Universidade Federal do Rio de Janeiro

Disfunção Sináptica e Comprometimento do Transporte Axonal induzidos por Oligômeros do Peptídeo β-amilóide

Helena Decker

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Ciências

Rio de Janeiro
2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Helena Decker

Disfunção Sináptica e Comprometimento do Transporte Axonal induzidos por Oligômeros do Peptídeo β-amilóide

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Ciências

Orientador: Prof. Sérgio T. Ferreira

Rio de Janeiro
2010

Ficha Catalográfica

Decker, Helena.
Disfunção Sináptica e Comprometimento do Transporte Axonal induzidos por Oligômeros do Peptídeo β-amilóide – Helena Decker.
Rio de Janeiro: UFRJ/ICB, 2010.
127 fl.: 19 Il.
Orientador: Sérgio T. Ferreira
Dissertação (doutorado) – UFRJ / Instituto de Ciências Biomédicas / Programa de Pós-graduação em Ciências Morfológicas, 2010.
Referências Bibliográficas: f. 20
I. Doença de Alzheimer. 2. Oligômeros do peptídeo beta-amilóide 3. Receptor NMDA. 4. Disfunção sináptica. 5. Transporte axonal. 6. GSK-3β.

II. Sérgio T. Ferreira. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-graduação em Ciências Morfológicas. III. Título.

Helena Decker

Disfunção Sináptica e Comprometimento do Transporte Axonal induzidos por Oligômeros do Peptídeo β-amilóide

Rio de Janeiro, 30 de junho de 2010

_____

Sérgio T. Ferreira
(Orientador, Professor titular do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ)

_____

João Batista Calixto
(Professor titular do Departamento de Farmacologia, UFSC)

_____

Roberto Paes de Carvalho
(Professor associado do Instituto de Biologia, UFF)

_____

Vivaldo Moura Neto
(Professor titular do Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ)

_____

Ana Maria Blanco Martinez
(Revisora, Professora associada do Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ)

_____

Ricardo Augusto de Melo Reis
(Professor associado do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ)

Esta tese foi realizada no Laboratório de Doenças Neurodegenerativas, do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação do Professor Sérgio T. Ferreira, com auxílios financeiros da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), do Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), do Howard Hughes Medical Institute (HHMI) e do Instituto Nacional de Neurociência Translacional (INNT).

Dedico esta tese aos meus pais, José e Maria Teresinha Decker,

pelo estímulo ao estudo e incondicional apoio

para concretização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de estar neste mundo, com muita saúde e disposição para trilhar os passos da minha vida.

Ao meu orientador Sérgio T. Ferreira, por todo apoio e atenção dedicados durante o desenvolvimento deste trabalho, e por ter apostado e confiado em mim mesmo nos momentos mais complicados. Muito obrigada por tudo!

Ao Prof. Michael A. Silverman, por ter me acolhido de braços abertos no seu laboratório em Vancouver, por ter me ensinado incondicionalmente e por ter confiado no meu potencial. Além disso, agradeço toda a dedicação e ajuda nas discussões do meu futuro acadêmico. Thank you so much!

À Professora Fernanda G. De Felice, pelo envolvimento e colaboração neste trabalho.

À CAPES e ao programa PDEE pelo financiamento das bolsas de estudos, tanto para o período realizado no Brasil, como o realizado em Vancouver.

Aos Professores do Curso de Pós-graduação em Ciências Morfológicas.

Agradeço aos amigos do laboratório de Doenças Neurodegenerativas (LDN): Sofia, Paulina, Rodrigo, Charles, Carol, Theresa, Fábio, Jordano, Letícia, Leo, Leozinho, Andrea, Adriano, Marcelo, Samantha, Milena, Omar, Gisele, Mychael, entre outros, por terem tornado tão especial os meus momentos no LDN. Também agradeço aos professores Paulo Alves, Paulo Louzada, Mathias e Margareth.

Agradeço aos amigos do laboratório do Prof. Silverman: Diana, Lawrence, Poyua, Momir, Kath, Anastásia, Karen, Natalie, entre outros. E em especial a minha aluna Sandra por ter me ajudado a quantificar meus dados de transporte. Thank you Sandy!

Agradeço às colegas do pensionato Santa Rosa de Lima, por terem tornado tão especial os meus momentos no Rio de Janeiro. Em especial à Iranildes e Jaqueline, que me acolheram de braços abertos na sua casa, o que foi essencial para minha sobrevivência nos últimos meses da minha tese.

Agradeço às técnicas do LDN, Mariângela e Maíra, por toda ajuda, e à técnica da SFU, Karen, por toda paciência e dedicação para realização do meu projeto.

Agradeço à Claudinha, pela ajuda durante toda minha tese, mas principalmente pela ajuda nos preparativos para impressão.

Agradeço à todos os funcionários da Universidade Federal do Rio de Janeiro e a Universidade Simon Fraser, por toda ajuda durante estes quatro anos, e agradeço principalmente à Tânia, secretária do Programa de Ciências Morfológicas.

Meus agradecimentos especiais a minha família que eu amo muito:

Aos meus pais, José e Teresinha, por todo amor e carinho dedicados à minha educação e a minha formação.

Às minhas irmãs, Patrícia, Luciana e Morgana, pela amizade e companheirismo.

Aos meus sogros, Raul e Fátima, por toda a força e estímulo.

Aos meus cunhados, Douglas, André, Rafael, Rodrigo, Eduardo, Bárbara e Ricardo, pela amizade e pela torcida.

Ao meu marido, companheiro e amigo, Diego, por todo compreensão, carinho, paciência e amor.

E a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para o sucesso deste trabalho.

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais

voltará ao seu tamanho original"

Albert Einstein

RESUMO

DECKER, Helena. Disfunção Sináptica e Comprometimento do Transporte Axonal induzidos por Oligômeros do Peptídeo β-amilóide. Rio de Janeiro, 2010. Tese (Doutorado em Ciências Morfológicas) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Oligômeros solúveis do peptídeo β-amilóide (AβOs), as principais neurotoxinas responsáveis pela patologia da Doença de Alzheimer (DA), se acumulam no cérebro de pacientes acometidos pela DA e se ligam seletivamente a terminais sinápticos excitatórios, o que desencadeia a falência sináptica. A identidade do receptor específico destes oligômeros ainda permanece desconhecida. Como os AβOs interferem com a função dos receptores glutamatérgicos do subtipo N-metil-D-aspartato (NMDAR), nós formulamos a hipótese de que a presença dos NMDARs é requerida para a ligação sináptica dos AβOs. Para investigar esta hipótese, foram utilizados vetores amplicon para silenciar os NMDARs em neurônios hipocampais em cultura. Este procedimento reduziu em cerca de 90% a expressão dendrítica de NMDARs e bloqueou o estresse oxidativo induzido por AβOs. De forma impressionante, o silenciamento de NMDARs aboliu a ligação de AβOs às sinapses. Entretanto, estes oligômeros não se ligam diretamente aos NMDARs, já que o tratamento com insulina, que induz a redução da expressão de sítios de ligação dos AβOs, não provoca a redução dos níveis de NMDARs na superfície neuronal. A identificação de NMDARs como componente-chave do complexo receptor da ligação de AβOs pode contribuir para o desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas para prevenir a falência sináptica induzida por AβOs. Outro aspecto da disfunção neuronal investigado neste trabalho diz respeito ao efeito dos AβOs no transporte axonal, fundamental para a comunicação e sobrevivência neuronal. Já está bastante estabelecido que o comprometimento do transporte axonal é uma característica inicial em várias doenças neurodegenerativas, incluindo DA, porém os mecanismos responsáveis ainda são pouco conhecidos. Através de imageamento em tempo real, nós observamos que AβOs induzem o comprometimento do transporte de vesículas secretórias densas (DCVs) e mitocôndrias em neurônios hipocampais em cultura. Antagonistas de NMDAR, incluindo D-AP5, MK801 e memantina, preveniram o déficit no transporte induzido por AβOs, identificando o NMDAR como um participante inicial deste mecanismo, ainda na membrana celular. Tanto a inibição farmacológica quanto a expressão de uma forma dominante negativa da proteína quinase glicogênio sintase -3β (GSK-3β) preveniram o comprometimento no transporte induzido por AβOs. Além disso, foi demonstrado, através de técnicas bioquímicas e imunocitoquímicas, que os AβOs não afetam a estabilidade e integridade dos microtúbulos (MTs), indicando que AβOs comprometem o transporte axonal por um mecanismo mais sutil do que a desintegração dos MTs, como, por exemplo, a desregulação de vias de sinalização intracelular. Estes resultados demonstram que os AβOs afetam o transporte axonal negativamente por um mecanismo iniciado por NMDARs e mediado por GSK-3β e estabelece uma nova conexão entre AβOs e a patologia da DA.

ABSTRACT

DECKER, Helena. Disfunção Sináptica e Comprometimento do Transporte Axonal induzidos por Oligômeros do Peptídeo β-amilóide. Rio de Janeiro, 2010. Tese (Doutorado em Ciências Morfológicas) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Soluble oligomers of the amyloid-β peptide (AβOs), increasingly recognized as the main neurotoxins in Alzheimer's disease (AD) pathology, accumulate in AD brains and target excitatory post-synaptic terminals. This is thought to trigger synapse deterioration, a mechanism possibly underlying AD memory loss. A major unknown is the identity of the receptor(s) targeted by oligomers. Because oligomers interfere with N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) function, we hypothesized that NMDARs might be required for oligomer binding to synapses. An amplicon vector was used to knock-down NMDARs in mature hippocampal neuronal cultures, yielding 90% reduction in dendritic NMDAR expression and blocking oligomer-induced neuronal oxidative stress. Remarkably, NMDAR knock-down abolished oligomer binding to synapses. Nevertheless, oligomers do not directly bind to NMDARs, since insulin, which has been shown to down-regulate oligomer-binding sites, did not cause NMDAR down-regulation. Establishing that NMDARs are key components of the synaptic oligomer binding complex may illuminate the development of novel approaches to prevent synapse failure triggered by AβOs. Another issue investigated in this study is the effect of AβOs on axonal transport of organelles, a neuronal function crucial to communication and survival. Disruption of axonal transport is a hallmark of several neurodegenerative diseases, including AD. Even though defective transport is considered an early pathologic event, the mechanisms by which neurodegenerative insults impact transport are poorly understood. We show that AβOs induce disruption of organelle transport in primary hippocampal neurons in culture. Live imaging of fluorescent protein-tagged organelles revealed a marked decrease in axonal trafficking of dense-core vesicles and mitochondria in the presence of 0.5 μM AβOs. NMDAR antagonists, including D-AP5, MK801 and memantine, prevented the disruption of trafficking, thereby identifying signals for AβO action at the cell membrane. Significantly, both pharmacological inhibition of glycogen synthase kinase-3β (GSK-3β) and transfection of neurons with a kinase-dead form of GSK-3β prevented the transport defect. Finally, we demonstrate by biochemical and immunocytochemical means that AβOs do not affect microtubule stability, indicating that disruption of transport involves a more subtle mechanism than microtubule destabilization, likely the dysregulation of intracellular signaling cascades. Results demonstrate that AβOs negatively impact axonal transport by a mechanism that is initiated by NMDARs and mediated by GSK-3β and establish a new connection between toxic Aβ oligomers and AD pathology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1) Alterações anatômicas histopatológicas da doença de Alzheimer.....3

Figura 2) Produção e agregação do peptídeo Aβ.....9

Figura 3) Hipótese da cascata amilóide atualizada.....13

Figura 4) Estrutura dos microtúbulos (MTs).....22

Figura 5) Papel fisiológico e patológico da proteína tau fosforilada.....25

Figura 6) Transporte axonal e proteínas motoras.....27

Figura 7) Superfamílias das quinesinas (KIFs) e o transporte axonal e dendrítico de suas cargas..... 30

Figura 8) Os três possíveis mecanismos de regulação do transporte bidirecional.....34

Figura 9) Caracterização das preparações de AβOs.....42

Figura 10) Co-cultura neuronal de hipocampo de rato.....45

Figura 11) Resumo esquemático do protocolo de co-cultura neuronal.....48

Figura 12) Mapas dos plasmídeos amplicon.....50

Figura 13) Identificação axonal.....53

Figura 14) Quantificação do transporte axonal.....56

Figura 15) Fosforilação de tau em epítopos relacionados à DA, mas não em epítopos de ligação de tau aos MTs.....64

Figura 16) O gradiente espacial de tau hiperfosforilada está inalterado após 18h de tratamento com AβOs.....66

Figura 17) (Figura 4 do artigo de De Felice e cols. 2009). Insulina bloqueia o dano oxidativo induzido por ADDLs.....69

Figura 18) (Figura 5 do artigo de De Felice e cols. 2009). Insulina protégé contra a perda de sinapses induzida por ADDLs.....71

Figura 19) (Figura 2 do manuscrito de Bomfim e cols., 2010). Expressão de uma forma dominante negativa de JNK (JNK DN) bloqueia efeito de AβOs sobre níveis de IRS-1.....73

Figura 20 (Figura 3 do manuscrito de Bomfim e cols., 2010): Oligômeros de Aβ induzem comprometimento do transporte de DCVs via ativação de JNK.....75

Figura 21 (Figura 4 do manuscrito de Bomfim e cols., 2010): Exendina-4 e insulina previnem o comprometimento do transporte de DCVs ou mitocôndrias induzido por oligômeros Aβ.....76

Figura 22) Esquema que mostra o complexo receptor de AβOs nas sinapses.....82

Figura 23) Esquema que mostra a regulação da GSK-3β no controle da plasticidade sináptica dependente de NMDAR…….....85

Figura 24) Esquema que mostra a regulação da atividade das quinesinas por fosforilação……..88

Figura 25) Esquema que mostra o sumário dos possíveis mecanismos pelo qual AβOs comprometem o transporte axonal.....97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADDLs – oligômeros solúveis derivados de Aβ

AmpR - ampicilina

AMPA – ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiônico

APP – proteínas precursora amilóide

Aβ – peptídeo β-amilóide

AβOs – oligômeros solúveis de Aβ

BDNF – fator neurotrófico derivado de cérebro

CaMKII – proteína quinase II dependente de calmodulina

Ca^{2+} – cálcio

cdk5 – proteína quinase 5 dependente de ciclina

CK2 – proteína caseína quinase 2

DA – doença de Alzheimer

D-AP5 – ácido D(-)-2-Amino-5-fosfonopentanóico

DCVs – vesículas secretórias densas

DIC – contraste interferencial

DIV – dias *in vitro*

DK – do inglês, “dead kinase”

DYNs – dineínas

ECA – enzima conversora de angiotensina

EROs – espécies reativas de oxigênio

GLUR2 – subunidade tipo 2 do receptor subtipo AMPA

GSK-3β – proteína quinase glicogênio sintase-3β

HCMV – citomegalovirus humano

HSV-1 – herpes vírus simplex tipo 1

IAPP – polipeptídio amilóide da ilhota

IDE – enzima degradadora de insulina

JNK – proteína c-Jun N-terminal quinase

KIFs – quinesinas

KHCs – cadeias pesadas

KLCs – cadeias leves

LDN – Laboratório de Doenças Neurodegenerativas

LiCl – cloreto de lítio

LTD – depressão de longo termo

LTP – potenciação de longo termo

MAPs – proteínas associadas aos MTs

MAPK – proteína quinase ativada por mitógeno

Mem – memantina

MK-801 – (+)-5-metil-10,11-diidro-5H-dibenzo[a,d] ciclohepteno-5,10-imino maleato)

MTs – microtúbulos

NFs – neurofilamentos

NFTs – emaranhados neurofibrilares

NMDA – receptor N-metil-D-aspartato

NMDAR – receptor do subtipo NMDA

NPY – neuropeptídeo Y

SNC – sistema nervoso central

SVs – vesículas sinápticas

SOD – enzima superóxido dismutase

PET Scan – do inglês, “positron emission tomography”

PHFs – filamentos helicoidais pareados

PI3K – proteína fosfatidilinositol 3 quinase

PKA – proteína quinase dependente de AMP cíclico

$p75^{NTR}$ – receptor de neurotrofina p75

PP-2A – proteína fosfatase-2A

PSD – densidade pós-sináptica

PrP^{C} – proteína príon celular

RAGE – receptor de produtos de glicação avançada

Trk – receptores tirosina quinase

UBA – Universidade de Buenos Aires

SUMÁRIO

I) INTRODUÇÃO.....1
I.1) Doença de Alzheimer.....1
I.2) Marcadores histopatológicos da Dença de Alzheimer.....4
I.2.1) Agregados neurofibrilares.....5
I.2.2) Placas amilóides.....7
I.3) Cascata amilóide.....11
I.3.1) Fibras amilóides versus oligômeros do peptídeo Aβ.....11
I.3.2) Efeitos neurotóxicos dos oligômeros solúveis do peptídeo Aβ.....14
I.3.3) Possíveis ligantes dos oligômeros solúveis do peptídeo Aβ.....16
I.4) Transporte axonal.....19
I.4.1) Citoesqueleto neuronal: microtúbulos.....21
I.4.2) Citoesqueleto neuronal: proteínas motoras.....26
I.4.2.1) Superfamília das quinesinas (KIFs).....29
I.4.2.2) Dineínas (DYNs).....31
I.4.3) Coordenação Bidirecional do Transporte.....31
I.4.4) Envelhecimento, doenças neurodegenerativas e transporte axonal.....35

II) OBJETIVOS.....37

III) METODOLOGIA.....39
III.1) Preparação e caracterização dos oligômeros do peptídeo Aβ (AβOs).....40
III.2) Culturas primárias de hipocampo rato.....43
III.2.1) Protocolo 1: Cultura primária de neurônios hipocampais de rato.....43
III.2.2) Protocolo 2: Co-cultura neuronal de hipocampo de rato.....44
III.3) Silenciamento de receptores NMDA.....49
III.3.1) Construção dos vetores virais.....51

III.4) Avaliação do transporte axonal 52
III.4.1) Expressão de plasmídeos fluorescentes.....52
III.4.2) Aquisição dos filmes 54
III.4.3) Análise de dados.....55
III.5) Avaliação estrutural do citoesqueleto neuronal.....57
III.5.1) Ensaio bioquímico: fração solúvel e polimerizada de tubulina.....57
III.5.2) Ensaio imunocitoquímico: remoção das proteínas solúveis 58

IV) RESULTADOS.....59
IV.1) Artigo 1: Receptores NMDAR são requeridos para a ligação sináptica de oligômeros de Aβ.....61
IV.2) Artigo 2: Oligômeros de Aβ comprometem o transporte axonal através de um mecanismo dependente de receptores NMDA e mediado pela glicogênio sintase quinase 3β em neurônios hipocampais em cultura.....63
IV.3) Resultados adicionais (continuação do estudo do artigo 2): AβOs induzem hiperfosforilação de tau, mas não desintegração do MT.....63
IV.4) Resultados adicionais: colaboração no trabalho de De Felice e cols. 2009.....68
IV.5) Resultados adicionais: colaboração no trabalho de Bomfim e cols. 2010.....72

V) DISCUSSÃO.....78
V.1) Oligômeros de Aβ e o seu receptor específico.....78
V.2) Receptor NMDA: parte do complexo-receptor.....80
V.3) Receptor NMDA: efeito no transporte axonal.....83
V.4) Comprometimento do transporte: vias de sinalização.....87
V.5) Comprometimento do transporte: organização estrutural dos MTs.....92
V.6) Comprometimento do transporte: considerações finais.....94
V.7) Doença de Alzheimer e a promessa de tratamentos eficientes.....98

VI) CONCLUSÕES.....101

VII) REFERÊNCIAS.....102

VIII) ANEXOS.....123

INTRODUÇÃO

I.1) Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) é a forma mais prevalente de demência progressiva entre os idosos, afetando cerca de 25 milhões de pessoas em todo o mundo (Ferri e cols., 2005). Apesar dos avanços no diagnóstico e tratamento, a doença continua incurável mais de um século após sua descrição inicial. O maior fator de risco para o desenvolvimento da DA é a idade. A incidência da DA é de cerca de 5 % em indivíduos com idade acima de 65 anos e 50% em indivíduos com mais de 85 anos (Lindsay e cols., 2002). A incidência da DA tem crescido muito nos últimos anos, pois está diretamente relacionada ao aumento da expectativa de vida da população. Uma vez que o aumento na expectativa de vida é um evento global, e que os custos individuais do tratamento da DA são muito elevados, a DA constitui um enorme problema de saúde pública. Dessa maneira, grupos de pesquisa no mundo inteiro dedicam seus esforços a melhor compreender os mecanismos que dão início a esta enfermidade e buscam a identificação de substâncias que possam ser utilizadas para interromper a progressão ou até mesmo reverter os sintomas da doença.

Esta doença é caracterizada pelo progressivo declínio da função cognitiva, extinguindo características inerentes à natureza humana, privando os indivíduos de capacidades como aquisição e consolidação de memória, raciocínio, abstração e linguagem. A progressão da doença acarreta grave perda de memória, atenção, fala e

alterações comportamentais incluindo distúrbios depressivos e psiquiátricos. Geralmente o curso médio da DA é de 8 anos, quando, enfim, ocorre um estado de incapacitação total das funções dos pacientes, que precede o óbito.

Por motivos ainda não completamente elucidados, a progressão desta patologia ocorre por um processo de disfunção neuronal seguido de extensa neurodegeneração que se inicia em áreas cerebrais específicas decisivas para as funções da memória, como o hipocampo, córtex frontal e entorrinal. Inicialmente, a memória explícita ou declarativa, que se refere à recordação de fatos ou acontecimentos, em oposição às habilidades motoras, é a mais prejudicada. Após alguns anos, a morte neuronal se estende para praticamente todas as regiões do cérebro. A atrofia cerebral generalizada é evidente em fases terminais da doença, e pode-se visualizar um considerável alargamento dos sulcos e estreitamento dos giros em comparação a um cérebro normal (Figura 1A). Além disso, os pacientes acometidos pela DA exibem grande diminuição no metabolismo energético no córtex frontal e nos lobos temporais (Figura 1B).

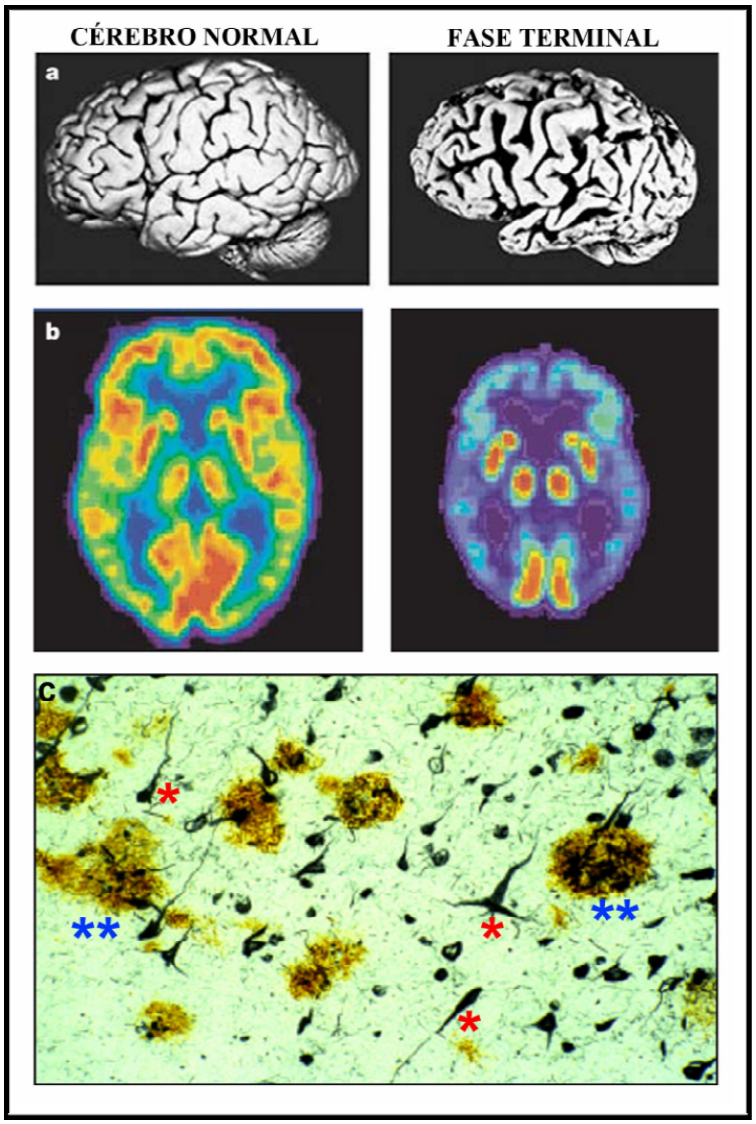


Figura 1. Alterações anatômicas e histopatológicas da doença de Alzheimer. A) Comparação entre um cérebro saudável ou normal (à esquerda) e um cérebro acometido pela Doença de Alzheimer (DA) (à direita). Note que em fases terminais da doença ocorre um considerável alargamento dos sulcos e estreitamento dos giros, além da evidente atrofia cerebral em comparação a um cérebro normal. B) Imagens de PET Scan (do inglês, "positron emission tomography") demonstrando a captação de glicose no cérebro de uma pessoa saudável (à esquerda) e um cérebro acometido pela DA (à direita) (cores vermelha e amarela revelam altos níveis de captação de glicose). C) Cortes histopatológicos *post-mortem* (coloração por prata) de cérebro de paciente com DA demonstrando emaranhados neurofibrilares (* cor vermelha) e placas amilóides (** cor azul) circundadas por neuritos distróficos. Adaptado de Mattson (2004).

I.2) Marcadores histopatológicos da Doença de Alzheimer

O primeiro caso de DA foi relatado em 1906 pelo médico neuropatologista Alois Alzheimer (1864-1915) durante um congresso científico na Alemanha. Dr. Alzheimer descreveu uma enfermidade psíquica que envolvia oscilações nos estados de ânimo e considerável perda de memória em uma de suas pacientes, Auguste D., internada no 'Asilo para enfermos mentais e epiléticos' de Frankfurt, Alemanha. A análise histopatológica *post-mortem* de seu cérebro revelou a presença de algumas lesões, como formações filiformes e outras compactas, e Dr. Alzheimer intuiu que a causa das espetaculares alterações na personalidade residia nessas lesões. Este médico entrou para a história da medicina e esta doença foi batizada com seu nome.

Somente cerca de 80 anos após esta descrição inicial, as lesões neuropatológicas foram identificadas como emaranhados neurofibrilares, que constituem depósitos intraneuronais compostos pela proteína tau em um estado anormalmente hiperfosforilado (Grundke-Iqbal e cols., 1986), e placas amilóides ou senis, que são depósitos protéicos extracelulares compostos majoritariamente pelo peptídeo β-amilóide (Aβ) (Glenner & Wong, 1984; Masters e cols., 1985). Também são observados neuritos distróficos, astrócitos reativos e microglia ativada ao redor das placas (Dickson e cols., 1988; McGeer & McGeer, 2002). Até os dias de hoje, mais de cem anos após o primeiro relato, estes achados ainda são considerados os principais marcadores histopatológicos da DA, e a comprovação definitiva do diagnóstico de DA é realizada somente após a visualização *post-mortem* destes marcadores (Figura 1C). Na clínica, são realizados testes neuropsicológicos específicos (Langbart, 2002), que visam excluir outras possíveis

causas de demências e apontam para um provável diagnóstico de DA, o qual só será confirmado após a morte do paciente.

I.2.1) Agregados neurofibrilares

Os emaranhados neurofibrilares (NFTs) são agregados intraneuronais compostos primariamente pela proteína tau em um estado anomalamente hiperfosforilado, polimerizada em filamentos helicoidais pareados (PHFs) que se agregam no interior do neurônio (Grundke-Iqbal e cols., 1986; Goedert e cols., 1988). A proteína tau é uma das proteínas associadas ao microtúbulo (MAPs) e possui papel fundamental na regulação da dinâmica do microtúbulo neuronal. Uma vez hiperfosforilada, a tau perde sua capacidade fisiológica de ligar-se e estabilizar os microtúbulos (MTs). Sua função é normalmente regulada via fosforilação e de-fosforilação de sítios específicos que precedem a polimerização e formação dos NFTs (Wang & Liu, 2008).

Tau pode ser fosforilada em mais de 30 resíduos de serina/treonina por inúmeras quinases (Hanger e cols., 1998; Iqbal e cols., 2005), como a proteína quinase dependente de AMP cíclico (PKA) (Jicha e cols., 1999), a proteína quinase II dependente de calmodulina (CaMKII) (Xiao e cols., 1996), a proteína quinase glicogênio sintase-3β (GSK-3β) (Pei e cols., 1999), e a proteína quinase 5 dependente de ciclina (cdk5) (Pei e cols., 1998), sendo que todas essas quinases já foram encontradas em NFTs em análise *post-mortem* de pacientes acometidos por DA. Tanto cdk5 quanto GSK-3β estão associadas aos MTs e a fosforilação de tau por cdk5 promove sua subseqüente fosforilação por GSK-3β (Sengupta e cols., 1997). Além disso, a combinação de PKA e

CaMKII com GSK-3β ou cdk5, ou cdk5 mais GSK-3β, pode induzir a formação de NFTs em estudos realizados *in vitro*, com proteína tau fosforilada purificada de córtex de pacientes DA (Wang e cols., 2007). A de-fosforilação da tau anormalmente fosforilada é realizada, principalmente, pela proteína fosfatase-2A (PP-2A) (Wang e cols., 1995), que co-localiza com tau e MTs no tecido cerebral (Sontag e cols., 1999). Em cérebros de pacientes DA, tanto a atividade quanto os níveis de RNA mensageiro de PP-2A estão diminuídos (Gong e cols., 1993; Vogelsberg-Ragaglia e cols., 2001), e a diminuição da atividade cerebral de PP-2A resulta em hiperfosforilação de tau (Gong e cols., 2000; Planel e cols., 2001), tanto por reduzir o potencial de de-fosforilação quanto por aumentar a atividade das quinases PKA, CaMKII e membros da família das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) (Bennecib e cols., 2001; Kins e cols., 2003; Pei e cols., 2003).

No cérebro e no líquido cérebroespinal de pacientes com DA, os níveis de tau hiperfosforilada são 3-4 vezes maiores do que no cérebro de pessoas saudáveis (Khatoon e cols., 1992, 1994). De maneira semelhante, já foi demonstrado que oligômeros do peptídeo β-amiloide (AβOs) induzem aumento de 2-3 vezes nos níveis de tau hiperfosforilada em neurônios hipocampais em cultura (De Felice e cols., 2008).

I.2.2) Placas amilóides

Apesar do papel central do peptídeo Aβ, maior componente das placas amilóides (Masters e cols., 1985), na fisiopatologia da DA, é importante notar que este peptídeo é produzido ao longo da vida por seres humanos e outros mamíferos, sendo componente normalmente presente nos fluidos biológicos (Seubert e cols., 1992; Ghiso e cols., 1997) e no parênquima cerebral (Tabaton e cols., 1994). Sua degradação é realizada por várias enzimas, incluindo a neprisilina, a IDE (enzima degradadora de insulina), a ECA (a enzima conversora de angiotensina) e o proteassoma (Iwata e cols., 2005).

