

Instituto de Biología Celular y Neurociencias

“Prof. E De Robertis” (CONICET - UBA)

1° Cátedra de Histología, Embriología, Biología Celular y Genética

PROYECTO/S DE INVESTIGACIÓN

Rol de la proteína Tau y sus isoformas en la regulación del transporte axonal en neuronas humanas sometidas en la degradación de proteínas o alteraciones en la disponibilidad de glucosa

REQUERIMIENTOS

- **Buena predisposición para el trabajo en conjunto**
- **Dedicación**
- **Motivación**
- **Voluntad para autogestionar tareas de manera independiente**
- **Conocimiento básico de biología celular, sistema nervioso preferiblemente**
- **Poseer habilidades computacionales y lingüísticas que le permitan desenvolverse con naturalidad en las tareas y ámbitos correspondientes**

DOCENTE: Dr. Tomás Luis Falzone

UBICACIÓN: 3° Piso. Paraguay 2155,

TAREAS A REALIZAR POR PARTE DEL PRACTICANTE

- **Desarrollo de protocolo de diferenciación de neuronas humanas (Cultivo celular, preparación de medios de cultivo y reactivos, técnicas de manutención de células)**
- **Transfecciones de elementos plasmidicos en diferentes tipos de líneas celulares**
- **Registro de películas de transporte axonal utilizando microscopía de fluorescencia**
- **Análisis de movimiento y sistema de trackeo con herramientas y programas informáticos**
- **Estadística y presentación de datos y resultados**

OBJETIVOS

Que el practicante adquiera habilidades pertinentes al desarrollo del pensamiento científico, manejo de técnicas de mesa, evaluación de resultados, presentación de data, exposición de resultados con manejo de bibliografía

CARGA HORARIA: 12 horas

PLAN DE INVESTIGACION

Director: Dr. Tomas Falzone, Jefe de trabajos Prácticos, Semi-exclusiva, UBA.

Co-Director: Dra. Elena Avale, Jefe de trabajos Prácticos, Simple, UBA.

Integrantes

Trinidad Saez, Jefe de Trabajos Prácticos, exclusiva, UBA

Ivan Bessone, Beca de Doctorando FMED, UBA.

Matias Alloatti, Beca de Doctorado, CONICET.

Julia Tichi, Becaria.

Disciplina/área del proyecto: (debe coincidir con el que se consigne en SIGEVA)

Ciencias médicas

Estado actual del conocimiento sobre el tema

Tau es una proteína principalmente neuronal que se asocia a los microtúbulos cumpliendo una serie de funciones que incluyen la regulación de polimerización y estabilidad de los microtúbulos y la modulación de dinámicas de transporte axonal de proteínas, vesículas y organelas (Morris et al., 2011). Diferentes enfermedades neurodegenerativas conocidas como taupatías poseen en común la aparición de patologías asociadas con el metabolismo anormal de Tau. Estas incluyen la enfermedad de Alzheimer, Parkinson atípico, Huntington y algunas formas de demencias frontotemporales, entre otras. Las mismas se caracterizan por la acumulación aberrante de Tau hiperfosforilada, que en condiciones patológicas se despegas de los microtúbulos, los desestabiliza y se acumula en inclusiones filamentosas insolubles llamadas ovillos neurofibrilares (Spillantini and Goedert, 2013). Diferentes mecanismos moleculares que alteran los niveles de tau, su hiperfosforilación y/o los niveles relativos de sus isoformas han sido propuestos como procesos involucrados en la inducción de neurodegeneración. Este proyecto de investigación propone evaluar cómo el sistema de degradación de proteínas “ubiquitina-proteasoma” o los cambios hiperglucémicos en las neuronas son capaces de inducir alteraciones específicas en los niveles de hiperfosforilación o del balance de isoformas de la proteína tau y de esta manera alterar las dinámicas de transporte axonal.

El gen codificante para Tau humano (*MAPT*) comprende 16 exones que expresan hasta 6 isoformas diferentes producidas mediante empalme (splicing) alternativo de los exones 2, 3 y 10 en el SNC (Spillantini and Goedert, 2013). El exón 10 (E10) codifica la segunda de cuatro repeticiones de unión a microtúbulos; por lo tanto, el splicing alternativo del E10 da lugar a isoformas de tau con tres (3R) o cuatro repeticiones (4R) de unión a microtúbulos (Goedert et al., 1989). Durante el desarrollo neuronal sólo Tau-3R es expresada en el SNC; sin embargo, en el cerebro humano adulto existe un equilibrio en la expresión de 3R:4R (Goedert et al., 1989; Andreadis, 2005). Mutaciones en tau que segregan con la demencia frontotemporal familiar con parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17) generan una acumulación anómala de tau hiperfosforilada. Algunas de estas mutaciones solo afectan el splicing del E10 sin modificar la secuencia proteica de Tau (Hutton et al., 1998; Spillantini et al., 1998). Esto demuestra claramente que una variación en las proporciones de 3R:4R podrían ser suficientes para inducir agregados de tau y generar patología (Ghetti et al., 2015). Sin embargo, los mecanismos de neurodegeneración subyacente al desequilibrio de la isoformas 3R:4R aún no están comprendidos.

Entre la gran variedad de funciones neuronales afectadas por el metabolismo anormal de Tau, el transporte axonal resalta como una de los mecanismos selectivos que pueden llevar a un deterioro neuronal significativo. El transporte axonal sostiene la morfología especializada de las neuronas mediante un mecanismo altamente regulado que media la distribución de proteínas y organelas hacia los sitios de acción (Hirokawa et al., 2011). El

