un contexto de deficiencia de tau endógena. Como la inserción que permite la expresión de ADan y el gen de tau se encuentran en el mismo cromosoma, se debieron generar líneas recombinantes (ver materiales y métodos, sección 3, página 48) que incluyeron el inserto de ADan con  $\Delta$ Tau por un lado y con TauEP por el otro. Luego se combinaron con el promotor elav, para dirigir la expresión de ADan de manera pan-neuronal. En primer lugar, se procedió a chequear las líneas recombinantes. Se comprobó la presencia de la secuencia de ADan por PCR de ADN genómico (figura 26, A) y la ausencia de tau por *Western Blot* (figura 26, B).



**Figura 26. Identificación de recombinantes.** A. Comprobación de presencia de la secuencia de ADan en cada línea recombinante. Positivo: línea ADan. Blanco: agua (gel de agarosa 2%). B. Comprobación de ausencia de la proteína tau mediante *Western blot*. Anticuerpos: anti-tau Dm (dTau) y anti-actina. elav: control sin modificaciones en tau;  $\Delta$ Tau/TauEP: control deficiente de tau; elav>ADan,  $\Delta$ Tau/TauEP: progenie de cruce de las dos líneas recombinantes: elav>ADan, $\Delta$ Tau x ADan,TauEP.

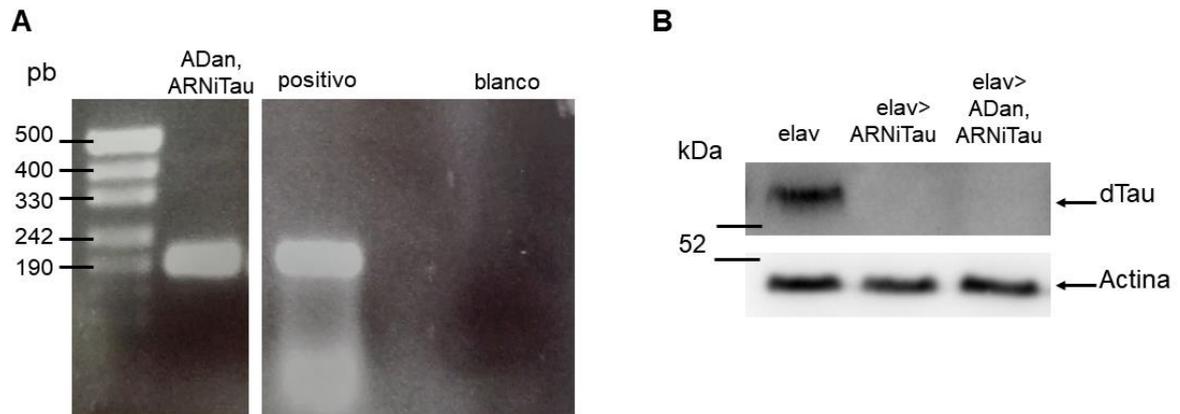
Una vez que se comprobó la combinación genética deseada, se realizó un ensayo de geotaxis negativa. En la figura 27 se muestra el resultado obtenido al comparar el desempeño en geotaxis negativa de cuatro líneas: elav>p23, como control de sobre-expresión, elav>ADan, como control de fenotipo tóxico, elav>ADan, $\Delta$ Tau/TauEP, como sobre-expresión de ADan en un contexto deficiente de tau y ADan, $\Delta$ Tau/TauEP, como control del efecto de la combinación genética que presenta la deficiencia de tau pero, al no poseer ningún promotor, no expresa ADan. La expresión de ADan en un contexto deficiente de tau no mostró ninguna diferencia respecto de la sobre-expresión de ADan sin modificaciones en tau (elav>ADan vs elav>ADan, $\Delta$ Tau/TauEP, 7 días  $1,89 \pm 0,29$  vs  $1,94 \pm 0,24$ ; 14 días  $1,86 \pm 0,18$  vs  $1,70 \pm 0,17$ ). Por su parte, el control ADan, $\Delta$ Tau/TauEP mostró un empeoramiento en la escalada respecto de elav>p23 a los 14 días, relacionado con las alteraciones genéticas asociadas a la deficiencia de tau (ya que ADan no se está expresando) (elav>p23  $3,42 \pm 0,18$  vs ADan, $\Delta$ Tau/TauEP  $2,42 \pm 0,21$ , 14 días). Sin embargo, no se evidenció una “sumatoria de toxicidades” en la línea elav>ADan, $\Delta$ Tau/TauEP, que sobre-expresa ADan y presenta la deficiencia de tau.



**Figura 27. Ensayo de geotaxis negativa al sobre-expresar ADan en un contexto deficiente de tau endógena.** Disminución de tau con las mutantes  $\Delta$ Tau/TauEP. Los individuos se envejecieron a 28°C. ANOVA de dos vías de medidas repetidas, Bonferroni *post-test*, \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

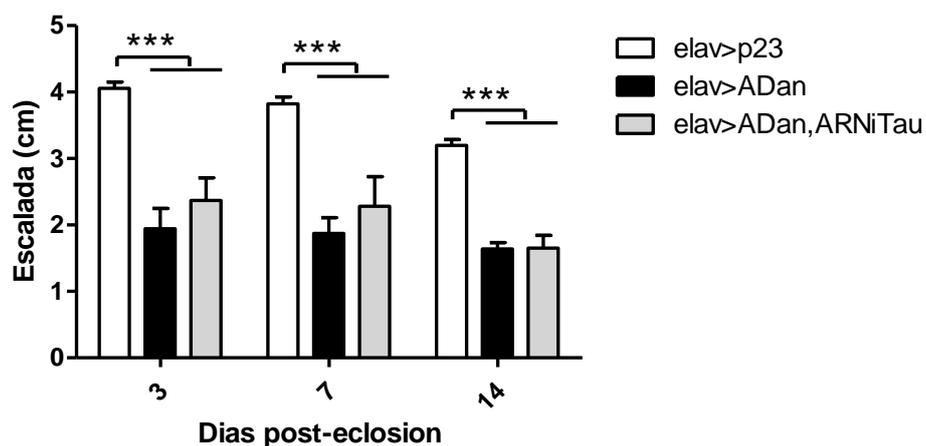
Por dificultades experimentales, relacionadas con la muerte de una línea fundamental para generar combinaciones genéticas estables que presenten el promotor elav en el cromosoma X, no pudo analizarse la sobre-expresión de ADan con la deficiente KOTau.

A continuación, se planteó analizar el efecto de la disminución de los niveles de tau mediante un ARNi específico al sobre-expresar ADan. Para ello se debió generar otra línea recombinante, con la secuencia codificante de ADan en el mismo cromosoma que el inserto que permite la expresión del ARNi de tau. De igual manera que las recombinantes anteriores, se comprobó la presencia de ADan por PCR de ADN genómico (figura 28, A) y la disminución de la expresión de tau por *Western Blot* (figura 28, B).



**Figura 28. Identificación de recombinantes.** A. Comprobación de presencia de la secuencia de ADan en la línea recombinante ADan,ARNiTau. Positivo: línea ADan. Blanco: agua (gel de agarosa 2%). B. Comprobación de disminución de la proteína tau mediante *Western blot*. Anticuerpos: anti-tau *Drosophila* (dTau) y anti-actina. elav: control sin modificaciones en tau; elav>ARNiTau: control disminución de tau por expresión del ARNi específico; elav>ADan,ARNiTau: recombinante de ADan y ARNiTau combinada con el promotor elav.

Luego de comprobar la combinación genética deseada, se realizó un ensayo de geotaxis negativa. En la figura 29 se puede ver que la co-expresión de ADan junto a la disminución de tau no mostró diferencias respecto del control de toxicidad elav>ADan. Cabe destacar que la expresión del ARNi de tau no fue tóxica, incluso a los 21 días post-eclosión (figura 25).



**Figura 29. Ensayo de geotaxis negativa al sobre-expresar ADan en un contexto deficiente de tau endógena.** Disminución de tau con un ARNi específico. Los individuos se envejecieron a 28°C. ANOVA de dos vías de medidas repetidas, Bonferroni *post-test*, \*\*\* $p < 0,01$ .

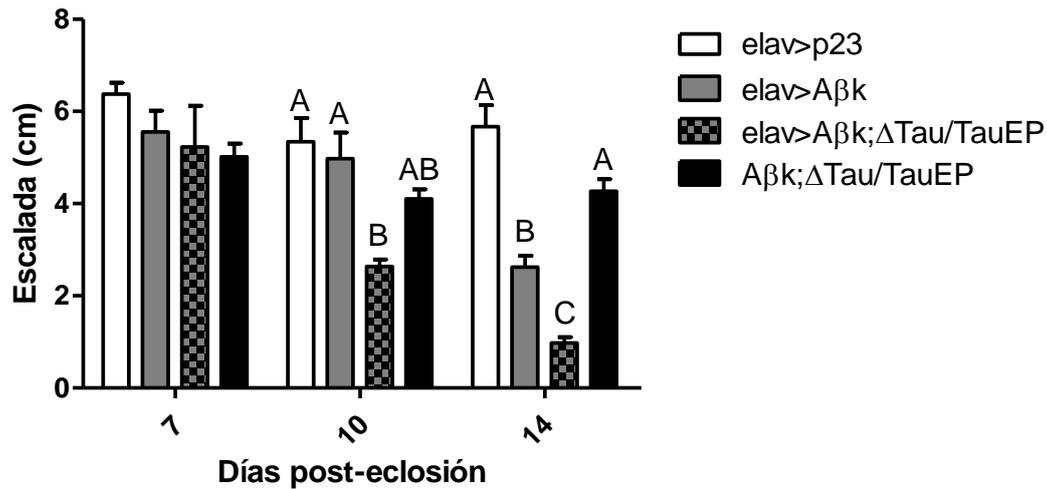
En resumen, la disminución de la expresión de tau endógena de Dm por dos métodos distintos no modificó el efecto tóxico evidenciado por geotaxis

negativa de las moscas que sobre-expresan ADan, sugiriendo que, en nuestro modelo, la toxicidad de ADan no está mediada por tau endógena, o que al menos bajo estas condiciones experimentales no se pudo detectar una interacción que impacte en el fenotipo estudiado.

#### 1.4. Relación entre la toxicidad de A $\beta$ en SN y tau endógena de Dm

La hipótesis amiloide propone que la acumulación de A $\beta$  induce la hiperfosforilación de tau y su posterior acumulación. Sin embargo, el rol de tau en la toxicidad de A $\beta$  es un tema controversial que sigue estudiándose en distintos modelos animales y no se ha llegado a un consenso. Es por eso que se decidió analizar si la deficiencia de tau endógena de *Drosophila* impacta en la toxicidad provocada por la sobre-expresión de A $\beta$ . Para ello se utilizó una línea transgénica para A $\beta$  que presenta un fenotipo tóxico asociado al envejecimiento al expresar el péptido en el SN de Dm<sup>131,150</sup>.

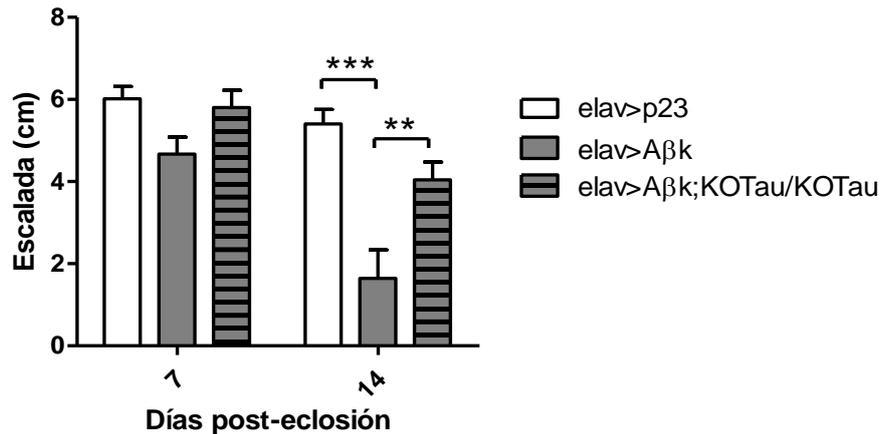
En primer lugar, analizamos la sobre-expresión de A $\beta$  en un contexto deficiente de tau a través la línea  $\Delta$ Tau/TauEP, en el paradigma de geotaxis negativa. Se observó que la sobre-expresión de A $\beta$  a 28°C induce un defecto en la escalada desde los 14 días (figura 30, elav>p23 5,67  $\pm$ 0,46 vs elav>A $\beta$ K 2,62  $\pm$ 0,25), mientras que, la sobre-expresión de A $\beta$  en un contexto deficiente de tau provocó un fenotipo tóxico a los 10 días (figura 30, elav>p23 5,35  $\pm$ 0,51 vs elav>A $\beta$ K, $\Delta$ Tau/TauEP 2,64  $\pm$ 0,15). Además, a los 14 días, la ausencia de tau aumentó la toxicidad provocada por la expresión de A $\beta$ , disminuyendo la escalada cerca de un 60% (figura 30, elav>A $\beta$ K 2,62  $\pm$ 0,25 vs elav>A $\beta$ K, $\Delta$ Tau/TauEP 0,98  $\pm$ 0,12). Como ya se dijo, la combinación  $\Delta$ Tau/TauEP muestra defectos en geotaxis negativa desde aproximadamente los 14 días, respecto del control elav>p23 (figura 24). Aunque en este experimento esa diferencia no es significativa, debe considerarse la posibilidad de una suma de toxicidades al disminuir los niveles de tau con esta herramienta genética y co-expresar A $\beta$ . Sin embargo, una disminución de un 60% excede el efecto tóxico que podría provocar la combinación  $\Delta$ Tau/TauEP.



**Figura 30. Sobre-expresión de Aβ en un contexto deficiente de tau.** Ensayo de geotaxis negativa al expresar Aβ junto con la deficiencia genética  $\Delta$ Tau/TauEP. El envejecimiento se realizó a 28°C. ANOVA de dos vías, medidas repetidas. Bonferroni *post-test*, letras distintas representan diferencias significativas entre genotipos a cada edad.

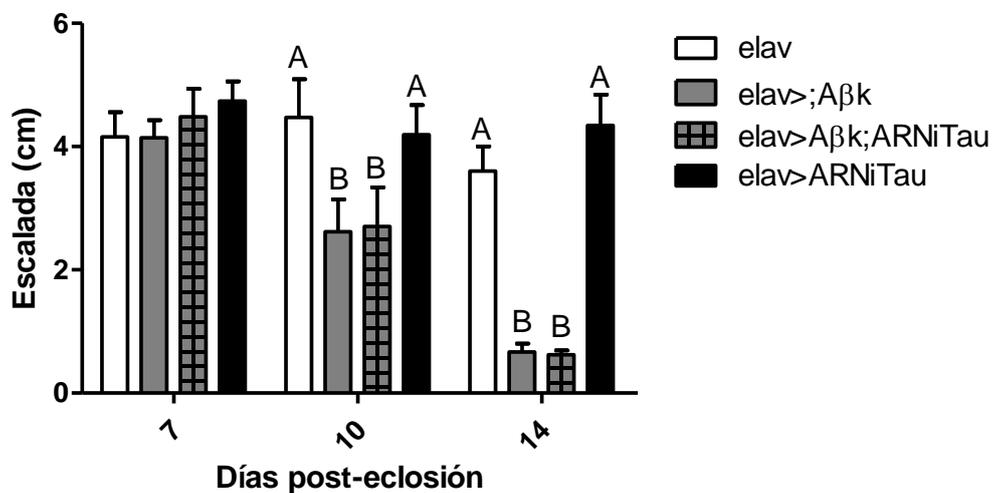
En resumen, al sobre-expresar Aβ junto con la línea deficiente de tau  $\Delta$ Tau/TauEP, el fenotipo en geotaxis negativa empeoró, obteniendo aparentemente un resultado opuesto a lo esperado.

Posteriormente se evaluó el efecto de la disminución de tau con la línea *knock-out* (KOTau) al sobre-expresar Aβ. Al evaluar el desempeño en geotaxis negativa, paradójicamente se encontró un efecto contrario al generado por la deficiencia genética  $\Delta$ Tau/TauEP: el fenotipo tóxico se revirtió a los 14 días (figura 31, elav>AβK 1,64  $\pm$ 0,69 vs elav>AβK,KOTau 4,05  $\pm$ 0,43). Estos resultados sugieren que la toxicidad de Aβ estaría mediada en parte por tau. Cabe recordar que la línea KOTau no induce toxicidad alguna en el ensayo de geotaxis negativa (figura 24).



**Figura 31. Sobre-expresión de Aβ en un contexto deficiente de tau.** Ensayo de geotaxis negativa al expresar Aβ junto con el *knock-out* de tau (KOTau). ANOVA de dos vías, medidas repetidas. Bonferroni *post-test*, \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Finalmente, se co-expresó Aβ junto con el ARNi específico contra tau utilizando el promotor pan-neuronal *elav*. Al realizar el ensayo de geotaxis negativa, no se detectó ninguna modulación del efecto tóxico provocado por Aβ en los días analizados (figura 32).



**Figura 32. Sobre-expresión de Aβ en un contexto deficiente de tau.** Ensayo de geotaxis negativa al co-expresar Aβ junto con un ARNi específico contra tau. ANOVA de dos vías, medidas repetidas. Bonferroni *post-test*, letras distintas representan diferencias significativas entre genotipos a cada edad.

En base a los resultados obtenidos al sobre-expresar Aβ en un contexto deficiente de tau, se puede sugerir que tau endógena de *Drosophila* podría

estar implicada en el efecto neurotóxico provocado por A $\beta$ , efecto que se pudo apreciar en el modelo más estricto de deficiencia de tau (KOTau).

### Conclusiones del capítulo 1

La toxicidad del péptido ADan en SN de *Drosophila* es dosis dependiente, asociada posiblemente a la acumulación de especies no fibrilares.

La sobre-expresión de ADan disminuye los niveles relativos de pS262 debido a un ligero aumento de tau total soluble, sugiriendo un mecanismo de toxicidad diferente al propuesto para A $\beta$ . En ese sentido se evaluó si la disminución de tau endógena impacta en la toxicidad provocada por ADan. Utilizando dos herramientas genéticas distintas, no se encontraron diferencias significativas en el comportamiento de geotaxis negativa, sugiriendo que el mecanismo de toxicidad de ADan no dependería de tau. Al analizar el efecto de la disminución de tau sobre el fenotipo tóxico provocado por A $\beta$  encontramos resultados contradictorios. Es posible que algunas de las líneas que utilizamos para disminuir tau presenten efectos “*off-target*”, lo que no nos permite evaluar certeramente el efecto de la disminución de tau al sobre-expresan ADan o A $\beta$ , pero los resultados sugieren mecanismos diferentes de neurotoxicidad entre ambos péptidos. Los resultados se resumen en la siguiente tabla, donde se indica si hubo cambios en cada combinación, respecto de la toxicidad inducida por cada péptido.

X	$\Delta$ Tau/TauEP	KOTau	RNAiTau
ADan	Sin diferencias	N/D	Sin diferencias
A $\beta$	Empeora	Mejora	Sin diferencias

**Tabla 3. Resumen resultados en geotaxis negativa al sobre-expresar ADan o A $\beta$  en un contexto de disminución de tau mediante tres herramientas diferentes. N/D= No determinado.**

Finalmente, es posible que la función de tau de *Drosophila* no sea comparable a tau humana con respecto al efecto neurotóxico que inducen y de esta manera la posible interacción con ADan y A $\beta$  no podría reproducirse.