A produção do peptídeo Aβ é proveniente do processamento proteolítico da proteína precursora amilóide (APP). A APP exerce importante papel na regulação de funções celulares, especialmente no sistema nervoso central (SNC), onde está envolvida na plasticidade sináptica e sinaptogênese (Gralle & Ferreira, 2007). Na Figura 2 está exemplificada a via amiloidogênica de processamento da APP, na qual a proteína é clivada por β- e γ- secretases, originando o peptídeo Aβ (Selkoe, 2001). O ponto de clivagem do domínio transmembrana da APP é variável e, por isso, peptídeos Aβ de diferentes tamanhos, variando de 38 a 43 aminoácidos, são liberados no cérebro (Schoonenboom e cols., 2005). Entretanto, apenas as formas mais longas, contendo 40-43 aminoácidos (denominados $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$ ou $A\beta_{1-43}$, dependendo do número de aminoácidos) são encontradas nas placas amilóides, sendo o $A\beta_{1-42}$ a isoforma mais abundante nas lesões (Jarrett e cols., 1993).

No envelhecimento normal, o peptídeo Aβ liberado permanece solúvel no cérebro, sendo progressivamente degradado e/ou removido. Em indivíduos acometidos pela DA, o peptídeo Aβ, presente em grande quantidade, agrega formando fibrilas amilóides (Figura 2) que se depositam progressivamente no ambiente extracelular, acumulando-se na forma de placas amilóides (Stromer & Serpell, 2005).

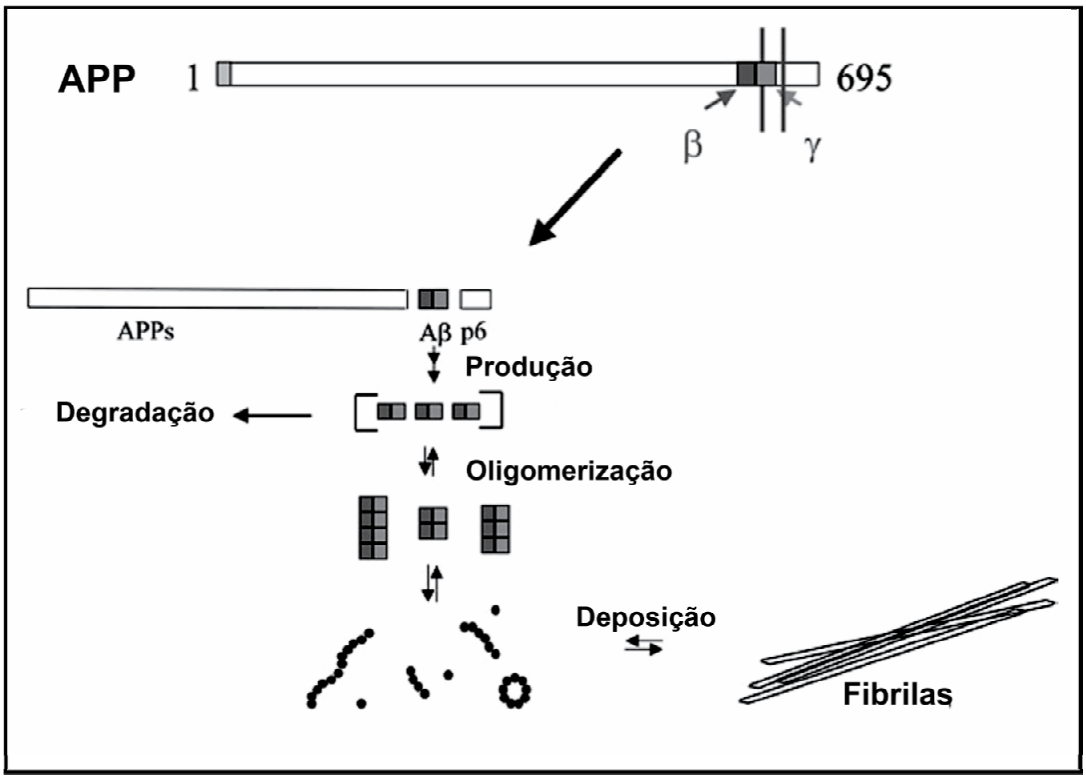


Figura 2. Produção e agregação do peptídeo Aβ. O peptídeo Aβ é gerado pela proteólise da proteína APP pelas enzimas β-secretase e γ-secretase. Os níveis de monômeros são controlados tanto pela taxa de produção quanto pela taxa de degradação. Certa quantidade de monômeros de Aβ pode se agregar formando oligômeros e posteriormente fibrilas. Adaptado de Walsh e cols (2005).

As placas amilóides são compostas predominantemente por fibrilas amilóides - extensos polímeros de morfologia fibrilar compostos por múltiplas subunidades do peptídeo Aβ interagindo entre si para formar folhas-β intermoleculares, com as fitas-β orientadas perpendicularmente ao eixo longitudinal da fibra (Stromer & Serpell, 2005). Este tipo de estrutura fibrilar amilóide já foi descrito em depósitos protéicos encontrados em variados tecidos em diversas patologias. Exemplos importantes são os corpúsculos de Lewy, agregados amilóides intracelulares da proteína alfa-sinucleína encontrados em neurônios da substância negra de portadores da Doença de Parkinson, e os depósitos amilóides pancreáticos compostos pelo polipeptídio amilóide da ilhota (IAPP) encontrados em pacientes com *diabetes mellitus* tipo II. Atualmente, são conhecidas mais de 30 doenças humanas, comumente denominadas amiloidoses, que têm como principal característica histopatológica a presença de depósitos amilóides de proteínas (Ferreira e cols., 2006). Apesar da completa ausência de homologia na seqüência de aminoácidos das proteínas que formam os depósitos em cada tipo de amiloidose, todas as fibras amilóides apresentam propriedades estruturais e morfológicas em comum (Stefani & Dobson, 2003).

I.3) Cascata amilóide

I.3.1) Fibras amilóides *versus* oligômeros do peptídeo Aβ

Com a finalidade de explicar a etiologia da DA, em 1992, um grupo de pesquisadores desenvolveu uma hipótese que ficou conhecida como "cascata amilóide". Com base nessa hipótese, a demência em DA depende da morte neuronal causada pelas fibras amilóides, as quais são encontradas nas placas amilóides (Hardy & Higgins, 1992). Durante muitos anos, as placas amilóides foram consideradas o achado fisiopatológico decisivo para a caracterização e desenvolvimento da DA. No entanto, recentes estudos demonstraram que estas placas são fracamente relacionadas com o declínio cognitivo (McLean e cols., 1999; Naslund e cols., 2000), e que a imunização passiva de camundongos transgênicos para DA com anticorpos monoclonais anti-Aβ pode reverter rapidamente a perda de memória, sem reduzir as placas amilóides, possivelmente através do aumento da remoção e/ou seqüestro de espécies solúveis do peptídeo Aβ (Dodart e cols., 2002; Kotilinek e cols., 2002).

Estes dados sugerem que formas solúveis (oligômeros) de Aβ, presentes no cérebro e no líquido cerebrospinal de pacientes em concentrações sub micromolares, ainda em fases precoces da doença em que não há morte neuronal, estão mais intensamente relacionados com o comprometimento da cognição (Gong e cols., 2003; Klein, 2006; Ferreira e cols., 2007; Haass & Selkoe, 2007). Além disso, observou-se também que os primeiros sintomas de déficit cognitivo se manifestam antes mesmo que

qualquer depósito fibrilar possa ser detectado, e que nesse estágio inicial da doença os níveis de oligômeros de Aβ já estão aumentados no fluido cerebrospinal (Lue e cols., 1999; McLean e cols., 1999). Alguns grupos chegam a propor, inclusive, que a formação de fibrilas amilóides, tidas inicialmente como o agente causador das alterações patológicas da DA, poderia representar uma estratégia do organismo para remover os oligômeros em circulação (Walsh & Selkoe, 2004; Ferreira e cols., 2007; Haass & Selkoe, 2007).

Após mais de uma década, com base nesses dados, surgiu uma nova versão da "hipótese da cascata amilóide" que propõe um mecanismo alternativo de perda de memória baseado no impacto de oligômeros pequenos e solúveis de Aβ nas sinapses neuronais (Klein e cols., 2001; Haass & Selkoe, 2007). A nova versão propõe que modificações graduais nos níveis do peptídeo Aβ (especialmente na forma de oligômeros solúveis de Aβ) promovem alterações sinápticas, ativação de microglia e astrócitos, conversão da proteína tau solúvel em agregados e, finalmente, em filamentos helicoidais pareados solúveis (PHF) (Haass & Selkoe, 2007). Estes eventos induzem a progressiva perda neuronal associada a múltiplas disfunções nos sistemas de neurotransmissores e déficit cognitivo (Figura 3).

Atualmente, os oligômeros solúveis de Aβ, diferentemente das fibras e monômeros de Aβ, são considerados as principais espécies responsáveis pelas manifestações iniciais da fisiopatologia da DA, como por exemplo, falência sináptica (Klein, 2006; Ferreira e cols., 2007).

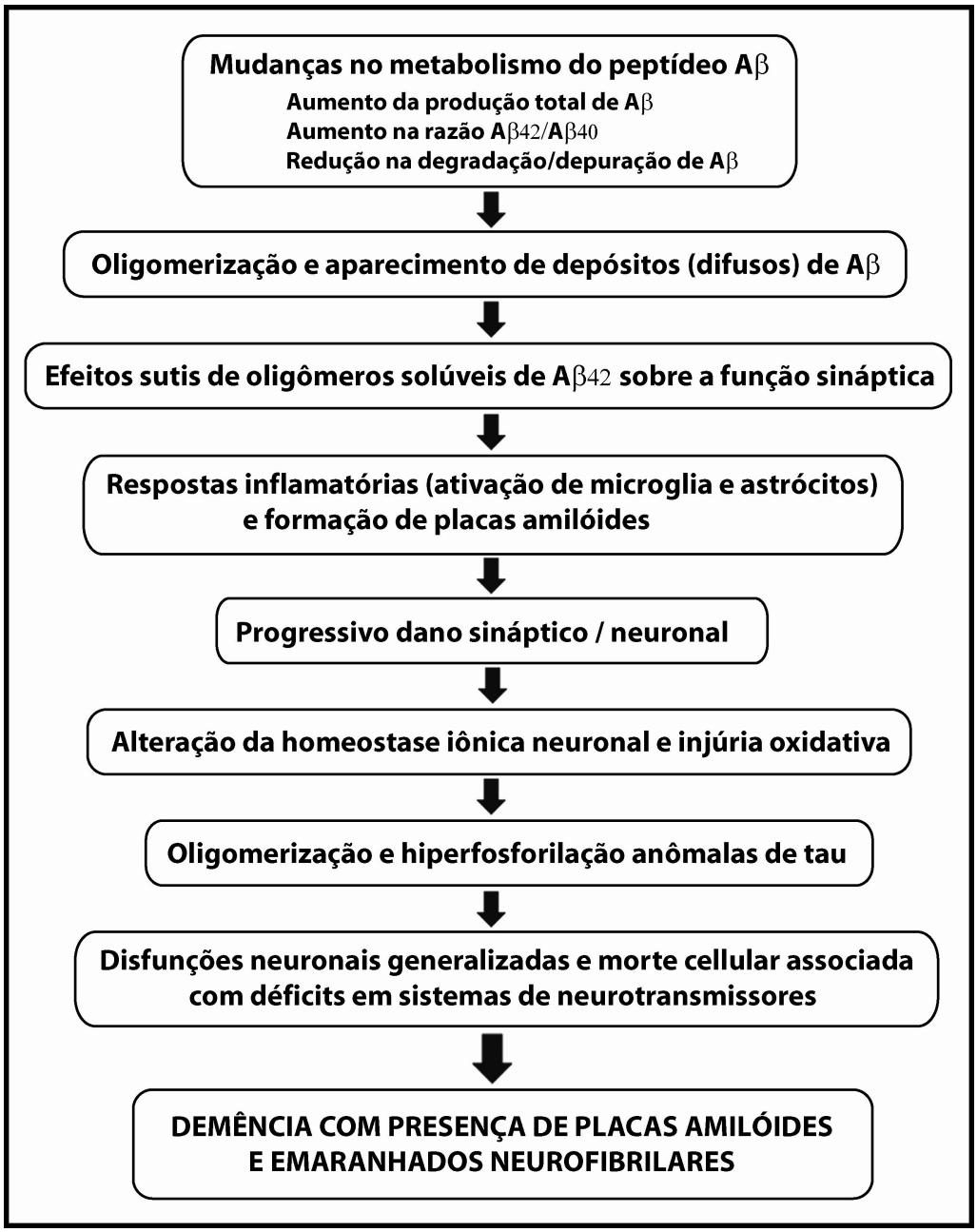


Figura 3. Hipótese da cascata amilóide atualizada. Seqüência hipotética de eventos deflagrados pelo peptídeo Aβ. Note que este é um mecanismo alternativo de perda de memória baseado no impacto dos oligômeros pequenos e solúveis de Aβ nas sinapses neuronais. Adaptado de Haass & Selkoe (2007).

I.3.2) Efeitos neurotóxicos dos oligômeros solúveis do peptídeo Aβ

Os oligômeros solúveis do peptídeo Aβ (também conhecidos como AβOs ou "ADDLs", do inglês "*Aβ-Derived Diffusible Ligands*") são ligantes patogênicos que se ligam às espinhas dendríticas de forma seletiva às sinapses (Lacor e cols., 2004), e induzem alterações características da patologia da DA.

Um estudo recente demonstrou que os AβOs induzem hiperfosforilação da proteína tau em neurônios hipocampais, indicando uma conexão direta entre AβOs e a patologia de emaranhados neurofibrilares encontrada na DA (De Felice e cols., 2008).

Nos cérebros de pacientes acometidos pela DA (Davies e cols., 1987; Moolman e cols., 2004) e de camundongos transgênicos expressando a proteína APP humana (Jacobsen e cols., 2006), ou presenilina-1 humana (Koffie e cols., 2009), ocorre uma diminuição dramática na densidade de espinhas dendríticas, que está fortemente associada com o declínio cognitivo encontrado nas fases iniciais da DA (Terry e cols., 1991). O ataque às sinapses é um evento precoce na DA, que precede a morte celular, e caracteriza a DA como uma doença sináptica (Selkoe, 2002). Curiosamente, a perda sináptica se mostrou mais pronunciada ao redor das placas amilóides (aproximadamente 15 μm das bordas das placas) (Spires e cols., 2005; Koffie e cols., 2009), o que sugere ser conseqüência de níveis aumentados de oligômeros solúveis de Aβ circundando as placas.

De fato, AβOs induzem disfunção sináptica por conseqüência da grande perda e distrofia das espinhas dendríticas em neurônios hipocampais em cultura (Lacor e cols., 2007; Shankar e cols., 2007). Além disso, AβOs desestabilizam proteínas do

citoesqueleto dos dendritos, diminuindo, por exemplo, a expressão de drebrina e aumentando a expressão de espinofilina de forma dependente de tempo e concentração (Lacor e cols., 2007). Esses dados indicam que AβOs são responsáveis por intensas alterações na plasticidade sináptica neuronal em um estágio inicial da doença.

Um trabalho do nosso grupo demonstrou que AβOs induzem desregulação da produção neuronal de espécies reativas de oxigênio (EROs) (De Felice e cols., 2007). Curiosamente, a produção transiente de EROs exerce papel modulatório sobre a potenciação de longo termo (LTP), uma forma de plasticidade sináptica amplamente utilizada como paradigma experimental para estudar os processos de formação de memória, enquanto níveis aumentados de EROs estão implicados no comprometimento da LTP induzido com o envelhecimento (Serrano & Klann, 2004).

Tanto AβOs extraídos de cérebros de pacientes acometidos pela DA quanto AβOs sintéticos preparados em laboratório bloqueiam a LTP, assim como também a reversão da depressão de longo termo (LTD) (Walsh e cols., 2002; Wang e cols., 2002; Shankar e cols., 2008), outra forma de plasticidade sináptica para estudar os processos de formação de memória. De fato, já foi demonstrado que AβOs interferem rapidamente e de forma reversível com a memória de um comportamento aprendido em ratos (Cleary e cols., 2005). O ataque das sinapses pelos AβOs constitui um mecanismo específico de comprometimento da memória e mecanismos relacionados à plasticidade sináptica (Gong e cols., 2003; Klein e cols., 2004).

I.3.3) Possíveis ligantes dos oligômeros solúveis do peptídeo Aβ

As bases moleculares para a especificidade da ligação sináptica dos AβOs ainda não são totalmente compreendidas. Já foi demonstrado que a ligação desses oligômeros é abolida pela tripsinização controlada da superfície neuronal (Lambert e cols., 1998), e que os AβOs se ligam de forma específica em terminais sinápticos em neurônios hipocampais e se co-localizam com marcadores sinápticos, como a proteína da densidade pós-sináptica PSD-95 (Lacor e cols., 2004). A densidade pós-sináptica (PSD) é uma rede protéica composta por proteínas estruturais e de ancoramento, moléculas de adesão e enzimas de sinalização celular. A PSD organiza e reúne receptores, canais iônicos, proteínas quinases e fosfatases. Normalmente, a área de PSD é proporcional ao número de receptores pós-sinápticos (Nusser e cols., 1998); sendo assim, a força da sinapse pode ser estimada pelo tamanho da PSD. A proteína PSD-95 é importante no ancoramento de receptores de glutamato às proteínas de sinalização e ao citoesqueleto neuronal (Hering & Sheng, 2001; Gerrow e cols., 2006).

Existem algumas proteínas sinápticas específicas de sítios positivos para PSD-95 que constituem potenciais candidatos para a ligação de AβOs. Uma dessas proteínas é o receptor glutamatérgico do subtipo N-metil-D-aspartato (NMDARs), que exerce funções fundamentais em mecanismos de plasticidade sináptica, como aprendizado e memória (Morris e cols., 1986; Collingridge & Singer, 1990; Bliss & Collingridge, 1993). Dados publicados recentemente pelo nosso grupo mostram que NMDARs co-imunoprecipitam

com oligômeros em preparações de membrana sinaptossomal tratadas com AβOs e extraídas com detergente (De Felice e cols., 2007).

De forma bastante interessante, o impacto neuronal deletério dos AβOs mostrou-se dependente dos NMDARs em diversos estudos recentes. Já foi demonstrado que os AβOs estimulam a formação de EROs por um mecanismo dependente da ativação de NMDAR (De Felice e cols., 2007). A utilização de um anticorpo dirigido contra a porção extracelular da subunidade NR1 de NMDARs bloqueou totalmente a formação de EROs e reduziu de forma significativa a ligação de AβOs em neurônios hipocampais. Estes resultados sugerem que os AβOs se ligam muito proximamente ou diretamente aos NMDARs (De Felice e cols., 2007). Além disso, AβOs induzem desequilíbrio de funções fisiológicas reguladas pela ativação dos NMDARs, incluindo a desregulação da homeostase de cálcio (Kelly & Ferreira, 2006; De Felice e cols., 2007). Diversos trabalhos tem também demonstrado que AβOs reduzem os níveis de NMDARs de superfície (Snyder e cols., 2005; Lacor e cols., 2007; Shankar e cols., 2007; De Felice e cols., 2009), sendo este evento associado com estímulos de endocitose ou bloqueio do recrutamento para a membrana plasmática.

Trabalhos recentes sugerem outros possíveis alvos para os AβOs, como é o caso da proteína príon celular (PrP^{C}), que foi apontada como um possível receptor para a ligação de AβOs (Lauren e cols., 2009). Este estudo mostrou que AβOs se ligam com muita afinidade à PrP^{C}, sem requerer a conformação infecciosa PrP^{Sc}, em neurônios hipocampais em cultura. Anticorpos anti-PrP^{C} previnem a ligação de AβOs e o bloqueio

de LTP (Lauren e cols., 2009). Além disso, não foi observado os déficits de aprendizado e memória espacial em animais transgênicos para doença de alzheimer com expressão nula para PrP^C (uma alteração comum desses animais), o que indica que os déficits cognitivos encontrados na DA requerem PrP^C (Gimbel e cols., 2010). Entretanto, outro trabalho demonstrou que, em camundongos knockout para PrP^C, AβOs comprometem a memória a longo prazo da mesma maneira que em neurônios selvagens, o que sugere que os efeitos de AβOs são independentes da PrP^C (Balducci e cols., 2010). Estudos mais aprofundados serão necessários para elucidar a real participação da PrP^C na patologia da DA.

Outro possível candidato é o receptor glutamatérgico do subtipo AMPA (ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiônico). Resultados em neurônios hipocampais em cultura demonstram que a inibição farmacológica de receptores AMPA de superfície, particularmente a sua subunidade tipo 2 (GLUR2), inibe a ligação de AβOs em espinhas dendríticas (Zhao e cols., 2010). Além disso, resultados demonstram que AβOs interagem preferencialmente com complexos sinápticos que contenham GLUR2 e que calciuneurina, uma proteína fosfatase dependente de cálcio, regula o processo endocítico responsável pela rápida internalizarão de receptores AMPA ligados à AβOs (Zhao e cols., 2010).

Além disso, a interação de AβOs com o domínio extracelular do receptor de neurotrofina p75 ($p75^{NTR}$) parece estar envolvida na distrofia neurítica induzida por AβOs *in vitro* e *in vivo* (Knowles e cols., 2009). Outros possíveis receptores envolvidos

na ligação neuronal induzida por AβOs incluem o receptor de produtos de glicação avançada (RAGE) (Sturchler e cols., 2008) e a proteína Frizzled (Magdesian e cols., 2008), a qual induz a inibição da via de sinalização Wnt/β-catenina.

Nos últimos anos os avanços nessa área têm sido bastante significativos, porém até agora, o receptor específico de AβOs continua desconhecido.

I.4) Transporte axonal

As células neuronais são polarizadas em dois domínios: axonal e somatodendrítico. Esses dois domínios exibem grandes diferenças não somente morfológicas como funcionais. Dendritos são curtos, espessos nas regiões proximais e se afilam gradativamente, enquanto os axônios são finos e muito longos, em alguns casos apresentando até 10.000 vezes a área de superfície dos dendritos (Bartlett & Banker, 1984). Muitas das proteínas que são necessárias nos axônios e terminais sinápticos são sintetizadas no corpo celular e transportadas pelo axônio em complexos de proteínas ou organelas, também designados de cargas (Grafstein & Forman, 1980). Os dendritos possuem, além desse tipo de transporte, o transporte de RNAs mensageiros específicos que fornecem suporte para a síntese local de proteínas (Job & Eberwine, 2001).

O transporte axonal é responsável por movimentos bidirecionais de um grande número de componentes celulares, como mitocôndrias, endossomos, precursores de vesículas sinápticas (SVs) ou vesículas secretórias densas (DCVs , do inglês “Dense Core Vesicles”) (Borgonovo e cols., 2006). Muitos processos biológicos são facilitados por

estas organelas, incluindo sobrevivência neuronal, desenvolvimento, aprendizado e memória.

As células neuronais se comunicam principalmente via mensageiros químicos, liberados de SVs ou DCVs. SVs são formadas e preenchidas com neurotransmissores clássicos nos sítios pré-sinápticos, onde permanecem armazenando ou liberando seus conteúdos. Já as DCVs percorrem grandes distâncias no interior de axônios e dendritos, desde o corpo celular onde são formadas até sítios distais pré- e pós-sinápticos, onde seus conteúdos protéicos e neuropeptídicos são armazenados e liberados (Silverman e cols., 2005; Lochner e cols., 2008).

Geralmente, as organelas ou vesículas são transportadas por transporte axonal rápido a uma velocidade de 50-200 mm por dia, e as proteínas citoplasmáticas, como tubulina e neurofilamentos (NFs), são transportadas por transporte axonal lento a uma velocidade de 0,1–3 mm por dia (Hirokawa e cols., 1990; Hirokawa & Takemura, 2005). Os registros das distâncias percorridas pelas DCVs chegam a 10.000 vezes o diâmetro do corpo celular neuronal.

I.4.1) Citoesqueleto neuronal: microtúbulos

Os microtúbulos (MTs) se distribuem em orientação longitudinal tanto em axônios quanto em dendritos (Hirokawa, 1982), e servem de trilhos pelos quais as cargas serão transportadas (Figura 4) (Hirokawa, 1998). Os MTs são estruturas tubulares de aproximadamente 25 nm de diâmetro formadas por heterodímeros de α e β tubulina. Os mesmos possuem polaridade intrínsica, com rápido favorecimento da polimerização para a extremidade positiva (do inglês, extremidade "*plus end*") e uma lenta polimerização para a extremidade negativa (do inglês, extremidade "*minus end*") (Desai & Mitchison, 1997). Os MTs, tanto em axônios como em dendritos, são unipolares, com a extremidade "*plus end*" apontando para a direção oposta ao corpo celular (Burton & Paige, 1981; Baas e cols., 1988), com exceção dos dendritos proximais, que possuem polaridade mista (Baas e cols., 1988).

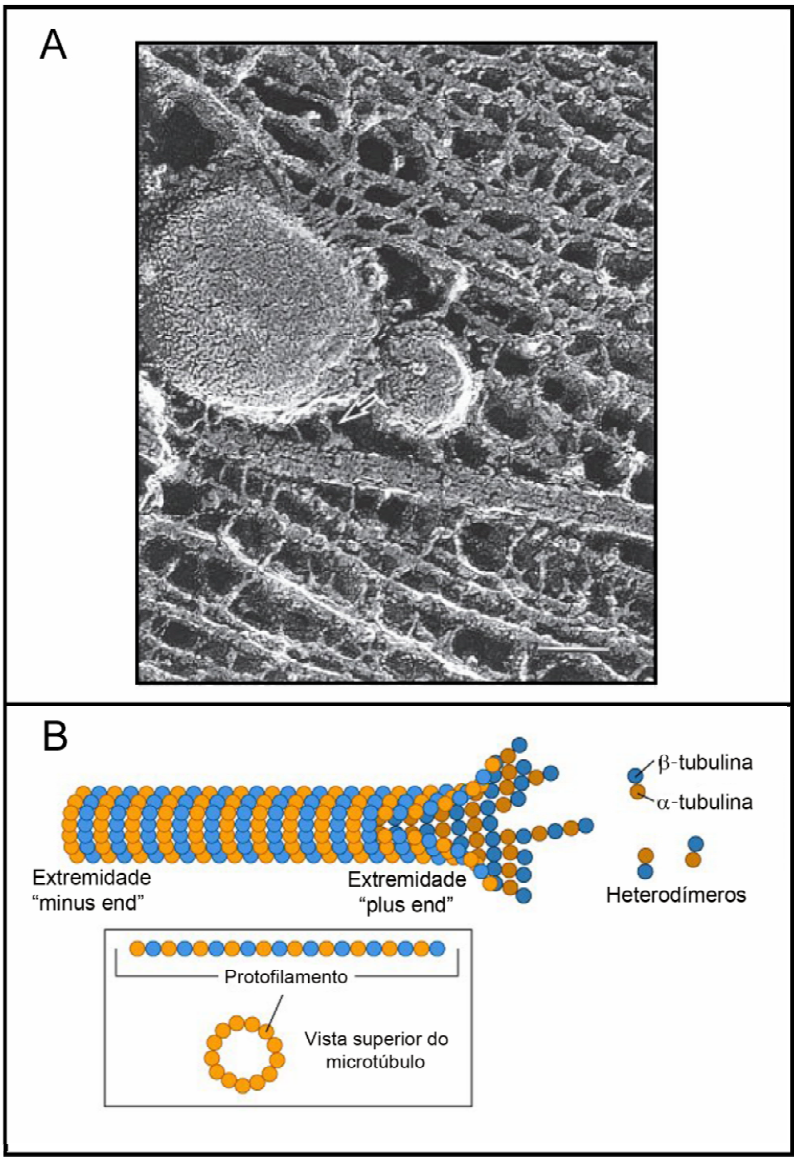


Figura 4. Estrutura dos microtúbulos (MTs). A) Pela eletromicrografia de um axônio de camundongo, podem-se visualizar as estruturas tubulares correspondentes aos MTs e uma organela sendo transportada com a ajuda de uma proteína motora (pequena estrutura tubular indicada pela seta). Barra de escala, 50 nm. B) Os MTs são formados pela organização tubular de 13 protofilamentos, os quais contem unidades repetidas de heterodímeros de α- e β- tubulina inseridos exclusivamente na extremidade "plus end". Adaptado de Hirokawa (1998) e do site manual.blueprint.org.

Os MTs nascentes são dinâmicos e instáveis (Desai & Mitchison, 1997), e várias proteínas associadas aos MTs (MAPs) controlam a sua dinâmica de polimerização *in vitro* e *in vivo*. As proteínas MAPs formam finas estruturas filamentosas que interligam os MTs, conferindo-lhes estabilidade estrutural (Hirokawa, 1982). Axônios e dendritos expressam MAPs diferentes, e possivelmente este é o fator que determina a diferença no espaçamento entre MTs em axônios (~ 20 nm) e em dendritos (~ 65 nm).

A proteína tau é uma das várias MAPs que regulam a dinâmica dos MTs (Wang & Liu, 2008) e nos últimos anos vários trabalhos relacionam sua função com patologias relacionadas com o transporte. A proteína tau exerce tanto papel fisiológico como patológico nas células (Figura 5). Quando o estado de fosforilação de tau está apropriadamente coordenado, tau exerce controle na regulação do crescimento neurítico (Biernat & Mandelkow, 1999; Biernat e cols., 2002), no transporte axonal (Spittaels e cols., 2000; Tatebayashi e cols., 2004) e na estabilidade e dinâmica dos MTs (Cho & Johnson, 2004). Entretanto, em condições patológicas, ocorre um desequilíbrio nos níveis de fosforilação e defosforilação e um aumento aberrante de tau fosforilada causa formação de filamentos de tau, componentes dos NFTs (Abraha e cols., 2000), desestabilização da estrutura dos MTs (Lu & Wood, 1993) e, possivelmente, favorece a morte celular (Fath e cols., 2002).

Alguns trabalhos associam a sobrexpressão de tau ao comprometimento do transporte axonal por prejudicar o acoplamento das proteínas motoras a suas cargas (Ebneth e cols., 1998; Trinczek e cols., 1999; Stamer e cols., 2002). Curiosamente,

entretanto, um recente estudo mostrou que os níveis de transporte axonal *in vivo* não são afetados pela deleção ou sobrexpressão de tau em camundongos (Yuan e cols., 2008).

Os axônios apresentam também os neurofilamentos (NFs), filamentos intermediários de aproximadamente 10 nm de diâmetro, que se interpõem aos MTs, formando uma rede fasciculada. A quantidade de NFs é diretamente proporcional à área do axônio (Hirokawa & Takemura, 2005).