transporte axonal hacia la sinapsis (anterógrado) y hacia el cuerpo celular (retrógrado) está mediado por motores moleculares de kinesina y dineína que interactúan diferencialmente leyendo la polaridad de los microtúbulos (MT)(Terada et al., 2010; Encalada and Goldstein, 2014). Mediante su unión a los microtúbulos, Tau contribuye a los mecanismos iniciales de generación de polaridad neuronal (Conde and Caceres, 2009). Cambios patológicos en la acumulación e hiper-fosforilación de Tau llevan a la generación de agregados y a la desorganización del cito-esqueleto, sugeridos como mecanismos que alterarían el transporte axonal (Spillantini and Goedert, 2013). Ha sido demostrado *in vitro* que tau modula diferencialmente la función de los motores moleculares que transportan cargas axonales favoreciendo el despegado de kinesina (motor anterogrado) de los microtúbulos y teniendo un menor efecto sobre la procesividad de dineínas (motor retrogrado) (Dixit R, 2008). Nuestros trabajos postulan que tau mediaría un mecanismo fisiológico de control de transporte mediante la regulación de isoformas afectando diferencialmente el transporte anterogrado y retrogrado, y cuando este balance es alterado se inducen defectos de movimiento que podrían ser iniciadores de patología (Lacovich et al., 2017). Ratones transgénicos que sobre-expresan Tau con la mutación P301S o P301L han demostrado deficiencias significativas en las dinámicas de transporte axonal (Ittner et al., 2008; Mellone et al., 2013; Rodríguez-Martín et al., 2016). A su vez, una reducción en el complejo motor anterogrado kinesina-I exacerba la patología de tau en el ratón transgénico P301L, sugiriendo que los defectos de transporte afectan su fisiología (Falzone et al., 2009). Experimentos realizados en neuronas en cultivo permitieron demostrar que bajo la sobreexpresión de las isoformas 3R o 4R se inducen defectos del transporte axonal de mitocondrias (Mertens et al., 2013) o en condiciones de sobreexpresión de mutaciones que aumentan la incorporación del E10 (Iovino et al., 2014). Recientemente, hemos demostrado que el desbalance de isoformas en un modelo humano sin sobre-expresión genera defectos significativos en las dinámicas de la proteína precursora de amiloide (APP) (Lacovich et al., 2017). Estos resultados nos llevaron a proponer un mecanismo molecular regulatorio por el cual las isoformas podrían direccionar de manera diferencial el transporte anterogrado y retrogrado.

Actualmente, no hay indicios claros que demuestren un aumento en la producción de la proteína Tau en Alzheimer esporádico no genético u otros tipos de demencias, lo que sugiere que la acumulación de Tau podría ser causada por una falla en los mecanismos de degradación celular (Olsson et al., 2003). La vía de degradación de Tau es compleja, y aun no se comprende completamente (Nilsson and Saido, 2014). Por un lado, Tau podría ser sustrato del proteasoma 26S en el sistema ubiquitina-proteasoma, y es claro también que los agregados de ovillos NFTs son capaces de poner en peligro el funcionamiento del proteasoma (Saido and Leissring, 2012). Defectos en el transporte axonal de APP y anomalías en tau son eventos tempranos en la enfermedad de Alzheimer (Stokin et al., 2005; Hinrichs et al., 2012), por lo tanto, alteraciones en las propiedades de transporte pueden ser utilizadas como método de referencia para detectar déficits asociados a condiciones patológicas (Falzone and Stokin, 2012). En Alzheimer, la disfunción local de la degradación mediada por el proteasoma ha sido descrita en las fases tempranas que incluyen defectos sinápticos y la formación de cuerpos de inclusión que contienen agregados de tau en su forma poli-ubiquitinada (Tai et al., 2012). Además, el péptido a β , producido mediante el procesamiento proteolítico de APP, también es capaz de inhibir la actividad del proteasoma llevando a un mayor incremento en la producción de a β y acumulación de tau hiperfosforilada (Tseng et al., 2008). Los defectos en la degradación de proteínas mediada por el proteasoma en taupatías podrían relacionarse a la descripción de una disminución en la actividad del proteasoma en áreas del cerebro de pacientes humanos (Keller et al., 2000; Keck et al., 2003). Es importante remarcar que las fallas en la degradación mediada por el proteasoma llevan a la acumulación de Tau en el axón (Tai and Schuman, 2008) y dicha agregación axonal es también referida a defectos en el transporte axonal en Alzheimer (Stokin and Goldstein, 2006). Estos resultados sugieren

que las propiedades de movimiento de vesículas podrían ser sensibles a la inhibición del proteasoma ya que esta inhibición podría aumentar o alterar los niveles de Tau y sus isoformas. En este contexto, es necesario comprender el impacto de la actividad del proteasoma en la regulación de dinámicas axonales relevantes en la inducción de patología y evaluar cómo posibles mejoras en el funcionamiento del proteasoma recuperan patologías de Tau y dinámicas de transporte.

El estrés oxidativo inducido por la hiperglucemia es otra hipótesis relevante para explicar diferentes complicaciones en el sistema nervioso (Vincent et al., 2004). El mismo es causado por la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que son en su mayoría generados por subproductos de la biosíntesis de ATP, y por acumulaciones de enzimas citoplasmáticas y la oxidación no enzimática de la glucosa (Tomlinson and Gardiner, 2008). Por lo tanto, la generación constante de ROS en altas condiciones de glucosa satura las defensas antioxidantes y hace que las neuronas sean más susceptibles al daño oxidativo. Una de las vías no enzimáticas del metabolismo de la glucosa afectadas críticamente en las neuronas es la formación de productos proteicos altamente glicosilados (AGEs) (Ott et al., 2014). Los AGEs se forman por la reacción del azúcar con grupos amino en macromoléculas. Esta reacción, que tiene lugar en las células senescentes, se exacerba en condiciones diabéticas. Los AGEs llevan a la deshidratación irreversible, condensación y reticulización de proteínas, lípidos y ADN. Ciertas modificaciones de glicosilación han sido demostradas específicamente para la proteína Tau, estando en particular asociadas a los dominios de unión a microtúbulos (Nacharaju et al., 1999). Además, ha sido propuesto que las propiedades de agregación de Tau podrían estar relacionadas con los niveles de AGEs presentes en la proteína (Nacharaju et al., 1999). Alteraciones en el metabolismo de glucosa neuronal han sido descritos en pacientes con mutaciones en el intron 9 del gen *MAPT*, que alteran los niveles de isoformas 3R:4R (Deters et al., 2008). Altos niveles de glucosa son capaces de inducir la hiperfosforilación de Tau como otro mecanismo asociado a la agregación y acumulación de la proteína (Wu et al., 2017). Estos datos sumados a la mayor incidencia de progresión a demencias en pacientes con diabetes de tipo II, pone de manifiesto de manera relevante un mecanismo molecular por el cual cambios en los niveles de glucosa podrían aumentar las patologías asociadas con alteraciones de Tau (Stokin and Goldstein, 2006). La hiperglucemia acelera la formación de AGEs y estos cambios están dramáticamente aumentados en condiciones de diabetes (Luchsinger et al., 2001). La formación de productos de glicosilación avanzada en Tau podría estar como centro del posible vínculo entre la diabetes de tipo II y la enfermedad de Alzheimer. Aunque originalmente se describió en el contexto de la diabetes, actualmente está claro que los AGE también juegan un papel fundamental en las demencias (Luchsinger et al., 2001). La glicosilación altera la actividad biológica de las proteínas y sus procesos de degradación. La reticulización de Tau por AGEs da lugar a la formación de agregados insolubles en detergente y resistentes a las proteasas. Tales agregados podrían interferir el transporte axonal tanto por mecanismos de pérdida de función o ganancia de función tóxica. La comprensión de los mecanismos moleculares asociados a las diferentes anomalías en el metabolismo de tau ligados a la presencia de AGEs resulta crucial para elucidar potenciales cascadas involucradas en los procesos neurodegenerativos, y la caracterización de nuevos blancos de intervención terapéutica. En particular, este proyecto se centrará en analizar déficits relacionados con disfunciones en mecanismos de transporte axonal.