## **Capítulo 2. Sobre-expresión neuronal de tau humana y co-expresión con los péptidos amiloides ADan y A $\beta$ en Dm**

### **2.1. Efecto de la sobre-expresión de tau humana en el SN de Dm**

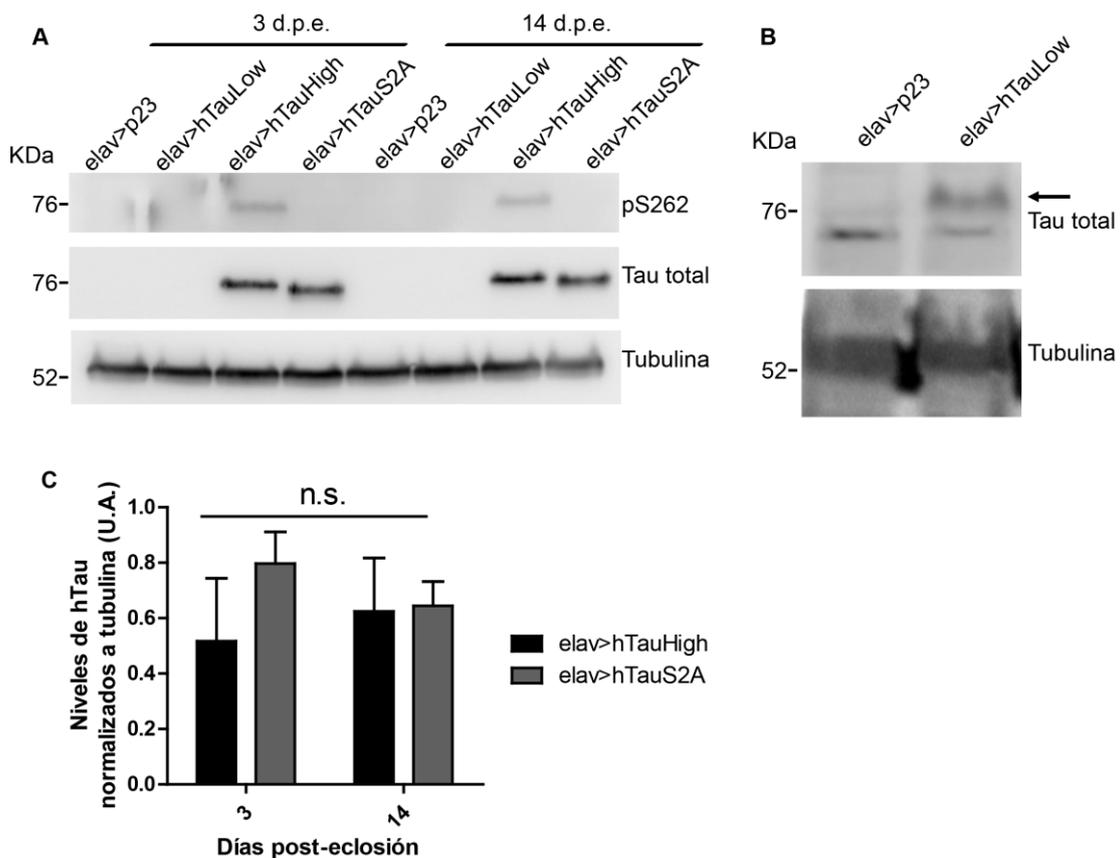
La proteína tau es fundamental en la patogenia de la EA y de la DFD, así como en otras enfermedades asociadas a la acumulación de tau, como la FTDP-17. Su sobre-expresión en el SN de Dm resulta una aproximación útil para entender posibles mecanismos de toxicidad relacionados con tau y asociados a la co-acumulación de otros amiloides, como A $\beta$  y ADan. En Dm se ha comprobado la toxicidad provocada por tau humana, principalmente en modelos de sobre-expresión de especies mutantes, asociadas a tauopatías hereditarias. Sin embargo, no se han detectado ovillos neurofibrilares en este modelo.

Para poder estudiar posibles interacciones entre el péptido ADan y la proteína tau *in vivo*, primero caracterizamos el efecto de la sobre-expresión de tau en el SN de Dm. Para ellos contamos con tres líneas transgénicas de tau humana que obtuvimos del repositorio Bloomington: #33819, #51362 y #51364, y las denominamos hTauLow, hTauHigh y hTauS2A, respectivamente. Las tres contienen la secuencia de la isoforma más larga de tau humana (2N4R); hTauLow y hTauHigh no presentan ninguna mutación, mientras que hTauS2A tiene mutados los sitios que codifican a las Ser262 y Ser356 a alanina, de manera que no es posible la fosforilación en esas posiciones.

En primer lugar, se analizaron los niveles de expresión, la fosforilación del sitio 262 (pS262) y el desempeño en geotaxis negativa de las 3 líneas transgénicas al expresar tau bajo el promotor elav. Se analizó por *Western blot* los niveles de tau y pS262 en moscas de 3 y 14 días. Como se esperaba, en los extractos de moscas que expresan hTauS2A no pudo detectarse pS262. Además, la banda correspondiente a tau en dichos extractos presentó mayor movilidad electroforética, indicando un menor peso molecular que tau silvestre, lo que coincide con el hecho de que no puede fosforilarse en los sitios de las mutaciones (figura 33, A). Si bien el aporte al peso molecular que implican dos fosfatos por molécula no es significativo, se ha propuesto que la fosforilación en

ciertos sitios son necesarios para la fosforilación en otros sitios, como se propuso para S238, T245, T212, S214, S202 y T205, que requieren de la fosforilación de S262 y S356<sup>151,152</sup>. De este modo, es posible que haya otras posiciones que no se estén fosforilando a partir de las mutaciones en S262 y S356, disminuyendo más la masa molecular aparente.

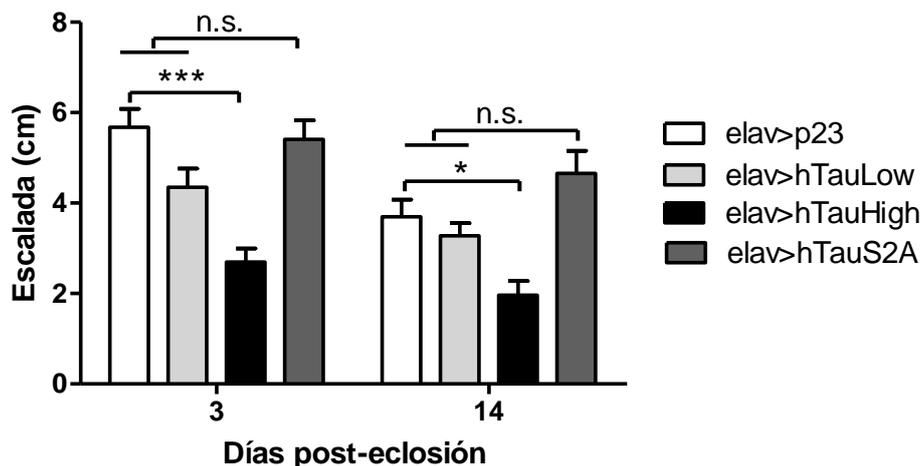
Al cuantificar los niveles de tau en las líneas hTauHigh y hTauS2A, se vio que presentaron niveles de expresión similares (no se encontraron diferencias significativas) lo cual resulta de gran importancia para poder comparar el efecto dado por la fosforilación de manera independiente de los niveles de expresión. (figura 33, C). Sin embargo, la línea hTauLow expresó la proteína en niveles mucho menores que las otras dos líneas, es por eso que no pudo detectarse en los ensayos conjuntos y se debió analizar en *Western blots* separados y con aproximadamente el cuádruple de masa proteica (400 µg vs. 100 µg) (figura 33, B).



**Figura 33. Sobre-expresión de tau humana en Dm.** A. *Western Blot* representativo de los niveles de pS262 y de tau total a los 3 y 14 días post-eclosión. B. *Western Blot* representativo de los niveles de tau total a los 21 días post-eclosión de moscas elav>hTauLow comparado con

el control *elav>p23*. C. Comparación de los niveles de tau total en las moscas *elav>hTauHigh* y *elav>hTauS2A* a los 3 y 14 días post-eclosión. El envejecimiento se realizó a 28°C. d.p.e.= Días post-eclosión. U.A.= Unidades arbitrarias.

Al realizar el ensayo de geotaxis negativa, sólo la línea *hTauHigh* mostró defectos desde los 3 días post-eclosión (a los 3 días *elav>p23*  $5,68 \pm 0,41$  vs *elav>hTauHigh*  $2,70 \pm 0,30$ ; a los 7 días *elav>p23*  $3,70 \pm 0,38$  vs *elav>hTauHigh*  $1,96 \pm 0,31$ ) (figura 34). Este último resultado resulta de gran interés ya que indica que la toxicidad de tau en SN de *Dm* si bien depende de los niveles de expresión y/o acumulación (al comparar *hTauHigh* con *hTauLow*) es más importante la fosforilación (si se compara *hTauHigh* con *hTauS2A*, a niveles similares de proteína, el efecto asociado a la fosforilación de por lo menos dos sitios, es de “todo o nada”).

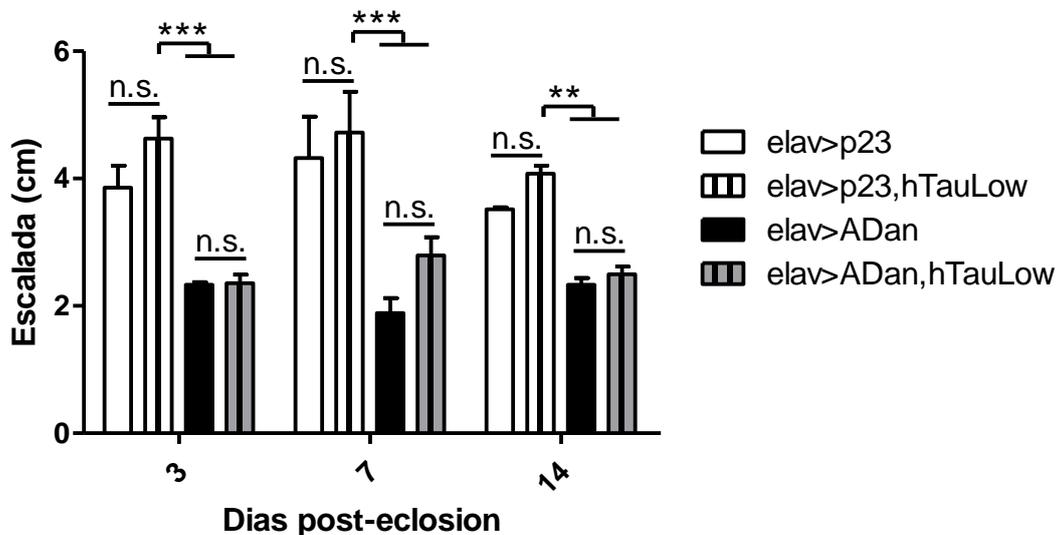


**Figura 34. Sobre-expresión de tau humana en *Drosophila*.** Ensayo de geotaxis negativa de las líneas que sobre-expresan tau humana a los 3 y 14 días post-eclosión. ANOVA de dos vías, medidas repetidas. Bonferroni *post-test*, \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ . El envejecimiento se realizó a 28°C.

## 2.2. Efecto de la co-expresión de ADan y tau humana en SN de *Dm*

Una vez caracterizadas las líneas que sobre-expresan tau humana, analizamos el efecto de la co-expresión con ADan. Para ello primero combinamos a *hTauLow*, que no muestra toxicidad en el ensayo de geotaxis negativa, con *elav>ADan*. El ensayo se realizó en primera instancia a 28°C, y no se encontraron diferencias. Entonces se volvió a realizar el ensayo a 25°C, que es una temperatura fisiológicamente más favorable para *Dm* y evita las

condiciones perjudiciales que provoca la temperatura elevada. Además, también se disminuyen los niveles de GAL4, lo que disminuiría la cantidad de ADan transcripto y, por consiguiente, el efecto tóxico provocado, favoreciendo la modulación de la toxicidad. Se encontró que la co-expresión de bajos niveles de tau humana con ADan no modificó el efecto tóxico provocado por ADan en el ensayo de geotaxis negativa (elav>ADan vs elav>ADan,hTauLow, 3d  $2,33 \pm 0,04$  vs.  $2,36 \pm 0,13$ ; 7 días:  $1,89 \pm 0,23$  vs  $2,80 \pm 0,28$ ; 14 días  $2,33 \pm 0,10$  vs  $2,50 \pm 0,12$ , figura 35).



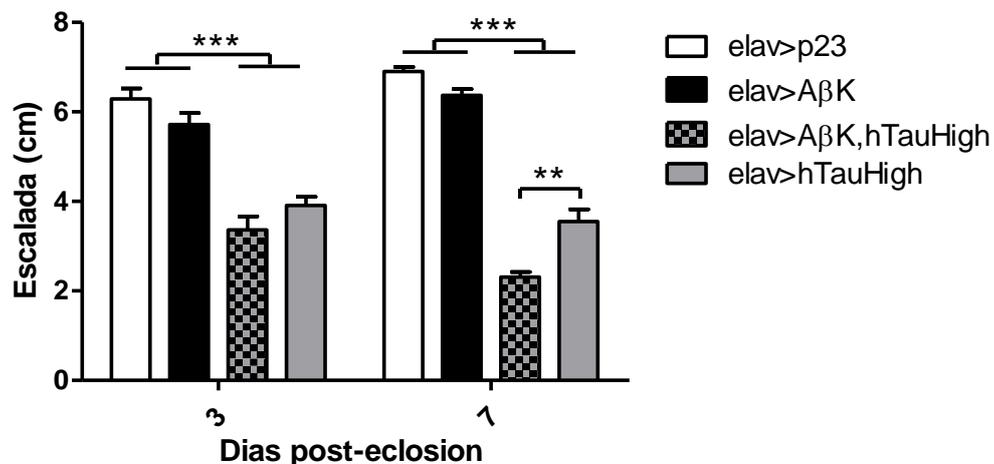
**Figura 35. Efecto de la co-expresión de ADan y hTauLow.** Ensayo de geotaxis negativa a los 3, 7 y 14 días post-eclosión. ANOVA de dos vías de medidas repetidas. Bonferroni *post-test*, \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Resultados del ensayo a 25°C.

Posteriormente, se intentó combinar la línea elav>ADan con hTauHigh pero no se obtuvo progenie viable, indicando que la suma de toxicidades de ambas proteínas amiloides es (con alta expresión de tau) letal en *Drosophila*.

### 2.3. Efecto de la co-expresión de A $\beta$ y tau humana en SN de Dm

Como ya se mencionó, se ha propuesto que la acumulación de A $\beta$  favorece la agregación y toxicidad asociada a tau. Para estudiar en nuestro modelo si existe una relación neurotóxica decidimos co-expresar A $\beta$  con tau humana (línea hTauHigh) y se realizó un ensayo de geotaxis negativa. Al analizar los resultados obtenidos se detectó que si bien la sobre-expresión de hTauHigh genera toxicidad desde temprana edad (3 días post-eclosión), la co-expresión

con A $\beta$  agrava el fenotipo tóxico a una edad en la cual A $\beta$  no presenta toxicidad visible mediante este ensayo (7 días elav>A $\beta$ K 6,37  $\pm$ 0,14 vs elav>A $\beta$ K,hTau 2,31  $\pm$ 0,12 vs elav>htau 3,55  $\pm$ 0,27, figura 36). Es posible que esto se deba a una “suma de toxicidades”, es decir que el efecto tóxico generado por cada proteína/péptido se visualicen en conjunto, sin que eso implique una interacción funcional entre ellos. Sin embargo, no debe descartarse una interacción (directa o indirecta) que agrave las condiciones celulares impactando en defectos comportamentales.



**Figura 36. Efecto de la co-expresión de A $\beta$  y tau humana.** Ensayo de geotaxis negativa, a los 3 y 7 días post-eclosión, antes de que A $\beta$  genere toxicidad (no se muestra, 18 días). ANOVA de dos vías de medidas repetidas, \*\* $p$ <0,01, \*\*\* $p$ <0,001. Ensayo realizado a 25°C.

La razón por la cual la co-expresión de tau humana con A $\beta$  empeoró el desempeño en geotaxis negativa podría estar asociada a un aumento en los niveles tanto de A $\beta$  como de fosfo-tau, favoreciendo la acumulación de especies tóxicas, agravando defectos celulares que se ven reflejados en este ensayo comportamental.

## Conclusiones del capítulo 2

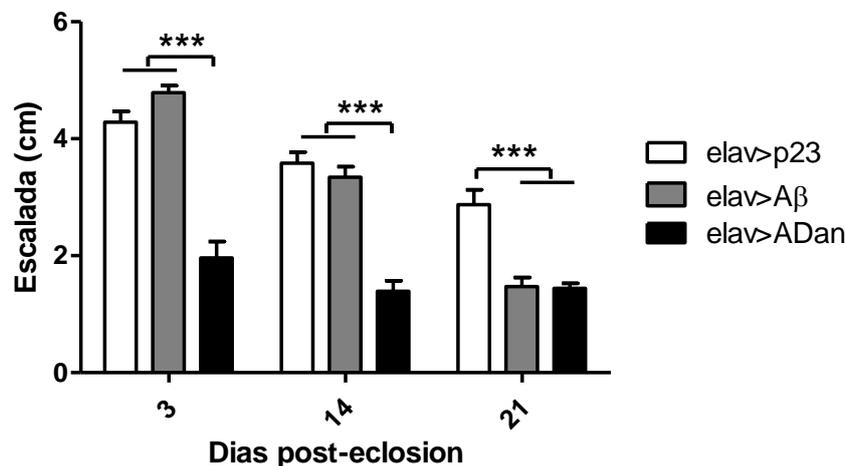
Se analizó el efecto de la expresión de tau humana en Dm a partir de distintas líneas. Las líneas hTauHigh y hTauLow expresan la isoforma más larga de tau, pero la primera alcanza niveles muy altos de proteína en comparación con la segunda. Por otro lado, la línea hTauS2A expresa niveles similares a hTauHigh, pero presenta mutaciones en los sitios 262 y 356 (S→A). El análisis del comportamiento de estos animales demostró que sólo la línea hTauHigh genera defectos en la geotaxis negativa desde muy temprana edad. Es por eso que podemos concluir que la toxicidad provocada por la expresión de tau humana en Dm es dependiente de la abundancia de proteína acumulada y estaría íntimamente asociada a la fosforilación de los sitios 262 y/o 356.

A continuación, analizamos si la co-expresión de tau con ADan empeora el fenotipo tóxico evidenciado al expresar el péptido sólo. La relación entre la toxicidad provocada por ADan y la provocada por tau es difícil de determinar, ya que en nuestro modelo la co-expresión de altos niveles de tau con ADan fue letal, mientras que la co-expresión de bajos niveles de tau con ADan no indujo cambios en el ensayo de geotaxis negativa. Sin embargo, cuando analizamos la co-expresión de A $\beta$  y tau se detectó que el efecto tóxico se encuentra agravado. Si bien es posible que se esté detectando una suma de toxicidades independientes, es interesante que este cambio se evidencia dos semanas antes de que A $\beta$  ejerza un efecto tóxico visible en geotaxis negativa. Es así que estos resultados nuevamente sugieren que la relación neurotóxica entre A $\beta$  y tau difiere a la de ADan y tau.

### Capítulo 3. Activación de UPR al sobre-expresar ADan, A $\beta$ y tau

#### 3.1. Activación de UPR asociada a la sobre-expresión de A $\beta$ y ADan

En trabajos anteriores en el laboratorio se generaron líneas con insertos sitio-dirigidos que expresan niveles comparables de A $\beta$  y ADan y se analizó el efecto tóxico provocado por cada péptido<sup>130</sup>. En la figura 37 se muestra el desempeño en el ensayo de geotaxis negativa de dichas líneas y se ve que la sobre-expresión de ADan fue tóxica desde los 3 días (elav>p23  $4,28 \pm 0,18$  vs elav>ADan  $1,96 \pm 0,28$ ), mientras que A $\beta$  fue tóxico recién a los 21 días, manifestando una clara dependencia de la edad (elav>p23  $2,87 \pm 0,26$  vs elav>A $\beta$   $1,47 \pm 0,15$ ).