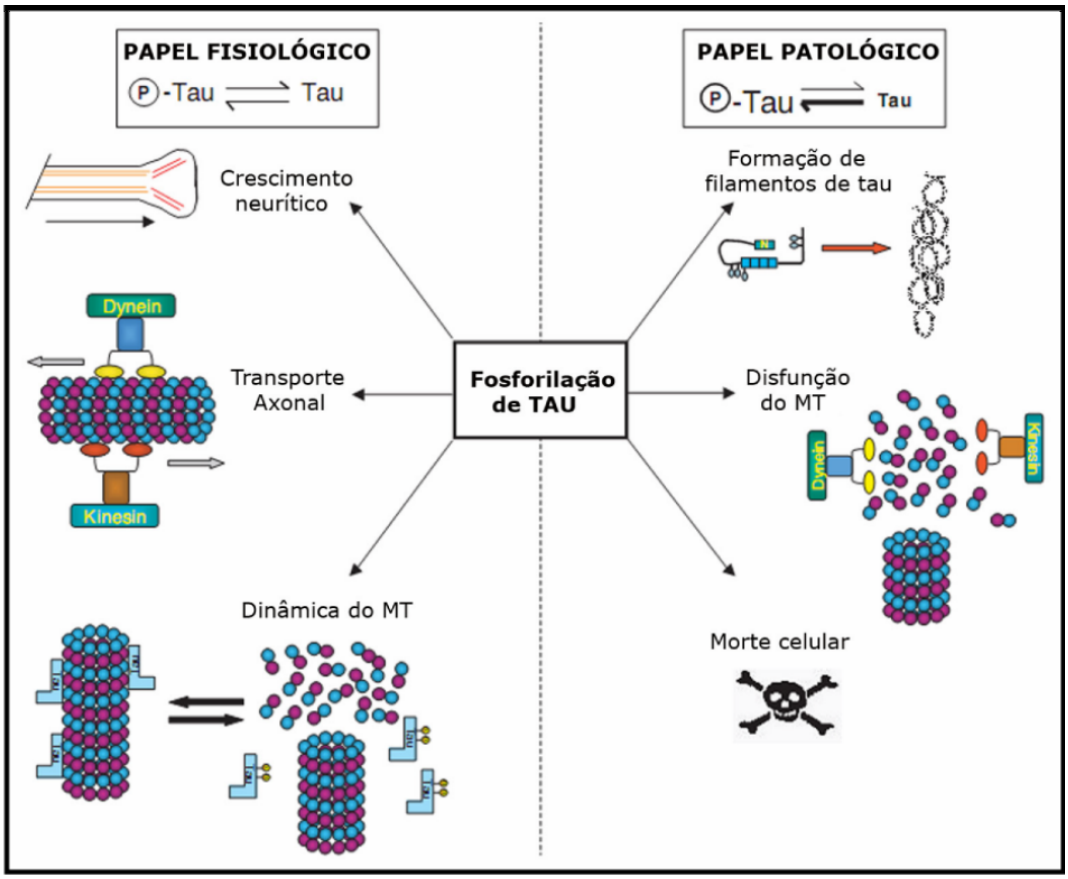


Figura 5. Papel fisiológico e patológico da proteína tau fosforilada. A proteína tau atua na estabilização dos MTs, crescimento neurítico e regulação do transporte axonal, e também em situações patológicas como na formação de protofibrilas, disfunção dos MTs e conseqüente morte celular. Adaptado de Johnson & Stoothoff (2004).

I.4.2) Citoesqueleto neuronal: proteínas motoras

Existem duas superfamílias de proteínas motoras que se movem sobre os MTs: A superfamília das quinesinas (KIFs) (Figura 6A), que, com exceção dos membros da família 14, se movem da porção proximal (ou seja, próximo ao corpo celular) em direção à porção distal (extremidade "*plus end*") dos MTs e participam do transporte anterógrado, transportando seletivamente moléculas do corpo celular neuronal para os axônios e dendritos; e a superfamília das dineínas (DYNs) (Figura 6A), que se movem da porção distal (dos terminais axonais ou dendríticos) em direção ao corpo celular, participando do transporte retrógrado (Vale e cols., 1985; Vallee e cols., 1988; Hirokawa e cols., 1990; Hirokawa, 1998; Vallee e cols., 2004).

O movimento das proteínas motoras é dependente da hidrólise de ATP, que dá suporte energético para que os domínios motores dessas proteínas se movam sobre os MTs (Vale, 2003). Em alguns casos, a maquinaria de transporte requer uma proteína adaptadora que se associa diretamente com a proteína motora e os componentes das vesículas e organelas. Um exemplo de proteína adaptadora é a dinactina, que está tipicamente associada com a proteína motora DYN, controlando o transporte retrógrado. Um artigo recente estabeleceu novos conceitos sobre as funções da dinactina na regulação do transporte de DCVs, os quais seriam mais abrangentes, por exercer controle também sobre o transporte anterógrado dependente de KIFs (Kwinter e cols., 2009).

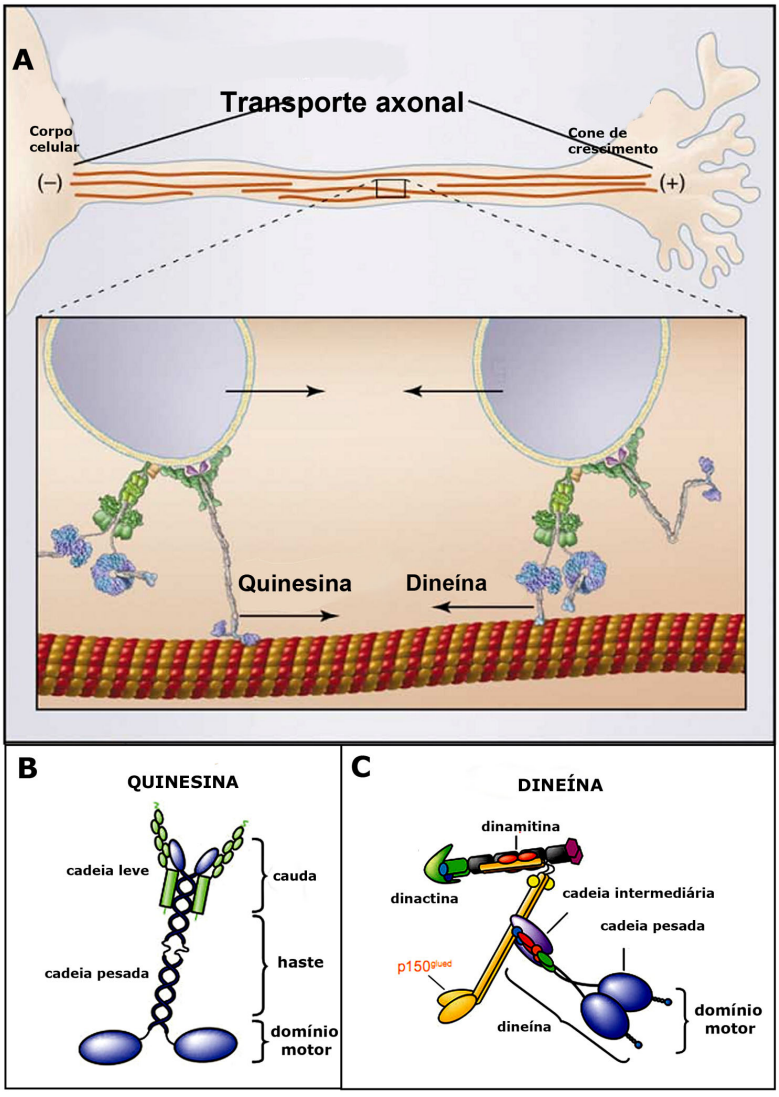


Figure 6. Transporte axonal e proteínas motoras. A) Existem duas superfamílias de proteínas motoras que se movem sobre os MTs, quinesinas (KIFs) que se movem na direção anterógrada e dineínas (DYNs) que se movem na direção retrógrada. B, C) Representações esquemáticas da estrutura das proteínas motoras KIFs e DYNs, respectivamente. A estrutura das KIFs consiste de duas cadeias pesadas e duas cadeias leves, dois domínios globulares (10 nm de diâmetro cada), uma haste e uma estrutura em forma de cauda. A estrutura das DYNs consiste de duas cadeias pesadas, três cadeias intermediárias, e quatro cadeias leves. Adaptado de Vale (2003) e De Vos e cols. (2008).

Alguns trabalhos identificaram a APP como um dos possíveis receptores da KIF 1 (Kamal e cols., 2000; Gunawardena & Goldstein, 2001). Outro trabalho sugere que o peptídeo Aβ pode ser gerado em trânsito, com o transporte das vesículas, assim ligando o transporte da APP com DA (Kamal e cols., 2001). Apesar de estes estudos estabelecerem conexões biológicas possíveis e surpreendentes entre o transporte axonal dependente de KIFs e o desenvolvimento da DA (Goldstein, 2001), estudos aprofundados precisam ser realizados, pois ainda existem contradições em relação a se estes achados condizem com o que acontece *in vivo* na DA.

O estudo do transporte de organelas tem sido amplamente investigado, pois ainda falta muito para a completa compreensão dos mecanismos que o controlam, incluindo sua especificidade, direcionalidade e controle temporal. O acoplamento das proteínas motoras às suas cargas é potencialmente um mecanismo regulador e, conseqüentemente, a busca por receptores e adaptadores que ligam as proteínas motoras às suas cargas tem sido um dos maiores focos de pesquisa dessa área.

I.4.2.1) Superfamília das quinesinas (KIFs)

A superfamília das KIFs é uma grande família de proteínas motoras dependentes de MTs, composta por 45 membros em camundongos e humanos (Aizawa e cols., 1992; Hirokawa, 1998; Miki e cols., 2001; Hirokawa & Takemura, 2004). A 'quinesina convencional' foi o primeiro membro a ser identificado bioquimicamente como integrante do transporte axonal rápido dependente de MTs (Brady, 1985; Vale e cols., 1985). Nos anos seguintes, várias proteínas motoras diferentes foram identificadas e caracterizadas. Somente recentemente, um grupo de pesquisadores estabeleceu uma nova nomenclatura para organizar e classificar as KIFs, baseada na organização em 14 grandes famílias (KIFs 1 a 14), para facilitar a compreensão do parentesco genético que já tinha sido identificado com nomes diferentes em várias filogenias (Lawrence e cols., 2004).

A estrutura das KIFs consiste de duas cadeias pesadas (KHCs) e duas cadeias leves (KLCs) (Vale e cols., 1985; DeBoer e cols., 2008), dois domínios globulares (10 nm de diâmetro cada), uma haste e uma estrutura em forma de cauda (Figura 4B), com o comprimento total de 80 nm (Figura 6B). Os domínios globulares (compostos pelas cadeias pesadas) possuem o domínio motor (alto nível de homologia entre as KIFs), e contêm uma seqüência de ligação ao MT e ATP. Todas as KIFs possuem seqüências diferentes fora do domínio motor, e a diversidade desses domínios, responsáveis pela ligação das proteínas motoras às suas cargas, o que explica como que as KIFs podem transportar muitas cargas diferentes (Scholey e cols., 1989; Hirokawa, 1998). Na Figura 7 podem-se observar diversos subtipos de KIFs e cada subtipo transportando seletivamente suas cargas em axônios ou em dendritos.

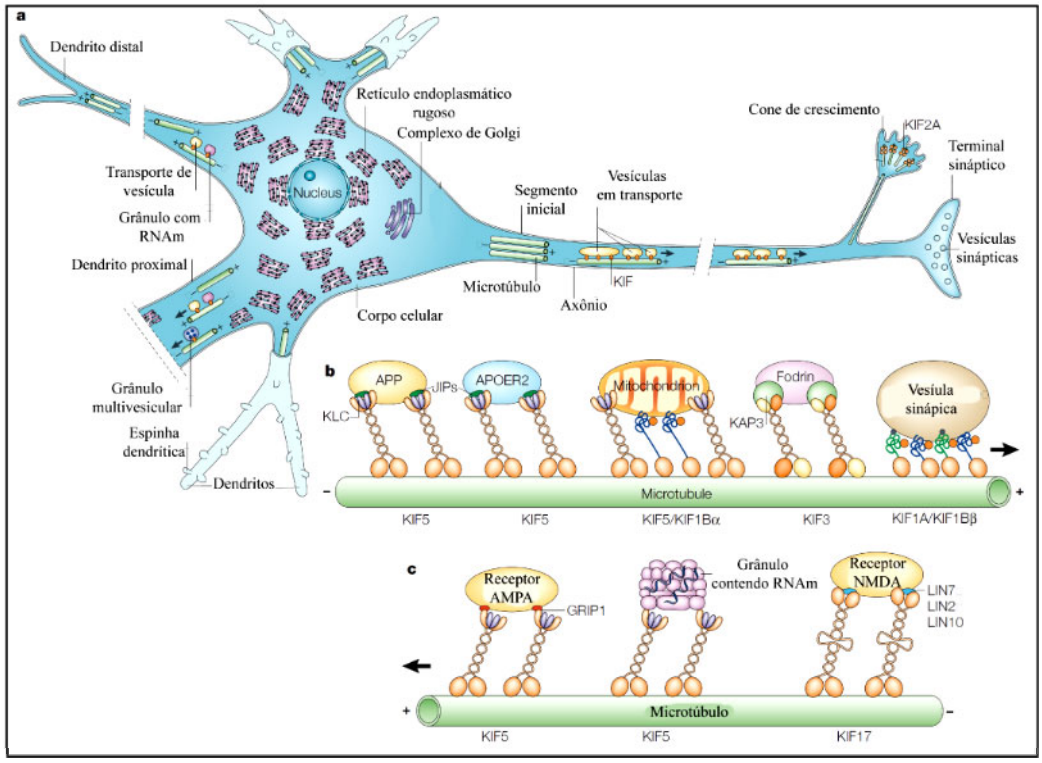


Figura 7. Superfamílias das quinesinas (KIFs) e o transporte axonal e dendrítico de suas cargas. a) Um exemplo representativo de um neurônio, estendendo seus dendritos (esquerda) e seu único axônio (direita) a partir do corpo celular. Podem-se visualizar diversas organelas sendo transportadas no axônio (b) ou nos dendritos (c) por diferentes KIFs de forma anterógrada sobre os MTs, como, por exemplo, a mitocôndria, sendo transportada pela KIF5 no axônio, e vesículas contendo NMDARs sendo transportadas pela KIF17 nos dendritos. Adaptado de Hirokawa & Takemura (2005).

I.4.2.2) Dineínas (DYNs)

A proteína motora dineína (DYN), também conhecida como dineína cerebral ou dineína citoplasmática, foi descoberta em 1987 (Lye e cols., 1987). Existe um grande número de exemplares com funções diferentes (Pfister e cols., 2005). Ela é composta por duas cadeias pesadas, três cadeias intermediárias, e quatro cadeias leves (Paschal e cols., 1987; Porter & Johnson, 1989). O complexo dineína citoplasmático é composto também por várias subunidades não catalíticas que conectam as proteínas adaptadoras, como dinactina e dinamitina, com as organelas (Figura 6C). As dineínas interagem com uma variedade de proteínas que não pertencem ao complexo estrutural, mas que são cruciais para suas funções celulares (Kardon & Vale, 2009).

I.4.3) Coordenação Bidirecional do transporte

Para manter a ordem nas avenidas intracelulares, o movimento das proteínas motoras precisa ser regulado. Por isso, é muito freqüente que o complexo proteína motora-organela troque de direção (como, por exemplo, da direção anterógrada para retrógrada), e o tempo de viagem nessas duas direções é determinado pela necessidade e distribuição de cada população de organelas.

O transporte bidirecional permite a regulação dinâmica, a correção de erros e a distribuição celular de organelas variadas (Gross e cols., 2002; Vale, 2003; Mallik & Gross, 2004; Welte, 2004; Muller e cols., 2008), incluindo mitocôndrias (Hollenbeck,

1996; Chada & Hollenbeck, 2003), endossomos (Hollenbeck, 1993), fagossomos (Blocker e cols., 1997), DCVs (Hayden, 1988; Wacker e cols., 1997), vírus (Smith e cols., 2001; McDonald e cols., 2002), e filamentos intermediários (Shah e cols., 2000), além de outras vesículas nos axônios e cones de crescimento de neurônios (Gilbert & Sloboda, 1984; Lochner e cols., 1998; Sabo & McAllister, 2003).

Quando o axônio está bloqueado, como, por exemplo, quando há a ruptura da estrutura do axônio, forma-se uma região de reversão. Após apenas alguns minutos, muitas organelas se acumulam no lado proximal da lesão e iniciam a reversão da direção de movimento, voltando para o corpo celular (Smith, 1988), onde as organelas podem instruir o núcleo para responder ao dano. Esta reversão de movimento pode ser mediada, pelo menos em parte, pelo recrutamento adicional de dineínas para estas organelas (Li e cols., 2000).

Existem algumas hipóteses para explicar a regulação do transporte bidirecional, representadas de forma resumida na Figura 6. Na primeira hipótese (Figura 8A), acredita-se que somente uma proteína motora pode estar acoplada à organela (ou carga) de cada vez e que os movimentos reversos acontecem quando a proteína motora acoplada é trocada pela proteína motora de polaridade oposta.

De acordo com a segunda hipótese (Figura 8B), ambas as proteínas motoras estão acopladas à carga e ao MT, trabalhando em sentidos opostos, e a direção do movimento depende da maior força relativa resultante da competição entre as proteínas motoras. Por exemplo, na Figura 8B, a proteína motora KIF é mais forte do que a DYN à esquerda, porém é mais fraca que duas DYNs à direita. Dessa forma, a carga da esquerda se move

de maneira anterógrada e a carga da direita se move de maneira retrógrada. E um detalhe importante é que mais de uma proteína motora ligada na mesma carga poderia oferecer maior vantagem (Mallik & Gross, 2004).

A terceira hipótese, que é atualmente a mais aceita, defende que ambas as proteínas motoras estão acopladas à carga, porém se movendo de forma unidirecional (somente uma das proteínas motoras, KIFs ou DYNs, está ativa). No momento em que o complexo proteína motora-organela recebe um sinal para alterar a direção, a proteína motora inativa assume o controle, recuperando a atividade e reprimindo a atividade da outra proteína motora. Para que este mecanismo funcione, existe uma complexa maquinaria de coordenação (representada em cor-de-rosa na Figura 8C), que determina quando uma das proteínas motoras está ativamente engajada com o MT e a outra proteína está desligada (Gross e cols., 2002; Gross, 2003; Welte, 2004; Muller e cols., 2008; Welte & Gross, 2008).

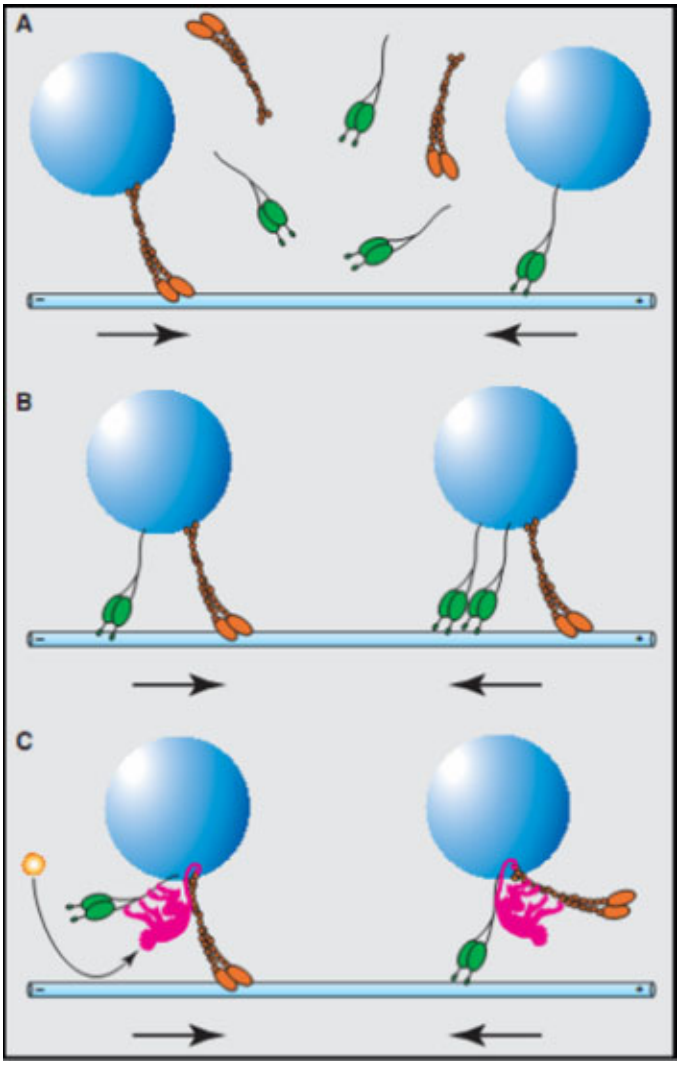


Figura 8. Os três possíveis mecanismos de regulação do transporte bidirecional. Proteínas motoras quinesinas estão representadas em coloração laranja e as dineínas estão em verde. Os receptores das cargas foram omitidos com o propósito de simplificação. A) Nessa hipótese, somente uma proteína motora pode estar acoplada à carga de cada vez. Os movimentos reversos acontecem quando a proteína motora acoplada é trocada pela proteína motora de polaridade oposta. B) Nessa hipótese, ambas as proteínas motoras estão acopladas à carga e ao MT, trabalhando em sentidos opostos, de forma que a direção do movimento depende da força relativa resultante da competição entre as proteínas motoras. (C) A terceira hipótese, atualmente mais aceita, defende que ambas as proteínas motoras estão acopladas à carga, e uma complexa maquinaria de coordenação (representada em cor-de-rosa), define quando determinada proteína motora deve estar ativamente engajada com o MT e a outra proteína desligada. Adaptado de Welte (2004).

I.4.4) Envelhecimento, doenças neurodegenerativas e transporte axonal

Durante o envelhecimento, o nosso corpo sofre alterações que induzem perda de funções celulares. Um exemplo disso é a redução no número e comprimento dos feixes de MTs em neurônios hipocampais de pacientes idosos (Cash e cols., 2003). De forma interessante, esse comprometimento da estrutura dos MTs não é dependente de alterações na proteína tau (Cash e cols., 2003), embora, durante o envelhecimento, ocorram alterações na distribuição de proteínas associadas ao MT, como a proteína tau no córtex frontal de ratos (Niewiadomska & Baksalerska-Pazera, 2003), e alterações morfológicas e bioquímicas de neurofilamentos (NF) no nervo ciático de camundongos (Uchida e cols., 2004). Vale, ainda, ressaltar, que já foi demonstrado que há o acúmulo de proteínas ao longo dos axônios no envelhecimento, como é o caso da proteína APP que se acumula em axônios comprometidos de ratos idosos (Kawarabayashi e cols., 1993). Porém, até agora não está bem esclarecido como estas mudanças que ocorrem no envelhecimento se relacionam e afetam o transporte axonal.

A perturbação do transporte neuronal é considerada uma manifestação patológica precoce em múltiplas doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Huntington (Trushina e cols., 2004), esclerose amiotrófica lateral (Morfini e cols., 2009), e a doença de Alzheimer (DA). Em particular, o comprometimento do transporte axonal foi encontrado em cérebro de pacientes com a DA (Muresan & Muresan, 2009) e em modelos animais da DA, como, por exemplo, camundongos transgênicos que sobrexpressam a proteína amilóide humana APP (Stokin e cols., 2005; Salehi e cols.,

2006), ou superexpressam a enzima superóxido dismutase (SOD) (Massaad e cols., 2010), ou que apresentam mutações na presenilina-1 (Lazarov e cols., 2007) ou na proteína tau (Ishihara e cols., 1999; Zhang e cols., 2004).

Nos últimos anos, alguns trabalhos demonstraram um efeito tóxico dos monômeros ou das fibras de Aβ sobre o transporte axonal em neurônios em cultura (Hiruma e cols., 2003; Rui e cols., 2006). Além disso, foi observado o comprometimento do transporte de organelas quando oligômeros de Aβ foram aplicados no meio intracelular de axoplasmas de lula gigante (Pigino e cols., 2009). Entretanto, ainda não foi investigado o papel dos oligômeros de Aβ (AβOs), as principais neurotoxinas responsáveis pela fisiopatologia da DA, sobre o transporte axonal em neurônios de mamíferos. Além disso, ainda são pouco compreendidos os mecanismos pelos quais diferentes insultos comprometem o transporte axonal.

II) OBJETIVOS

II.1) Objetivo Geral

Investigar mecanismos de disfunção sináptica e comprometimento do transporte axonal induzidos pelos oligômeros solúveis do peptídeo β-amilóide (AβOs).

II.2) Objetivos Específicos

II.2.1) Identificar alvos de ligação dos AβOS

II.2.1.1) Padronizar a técnica de knockdown de proteínas em culturas maduras de neurônios dissociados de hipocampo de rato (18 DIV), através da infecção neuronal com vetores virais expressando a seqüência "antisense" da subunidade NR1 do NMDAR.

II.2.1.2) Avaliar a ligação de AβOs em neurônios silenciados NR1-NMDAR com o intuito de identificar um possível alvo de ligação sináptica dos AβOs.

II.2.2) Avaliar os efeitos dos AβOs no transporte axonal de organelas em neurônios hipocampais em cultura.

II.2.2.1) Investigar os efeitos de AβOs sobre o transporte axonal de vesículas secretórias densas (DCVs) e mitocôndrias em neurônios hipocampais em cultura.

II.2.2.2) Caracterizar o mecanismo responsável pelo comprometimento do transporte axonal de organelas após 18h de exposição aos AβOs.

III) METODOLOGIA

Descrições detalhadas dos vários métodos utilizados no desenvolvimento desta tese encontram-se nos artigos em anexo (VIII). Entretanto, nesta seção, serão descritas, de forma detalhada, apenas algumas das metodologias empregadas, dentre as quais aquelas utilizadas nos resultados adicionais (IV.3) e aquelas que não eram empregadas no cotidiano do Laboratório de Doenças Neurodegenerativas (LDN) até sua implantação para este trabalho - UFRJ.

III.1) Preparação e caracterização de oligômeros do peptídeo Aβ (AβOs)

$A\beta_{1-42}$ (Bachem Inc., Torrance, CA) foram solubilizados em 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP; Merck, Darmstadt, DE) gelado e a solução límpida e incolor resultante a 1 mM foi incubada à temperatura ambiente, por 60 min. A solução foi então colocada em gelo por 5-10 min. e aliquotada, em fluxo laminar, em eppendorfs. Os eppendorfs foram deixados abertos na capela de fluxo laminar durante 12 horas à temperatura ambiente para permitir a evaporação do HFIP. A eliminação completa do HFIP foi realizada por centrifugação em SpeedVac por 10 min. As alíquotas contendo películas finas e transparentes de Aβ foram estocadas a -80 ºC para utilização posterior. As preparações de AβOs foram feitas, a partir destes estoques de Aβ, segundo protocolo previamente descrito por (Lambert e cols., 1998). A cada preparação de AβOs, uma alíquota Aβ foi dissolvida em DMSO fresco e anidro (Sigma) de forma a obter solução a 5 mM. Esta solução foi posteriormente diluída a 100 μM em PBS estéril e incubada a 4 ºC por 24 horas. Após a incubação, a preparação foi centrifugada a 14.000g por 10 min. a 4 ºC para remoção de agregados insolúveis de Aβ. O sobrenadante da centrifugação, contendo AβOs, foi mantido a 4 ºC até a sua utilização. Para determinar a concentração de AβOs, nas preparações, utilizou-se o método de BCA (Pierce, Rockford, IL).

Como são metaestáveis, as preparações de AβOs realizadas semanalmente no laboratório são rotineiramente analisadas por Western blot e HPLC para avaliar a composição dos agregados (Figura 9). Para as análises por Western blot, amostras das preparações foram adicionadas a tampão de amostra contendo tricina e resolvidas por

eletroforese em gel de gradiente de 4–20% de acrilamida com tampão de corrida Tris/Tricina/SDS, a 120 V por 80 min. a temperatura ambiente. O material no gel (20 pmol de Aβ/canaleta) foi transferido para membranas de nitrocelulose Hybond ECL (Amersham, Piscataway, NJ) a 100 V por 1 h a 4 °C, usando tampão contendo 25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% (v/v) metanol, 0.02% SDS, pH 8.3. As membranas foram bloqueadas com BSA 3% em tampão Tris-HCl 20 mM contendo 0.1% Tween-20 (TBS-T) por 1 h à temperatura ambiente. Um anticorpo monoclonal específico contra AβOs (NU4), gentilmente doado pelo Dr. William Klein, da Universidade Northwestern (Evanston, USA), foi diluído a 1µg/mL em BSA 3%/TBS e incubado com as membranas por 90 min. Após 3 lavagens de 10 minutos com TBS-T, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase na diluição de 1:20.000 (em TBS-T) por 1 hora. As membranas foram lavadas 3 vezes por 10 min. com TBS-T e reveladas com o substrato SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity (Pierce, Rockford, IL) diluído 1:1 em água, e expostas em filme KodaK.

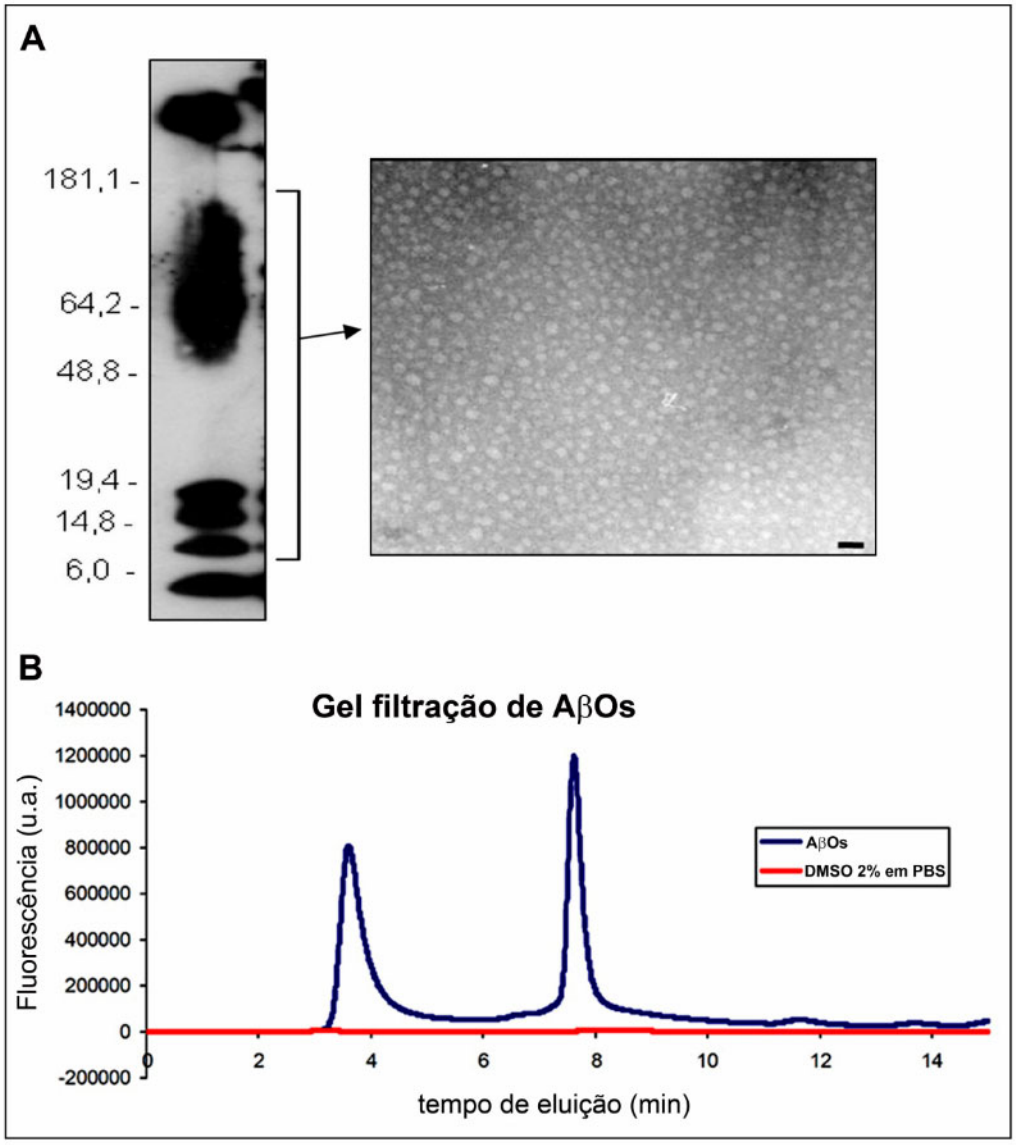


Figura 9. Caracterização das preparações de AβOs. A) *Western blot* representativo das preparações de AβOs (gentilmente cedido por Fabio F. Oliveira e Theresa R. Bomfim). O tamanho dos agregados varia de dímeros até oligômeros de ~ 50-100 kDa. No maior aumento (à direita), pode-se observar uma imagem de microscopia eletrônica de transmissão (aumento de 85.000x) obtida pela Dra. Andréa Paula-Lima (Universidad de Chile), onde é possível observar a conformação oligomérica dos agregados de AβOs. B) Cromatograma representativo de gel-filtração dos AβOs (gentilmente cedido por Jordano Brito-Moreira). Através da gel-filtração é possível detectar duas populações de agregados. A primeira, formada por oligômeros de alto peso molecular (50-100 kDa), elui entre 3,5 – 4 minutos, e a segunda formada por agregados de 2-3 monômeros, que eluem mais tarde, entre 7,5 – 8 minutos.