Recientemente, hemos utilizado un sistema de control del *splicing* alternativo endógeno de Tau mediante *trans*-*splicing* (Avalé et al., 2013) en modelos experimentales de neuronas humanas, en base al cual propusimos un mecanismo de coordinación de motores moleculares regulado por la interacción lábil de tau con los microtúbulos, dependiente de niveles relativos de las isoformas de tau 3R y 4R (Lacovich et al., 2017). En este proyecto

proponemos estudiar los efectos de las alteraciones moleculares de Tau inducidas principalmente por cambios en la degradación de proteínas o debido a modulaciones de la disponibilidad de glucosa neuronal. Postulamos que las modificaciones en los niveles totales de tau, en los niveles relativos de las isoformas 3R:4R y/o la presencia de formas hiperfosforiladas o insolubles generados por estas modificaciones podrían explicar el papel patológico de Tau en las dinámicas de transporte axonal, y su relación con los procesos tempranos de degeneración neuronal. Además, proponemos evaluar si las correcciones en el desbalance de isoformas de Tau o su eliminación molecular podrían resultar mecanismos válidos para recuperar dinámicas intracelulares y plantearlos como estrategia reparadora. Comprender la regulación de este sistema permitirá fortalecer la relevancia funcional de Tau en un proceso neuronal clave y elucidar los defectos inducidos en la progresión de enfermedades neurodegenerativas.

Objetivos e hipótesis de la investigación (Desarrolle en 4 carillas como máximo). Fundamentalmente, se deberá detallar el problema o situación de referencia en el que se desarrolla el proyecto, o los interrogantes en el campo disciplinario a los que el proyecto se dirige. Se deben enunciar de manera clara las metas concretas a alcanzar en el marco del proyecto indicando hipótesis o postulados o propuestas explicativas de la pregunta en estudio.

Este trabajo propone como hipótesis principal que las **alteraciones de los niveles de proteína Tau, el desbalance de sus isoformas 3R:4R y/o la formación de agregados insolubles subyacen a las anomalías de transporte axonal inducidas por defectos en la degradación de proteínas y/o regulaciones de su estado energético por glucosa.** Mediante la comprensión de estas alteraciones proponemos evaluar potenciales estrategias reparadoras basadas en la regulación del metabolismo endógeno de tau. Para poner a prueba esta hipótesis proponemos los siguientes **objetivos específicos**:

1) Caracterizar las alteraciones de las dinámicas de transporte axonal en neuronas humanas en condiciones de modificación de la degradación proteica o en base a cambios en los niveles de glucosa neuronal.

Los resultados preliminares de nuestro grupo, obtenidos mediante inhibición de la actividad de degradación de proteínas por el proteasoma en neuronas de ratón, demuestran la existencia de cambios en las dinámicas de transporte axonal. A su vez, utilizando un sistema similar, demostramos que los niveles de glucosa modulan las dinámicas de transporte axonal de la proteína precursora de amiloide (APP). Aquí proponemos profundizar estas descripciones en un modelo de neuronas humanas en cultivo. Para este objetivo planeamos diferenciar neuronas humanas a partir de células madre pluripotentes utilizando un protocolo desarrollado en nuestro laboratorio (Lacovich et al., 2017; Pozo Devoto et al., 2017). El análisis de dinámicas de transporte axonal de APP y de mitocondrias será registrado y analizado mediante técnicas de seguimiento de partículas en MATLAB a fin de determinar las propiedades de transporte axonal anterógradas y retrógradas en condiciones de defectos en la degradación de proteínas o bajo cambios en la disponibilidad de glucosa (Alloatti et al., 2017).

2) Determinar la presencia de alteraciones en la proteína tau (contenido relativo de isoformas, acumulación y/o hiperfosforilación) en neuronas humanas sometidas a cambios en la degradación proteica mediante defectos o activación del proteasoma.

Si bien demostramos cambios en el transporte axonal con inhibición del proteasoma, el impacto de esta modulación sobre los niveles totales y los contenidos relativos de isoformas de Tau no es claro. Utilizando neuronas humanas tratadas con el inhibidor de

proteasoma MG-132 o al activador de degradación Rolipram, determinaremos los cambios en las isoformas de Tau mediante RT-PCR y western blot. También, analizaremos los niveles de hiperfosforilación de Tau con anticuerpos anti Tau total, PHF1, CP13, AT-180 y mediante inmunofluorescencia. Para determinar estados de agregación de tau realizaremos fraccionamiento de proteínas insolubles (con reactivo de sarkosyl).

3) Determinar la presencia de alteraciones en las isoformas, acumulación e hiperfosforilación de tau en neuronas humanas con cambios metabólicos en los niveles de glucosa neuronal.

Nuestros resultados preliminares demuestran que las dinámicas de transporte axonal dependen significativamente de la disponibilidad de glucosa neuronal. Por lo tanto, proponemos analizar los cambios en los niveles de isoformas, en la solubilidad y estado de fosforilación de Tau inducidos por el modelo de hiperglucemia. Utilizando neuronas humanas tratadas con diferentes concentraciones de glucosa (normal: 5mM, hiperglucemia: 25mM) o con shocks de glucosa, que hemos descrito que generan alteraciones significativas en el transporte de APP, evaluaremos los cambios en el metabolismo de la proteína Tau endógena, como se describe en el objetivo 2.

4) Evaluar la estrategia de restitución de isoformas de Tau o la eliminación de su expresión como corrector de las alteraciones de transporte axonal inducidos por la inhibición del proteasoma o cambios en glucosa.

Como prueba de concepto para evaluar potenciales estrategias terapéuticas recuperadoras de las dinámicas axonales basadas en la modulación del metabolismo de la proteína Tau, proponemos restablecer el balance de isoformas de Tau o eliminar su expresión en neuronas con tratamiento de inhibidor de proteínas o con cambios en los niveles de glucosa. Las neuronas tratadas con diferentes concentraciones de MG-132 frente a cambios hiperglucémicos serán utilizadas para modular isoformas 3R:4R mediante *trans*-splicing o para reducir la expresión de tau utilizando miRNA. Posteriormente, estos cultivos serán analizados para determinar las dinámicas de transporte axonal de vesículas de APP. La reducción en los niveles o isoformas de Tau será evaluada mediante westerns blots y RT-PCR.

Metodología (Desarrolle en 4 carillas como máximo) Describir, según corresponda al tipo de proyecto, el diseño experimental, o el procedimiento, para la recolección de información y su procesamiento. Es aconsejable la descripción muy breve de la metodología a usar dentro de cada sección donde se describen las tareas.