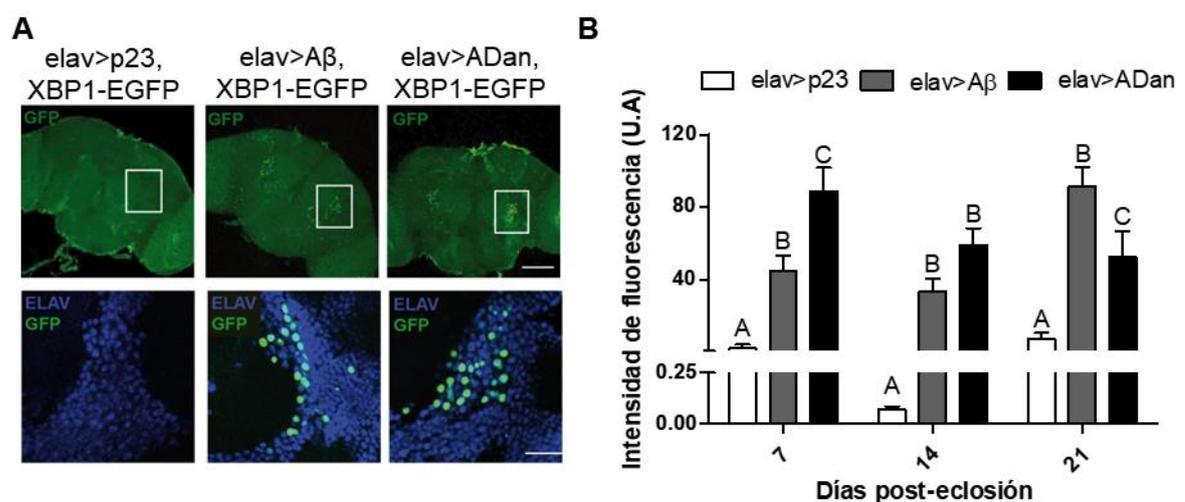


**Figura 37. Comparación del efecto neurotóxico provocado por A $\beta$  y ADan en *Drosophila*.** Ensayo de geotaxis negativa a los 3, 14 y 21 días. Moscas envejecidas a 28°C. ANOVA de dos vías, medidas repetidas. Bonferroni *post-test*. \*\*\* $p < 0,001$ .

Al estudiar la respuesta a proteínas mal plegadas frente a la expresión de A $\beta$  se detectó que la vía de IRE/XBP1 se activó tempranamente y con un rol neuroprotectivo<sup>150</sup>. Para ampliar el conocimiento del rol de esta respuesta frente a la toxicidad de amiloides, analizamos el efecto de la sobre-expresión de ADan y lo comparamos con A $\beta$ .

En primer lugar, se utilizó una línea reportera que permite detectar la activación de la vía de IRE1/XBP1 a través de la presencia de fluorescencia (ver materiales y métodos, sección 11, página 57). Brevemente, se expresa una porción del mensajero de XBP1, que incluye el sitio de unión al ADN y el sitio

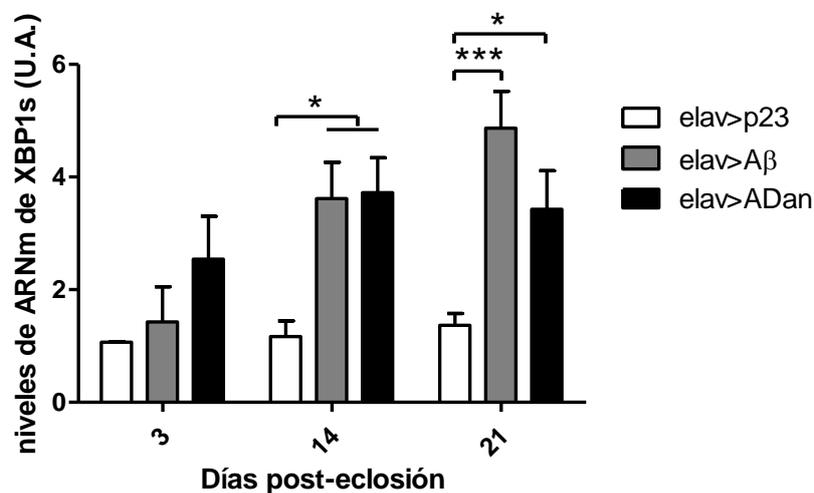
de *splicing* mediado por IRE1 río arriba de la secuencia de la proteína EGFP; cuando IRE-1 dimeriza y se autofosforila, ejerce su actividad endonucleasa e induce el *splicing* no convencional en XBP1, provocando que la secuencia codificante de EGFP quede en marco de lectura y pueda ser traducida<sup>132</sup>. En estudios anteriores del laboratorio que no han sido publicados, se encontró que la sobre-expresión tanto de A $\beta$  como de ADan activan la vía de IRE1/XBP1 (figura 38, A). La intensidad de fluorescencia a los 7 días post-eclosión tanto en A $\beta$  como en ADan fue mayor respecto del control p23. Además, a esa edad la intensidad de fluorescencia detectada en las moscas que sobre-expresan ADan encontró su máximo, entre los días estudiados. Luego, a los 14 días post-eclosión, la fluorescencia detectada en el cerebro de las moscas *elav*>ADan no se diferenció significativamente de la detectada en las moscas *elav*>A $\beta$ , las cuales encontraron un pico de fluorescencia a los 21 días. Estos resultados indican que la activación de la vía de IRE1 correlaciona con el nivel de toxicidad de cada péptido a lo largo del tiempo: la expresión de A $\beta$  genera toxicidad en el ensayo de geotaxis negativa a los 21 días y en el mismo momento se detecta el pico de fluorescencia con la herramienta XBP1-EGFP, mientras que en el caso de ADan la toxicidad se evidencia desde muy temprana edad (3 días post-eclosión) en el ensayo de geotaxis negativa y a los 7 días se detecta la mayor fluorescencia con la herramienta XBP1-EGFP (figura 38, B)



**Figura 38. Activación de la vía de IRE1-XBP1 por la sobre-expresión de A $\beta$  y ADan. A.** Inmunofluorescencia de cerebros de 21 días que co-expresan el reportero XBP1-EGFP con los

péptidos p23, A $\beta$  y ADan, bajo el promotor elav. Arriba cerebro entero, barra= 50  $\mu$ m. Abajo ampliación del área recuadrada, barra= 20  $\mu$ m. En verde EGFP, en azul ELAV. B. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de EGFP a lo largo del tiempo (7, 14 y 21 días). Se analizaron las fotos con el *software Image J*, cuantificando la máxima intensidad dada en un área pre-seleccionada y restándole el fondo. Moscas envejecidas a 28°C. ANOVA de dos vías, medidas repetidas. Bonferroni *post-test*. Letras distintas indican diferencias significativas en cada edad. U.A.= Unidades Arbitrarias.

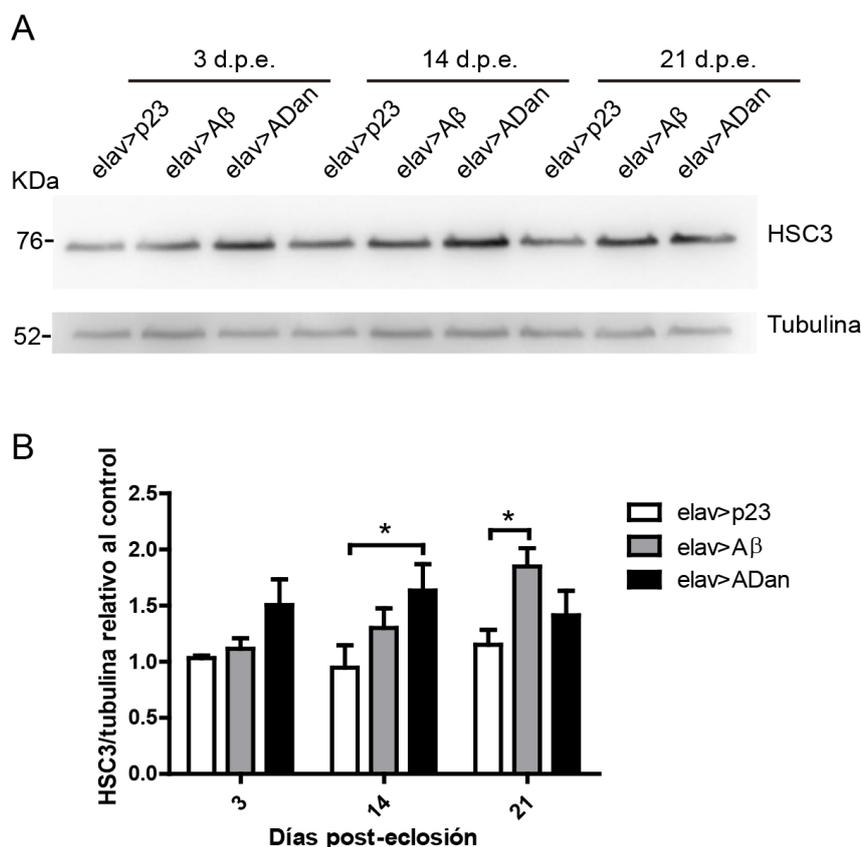
Para confirmar los resultados encontrados con la línea reportera XBP1-EGFP, se analizaron los niveles de ARN mensajero de XBP1s (“s” refiere a “*spliced*”, que es la forma activa de XBP1) de manera comparativa entre los péptidos A $\beta$  y ADan a lo largo del tiempo. Los niveles de ARNm de XBP1s se vieron levemente aumentados en las moscas que sobre-expresan ADan a los 3 días, pero recién fueron significativamente mayores al control a los 14 días y se mantuvieron niveles similares a los 21 días. Para el caso de A $\beta$ , los niveles se vieron aumentados recién a los 14 días (antes de que se evidencie la toxicidad en geotaxis negativa), pero el pico se presenta a los 21 días, llegando a niveles incluso mayores que los alcanzados por ADan, en las condiciones estudiadas (figura 39).



**Figura 39. Niveles de ARNm de XBP1s en moscas que sobre-expresan los péptidos A $\beta$  y ADan.** Cuantificación por PCR en tiempo real a los 3, 14 y 21 días post-eclosión. ANOVA de dos vías, pareado. Bonferroni *post-test*, \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Moscas envejecidas a 28°C. U.A.= Unidades Arbitrarias.

Para continuar estudiando la activación de UPR en relación a la toxicidad provocada por péptidos amiloidogénicos, se analizaron los niveles de la

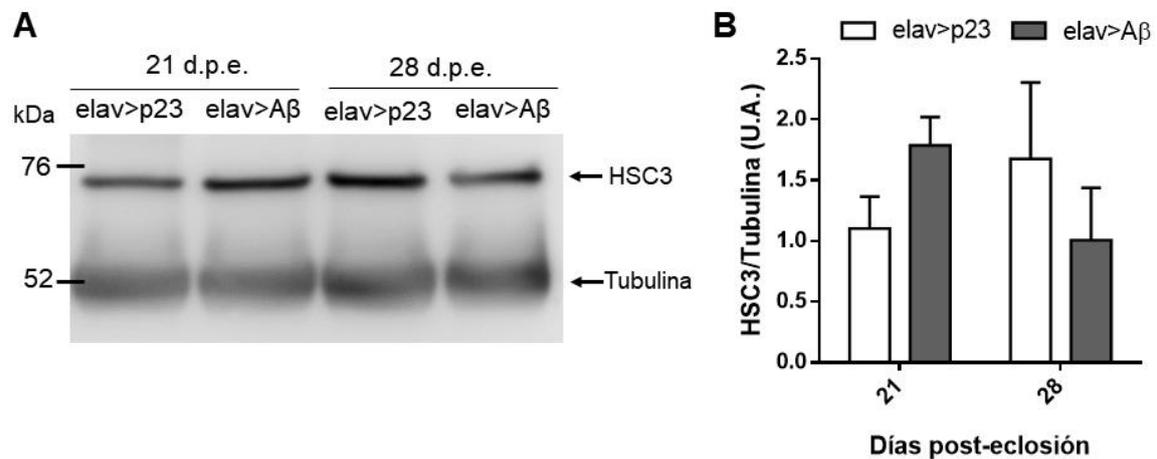
chaperona de retículo BiP (su homóloga en Dm se denomina HSC3), que es capaz de sensar las proteínas mal plegadas en esta organela y cuya expresión está regulada en parte por XBP1s<sup>153</sup>. Para ello, realizamos ensayos de *Western blot* con extractos de proteínas de cabezas de moscas que sobre-expresaban p23, A $\beta$  y ADan a los 3, 14 y 21 días (figura 40, A). Encontramos que, al igual que la activación de la vía de IRE1, el aumento en los niveles de HSC3 correlacionan con el inicio de la toxicidad provocada por cada péptido: a los 3 días post-eclosión los niveles de HSC3 en las moscas que sobre-expresan ADan se vieron levemente aumentados y fueron significativamente distintos al control a los 14 días, pero a los 21 días los niveles se mantuvieron similares; mientras que en el caso de las moscas que sobre-expresan A $\beta$  hubo un aumento paulatino que encontró su máximo a los 21 días post-eclosión (figura 40, B).



**Figura 40. Niveles de HSC3 en moscas que sobre-expresan los péptidos A $\beta$  y ADan.** A. *Western Blot* representativo de los niveles de HSC3 a lo largo del tiempo. B. Cuantificación de los niveles de HSC3 normalizados a tubulina, relativos a elav>p23 de 3 días. ANOVA de dos

vías, pareado. Bonferroni *post-test*, \* $p < 0,05$ . Moscas envejecidas a 28°C. d.p.e.= Días post-eclosión. U.A.= Unidades Arbitrarias.

En las moscas que sobre-expresan ADan, los niveles de HSC3 se vieron aumentados desde los 3 días respecto del control p23, pero a lo largo del tiempo pareció alcanzar un *plateau*. Para determinar si en el caso de A $\beta$  los niveles de HSC3, luego de los 21 días, se mantienen, aumentan o disminuyen, se analizaron muestras de 28 días (figura 41, A). Al comparar los niveles de BiP/HSC3 a los 21 y 28 días en resultados preliminares, se encontró que a los 28 días los niveles tienden a disminuir, indicando que la respuesta UPR a través de BiP decaería a partir de las tres semanas.



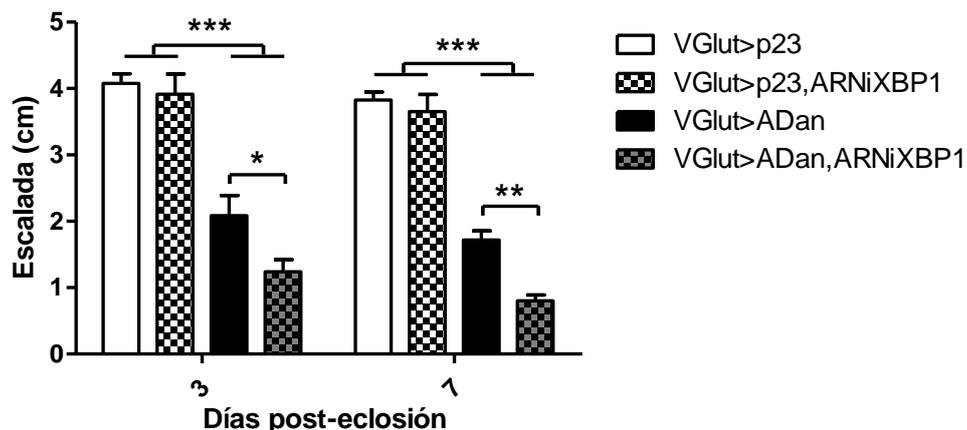
**Figura 41. Niveles de HSC3 en moscas que sobre-expresan los péptidos ADan y A $\beta$ .** A. *Western Blot* representativo de los niveles de HSC3 a los 21 y 28 días. B. Cuantificación de los niveles de HSC3 normalizados a tubulina (dos repeticiones). Moscas envejecidas a 28°C. d.p.e.= días post-eclosión. U.A.= Unidades Arbitrarias.

Estos resultados apuntan a un aumento de HSC3 relacionado con la activación de la vía de IRE1, en respuesta a A $\beta$ , previo a que se manifieste el defecto comportamental en geotaxis negativa, que alcanza un punto máximo que puede mantenerse durante cierto tiempo, pero eventualmente comienza a disminuir.

### 3.2. Modulación de la vía de IRE1 en las moscas que sobre-expresan ADan

En trabajos previos del laboratorio se analizó la modulación de las vías de UPR al sobre-expresar A $\beta$ <sup>150</sup>. Se encontró que al disminuir los niveles de XBP1s el desempeño en geotaxis negativa empeoró, acompañado con un aumento de 7

veces en los niveles de A $\beta$  cuantificados por *Western blot* a los 12 d.p.e.; mientras que al sobre-expresar XBP1s se mejoró el defecto inducido por A $\beta$  en la escalada y los niveles de A $\beta$  disminuyeron levemente, sugiriendo un impacto de XBP1s en la acumulación del péptido<sup>150</sup>. En el caso de ADan, la disminución de XBP1 dirigida por el promotor elav resultó no viable, por lo que decidimos acotar la expresión a un grupo neuronal caracterizado por la presencia del transportador vesicular de glutamato con el promotor VGlut. Al utilizar este promotor la sobre-expresión de ADan generó un fenotipo tóxico en geotaxis negativa, similar al encontrado con elav. Se realizaron ensayos a los 3 y 7 días post eclosión y, al igual que en el caso de A $\beta$ , se encontró que la disminución de XBP1 con un ARNi específico, empeoró el efecto tóxico provocado por la expresión de ADan, desde los 3 días, acentuándose a los 7 días (figura 42, VGlut>ADan vs VGlut>ADan,ARNiXBP1, 3 días 2,09  $\pm$ 0,30 vs 1,24  $\pm$ 0,18; 7 días 1,72  $\pm$ 0,14 vs 0,80  $\pm$ 0,09).

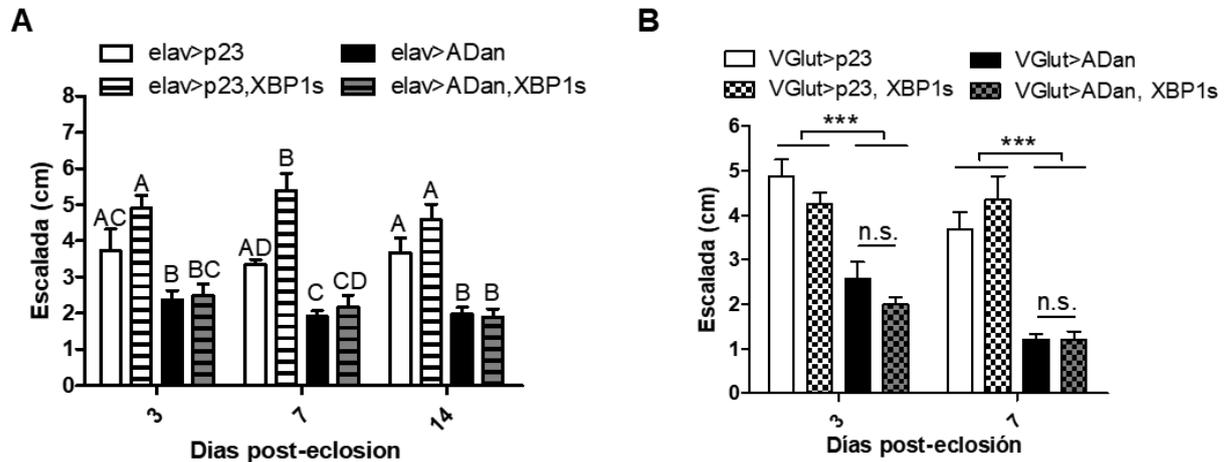


**Figura 42. Efecto de la disminución de los niveles de XBP1s en moscas que sobre-expresan ADan.** Ensayo de geotaxis negativa de moscas que sobre-expresan p23 y ADan, sin y con ARNi contra XBP1. Moscas envejecidas a 28°C. ANOVA de dos vías, medidas repetidas. Bonferroni *post-test*, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Estos resultados indican que la activación de la vía de IRE1-XBP1 resulta protectora frente a la acumulación del péptido ADan.