III.2) Culturas primárias de hipocampo de rato

III.2.1) Protocolo 1: Cultura primária de neurônios hipocampais de rato

Este protocolo foi desenvolvido segundo De Felice e cols. (2007). Embriões de rato Sprague-Dawley foram obtidos de ratas com 18 dias de gestação. Após decapitação dos embriões, os cérebros foram removidos e transferidos para uma placa de Petri contendo uma solução estéril de PBS contendo 2% de glicose a 37 ^{o}C. Com o auxílio de uma lupa, os hipocampos foram dissecados, as meninges foram retiradas e o tecido foi fracionado com tesoura cirúrgica estéril. As células foram dissociadas mecanicamente com pipetas Pasteur de pontas flambadas, e centrifugadas a 1000 g por 4 minutos à temperatura ambiente. Após remoção do sobrenadante, as células foram ressuspendidas em meio Neurobasal suplementado com 2% de suplemento B27 (Gibco, Grand Island, NY), 0.5 mM de glutamina (Gibco), 100 Unidades/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco) e 10 µg/mL de anfotericina-B (Cristália, Itapira, SP). Após quantificação em câmara de Neubauer, as células foram plaqueadas na densidade de 500 células/mm^2 em 100 µL de meio por poço. O plaqueamento foi feito em placas de 96 poços previamente tratadas com solução de poli-L-lisina a 10 µg/mL. As culturas foram mantidas a 37 ^{o}C, em estufa contendo 5% CO_2/95% ar atmosférico, por períodos de 18-21 dias *in vitro* (DIV).

III.2.2) Protocolo 2: Co-cultura de hipocampo de rato.

Este protocolo de co-cultura neuronal permite o cultivo de neurônios hipocampais em baixa densidade (Kaech & Banker, 2006), o que é um limitante para muitos protocolos convencionais. O segredo da baixa densidade neuronal é o suporte trófico fornecido pela monocamada de astrócitos cultivadas na placa de cultura sem contato direto com os neurônios. Esta configuração de cultura 'sanduíche', onde os neurônios crescem em um estreito espaço entre a lamínula e a superfície da placa de cultura (Figura 10A), cria um microambiente onde fatores secretados por neurônios e astrócitos se concentram e a tensão de oxigênio é reduzida (Brewer & Cotman, 1989).

Quando utilizado este protocolo, os neurônios hipocampais se tornam apropriadamente polarizados, desenvolvem extensas árvores dendríticas e axonais, e formam conexões sinápticas numerosas e funcionais (Figura 10B). Neurônios preparados através desse protocolo são utilizados largamente para visualizar a sub-localização de proteínas endógenas, para avaliar o transporte de proteínas e para estudar os mecanismos moleculares do desenvolvimento da polaridade neuronal, crescimento dendrítico e formação de sinapses.

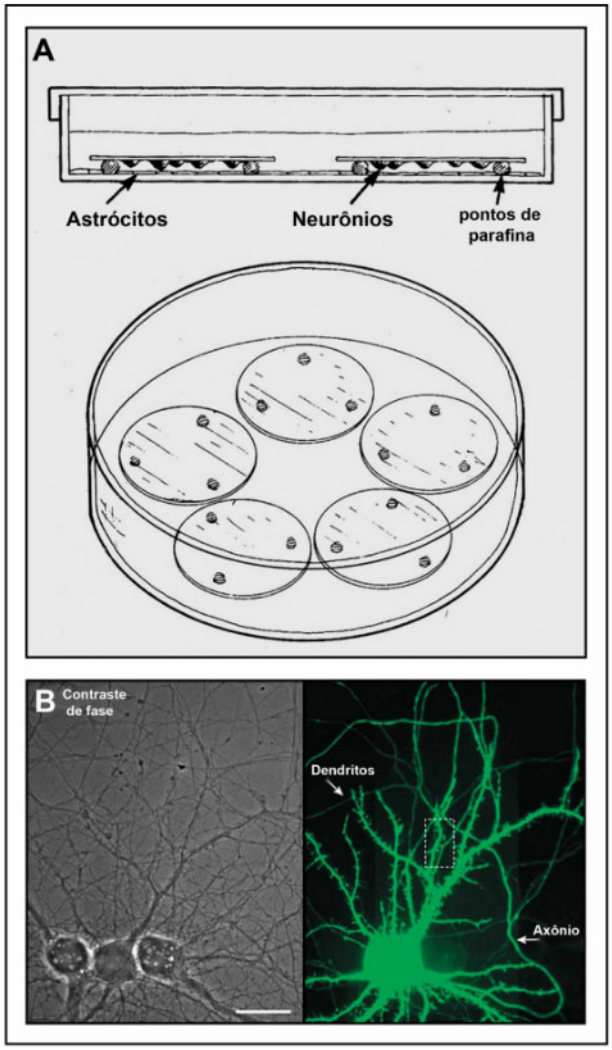


Figura 10. Co-cultura neuronal de hipocampo de rato. A) Esquema representativo da configuração de cultura 'sanduíche', em que os neurônios crescem em um estreito espaço entre a lamínula e a superfície da placa de cultura contendo a monocamada de astrócitos. B) Um exemplo representativo de uma cultura com 21 DIV. Através da imagem no contraste de fase (à esquerda), é possível identificar alguns corpos celulares e seguir o trajeto de alguns dendritos. Porém, é impossível identificar o axônio de cada célula. A expressão de GFP (à direita) permite a visualização completa do trajeto dos dendritos e permite a identificação do axônio do neurônio transfectado, que emerge próximo da base de um dendrito. As numerosas espinhas dendríticas são características dos neurônios piramidais nesse estágio de desenvolvimento. Barra de escala, 25 μm. Adaptado de Kaech & Banker (2006).

Este protocolo de cultura (representado de forma esquemática na Figura 11) envolve a preparação de uma suspensão de neurônios hipocampais dissociados, plaqueados em lamínulas de vidro tratadas com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich). Após a adesão neuronal, as lamínulas foram transferidas para placas de culturas contendo uma monocamada de astrócitos. Na prática, este protocolo foi desenvolvido em três etapas:

Etapa 1: A monacamada de astrócitos foi preparada a partir de córtices de ratos recém-nascidos (P1). As células gliais cresceram, inicialmente em garrafas, em meio suplementado com soro de cavalo até atingirem 85% de confluência, para então serem transferidas para placas de cultura. Aproximadamente 24 horas antes da etapa 3 (preparação de neurônios hipocampais), o meio foi substituído por meio Neurobasal sem soro suplementado com B27 e Glutamax (Invitrogen, Carlsbad, CA). Nesse período, a confluência da monocamada glial deve ser maior que 40% e os astrócitos já iniciaram a secreção de fatores tróficos, que condicionam e preparam o meio de cultura para os neurônios. A qualidade da camada glial é notavelmente importante para o desenvolvimento e maturação dos neurônios.

Etapa 2: Esta etapa é essencial para o sucesso da cultura e consiste no tratamento das lamínulas de vidro (de boa qualidade) com ácido nítrico, esterilização por calor, seguido do tratamento com poli-L-lisina. Os pontos de parafina devem ser preparados com cuidado para não desprenderem durante os dias de cultura, pois são estes pontos de parafina que mantêm a estreita distância entre os neurônios e a camada de células gliais.

Etapa 3: Os neurônios dissociados foram obtidos de hipocampos de embriões de ratos com 18 dias de gestação, e cultivados em lamínulas a uma densidade de 50-100

células/mm^2. Após um período de 2-3h em meio de plaqueamento para a adesão dos neurônios nas lamínulas, essas lamínulas foram transferidas de placa e suspensas (com a ajuda de pontos de parafina) sobre a camada de astrócitos. O meio de cultura já foi pré-condicionado com os fatores tróficos secretados pelos astrócitos, o que suporta o desenvolvimento e a viabilidade dos neurônios em baixa densidade.

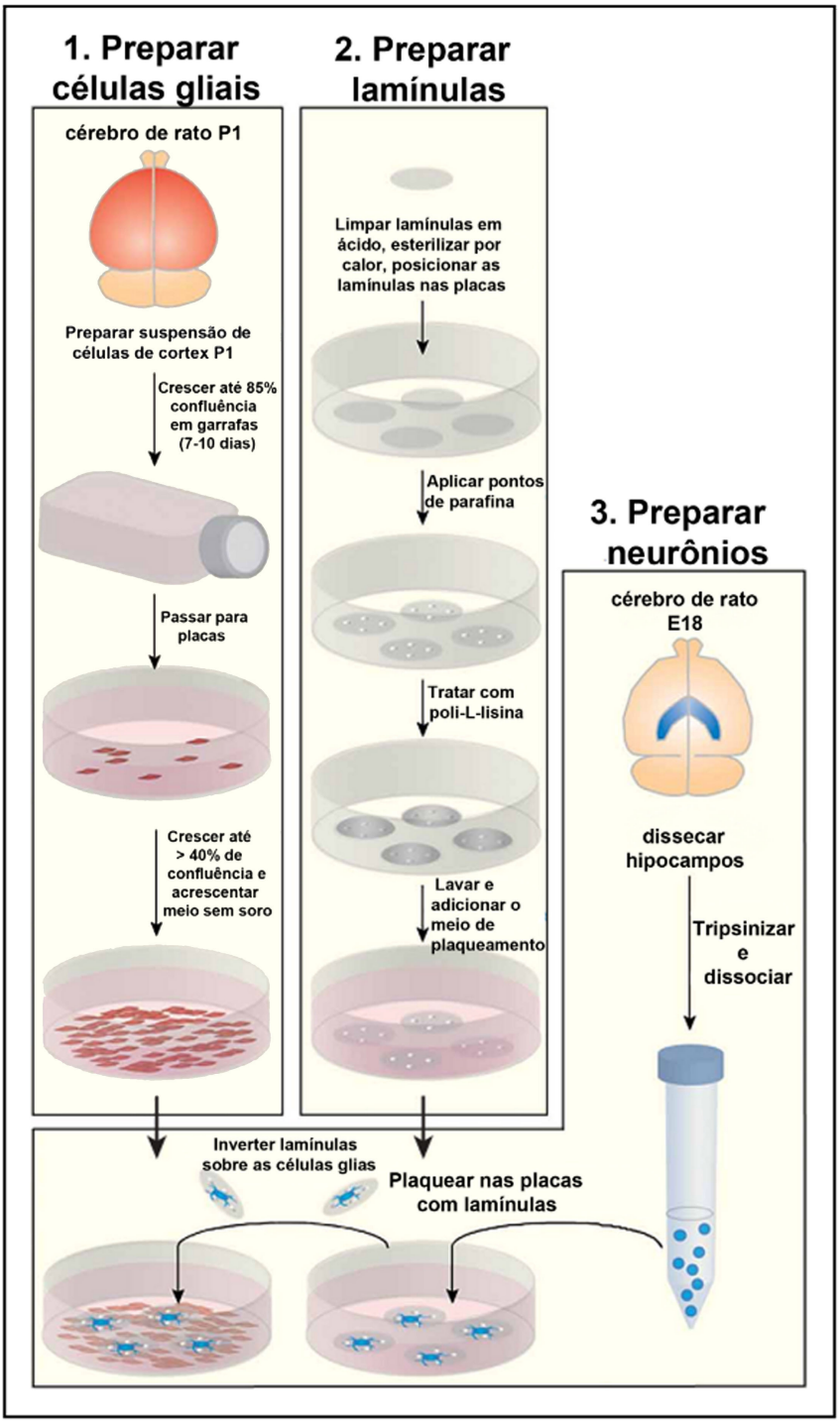


Figura 11. Resumo esquemático do protocolo de co-cultura neuronal. Adaptado de Kaech & Banker (2006).

III.3) Silenciamento de receptores NMDA

Os vetores virais utilizados são derivados do herpes vírus simplex tipo 1 (HSV-1) e foram construídos segundo Adrover e cols. (2003). Os plasmídeos amplicon utilizados contêm a origem de replicação de DNA e a seqüência de empacotamento do herpes vírus simplex tipo 1 (HSV-1), com dois transgenes que carregam a seqüência NR1 "antisense" (–) e a seqüência para proteína verde fluorescente GFP (Figura 12). As culturas de neurônios hipocampais cultivadas por 18 DIV (segundo protocolo descrito acima) foram expostas aos vetores virais A_2-GFP-NR1 (–) ("antisense") ou A_2-GFP-LacZ (controle de infecção), por 2 horas à 37 ^{o}C. Após infecção, o meio contendo os vetores virais foi removido e substituído por meio condicionado desta mesma cultura. Os ensaios foram realizados após 30 horas de silenciamento (tempo de meia vida dos NMDARs). Para determinar a eficiência do silenciamento dos NMDARs, os neurônios foram imunomarcados com anticorpo anti-NR1 (Santa Cruz, Temecula, CA; 1:50). Ensaios de imunocitoquímica foram realizados como descrito em De Felice e cols. (2008) e informações detalhadas estão descritas no artigo número 1 (Receptores NMDAR estão envolvidos na ligação sináptica de oligômeros de Aβ), atualmente submetido para publicação.

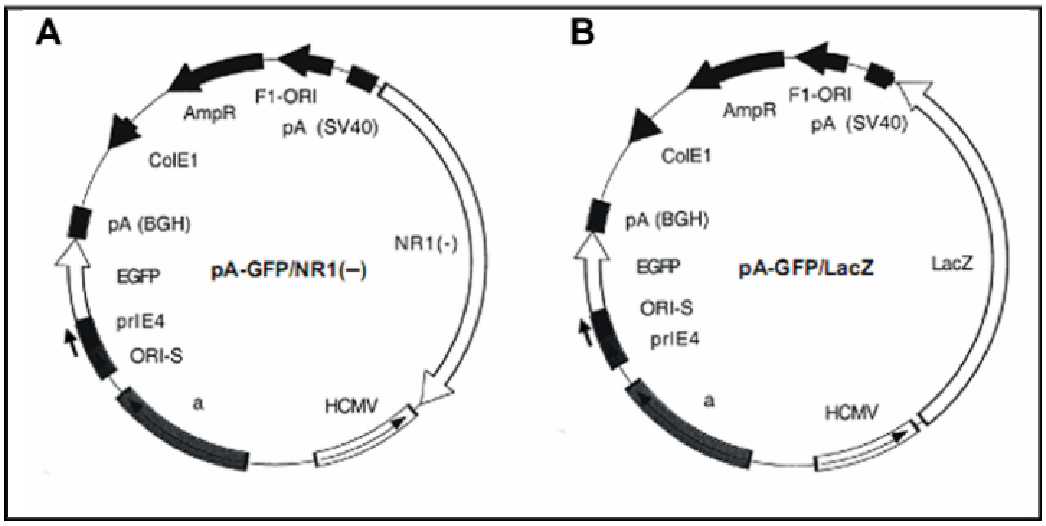


Figura 12. Mapas dos plasmídeos amplicon. A representação esquemática dos plasmídeos amplicon (A) A_2-GFP-NR1(–) ("antisense"), e (B) A_2-GFP-LacZ (controle de expressão). A flecha sobre HCMV e prIE4 indica o sentido da transcrição, a flecha sobre os transgenes (NR1 ou LacZ) indica a orientação do início da leitura. Seqüências do HSV-1: origem de replicação (Ori-S) e seqüência de empacotamento (a). Promotores: do citomegalovirus humano (HCMV) e do HSV-1 IE4 (prIE4). Seqüências de origem bacteriana: gene de resistência à ampicilina (AmpR) e origem de replicação (ColE1). Adaptado de Adrover e cols. (2003).

III.3.1) Construção dos vetores virais

Os vetores virais foram preparados no laboratório da Dra. Diana Jerusalinsky, na Universidade de Buenos Aires (UBA) em Buenos Aires, Argentina, em colaboração com o Dr. Alberto L. Epstein, da Universidade de Lyon, França. Para preparação dos vetores, foram utilizados plasmídeos amplicon com expressão de EGFP e também do cDNA da seqüência "antisense" da subnidade NR1 do receptor NMDA (pA-GFP-NR1(–)) ou do gene LacZ (pA-GFP-LacZ) (Adrover e cols., 2003). Os estoques de vetores foram preparados usando o vírus HSV1 LaLΔJ helper, neuroatenuado e não replicativo, como descrito em Zaupa e cols. (2003) com poucas alterações. De forma breve, células 7b (Krisky e cols., 1998) foram transfectadas com plasmídeos amplicon com Lipofectamina Plus (Invitrogen, Paisley, UK). Um dia depois, as células foram infectadas com o vírus LaLΔJ com uma multiplicidade de infecção de 0.3 (p.f.u., do inglês "plaque forming unit") por célula. Quando o efeito citopático foi máximo, as células foram coletadas por centrifugação, rompidas por três ciclos de congelamento/descongelamento para liberar as partículas virais e centrifugadas a 5.000 *g* por 5 min. para concentrar os restos celulares. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C. As partículas virais (HSV-1 LaLΔJ) foram tituladas em células 7b (Machuca e cols., 1986) e em células Vero. Para titular as partículas virais, células Gli36 foram infectadas com diluições seriadas de cada vetor estoque e uma contagem foi feita das células que expressam a proteína EGFP, como descrito em Zaupa e cols. (2003). Os títulos dos vetores usados nesse estudo foram acima de 10^8 partículas/mL.

II.4) Avaliação do transporte axonal

III.4.1) Expressão de plasmídeos fluorescentes

Para avaliar o transporte axonal, proteínas fluorescentes recombinantes foram expressas por transfecção em neurônios hipocampais de rato (segundo o protocolo de co-cultura descrito acima) mantidos por 10-13 dias in vitro (DIV). A transfecção foi realizada com 6 μL de lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) e 1 μg de DNA (volume para 4 lamínulas independentes) por 2 horas, e a expressão dos constructos foi realizada por pelo menos 24 horas antes da avaliação do transporte (Kwinter e cols., 2009; Kwinter & Silverman, 2009). Foram analisados dois exemplos de proteínas carregadas em DCVs, o fator neurotrófico derivado de cérebro (BDNF) e o neuropeptídeo Y (NPY), ambos fatores tróficos com implicações diretas na DA (Mattson, 2008; Rose e cols., 2009). Além disso, foi utilizado um plasmídeo que permite reconhecer mitocôndrias. Informações detalhadas estão no artigo número 2 ("Aβ oligomers disrupt axonal transport via an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is mediated by glycogen synthase quinase 3β in primary cultured hippocampal neurons"), atualmente no prelo no periódico The Journal of Neuroscience.

A distinção entre dendritos e axônios foi baseada em aspectos morfológicos identificados ao microscópio, como espessura e comprimento, e a confirmação foi realizada após a aquisição dos filmes por imunomarcação para MAP-2, uma proteína exclusiva de dendritos (Figura 13).

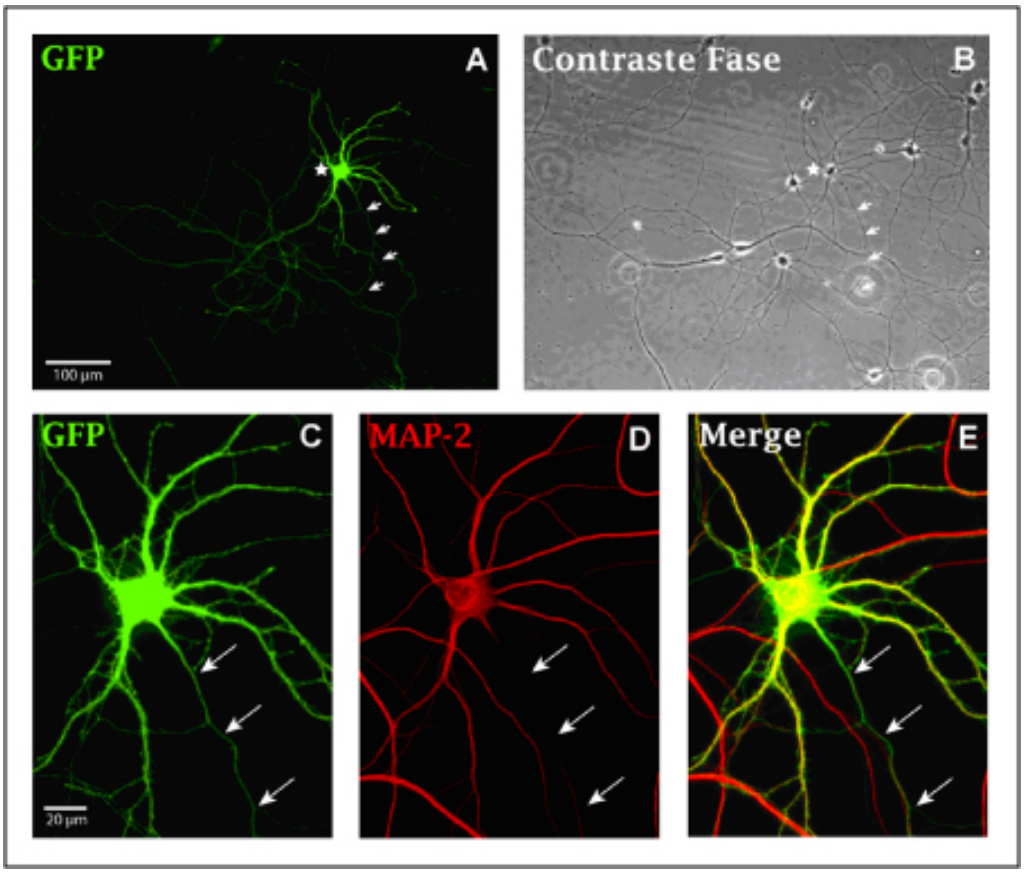


Figura 13. Identificação axonal. Neurônios hipocampais (10-13 DIV) cultivados com suporte de células gliais, expressam polaridade com clara distinção entre dendritos e axônios. Painel A, expressão de GFP solúvel para identificação do neurônio transfectado. Painel B, contraste de fase. A taxa de transfecção de cultura primária neuronal é baixa (~ 10%), o que contribui para a distinção entre dendritos e axônios e facilita a avaliação de transporte de organelas (* corpo neuronal; flechas ressaltam o percurso do axônio). Painéis C-E, confirmação por imunocitoquímica do axônio, utilizando o marcador dendrítico MAP-2. Nota-se que a imunomarcação de MAP-2 é ausente no axônio. Escala da barra = 100 µm (A) e 20 µm (C). Adaptado do material suplementar publicado em Kwinter e cols. (2009).

III.4.2) Aquisição dos filmes

A aquisição dos filmes foi feita em tempo real numa câmara aquecida a 37 ^{o}C, e 200 imagens (frames) foram capturadas ao longo de aproximadamente 50 segundos (Kwinter e cols., 2009). Um exemplo representativo de como o movimento das vesículas é visualizado está na Figura 14A. As imagens foram adquiridas usando um microscópio de fluorescência convencional (DMI 6000 B, Leica Microsystems AG, Wetzlar, Germany) equipado com uma câmera CCD resfriada (Hamamatsu Photonics KK, Bridgewater, NJ, USA) controlada pelo Software MetaMorph (Universal Imaging, Downingtown, PA, USA). As células foram mantidas em uma câmara fechada com temperatura controlada a 37 °C (Warner Instruments, Hamden, CT, USA) contendo meio tamponado (Hanks 1x suplementando com Ca^{2+} e Mg^{2+}, 0,6% glicose, e 10 mM HEPES).

III.4.3) Análise dos dados

As análises quantitativas dos filmes foram realizadas no software MetaMorph (Molecular Devices, Sunnyvale-CA, USA), pela avaliação de kimográficos (do inglês "kymographs"). Os kimográficos expressam a informação de cada movimento registrado durante os filmes (Figura 14B), permitindo que, através do traçado de cada movimento, sejam calculadas a distância e velocidade com que cada vesícula ou organela se move. O fluxo axonal foi definido como o total da distância percorrida pelas organelas, normalizado pelo comprimento do axônio analisado e a duração de cada filme (Kwinter e cols., 2009). Todos os valores foram compilados para análise no Excel e SPSS. Diferenças significativas entre as diferentes condições experimentais utilizadas foram indicadas pelo teste-T independente com variâncias iguais ou desiguais em intervalo de confiança de 95%.

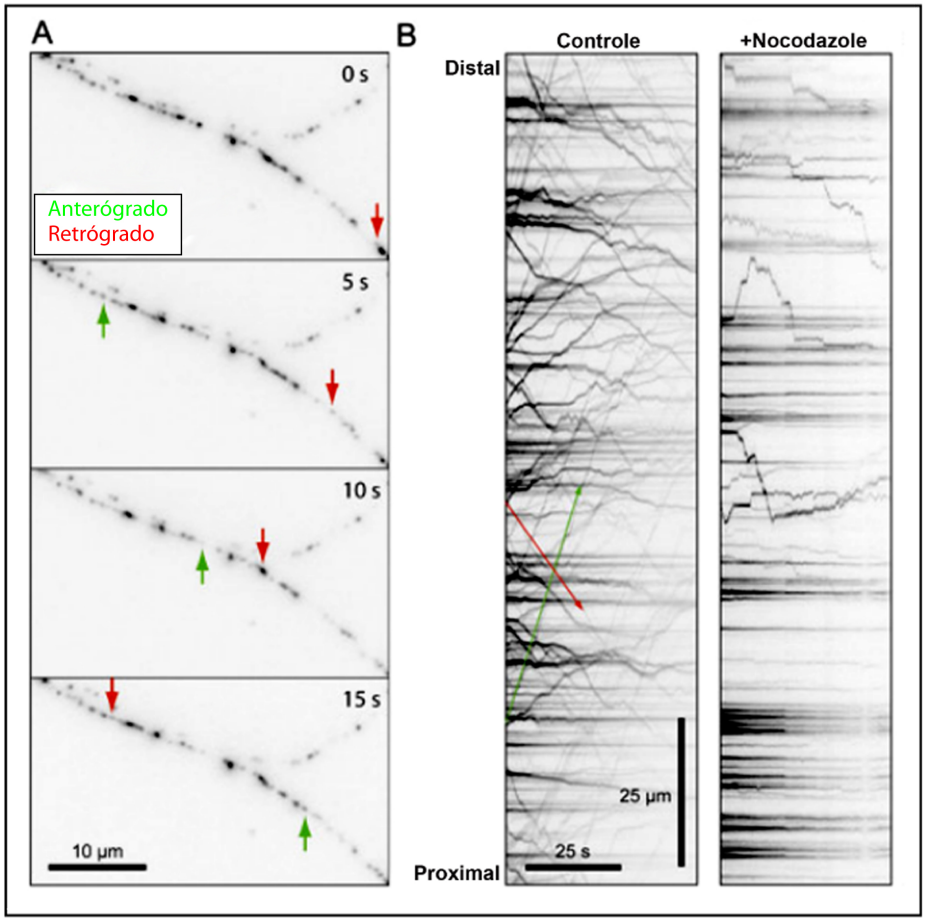


Figure 14. Quantificação do transporte axonal. A) Imagens selecionadas de um filme representativo de DCVs. Partículas individuais se movem na direção anterógrada (indicada pela seta cor verde) e na região retrógrada (indicada pela seta cor vermelha). B) Kimográficos representativos ilustrando o movimento de vesículas de TPA-mCherry (fator ativador de plasminogênio tecidual conjugado a um fluoróforo de cor cereja) em um axônio. As linhas horizontais no kimográfico representam os objetos estacionários, enquanto as linhas diagonais representam organelas se movendo pelo axônio de forma anterógrada ou retrógrada. A longa seta verde e a vermelha representa as vesículas correspondentes do painel (A). Ainda em (B), kimográfico à direita, pode-se observar o efeito de um agente despolarizador dos MTs, nocodazole. Note que há uma drástica redução do número de organelas que se movem (ausência de linhas diagonais), o que corresponde a graves alterações no transporte de DCVs. Adaptado de Kwinter & Silverman (2009).

III.5) Avaliação estrutural do citoesqueleto neuronal

III.5.1) Ensaio bioquímico: fração solúvel e polimerizada de tubulina

Para separação das frações solúvel e polimerizada de tubulina, foi utilizado o protocolo de (Black e cols., 1996) com pequenas modificações. Para extrair a fração constituídas pelas proteínas solúveis, as células foram incubadas por 5 minutos a 37 ^{o}C com o tampão de extração PHEM (60 mM PIPES, 25 mM HEPES, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl2, pH 6,9) suplementado com 10 μM de taxol e 0,2% Triton X-100. Este tampão estabiliza a estrutura do citoesqueleto, mantendo intactas todas as proteínas associadas ao MT. Após estes 5 minutos, o tampão foi gentilmente removido e misturado com tampão de amostra para SDS-PAGE. Para extrair a fração polimerizada, um volume equivalente de tampão de extração PHEM foi acrescentado sobre as células, seguido de extração por fricção. Esta fração também foi misturada com tampão de amostra SDS-PAGE

Volumes equivalentes de cada fração (solúvel e polimerizada), determinando o equilíbrio entre estas frações, foram analisados por imunoblotting com anticorpo para tubulina. A análise quantitativa e densitométrica foi realizada utilizando o software Image J (National Institutes of Health, MD).