El protocolo de diferenciación de células madre humanas a neuronas ha sido desarrollado exitosamente en nuestro laboratorio y será utilizado como modelo experimental para los diferentes objetivos propuestos (Lacovich et al., 2017; Pozo Devoto et al., 2017).

Protocolos de diferenciación a neuronas humanas: En nuestro laboratorio mantenemos regularmente cultivos de células madre humanas en estadios no diferenciados correspondientes a la línea Hues-9 (Harvard) y la línea cviPSC (UCSD). Estas células han sido transferidas a mi laboratorio previo firma de acuerdo de transferencia de materiales (MTA) entre la Facultad de medicina, UBA y la Universidad de Harvard o la Universidad de California en San Diego. El mantenimiento y amplificación de las células madre se realiza utilizando un medio DMEM/F12 enriquecido conteniendo 20% Knock out serum replacement (KO serum), aminoácidos no esenciales, L-glutamina y β -mercaptoetanol. Colagenasa 4 es utilizada para el pasaje o congelamiento. Para inducir la diferenciación de las células madre a linajes de precursores neuronales hemos modificado un protocolo publicado en 2010 por Zhang and Zhang (Pozo 2017). Este protocolo implica un crecimiento de colonias en solución en placas no adherentes por un

período de 5 días (Stage II). Posteriormente los cuerpos embrionarios son plaqueados en placas de adhesión cubiertas con laminina (Stage III). Luego de 9 días en medio suplementado con N2 se observa la formación de neurorosetas que son manualmente extraídas bajo lupa de disección en condiciones de esterilidad y son levantadas como neurorosetas con precursores neuroepiteliales en placas no adherentes con medio N2 + B27 (Stage IV). Luego de 9 días como neuro-esferas las células son disgregadas y plaqueadas en vidrios cubiertos con laminina y en medios suplementados con factores de crecimiento BDNF, GDNF (Stage VI). Estas células aisladas presentan características neuronales de formación de patrones de polaridad, maduración de la actividad eléctrica y expresión de marcadores de identidad neuronal que han sido caracterizados en nuestro laboratorio (Fig 1). Si bien esta metodología consiste de un protocolo extenso, en nuestro laboratorio hemos logrado éxito en llevar adelante la obtención de cultivos neuronales enriquecidos (Fig 1C). Para realizar una buena caracterización de la calidad de las neuronas obtenidas hemos realizado diferentes validaciones. Estas células fueron fijadas a diferentes tiempos utilizando 4% paraformaldehído, 4% sacarosa en PBS por 30 min. Pevio al bloqueo e incubación con anticuerpos primarios las membranas celulares fueron permeabilizadas con tritonX100 (0,1%) en PBS por 10 min. La correcta expresión de marcadores de diferenciación y no diferenciación fue evaluada en diferentes tiempos post-diferenciación mediante experimentos de PCR en tiempo real para una batería de marcadores (Fig 1A). A diferentes tiempos de crecimiento en los medios neuronales enriquecidos se realizaron tinciones con anticuerpos contra marcadores neuronales básicos como MAP2 y bIII-tubulina (Fig 1B). Un estudio detallado de la cantidad de células expresando marcadores neuronales se contrasto contra el total de células o células con marcadores de glia etc. La presencia y maduración de estructuras sinápticas y actividad eléctrica fue descripta y evaluada a diferentes tiempos anlaizando su actividad eléctrica (Fig 1c). La evolución de los disparos de potenciales de acción fue evaluada en nuestros cultivos mediante una colaboración con la Dra. Antonia Marin-Burgin del Polo científico del CONICET.

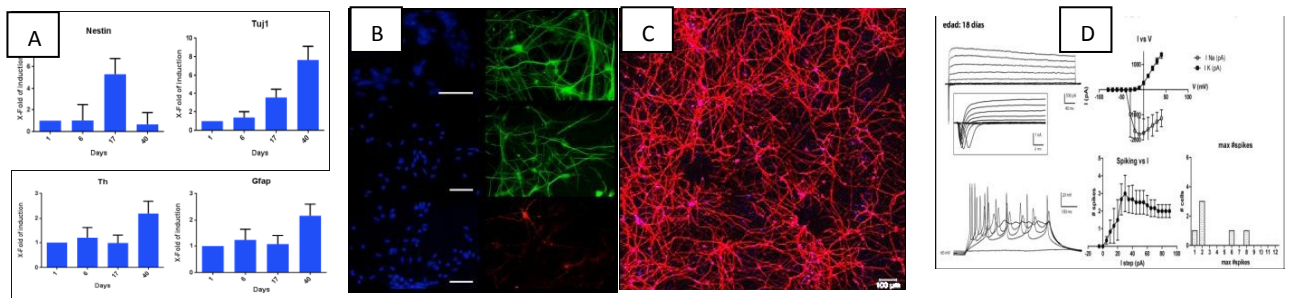


Figura 1: A) Evaluación de expresión de marcadores (factores y proteínas) de identidad de precursores (nestina) e identidad neuronal (bIII-Tubulina y TH, glia: GFAP) mediante rt-PCR. **B)** Tinción con marcadores de polaridad y diferenciación neuronal Map2, bIII-Tubulina y TH. **B)** Cultivo neuronal humano de 18 días altamente enriquecido en neuronas y con un gran desarrollo de polarización y estructuras axonales y dendríticas (tinción h-tau) **C)** Mediciones de potencial de membrana y presencia de corrientes de Na/K en neuronas de 18 días. Eventos de actividad espontánea fueron registrados.

Para **caracterizar las alteraciones de las dinámicas de transporte axonal en neuronas humanas en condiciones de modificación de la degradación proteica o en base a cambios en niveles de glucosa neuronal** desarrollaremos la siguiente metodología que se encuentra puesta a punto en nuestro laboratorio.

Protocolo de inhibición y activación del proteasoma: Con la intención de evaluar el impacto de la inhibición de la degradación por el sistema ubiquitina proteasoma inicialmente establecimos un protocolo de incubación crónica con inhibidores. Neuronas humanas polarizadas serán sometidas a diferentes dosis de inhibidores de la actividad del proteasoma utilizando lactacistina o MG132 como inhibidores específicos. Se realizarán incubaciones con el inhibidor del proteasoma (aguda y crónica) a diferentes concentraciones que ya han sido puestas a punto con cultivos primarios de neuronas de ratón (MG132 50-200 nM) y en los tiempos establecidos previamente (4-24-48-72 hrs). En base a que las modificaciones de transporte axonal inducidas por la inhibición del proteasoma son observadas de manera rápida luego del tratamiento (4 horas post-inhibición) nuestros estudios estarán concentrados en tiempos cortos. Esto es necesario porque además de la degradación específica de proteínas, la inhibición del proteasoma genera cambios significativos de expresión de genes que podrían generar alteraciones secundarias.