Hemos reportado que la sobre-expresión de XBP1s disminuye la toxicidad inducida por A $\beta$ , sin embargo, al realizar el experimento con ADan no se encontraron diferencias en el ensayo de geotaxis negativa, ni con el promotor elav (figura 43 A, elav>ADan vs elav>ADan,XBP1s, 3 días 2,38  $\pm$ 0,25 vs 2,48

$\pm 0,33$ ; 7 días  $1,91 \pm 0,16$  vs  $2,17 \pm 0,34$ ; 14 días  $1,99 \pm 0,17$  vs  $1,90 \pm 0,23$ ) ni con el promotor VGlut (figura 43 B, VGlut>ADan vs VGlut>ADan,XBP1s, 3 días  $2,58 \pm 0,37$  vs  $1,99 \pm 0,16$ ; 7 días  $1,21 \pm 0,13$  vs  $1,21 \pm 0,18$ ) y realizando el envejecimiento a  $25^{\circ}\text{C}$

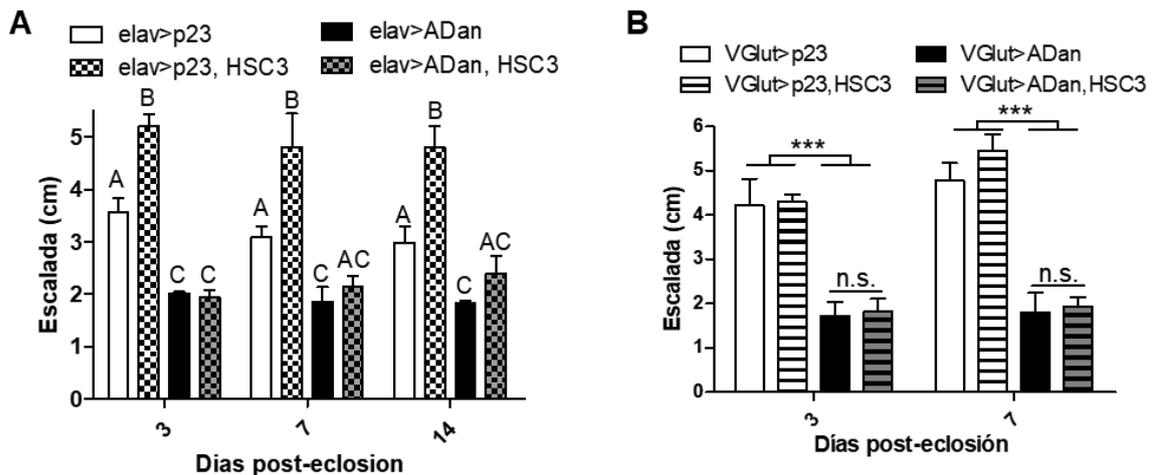


**Figura 43. Efecto de la sobre-expresión de XBP1s junto con el péptido ADan.** A. Ensayo de geotaxis negativa a los 3, 7 y 14 días sobre-expresando los transgenes con el promotor elav. B. Ensayo de geotaxis negativa a los 3 y 7 días sobre-expresando los transgenes con el promotor VGlut. Moscas envejecidas a  $25^{\circ}\text{C}$ . ANOVA de dos vías medidas repetidas. Bonferroni *post-test*. Letras diferentes indican diferencias significativas a cada edad ( $*p < 0,05$ ).  $***p < 0,01$ .

Estos resultados podrían deberse a: o bien los niveles alcanzados por la sobre-expresión de XBP1s no son suficientes para rescatar el fenotipo tóxico inducido por ADan, o la activación de la vía mediada por XBP1 llegó a un punto de saturación. Sin embargo, al utilizar el promotor elav la sobre-expresión de p23 junto XBP1s mostró una mejora respecto al p23 a los 7 días (elav>p23  $3,34 \pm 0,15$  vs elav>p23,XBP1s  $5,40 \pm 0,48$ ). Esta mejora podría estar asociada a un efecto neuroprotector de XBP1 que no estaría asociado específicamente a amiloides.

Considerando que los niveles de BiP/HSC3 se ven aumentados por la expresión de los péptidos A $\beta$  y ADan, utilizamos una línea que nos permite sobre-expresar HSC3 junto con ADan, con el objetivo de estudiar si se promueve una mejora a nivel comportamental. En primer lugar, utilizamos el promotor elav, pero no se encontraron diferencias entre las moscas que sobre-expresan ADan y las que co-expresan ADan y HSC3 (figura 44 A, elav>ADan

vs elav>ADan,HSC3, 3 días  $2,00 \pm 0,04$  vs  $1,94 \pm 0,14$ ; 7 días  $1,86 \pm 0,27$  vs  $2,14 \pm 0,22$ ; 14 días  $1,83 \pm 0,05$  vs  $2,40 \pm 0,34$ ). Entonces decidimos acotar la expresión con el promotor VGlut, aunque tampoco se encontraron diferencias al sobre-expresar HSC3 junto a ADan (figura 44 B, VGlut>ADan vs VGlut>ADan,HSC3, 3 días  $1,72 \pm 0,32$  vs  $1,82 \pm 0,29$ ; 7 días  $1,79 \pm 0,45$  vs  $1,93 \pm 0,21$ ).



**Figura 44. Efecto de la sobre-expresión de BiP/HSC3 junto con el péptido ADan. A.**

Ensayo de geotaxis negativa a los 3, 7 y 14 días sobre-expresando los transgenes con el promotor elav. B. Ensayo de geotaxis negativa a los 3 y 7 días sobre-expresando los transgenes con el promotor VGlut. Moscas envejecidas a 25°C. ANOVA de dos vías medidas repetidas. Bonferroni *post-test*. Letras diferentes indican diferencias significativas a cada edad (\* $p < 0,05$ ). \*\*\* $p < 0,01$ ).

Sin embargo, al igual que en el caso de la sobre-expresión de XBP1s con el promotor elav, se observó una mejora al co-expresar HSC3 con p23 respecto de p23 solo (elav>p23 vs elav>p23,HSC3, 3 días  $3,57 \pm 0,26$  vs  $5,20 \pm 0,23$ , 7 días  $3,09 \pm 0,21$  vs  $4,80 \pm 0,65$ , 14 días  $2,98 \pm 0,31$  vs  $4,80 \pm 0,40$ ). De igual manera que lo sugerido para XBP1s, quizás la sobre-expresión de HSC3 induce una mejora inespecífica, que no es suficiente frente al efecto tóxico provocado por ADan, pero que frente a una toxicidad leve resulta eficiente. Es llamativo que esta mejora en la performance en geotaxis negativa de las moscas control al sobre-expresar tanto XBP1s como HSC3 solo se visualizó con el promotor elav y no con VGlut.

Al emplear una línea ARNi contra HSC3, bajo el promotor de elav, no eclosionaron adultos, indicando un rol fundamental de HSC3 en la vida de Dm,

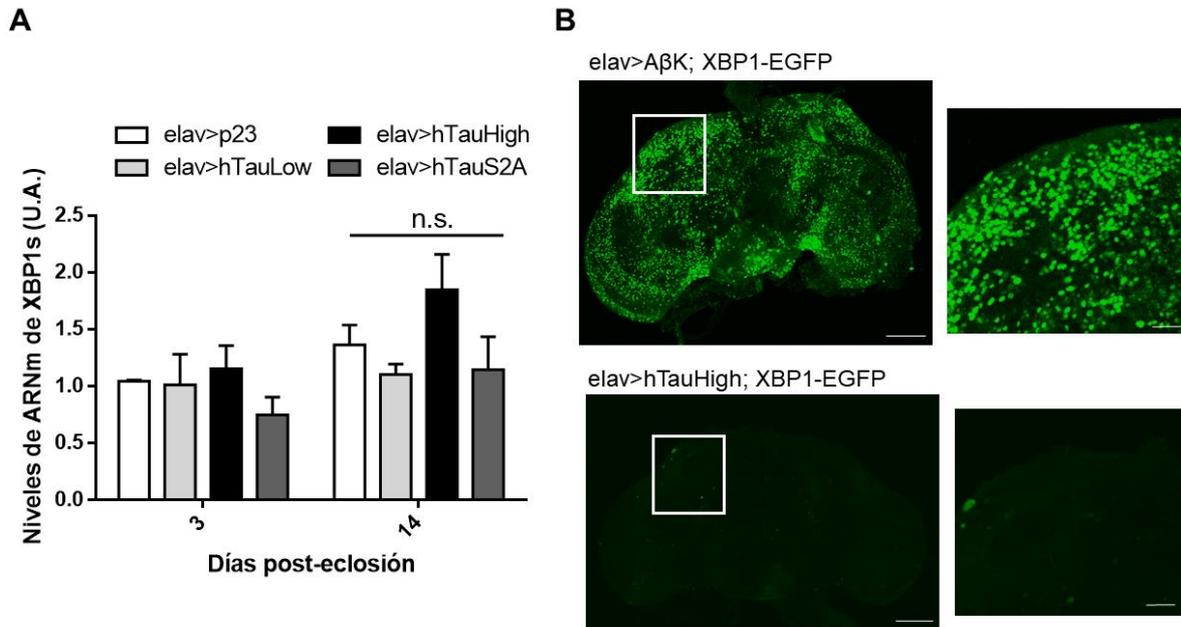
como se ha reportado en ratones, e impidiendo su utilización en nuestro trabajo para combinarlos con ADan y p23<sup>154</sup>.

Estos resultados en conjunto sugieren que la activación de la vía de IRE1/XBP1 es fundamental frente a la acumulación de ADan en SN de Dm, y que posiblemente se esté desempeñando al máximo de su capacidad, con lo cual, la sobre-expresión de algunos de sus efectores no es suficiente para mejorar el fenotipo tóxico inducido por ADan.

### 3.3. Efecto de la sobre-expresión de tau humana en la vía de IRE1

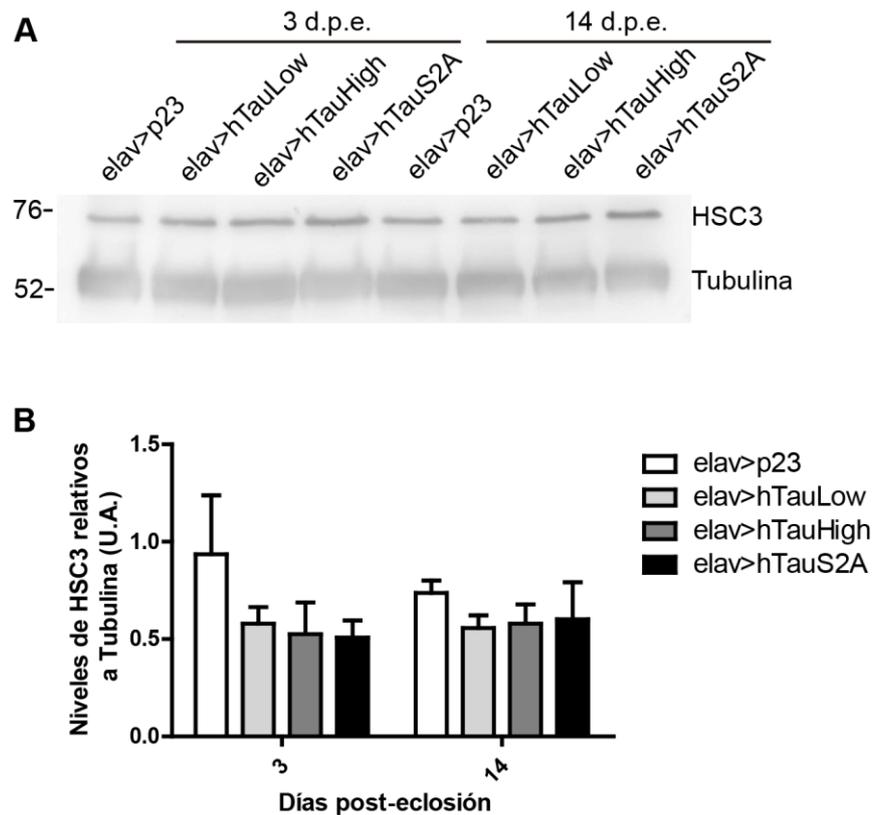
La relación entre la acumulación de tau y la activación de UPR es un tema controversial que hemos revisado en un artículo recientemente publicado donde discutimos las evidencias en relación a estudios con cerebros humanos, en cultivos celulares y en modelos animales<sup>117</sup>. Existen varios modelos de expresión de tau humana y no hay un consenso respecto a si UPR se activa o no, y si lo hace, cuáles son las vías involucradas. Es por eso que decidimos analizar este tópico en nuestro modelo.

Es primer lugar se midieron los niveles de ARNm de XBP1s en las tres líneas que sobre-expresan tau humana (descriptas en el capítulo 2) a los 3 y 14 días, y no se encontró diferencia respecto del control p23 (figura 45, A). Para confirmar este dato, se utilizó el sensor XBP1-EGFP y se comparó su co-expresión con hTauHigh (que es la única línea que induce un fenotipo tóxico en geotaxis negativa) y con una línea de A $\beta$  que activa la vía de IRE1/XBP1<sup>150</sup>. Como se había anticipado, no se encontró marca positiva de fluorescencia al sobre-expresar hTauHigh con XBP1-EGFP (figura 45, B), indicando que la vía de IRE1/XBP1 no se activaría por la sobre-expresión de tau humana en Dm.



**Figura 45. Análisis de la activación de la vía de IRE1/XBP1 en moscas que sobre-expresan tau humana.** A. Niveles de ARNm de XBP1s a los 3 y 14 días. U.A. Unidades arbitrarias. ANOVA de dos vías. B. Inmuno-fluorescencia de cerebros de moscas de 14 días que expresan el reportero XBP1-EGFP junto con A $\beta$  o hTau. Arriba, control positivo: moscas que sobre-expresan A $\beta$ . Abajo, moscas que sobre-expresan hTauHigh. Izquierda, cerebro entero, escala: 50  $\mu$ m. Derecha, ampliación de la sección recuadrada, escala: 20  $\mu$ m. Apilado en eje z de cerebro entero. Moscas envejecidas a 28°C.

Para confirmar estos resultados medimos los niveles de BiP/HSC3 en todas las líneas que sobre-expresan tau humana, ya que su expresión se ve activada en parte por la vía de IRE/XBP1 (figura 46, A). Para ello realizamos *Western blots* con extractos de proteínas de cabezas de moscas de 3 y 14 días, y no se encontraron diferencias entre los grupos (figura 46, B).



**Figura 46. Niveles de HSC3 en moscas que sobre-expresan tau humana a los 3 y 14 días.**

A. *Western Blot* representativo. B. Cuantificación de al menos tres repeticiones independientes. Moscas envejecidas a 28°C. d.p.e.= días post-eclosión. U.A.= Unidades arbitrarias.

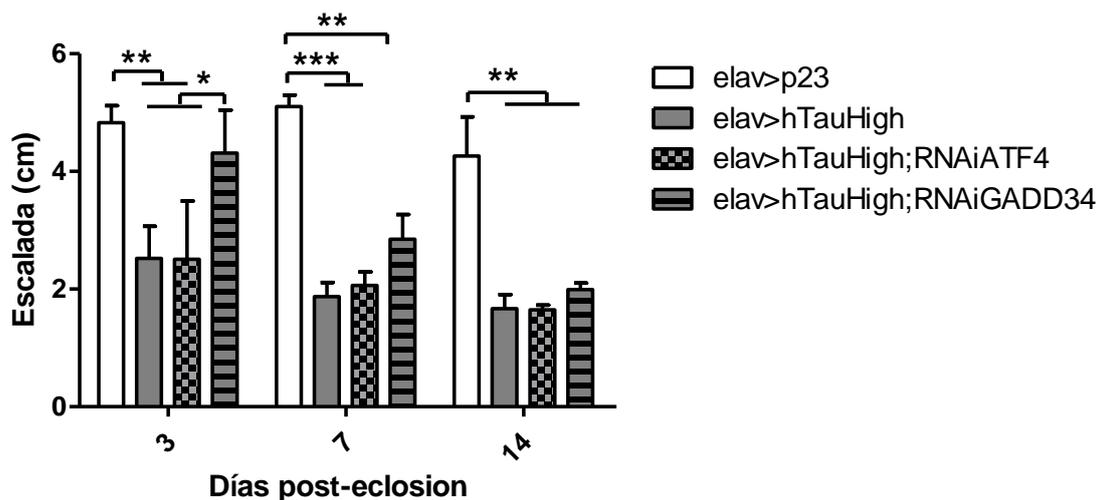
Es importante destacar que, en geotaxis negativa, sólo la línea hTauHigh presentó toxicidad y desde temprana edad. Sin embargo, dicha toxicidad no estaría asociada a la activación de la vía de IRE1, como ocurre en el caso de ADan y de A $\beta$ . Este resultado es útil para analizar el efecto de la co-expresión de ADan y A $\beta$  con hTau, ya que permitiría determinar si la vía de IRE1 se activa diferencialmente en presencia de hTau al sobre-expresar cada péptido amiloide. De ese modo se podría confirmar una posible vía de relación neurotóxica entre los péptidos y tau. Sin embargo, por cuestión de tiempo no fue posible realizar dichos experimentos.

### 3.4. Modulación de la vía de PERK en las moscas que sobre-expresan tau humana

A raíz de los resultados anteriores, se decidió no evaluar el efecto de la modulación de la vía de IRE1 al sobre-expresar tau humana, porque esa vía no se activa en nuestras condiciones experimentales. En cambio, se decidió

estudiar la vía de PERK, ya que se han detectado evidencias de su activación tanto en pacientes con FTDP-17 como en modelos animales. Para ello se utilizó la línea hTauHigh, que es la única que presentó fenotipo en geotaxis negativa, con un ARNi de ATF4 y otro de GADD34. Se espera que estos ARNi generen efectos opuestos, ya que disminuir los niveles de ATF4 implica un truncamiento en la vía de PERK, mientras que disminuir los niveles de GADD34 mantendría a eIF2 $\alpha$  fosforilado continuamente, y de esa manera mantendría activa la vía (ver introducción, sección 3, páginas 35-37).

De esta manera, se analizó el fenotipo en geotaxis negativa a los 3, 7 y 14 días post-eclosión y aunque el ARNi de ATF4 no modificó el fenotipo inducido por la expresión de tau humana, la disminución de GADD34 revirtió el fenotipo sólo a los 3 días (figura 47).



**Figura 47. Efecto de la disminución de los niveles de ATF4 y GADD34 al sobre-expresar tau humana.** Ensayo de geotaxis negativa de moscas que sobre-expresan altos niveles de tau humana sola y con ARNi específicos contra ATF4 y GADD34. Moscas envejecidas a 28°C. ANOVA de dos vías de medidas repetidas. Bonferroni *post-test*, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Debe considerarse que cabe la posibilidad de que la disminución de mensajero a través de los ARNi sea insuficiente, principalmente en el caso de ATF4. Sin embargo, los resultados con ARNi de GADD34 sugieren que la sobre-expresión de tau podría activar a la vía de PERK que tendría una función protectora, sobre todo en etapas tempranas de la toxicidad.