III.5.2) Ensaio imunocitoquímico: remoção das proteínas solúveis

Este protocolo foi utilizado para a visualização dos feixes de tubulina que evidenciam a organização estrutural dos MTs e para a avaliação do gradiente próximo-distal de fosforilação de tau ao longo dos axônios. A remoção das proteínas solúveis permite um melhor acesso e visualização da estrutura dos MTs (Kempf e cols., 1996). Inicialmente, os neurônios foram lavados com tampão de extração [80 mM PIPES/KOH, pH 6,8, 1 mM MgCl2, 1 mM EGTA, 30% (v/v) glicerol, e 1 mM GTP]. Em seguida, os neurônios foram incubados por 30 segundos com o tampão de extração acrescido de 0,02% de saponina, e lavados novamente com o tampão de extração. Todas as etapas foram realizadas a 37 ^{o}C, sob gentil agitação. A fixação foi realizada por 1 hora com 2% (w/v) de paraformaldeído e 0,1% de glutaraldeído em tampão de extração. As células foram permeabilizadas por 30 minutos com Triton X-100 em PBS e incubadas por 7 minutos com 10 mg/mL de $NaBH_4$ em PBS e por 20 minutos com 0,1 M de glicina em PBS e, subseqüentemente, bloqueadas por 1 hora com 1% (w/v) de BSA em PBS. As etapas subseqüentes seguem os protocolos convencionais de imunocitoquímica (Silverman e cols., 2005).

IV) RESULTADOS

IV.1) ARTIGO 1: Receptores NMDA são requeridos para a ligação sináptica de oligômeros de Aβ (título em inglês: "N-methyl-D-aspartate receptors are required for synaptic targeting of Alzheimer's toxic Aβ oligomers")

A primeira parte do meu projeto de doutorado teve como principal interesse investigar o envolvimento e a participação do receptor NMDA (NMDAR) nas disfunções sinápticas induzidas por AβOs. Considerando que os AβOs interferem com a função dos NMDARs (Snyder e cols., 2005; De Felice e cols., 2007; Lacor e cols., 2007; Shankar e cols., 2007), nós formulamos a hipótese de que a presença dos NMDAR poderia ser requerida para a ligação de AβOs nas sinapses.

A principal ferramenta metodológica utilizada foi o silenciamento (knockdown) dos receptores NMDA através da infecção viral utilizando vetores amplicon derivados do vírus Herpes. Estes vetores são neurotrópicos e expressam a seqüência "antisense" da subunidade NR1 do NMDAR (descrição detalhada em "Metodologia"). Foi estabelecida uma colaboração com o Laboratório de Neuroplasticidade da Universidade de Buenos Aires, Argentina, coordenado pela Dr. Diana Jerusalinsky, visando o aprendizado da utilização desses vetores virais em neurônios hipocampais maduros (Adrover e cols., 2003; Cheli e cols., 2006).

Esta técnica de silenciamento permitiu a redução de aproximadamente 90% da expressão de NMDARs nos dendritos neuronais e bloqueou a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzidas por AβOs. Notavelmente, o silenciamento de NMDARs aboliu a ligação de AβOs nas sinapses. Esta descoberta levantou a intrigante possibilidade de que o NMDAR poderia ser o até aqui desconhecido receptor de AβOs. Para responder esta questão, seria necessário diminuir a expressão do receptor de AβOs através de uma maneira independente de NMDAR. Com este propósito, nós utilizamos um achado recente do nosso grupo, de que a estimulação com insulina bloqueia a ligação dendrítica de AβOs por induzir a regulação negativa dos receptores de AβOs (De Felice e cols., 2009). Consistentemente com estes achados, o tratamento de neurônios hipocampais com insulina induziu a redução significativa (~ 50%) da ligação de AβOs e preveniu a endocitose de NMDARs induzida por AβOs. Estes dados indicam que os NMDARs são necessários, mas não suficientes para a ligação de AβOs.

Os resultados obtidos nessa parte do meu projeto de doutorado estão disponíveis na forma de um artigo científico (vide anexo VIII.1), atualmente submetido para publicação.

IV.2) ARTIGO 2: Oligômeros de Aβ comprometem o transporte axonal através de um mecanismo dependente de receptores NMDA e mediado pela glicogênio sintase quinase 3β em neurônios hipocampais em cultura (título em inglês: " Aβ oligomers disrupt axonal transport via an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is mediated by glycogen synthase kinase 3β in primary cultured hippocampal neurons"

A segunda parte do meu projeto de doutorado foi desenvolvida no laboratório de Neurociências Celulares, da Universidade Simon Fraser, Vancouver-Canadá, sob co-orientação do Dr. Michael A. Silverman, durante um doutorado-sanduíche, patrocinado pela CAPES.

O laboratório do Dr. Silverman investiga principalmente o controle fisiológico do transporte dendrítico e axonal de organelas em neurônios hipocampais em cultura, utilizando técnicas de imagem em tempo real (time lapse imaging) e expressão de proteínas fluorescentes (descrição detalhada em "Metodologia").

Durante a realização do meu projeto, a principal observação experimental foi o comprometimento do transporte axonal de vesículas secretórias densas (DCVs) e mitocôndrias na presença de AβOs. Este efeito foi prevenido pela inibição farmacológica dos NMDARs, evidenciando que o efeito dos AβOs se inicia na membrana celular.

O próximo passo foi investigar o mecanismo pelo qual AβOs compromete o transporte. Iniciamos a nossa investigação pela via da proteína GSK-3β, uma das diversas vias de sinalização celular que são afetadas por AβOs (Hoshi e cols., 2003; Ferreira e cols., 2007) e de particular interesse para nosso projeto, pois esta quinase fosforila

proteínas reguladoras dos MTs e altera a atividade das proteínas motoras (Morfini e cols., 2002; Wang & Liu, 2008).

Nós observamos que tanto a inibição farmacológica da proteína GSK-3β, como a expressão exógena de um dominante negativo dessa proteína quinase previnem o efeito dos AβOs sobre o transporte axonal, evidenciando fortemente que esta via da sinalização está envolvida.

Nesse trabalho também foram investigadas possíveis alterações na organização dos feixes de tubulina nos MTs, o equilíbrio entre tubulina solúvel e ligada ao MT, e os níveis totais de proteínas motoras. Foi demonstrado que AβOs não afeta a estabilidade dos MTs nem os níveis de proteínas motoras, indicando que o mecanismo pelo qual AβOs compromete o transporte axonal é mais sutil que a desintegração dos feixes de MTs, envolvendo, por exemplo, a desregulação de cascatas de sinalização celular.

Os resultados obtidos nessa parte do meu projeto de doutorado estão disponíveis na forma de um artigo científico (vide anexo VIII.2), atualmente no prelo no periódico The Journal of Neuroscience.

IV.3) Resultados adicionais (continuação do estudo do artigo 2):

AβOs induzem hiperfosforilação de tau, mas não desintegração do MT

De acordo com dados anteriores (De Felice e cols., 2008), observamos um aumento de 2 vezes na fosforilação de tau em epítopos relacionados com a DA (Ser396 e Ser404) em neurônios hipocampais tratados por 4 horas com 0,5 μM AβOs (Fig. 15A). Notavelmente, entretanto, o tratamento por 4 horas com AβOs não induz perturbação no transporte axonal de DCVs (Decker e cols., 2010; Fig. 1B).

Após 18 horas de exposição a AβOs, foi observado um aumento de 5 vezes na fosforilação de tau (pSer396 e pSer404) (Fig. 15A). São estas justamente as condições experimentais (0,5 μM AβOs, 18 horas de tratamento) que comprometem intensamente o transporte de organelas (Decker e cols., 2010; Fig. 1B). Este grande aumento na fosforilação de tau foi parcialmente prevenido pela pré-incubação dos neurônios com memantina, um medicamento aprovado para o tratamento de pacientes com a DA, e totalmente prevenido por MK-801, D-AP5, inibidor de GSK-3β e cloreto de lítio (Fig. 15B), inibidores farmacológicos que também previnem o efeito deletério sobre o transporte axonal.

De forma muito interessante, não há diferença na fosforilação de dois epítopos de tau relacionados com a ligação ao MT (pThr231 e pSer262) (Sengupta e cols., 1998), quando comparamos neurônios controle e tratados com AβOs por 4 horas ou 18 horas (Fig. 15A), sugerindo que a associação de tau aos MTs não é afetada por AβOs.

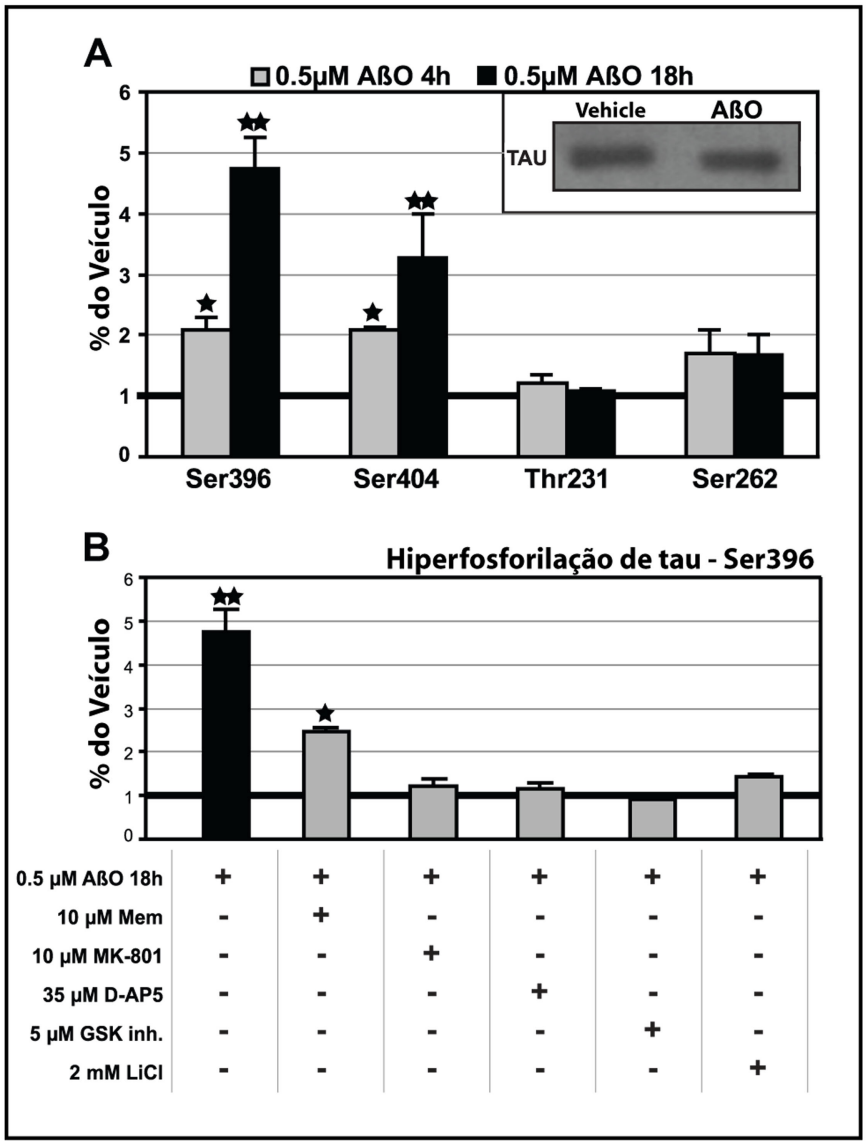


Figura 15. Fosforilação de tau em epítopos relacionados à DA, mas não em epítopos de ligação de tau aos MTs. A) AβOs induzem fosforilação de tau em epítopos relacionados à DA (pSer396, pSer404). Entretanto, não há alteração na fosforilação de epítopos de tau envolvidos na ligação aos MTs (Thr231, Ser262). No inset, *Western blot* para proteína tau total, mostrando que não há alteração em neurônios tratados com AβOs por 18 horas. (B) O aumento da fosforilação de tau em Ser396 induzido pelo tratamento por 18h com AβOs foi parcialmente prevenido pela pré-incubação com memantina (Mem) e completamente bloqueado por MK-801, D-AP5, inibidor VIII de GSK-3β (GSK inh.) e cloreto de lítio (LiCl). Foram analisadas no mínimo 24 células por condição, a partir de pelo menos 3 culturas diferentes. * e ** indicam diferenças significativas ($p<0,05$ e $p<0,005$, respectivamente) quando comparado com o veículo (100%).

Outro parâmetro analisado que tem papel importante na função e desenvolvimento dos axônios foi o gradiente fisiológico de fosforilação de tau ao longo dos axônios (correspondendo a níveis mais elevados nas porções distais dos axônios) (Mandell & Banker, 1996). Através de uma extração com saponina, grande parte das proteínas solúveis e de membrana é removida, o que permite a visualização do citoesqueleto neuronal. Este gradiente pode ser visualizado por imunocitoquímica com anticorpos que reconhecem formas fosforiladas de tau (pSer396 e pSer404), e sua quantificação foi determinada pela razão entre a imunofluorescência da região distal versus inicial dos axônios.

Podemos observar na figura 16A que a incubação por 18 horas com AβOs não altera o gradiente de fosforilação de tau, o que sugere que o nível de fosforilação da tau ligada aos MTs está inalterado. O fato de que, após a extração das proteínas solúveis, não está mais evidente o aumento na fosforilação de tau como havíamos observado na figura 15, sugere que o aumento de fosforilação de tau induzido pelo tratamento com AβOs possivelmente afeta preferencialmente uma forma de tau não associada com MTs, e que a tau anormalmente fosforilada foi removida após a extração dos componentes celulares solúveis pela saponina.

Com base nesses dados, é possível supor que a tau hiperfosforilada observada após 4 e 18 horas de exposição a AβOs esteja em forma solúvel, o que não estaria prejudicando a estrutura dos MTs. Além disso, estes dados corroboram nossos resultados (Decker e cols., 2010) que evidenciam que a desintegração global dos microtúbulos não faz parte do mecanismo pelo qual AβOs compromete o transporte axonal.

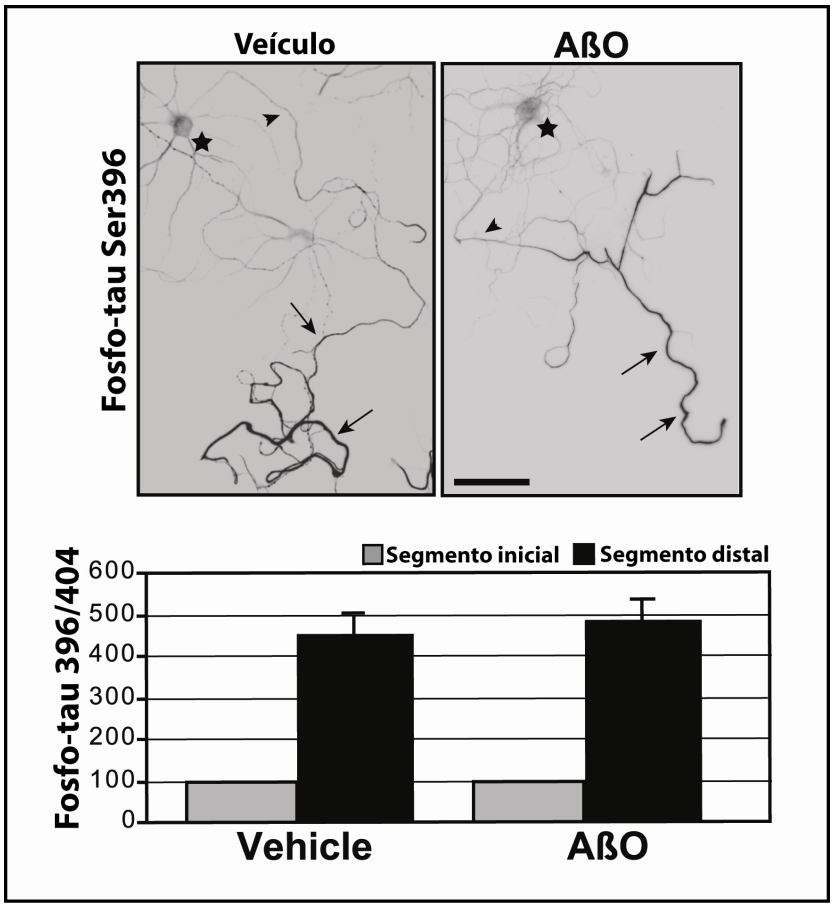


Figura 16. O gradiente espacial de tau hiperfosforilada está inalterado após 18h de tratamento com AβOs. Imagens representativas de neurônios 10 DIV imunomarcados com anticorpo anti-fosfo-tau epítopo Ser396 (A). Nota-se em que há aumento da intensidade de fluorescência na região distal do axônio. O mesmo padrão de imunomarcação foi encontrado com anticorpo anti-fosfo-tau epítopo Ser404 (dados não demonstrados). Para visualização deste gradiente, as proteínas solúveis e de membrana foram extraídas, seguida de fixação com tampão específico para estabilizar citoesqueleto, o que preserva a organização dos MTs e proteínas associadas. A quantificação da imunofluorescência (B) foi realizada medindo múltiplas regiões axonais: proximal (região inicial do axônio, próximo ao corpo celular, indicada pelas cabeças de seta), e distal (região terminal do axônio, indicado pelas setas), e a razão (em percentual) foi determinada através da comparação entre a imunomarcação distal em relação à região inicial, normalizada pela área. * indicam o corpo celular. Foram analisadas 18 células por condição, a partir de 3 diferentes culturas. Escala da barra = 100 μm.

A hiperfosforilação de tau como um efeito induzido por AβOs correlaciona-se temporalmente bem com o comprometimento do transporte axonal; entretanto, não sabemos se existe uma ligação direta entre estes dois fenômenos. Uma conseqüência da hiperfosforilação de tau sobre o citoesqueleto neuronal é o desligamento de tau dos microtúbulos (MTs), o que resulta em diminuição da estabilidade destes (Johnson & Stoothoff, 2004; Wang & Liu, 2008). Alguns trabalhos associam a superexpressão de tau com o comprometimento do transporte axonal por prejudicar o acoplamento das proteínas motoras (Ebneth e cols., 1998; Trinczek e cols., 1999; Stamer e cols., 2002). Porém, um estudo recente mostrou que os níveis de transporte axonal *in vivo* não são afetados pela deleção ou sobrexpressão de tau em camundongos (Yuan e cols., 2008).

Considerando as contradições que ainda perduram na literatura, na continuação do nosso trabalho visaremos clarificar se a hiperfosforilação da proteína tau é a causa ou uma das causas do comprometimento do transporte de organelas induzido por AβOs. A continuação desse trabalho é parte do projeto de doutorado de um aluno do Dr. Silverman, na Simon Fraser University, onde serão utilizados camundongos knockout para proteína tau, com o intuito de elucidar e talvez dissociar o envolvimento da proteína tau do efeito dos AβOs sobre o transporte axonal.

IV.4) Resultados adicionais (colaboração no trabalho de De Felice e cols., 2009)

Durante meu doutorado, eu tive o prazer de participar de um trabalho do nosso laboratório intitulado “Proteção das sinapses contra as toxinas da Doença de Alzheimer: sinalização de insulina previne a ligação patogênica dos oligômeros de Abeta” (título original em inglês: “Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: Insulin signaling prevents the pathogenic binding of Abeta oligomers”.

Este trabalho teve um impacto considerável na pesquisa em Alzheimer, pois demonstrou um mecanismo natural de proteção das sinapses contra a toxicidade dos oligômeros solúveis de Aβ (também designados ADDLs). De forma muito interessante, o pré-tratamento com insulina preveniu completamente os efeitos tóxicos de ADDLs sobre a geração de EROs e perda de espinhas dendríticas. Neste trabalho também é caracterizado o mecanismo protetor da insulina (De Felice e cols., 2009).

A minha participação neste trabalho envolveu a realização de experimentos utilizando a sonda DHE, que detecta os níveis de estresse oxidativo, e a quantificação da fluorescência obtida utilizando o software Image J. Nesse experimento, foi avaliado o efeito protetor da insulina contra a geração de EROs (Figura 17).

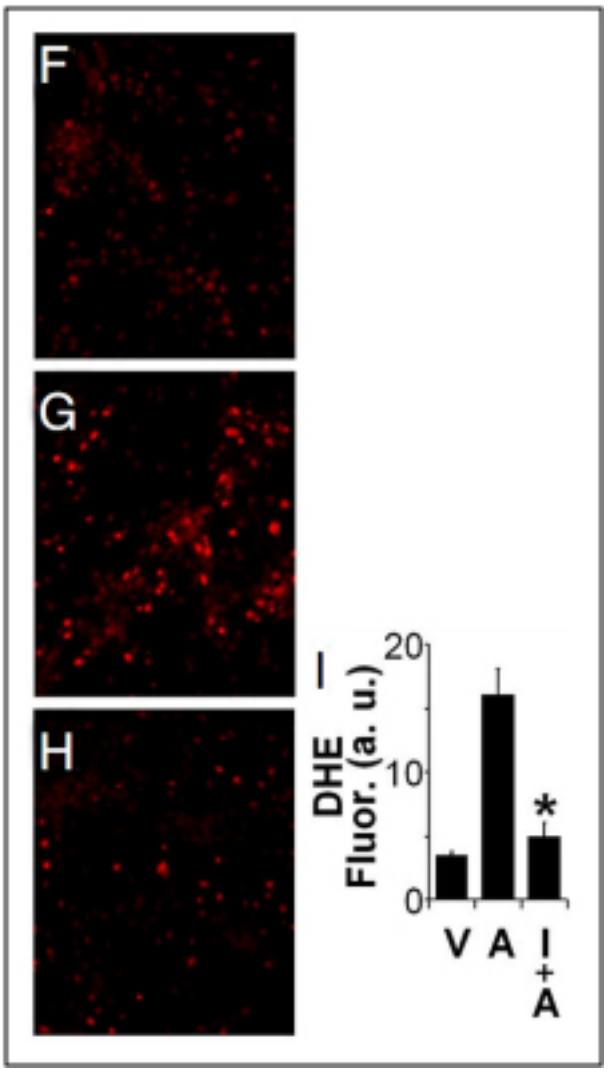


Figura 17 (Figura 4 do artigo de De Felice e cols., 2009). Insulina bloqueia o dano oxidativo induzido por ADDLs. (F–H) Imagens representativas da fluorescência da sonda DHE em neurônios hipocampais tratados com veículo (F), 1 μM ADDLs (G), ou 1 μM insulina + 1 μM ADDLs (H). (I) Quantificação da fluorescência de DHE. Asterisco indica diferença significativa (*, $p<0.007$) quando comparado com culturas tratadas com ADDLs.

A minha segunda contribuição a este estudo foi na quantificação das espinhas dendríticas, realizada através da contagem manual dos pontos com maior fluorescência de faloidina (por μm) em segmentos de dendritos. Nesse experimento, foi avaliado o efeito protetor da insulina contra a perda das espinhas dendríticas (Figura 18).

Estes achados estabelecem um novo conceito segundo o qual a estimulação da sinalização de insulina no cérebro apresenta grande potencial para diminuir ou interromper a progressão da DA.

Os demais resultados deste artigo (publicado na Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106(6):1971–1976) estão disponíveis nos anexos dessa tese (vide anexo VIII.3).

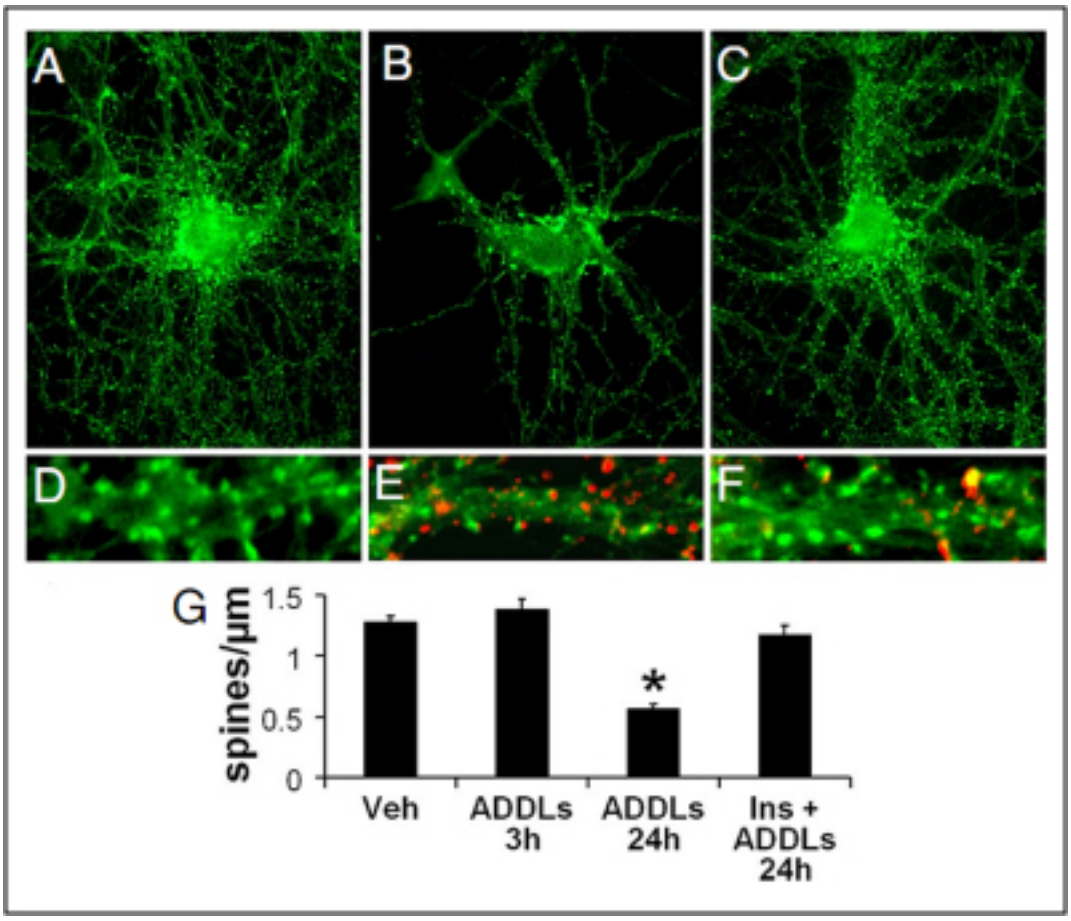


Figura 18 (Figura 5 do artigo de De Felice e cols., 2009). Insulina protege contra a perda de sinapses induzida por ADDLs. (A–C) Imagens representativas de neurônios hipocampais tratados com veículo (A), 100 nM ADDLs (B) ou 100 nM ADDLs + 1 µM insulina (C) por 24 h. As espinhas dendríticas foram imunomarcadas com faloidina (verde). (D–F) Dupla marcação em maior aumento de segmentos de dendritos neuronais tratados com veículo (D), ADDLs (E), ou ADDLs + insulina (F). As espinhas dendríticas foram marcadas com faloidina (verde) e ADDLs foram detectados com o anticorpo NU4 (vermelho). (G) Quantificação do número de espinhas dendríticas normalizado pelo comprimento do dendrito. Asterisco indica diferença significativa (*, P <0.001) quando comparado com neurônios tratados com veículo.

IV.5) Resultados adicionais (colaboração no trabalho de Bomfim e cols., 2010)

Durante meu doutorado 'sanduíche' na Simon Fraser University, a aluna Theresa R. Bomfim, orientada pela Professora Fernanda G. De Felice, visitou o laboratório do Dr. Silverman e tivemos a oportunidade de desenvolver alguns experimentos em colaboração.

O trabalho de mestrado da Theresa identifica o mecanismo pelo qual oligômeros de Aβ provocam resistência à insulina no cérebro e sugere que exendina-4, um medicamento utilizando no tratamento de resistência periférica à insulina no diabetes tipo II, e o infliximab, um inibidor de TNF-α, podem atuam como novos agentes para defender os neurônios contra o dano neuronal na DA.

Jà de volta ao Brasil, eu participei da realização de experimentos do projeto da Theresa, onde avaliamos a participação da via da sinalização da proteína c-Jun N-terminal quinase (JNK) nos efeitos tóxicos dos oligômeros de Aβ sobre a sinalização por insulina. Nesta abordagem, foi utilizada a transfecção de neurônios por uma forma dominante negativa da JNK para bloquear esta via de sinalização, revelando que as alterações nos níveis de IRS pSer636 e pTyr465 induzidas por oligômeros de Aβ são dependentes da via da JNK (Figura 19).

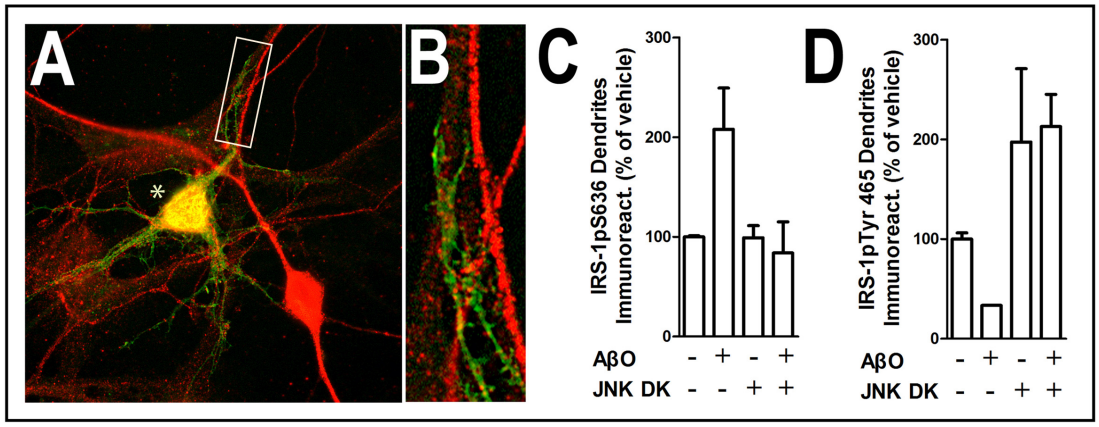


Figura 19 (Figura 2 do manuscrito de Bomfim e cols., 2010). Expressão de uma forma dominante negativa de JNK (JNK DN) bloqueia efeito de AβOs sobre níveis de IRS-1. (A) Imagem representativa de dois neurônios, onde um deles esta expressando o JNK DK (asterisco). (B) Detalhe mostrando a regiao assinalada por um retangulo tracejado no painel A. Note que o aumento de pSer696 IRS-1 induzido por AβOs (segmento de dendrito corado em vermelho) é bloqueado no neurônio transfectado com a forma dominante negativa (DK) da JNK conjugada à GFP (segmento de neurito corado em verde). Quantificação dos níveis de IRS-1 pSer696 (C) e pTyr465 (D).

No laboratório do Dr. Silverman, os experimentos realizados investigaram se a via de sinalização da JNK também está envolvida nos déficits de transporte axonal induzido por AβOs. De forma surpreendente, a inibição farmacológica dessa via, utilizando o inibidor SP600125, aboliu completamente os efeitos deletérios de AβOs sobre o transporte de DCVs (Figura 20).