Protocolo de modulación de disponibilidad de glucosa: Para evaluar como la disponibilidad de glucosa neuronal modula dinámicas de transporte estableceremos un protocolo de incubación en medios de crecimiento modificando las concentraciones de glucosa. Es importante remarcar en este punto que los medios de cultivo adquiridos normalmente están producidos en concentraciones de glucosa 25 mM, una condición que las neuronas de cerebros humanos nunca están expuestas aun en las condiciones de mayor hiperglucemia fisiológica. Por lo tanto hemos adquirido medios de cultivo sin glucosa los cuales serán suplementados para modular los niveles basales (5 mM glucosa) y llevarlos a estados de hiperglucemia (25 mM). Por lo tanto, diferentes cultivos neuronales humanos serán crecidos en condiciones de glucosa normal (5 mM) o de hiperglucemia (25 mM). Además, incorporaremos 2 nuevos grupos experimentales que se basan en condiciones de shock de glucosa por cambio de concentraciones. Por lo tanto los 2 nuevos grupos serán cultivos crecidos en baja glucosa que reciben shock hiperglucémico durante 4-8 horas antes del diseño de análisis de dinámicas intracelulares. Otro grupo de neuronas crecidas en 25 mM glucosa (hiperglucemia) pasará repentinamente a 5 mM por 4-8 horas.

Transfecciones: Los cultivos neuronales humanos diferenciados entre 7 a 14 días de plaqueado bajo las condiciones experimentales mencionadas previamente serán transfectados o co-transfectados mediante la técnica de lipofectamina 2000 (Invitrogen). El complejo lipido/DNA es preparado a temperatura ambiente 20 min antes de la transfección e incubado posteriormente con las células durante 2 horas. Luego el medio es totalmente removido y reemplazado por medio nuevo para evitar o disminuir la citotoxicidad. La baja eficiencia de transfección obtenida con esta técnica en cultivos humanos es necesaria en nuestros experimentos de manera de poder identificar células transfectadas aisladas donde seguir la estructura axonal y poder identificar el transporte anterogrado (hacia la sinapsis) y retrogrado (hacia el cuerpo celular). 24 horas post-transfección los cultivos serán llevados a un microscopio de fluorescencia invertido con equipo de micro-cámara, equipado con una videocámara rápida Hamamatsu ORCAMOS 2.8 MGp y un lente 100X super-apocromático y con sistema de adquisición de imagen en tiempo real (Fig 1A) (Olympus IX81).

Registro de películas: El transporte axonal de vesículas de APP será registrado a intervalos de tiempo y posteriormente se analizarán los diferentes parámetros de movimientos (direccionalidad de las partículas, proporción, velocidad, procesividad y distancias de movimiento).

Los vidrios circulares conteniendo el cultivo de neuronas humanas transfectadas serán removidos de la placa de multiwell y colocados de manera invertida en placas con base de vidrio de 35 mm. Este sándwich permitirá utilizar el lente 100X en el microscopio invertido Olympus IX81 para registrar el movimiento axonal. El microscopio cuenta con una cámara de control de temperatura y dióxido para permitir el registro en condiciones de incubación. Inicialmente los cuerpos celulares serán reconocidos a bajo aumento y

luego con el objetivo 100X registraremos el movimientos en las zonas medias de los axones (Otero et al., 2014). Las mitocondrias fluorescentes (mito-egfp) serán utilizadas para evaluar las dinámicas de transporte axonal. Registros espaciados en el tiempo con cuadros de exposición de 120 milisegundos serán utilizados inicialmente para el análisis de movimiento de mitocondrias fluorescentes. Experimentos recientes utilizando esta técnica nos han permitido demostrar que la relación entre el contenido de isoformas de Tau y los flujos de dinámicas de APP (Lacovich et al., 2017). Esta técnica de avanzada permite registros de uno y dos canales fluorescentes secuencialmente.

Análisis de gráficos de movimiento, utilización de algoritmos y sistemas de traqueo:

Las películas obtenidas serán transformadas a gráficos de movimiento. El eje x estará representado por el tiempo total de registro y el eje y representará la distancia de desplazamiento. Extrapolando el tamaño del pixel en el eje (1pixel = 0,286 um) y trazando líneas de desplazamiento sobre las partículas fluorescentes del gráfico podremos obtener la direccionalidad y promedios de tiempo en movimiento, la distancia recorrida, la velocidad y procesividad. El programa de análisis Image J e Image Pro-Plus serán utilizados para la obtención de los parámetros mencionados (Stokin et al., 2005; Falzone et al., 2009). El programa Excel se utilizará para realizar cálculos promedio de velocidades y porcentajes de partículas totales, estacionarias y en desplazamiento tanto anterógrado como retrógrado. Para un análisis detallado procesaremos los gráficos mediante algoritmos de detección de partícula única utilizando la intensidad máxima de la partícula y de los pixeles adyacentes para determinar la ubicación con precisión sub-pixel y luego se realizará un traqueo mediante códigos de MATLAB. Este sistema ha sido productivo en base a nuestra interacción con la Dra Bruno del Departamento de Física de FCEyN, UBA (Otero et al., 2014; Lacovich et al., 2017; Pozo Devoto et al., 2017). La relación señal/ruido S/R ya ha sido calculada para nuestro sistema como el cociente entre la intensidad máxima corregida (I_m) y el desvío estándar de la posición de la partícula en la trayectoria σ ($S/R = I_m / \sigma$). Esto ha determinado que el error de medición es varios órdenes de magnitud menor a la señal utilizada en el traqueo. Posteriormente mediante la utilización de códigos en MATLAB se calculará las velocidades segmentales, pausas, runlength y reversiones de vesículas y tiempo en cada uno de los componentes. Un procesamiento matemático de ajuste de curvas de distribución de velocidades segmentales será utilizado para comparar las dinámicas de APP en condiciones control contra condiciones de cambios en la degradación proteica o en los niveles de glucosa.

Estadística: ANOVA de dos vías se utilizará inicialmente para determinar la existencia de interacción entre los tratamientos y a posteriori se evaluarán las modificaciones en los parámetros de direccionalidad de partículas en diferentes condiciones de observación de movimiento axonal. Diferentes test a posteriori serán utilizados para determinar los grupos que presentan diferencias significativas. Para datos no paramétricos (sin normalidad) realizaremos test de Mann-Whitney. Para comparar cambios significativos en parámetros únicos como el análisis de velocidad utilizaremos el Student-t test. Un valor de $P < 0,05$ será considerado para determinar significancia (Falzone et al., 2009). Distribución de frecuencias de velocidades serán analizadas mediante un test de Kolmogorov-Smirnov (Otero et al., 2014). Una vez obtenidas las propiedades de transporte axonal para diferentes subunidades, estas serán comparadas para determinar similitudes y diferencias que nos permitan identificar las propiedades de desplazamiento.