### Conclusiones del capítulo 3

La expresión tanto de ADan como de A $\beta$  induce la activación de UPR en neuronas del SNC desde edad temprana. Al analizar la respuesta ejecutada por IRE1 a través de XBP1s, se encontró que en las moscas que sobre-expresan ADan los niveles del mensajero se encuentran aumentados desde los 3 días y alcanzan su punto máximo a los 14 días. Mientras que las moscas que sobre-expresan A $\beta$  muestran un aumento paulatino del ARNm de XBP1s, encontrando el pico a los 21 días y disminuyendo a los 28 días. La misma tendencia se detectó al medir los niveles de BiP/HSC3: los niveles de la chaperona de retículo HSC3 se ven aumentados desde muy temprana edad en el caso de las moscas que sobre-expresan ADan, manteniéndose a lo largo del tiempo prácticamente sin variación; mientras que en el caso de A $\beta$ , los niveles van aumentando y encuentran su pico a la edad en la que se evidencia el fenotipo tóxico en geotaxis negativa, para luego disminuir. En conjunto, los niveles de los efectores de la vía aumentaron en una primera etapa y luego se mantuvieron o disminuyeron, posiblemente indicando un punto de saturación de la respuesta. Es interesante que la respuesta que involucra a la vía de IRE1 en las moscas que sobre-expresan A $\beta$  parece ser progresiva y más intensa que en el caso de las moscas que sobre-expresan ADan, aunque estas últimas mostraron un efecto tóxico mayor. La disminución de XBP1s al sobre-expresar ADan, mostró un empeoramiento en la geotaxis negativa, indicando un rol protector de esta vía, al igual de lo que se había encontrado con A $\beta$ . Sin embargo, ni la sobre-expresión a XBP1s ni de HSC3 rescataron el fenotipo, sugiriendo que el efecto neurotóxico de ADan alcanzó niveles difíciles de modular mediante esta respuesta proteostática.

Por su parte, la sobre-expresión de tau no activa la vía de IRE1, evidenciado a través de la medición de los niveles de mensajero de XBP1s, la utilización de la herramienta XBP1-EGFP y la medición de los niveles de proteína HSC3. Sin embargo, es posible que la vía de PERK sí se active por la sobre-expresión de tau y que tenga un rol protector a temprana edad, que se pierde a lo largo del tiempo. Estos resultados son útiles para un posterior análisis del efecto de la co-expresión a A $\beta$  y ADan junto con hTau en las distintas vías de UPR.

# DISCUSIÓN

La población mayor de 65 años crece año a año haciendo de las demencias asociadas al envejecimiento un hecho relevante en tema de salud pública. La enfermedad de Alzheimer es la principal causa de demencia en los adultos mayores, y si bien se conoce desde principios del siglo XX, aún no existe tratamientos efectivos. Desde la década de los 90 la hipótesis amiloide ha sido el foco principal de investigación y en los últimos años, la progresión del conocimiento ha derivado en una extensa revisión del tema. La hipótesis simple y lineal de toxicidad de amiloide como agente desencadenante de la EAE ya no es sostenible; por un lado, se propone que ocurre un desequilibrio entre la producción de A $\beta$  y su eliminación que deriva en la acumulación del péptido, pero aún no se han aclarado los mecanismos por los cuales se llega a ese desbalance de manera crónica. Por otro, está claro que su sola acumulación no es suficiente para desencadenar la enfermedad: 1) los ratones y ratas transgénicas que sobre-expresan APP y acumulan A $\beta$  no presentan evidencias de daño sináptico y/o neuronal comparable al detectado en EA y 2) aproximadamente un 30% de individuos de edad avanzada presenta acumulación de A $\beta$  cerebral (comparable a la que se encuentra en EA) y no desarrollan demencia<sup>71,72,155,156</sup>. Sin embargo, en el caso de la DFD hay una mutación autosómica dominante que determina la producción de un péptido amiloide (ADan) que no existe en condiciones fisiológicas y que sería el factor desencadenante de la enfermedad. Es por eso que nuestra estrategia consistió en utilizar un modelo animal sencillo respecto a su manipulación y mantenimiento, pero con un sistema nervioso complejo para estudiar la toxicidad asociada al péptido ADan, del cual poco se conoce y que compartiría mecanismos de toxicidad con otros amiloides.

#### Efectos de la sobre-expresión de ADan en Sistema Nervioso (SN) de Dm

En primer lugar, encontramos que la acumulación de ADan en Dm depende de la cantidad de copias del gen y del tiempo durante el cual se expresa. La detección de una especie tetramérica resistente a SDS solo en extractos de proteínas provenientes de cabezas de moscas de 21 días post-eclosión que expresan dos copias del gen de ADan es una clara evidencia de la importancia de la dosis y del tiempo en la acumulación de este péptido. Esta característica estaría asociada al sistema de sobre-expresión GAL4-UAS, por el cual, al

expresarlo en homocigosis, los niveles de ADan superarían un umbral que permite evidenciar especies que no se detectan en hemocigosis en los tiempos estudiados. Esto coincide con lo detectado en modelos de sobre-expresión de A $\beta$ , donde el nivel de expresión es fundamental para la formación de agregados y su acumulación progresiva<sup>131,157,158</sup>. En lo que respecta al progreso de la EA y la DFD, en principio no existiría un factor que involucre un aumento en los niveles de expresión o traducción, sino más bien, dificultades asociadas al procesamiento de las proteínas precursoras y/o a la degradación que inducirían un efecto similar, donde los péptidos aumentan su concentración por encima de la concentración crítica llevando a la autoagregación ordenada. Respecto de la dependencia del tiempo es destacable que la edad es un factor fundamental para el desarrollo no solo de la de la EAE, sino también de la DFD ya que el cuadro clínico se evidencia en la adultez. En ese sentido se propone que ADan y A $\beta$  se acumulan de manera progresiva y que el factor “envejecimiento neuronal” sumado a los agregados proteicos disparan las distintas respuestas celulares que desembocan en la disfunción y posterior muerte neuronal. Al respecto, en un estudio donde utilizaron un sistema inducible de expresión de A $\beta$  mutante asociada a EAF en Dm, se encontró que las moscas envejecidas presentaron una mayor toxicidad frente a la inducción de A $\beta$  que las moscas jóvenes, demostrando un fuerte componente del envejecimiento a la vulnerabilidad neuronal<sup>159</sup>. Al igual que lo detectado tanto en EA y en DFD, la acumulación del péptido ADan en nuestro modelo es detectable mediante inmunofluorescencia principalmente en algunas neuronas. Sería interesante mapear las estructuras cerebrales y tipos de neuronas afectadas en Dm al sobre-expresar ADan de manera pan-neuronal; en el caso de que se encuentre una correlación con los tipos neuronales afectados en humanos con DFD nos hablaría de que el péptido tiene un mecanismo de acumulación y/o toxicidad específico y asociado a la funcionalidad y particularidades de dichas neuronas.

De manera concurrente a la acumulación progresiva, el análisis de dos comportamientos, la sobrevivencia y la geotaxis negativa, indicaron que la dosis del péptido ADan es fundamental para ejercer un efecto tóxico en Dm, ya que la sobre-expresión en hemocigosis no resultó tóxica a lo largo de los ensayos,

mientras que en homocigosis la toxicidad se evidenció desde muy temprana edad. Es interesante que el efecto tóxico de ADan se evidenció desde los primeros días de los ensayos en homocigosis, mientras que en líneas comparables sitio-dirigidas que sobre-expresan A $\beta$  el efecto tóxico se evidenció en forma tardía<sup>99</sup>. Es interesante recordar, si comparamos la DFD y la EAE, esta tendencia se repite, siendo la primera de inicio temprano (aproximadamente a los 40 años) mientras que la EAE es de inicio más tardío (desde los 65 años). Estas correlaciones, que se replican en nuestro modelo, podrían estar relacionadas en parte con la capacidad de agregación diferencial de cada péptido: en un estudio *in vitro* donde se compararon las cinéticas de agregación fibrilar de A $\beta$  y ADan, se encontró que A $\beta$  se agrega espontánea y rápidamente a diferentes pH, mientras que ADan presenta una cinética de agregación más lenta y en un rango limitado de pH<sup>160</sup>. Estos resultados apuntan a un predominio de especies oligoméricas de ADan, que se consideran las principales responsables de la neurotoxicidad<sup>161</sup>, lo cual coincide con la tinción tioflavina S negativa de los cerebros de nuestras moscas y también con el predominio de agregados rojo Congo negativos en los cerebros de pacientes con DFD. Por otro lado, es posible que la identidad particular de cada péptido induzca distintas respuestas celulares y los mecanismos de toxicidad difieran entre péptidos amiloides, de manera concordante con lo postulado para otros tipos de proteínas asociadas a diferentes enfermedades neurodegenerativas<sup>162</sup>.

Una característica destacable de todos nuestros ensayos es la utilización de p23 como control de sobre-expresión de un péptido no amiloidogénico. Aunque se detectó un efecto tóxico en el ensayo de sobrevida en las moscas que sobre-expresan dos copias de p23, podría deberse a que la sobre-expresión en homocigosis generaría altos niveles de ARNm y péptido que producen alguna alteración celular acumulativa que no afecta la geotaxis, a diferencia de la expresión de ADan<sup>143</sup>. Este ensayo permitió realizar análisis de comportamiento en períodos de tiempo más cortos que en sobrevida, en la cual es posible que se requiera una acumulación de estrés crítico para evidenciar efectos tóxicos. El hecho de contar con un buen control es fundamental para analizar los resultados, y en este caso hace de nuestro modelo una

herramienta muy útil y confiable para estudiar distintos aspectos de la neurotoxicidad de péptidos amiloides.

#### Efecto de la sobre-expresión de ADan en el SN sobre tau endógena de Dm

Tanto en la EA como en la DFD, la acumulación de la proteína tau dentro de las neuronas es un aspecto central de estas patologías. Sin embargo, los mecanismos que conectan la acumulación de A $\beta$  o ADan con la acumulación de fosfo-tau aún no se conocen completamente. La hipótesis amiloide en la EA propone que la acumulación de A $\beta$  inicia cambios en las neuronas, incluyendo la actividad de quinasas y fosfatasa, que inducen la hiperfosforilación de tau y su posterior acumulación. Si bien existe evidencia a favor y en contra de esta hipótesis, hasta ahora es irrevocable el hecho de que no se han encontrado pacientes con EA o DFD que no presenten acumulaciones de proteína tau hiperfosforilada en sus cerebros, mientras que en otras tauopatías, como FTDP-17, parálisis supranuclear progresiva o degeneración corticobasal, ocurre acumulación de fosfo-tau sin acumulación de otros amiloides, sugiriendo que la patología de tau podría estar “río abajo” de la acumulación de A $\beta$  o ADan pero no viceversa. A pesar de esto, no hay estudios que analicen si la interacción entre ADan y tau es similar a lo que ocurre con A $\beta$ . Es por eso que decidimos analizar si la sobre-expresión de ADan en Dm induce cambios en los niveles de fosforilación de tau endógena. Dm tiene un homólogo de tau que comparte los mismos dominios, aunque tiene un dominio de unión a microtúbulos adicional. De los numerosos sitios de fosforilación que se han estudiado en tau humana y se conservan en Dm se destacan Ser262 y Ser356. Es por eso que utilizamos un anticuerpo que permite detectar la fosforilación del sitio Ser262 en tau humana, en muestras de Dm. Si bien esperábamos que el efecto de ADan sobre tau fuera similar al propuesto para A $\beta$ , es decir, que la fosforilación de tau se vea aumentada, encontramos una disminución en los niveles de pSer262 junto con un leve aumento de tau total. El aumento en tau total podría denotar un aumento en la acumulación de tau, aunque ese aumento no estaría acompañado por mayor fosforilación en el sitio 262. La posibilidad de que tau esté hiperfosforilada y acumulada en fracciones más insolubles, es poco probable de acuerdo a nuestros ensayos de fraccionamiento; si ocurre acumulación en fracciones insolubles, esta es

escasa. Otra posibilidad es que en Dm la fosforilación de cada sitio tenga un rol distinto que en humanos, por lo cual la disminución en la fosforilación del sitio Ser262 debería ser interpretada de otra forma: quizás su fosforilación no está involucrada en la disociación de tau de los microtúbulos en Dm, y de ese modo no habría una correlación entre la fosforilación de Ser262 y la toxicidad de tau, como se propone en humanos (entonces la toxicidad de ADan no estaría mediada por la fosforilación de este sitio); ó quizá su fosforilación sea parte de una respuesta “protectiva” respecto a la patología de tau que se ve afectada por la expresión y acumulación de ADan. De igual manera, es posible que el rol de tau de Dm difiera del de tau humana, que el efecto tóxico de ADan sobre tau difiera de lo propuesto para A $\beta$ , y más específicamente, que la toxicidad de ADan no sea dependiente de tau.

#### Relación entre la toxicidad de ADan en SN y tau endógena de Dm

Para estudiar si la neurotoxicidad de ADan está mediada por tau en Dm, nos propusimos analizar el efecto de la sobre-expresión de ADan en un contexto de deficiencia endógena de tau. En primer lugar, caracterizamos tres líneas que presentan disminución de tau endógena:  $\Delta$ Tau/TauEP, KOTau y ARNiTau. Tanto  $\Delta$ Tau/TauEP como KOTau son deficientes genéticas, pero que fueron generadas de diferente manera: la primera presenta un elemento P inserto al azar que interrumpe el gen de tau junto con una deficiencia derivada de la recombinación del mismo elemento P, la combinación de estas mutantes afectaría a otros genes además de tau; la segunda fue generada por recombinación específica de una sección de tau que no afecta ningún otro gen. Finalmente, la línea ARNiTau permite la expresión sólo en el sistema nervioso, de un ARN de interferencia específico contra tau. La caracterización de estas líneas indicó que  $\Delta$ Tau/TauEP y KOTau disminuyen los niveles de la isoforma mayoritaria de tau de manera prácticamente total, considerando que no fue posible detectarla por *Western blot*, mientras que la herramienta ARNiTau disminuye los niveles de la proteína, pero se pudo detectar por *Western blot*. En el ensayo de geotaxis negativa tanto KOTau como ARNiTau no indujeron efectos tóxicos detectables, mientras que  $\Delta$ Tau/TauEP mostró toxicidad moderada y estable desde los 14 días. Considerando que KOTau y ARNiTau disminuyen tau de manera específica, a diferencia de  $\Delta$ Tau/TauEP, es posible

que el efecto tóxico detectado en  $\Delta$ Tau/TauEP se deba a alguno de los otros genes afectados por las mutantes. De ellos, el único que posiblemente esté totalmente disminuido es *RpS10a* que codifica a una proteína ribosomal que se expresa principalmente en ovario y testículo; por lo cual la relación con la geotaxis no sería directa. Quizá hay otros genes disminuidos que están involucrados en funciones celulares cuya afección se traduzca en un defecto en este ensayo comportamental. Entre ellos hay tres genes no caracterizados (CG5611, CG5612, CG5639), el gen *dsd* que podría ser un *target* muscular para el reconocimiento sináptico<sup>163</sup>, un micro ARN (*mir100*) que estaría involucrado en la homeostasis de células musculares<sup>164</sup>, el gen *Mtl* que codifica a una proteína Rac GTPasa que tendría funciones solapantes con otras Rac (Rac1 y Rac2) en el control de la morfogénesis epitelial, la fusión de mioblastos y el crecimiento y guía de los axones<sup>165</sup>, el gen *pins* que está involucrado en la orientación del huso mitótico<sup>166</sup>, el gen *Tusp* que se propuso como regulador del ensamblaje de SNARE y, por lo tanto, de la liberación de neurotransmisores<sup>167</sup> y el gen *wdb* que codifica una subunidad reguladora de la fosfatasa PP2A y se relacionó con la segregación de cromátidas hermanas<sup>168</sup>. Los defectos relacionados con la disminución de cualquiera de estos genes podrían provocar defectos visibles en el ensayo de geotaxis negativa. Además, debería determinarse si hay un efecto provocado por un “*off-target*”, es decir si al crearse las deficientes se generó una inserción o una recombinación desconocida en otro sitio. Observando todos los posibles genes afectados en la línea  $\Delta$ Tau/TauEP, cabe destacar que iniciamos los estudios con dicha línea antes de que se haya publicado la línea KOTau, que fue incorporada tardíamente a los análisis.

Una vez que se caracterizaron las líneas que disminuyen tau endógena se combinaron con las que expresan ADan para determinar si su toxicidad depende de tau e incorporamos a A $\beta$  como modelo de comparación. En el caso de ADan, no hubo modificaciones en el fenotipo de geotaxis negativa al disminuir los niveles de tau con  $\Delta$ Tau/TauEP ni con ARNiTau, sin embargo, es llamativo que no se haya detectado un empeoramiento en el primer caso, debido al defecto que muestra  $\Delta$ Tau/TauEP *per se*. Quizás la disminución de tau induce una leve mejora sobre la toxicidad de ADan, que en el caso de ARNi

no puede detectarse porque no disminuye totalmente los niveles de tau, y en el caso de  $\Delta$ Tau/TauEP se diluye por el defecto que induce la deficiencia por sí sola. El efecto de la combinación de ADan con KOTau no se pudo analizar por dificultades experimentales, que se explicaron en los resultados; considerando que KOTau es la línea que disminuye totalmente tau de manera específica, su combinación con ADan nos hubiese permitido estipular con mayor confianza si la toxicidad de ADan depende de tau.

Al probar cada una de las tres líneas que disminuyen tau junto con la sobre-expresión de A $\beta$  los resultados fueron contradictorios. La utilización de la línea  $\Delta$ Tau/TauEP empeoró el fenotipo provocado por A $\beta$ , mientras la línea KOTau lo mejoró significativamente. La línea ARNiTau no modificó el fenotipo inducido por A $\beta$  en geotaxis negativa. Éstas diferencias controversiales al sobre-expresar A $\beta$  junto con las distintas líneas deficientes de tau no pueden explicarse considerando únicamente la disminución de los niveles de tau en el SNC. Por un lado, debe ser considerado que las deficiencias genéticas ( $\Delta$ Tau/TauEP y KOTau) disminuyen los niveles de tau en todas las células de la mosca desde el desarrollo, mientras que el ARNi se expresa solo en neuronas, desde el estadio embrionario en el que comienza a expresarse la proteína ELAV (estadio embrionario 11); en este sentido la herramienta más específica en cuanto a expresión neuronal para nuestro estudio es el ARNi, aunque los niveles de disminución de tau que alcanza podrían no ser suficientes para evidenciar un fenotipo al co-expresar A $\beta$  mediante el ensayo de geotaxis negativa. Por otro lado,  $\Delta$ Tau/TauEP tiene una deficiencia completa de la isoforma mayoritaria de tau, pero algunas isoformas podrían estar siendo traducidas y, además, presenta otros genes afectados, como se detalló más arriba. Al sobre-expresar A $\beta$  en este contexto, el fenotipo en el ensayo de geotaxis negativa empeoró, indicando que la disminución de tau impacta negativamente en las células y empeora el efecto tóxico de A $\beta$ , contrario a las evidencias anteriores, que sostienen una relación neurotóxica entre A $\beta$  y tau, donde la presencia de tau es necesaria para que A $\beta$  ejerza su toxicidad. Otra posibilidad es que ocurra una suma de toxicidades entre la inducida por A $\beta$  y la inducida por  $\Delta$ Tau/TauEP, que se traduzcan en un empeoramiento en el comportamiento de geotaxis negativa, y que no esté

directamente relacionado con la interacción entre A $\beta$  y tau. KOTau también tiene deficiencia completa de tau a raíz de una delección específica que afecta sólo dicho gen y que no genera defectos en el ensayo de geotaxis negativa. Al sobre-expresar A $\beta$  en el contexto genético KOTau, el efecto tóxico provocado por el péptido disminuyó, es decir que en este caso la toxicidad de A $\beta$  estaría mediada por tau, como se ha reportado anteriormente (ver introducción, sección 2, páginas 28-33).

Si bien los resultados obtenidos con todas las combinaciones genéticas utilizadas no permiten una interpretación directa y sencilla, es posible que el rol de tau de Dm sea diferente en los procesos de toxicidad inducidos por ADan respecto de A $\beta$ . Considerando que la co-expresión del ARNiTau tanto con ADan como con A $\beta$  no indujo modificaciones en el fenotipo, es posible que una disminución parcial de la expresión de tau endógena no alcance para modular el efecto tóxico provocado por la expresión de cada péptido. Por otro lado, aunque la deficiente KOTau es la más confiable debido a la disminución total de la proteína y por contar con una delección específica que no afecta a otros genes, como no pudo analizarse junto con ADan, no podemos compararlo con el resultado obtenido con A $\beta$ . Mientras que la disminución de tau con la línea  $\Delta$ Tau/TauEP provocó un empeoramiento en el fenotipo tóxico inducido por A $\beta$ . Al expresar ADan, que es más tóxico y desde edades más tempranas, no se modificó su desempeño en el ensayo de geotaxis negativa. Este resultado es llamativo, y podría deberse a efectos secundarios de la deficiente. Alternativamente, podría explicarse por un efecto diferente de tau endógena frente a ADan o A $\beta$  que no podemos clarificar con estas herramientas.