Além disso, insulina e exendina-4 previnem os efeitos tóxicos de AβOs sobre o transporte axonal de DCVs (Figura 21).

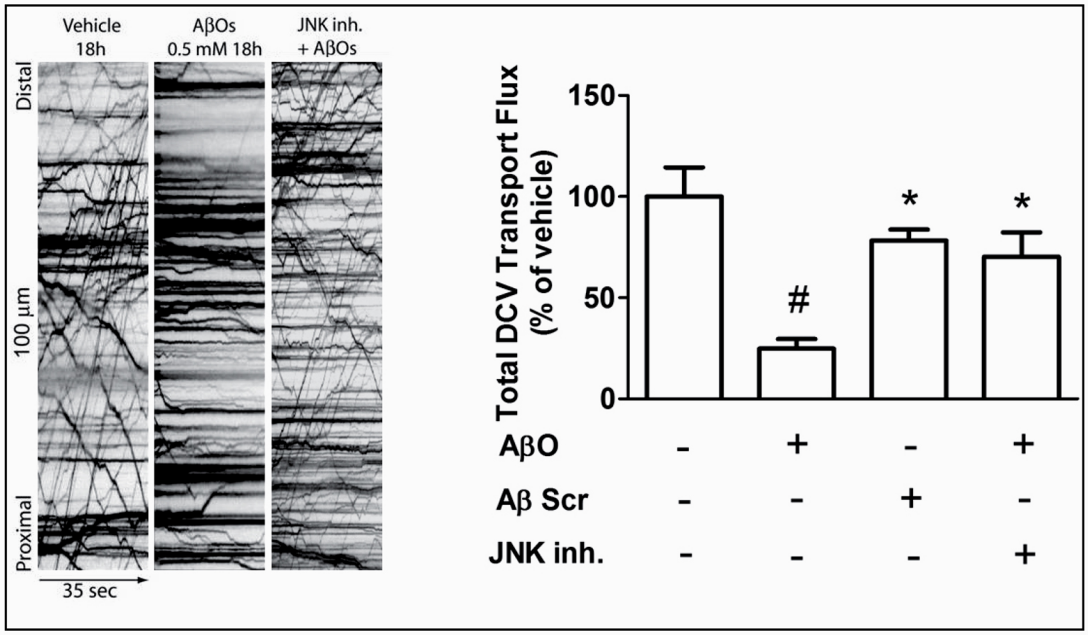


Figura 20 (Figura 3 do manuscrito de Bomfim e cols., 2010): Oligômeros de Aβ induzem comprometimento do transporte de DCVs via ativação de JNK. Kimográficos representativos comparando controle (veículo), tratamento com oligômeros de Aβ (18 h, 500 nM AβO) e pré-tratamento por 30 min. com 10 µM SP600125, seguido do tratamento com oligômeros. O comprometimento do transporte de DCVs foi completamente prevenido pelo pré-tratamento com o inibidor da JNK. O gráfico expressa a quantificação do transporte axonal de DCVs. Aβ Scr corresponde a uma preparação de "oligomeros" obtida a partir de um peptídeo com a mesma composição de aminoácidos que o peptídeo Aβ mas sequencia aleatória (Aβ "scrambled"). Foram analisadas um mínimo de 15 células por condição a partir de pelo menos 2 culturas diferentes. # indica diferença estatística significativa ($p < 0.001$) quando comparado com o veículo. * indica diferença estatística significativa ($p < 0.001$) quando comparado com oligômeros de Aβ.

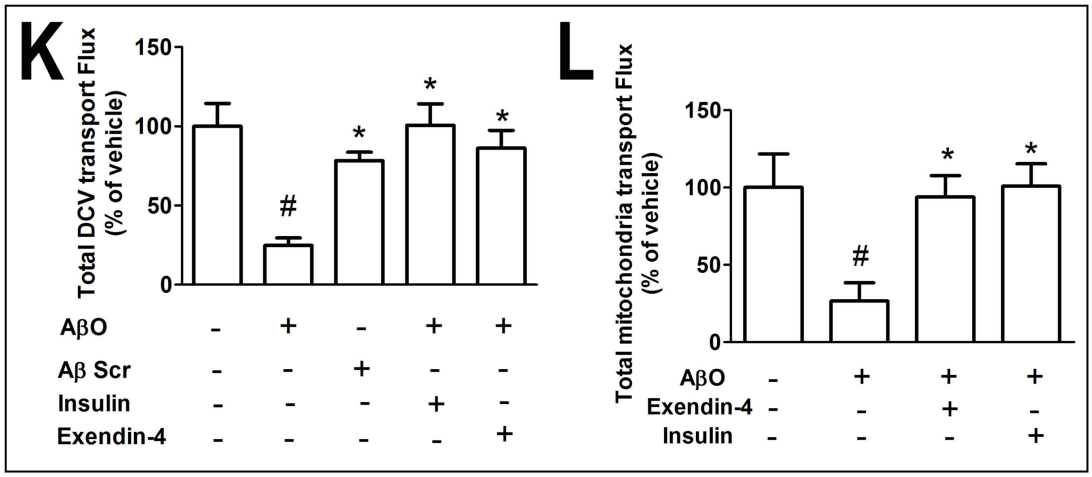


Figura 21 (Figura 4 do manuscrito de Bomfim e cols., 2010): Exendina-4 e insulina previnem o comprometimento do transporte de DCVs ou mitocôndrias induzido por oligômeros Aβ. Quantificação do transporte axonal de DCVs (K) ou mitocôndria (L) em controle (veículo), tratamento com oligômeros de Aβ (18 h, 500 nM AβO), tratamento com oligômeros de Aβ "scrambled" (18 h, 500 nM), e pré-tratamento por 30 min. com 300 nM de exendina-4 ou 1 μM de insulina, seguido de tratamento com oligômeros. O comprometimento do transporte foi completamente prevenido por exendina-4 e insulina. Foram analisadas um mínimo de 15 células por condição a partir de pelo menos 2 culturas diferentes. # indica diferença estatística significativa ($p < 0.001$) quando comparado com o veículo. * indica diferença estatística significativa ($p < 0.001$) quando comparado com oligômeros de Aβ.

Este manuscrito está atualmente submetido para publicação e é intitulado “Oligômeros de Aβ induzem resistência a insulina no cérebro por mecanismos comuns ao diabetes tipo 2: proteção por exendina-4 e Infliximab" (título original em inglês: “Alzheimer's toxic Aβ oligomers trigger brain insulin resistance by mechanisms common to type 2 diabetes: Protection by exendin-4 and infliximab”), de autoria de Theresa R. Bomfim, Helena Decker, Jordano Brito-Moreira, Hala Kazi, Steven E. Arnold, Michael A. Silverman, Konrad Talbot, William L. Klein, Sergio T. Ferreira e Fernanda G. De Felice.

V) DISCUSSÃO

V.1) Oligômeros de Aβ e o seu receptor específico

O progresso da ciência na área da Doença de Alzheimer (DA) está prejudicado por duas questões fundamentais que possuem implicações diretas sobre a compreensão dos mecanismos moleculares da patogênese da DA e o desenvolvimento de terapias eficientes.

A primeira delas compreende identificar e caracterizar a natureza das espécies tóxicas responsáveis pelo comprometimento inicial da memória e disfunção neuronal. Consideráveis avanços já foram feitos nesse tópico nos últimos anos e já é consenso na comunidade científica que os oligômeros solúveis de Aβ (AβOs) são as principais neurotoxinas responsáveis pelo ataque às sinapses, induzindo falência sináptica em fases iniciais desta patologia. Vários trabalhos apontam a detecção destas espécies como um marcador neuropatológico adicional da DA (Klein e cols., 2001; Klein e cols., 2004; Haass & Selkoe, 2007), pois já foram detectados níveis aumentados de AβOs no cérebro e líquido cerebrospinal de pacientes acometidos pela DA, quando comparado com indivíduos não dementes (McLean e cols., 1999; Gong e cols., 2003; Georganopoulou e cols., 2005). Este aumento nos níveis das formas oligoméricas parece estar restrito a regiões do cérebro responsáveis pelas funções cognitivas, como córtex frontal e hipocampo, regiões comprometidas em pacientes com DA (Lacor e cols., 2004).

A segunda questão ainda pouco conhecida é a identidade molecular do receptor a que os AβOs se ligam. A identificação desta(s) molécula(s) irá impulsionar o desenvolvimento de medicamentos que bloqueiam a ligação desses oligômeros nos neurônios, o que bloquearia seus efeitos tóxicos.

Ainda não é totalmente compreendida a base molecular para a especificidade da ligação sináptica dos AβOs. Já foi demonstrado que a ligação desses oligômeros aos neurônios é diminuida pelo tratamento com tripsina (Lambert e cols., 1998), e que os AβOs se ligam de forma específica a terminais sinápticos em neurônios hipocampais e se co-localizam com marcadores sinápticos, como a proteína da densidade pós-sináptica PSD-95 (Lacor e cols., 2004).

Nos últimos anos, diferentes candidatos foram propostos como ligantes específicos de AβOs, como é o caso da proteína príon celular (PrP^{C}) (Lauren e cols., 2009; Balducci e cols., 2010; Gimbel e cols., 2010), do receptor glutamatérgico do subtipo AMPA (Zhao e cols., 2010), do receptor de neurotrofina p75 ($p75^{NTR}$) (Knowles e cols., 2009), do receptor de produtos de glicação avançada (RAGE) (Sturchler e cols., 2008) e da proteína Frizzled (Magdesian e cols., 2008). Porém, até agora, a identidade do receptor específico de AβOs permanece desconhecida, e muitos grupos de pesquisa estão concentrados em elucidar esta questão.

V.2) Receptor NMDA: parte do complexo-receptor

O presente trabalho propõe um conceito novo segundo o qual o receptor dos AβOs consiste, na realidade, de um complexo protéico, composto pelo receptor NMDAR e por uma ou mais proteinas da superfície neuronal.

Através do silenciamento de NMDARs identificamos que a presença de NMDARs nas sinapses é estritamente requerida para a ligação de AβOs e efeitos tóxicos induzidos pelos oligômeros. Entretanto, constatamos que os AβOs não ligam diretamente aos NMDARs, pois em uma condição em que há o bloqueio da ligação de AβOs (na presenca de insulina), não ocorre diminuição dos níveis de NMDARs. Este dado indica que, embora os NMDARs sejam requeridos para a ligação dos AβOs nas sinapses, sua presença não é suficiente. Estas evidências podem ser visualizadas de maneira esquematica na figura 22.

Podemos concluir que o complexo receptor de AβOs requer uma composição específica para induzir toxicidade, e de um ponto de vista terapêutico, isto sugere que possivelmente se possa bloquear tanto a organização/composição do complexo receptor quanto a sua toxicidade através de um grande número de componentes moleculares. A identificação dos alvos moleculares dos AβOs pode esclarecer o complicado mecanismo de falência sináptica na DA e contribuir para o desenvolvimento de medicamentos eficazes capazes de recuperar ou até prevenir a progressão da doença.

[Ca2+]
↑[Ca2+]
↑[EROs]
DISFUNÇÃO SINAPTICA
PREVENÇÃO DOS EFEITOS DE AβOS
AβOs
GLUTAMATO
INSULINA
COMPLEXO RECEPTOR DE AβOs
RECEPTOR NMDA
RECEPTOR INSULINA

Figura 22: **Esquema que mostra o complexo receptor de AβOs nas sinapses.** No painel superior pode-se visualizar a ligação de AβOs (agregados de cor vermelha), e a ativação de NMDAR, com conseqüente influxo de cálcio (Ca^{2+}), geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), desencadeando vários efeitos tóxicos, entre eles disfunção sináptica. Note que o receptor NMDA (NMDAR, receptor amarelo) faz parte do complexo receptor de AβOs, ou é requerido para a expressão de superfície ou organização estrutural, pois sua presença nas sinapses é necessária para a ligação dos AβOs. No painel inferior pode-se observar o efeito da insulina (estrela de cor verde) sobre a ligação de AβOs e seus efeitos tóxicos. Note que o pré-tratamento com insulina induz a endocitose de componentes do complexo receptor de AβOs, o que possivelmente desorganiza o complexo receptor de AβOs de tal forma que a ligação dendrítica de AβOs é bloqueada.

V.3) Receptor NMDA: efeito no transporte axonal

Evidências recentes indicam que AβOs comprometem a transmissão sináptica via desregulação da função dos NMDARs (De Felice e cols., 2007; Lacor e cols., 2007). Por outro lado, como a modulação sináptica e alterações no transporte axonal estão conectadas (Schlager & Hoogenraad, 2009), perturbações da atividade sináptica podem ter um efeito direto no transporte e vice-versa.

Um dos achados importantes desse projeto foi a identificação e caracterização do efeito dos AβOs sobre o transporte axonal de organelas, vesículas secretórias densas (DCVs) e mitocôndrias, em neurônios hipocampais em cultura (Decker e cols., 2010, Fig.1). Para determinar se a disfunção de NMDARs induzida por AβOs e o comprometimento do transporte estão interligados, foi utilizada uma abordagem farmacológica, em que três diferentes inibidores de NMDAR foram utilizados independentemente 30 minutos antes do tratamento com AβOs. A memantina, um medicamento aprovado para o tratamento de pacientes com a DA, e o MK-801, ambos bloqueadores do canal do receptor NMDA, preveniram parcialmente o efeito dos AβOs sobre o transporte axonal de DCVs. Por outro lado, o D-AP5, um potente antagonista competitivo do NMDAR, preveniu completamente este efeito (Decker e cols., 2010, Fig.1). É interessante notar que um trabalho recente do nosso grupo demonstrou que D-AP5 (mas não a memantina ou o MK-801) reduz significativamente a ligação de AβOs

em neurônios hipocampais (De Felice e cols., 2007), o que provavelmente explica a completa prevenção do efeito dos AβOs pelo D-AP5 em nosso atual estudo.

A proteína GSK-3β exerce papel fundamental na modulação de uma variedade de funções celulares como proliferação e diferenciação (Frame & Cohen, 2001; Grimes & Jope, 2001), e está implicada em várias desordens neurológicas, incluindo a DA, esquizofrenia e transtorno bipolar (Alvarez e cols., 2002; Bhat e cols., 2004). Vários trabalhos demonstraram que a GSK-3β é responsável por fosforilar tanto presenilina-1 quanto a proteína tau (Spittaels e cols., 2000; Kirschenbaum e cols., 2001; Avila e cols., 2004), e exerce regulação entre LTD e LTP, as duas formas de plasticidade sináptica dependentes de NMDAR (Peineau e cols., 2007; Peineau e cols., 2008).

Na figura 23 pode-se visualizar uma representação esquemática do mecanismo pelo qual GSK-3β regula a plasticidade dependente de NMDAR. A atividade da GSK-3β determina se a ativação do NMDAR induz LTD ou LTP. Durante a LTD, a ativação da proteína fosfatase 1 (PP1) leva à defosforilação do resíduo Ser9 da GSK-3β (o que a torna ativa) favorecendo a ocorrência de LTD. PP1 também inibe a proteína Akt. Durante a LTP, a ativação dos NMDARs leva à estimulação da via da proteína fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K)-Akt, com conseqüente fosforilação do resíduo Ser9 da GSK-3β (tornando-a inativa), o que previne a indução de LTD. Assim, a proteína GSK-3β, regulada pelas proteínas Akt e PP1, é um determinante crítico da direção da plasticidade sináptica dependente de NMDARs (Peineau e cols., 2007).

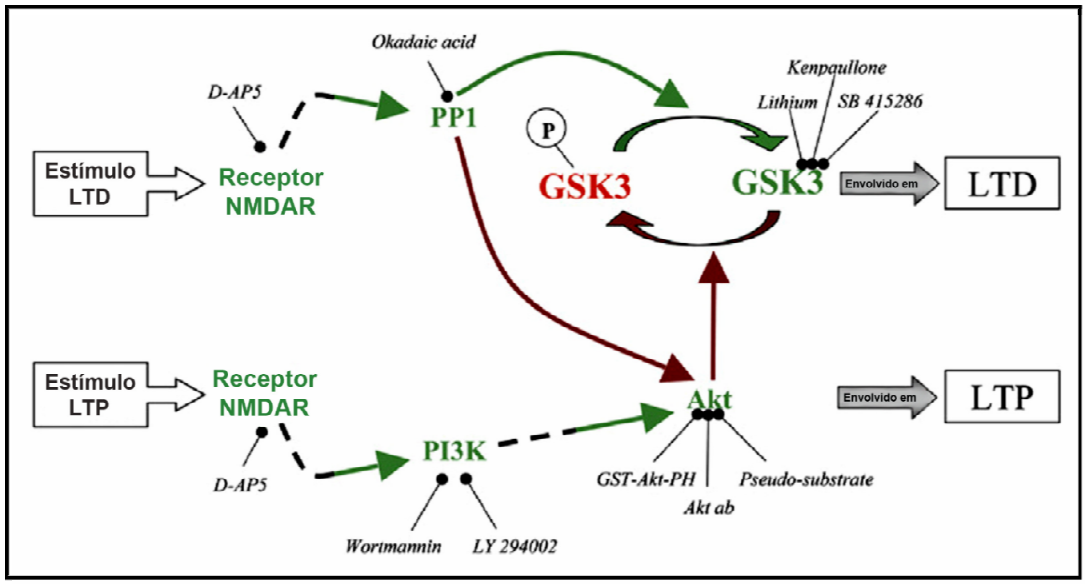


Figura 23. Esquema que mostra a regulação da GSK-3β no controle da plasticidade sináptica dependente de NMDAR. A atividade da GSK-3β determina se a ativação do NMDAR induz ou inibe LTD. Durante a LTD, a ativação da PP1 leva à defosforilação do resíduo Ser9 da GSK-3β (o que a torna ativa) favorecendo a ocorrência de LTD. PP1 também inibe a proteína Akt. Durante a LTP, a ativação dos NMDARs leva à estimulação da via da proteína fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K)-Akt, com conseqüente fosforilação do resíduo Ser9 da GSK-3β (tornando-a inativa), o que previne a indução de LTD. GSK-3β, proteína quinase da glicogênio sintase 3; PP1, proteína fosfatase 1; PI3k, proteína fosfatidilinositol 3 quinase; LTD, depressão de longo termo; LTP, potenciação de longo termo. Adaptado de Peineau e cols. (2007).

Considerando que já está bem demonstrado que os AβOs bloqueiam a LTP e induzem LTD ou inibem sua reversão (Walsh e cols., 2002; Wang e cols., 2002; Shankar e cols., 2008; Li e cols., 2009), é possível que a ativação dos NMDARs pelos AβOs induza um estímulo na via que ativa LTD, com conseqüente modulação de cascatas de sinalização que ativam a proteína quinase GSK-3β.

V.4) Comprometimento do transporte: vias de sinalização

Alterações na atividade de proteínas quinases e fosforilação anormal de proteínas neuronais são características encontradas na DA (Hoshi e cols., 2003; Ferreira e cols., 2007; Wang e cols., 2007), e algumas dessas quinases anormalmente desreguladas podem afetar o transporte axonal de organelas (Pigino e cols., 2001; Morfini e cols., 2002; Pigino e cols., 2003; Morfini e cols., 2009).

Estudos recentes identificaram que algumas proteínas quinases fosforilam de forma direta e seletiva subunidades das proteínas motoras quinesinas (KIFs). A conseqüência funcional de cada fosforilação é determinada em parte pela principal função da subunidade alvo. As KIFs, por exemplo, são compostas por cadeias leves (KLCs) e por cadeias pesadas (KHCs) (DeBoer e cols., 2008), e as KLCs exercem um papel crítico na ligação das quinesinas às organelas (Stenoien & Brady, 1997).

A fosforilação de KLCs por GSK-3β (Morfini e cols., 2002) ou proteína caseína quinase 2 (CK2) (Morfini e cols., 2001; Pigino e cols., 2009) promove o desacoplamento de quinesina-1 das organelas, enquanto a fosforilação de KHCs por JNK inibe a ligação das quinesinas aos MTs (Morfini e cols., 2006; Morfini e cols., 2009). Mecanismo regulatório similar é proposto para as dineínas (Susalka & Pfister, 2000; Morfini e cols., 2007). Estes achados evidenciam um mecanismo molecular para a distribuição e entrega de organelas específicas em determinados compartimentos axonais (Morfini e cols., 2001). Ilustrações desses exemplos estão na figura 24.

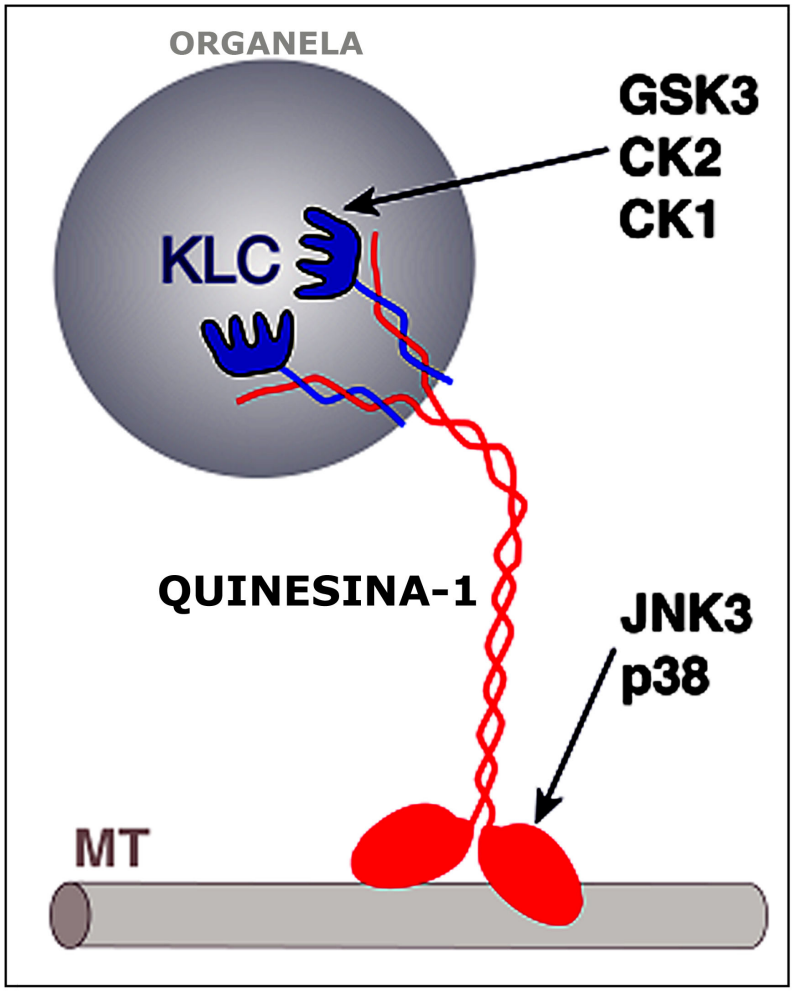


Figura 24. Esquema que mostra a regulação da atividade das quinesinas por fosforilação. As quinesinas são compostas por cadeias pesadas (KHCs, ilustradas em vermelho) e cadeias leves (KLCs, ilustradas em azul). A fosforilação de KLCs por GSK-3β e CK2 promove o desacoplamento de quinesinas das organelas, enquanto a fosforização de KHCs por JNK inibe sua ligação ao MT. Já foi proposto que as dineínas também apresentam mecanismo regulatório similar. MT, microtúbulo; KHC, cadeia pesada da quinesina; KLC, cadeia leve da quinesina; GSK-3β, proteína quinase da glicogênio sintase 3β, CK2, proteína caseína quinase 2; CK1, proteína caseína quinase 1; JNK, proteína c-Jun-N-terminal quinase; p38, proteína quinase p38. Adaptado de Morfini e cols. (2009).

O transporte axonal de várias classes de organelas, incluindo mitocôndrias, endossomos, e vesículas contendo APP, sinaptofisina, sintaxina e receptores tirosina quinase (Trk), está inibido em modelos de camundongos transgênicos para a DA (Pigino e cols., 2003; Lazarov e cols., 2007). De forma interessante, esses animais apresentam acúmulo cerebral de Aβ, mas ainda não se sabe se acumulam especificamente oligômeros de Aβ. Ademais, o mecanismo que eventualmente conecta estas espécies oligoméricas ao déficit no transporte axonal ainda precisa ser definido.

A perfusão intracelular de oligômeros de Aβ inibiu o transporte axonal retrógrado e anterógrado em axoplasmas isolados de lula gigante (Pigino e cols., 2009). Esta é uma evidência interessante do efeito deletério dos oligômeros de Aβ sobre o transporte axonal. Porém, este modelo, mesmo sendo o pioneiro para avaliação de transporte axonal, apresenta algumas limitações: consiste de um sistema sem membrana plasmática (todas as substâncias são aplicadas no meio intracelular de axônios isolados), a aquisição dos filmes é feita por contraste interferencial (DIC), o que não permite separar ou rastrear determinadas populações de organelas, e as características fisiológicas dos moluscos estão muito distantes dos mamíferos (Pigino e cols., 2009).

Outros trabalhos usando Aβ fibrilar apontam o déficit no transporte axonal como uma alteração patológica da DA. Já foi demonstrado que Aβ fibrilar em altas concentrações (20 μM) induz alterações no transporte de mitocôndrias (Rui e cols., 2006) e de organelas (Hiruma e cols., 2003) em neurônios hipocampais em cultura.

Os dados obtidos no nosso estudo são bastante inovadores, pois demonstramos, pela primeira vez, o efeito dos AβOs, as neurotoxinas responsáveis pelos danos iniciais

na DA, sobre o transporte axonal de DCVs e mitocôndrias em neurônios hipocampais de mamíferos (Decker e cols., 2010).

Buscando a identificação do mecanismo pelo qual AβOs comprometem o transporte axonal e considerando as evidências acima citadas, que conectam vias de sinalização com o comprometimento do transporte axonal, nós decidimos investigar se este efeito é dependente da atividade da GSK-3β. Já foi demonstrado que os AβOs induzem ativação aberrante de muitas quinases, incluindo a GSK-3β (Hoshi e cols., 2003; De Felice e cols., 2008). Para a fisiopatologia da DA, a GSK-3β é de particular interesse, pois é encontrada ativa nos emaranhados neurofibrilares (NFTs) em cérebros *post morten* de pacientes (Giese, 2009). Além disso, GSK-3β pode ser ativada por formas fibrilares de Aβ (Rui e cols., 2006). De fato, observamos prevenção do efeito deletério dos AβOs tanto com a inibição farmacológica, usando dois diferentes inibidores da GSK-3β, como em neurônios transfectados com uma forma dominante negativa da GSK-3β.

Em nossos resultados, observamos um comprometimento do transporte de forma bidirecional, sendo mais acentuado na direção anterógrada, com possíveis conseqüências na distribuição das organelas para as porções distais dos axônios, como as sinapses. Embora ainda não tenha sido claramente identificados os subtipos de proteínas motoras que transportam DCVs em neurônios de mamíferos, nossos dados sugerem que AβOs comprometem preferencialmente proteínas motoras responsáveis pelo transporte anterógrado e a inibição farmacológica de GSK-3β preveniu a diminuição do transporte de DCVs em neurônios hipocampais em cultura para ambas as direções. É possível que a GSK-3β controle majoritariamente o transporte anterógrado como publicado

anteriormente (Morfini e cols., 2002); entretanto, muitos estudos defendem um mecanismo regulatório coordenado, onde a disfunção de um tipo de proteínas motoras compromete o transporte em ambas as direções (Ally e cols., 2009).

Em colaboração com o trabalho de Theresa R. Bomfim, também foi avaliado se a via de sinalização da JNK está envolvida nos déficits de transporte axonal induzido por AβOs. De forma surpreendente, a inibição farmacológica dessa via, assim como a expressão exógena de uma forma dominante negativo da enzima, previne os efeitos deletérios de AβOs sobre o transporte de DCVs.

As perspectivas futuras para esta parte do projeto são muito promissoras, pois existem grandes chances de que a atividade das proteínas motoras esteja reduzida sob efeito dos AβOs. Os níveis totais das proteínas motoras não estão alterados. Porém, para responder a estas questões, existem limitações técnicas, pois ainda não estão disponíveis comercialmente anticorpos para as formas fosforiladas das proteínas motoras.

V.5) Comprometimento do transporte: organização estrutural dos MTs

Um marcador central da DA é a fosforilação de tau, mas seu papel no transporte axonal é ainda controverso. Existem evidências de que o comprometimento do transporte axonal é uma conseqüência da hiperfosforilação de tau (Trinczek e cols., 1999). Entretanto, um estudo recente demonstra que o transporte axonal *in vivo* não é afetado pela deleção ou sobrexpressão de tau em camundongos (Yuan e cols., 2008).

Nesse trabalho demonstramos que a exposição de neurônios por 4 horas a AβOs induz um aumento de 2 vezes nos níveis de fosforilação de tau (Resultados adicionais, Fig. 15), porém nessas condições não há alteração no transporte, o que sugere que um aumento moderado na fosforilação de tau não apresenta um impacto adverso sobre o transporte axonal.

Foi observado um aumento mais expressivo da fosforilação de tau (~ 5 vezes) (Resultados adicionais, Fig. 15), temporalmente correlacionado com o comprometimento do transporte axonal, em exposições mais longas a AβOs (18 horas); entretanto, a tau que se encontra hiperfosforilada nestas condições não parece estar firmemente associada com o citoesqueleto pois foi facilmente removida após extração com saponina (Resultados adicionais, Fig. 16). Fontes de tau não associada com MTs incluem aquelas associadas à actina ou aquelas que estão sendo transportadas (Fulga e cols., 2007).

A fosforilação de tau induzida por AβOs em nossos experimentos não deve levar à formação de NFTs, porque estes agregados são dificilmente gerados em cultura (Rosenmann e cols., 2008) e tais estruturas não foram visualizadas através da

imunomarcação com um anticorpo específico para filamentos helicoidais pareados (PHF-1) (dados não mostrados). Porém, é possível que a fosforilação induza alterações conformacionais em tau que possam influenciar negativamente o transporte (Fischer e cols., 2009). Assim, embora não seja possível excluir um papel para tau, nossos dados sugerem que a fosforilação de epítopos em tau relacionados com DA (pSer396 e pSer404) não é a causa primária do comprometimento do transporte induzido por AβOs.

Na continuação desse projeto, o papel de tau sobre o transporte será investigado utilizando-se modelos de animais transgênicos, como camundongos knockout para tau. Em culturas de neurônios sem tau, será possível distinguir se o mecanismo pelo qual AβOs afeta o transporte envolve tau. Além disso, considerando a possibilidade de que tau possua um papel ativo no efeito de AβOs (Fischer e cols., 2009), poderão ser identificados que sítios de fosforilação de tau estão envolvidos, através da expressão exógena da proteína.