Producción de vectores lentivirales: Los vectores lenti-virales pLV de tercera generación dirigiendo la expresión de un cassette de trans-splicing con isoformas de Tau o pLV expresando un microRNA de interferencia contra el transcripto primario de tau ha sido generados por la Dra. Avale. La colaboración previa con la Dra Avale demuestra nuestra coordinación para ser altamente

productivos en este proyecto (Lacovich et al., 2017). El empaquetamiento de los vectores lentivirales será realizado mediante transfección con lipofectamina de la línea celular HEK 293T con los vectores lentivirales de empaquetamiento pMDL (Gag/Pol), pVSVG (vesicular stomatitis virus glycoprotein) y pREV junto al vector viral pLV conteniendo el casete para

dirigir las isoformas de tau o el siRNA para interferir la expresión de Tau. A los 4 y 5 días post transfección los medios de cultivo serán colectados y posteriormente el virus será ultra-centrifugado y purificado por columna. El título viral será obtenido mediante el vector pLV-FUG para determinar la eficiencia de infección inicial de la preparación viral. Además, tinciones de inmunofluorescencia y westerns para determinar los niveles de transducción viral y expresión serán evaluados con anticuerpos anti Tau.

Determinación de niveles e isoformas de tau: El RNA total provenientes de neuronas humanas control y tratadas será extraído para una determinación de rt-PCR utilizando una columna ALLprep Kit de Quiagen. Una reacción de rt-PCR será diseñada para generar cDNA partiendo de 0,5 ug de RNA utilizando el sistema TaqMan. Para detectar los niveles de tau y sus isoformas 3R 4R se realizará una reacción de “end point” y posteriormente se correrá en gel de agarosa. También, se realizarán PCR cuantitativas en tiempo real utilizando primer ya descritos y utilizados previamente en la detección de isoformas de 3R y 4R: 4Rfor(E9): 5'-TCCACTGAGAACCTGAAG-3'; 4Rrev(E10): 5'-AGTGTGGCTCAAAGGATA-3'; 3Rfor(E9/11): 5'-AGGCGGGAAGGTGCAAATAG-3'; 3Rrev(E11): 5'-TCCTGGTTTATGATGGATGTT- 3'. Datos de experimentos independientes serán recolectados e incluidos en la cuantificación. Los niveles de proteínas totales de tau y sus isoformas 3R y 4R serán evaluadas mediante experimentos de western blot. También, se evaluarán las versiones fosforiladas de tau en diferentes sitios patológicos utilizando anticuerpos específicos (PHF1, CP13, y la versión conformacional ALZ50).

Western blots, fraccionamiento subcelular y bioquímica para determinar modificaciones en Tau: Experimentos en cultivos de neuronas humanas serán realizados luego de la inhibición de la actividad del proteasoma o bajo cambios en la disponibilidad de glucosa para determinar los niveles totales de la proteína Tau y alteraciones en su metabolismo. Perfiles de fosforilación de la proteína tau en neuronas humanas en condiciones tratados o no con inhibidores del proteasoma serán evaluados en cuanto a sus niveles endógenos de la proteína Tau. Western blots de SDS-PAGE para cuantificación de niveles de tau y estados de hiperfosforilación serán preparados a partir de homogenatos celulares tratados y control. Los resultados serán también comparados con experimentos de inmunofluorescencia semi-cuantitativa por intensidad de fluoróforos. Una batería de anticuerpos contra versiones fosforiladas de Tau será utilizada tanto en western como en inmunofluorescencia para determinar modificaciones en sitios temprano y tardíos de fosforilación. Anticuerpos con Tau total, PHF1, CP13, AT-180, 3R y 4R serán utilizados. Experimentos de fraccionamiento subcelular purificando fracciones insolubles será realizado de homogenatos de neuronas humanas tratadas con inhibidores o control. Un homogeneizador de teflón-vidrio unido a un labo-agitador (Yamato) en tres volúmenes de buffer tampón TBS que consiste en 25 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, mM EGTA 1 mM, EDTA 1, inhibidor de proteasas e inhibidores de fosfatasa (fluoruro de sodio 10 mM, 1 mM ortovanadato de sodio). Los homogenatos se centrifugarán durante 15 minutos a 150.000 g a 4C. Los sobrenadantes extraídos como la fracción soluble y los pellets serán re-homogeneizados en tres volúmenes de buffer sacarosa (0,8 M NaCl, 10% de sacarosa, 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM EGTA, inhibidores de proteasas y fosfatasas). Después se centrifugarán durante 15 min a 150.000 g a 4C. Los sobrenadantes se incubarán con 1% de N-laurilsarcosinato (Sarkosyl) a 37C durante 1 h con agitación moderada. La solución de Sarkosyl se centrifugará 150.000 g durante 30 min a 4C, y los precipitados de Sarkosyl insoluble se re-suspenderán. Geles de proteínas SDS-PAGE serán sembrados con igual carga de proteínas por igual relación peso/volumen.

Transferencia de Resultados (máximo 2 carillas) Describir el objeto de la transferencia, su importancia, los destinatarios concretos o posibles, y los procedimientos para concretarla.

La prevalencia de demencias asciende al 8.5% en la población mayor de 60 años en Sudamérica, implicando altos costos en los sistemas de salud. Comprender los

mecanismos moleculares que subyacen a estas patologías resulta imprescindible para el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos. En este sentido los conocimientos básicos que se obtengan en el curso de este proyecto contribuirán a futuros desarrollos farmacológicos y/o de diagnóstico precoz de las demencias. Debido al crecimiento de la expectativa de vida y el aumento de la población de edades avanzadas, la Argentina presenta una problemática de pacientes que sufren enfermedades neurodegenerativas similar a la de los países desarrollados.

Desde una perspectiva de investigación básica, este proyecto plantea como eje principal el desarrollo de novedosas herramientas de modelado de procesos degenerativos en neuronas humanas. En un futuro a mediano plazo, esta metodología podría servir para desarrollar plataformas de ensayos preclínicos de fármacos con fines terapéuticos, sin necesidad de utilizar modelos animales. Esta temática, prioritaria dentro de los lineamientos de desarrollo en Salud asociados a la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires, plantea el desarrollo de modelos de diferenciación a neuronas humanas para estudiar mecanismos de transporte axonal, rol de tau y mecanismos de daño neural con inhibición de proteasoma y cambios en la disponibilidad de glucosa. Este desarrollo básico puede ser trasladado a la ciencia aplicada mediante transferencia de conocimiento en diferentes sectores de producción dirigidos al tratamiento de enfermedades.