Finalmente debe considerarse la posibilidad de que la función y rol de tau en Dm no sea directamente comparable con lo que ocurre con tau humana en las enfermedades EA y DFD.

#### Efecto de la sobre-expresión de tau humana en SN de Dm

La proteína tau hiperfosforilada se acumula y agrega en el citoplasma neuronal formando los ovillos neurofibrilares en la EA y la DFD. Estudios en cultivos celulares y modelos animales, incluyendo Dm, sostienen el hecho de que el aumento de fosforilación de tau está directamente involucrado en la toxicidad

inducida por la proteína<sup>64,66,77,90,169,170</sup>. Se propone que la fosforilación de tau provoca una caída de unas diez veces en la afinidad de ésta con los microtúbulos. El aumento de los niveles de tau soluble libre, favorece la autoagregación, la formación de oligómeros y eventualmente de ovillos neurofibrilares. La fosforilación de tau podría tener un rol de pérdida de función o de ganancia de “función tóxica”, que afectaría en primer instancia la dinámica de microtúbulos e interferiría en otros procesos celulares<sup>171</sup>. Si bien se han propuesto varios sitios de fosforilación como fundamentales en la toxicidad, incluyendo a Ser262, no se han definido sitios únicos imprescindibles para desencadenarla. Por otro lado, se ha identificado que la hiperfosforilación de tau es un evento de modificación post-traducciona que ocurre durante la hibernación y la anestesia, pero estos eventos son reversibles y no desencadenan una patología asociada a tau, aunque en el caso de la anestesia se cree que podría acelerar una patología de tau pre-existente<sup>172,173</sup>. El mecanismo que dispara la hiperfosforilación de tau no se conoce tampoco, pero se propone que las disfunciones de la tau se relacionan a un desequilibrio general en los niveles de actividad o regulación de quinasas y fosfatasas<sup>60,174</sup>. Es por eso que analizamos en Dm el efecto de la sobre-expresión de tres versiones de tau humana: hTauLow, permite expresar bajos niveles de la isoforma más larga de tau (2N4R), hTauHigh, permite expresar altos niveles de la misma isoforma y hTauS2A, que permite la expresión de niveles similares a hTauHigh de la isoforma 2N4R, pero presenta dos mutaciones puntuales Ser262→Ala y Ser356→Ala, las cuales evitan la fosforilación en esas dos posiciones. Ambos sitios se encuentran dentro de los dominios de unión a microtúbulos, por lo que su fosforilación, principalmente en el sitio 262, estaría involucrada en la disociación de tau de los microtúbulos, que es uno de los mecanismos patogénicos propuestos. Frente a un posible efecto “*seeding*” donde la presencia de núcleos de acumulación promueven el depósito de la proteína amiloide, el aumento de tau disociada de microtúbulos favorecería el proceso de agregación<sup>175</sup>. Entre los numerosos sitios de fosforilación de tau identificados en la EA, como ya se comentó, aquellos que intervienen en la unión a microtúbulos podrían ser importantes en la patogenia. Entre ellos, Ser262, que ha sido estudiado en neuronas cultivadas, ratones y Dm

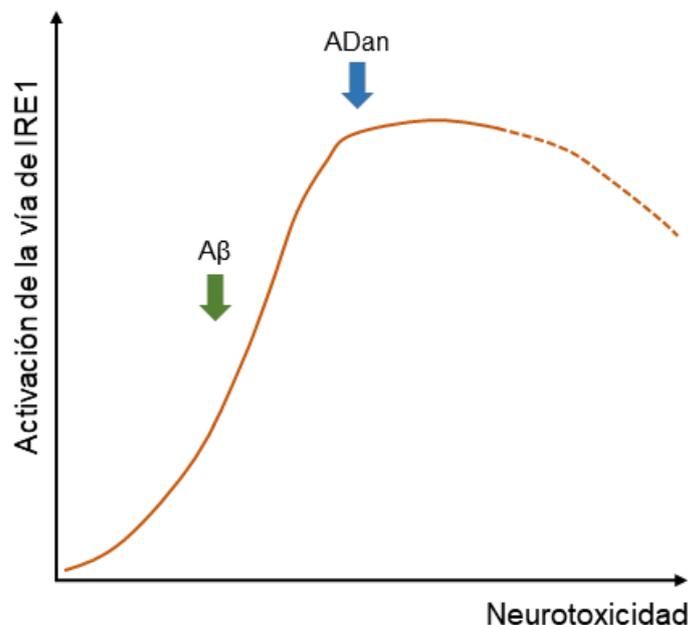
transgénicos<sup>176-179</sup>. Al respecto, los resultados obtenidos al analizar las líneas que expresan tau humana en Dm mediante el ensayo de geotaxis negativa demostraron que para que tau induzca su toxicidad en Dm se requiere que la expresión y acumulación sobrepasen un umbral crítico: la línea hTauLow no mostró toxicidad alguna, al igual que hTauS2A, mientras que en la línea hTauHigh el comportamiento se vio significativamente afectado desde los 3 días post-eclosión. Además, los resultados indican que la fosforilación en los sitios S262 y/o S356 son necesarios para ejercer un efecto tóxico detectable por geotaxis negativa. Es decir, la imposibilidad de la fosforilación de los sitios 262 y/o 356 en tau humana transgénica evita la toxicidad inducida por la expresión de altos niveles de tau, sin embargo, no se puede asegurar que la fosforilación de esos sitios sean suficientes para desencadenar patología. Es posible que la fosforilación en esos sitios, o en alguno de ellos, sea necesaria para la fosforilación en otros sitios involucrados directamente con algún mecanismo de toxicidad inducido por tau. Por ejemplo, se ha propuesto que la fosforilación en Ser262 y Ser356 son necesarios para la fosforilación en Ser238, Thr245, Thr212, Ser214, Ser202 y Thr205<sup>151,152</sup>.

Cuando nos propusimos estudiar el efecto de la co-expresión de ADan y tau, encontramos que la expresión de bajos niveles de tau no modificó el fenotipo tóxico provocado por ADan en geotaxis negativa. Sin embargo, la co-expresión de niveles altos de tau con ADan mostró letalidad. Esto indicaría que la sobre-expresión de tau potencia la toxicidad inducida por ADan, pero solo si se alcanza cierto nivel umbral de expresión o acumulación. En el caso de la sobre-expresión de A $\beta$  con altos niveles de tau se adelantó el fenotipo tóxico de manera evidente en el ensayo de geotaxis negativa, apoyando la hipótesis de que existe una relación neurotóxica entre A $\beta$  y tau. Sería interesante analizar si la co-expresión de ADan induce cambios en la fosforilación de tau y/o aumenta su acumulación, como ha sido propuesto para A $\beta$  <sup>64,66,74,88</sup>.

#### Activación de las distintas vías de UPR asociada a la sobre-expresión de A $\beta$ y ADan

La respuesta a proteínas mal plegadas es la principal cascada de señalización involucrada en el control de calidad del plegamiento de proteínas en el retículo

endoplásmico. En cerebros de pacientes con EA y otras tauopatías se ha evidenciado la activación de cada una de las vías involucradas en esta respuesta dentro de las neuronas en regiones afectadas, especialmente las vías de PERK e IRE1. Más aún, algunos investigadores han propuesto que la activación de UPR podría tener un efecto pro-degenerativo en estas enfermedades<sup>100,180–182</sup>. En nuestro modelo se evidenció que A $\beta$  y ADan provocan la activación de la vía de IRE1 demostrada mediante la detección y cuantificación del *splicing* alternativo de XBP1, utilizando un reportero fluorescente (XBP1s-EGFP). Al medir la intensidad de fluorescencia con dicho reportero a distintas edades se detectó una correlación entre el nivel de activación de la vía de IRE1/XBP1 y el inicio de los defectos en geotaxis negativa provocados por la expresión de los péptidos A $\beta$  y ADan. Los máximos de fluorescencia intraneuronal cuantificados coincidieron con los puntos temporales en los cuales se detectó la toxicidad inicial, a temprana edad para ADan (7 días) y a los 21 días para A $\beta$ ; este resultado se replicó al medir los niveles de mensajero de XBP1s a lo largo del tiempo. La misma tendencia se detectó al medir en *Western blots* los niveles de la chaperona BiP/HSC3, que es regulada transcripcionalmente, aunque sea en parte, por la vía de IRE1. En primer lugar, es notable que éste es el primer estudio que evidencia la activación de UPR asociada a ADan. En segundo lugar, el *time-course* de la respuesta de la vía de IRE1, medido por los niveles de los efectores XBP1s y HSC3, parece tener una relación con el nivel de toxicidad de cada péptido. Proponemos la siguiente cinética en base a nuestros resultados:



**Figura 48. Cinética propuesta para la activación de la vía de IRE1 en nuestro modelo.** El eje x representa la neurotoxicidad y el eje y representa la activación de la vía de IRE1. Se marcan con flechas el estado inicial en nuestros estudios de las moscas que sobre-expresan el péptido A $\beta$  y ADan (a los 3 días post-eclosión). La zona punteada se refiere a resultados preliminares.

En primer lugar, proponemos que la intensidad de la respuesta de la vía de IRE1 depende del grado de estrés de RE y/o acumulación de proteínas mal plegadas, que se ve reflejado en el nivel de neurotoxicidad; en el caso de A $\beta$ , la activación de UPR comenzó en un nivel de toxicidad leve que no se evidencia en el ensayo de geotaxis negativa y va aumentando paulatinamente hasta alcanzar un máximo cuando comienza a ser visible el efecto tóxico. En cambio, al inicio de los ensayos las moscas que sobre-expresan ADan presentan un nivel de toxicidad más elevado, que no admitiría mayor activación puesto que ya se llegó al punto de saturación de la respuesta. Resultados preliminares con moscas de 28 días que sobre-expresan A $\beta$  sugieren que posteriormente la activación de la vía de IRE1 comienza a disminuir (línea punteada). La pendiente de la curva dependería del estado fisiológico de las neuronas en un contexto de toxicidad crónica y dependiente de los efectos de cada péptido. Una cinética similar se propuso en un estudio *in silico*<sup>183</sup>. Por otro lado, la coincidencia entre los máximos de XBP1s y HSC3 y la detección de toxicidad podrían indicar que la respuesta de la vía de IRE1 es tóxica, como se ha

sugerido en algunos trabajos con distintos modelos animales<sup>180,184,185</sup>. Considerando los resultados publicados por nuestro laboratorio, donde mostramos que la sobre-expresión de XBP1s mejora el fenotipo tóxico inducido por A $\beta$ , asociado a una disminución en los niveles del péptido y, por el contrario, la disminución de XBP1s empeora el fenotipo y aumenta la acumulación de A $\beta$ <sup>150</sup> y otros estudios que proponen un efecto protector para esta vía<sup>133,186–188</sup>, creemos que es probable que dicha coincidencia temporal se deba a que la respuesta máxima del sistema no es suficiente para impedir el efecto neurotóxico provocado por A $\beta$  y ADan. Al respecto debe destacarse la escasa evidencia sobre UPR y la acumulación de proteínas en el RE *in vivo* y en forma crónica, ya que en la amplia mayoría de las publicaciones se analizan puntos de tiempo únicos.

#### Modulación de la vía de IRE1 en las moscas que sobre-expresan ADan

Como se mencionó anteriormente, en un trabajo publicado de nuestro laboratorio evidenciamos la importancia de la vía de IRE1 frente a la toxicidad de A $\beta$ , y detectamos que la modulación de los niveles de XBP1s impacta en los de A $\beta$  de manera indirecta (es decir, mientras más ARNm de XBP1s, menos acumulación de A $\beta$  y viceversa)<sup>150</sup>. Para comprobar si la modulación de la vía de IRE1 también refleja un rol neuroprotector en las moscas que sobre-expresan ADan, utilizamos las mismas herramientas para disminuir y aumentar los niveles de XBP1s. Encontramos, al igual que en el caso de A $\beta$ , que la disminución de XBP1 al sobre-expresar ADan empeoró el fenotipo tóxico inducido por el péptido. Sin embargo, la sobre-expresión de XBP1s no indujo modificaciones en el fenotipo provocado por ADan. Estos resultados indican que al igual que para A $\beta$ , la vía de IRE1-XBP1 cumple un rol protector, aunque su modulación positiva no es suficiente para mejorar el fenotipo tóxico inducido por ADan. Considerando que la toxicidad de ADan es mayor que la de A $\beta$ , y que el inicio del efecto tóxico es muy temprano, podemos suponer que el estado fisiológico general de las neuronas posiblemente se encuentre muy comprometido, siendo imposible inducir una mejora significativa que se pueda evidenciar a través del ensayo de geotaxis negativa. Por otro lado, la disminución de HSC3 no pudo evaluarse junto con ADan porque resultó letal; mientras que la sobre-expresión de HSC3 no indujo modificaciones al sobre-

expresar ADan. Diversas razones pueden justificar este hecho, por un lado, que la sobre-expresión no alcance niveles suficientes como para provocar una disminución en la acumulación de oligómeros tóxicos de ADan, o que, al igual que lo propuesto para XBP1s, la respuesta hubiese alcanzado su máximo. Además, así como se ha propuesto a BiP como un target terapéutico, a raíz de estudios realizados con un activador bioquímico de su actividad<sup>189</sup> también se ha propuesto a BiP como un inhibidor de UPR. Esta función propuesta para BiP deriva de estudios en cultivos celulares donde su sobre-expresión indujo una disminución en la respuesta mediada por IRE1 y por PERK, a través de un secuestro e inactivación de dichos efectores<sup>190</sup>. Nuestras evidencias indican que, si bien un aumento en sus niveles no provocó un efecto beneficioso, tampoco se detectó un efecto perjudicial, por lo que el rol de la sobre-expresión de BiP frente a un estrés de RE debe analizarse con más profundidad y especialmente en modelos *in vivo* de estrés crónico de RE.

#### Efecto de la sobre-expresión de tau humana en la vía de IRE1

La activación de UPR mediada por la acumulación anormal de tau ha sido propuesta para explicar el hallazgo de p-PERK y p-eIF2, en neuronas afectadas de cerebros con tauopatías<sup>113,182,191,192</sup>. La posible relación entre la acumulación de tau y UPR ha sido estudiada en modelos animales y cultivos celulares, sin llegar a un consenso. Entre ellos, estudios con células HEK que sobre-expresan tau mutante asociada a la FTDP-17 no mostraron cambios en los niveles de XBP1s ni de p-eIF2 $\alpha$ <sup>193</sup>, mientras que con otro modelo similar se encontró un aumento en los niveles de BiP y de pPERK, que se revirtió al bloquear la expresión de tau<sup>191</sup>. En ratones transgénicos que sobre-expresan distintas versiones de tau mutante, la línea PS19 no mostró ningún indicio de activación de UPR (se midieron XBP1s, BiP, pPERK, p-eIF2 $\alpha$  y CHOP)<sup>193–195</sup>, mientras que las líneas 2541, pR5, JNPL3 y Tg4510 mostraron activación de la vía de PERK<sup>181,182,191,192,196</sup>. En cuanto a Dm existe un solo reporte, además de nuestro trabajo publicado, donde se indica que ocurre activación de la vía de IRE1 medido a través del reportero XBP1-EGFP en moscas que sobre-expresan tau silvestre y tau mutante<sup>197</sup>. En nuestro trabajo con moscas transgénicas que sobre-expresan niveles tóxicos de tau 2N4R silvestre se cuantificó el ARNm de XBP1s, los niveles de HSC3 por *Western blot* y se

evaluó la activación de la vía de IRE1 a través del reportero neuronal XBP1-EGFP, sin encontrar activación de dicha vía. Si bien es posible que las variantes de tau que utilizaron en el primer estudio sean más tóxicas que las que utilizamos nosotros, debe considerarse que el número máximo de núcleos EGFP positivos mostrados en dicho estudio fue inferior a cincuenta por sección de cerebro. Si se compara ese número con la cantidad total de neuronas en el cerebro de una mosca o con la cantidad de neuronas EGFP positivas en nuestro control *elav>Aβ*, queda claro que lo que se reporta en dicha publicación no es una respuesta masiva. Nuestro trabajo indica que, si existe activación de la vía IRE1-XBP1 por acumulación anormal de tau en las neuronas de Dm, es mínima en comparación con la inducida por Aβ y ADan.

#### Modulación de la vía de PERK en las moscas que sobre-expresan tau humana

Como se comentó en la sección anterior y en la introducción, la mayoría de la evidencia de activación de UPR en tauopatías implica a la vía de PERK. En Dm no existen muchas herramientas de modulación de expresión para estudiar esta vía. La mayoría de los efectores de p-PERK sufren modificaciones a nivel proteico, por lo cual sólo pueden utilizarse anticuerpos específicos. El único anticuerpo disponible contra p-eIF2α que se puede utilizar en Dm no permitió detectar claramente dicha proteína en *Western blots* a partir de extractos de proteínas de cerebros (estudios anteriores en el laboratorio). Otros efectores, como CHOP, no presentan homólogos conocidos en Dm. Es por eso que utilizamos una línea que expresa un ARNi contra ATF4, que disminuiría la activación de la vía, y un ARNi contra GADD34, que mantendría activa la vía al inhibir la defosforilación de p-eIF2α. Cuando co-expresamos cada ARNi con hTauHigh, que es la única que mostró toxicidad en el ensayo de geotaxis negativa, encontramos que la disminución de la expresión de ATF4 no indujo modificaciones en el fenotipo de las moscas que sobre-expresan tau, un resultado en apariencia contrario a lo esperado. Es posible que el ARNi de ATF4 no disminuya los niveles de manera considerable (debería realizarse una cuantificación de los niveles de mensajero que no pudimos hacer en este trabajo). Por otro lado, la disminución de los niveles de GADD34 rescató totalmente el fenotipo a los 3 días, aunque luego no se evidenciaron diferencias con el control *elav>hTauHigh*. Este resultado indicaría que la vía de PERK

tiene un rol protector a temprana edad cuando se sobre-expresa tau humana. De todas formas, es necesario un análisis más profundo, con herramientas que aún no han sido desarrolladas, para poder determinar si la vía de PERK efectivamente se encuentra activa en nuestras moscas.

La utilización de los modelos presentados en esta tesis nos permitió describir interacciones entre distintos factores celulares/metabólicos que puedan estar involucrados en la neurotoxicidad inducida por amiloides. La búsqueda de tantas respuestas que aún no se conocen en relación a las enfermedades neurodegenerativas debería realizarse desde modelos sencillos que permitan controles estrictos, para luego trabajar en modelos más complejos, como ratas o ratones. Si bien es cierto que ciertos procesos posiblemente no se repliquen entre el cerebro humano y el de mosca, las bases de la neurotoxicidad posiblemente se conservan, como se demuestra con cada estudio que evidencia la conservación de ciertas respuestas encontradas en humanos.

Nuestros resultados argumentan que A $\beta$  y ADan, a pesar de su falta de homología de secuencia, participan activando vías similares (entre ellas UPR), lo que podría promover la neurotoxicidad a través de sus propiedades amiloides compartidas. Sus roles en mecanismos de toxicidad diferentes, como podría ser el caso de tau (ya que no pudimos determinar si la toxicidad de ADan está mediada por tau en nuestro modelo, como se propone para A $\beta$ ) serían los que definen las características específicas de cada tipo de amiloide. Los resultados aquí presentados son mayormente de tipo descriptivo, sin embargo, pueden ser de utilidad para futuros estudios mecanísticos. Un mejor conocimiento de las bases moleculares de las demencias asociadas a amiloides permitirá, eventualmente, desarrollar estrategias terapéuticas específicas.