A desestabilização da rede dos MTs ocorre após a exposição a altas concentrações (até 10 vezes maiores do que as empregadas no presente estudo) de agregados fibrilares ou não fibrilares de Aβ (Blurton-Jones & Laferla, 2006; King e cols., 2006). Entretanto, em nossos experimentos a estabilidade dos MTs foi mantida após longa exposição aos AβOs. Estes resultados apoiam a hipótese de que a desregulação de cascatas de sinalização celular mediadas por GSK-3β resultam em déficits no transporte axonal. De forma intrigante, atualmente, GSK-3β é considerada a principal quinase responsável por fosforilar a proteína tau (Plattner e cols., 2006; Wang e cols., 2007), o que explica, mais uma vez, o nosso grande interesse em seu estudo, principalmente buscando a

compreensão do mecanismo pelo qual esta quinase atua nos mecanismos de toxicidade dos AβOs sobre o transporte axonal, e como promissor alvo terapêutico para o tratamento da DA.

V.6) Comprometimento do transporte: considerações finais

A Figura 25 apresenta um sumário do mecanismo proposto pelo qual AβOs comprometem o transporte axonal de DCVs. Foi identificado que este efeito deletério é iniciado na membrana plasmática neuronal, através da ativação de NMDARs. Outro participante deste mecanismo é a proteína quinase GSK-3β na sua forma ativa, que por sua vez pode modular diversos alvos, um dos quais a proteína tau. É importante ressaltar, entretanto, que apesar da fosforilação de tau estar bastante aumentada após exposição aos AβOs, não obtivemos comprovação de que o aumento da fosforilação de tau é uma das causas primárias do bloqueio do transporte axonal induzido por AβOs.

A atividade das proteínas motoras (em especial das quinesinas) é controlada por fosforilação. A GSK-3β em sua forma ativa reduz a atividade das proteínas motoras, o que resulta no desacoplamento das mesmas das organelas (Morfini e cols., 2009). Experimentos adicionais serão realizados para verificar os níveis de atividade das proteínas motoras e da GSK-3β, e poderão fornecer uma explicação bastante elegante para explicar o mecanismo pelo qual AβOs compromete o transporte.

Além disso, será importante investigar se o comprometimento no transporte não está relacionado com modificações pós-traducionais da tubulina, como tirosinação ou

acetilação. De fato, a fisiologia do transporte axonal é modulada por estas modificações (Fukushima e cols., 2009); por exemplo, a inibição da acetilação da tubulina influencia negativamente a ligação e mobilidade da quinesina-1 *in vitro* (Reed e cols., 2006). Futuros experimentos serão necessários para caracterizar cada etapa do mecanismo pelo qual AβOs afetam o transporte axonal de organelas.

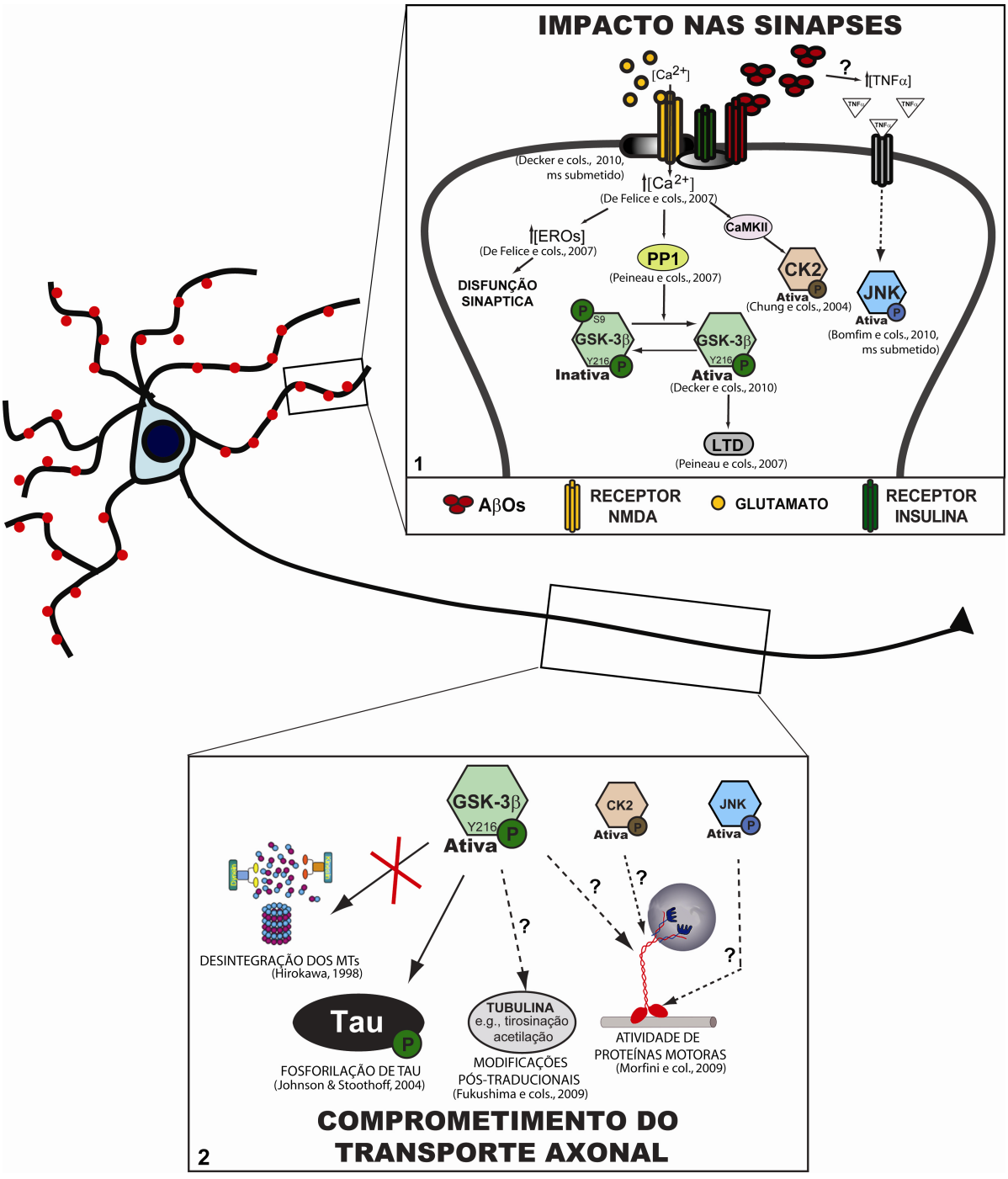

IMPACTO NAS SINAPSES
[Ca2+]
?
[TNFα]
(Decker e cols., 2010, ms submetido)
[Ca2+]
(De Felice e cols., 2007)
[EROs]
(De Felice e cols., 2007)
DISFUNÇÃO SINAPTICA
PP1
(Peineau e cols., 2007)
CaMKII
CK2
Ativa
(Chung e cols., 2004)
JNK
Ativa
(Bomfim e cols., 2010, ms submetido)
P S9
GSK-3β
Y216 P
Inativa
GSK-3β
Y216 P
Ativa
(Decker e cols., 2010)
LTD
(Peineau e cols., 2007)
1
AβOs
RECEPTOR NMDA
GLUTAMATO
RECEPTOR INSULINA
GSK-3β
Y216 P
Ativa
CK2
Ativa
JNK
Ativa
DESINTEGRAÇÃO DOS MTs
(Hirokawa, 1998)
Tau
P
FOSFORILAÇÃO DE TAU
(Johnson & Stoothoff, 2004)
TUBULINA
e.g., tirosinação
acetilação
MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS
(Fukushima e cols., 2009)
ATIVIDADE DE PROTEÍNAS MOTORAS
(Morfini e col., 2009)
COMPROMETIMENTO DO TRANSPORTE AXONAL
2

Figura 25. Esquema que mostra o sumário dos possíveis mecanismos pelo qual AβOs comprometem o transporte axonal. O efeito dos AβOs é iniciado na membrana plasmática (quadro 1) através da sua ligação em um sítio específico de seu complexo-receptor (Decker e cols., 2010, manuscrito submetido) que desencadeia a ativação de NMDAR com conseqüente influxo de cálcio. O aumento de cálcio intracelular induz aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) (De Felice e cols., 2007) com conseqüente comprometimento da função sináptica. O aumento de cálcio intracelular desencadeia também a ativação das proteínas quinases, como a CaMKII e CK2 (Chung e cols., 2004) e da proteína fosfatase PP1 que ativa a GSK-3β (Peineau e cols., 2007), a qual estimula a via LTD (Peineau e cols., 2007). Além disso, AβOs possivelmente induzem aumento de TNFα (por mecanismos ainda não conhecidos) que, por sua vez, ativam seus receptores desencadeando ativação da via da JNK (Bomfim e cols., 2010, manuscrito submetido). O quadro 2 indica possíveis mecanismos pelo quais AβOs comprometem o transporte. A proteína GSK-3β modula diversos alvos, entre eles a proteína Tau que se encontra anormalmente fosforilada após tratamento com AβOs (resultados adicionais, Fig.15). GSK-3β, CK2 e JNK modulam a atividade das proteínas motoras, regulando o acoplamento destas proteínas às organelas ou sua ligação aos MTs (Morfini e cols., 2009). No presente trabalho, foi demonstrado que AβOs não desestabilizam a organização dos MTs, porém ainda precisa ser investigado se AβOs induzem modificações pós-traducionais na tubulina, alterações que controlam a eficiência do transporte.

V.7) Doença de Alzheimer e a promessa de tratamentos eficientes

Para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas inovadoras na DA, torna-se claramente necessário compreender as bases moleculares e celulares desta patologia. Atualmente, os medicamentos utilizados no tratamento da DA apenas retardam a progressão dos sintomas e não atacam o(s) agente(s) causador(es).

Uma classe de medicamentos que está em uso por pacientes em fases iniciais da DA são os anti-colinesterásicos, ou seja, inibidores da atividade da acetilcolinesterase, principal enzima envolvida na degradação da acetilcolina. A acetilcolina é um neurotransmissor importante nos processos de formação e consolidação da memória, dentre outras funções cerebrais (Del Arco & Mora, 2009; Placzek e cols., 2009; Thomsen e cols., 2010). Estes medicamentos impedem a diminuição dos níveis de acetilcolina, resultante da morte de neurônios no Núcleo Basal de Meynert. Entretanto, é importante ressaltar que estes inibidores apresentam eficácia bastante limitada, e, em geral, mesmo os pacientes que respondem ao tratamento deixam de fazê-lo após alguns meses de uso (Mayeux & Sano, 1999). Desta forma, na melhor das hipóteses, os anti-colinesterásicos produzem um retardo de alguns meses no declínio cognitivo inabalável apresentado pelos pacientes com DA

Abordagens terapêuticas alternativas têm sido propostas envolvendo compostos com ação antioxidante, como o α-tocoferol (vitamina E) ou o Ginkgo biloba, que visam reduzir o estresse oxidativo e processos inflamatórios na neurodegeneração da DA. Os estudos clínicos têm demonstrado que pacientes que recebem este tipo de medicamento

apresentam modesto retardo no curso da doença (Birks & Grimley Evans, 2009; Weinmann e cols., 2010). Entretanto, tais estudos ainda não foram capazes de produzir resultados que efetivamente demonstrem ações modificadoras da doença por estes compostos em pacientes com DA.

Além das abordagens terapêuticas descritas acima, o uso de bloqueadores do receptor NMDA (NMDAR) constitui uma estratégia terapêutica contra o dano excitotóxico induzido por Aβ (Mattson, 2003). Muitos estudos experimentais demonstraram efeitos neuroprotetores de antagonistas seletivos de receptores de glutamato contra a neurotoxicidade do peptídeo Aβ (Mattson e cols., 1992; Louzada e cols., 2001; Miguel-Hidalgo e cols., 2002). Neste sentido, o uso de memantina foi liberado para uso em pacientes com DA (final de 2003 na Europa, e final de 2004 nos EUA). A memantina é um bloqueador de afinidade moderada de NMDARs, capaz de permitir sua ativação fisiológica durante os processos de formação de memória, mas bloqueia a abertura e ativação patológica dos canais (Parsons e cols., 1993).

Embora a memantina represente um medicamento promissor no tratamento da DA, os seus efeitos terapêuticos, até aqui verificados, são modestos e possíveis efeitos colaterais deste fármaco ainda estão sendo avaliados. Já foi demonstrado que o uso continuado de antagonistas de receptores de glutamato leva a efeitos colaterais severos, incluindo quadros de psicose (Rowland e cols., 2005), e, sob certas circunstâncias, morte celular por necrose (Fix e cols., 1993; Ikonomidou e cols., 2000). Desta forma, o uso clínico continuado de tais antagonistas pode não ser conveniente.

Um achado importante deste trabalho é o efeito dos AβOs no transporte de organelas em uma fase bastante inicial da DA, precedendo o dano neuronal. Do ponto de vista biológico, é evidente que este efeito contribua para a neuropatologia da DA em muitos níveis, devido ao papel crucial do transporte de organelas na fisiologia neuronal. Por exemplo, uma alteração encontrada em paciente com a DA é a redução de níveis cerebrais de fatores tróficos, provavelmente como conseqüência da deficiência na entrega de vesículas contendo BDNF (instrumento de estudo deste trabalho). Portanto, este mecanismo tóxico dos AβOs pode ser a causa de várias alterações patológicas presentes na DA e a identificação de medicamentos capazes de prevenir ou reverter este efeito, como, por exemplo, mecanismos que bloqueiem a via de sinalização da proteína GSK-3β, poderá ser a chave para a cura da Doença de Alzheimer.

VI) CONCLUSÕES

1. O silenciamento de NMDARs inibe o estresse oxidativo neuronal induzido por AβOs;

2. A ligação de AβOs é abolida em neurônios silenciados para NMDARs;

3. A presença do receptor NMDAR é necessária, porém não suficiente, para a ligação sináptica de AβOs;

4. AβOs comprometem o transporte axonal de DCVs e mitocôndrias em neurônios hipocampais em cultura;

5. Este efeito é iniciado através da ativação de NMDAR, e é dependente da via de sinalização da proteína GSK-3β;

6. AβOs induzem hiperfosforilação de tau em epítopos relacionados com DA, porém não alteram epítopos de ligação nos microtúbulos;

7. O mecanismo pelo qual AβOs comprometem o transporte axonal não envolve desintegração dos microtúbulos, degradação de proteínas motoras ou morte celular.

VII) REFERÊNCIAS

Abraha A, Ghoshal N, Gamblin TC, Cryns V, Berry RW, Kuret J and Binder LI (2000). C-terminal inhibition of tau assembly in vitro and in Alzheimer's disease. *J Cell Sci* 113 Pt 21: 3737-3745.

Adrover MF, Guyot-Revol V, Cheli VT, Blanco C, Vidal R, Alche L, Kornisiuk E, Epstein AL and Jerusalinsky D (2003). Hippocampal infection with HSV-1-derived vectors expressing an NMDAR1 antisense modifies behavior. *Genes Brain Behav* 2(2): 103-113.

Aizawa H, Sekine Y, Takemura R, Zhang Z, Nangaku M and Hirokawa N (1992). Kinesin family in murine central nervous system. *J Cell Biol* 119(5): 1287-1296.

Ally S, Larson AG, Barlan K, Rice SE and Gelfand VI (2009). Opposite-polarity motors activate one another to trigger cargo transport in live cells. *J Cell Biol* 187(7): 1071-1082.

Alvarez G, Munoz-Montano JR, Satrustegui J, Avila J, Bogonez E and Diaz-Nido J (2002). Regulation of tau phosphorylation and protection against beta-amyloid-induced neurodegeneration by lithium. Possible implications for Alzheimer's disease. *Bipolar Disord* 4(3): 153-165.

Avila J, Lucas JJ, Perez M and Hernandez F (2004). Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev* 84(2): 361-384.

Baas PW, Deitch JS, Black MM and Banker GA (1988). Polarity orientation of microtubules in hippocampal neurons: uniformity in the axon and nonuniformity in the dendrite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(21): 8335-8339.

Balducci C, Beeg M, Stravalaci M, Bastone A, Sclip A, Biasini E, Tapella L, Colombo L, Manzoni C, Borsello T, Chiesa R, Gobbi M, Salmona M and Forloni G (2010). Synthetic amyloid-beta oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(5): 2295-2300.

Bartlett WP and Banker GA (1984). An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. I. Cells which develop without intercellular contacts. *J Neurosci* 4(8): 1944-1953.

Bennecib M, Gong CX, Grundke-Iqbal I and Iqbal K (2001). Inhibition of PP-2A upregulates CaMKII in rat forebrain and induces hyperphosphorylation of tau at Ser 262/356. *FEBS Lett* 490(1-2): 15-22.

Bhat RV, Budd Haeberlein SL and Avila J (2004). Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies. *J Neurochem* 89(6): 1313-1317.

Biernat J and Mandelkow EM (1999). The development of cell processes induced by tau protein requires phosphorylation of serine 262 and 356 in the repeat domain and is inhibited by phosphorylation in the proline-rich domains. *Mol Biol Cell* 10(3): 727-740.

Biernat J, Wu YZ, Timm T, Zheng-Fischhofer Q, Mandelkow E, Meijer L and Mandelkow EM (2002). Protein kinase MARK/PAR-1 is required for neurite outgrowth and establishment of neuronal polarity. *Mol Biol Cell* 13(11): 4013-4028.

Birks J and Grimley Evans J (2009). Ginkgo biloba for cognitive impairment and dementia. *Cochrane Database Syst Rev*(1): CD003120.

Black MM, Slaughter T, Moshiach S, Obrocka M and Fischer I (1996). Tau is enriched on dynamic microtubules in the distal region of growing axons. *J Neurosci* 16(11): 3601-3619.

Bliss TV and Collingridge GL (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361(6407): 31-39.

Blocker A, Severin FF, Burkhardt JK, Bingham JB, Yu H, Olivo JC, Schroer TA, Hyman AA and Griffiths G (1997). Molecular requirements for bi-directional movement of phagosomes along microtubules. *J Cell Biol* 137(1): 113-129.

Blurton-Jones M and Laferla FM (2006). Pathways by which Abeta facilitates tau pathology. *Curr Alzheimer Res* 3(5): 437-448.

Borgonovo B, Ouwendijk J and Solimena M (2006). Biogenesis of secretory granules. *Curr Opin Cell Biol* 18(4): 365-370.

Brady ST (1985). A novel brain ATPase with properties expected for the fast axonal transport motor. *Nature* 317(6032): 73-75.

Brewer GJ and Cotman CW (1989). Survival and growth of hippocampal neurons in defined medium at low density: advantages of a sandwich culture technique or low oxygen. *Brain Res* 494(1): 65-74.

Burton PR and Paige JL (1981). Polarity of axoplasmic microtubules in the olfactory nerve of the frog. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(5): 3269-3273.

Cash AD, Aliev G, Siedlak SL, Nunomura A, Fujioka H, Zhu X, Raina AK, Vinters HV, Tabaton M, Johnson AB, Paula-Barbosa M, Avila J, Jones PK, Castellani RJ, Smith MA

and Perry G (2003). Microtubule reduction in Alzheimer's disease and aging is independent of tau filament formation. *Am J Pathol* 162(5): 1623-1627.

Chada SR and Hollenbeck PJ (2003). Mitochondrial movement and positioning in axons: the role of growth factor signaling. *J Exp Biol* 206(Pt 12): 1985-1992.

Cheli V, Adrover M, Blanco C, Ferrari C, Cornea A, Pitossi F, Epstein AL and Jerusalinsky D (2006). Knocking-down the NMDAR1 subunit in a limited amount of neurons in the rat hippocampus impairs learning. *J Neurochem* 97 Suppl 1: 68-73.

Cho JH and Johnson GV (2004). Primed phosphorylation of tau at Thr231 by glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) plays a critical role in regulating tau's ability to bind and stabilize microtubules. *J Neurochem* 88(2): 349-358.

Chung HJ, Huang YH, Lau LF and Huganir RL (2004). Regulation of the NMDA receptor complex and trafficking by activity-dependent phosphorylation of the NR2B subunit PDZ ligand. *J Neurosci* 24(45): 10248-10259.

Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, Shankar GM, Kuskowski MA, Selkoe DJ and Ashe KH (2005). Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci* 8(1): 79-84.

Collingridge GL and Singer W (1990). Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol Sci* 11(7): 290-296.

Davies CA, Mann DM, Sumpter PQ and Yates PO (1987). A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 78(2): 151-164.

De Felice FG, Velasco PT, Lambert MP, Viola K, Fernandez SJ, Ferreira ST and Klein WL (2007). Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *J Biol Chem* 282(15): 11590-11601.

De Felice FG, Vieira MN, Bomfim TR, Decker H, Velasco PT, Lambert MP, Viola KL, Zhao WQ, Ferreira ST and Klein WL (2009). Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: insulin signaling prevents the pathogenic binding of Abeta oligomers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(6): 1971-1976.

De Felice FG, Wu D, Lambert MP, Fernandez SJ, Velasco PT, Lacor PN, Bigio EH, Jerecic J, Acton PJ, Shughrue PJ, Chen-Dodson E, Kinney GG and Klein WL (2008). Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A beta oligomers. *Neurobiol Aging* 29(9): 1334-1347.

De Vos KJ, Grierson AJ, Ackerley S and Miller CC (2008). Role of axonal transport in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Neurosci* 31: 151-173.

DeBoer SR, You Y, Szodorai A, Kaminska A, Pigino G, Nwabuisi E, Wang B, Estrada-Hernandez T, Kins S, Brady ST and Morfini G (2008). Conventional kinesin holoenzymes are composed of heavy and light chain homodimers. *Biochemistry* 47(15): 4535-4543.

Del Arco A and Mora F (2009). Neurotransmitters and prefrontal cortex-limbic system interactions: implications for plasticity and psychiatric disorders. *J Neural Transm* 116(8): 941-952.

Desai A and Mitchison TJ (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 83-117.

Dickson DW, Farlo J, Davies P, Crystal H, Fuld P and Yen SH (1988). Alzheimer's disease. A double-labeling immunohistochemical study of senile plaques. *Am J Pathol* 132(1): 86-101.

Dodart JC, Bales KR, Gannon KS, Greene SJ, DeMattos RB, Mathis C, DeLong CA, Wu S, Wu X, Holtzman DM and Paul SM (2002). Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model. *Nat Neurosci* 5(5): 452-457.

Ebneth A, Godemann R, Stamer K, Illenberger S, Trinczek B and Mandelkow E (1998). Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 143(3): 777-794.

Fath T, Eidenmuller J and Brandt R (2002). Tau-mediated cytotoxicity in a pseudohyperphosphorylation model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 22(22): 9733-9741.

Ferreira ST, De Felice FG and Chapeaurouge A (2006). Metastable, partially folded states in the productive folding and in the misfolding and amyloid aggregation of proteins. *Cell Biochem Biophys* 44(3): 539-548.

Ferreira ST, Vieira MN and De Felice FG (2007). Soluble protein oligomers as emerging toxins in Alzheimer's and other amyloid diseases. *IUBMB Life* 59(4-5): 332-345.

Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E and Scazufca M (2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366(9503): 2112-2117.

Fischer D, Mukrasch MD, Biernat J, Bibow S, Blackledge M, Griesinger C, Mandelkow E and Zweckstetter M (2009). Conformational changes specific for pseudophosphorylation at serine 262 selectively impair binding of tau to microtubules. *Biochemistry* 48(42): 10047-10055.

Fix AS, Horn JW, Wightman KA, Johnson CA, Long GG, Storts RW, Farber N, Wozniak DF and Olney JW (1993). Neuronal vacuolization and necrosis induced by the noncompetitive N-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonist MK(+)801 (dizocilpine maleate): a light and electron microscopic evaluation of the rat retrosplenial cortex. *Exp Neurol* 123(2): 204-215.

Frame S and Cohen P (2001). GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* 359(Pt 1): 1-16.

Fukushima N, Furuta D, Hidaka Y, Moriyama R and Tsujiuchi T (2009). Post-translational modifications of tubulin in the nervous system. *J Neurochem* 109(3): 683-693.

Fulga TA, Elson-Schwab I, Khurana V, Steinhilb ML, Spires TL, Hyman BT and Feany MB (2007). Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo. *Nat Cell Biol* 9(2): 139-148.

Georganopoulou DG, Chang L, Nam JM, Thaxton CS, Mufson EJ, Klein WL and Mirkin CA (2005). Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(7): 2273-2276.

Gerrow K, Romorini S, Nabi SM, Colicos MA, Sala C and El-Husseini A (2006). A preformed complex of postsynaptic proteins is involved in excitatory synapse development. *Neuron* 49(4): 547-562.

Ghiso J, Calero M, Matsubara E, Governale S, Chuba J, Beavis R, Wisniewski T and Frangione B (1997). Alzheimer's soluble amyloid beta is a normal component of human urine. *FEBS Lett* 408(1): 105-108.

Giese KP (2009). GSK-3: a key player in neurodegeneration and memory. *IUBMB Life* 61(5): 516-521.

Gilbert SP and Sloboda RD (1984). Bidirectional transport of fluorescently labeled vesicles introduced into extruded axoplasm of squid Loligo pealei. *J Cell Biol* 99(2): 445-452.

Gimbel DA, Nygaard HB, Coffey EE, Gunther EC, Lauren J, Gimbel ZA and Strittmatter SM (2010). Memory impairment in transgenic Alzheimer mice requires cellular prion protein. *J Neurosci* 30(18): 6367-6374.

Glenner GG and Wong CW (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120(3): 885-890.

Goedert M, Wischik CM, Crowther RA, Walker JE and Klug A (1988). Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(11): 4051-4055.

Goldstein LS (2001). Kinesin molecular motors: transport pathways, receptors, and human disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(13): 6999-7003.

Gong CX, Lidsky T, Wegiel J, Zuck L, Grundke-Iqbal I and Iqbal K (2000). Phosphorylation of microtubule-associated protein tau is regulated by protein phosphatase 2A in mammalian brain. Implications for neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 275(8): 5535-5544.

Gong CX, Singh TJ, Grundke-Iqbal I and Iqbal K (1993). Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain. *J Neurochem* 61(3): 921-927.

Gong Y, Chang L, Viola KL, Lacor PN, Lambert MP, Finch CE, Krafft GA and Klein WL (2003). Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(18): 10417-10422.

Grafstein B and Forman DS (1980). Intracellular transport in neurons. *Physiol Rev* 60(4): 1167-1283.

Gralle M and Ferreira ST (2007). Structure and functions of the human amyloid precursor protein: the whole is more than the sum of its parts. *Prog Neurobiol* 82(1): 11-32.

Grimes CA and Jope RS (2001). The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog Neurobiol* 65(4): 391-426.

Gross SP (2003). Dynactin: coordinating motors with opposite inclinations. *Curr Biol* 13(8): R320-322.

Gross SP, Welte MA, Block SM and Wieschaus EF (2002). Coordination of opposite-polarity microtubule motors. *J Cell Biol* 156(4): 715-724.

Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS and Wisniewski HM (1986). Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 261(13): 6084-6089.

Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM and Binder LI (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(13): 4913-4917.

Gunawardena S and Goldstein LS (2001). Disruption of axonal transport and neuronal viability by amyloid precursor protein mutations in Drosophila. *Neuron* 32(3): 389-401.

Haass C and Selkoe DJ (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(2): 101-112.

Hanger DP, Betts JC, Loviny TL, Blackstock WP and Anderton BH (1998). New phosphorylation sites identified in hyperphosphorylated tau (paired helical filament-tau) from Alzheimer's disease brain using nanoelectrospray mass spectrometry. *J Neurochem* 71(6): 2465-2476.

Hardy JA and Higgins GA (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256(5054): 184-185.

Hayden JH (1988). Microtubule-associated organelle and vesicle transport in fibroblasts. *Cell Motil Cytoskeleton* 10(1-2): 255-262.

Hering H and Sheng M (2001). Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nat Rev Neurosci* 2(12): 880-888.

Hirokawa N (1982). Cross-linker system between neurofilaments, microtubules, and membranous organelles in frog axons revealed by the quick-freeze, deep-etching method. *J Cell Biol* 94(1): 129-142.

Hirokawa N (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* 279(5350): 519-526.

Hirokawa N, Sato-Yoshitake R, Yoshida T and Kawashima T (1990). Brain dynein (MAP1C) localizes on both anterogradely and retrogradely transported membranous organelles in vivo. *J Cell Biol* 111(3): 1027-1037.

Hirokawa N and Takemura R (2004). Kinesin superfamily proteins and their various functions and dynamics. *Exp Cell Res* 301(1): 50-59.

Hirokawa N and Takemura R (2005). Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat Rev Neurosci* 6(3): 201-214.

Hiruma H, Katakura T, Takahashi S, Ichikawa T and Kawakami T (2003). Glutamate and amyloid beta-protein rapidly inhibit fast axonal transport in cultured rat hippocampal neurons by different mechanisms. *J Neurosci* 23(26): 8967-8977.

Hollenbeck PJ (1993). Products of endocytosis and autophagy are retrieved from axons by regulated retrograde organelle transport. *J Cell Biol* 121(2): 305-315.

Hollenbeck PJ (1996). The pattern and mechanism of mitochondrial transport in axons. *Front Biosci* 1: d91-102.

Hoshi M, Sato M, Matsumoto S, Noguchi A, Yasutake K, Yoshida N and Sato K (2003). Spherical aggregates of beta-amyloid (amylospheroid) show high neurotoxicity and activate tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(11): 6370-6375.

Ikonomidou C, Stefovska V and Turski L (2000). Neuronal death enhanced by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(23): 12885-12890.

Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, Khatoon S, Li B, Liu F, Rahman A, Tanimukai H and Grundke-Iqbal I (2005). Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 1739(2-3): 198-210.

Ishihara T, Hong M, Zhang B, Nakagawa Y, Lee MK, Trojanowski JQ and Lee VM (1999). Age-dependent emergence and progression of a tauopathy in transgenic mice overexpressing the shortest human tau isoform. *Neuron* 24(3): 751-762.

Iwata N, Higuchi M and Saido TC (2005). Metabolism of amyloid-beta peptide and Alzheimer's disease. *Pharmacol Ther* 108(2): 129-148.

Jacobsen JS, Wu CC, Redwine JM, Comery TA, Arias R, Bowlby M, Martone R, Morrison JH, Pangalos MN, Reinhart PH and Bloom FE (2006). Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(13): 5161-5166.

Jarrett JT, Berger EP and Lansbury PT, Jr. (1993). The C-terminus of the beta protein is critical in amyloidogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 695: 144-148.

Jicha GA, Weaver C, Lane E, Vianna C, Kress Y, Rockwood J and Davies P (1999). cAMP-dependent protein kinase phosphorylations on tau in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 19(17): 7486-7494.

Job C and Eberwine J (2001). Localization and translation of mRNA in dendrites and axons. *Nat Rev Neurosci* 2(12): 889-898.

Johnson GV and Stoothoff WH (2004). Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *J Cell Sci* 117(Pt 24): 5721-5729.

Kaech S and Banker G (2006). Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc* 1(5): 2406-2415.

Kamal A, Almenar-Queralt A, LeBlanc JF, Roberts EA and Goldstein LS (2001). Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP. *Nature* 414(6864): 643-648.

Kamal A, Stokin GB, Yang Z, Xia CH and Goldstein LS (2000). Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I. *Neuron* 28(2): 449-459.

Kardon JR and Vale RD (2009). Regulators of the cytoplasmic dynein motor. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(12): 854-865.