Desde el punto de vista metodológico, comprender los alcances de proteínas inductoras de enfermedad en los mecanismos de transporte y la utilización de modelos neuronales humanos para testeo de drogas no solo es necesario para mejorar el tratamiento de los pacientes sino también brinda un alto impacto en el desarrollo socioeconómico. Conjuntamente este subsidio constituirá el perfeccionamiento de recursos humanos en la utilización de técnicas de microscopia de avanzada con generación de películas en tiempo real desarrolladas dentro del ámbito de la Facultad de Medicina de la UBA. Dentro de la sinergia alcanzada entre la Dra. Avale y el Dr. Falzone, el proyecto tiene alcance de colaboración nacional e internacional a través de colaboraciones con el Dr. Stevens Rehen en la Universidad de Rio de Janeiro en Brasil. En el plano Nacional colaboramos con la Dra. Bruno, de UBA, para desarrollar herramientas de análisis de dinámicas de alta resolución y testeo de modelos de coordinación y la Dra. Levi del departamento de Química Biológica para el diseño de nuevas estrategias de cross-correlación para medir procesamiento en tiempo real.

En cuanto a los objetivos específicos a desarrollar y al conocimiento que será generado este proyecto propone ideas innovadoras que involucran la comprensión de proteínas relevantes en la regulación del transporte axonal que pueden explicar procesos intracelulares que llevan a la manifestación de enfermedades neurodegenerativas. Si bien se ha demostrado previamente que estas proteínas inducen enfermedad cuando están alteradas, los mecanismos precisos por los cuales podrían modular el transporte axonal no están elucidados. El enfoque original de este proyecto reside en comprender en detalle cómo una regulación y desregulación de los procesos de transporte axonal pueden ser actores comunes en diferentes enfermedades neuronales no genéticas. Buscaremos comprender los cambios en la proteína tau mediada por alteraciones en la degradación de proteínas o en la biodisponibilidad de glucosa neuronal, y cómo esto puede impactar en los mecanismos de transporte axonal.

Este proyecto representa un desafío científico y técnico altamente novedoso basado en un sólido trabajo de puesta a punto de diferenciación de neuronas humanas y en el desarrollo de sofisticadas herramientas de ingeniería genética. Nuestros grupos de trabajo, formados por gente

joven y con solida formación, han demostrado su capacidad en el desarrollo de metodologías innovadoras para responder preguntas de amplia relevancia en las ciencias biomédicas. Proponemos optimizar nuestras capacidades científico- tecnológicas para generar conocimiento genuino, que permita brindar un sólido marco científico para el diseño y testeo de nuevas estrategias terapéuticas de aplicabilidad en enfermedades

neurodegenerativas .

Cronograma de actividades: Detallar las actividades propuestas con su secuencia o encadenamiento lógico y metodología a usar en cada una de ellas. Consigne sucesivamente cada actividad unitaria.

Actividad	Meses del primer año											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Amplificación de células madre	X	X				X						
Diferenciación a neuronas humanas			X	X	X		X	X	X			
Incubación con inhibidores de proteasoma					X	X						
Caracterización de dinámicas					X	X						
Incubación con distintos niveles de glucosa									X	X		
Caracterización de dinámicas										X	X	
Análisis de data por MATLAB							X	X			X	X

Actividad	Meses del segundo año											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Amplificación de células madre	X	X				X	X					
Diferenciación a neuronas humanas			X	X	X		X	X	X			
Incubación con inhibidor y activador del proteasoma				X	X				X	X		
Determinación de isoformas y niveles por rtPCR					X	X				X	X	
Determinación de isoformas y niveles por western					X	X				X	X	
Extracciones insolubles para agregación de tau										X	X	
Análisis de data y estadística							X	X			X	X
Presentación de datos en congreso internacional										X	X	

Actividad	Meses del tercer año											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Amplificación de células madre	X	X				X	X					
Diferenciación a neuronas humanas			X	X	X		X	X	X			
Incubación con distintos niveles de glucosa				X	X				X	X		
Determinación de isoformas y niveles por rtPCR					X	X				X	X	
Determinación de isoformas y niveles por western					X	X				X	X	
Extracciones insolubles para agregación de tau										X	X	
Análisis de data y estadística							X	X			X	X
Preparación de publicación									X	X	X	X

(Sólo completar el tercer año en caso de solicitar proyecto “Modalidad 1”)

Presupuesto Total Realizar una breve justificación para cada rubro desagregado por objeto del gasto (de acuerdo con lo consignado en el ítem Recursos Financieros de la postulación de su proyecto).

El monto solicitado se justifica en la adquisición de insumos de cultivos. Gran parte del subsidio será utilizado en gastos de insumos para cultivo de células madre humanas y diferenciación e

neuronas humanas sumado al pago de servicios por sistema de importación (medios, sueros, suplementos y factores). También, material de plástico (placas, scrapers, botellas y filtros), reactivos de transfección, anticuerpos y enzimas (anticuerpos primarios y secundarios, lipofectamina 2000, collagenasa IV, tripsina), material de biología molecular (tips, tubos epp., de 15 y 50ml, tubos de pcr) y la compra de insumos de generales (reactivos de western, anticuerpos, enzimas, y kits). Planeamos la compra de equipamiento menor, un rocker para westerns y pipetas de biología molecular. El ítem reservado para gastos de servicios técnicos especializados se utilizará en el pago del microscopia confocal e importación de insumos. El rubro viajes y viáticos será utilizado para congresos nacionales.

Bibliografía:

Alloatti M, Bruno L, **Falzone T** (2017) Methods for Quantitative Analysis of Axonal Cargo Transport. *Methods in Molecular Biology* In Press.

Avale ME, Rodriguez-Martin T, Gallo JM (2013) Trans-splicing correction of tau isoform imbalance in a mouse model of tau mis-splicing. *Hum Mol Genet* 22:2603-2611.

Conde C, Caceres A (2009) Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci* 10:319-332.

Deters N, Ittner LM, Gotz J (2008) Divergent phosphorylation pattern of tau in P301L tau transgenic mice. *Eur J Neurosci* 28:137-147.

Dixit R RJ, Goldman YE, Holzbaur EL. (2008) Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science* 319:1086-1089.

Encalada SE, Goldstein LSB (2014) Biophysical Challenges to Axonal Transport: Motor-Cargo Deficiencies and Neurodegeneration. *Annual Review of Biophysics* 43:141-169.

Falzone TL, Stokin GB (2012) Imaging amyloid precursor protein in vivo: an axonal transport assay. *Methods Mol Biol* 846:295-303.