## CONCLUSIONES GENERALES

- La toxicidad del péptido ADan en SN de Dm es dosis dependiente, asociada posiblemente a la acumulación de especies no fibrilares.
- La toxicidad provocada por la expresión de tau humana en Dm es dependiente de la abundancia de proteína acumulada y estaría íntimamente asociada a la fosforilación de los sitios 262 y/o 356.
- Es posible que la relación neurotóxica entre ADan y tau difiera de la propuesta entre A $\beta$  y tau.
- La expresión tanto de ADan como de A $\beta$  induce la activación de UPR en neuronas del SNC desde edad temprana. La vía de IRE1/XBP1 tendría un rol protectoro frente a la toxicidad de ADan, aunque con menor eficacia que lo detectado con A $\beta$ .
- La sobre-expresión de tau no activa la vía de IRE1, mientras que es posible que la vía de PERK sí se active y que tenga un rol protectoro a temprana edad.

# BIBLIOGRAFÍA

1. Katsnelson, A., De Strooper, B. & Zoghbi, H. Y. Neurodegeneration: From cellular concepts to clinical applications. *Sci. Transl. Med.* **8**, 1–6 (2016).
2. Morrison, J. H. & Hof, P. R. Life and Death of Neurons in the Aging Brain. *Science*. **278**, 412–419 (1997).
3. Bertram, L. & Tanzi, R. E. The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *J. Clin. Invest.* **115**, 1449–1457 (2005).
4. Sunde, M. *et al.* Common Core Structure of Amyloid Fibrils by Synchrotron X-ray Diffraction. *J. Mol. Biol.* **273**, 729–739(11) (1997).
5. Greenwald, J., Kwiatkowski, W. & Riek, R. Peptide Amyloids in the Origin of Life. *J. Mol. Biol.* **430**, 3735–3750 (2018).
6. Puchtler, H., Sweat, F. & Levine, M. On the Binding of Congo Red By Amyloid. *J. Histochem. Cytochem.* **10**, 355–364 (1962).
7. LeVine, H. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease b-amyloid peptides: Detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci.* **2**, 404–410 (1993).
8. Jarrett, J. & Lansbury, P. T. J. Seeding 'one-dimensional crystallization' of amyloid: A pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* **73**, 1055–1058 (1993).
9. Kaye, R. & Lasagna-Reeves, C. A. Molecular Mechanisms of Amyloid Oligomers Toxicity. *J. Alzheimer's Dis.* **33**, S67–S78 (2013).
10. Ferreira, S. T., Vieira, M. N. N. & De Felice, F. G. Soluble protein oligomers as emerging toxins in Alzheimer's and other amyloid diseases. *IUBMB Life* **59**, 332–345 (2007).
11. Choi, M. L. & Gandhi, S. Crucial role of protein oligomerization in the pathogenesis of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *FEBS J.* **285**, 3631–3644 (2018).
12. Dias, A. *et al.* 3.1 Dementia. in *Neurological disorders: public health challenges* (eds. Aarli, J. A. *et al.*) 42–55 (World Health Organization, 2006). doi:10.1001/archneurol.2007.19
13. Patterson, C. *World Alzheimer Report 2018. The state of the art of dementia research: New frontiers.* (Alzheimer's Disease International, 2018).
14. Stelzmann, R. A., Schnitzlein, H. N. & Murtagh, F. R. An English translation of Alzheimer's 1907 Paper , "Über eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde ". *Clin. Anat.* **8**, 429–431 (1995).
15. Bird, T. D. Alzheimer Disease Overview. in *Adam M. P., Ardingier H. H., Pagon R. A., et al., editors.* (GeneReviews [Internet], 1998 [Updated 2018]).
16. Ghiso, J. & Frangione, B. Amyloidosis and Alzheimer's disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**, 1539–1551 (2002).
17. Perl, D. P. Neuropathology of Alzheimer's Disease. *Mt Sinai J Med* **77**, 32–42 (2010).
18. Lehericy, S., Marjanska, M., Mesrob, L., Sarazin, M. & Kinkingnehun, S. Magnetic resonance imaging of Alzheimer's disease. *Eur. Radiol.* **17**, 347–362 (2007).

19. Maarouf, C. L. *et al.* Alzheimer ' s Disease and Non-Demented High Pathology Control Nonagenarians : Comparing and Contrasting the Biochemistry of Cognitively Successful Aging. *6*, 1–17 (2011).
20. Baumgart, M. *et al.* Summary of the evidence on modifiable risk factors for cognitive decline and dementia : A population-based perspective. *Alzheimer's Dement.* **11**, 718–726 (2015).
21. Corder, E. H. *et al.* Gene Dose of Apolipoprotein E Type 4 Allele and the Risk of Alzheimer's Disease in Late Onset Families. *Science.* **261**, 921–923 (1993).
22. Mrak, R. E. & Griffin, W. S. T. Trisomy 21 and the Brain Robert. *J Neuropathol Exp Neurol* **63**, 679–685 (2004).
23. Zhang Y, Thompson R, Zhang H, X. H. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol. Brain* **4** (2011).
24. Chow, V. W., Mattson, M. P., Wong, P. C. & Gleichmann, M. An Overview of APP Processing Enzymes and Products. *Neuromolecular Med.* **12**, 1–12 (2010).
25. Zheng, H. & Koo, E. H. The amyloid precursor protein: Beyond amyloid. *Mol. Neurodegener.* **1**, 1–12 (2006).
26. Coronel, R. *et al.* Role of Amyloid Precursor Protein (APP) and Its Derivatives in the Biology and Cell Fate Specification of Neural Stem Cells. *Mol. Neurobiol.* **55**, 7107–7117 (2018).
27. Pająk, B., Kania, E. & Orzechowski, A. Killing Me Softly: Connotations to Unfolded Protein Response and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 1805304 (2016).
28. Hardy, J. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science.* **297**, 353–356 (2002).
29. Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E. & Hyman, B. T. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **1**, 1–23 (2011).
30. Hardy, J. & Higgins, G. Alzheimer' s Disease : The Amyloid Cascade Hypothesis. *Science.* **256**, 184–185 (1992).
31. Nagy, Z. *et al.* Relative Roles of Plaques and Tangles in the Dementia of Alzheimer's Disease: Correlations Using Three Sets of Neuropathological Criteria. *Dementia* **6**, 21–31 (1995).
32. Reisa Sperling, M.D., Elizabeth Mormino, Ph.D., and Keith Johnson, M. D. The evolution of preclinical Alzheimer's disease: Implications for prevention trials. *Neuron* **84**, 608–622 (2014).
33. Plant G. & Esiri M. M. Familial cerebral amyloid angiopathies. in *The Neuropathology of Dementia*, (eds Esiri M. M., Morris J. H.) 260–276 (Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.K. 1997).
34. Holton, J. L. *et al.* Familial Danish dementia: A novel form of cerebral amyloidosis associated with deposition of both amyloid-Dan and amyloid-Beta. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **61**, 254–267 (2002).
35. Vidal, R. *et al.* A decamer duplication in the 3' region of the BRI gene originates an amyloid peptide that is associated with dementia in a Danish kindred. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 4920–4925 (2000).

36. Pickford, F., Onstead, L., Camacho-Prihar, C., Hardy, J. & McGowan, E. Expression of mBRI 2 in mice. *Neurosci. Lett.* **338**, 95–98 (2003).
37. Sánchez-Pulido, L., Devos, D. & Valencia, A. BRICHOS: A conserved domain in proteins associated with dementia, respiratory distress and cancer. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 329–332 (2002).
38. Matsuda, S., Giliberto, L., Matsuda, Y., McGowan, E. M. & D'Adamio, L. BRI2 Inhibits Amyloid  $\beta$ -Peptide Precursor Protein Processing by Interfering with the Docking of Secretases to the Substrate. *J. Neurosci.* **28**, 8668–8676 (2008).
39. Kim, S. H., Creemers, J. W. M., Chu, S., Thinakaran, G. & Sisodia, S. S. Proteolytic processing of familial British dementia-associated BRI variants: Evidence for enhanced intracellular accumulation of amyloidogenic peptides. *J. Biol. Chem.* **277**, 1872–1877 (2002).
40. Choi, S. Il, Vidal, R., Frangione, B. & Levy, E. Axonal transport of British and Danish amyloid peptides via secretory vesicles. *FASEB J.* **18**, 373–375 (2003).
41. Garringer, H. J., Murrell, J., D'Adamio, L., Ghetti, B. & Vidal, R. Modeling familial British and Danish dementia. *Brain Struct. Funct.* **214**, 235–244 (2010).
42. Ghiso, J. *et al.* A stop-codon mutation in the BRI gene associated with familial British dementia. *Nature* **399**, 776–781 (1999).
43. Rostagno, A. *et al.* Chromosome 13 dementias. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 1814–1825 (2005).
44. Todd, K., Ghiso, J. & Rostagno, A. Oxidative stress and mitochondria-mediated cell death mechanisms triggered by the familial Danish dementia ADan amyloid. *Neurobiol Dis* **85**, 130–143 (2016).
45. Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. & Kirschner, M. W. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **72**, 1858–1862 (1975).
46. Goedert, M., Spillantini, M. G., Jakes, R., Rutherford, D. & Crowther, R. A. Multiple Isoforms of Human Microtubule-Associated Protein Tau: Sequences and localization in Neurofibrillary Tangles of Alzheimer's Disease. *Neuron* **3**, 519–526 (1989).
47. Lee, V. M. Y., Goedert, M. & Trojanowski, J. Q. Neurodegenerative Tauopathies. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 1121–1159 (2001).
48. Goedert, M., Spillantini, M. G., Potier, M. C., Ulrich, J. & Crowther, R. A. Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J.* **8**, 393–399 (1989).
49. Goedert, M. & Jakes, R. Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J.* **9**, 4225–4230 (1990).
50. Brandt, R., Léger, J. & Lee, G. Interaction of Tau with the Neural Plasma Membrane Mediated by Tau's Amino-terminal Projection Domain. *J. Cell Biol.* **131**, 1327–1340 (1995).
51. Chen, J., Kanai, Y., Cowan, N. J. & Hirokawa, N. Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature* **360**, 674–677 (1992).

52. Kidd, M. Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* **197**, 192–193 (1963).
53. Iqbal, K. *et al.* Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim. Biophys. Acta* **1739**, 198–210 (2005).
54. Mandelkow, E., Von-Bergen, M., Biernat, J. & Mandelkow, E.-M. Structural Principles of Tau and the Paired Helical Filaments of Alzheimer's Disease. *Brain Pathol.* **17**, 83–90 (2007).
55. Wiue, H., Drewes, G., Biernat, J., Mandelkow, E.-M. & Mandelkow, E. Alzheimer-like Paired Helical Filaments and Antiparallel Dimers Formed from Microtubule-associated Protein Tau In Vitro. *J. Cell Biol.* **118**, 573–584 (1992).
56. Buèe, L., Bussière, T., Buèe-Scherrer, V., Delacourte, A. & Hof, P. R. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Rev.* **33**, 95–130 (2000).
57. Biernat, J., Gustke, N., Drewes, C. & Mandelkow, E. Phosphorylation of Ser262 Strongly Reduces Binding of Tau to Microtubules: Distinction between PHF-like Immunoreactivity and Microtubule Binding. *Neuron* **11**, 153–163 (1993).
58. Hasegawa, M. *et al.* Protein sequence and mass spectrometric analyses of tau in the Alzheimer's disease brain. *J. Biol. Chem.* **267**, 17047–17054 (1992).
59. Hanger, D. P., Anderton, B. H. & Noble, W. Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Cell* **15**, 112–119 (2009).
60. Martin, L. *et al.* Tau protein phosphatases in Alzheimer's disease: The leading role of PP2A. *Ageing Res. Rev.* **12**, 39–49 (2013).
61. Wilhelmsen, K. C., Lynch, T., Pavlou, E., Higgins, M. & Nygaard, T. G. Localization of Disinhibition-Dementia-Parkinsonism- Amyotrophy Complex to 17q21-22. *Am. J. Hum. Genet.* **55**, 1159–1165 (1994).
62. Yen, S.-H., Hutton, M., Deture, M., Ko, L.-W. & Nacharaju, P. Fibrillogenesis of Tau: Insights from Tau Missense Mutations in FTDP-17. *Brian Pathol.* **9**, 695–705 (1999).
63. Rapoport, M., Dawson, H. N., Binder, L. I., Vitek, M. P. & Ferreira, A. Tau is essential to  $\beta$ -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 6364–6369 (2002).
64. Jin, M. *et al.* Soluble amyloid  $\beta$ -protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 5819–5824 (2011).
65. Pennanen, L. & Götz, J. Different tau epitopes define A $\beta$ 42-mediated tau insolubility. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **337**, 1097–1101 (2005).
66. Ferrari, A., Hoerndli, F., Baechi, T., Nitsch, R. M. & Götz, J. B-Amyloid Induces Paired Helical Filament-Like Tau Filaments in Tissue Culture. *J. Biol. Chem.* **278**, 40162–40168 (2003).
67. Bloom, G. S. Amyloid- $\beta$  and Tau. The Trigger and Bullet in Alzheimer Disease Pathogenesis. *JAMA Neurol.* **71**, 505–508 (2014).
68. Youssef, S. A. *et al.* Pathology of the Aging Brain in Domestic and Laboratory Animals , and Animal Models of Human Neurodegenerative Diseases. *Vet. Pathol.* **53**, 327–348 (2016).

69. Hurley, M. J. *et al.* The long-lived Octodon degus as a rodent drug discovery model for Alzheimer's and other age-related diseases. *Pharmacol. Ther.* **188**, 36–44 (2018).
70. Newman, M., Ebrahimie, E. & Lardelli, M. Using the zebrafish model for Alzheimer's disease research. *Front. Genet.* **5**, 1–10 (2014).
71. Schaeffer, E. L., Figueiró, M. & Gattaz, W. F. Insights into Alzheimer disease pathogenesis from studies in transgenic animal models. *Clinics* **66**, 45–54 (2011).
72. Carmo, S. Do & Cuello, A. C. Modeling Alzheimer's disease in transgenic rats. *Mol. Neurodegener.* **8**, 1–11 (2013).
73. Elder, G. A., Gama Sosa, M. A. & De Gasperi, R. Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Mt. Sinai J. Med.* **77**, 69–81 (2010).
74. Lewis, J. *et al.* Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science.* **293**, 1487–1491 (2001).
75. Oddo, S. *et al.* Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles\_intracellular A $\beta$  and synaptic dysfunction. *Neuron* **39**, 409–421 (2003).
76. Roberson, E. D. *et al.* Reducing Endogenous Tau Ameliorates Amyloid b-Induced Deficits in an Alzheimer's Disease Mouse Model. *Science.* **316**, 750–754 (2007).
77. SantaCruz, K. *et al.* Tau Suppression in a Neurodegenerative Mouse Model Improves Memory Function. *Science.* **309**, 476–481 (2005).
78. Götz, J., Chen, F., Van Dorpe, J. & Nitsch, R. M. Formation of neurofibrillary tangles in P301L tau transgenic mice induced by A $\beta$ 42 fibrils. *Science.* **293**, 1491–1495 (2001).
79. David, D. C. *et al.*  $\beta$ -amyloid treatment of two complementary P301L tau-expressing Alzheimer's disease models reveals similar deregulated cellular processes. *Proteomics* **6**, 6566–6577 (2006).
80. Sharma, N., Khurana, N. & Muthuraman, A. Lower vertebrate and invertebrate models of Alzheimer's disease – A review. *Eur. J. Pharmacol.* **815**, 312–323 (2017).
81. Calahorra, F. & Ruiz-Rubio, M. *Caenorhabditis elegans* as an experimental tool for the study of complex neurological diseases: Parkinson's disease, Alzheimer's disease and autism spectrum disorder. *Invertebr. Neurosci.* **11**, 73–83 (2011).
82. Link, C. D. Invertebrate models of Alzheimer's disease. *Genes, Brain Behav.* **4**, 147–156 (2005).
83. Luo, L., Tully, T. & White, K. Human amyloid precursor protein ameliorates behavioral deficit of flies deleted for Appl gene. *Neuron* **9**, 595–605 (1992).
84. Carmine-Simmen, K. *et al.* Neurotoxic effects induced by the *Drosophila* amyloid- $\beta$  peptide suggest a conserved toxic function. *Neurobiol. Dis.* **33**, 274–281 (2009).
85. Heidary, G. & Fortini, M. E. Identification and characterization of the *Drosophila* tau homolog. *Mech. Dev.* **108**, 171–178 (2001).
86. Chen, X. *et al.* Study of tauopathies by comparing *Drosophila* and human tau in

- Drosophila. *Cell Tissue Res.* **329**, 169–178 (2007).
87. Bouleau, S. & Tricoire, H. Drosophila Models of Alzheimer's Disease: Advances, limits and perspectives. *J. Alzheimer's Dis.* **45**, 1015–1038 (2015).
  88. Folwell, J. *et al.* A $\beta$  exacerbates the neuronal dysfunction caused by human tau expression in a Drosophila model of Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* **223**, 401–409 (2010).
  89. Hyman, B. T. *et al.* Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo. *Nat. Cell Biol.* **9**, 139–148 (2007).
  90. Iijima, K., Gatt, A. & Iijima-Ando, K. Tau Ser262 phosphorylation is critical for A $\beta$ 42-induced tau toxicity in a transgenic Drosophila model of Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 2947–2957 (2010).
  91. Gibson, G. *et al.* Oligomerization and neurotoxicity of the amyloid ADan peptide implicated in familial Danish dementia. *J. Neurochem.* **88**, 281–290 (2004).
  92. Auten, B. *et al.* Properties of Neurotoxic Peptides Related to the Bri Gene. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 557–559 (2002).
  93. Vidal, R., Barbeito, A. G., Miravalle, L. & Ghetti, B. Cerebral amyloid angiopathy and parenchymal amyloid deposition in transgenic mice expressing the Danish mutant form of human BRI2. *Brain Pathol.* **19**, 58–68 (2009).
  94. Coomaraswamy, J. *et al.* Modeling familial Danish dementia in mice supports the concept of the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 7969–7974 (2010).
  95. Giliberto, L., Matsuda, S., Vidal, R. & D'Adamio, L. Generation and initial characterization of FDD knock in mice. *PLoS One* **4**, 1–8 (2009).
  96. Tamayev, R., Matsuda, S., Fa, M., Arancio, O. & D'Adamio, L. Danish dementia mice suggest that loss of function and not the amyloid cascade causes synaptic plasticity and memory deficits. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 20822–20827 (2010).
  97. Garringer, H. J. *et al.* Increased Tau Phosphorylation and Tau Truncation, and Decreased Synaptophysin Levels in Mutant BRI2/Tau Transgenic Mice. *PLoS One* **8**, e56426 (2013).
  98. Ghetti, B. *et al.* Abundant tau filaments and neurodegeneration in mice transgenic for human P301S tau. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **61**, 484 (2002).
  99. Marcora, M. S. *et al.* Amyloid peptides ABri and ADan show differential neurotoxicity in transgenic Drosophila models of familial British and Danish dementia. *Mol. Neurodegener.* **9**, 1–14 (2014).
  100. Hughes, D. & Mallucci, G. R. The unfolded protein response in neurodegenerative disorders – therapeutic modulation of the PERK pathway. *FEBS J.* **286**, 342–355 (2019).
  101. Gething, M.-J. Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Cell Dev. Biol.* **10**, 465–472 (1999).
  102. Morris, G. *et al.* The Endoplasmic Reticulum Stress Response in Neuroprogressive Diseases: Emerging Pathophysiological Role and Translational Implications. *Mol. Neurobiol.* **55**, 8765–8787 (2018).
  103. Coelho, D. S. & Domingos, P. M. Physiological roles of regulated Ire1 dependent decay. *Front. Genet.* **5**, 1–6 (2014).