Falzone TL, Stokin GB, Lillo C, Rodrigues EM, Westerman EL, Williams DS, Goldstein LS (2009) Axonal stress kinase activation and tau misbehavior induced by kinesin-1 transport defects. *J Neurosci* 29:5758-5767.

Hinrichs MH, Jalal A, Brenner B, Mandelkow E, Kumar S, Scholz T (2012) Tau protein diffuses along the microtubule lattice. *J Biol Chem* 287:38559-38568.

Hirokawa N, Niwa S, Tanaka Y (2011) Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron* 68:610-638.

Iovino M, Pfisterer U, Holton JL, Lashley T, Swingle RJ, Calo L, Treacy R, Revesz T, Parmar M, Goedert M, Muqit MMK, Spillantini MG (2014) The novel MAPT mutation K298E: mechanisms of mutant tau toxicity, brain pathology and tau expression in induced fibroblast-derived neurons. *Acta Neuropathologica* 127:283-295.

Ittner LM, Fath T, Ke YD, Bi M, van Eersel J, Li KM, Gunning P, Götz J (2008) Parkinsonism and impaired axonal transport in a mouse model of frontotemporal dementia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:15997-16002.

Keck S, Nitsch R, Grune T, Ullrich O (2003) Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brains of patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem* 85:115-122.

Keller JN, Hanni KB, Markesbery WR (2000) Impaired proteasome function in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 75:436-439.

Lacovich V, Espindola SL, Alloatti M, Pozo Devoto V, Cromberg LE, Čarná ME, Forte G, Gallo

J-M, Bruno L, Stokin GB, **Avale ME, Falzone TL** (2017) Tau Isoforms Imbalance Impairs the Axonal Transport of the Amyloid Precursor Protein in Human Neurons. *The Journal of Neuroscience* 37:58-69.

Luchsinger JA, Tang M-X, Stern Y, Shea S, Mayeux R (2001) Diabetes Mellitus and Risk of Alzheimer's Disease and Dementia with Stroke in a Multiethnic Cohort. *American Journal of Epidemiology* 154:635-641.

Mellone M, Kestoras D, Andrews MR, Dassie E, Crowther RA, Stokin GB, Tinsley J, Horne G, Goedert M, Tolkovsky AM, Spillantini MG (2013) Tau Pathology is Present *In Vivo* and Develops *In Vitro* in Sensory Neurons from Human P301S Tau Transgenic Mice: A System for Screening Drugs against Tauopathies. *The Journal of Neuroscience* 33:18175-18189.

Mertens J, Stüber K, Poppe D, Doerr J, Ladewig J, Brüstle O, Koch P (2013) Embryonic stem cell-based modeling of tau pathology in human neurons. *The American Journal of Pathology* 182:1769-1779.

Morris M, Maeda S, Vossell K, Mucke L (2011) The Many Faces of Tau. *Neuron* 70:410-426.

Nacharaju P, Lewis J, Easson C, Yen S, Hackett J, Hutton M, Yen SH (1999) Accelerated filament formation from tau protein with specific FTDP-17 missense mutations. *FEBS Lett* 447:195-199.

Nilsson P, Saido TC (2014) Dual roles for autophagy: degradation and secretion of Alzheimer's disease Aβ peptide. *Bioessays* 36:570-578.

Olsson A, Högglund K, Sjögren M, Andreassen N, Minthon L, Lannfelt L, Buerger K, Møller HJ, Hampel H, Davidsson P, Blennow K (2003) Measurement of α- and β-secretase cleaved amyloid precursor protein in cerebrospinal fluid from Alzheimer patients. *Exp Neurol* 183:74-80.

Otero MG, Alloatti M, Cromberg LE, Almenar-Queralt A, Encalada SE, Pozo Devoto VM, Bruno L, Goldstein LS, **Falzone TL** (2014) Fast axonal transport of the proteasome complex depends on membrane interaction and molecular motor function. *J Cell Sci* 127:1537-1549.

Ott C, Jacobs K, Haucke E, Navarrete Santos A, Grune T, Simm A (2014) Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biology* 2:411-429.

Pozo Devoto VM, Dimopoulos N, Alloatti M, Pardi MB, Saez TM, Otero MG, Cromberg LE, Marín-Burgin A, Scassa ME, Stokin GB, Schinder AF, Sevlever G, **Falzone TL** (2017) αSynuclein control of mitochondrial homeostasis in human-derived neurons is disrupted by mutations associated with Parkinson's disease. *Scientific Reports* 7:5042.

Rodríguez-Martín T, Pooler AM, Lau DHW, Mórotz GM, De Vos KJ, Gilley J, Coleman MP, Hanger DP (2016) Reduced number of axonal mitochondria and tau hypophosphorylation in mouse P301L tau knockin neurons. *Neurobiology of Disease* 85:1-10.

Saido T, Leissring MA (2012) Proteolytic degradation of amyloid β-protein. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a006379.

Spillantini MG, Goedert M (2013) Tau pathology and neurodegeneration. *The Lancet Neurology* 12:609-622.

Stokin GB, Goldstein LS (2006) Axonal transport and Alzheimer's disease. *Annu Rev Biochem* 75:607-627.

Stokin GB, Lillo C, Falzone TL, Brusch RG, Rockenstein E, Mount SL, Raman R, Davies P, Masliah E, Williams DS, Goldstein LS (2005) Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science* 307:1282-1288.

Tai HC, Schuman EM (2008) Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction. *Nat Rev Neurosci* 9:826-838.

Tai HC, Serrano-Pozo A, Hashimoto T, Frosch MP, Spire-Jones TL, Hyman BT (2012) The synaptic accumulation of hyperphosphorylated tau oligomers in Alzheimer disease is associated with dysfunction of the ubiquitin-proteasome system. *Am J Pathol* 181:1426-1435.

Terada S, Kinjo M, Aihara M, Takei Y, Hirokawa N (2010) Kinesin-1/Hsc70-dependent mechanism of slow axonal transport and its relation to fast axonal transport. *Embo J*

29:843-854.

Tomlinson DR, Gardiner NJ (2008) Glucose neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci* 9:36-45.

Tseng BP, Green KN, Chan JL, Blurton-Jones M, LaFerla FM (2008) Abeta inhibits the proteasome and enhances amyloid and tau accumulation. *Neurobiol Aging* 29:1607-1618.

Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL (2004) Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. *Endocrine Reviews* 25:612-628.

Wu J, Zhou S-L, Pi L-H, Shi X-J, Ma L-R, Chen Z, Qu M-L, Li X, Nie S-D, Liao D-F, Pei J-J, Wang S (2017) High glucose induces formation of tau hyperphosphorylation via Cav-1-mTOR pathway: A potential molecular mechanism for diabetes-induced cognitive dysfunction. *Oncotarget* 8:40843-40856.