104. Cui, W., Li, J., Ron, D. & Sha, B. The structure of the PERK kinase domain suggests the mechanism for its activation. *Acta Crystallogr. Sect. D, Biol. Crystallogr.* **D67**, 423–428 (2011).
105. Dever, T. E. Gene-Specific Regulation by General Translation Factors. *Cell* **108**, 545–556 (2002).
106. Pitale, P. M., Gorbatyuk, O. & Gorbatyuk, M. Neurodegeneration: Keeping ATF4 on a Tight Leash. *Frontiers Cell. Neurosci.* **11**, 1–8 (2017).
107. Novoa, I., Zeng, H., Harding, H. P. & Ron, D. Feedback Inhibition of the Unfolded Protein Response by GADD34-mediated Dephosphorylation of eIF2a. *J. Cell Biol.* **153**, 1011–1021 (2001).
108. Wang, M. & Kaufman, R. J. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature* **529**, 326–335 (2016).
109. Yamamoto, K. *et al.* Transcriptional Induction of Mammalian ER Quality Control Proteins Is Mediated by Single or Combined Action of ATF6 a and XBP1. *Dev. Cell* **13**, 365–376 (2007).
110. Scheper, W. & Hoozemans, J. J. M. The unfolded protein response in neurodegenerative diseases: a neuropathological perspective. *Acta Neuropathol.* **130**, 315–331 (2015).
111. Hoozemans, J. J. M. *et al.* The Unfolded Protein Response Is Activated in Pretangle Neurons in Alzheimer's Disease Hippocampus. *Am. J. Pathol.* **174**, 1241–1251 (2009).
112. Hoozemans, J. J. M. *et al.* The unfolded protein response is activated in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **110**, 165–172 (2005).
113. Nijholt, D. A. T., Haastert, E. S. Van, Rozemuller, A. J. M., Scheper, W. & Hoozemans, J. J. M. The unfolded protein response is associated with early tau pathology in the hippocampus of tauopathies. *J. Pathol.* **226**, 693–702 (2012).
114. Unterberger, U. *et al.* Endoplasmic Reticulum Stress Features Are Prominent in Alzheimer Disease but Not in Prion Diseases In Vivo. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **65**, 348–357 (2006).
115. Ilieva, E. V. *et al.* Mitochondrial Dysfunction and Oxidative and Endoplasmic Reticulum Stress in Argyrophilic Grain Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **70**, 253–263 (2011).
116. Santos, L. E. & Ferreira, S. T. Crosstalk between endoplasmic reticulum stress and brain inflammation in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* **136**, 350–360 (2018).
117. Bocai, N. I., Marcora, M. S., Belfiori-Carrasco, L. F., Morelli, L. & Castaño, E. M. Endoplasmic Reticulum Stress in Tauopathies: Contrasting Human Brain Pathology with Cellular and Animal Models. *J. Alzheimer's Dis.* **68**, 439–458 (2019). doi:10.3233/JAD-160673
118. Rozpędek, W., Markiewicz, Ł., Diehl, J. A., Pytel, D. & Majsterek, I. Unfolded Protein Response and PERK Kinase as a New Therapeutic Target in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Curr. Med. Chem.* **22**, 3169–3184 (2015).
119. Gerakis, Y. & Hetz, C. Emerging roles of ER stress in the etiology and pathogenesis of Alzheimer's disease. *FEBS J.* **285**, 995–1011 (2018).

120. Morgan, T. H. Sex Limited Inheritance in *Drosophila*. *Science*. **32**, 120 LP-122 (1910).
121. Adams, M. D. *et al.* The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. **287**, 2185–2196 (2000).
122. Hales, K. G., Korey, C. A., Larracuente, A. M. & Roberts, D. M. Genetics on the Fly: A Primer on the *Drosophila*. *Genetics* **201**, 815–842 (2015).
123. Greenspan, R. J. & Dierick, H. A. ‘Am not I a fly like thee?’ From genes in fruit flies to behavior in humans. *Hum. Mol. Genet.* **13**, R267–R273 (2004).
124. Reiter, L. T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M. & Bier, E. A Systematic Analysis of Human Disease-Associated Gene Sequences In *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* **11**, 1114–1125 (2001).
125. Fischer, J. A., Giniger, E., Maniatis, T. & Ptashne, M. GAL4 activates transcription in *Drosophila*. *Nature* **332**, 853–856 (1988).
126. Walker, J. M. *Drosophila, Methods and Protocols*. (Springer Nature, 2016).
127. Nilson, T. L., Sinclair, B. J. & Roberts, S. P. The effects of carbon dioxide anesthesia and anoxia on rapid cold-hardening and chill coma recovery in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* **52**, 1027–1033 (2006).
128. Colinet, H. & Renault, D. Metabolic effects of CO<sub>2</sub> anaesthesia in *Drosophila melanogaster*. *Biol. Lett.* **8**, 1050–1054 (2012).
129. Macmillan, H. A., Nørgård, M., Maclean, H. J., Overgaard, J. & Williams, C. J. A. A critical test of *Drosophila* anaesthetics : Isoflurane and sevoflurane are benign alternatives to cold and CO<sub>2</sub> A critical test of *Drosophila* anaesthetics : Isoflurane and sevoflurane are benign alternatives to cold and CO<sub>2</sub>. *J. Insect Physiol.* **101**, 97–106 (2017).
130. Marcora, M. S. *et al.* Amyloid peptides ABri and ADan show differential neurotoxicity in transgenic *Drosophila* models of familial British and Danish dementia. *Mol neurodegener.* **9** (2014).
131. Finelli, A., Kelkar, A., Song, H.-J., Yang, H. & Konsolaki, M. A model for studying Alzheimer’s A $\beta$ 42-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Neurosci.* **26**, 365–375 (2004).
132. Ryoo, H. D., Domingos, M., Kang, M. & Steller, H. Unfolded protein response in a *Drosophila* model for retinal degeneration. *EMBO J.* **26**, 242–252 (2007).
133. Casas-Tinto, S. *et al.* The ER stress factor XBP1s prevents amyloid- $\beta$  neurotoxicity. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 2144–2160 (2011).
134. Doerflinger, H., Benton, R., Shulman, J. M. & Johnston, D. S. The role of PAR-1 in regulating the polarised microtubule cytoskeleton in the *Drosophila* follicular epithelium. *Development* **130**, 3965–3975 (2003). doi:10.1242/dev.00616
135. Gargano, J. W., Martin, I., Bhandari, P. & Grotewiel, M. S. Rapid iterative negative geotaxis (RING): a new method for assessing age-related locomotor decline in *Drosophila*. *Exp. Gerontol.* **40**, 386–395 (2005).
136. Yao, K. & Samson, M. A Prototype for Neuronal-Specific RNA Binding Protein Gene Family That Is Conserved in Flies and Humans. *J Neurobiol.* **24**, 723-739 (1992).
137. Robinow, S. & Whitet, K. Characterization and Spatial Distribution of the ELAV

- Protein During *Drosophila melanogaster* Development. *J neurobiol.* **22**, 443-461 (1988).
138. Berger, C., Renner, S., Lu, K. & Technau, G. M. The Commonly Used Marker ELAV Is Transiently Expressed in Neuroblasts and Glial Cells in the *Drosophila* Embryonic CNS. *Dev. Dyn.* **236**, 3562–3568 (2007).
  139. Casas-Tintó, S., Arnés, M. & Ferrús, A. *Drosophila* enhancer-Gal4 lines show ectopic expression during development. *R. Soc. Open Sci.* **4**, 170039 (2017).
  140. Bischof, J., Maeda, R. K., Hediger, M., Karch, F. & Basler, K. An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific  $\phi$ C31 integrases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 3312–3317 (2007).
  141. Jonson, M., Pokrzywa, M., Starkenberg, A., Hammarstrom, P. & Thor, S. Systematic A $\beta$  analysis in *drosophila* reveals high toxicity for the 1-42, 3-42 and 11-42 peptides, and emphasizes N- and C-terminal residues. *PLoS One* **10**, e0133272 (2015).
  142. Gargano Warner, J., Martin, I., Bhandari, P. & Grotewiel, M. S. Rapid iterative negative geotaxis (RING): a new method for assessing age-related locomotor decline in *Drosophila*. *Exp. Gerontol.* **40**, 386–395 (2005).
  143. Loehlin, D. W. & Carroll, S. B. Expression of tandem gene duplicates is often greater than twofold. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 5988–5992 (2016).
  144. Rorth, P. A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 12418–12422 (1996).
  145. Engels, W. R. & Preston, C. R. Identifying P Factors in *Drosophila* by Means of Chromosome Breakage Hotspots. *Cell* **26**, 421–428 (1981).
  146. Hummel, T. & Klämbt, C. P-Element Mutagenesis. in *Drosophila. Methods in Molecular Biology* (ed. Dahmann, C.) 97–117 (Humana Press, 2008).
  147. Preston, C. R., Svedt, J. A. & Engels, W. R. Duplications and Deletions Associated With P-Induced *n* *Drosophila* Male Recombination in *Drosophila*. *Genetics* **144**, 1623–1638 (1996).
  148. Bolkan, B. J. & Kretzschmar, D. Loss of Tau Results in Defects in Photoreceptor Development and Progressive Neuronal Degeneration in *Drosophila*. *Dev neurobiol.* **74**, 1210–1225 (2014). doi:10.1002/dneu.22199
  149. Burnouf, S. *et al.* Deletion of endogenous Tau proteins is not detrimental in *Drosophila*. *Sci. Rep.* **6**, 1–11 (2016).
  150. Marcora, M. S., Belfiori-Carrasco, L. F., Bocai, N. I., Morelli, L. & Castaño, E. M. Amyloid- $\beta$ 42 clearance and neuroprotection mediated by X-box binding protein 1 signaling decline with aging in the *Drosophila* brain. *Neurobiol. Aging* **60**, 57–70 (2017).
  151. Kosmidis, S., Grammenoudi, S., Papanikolopoulou, K. & Skoulakis, E. M. C. Differential Effects of Tau on the Integrity and Function of Neurons Essential for Learning in *Drosophila*. *J. Neurosci.* **30**, 464–477 (2010).
  152. Nishimura, I., Yang, Y. & Lu, B. PAR-1 kinase plays an initiator role in a temporally ordered phosphorylation process that confers tau toxicity in *Drosophila*. *Cell* **116**, 671–682 (2004).
  153. Tamamoto, K., Yoshida, H., Kokame, K., Kaufman, R. J. & Mori, K. Differential

- contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmatic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II. *J. Biochem.* **136**, 343–350 (2004).
154. Luo, S., Mao, C., Lee, B. & Lee, A. S. GRP78/BiP Is Required for Cell Proliferation and Protecting the Inner Cell Mass from Apoptosis during Early Mouse Embryonic Development. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 5688–5697 (2006).
  155. Jansen, W. J. *et al.* Prevalence of Cerebral Amyloid Pathology in Persons Without Dementia: A Meta-analysis. *Jama* **313**, 1924–1938 (2015).
  156. Perez-Nievas, B. G. *et al.* Dissecting phenotypic traits linked to human resilience to Alzheimer's pathology. *Brain* **136**, 2510–2526 (2013).
  157. Mucke, L. *et al.* High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J. Neurosci.* **20**, 4050–8 (2000).
  158. Iijima, K. *et al.* A $\beta$ 42 mutants with different aggregation profiles induce distinct pathologies in *Drosophila*. *PLoS One* **3**, e1703 (2008).
  159. Rogers, I. *et al.* Ageing increases vulnerability to A $\beta$ 42 toxicity in *Drosophila*. *PLoS One* **7**, e40569 (2012).
  160. Surolia, I., Reddy, G. B. & Sinha, S. Hierarchy and the mechanism of fibril formation in ADan peptides. *J. Neurochem.* **99**, 537–548 (2006).
  161. Kirkitadze, M. D., Bitan, G. & Teplow, D. B. Paradigm shifts in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders: The emerging role of oligomeric assemblies. *J. Neurosci. Res.* **69**, 567–577 (2002).
  162. Chung, C. G., Lee, H. & Lee, S. B. Mechanisms of protein toxicity in neurodegenerative diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* **75**, 3159–3180 (2018).
  163. Kurusu, M. *et al.* A Screen of Cell-Surface Molecules Identifies Leucine-Rich Repeat Proteins as Key Mediators of Synaptic Target Selection. *Neuron* **59**, 972–985 (2008).
  164. Fulga, T. A. *et al.* A transgenic resource for conditional competitive inhibition of conserved *Drosophila* microRNAs. *Nat. Commun.* **6**, 1–10 (2015).
  165. Hakeda-Suzuki, S. *et al.* Rac function and regulation during *Drosophila* development. *Nature* **416**, 438–442 (2002).
  166. Saadaoui, M. *et al.* Loss of the canonical spindle orientation function in the Pins/LGN homolog AGS3. *EMBO Rep.* **18**, 1509–1520 (2017).
  167. Yoon, E. J., Jeong, Y. T., Lee, J. E., Moon, S. J. & Kim, C. H. Tubby domain superfamily protein is required for the formation of the 7S SNARE complex in *Drosophila*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **482**, 814–820 (2017).
  168. Pinto, B. S. & Orr-Weaver, T. L. *Drosophila* protein phosphatases 2A B' Wdb and Wrd regulate meiotic centromere localization and function of the MEI-S332 Shugoshin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 12988–12993 (2017).
  169. Koss, D. J., Dubini, M., Buchanan, H., Hull, C. & Platt, B. Distinctive temporal profiles of detergent-soluble and -insoluble tau and A $\beta$  species in human Alzheimer's disease. *Brain Res.* **1699**, 121–134 (2018).
  170. Sydow, A. *et al.* Tau-Induced Defects in Synaptic Plasticity, Learning, and Memory Are Reversible in Transgenic Mice after Switching Off the Toxic Tau

- Mutant. *J. Neurosci.* **31**, 2511–2525 (2011).
171. Ballatore, C., Lee, V. M. Y. & Trojanowski, J. Q. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 663–672 (2007).
  172. Arendt, T., Stieler, J. & Holzer, M. Brain hypometabolism triggers PHF-like phosphorylation of tau, a major hallmark of Alzheimer's disease pathology. *J. Neural Transm.* **122**, 531–539 (2015).
  173. Whittington, R. A., Bretteville, A., Dickler, M. F. & Planel, E. Anesthesia and Tau Pathology. *Prog. neuro-psychopharmacology Biol. psychiatry.* **47**, 147–155 (2013).
  174. Mazanetz, M. P. & Fischer, P. M. Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 464–479 (2007).
  175. Guo, J. L. & Lee, V. M. Y. Seeding of normal tau by pathological tau conformers drives pathogenesis of Alzheimer-like tangles. *J. Biol. Chem.* **286**, 15317–15331 (2011).
  176. Lauckner, J., Frey, P. & Geula, C. Comparative distribution of tau phosphorylated at Ser262 in pre-tangles and tangles. *Neurobiol. Aging* **24**, 767–776 (2003).
  177. Papanikolopoulou, K. & Skoulakis, E. M. C. Temporally distinct phosphorylations differentiate tau-dependent learning deficits and premature mortality in *Drosophila*. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 2065–2077 (2015).
  178. Khandelwal, P. J., Dumanis, S. B., Herman, A. M., Rebeck, G. W. & Moussa, C. E.-H. Wild type and P301L mutant Tau promote neuro-inflammation and  $\alpha$ -Synuclein accumulation in lentiviral gene delivery models. *Mol. Cell. Neurosci.* **49**, 44–53 (2012).
  179. Alonso, A. D. *et al.* Phosphorylation of Tau at Thr212, Thr231, and Ser262 combined causes neurodegeneration. *J. Biol. Chem.* **285**, 30851–30860 (2010).
  180. Duran-Aniotz, C. *et al.* IRE1 signaling exacerbates Alzheimer's disease pathogenesis. *Acta Neuropathol.* **134**, 489–506 (2017).
  181. Radford, H., Moreno, J. A., Verity, N., Halliday, M. & Mallucci, G. R. PERK inhibition prevents tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of frontotemporal dementia. *Acta Neuropathol.* **130**, 633–642 (2015).
  182. Ho, Y. S. *et al.* Endoplasmic reticulum stress induces tau pathology and forms a vicious cycle: Implication in Alzheimer's disease pathogenesis. *J. Alzheimer's Dis.* **28**, 839–854 (2014).
  183. Erguler, K., Pieri, M. & Deltas, C. A mathematical model of the unfolded protein stress response reveals the decision mechanism for recovery, adaptation and apoptosis. *BMC Syst. Biol.* **7**, 1–18 (2013).
  184. Safra, M., Ben-Hamo, S., Kenyon, C. & Henis-Korenblit, S. The ire-1 ER stress-response pathway is required for normal secretory-protein metabolism in *C. elegans*. *J. Cell Sci.* **126**, 4136–4146 (2013).
  185. Sekiya, M. *et al.* EDEM function in ERAD protects against chronic ER proteinopathy and age-related physiological decline in *Drosophila*. *Dev. Cell* **41**, 652–664 (2017).

186. Sado, M. *et al.* Protective effect against Parkinson's disease-related insults through the activation of XBP1. *Brain Res.* **1257**, 16–24 (2009).
187. Cissé, M., Duplan, E. & Checler, F. The Transcription Factor XBP1 in Memory and Cognition: implications in Alzheimer's Disease. *Mol. Med.* **22**, 905–917 (2016).
188. Kaneko, M. *et al.* Loss of HRD1-Mediated Protein Degradation Causes Amyloid Precursor Protein Accumulation and Amyloid- Generation. *J. Neurosci.* **30**, 3924–3932 (2010).
189. Gorbatyuk, M. & Gorbatyuk, O. The Molecular Chaperone GRP78/BiP as a Therapeutic Target for Neurodegenerative Disorders: A Mini Review. *Journal Genet. Syndr. gene Ther.* **4**, 128 (2013).
190. Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P. & Ron, D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* **2**, 326–332 (2000).
191. Abisambra, J. F. *et al.* Tau Accumulation Activates the Unfolded Protein Response by Impairing Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation. *J. Neurosci.* **33**, 9498–9507 (2013).
192. Köhler, C., Dinekov, M. & Götz, J. Granulovacuolar degeneration and unfolded protein response in mouse models of tauopathy and A $\beta$  amyloidosis. *Neurobiol. Dis.* **71**, 169–179 (2014).
193. Spatara, M. L. & Robinson, A. S. Transgenic Mouse and Cell Culture Models Demonstrate a Lack of Mechanistic Connection Between Endoplasmic Reticulum Stress and Tau Dysfunction. *J. Neurosci. Res.* **88**, 1951–1961 (2010).
194. Kim, E., Sakata, K. & Liao, F. F. Bidirectional interplay of HSF1 degradation and UPR activation promotes tau hyperphosphorylation. *PLoS Genet.* **13**, e1006849 (2017).
195. Briggs, D. I. *et al.* Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Learning and Memory Impairment and Alzheimer's Disease-Like Neuropathology in the PS19 and APP Swe Mouse Models of Tauopathy and Amyloidosis. *eNeuro* **4**, 1–25 (2017).
196. Bruch, J. *et al.* PERK activation mitigates tau pathology in vitro and in vivo . *EMBO Mol. Med.* **9**, 371–384 (2017).
197. Loewen, C. A. & Feany, M. B. The unfolded protein response protects from tau neurotoxicity in vivo. *PLoS One* **5**, e13084 (2010).

## **La colina de la vida - León Gieco**

*Casi, casi nada me resulta pasajero  
todo prende de mis sueños  
y se acopla en mi espalda  
y así subo muy tranquilo la colina de la vida.*

*Nunca me creo en la cima o en la gloria,  
eso es un gran fantasma  
creado por generaciones pasadas,  
atascado en el camino de la vida.*

*La realidad duerme sola en un entierro  
y camina triste por el sueño del más bueno.  
La realidad baila sola en la mentira  
y en un bolsillo tiene amor y alegrías,  
un Dios de fantasías, la guerra y la poesía.*

*Tengo de todo para ver y creer,  
para obviar o no creer  
y pocas veces me encuentro solitario  
llorando en el umbral de la vida.*

*Busco hacer pie en un mundo al revés  
busco algún buen amigo  
para que no me atrape algún día,  
temiendo hallarla muerta a la vida.*