Kawarabayashi T, Shoji M, Yamaguchi H, Tanaka M, Harigaya Y, Ishiguro K and Hirai S (1993). Amyloid beta protein precursor accumulates in swollen neurites throughout rat brain with aging. *Neurosci Lett* 153(1): 73-76.

Kelly BL and Ferreira A (2006). beta-Amyloid-induced dynamin 1 degradation is mediated by N-methyl-D-aspartate receptors in hippocampal neurons. *J Biol Chem* 281(38): 28079-28089.

Kempf M, Clement A, Faissner A, Lee G and Brandt R (1996). Tau binds to the distal axon early in development of polarity in a microtubule- and microfilament-dependent manner. *J Neurosci* 16(18): 5583-5592.

Khatoon S, Grundke-Iqbal I and Iqbal K (1992). Brain levels of microtubule-associated protein tau are elevated in Alzheimer's disease: a radioimmuno-slot-blot assay for nanograms of the protein. *J Neurochem* 59(2): 750-753.

Khatoon S, Grundke-Iqbal I and Iqbal K (1994). Levels of normal and abnormally phosphorylated tau in different cellular and regional compartments of Alzheimer disease and control brains. *FEBS Lett* 351(1): 80-84.

King ME, Kan HM, Baas PW, Erisir A, Glabe CG and Bloom GS (2006). Tau-dependent microtubule disassembly initiated by prefibrillar beta-amyloid. *J Cell Biol* 175(4): 541-546.

Kins S, Kurosinski P, Nitsch RM and Gotz J (2003). Activation of the ERK and JNK signaling pathways caused by neuron-specific inhibition of PP2A in transgenic mice. *Am J Pathol* 163(3): 833-843.

Kirschenbaum F, Hsu SC, Cordell B and McCarthy JV (2001). Glycogen synthase kinase-3beta regulates presenilin 1 C-terminal fragment levels. *J Biol Chem* 276(33): 30701-30707.

Klein WL (2006). Synaptic targeting by A beta oligomers (ADDLS) as a basis for memory loss in early Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2(1): 43-55.

Klein WL, Krafft GA and Finch CE (2001). Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci* 24(4): 219-224.

Klein WL, Stine WB, Jr. and Teplow DB (2004). Small assemblies of unmodified amyloid beta-protein are the proximate neurotoxin in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 25(5): 569-580.

Knowles JK, Rajadas J, Nguyen TV, Yang T, LeMieux MC, Vander Griend L, Ishikawa C, Massa SM, Wyss-Coray T and Longo FM (2009). The p75 neurotrophin receptor promotes amyloid-beta(1-42)-induced neuritic dystrophy in vitro and in vivo. *J Neurosci* 29(34): 10627-10637.

Koffie RM, Meyer-Luehmann M, Hashimoto T, Adams KW, Mielke ML, Garcia-Alloza M, Micheva KD, Smith SJ, Kim ML, Lee VM, Hyman BT and Spires-Jones TL (2009). Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(10): 4012-4017.

Kotilinek LA, Bacskai B, Westerman M, Kawarabayashi T, Younkin L, Hyman BT, Younkin S and Ashe KH (2002). Reversible memory loss in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 22(15): 6331-6335.

Krisky DM, Marconi PC, Oligino TJ, Rouse RJ, Fink DJ, Cohen JB, Watkins SC and Glorioso JC (1998). Development of herpes simplex virus replication-defective multigene vectors for combination gene therapy applications. *Gene Ther* 5(11): 1517-1530.

Kwinter DM, Lo K, Mafi P and Silverman MA (2009). Dynactin regulates bidirectional transport of dense-core vesicles in the axon and dendrites of cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* 162(4): 1001-1010.

Kwinter DM and Silverman MA (2009). Live imaging of dense-core vesicles in primary cultured hippocampal neurons. *J Vis Exp*(27).

Lacor PN, Buniel MC, Chang L, Fernandez SJ, Gong Y, Viola KL, Lambert MP, Velasco PT, Bigio EH, Finch CE, Krafft GA and Klein WL (2004). Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *J Neurosci* 24(45): 10191-10200.

Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, Clemente AS, Velasco PT, Wood M, Viola KL and Klein WL (2007). Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 27(4): 796-807.

Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA and Klein WL (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(11): 6448-6453.

Langbart C (2002). Diagnosing and treating Alzheimer's disease: a practitioner's overview. *J Am Acad Nurse Pract* 14(3): 103-109; quiz 110-102.

Lauren J, Gimbel DA, Nygaard HB, Gilbert JW and Strittmatter SM (2009). Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* 457(7233): 1128-1132.

Lawrence CJ, Dawe RK, Christie KR, Cleveland DW, Dawson SC, Endow SA, Goldstein LS, Goodson HV, Hirokawa N, Howard J, Malmberg RL, McIntosh JR, Miki H, Mitchison TJ, Okada Y, Reddy AS, Saxton WM, Schliwa M, Scholey JM, Vale RD, Walczak CE and Wordeman L (2004). A standardized kinesin nomenclature. *J Cell Biol* 167(1): 19-22.

Lazarov O, Morfini GA, Pigino G, Gadadhar A, Chen X, Robinson J, Ho H, Brady ST and Sisodia SS (2007). Impairments in fast axonal transport and motor neuron deficits in transgenic mice expressing familial Alzheimer's disease-linked mutant presenilin 1. *J Neurosci* 27(26): 7011-7020.

Li JY, Pfister KK, Brady ST and Dahlstrom A (2000). Cytoplasmic dynein conversion at a crush injury in rat peripheral axons. *J Neurosci Res* 61(2): 151-161.

Lindsay J, Laurin D, Verreault R, Hebert R, Helliwell B, Hill GB and McDowell I (2002). Risk factors for Alzheimer's disease: a prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging. *Am J Epidemiol* 156(5): 445-453.

Lochner JE, Kingma M, Kuhn S, Meliza CD, Cutler B and Scalettar BA (1998). Real-time imaging of the axonal transport of granules containing a tissue plasminogen activator/green fluorescent protein hybrid. *Mol Biol Cell* 9(9): 2463-2476.

Lochner JE, Spangler E, Chavarha M, Jacobs C, McAllister K, Schuttner LC and Scalettar BA (2008). Efficient copackaging and cotransport yields postsynaptic colocalization of neuromodulators associated with synaptic plasticity. *Dev Neurobiol* 68(10): 1243-1256.

Louzada PR, Jr., Paula Lima AC, de Mello FG and Ferreira ST (2001). Dual role of glutamatergic neurotransmission on amyloid beta(1-42) aggregation and neurotoxicity in embryonic avian retina. *Neurosci Lett* 301(1): 59-63.

Lu Q and Wood JG (1993). Functional studies of Alzheimer's disease tau protein. *J Neurosci* 13(2): 508-515.

Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE and Rogers J (1999). Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 155(3): 853-862.

Lye RJ, Porter ME, Scholey JM and McIntosh JR (1987). Identification of a microtubule-based cytoplasmic motor in the nematode C. elegans. *Cell* 51(2): 309-318.

Machuca I, Jacquemont B and Epstein A (1986). Multiple adjacent or overlapping loci affecting the level of gC and cell fusion mapped by intratypic recombinants of HSV-1. *Virology* 150(1): 117-125.

Magdesian MH, Carvalho MM, Mendes FA, Saraiva LM, Juliano MA, Juliano L, Garcia-Abreu J and Ferreira ST (2008). Amyloid-beta binds to the extracellular cysteine-rich domain of Frizzled and inhibits Wnt/beta-catenin signaling. *J Biol Chem* 283(14): 9359-9368.

Mallik R and Gross SP (2004). Molecular motors: strategies to get along. *Curr Biol* 14(22): R971-982.

Mandell JW and Banker GA (1996). A spatial gradient of tau protein phosphorylation in nascent axons. *J Neurosci* 16(18): 5727-5740.

Massaad CA, Amin SK, Hu L, Mei Y, Klann E and Pautler RG (2010). Mitochondrial superoxide contributes to blood flow and axonal transport deficits in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* 5(5): e10561.

Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL and Beyreuther K (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(12): 4245-4249.

Mattson MP (2003). Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Med* 3(2): 65-94.

Mattson MP (2004). Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430(7000): 631-639.

Mattson MP (2008). Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Ann N Y Acad Sci* 1144: 97-112.

Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I and Rydel RE (1992). beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci* 12(2): 376-389.

Mayeux R and Sano M (1999). Treatment of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 341(22): 1670-1679.

McDonald D, Vodicka MA, Lucero G, Svitkina TM, Borisy GG, Emerman M and Hope TJ (2002). Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J Cell Biol* 159(3): 441-452.

McGeer PL and McGeer EG (2002). Innate immunity, local inflammation, and degenerative disease. *Sci Aging Knowledge Environ* 2002(29): re3.

McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI and Masters CL (1999). Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 46(6): 860-866.

Miguel-Hidalgo JJ, Alvarez XA, Cacabelos R and Quack G (2002). Neuroprotection by memantine against neurodegeneration induced by beta-amyloid(1-40). *Brain Res* 958(1): 210-221.

Miki H, Setou M, Kaneshiro K and Hirokawa N (2001). All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(13): 7004-7011.

Moolman DL, Vitolo OV, Vonsattel JP and Shelanski ML (2004). Dendrite and dendritic spine alterations in Alzheimer models. *J Neurocytol* 33(3): 377-387.

Morfini G, Pigino G and Brady ST (2007). Approaches to kinesin-1 phosphorylation. *Methods Mol Biol* 392: 51-69.

Morfini G, Pigino G, Szebenyi G, You Y, Pollema S and Brady ST (2006). JNK mediates pathogenic effects of polyglutamine-expanded androgen receptor on fast axonal transport. *Nat Neurosci* 9(7): 907-916.

Morfini G, Szebenyi G, Elluru R, Ratner N and Brady ST (2002). Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates kinesin light chains and negatively regulates kinesin-based motility. *EMBO J* 21(3): 281-293.

Morfini G, Szebenyi G, Richards B and Brady ST (2001). Regulation of kinesin: implications for neuronal development. *Dev Neurosci* 23(4-5): 364-376.

Morfini GA, Burns M, Binder LI, Kanaan NM, LaPointe N, Bosco DA, Brown RH, Jr., Brown H, Tiwari A, Hayward L, Edgar J, Nave KA, Garberrn J, Atagi Y, Song Y, Pigino G and Brady ST (2009). Axonal transport defects in neurodegenerative diseases. *J Neurosci* 29(41): 12776-12786.

Morfini GA, You YM, Pollema SL, Kaminska A, Liu K, Yoshioka K, Bjorkblom B, Coffey ET, Bagnato C, Han D, Huang CF, Banker G, Pigino G and Brady ST (2009). Pathogenic huntingtin inhibits fast axonal transport by activating JNK3 and phosphorylating kinesin. *Nat Neurosci* 12(7): 864-871.

Morris RG, Anderson E, Lynch GS and Baudry M (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319(6056): 774-776.

Muller MJ, Klumpp S and Lipowsky R (2008). Tug-of-war as a cooperative mechanism for bidirectional cargo transport by molecular motors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(12): 4609-4614.

Muresan V and Muresan Z (2009). Is abnormal axonal transport a cause, a contributing factor or a consequence of the neuronal pathology in Alzheimer's disease? *Future Neurol* 4(6): 761-773.

Naslund J, Haroutunian V, Mohs R, Davis KL, Davies P, Greengard P and Buxbaum JD (2000). Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA* 283(12): 1571-1577.

Niewiadomska G and Baksalerska-Pazera M (2003). Age-dependent changes in axonal transport and cellular distribution of Tau 1 in the rat basal forebrain neurons. *Neuroreport* 14(13): 1701-1706.

Nusser Z, Lujan R, Laube G, Roberts JD, Molnar E and Somogyi P (1998). Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. *Neuron* 21(3): 545-559.

Parsons CG, Gruner R, Rozental J, Millar J and Lodge D (1993). Patch clamp studies on the kinetics and selectivity of N-methyl-D-aspartate receptor antagonism by memantine (1-amino-3,5-dimethyladamantan). *Neuropharmacology* 32(12): 1337-1350.

Paschal BM, Shpetner HS and Vallee RB (1987). MAP 1C is a microtubule-activated ATPase which translocates microtubules in vitro and has dynein-like properties. *J Cell Biol* 105(3): 1273-1282.

Pei JJ, Braak E, Braak H, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Winblad B and Cowburn RF (1999). Distribution of active glycogen synthase kinase 3beta (GSK-3beta) in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes. *J Neuropathol Exp Neurol* 58(9): 1010-1019.

Pei JJ, Gong CX, An WL, Winblad B, Cowburn RF, Grundke-Iqbal I and Iqbal K (2003). Okadaic-acid-induced inhibition of protein phosphatase 2A produces activation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2, MEK1/2, and p70 S6, similar to that in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 163(3): 845-858.

Pei JJ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Bogdanovic N, Winblad B and Cowburn RF (1998). Accumulation of cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) in neurons with early stages of Alzheimer's disease neurofibrillary degeneration. *Brain Res* 797(2): 267-277.

Peineau S, Bradley C, Taghibiglou C, Doherty A, Bortolotto ZA, Wang YT and Collingridge GL (2008). The role of GSK-3 in synaptic plasticity. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1: S428-437.

Peineau S, Taghibiglou C, Bradley C, Wong TP, Liu L, Lu J, Lo E, Wu D, Saule E, Bouschet T, Matthews P, Isaac JT, Bortolotto ZA, Wang YT and Collingridge GL (2007). LTP inhibits LTD in the hippocampus via regulation of GSK3beta. *Neuron* 53(5): 703-717.

Pfister KK, Fisher EM, Gibbons IR, Hays TS, Holzbaur EL, McIntosh JR, Porter ME, Schroer TA, Vaughan KT, Witman GB, King SM and Vallee RB (2005). Cytoplasmic dynein nomenclature. *J Cell Biol* 171(3): 411-413.

Pigino G, Morfini G, Atagi Y, Deshpande A, Yu C, Jungbauer L, LaDu M, Busciglio J and Brady S (2009). Disruption of fast axonal transport is a pathogenic mechanism for intraneuronal amyloid beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(14): 5907-5912.

Pigino G, Morfini G, Pelsman A, Mattson MP, Brady ST and Busciglio J (2003). Alzheimer's presenilin 1 mutations impair kinesin-based axonal transport. *J Neurosci* 23(11): 4499-4508.

Pigino G, Pelsman A, Mori H and Busciglio J (2001). Presenilin-1 mutations reduce cytoskeletal association, deregulate neurite growth, and potentiate neuronal dystrophy and tau phosphorylation. *J Neurosci* 21(3): 834-842.

Placzek AN, Zhang TA and Dani JA (2009). Nicotinic mechanisms influencing synaptic plasticity in the hippocampus. *Acta Pharmacol Sin* 30(6): 752-760.

Planel E, Yasutake K, Fujita SC and Ishiguro K (2001). Inhibition of protein phosphatase 2A overrides tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3 beta and cyclin-dependent kinase 5 inhibition and results in tau hyperphosphorylation in the hippocampus of starved mouse. *J Biol Chem* 276(36): 34298-34306.

Plattner F, Angelo M and Giese KP (2006). The roles of cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 in tau hyperphosphorylation. *J Biol Chem* 281(35): 25457-25465.

Porter ME and Johnson KA (1989). Dynein structure and function. *Annu Rev Cell Biol* 5: 119-151.

Reed NA, Cai D, Blasius TL, Jih GT, Meyhofer E, Gaertig J and Verhey KJ (2006). Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr Biol* 16(21): 2166-2172.

Rose JB, Crews L, Rockenstein E, Adame A, Mante M, Hersh LB, Gage FH, Spencer B, Potkar R, Marr RA and Masliah E (2009). Neuropeptide Y fragments derived from neprilysin processing are neuroprotective in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 29(4): 1115-1125.

Rosenmann H, Grigoriadis N, Eldar-Levy H, Avital A, Rozenstein L, Touloumi O, Behar L, Ben-Hur T, Avraham Y, Berry E, Segal M, Ginzburg I and Abramsky O (2008). A novel transgenic mouse expressing double mutant tau driven by its natural promoter exhibits tauopathy characteristics. *Exp Neurol* 212(1): 71-84.

Rowland LM, Astur RS, Jung RE, Bustillo JR, Lauriello J and Yeo RA (2005). Selective cognitive impairments associated with NMDA receptor blockade in humans. *Neuropsychopharmacology* 30(3): 633-639.

Rui Y, Tiwari P, Xie Z and Zheng JQ (2006). Acute impairment of mitochondrial trafficking by beta-amyloid peptides in hippocampal neurons. *J Neurosci* 26(41): 10480-10487.

Sabo SL and McAllister AK (2003). Mobility and cycling of synaptic protein-containing vesicles in axonal growth cone filopodia. *Nat Neurosci* 6(12): 1264-1269.

Salehi A, Delcroix JD, Belichenko PV, Zhan K, Wu C, Valletta JS, Takimoto-Kimura R, Kleschevnikov AM, Sambamurti K, Chung PP, Xia W, Villar A, Campbell WA, Kulnane LS, Nixon RA, Lamb BT, Epstein CJ, Stokin GB, Goldstein LS and Mobley WC (2006). Increased App expression in a mouse model of Down's syndrome disrupts NGF transport and causes cholinergic neuron degeneration. *Neuron* 51(1): 29-42.

Schlager MA and Hoogenraad CC (2009). Basic mechanisms for recognition and transport of synaptic cargos. *Mol Brain* 2(1): 25.

Scholey JM, Heuser J, Yang JT and Goldstein LS (1989). Identification of globular mechanochemical heads of kinesin. *Nature* 338(6213): 355-357.

Schoonenboom NS, Mulder C, Van Kamp GJ, Mehta SP, Scheltens P, Blankenstein MA and Mehta PD (2005). Amyloid beta 38, 40, and 42 species in cerebrospinal fluid: more of the same? *Ann Neurol* 58(1): 139-142.

Selkoe DJ (2001). Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *J Alzheimers Dis* 3(1): 75-80.

Selkoe DJ (2002). Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298(5594): 789-791.

Sengupta A, Wu Q, Grundke-Iqbal I, Iqbal K and Singh TJ (1997). Potentiation of GSK-3-catalyzed Alzheimer-like phosphorylation of human tau by cdk5. *Mol Cell Biochem* 167(1-2): 99-105.

Serrano F and Klann E (2004). Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. *Ageing Res Rev* 3(4): 431-443.

Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D, Sinha S, Schlossmacher M, Whaley J, Swindlehurst C and et al. (1992). Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature* 359(6393): 325-327.

Shah JV, Flanagan LA, Janmey PA and Leterrier JF (2000). Bidirectional translocation of neurofilaments along microtubules mediated in part by dynein/dynactin. *Mol Biol Cell* 11(10): 3495-3508.

Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ and Sabatini BL (2007). Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci* 27(11): 2866-2875.

Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL and Selkoe DJ

(2008). Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 14(8): 837-842.

Silverman MA, Johnson S, Gurkins D, Farmer M, Lochner JE, Rosa P and Scalettar BA (2005). Mechanisms of transport and exocytosis of dense-core granules containing tissue plasminogen activator in developing hippocampal neurons. *J Neurosci* 25(12): 3095-3106.

Smith GA, Gross SP and Enquist LW (2001). Herpesviruses use bidirectional fast-axonal transport to spread in sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(6): 3466-3470.

Smith RS (1988). Studies on the mechanism of the reversal of rapid organelle transport in myelinated axons of Xenopus laevis. *Cell Motil Cytoskeleton* 10(1-2): 296-308.

Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, Nairn AC, Salter MW, Lombroso PJ, Gouras GK and Greengard P (2005). Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci* 8(8): 1051-1058.

Sontag E, Nunbhakdi-Craig V, Lee G, Brandt R, Kamibayashi C, Kuret J, White CL, 3rd, Mumby MC and Bloom GS (1999). Molecular interactions among protein phosphatase 2A, tau, and microtubules. Implications for the regulation of tau phosphorylation and the development of tauopathies. *J Biol Chem* 274(36): 25490-25498.

Spires TL, Meyer-Luehmann M, Stern EA, McLean PJ, Skoch J, Nguyen PT, Bacskai BJ and Hyman BT (2005). Dendritic spine abnormalities in amyloid precursor protein transgenic mice demonstrated by gene transfer and intravital multiphoton microscopy. *J Neurosci* 25(31): 7278-7287.

Spittaels K, Van den Haute C, Van Dorpe J, Geerts H, Mercken M, Bruynseels K, Lasrado R, Vandezande K, Laenen I, Boon T, Van Lint J, Vandenheede J, Moechars D, Loos R and Van Leuven F (2000). Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylates protein tau and rescues the axonopathy in the central nervous system of human four-repeat tau transgenic mice. *J Biol Chem* 275(52): 41340-41349.

Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E and Mandelkow EM (2002). Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J Cell Biol* 156(6): 1051-1063.

Stefani M and Dobson CM (2003). Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J Mol Med* 81(11): 678-699.

Stenoien DL and Brady ST (1997). Immunochemical analysis of kinesin light chain function. *Mol Biol Cell* 8(4): 675-689.

Stokin GB, Lillo C, Falzone TL, Brusch RG, Rockenstein E, Mount SL, Raman R, Davies P, Masliah E, Williams DS and Goldstein LS (2005). Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science* 307(5713): 1282-1288.

Stromer T and Serpell LC (2005). Structure and morphology of the Alzheimer's amyloid fibril. *Microsc Res Tech* 67(3-4): 210-217.

Sturchler E, Galichet A, Weibel M, Leclerc E and Heizmann CW (2008). Site-specific blockade of RAGE-Vd prevents amyloid-beta oligomer neurotoxicity. *J Neurosci* 28(20): 5149-5158.

Susalka SJ and Pfister KK (2000). Cytoplasmic dynein subunit heterogeneity: implications for axonal transport. *J Neurocytol* 29(11-12): 819-829.

Tabaton M, Nunzi MG, Xue R, Usiak M, Autilio-Gambetti L and Gambetti P (1994). Soluble amyloid beta-protein is a marker of Alzheimer amyloid in brain but not in cerebrospinal fluid. *Biochem Biophys Res Commun* 200(3): 1598-1603.

Tatebayashi Y, Haque N, Tung YC, Iqbal K and Grundke-Iqbal I (2004). Role of tau phosphorylation by glycogen synthase kinase-3beta in the regulation of organelle transport. *J Cell Sci* 117(Pt 9): 1653-1663.

Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA and Katzman R (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 30(4): 572-580.

Thomsen MS, Hansen HH, Timmerman DB and Mikkelsen JD (2010). Cognitive improvement by activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors: from animal models to human pathophysiology. *Curr Pharm Des* 16(3): 323-343.

Trinczek B, Ebneth A, Mandelkow EM and Mandelkow E (1999). Tau regulates the attachment/detachment but not the speed of motors in microtubule-dependent transport of single vesicles and organelles. *J Cell Sci* 112 (Pt 14): 2355-2367.

Trushina E, Dyer RB, Badger JD, 2nd, Ure D, Eide L, Tran DD, Vrieze BT, Legendre-Guillemin V, McPherson PS, Mandavilli BS, Van Houten B, Zeitlin S, McNiven M, Aebersold R, Hayden M, Parisi JE, Seeberg E, Dragatsis I, Doyle K, Bender A, Chacko C and McMurray CT (2004). Mutant huntingtin impairs axonal trafficking in mammalian neurons in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol* 24(18): 8195-8209.

Uchida A, Tashiro T, Komiya Y, Yorifuji H, Kishimoto T and Hisanaga S (2004). Morphological and biochemical changes of neurofilaments in aged rat sciatic nerve axons. *J Neurochem* 88(3): 735-745.

Vale RD (2003). The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 112(4): 467-480.

Vale RD, Reese TS and Sheetz MP (1985). Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* 42(1): 39-50.

Vallee RB, Wall JS, Paschal BM and Shpetner HS (1988). Microtubule-associated protein 1C from brain is a two-headed cytosolic dynein. *Nature* 332(6164): 561-563.

Vallee RB, Williams JC, Varma D and Barnhart LE (2004). Dynein: An ancient motor protein involved in multiple modes of transport. *J Neurobiol* 58(2): 189-200.

Vogelsberg-Ragaglia V, Schuck T, Trojanowski JQ and Lee VM (2001). PP2A mRNA expression is quantitatively decreased in Alzheimer's disease hippocampus. *Exp Neurol* 168(2): 402-412.

Wacker I, Kaether C, Kromer A, Migala A, Almers W and Gerdes HH (1997). Microtubule-dependent transport of secretory vesicles visualized in real time with a GFP-tagged secretory protein. *J Cell Sci* 110 (Pt 13): 1453-1463.

Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ and Selkoe DJ (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416(6880): 535-539.

Walsh DM, Klyubin I, Shankar GM, Townsend M, Fadeeva JV, Betts V, Podlisny MB, Cleary JP, Ashe KH, Rowan MJ and Selkoe DJ (2005). The role of cell-derived oligomers of Abeta in Alzheimer's disease and avenues for therapeutic intervention. *Biochem Soc Trans* 33(Pt 5): 1087-1090.

Walsh DM and Selkoe DJ (2004). Oligomers on the brain: the emerging role of soluble protein aggregates in neurodegeneration. *Protein Pept Lett* 11(3): 213-228.

Wang HW, Pasternak JF, Kuo H, Ristic H, Lambert MP, Chromy B, Viola KL, Klein WL, Stine WB, Krafft GA and Trommer BL (2002). Soluble oligomers of beta amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus. *Brain Res* 924(2): 133-140.

Wang JZ, Gong CX, Zaidi T, Grundke-Iqbal I and Iqbal K (1995). Dephosphorylation of Alzheimer paired helical filaments by protein phosphatase-2A and -2B. *J Biol Chem* 270(9): 4854-4860.

Wang JZ, Grundke-Iqbal I and Iqbal K (2007). Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *Eur J Neurosci* 25(1): 59-68.

Wang JZ and Liu F (2008). Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons. *Prog Neurobiol* 85(2): 148-175.

Weinmann S, Roll S, Schwarzbach C, Vauth C and Willich SN (2010). Effects of Ginkgo biloba in dementia: systematic review and meta-analysis. *BMC Geriatr* 10: 14.

Welte MA (2004). Bidirectional transport along microtubules. *Curr Biol* 14(13): R525-537.

Welte MA and Gross SP (2008). Molecular motors: a traffic cop within? *HFSP J* 2(4): 178-182.

Xiao J, Perry G, Troncoso J and Monteiro MJ (1996). alpha-calcium-calmodulin-dependent kinase II is associated with paired helical filaments of Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 55(9): 954-963.

Yuan A, Kumar A, Peterhoff C, Duff K and Nixon RA (2008). Axonal transport rates in vivo are unaffected by tau deletion or overexpression in mice. *J Neurosci* 28(7): 1682-1687.

Zaupa C, Revol-Guyot V and Epstein AL (2003). Improved packaging system for generation of high-level noncytotoxic HSV-1 amplicon vectors using Cre-loxP site-specific recombination to delete the packaging signals of defective helper genomes. *Hum Gene Ther* 14(11): 1049-1063.

Zhang B, Higuchi M, Yoshiyama Y, Ishihara T, Forman MS, Martinez D, Joyce S, Trojanowski JQ and Lee VM (2004). Retarded axonal transport of R406W mutant tau in transgenic mice with a neurodegenerative tauopathy. *J Neurosci* 24(19): 4657-4667.

Zhao WQ, Santini F, Breese R, Ross D, Zhang XD, Stone DJ, Ferrer M, Townsend M, Wolfe AL, Seager MA, Kinney GG, Shughrue PJ and Ray WJ (2010). Inhibition of calcineurin-mediated endocytosis and alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors prevents amyloid beta oligomer-induced synaptic disruption. *J Biol Chem* 285(10): 7619-7632.

VIII) ANEXOS

VIII. 1) ARTIGO 1:

"Receptores NMDA são requeridos para ligação sináptica de oligômeros de Aβ"

"N-methyl-D-aspartate receptors are required for synaptic targeting of Alzheimer's toxic Aβ oligomers"

Helena Decker[1,2], Sofia Jürgensen[1], Martin F. Adrover[3], Jordano Brito-Moreira[1], Theresa R. Bomfim[1], William L. Klein[4], Alberto L. Epstein[5], Fernanda G. De Felice[1], Diana Jerusalinsky[3], Sergio T. Ferreira[1]

1- Institute of Medical Biochemistry,
2- Program in Morphological Sciences, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21944-590, Brazil;
3- Institute of Cellular Biology & Neuroscience 'Professor Eduardo de Robertis', School of Medicine & CBC, University of Buenos Aires & CONICET, Buenos Aires, Argentina;
4- Department of Neurobiology and Physiology, Northwestern University, Evanston, IL 60820, USA;
5- Centre de Génétique Moléculaire et Cellulaire, Université Claude Bernard, Lyon 1, Villeurbanne, F- 69622; CNRS, UMR5534, France.

Submetido para publicação.

N-methyl-D-aspartate receptors are required for synaptic targeting of Alzheimer's toxic Aβ oligomers

Helena Decker[1,2], Sofia Jürgensen[1], Martin F. Adrover[3], Jordano Brito-Moreira[1], Theresa R. Bomfim[1], William L. Klein[4], Alberto L. Epstein[5], Fernanda G. De Felice[1], Diana Jerusalinsky[3], Sergio T. Ferreira[1]

Institute of Medical Biochemistry[1], and Program in Morphological Sciences[2], Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21944-590, Brazil; Institute of Cellular Biology & Neuroscience 'Professor Eduardo de Robertis', School of Medicine & CBC, University of Buenos Aires & CONICET, Buenos Aires, Argentina[3]; Department of Neurobiology and Physiology, Northwestern University, Evanston, IL 60820, USA[4];

Centre de Génétique Moléculaire et Cellulaire, Université Claude Bernard, Lyon 1, Villeurbanne, F- 69622; CNRS, UMR5534, France[5].

Running head: Synaptic targeting of Aβ oligomers

Address correspondence to: Sergio T. Ferreira; Institute of Medical Biochemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21944-590, Brazil. Tel: (+55-21)2562-6790
E-mail: ferreira@bioqmed.ufrj.br

Soluble Aβ oligomers, known to accumulate in Alzheimer's disease (AD) brains, target excitatory post-synaptic terminals. This is thought to trigger synapse deterioration, a mechanism possibly underlying AD memory loss. A major unknown is the identity of the receptor(s) targeted by oligomers. Because oligomers interfere with N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) function, we hypothesized that NMDARs might be required for oligomer binding to synapses. An amplicon vector was used to knock-down NMDARs in mature hippocampal neuronal cultures, yielding 90% reduction in dendritic NMDAR expression and blocking oligomer-induced neuronal oxidative stress. Remarkably, NMDAR knock-down abolished oligomer binding to synapses. Nevertheless, oligomers do not directly bind to NMDARs as insulin, shown to down-regulate oligomer-binding sites, did not cause NMDAR down-regulation. Establishing that NMDARs are key components of the synaptic oligomer binding complex may illuminate the development of novel approaches to prevent synapse failure triggered by Aβ oligomers.

N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) are critical for synaptic plasticity mechanisms underlying learning and memory, such as long-term potentiation (LTP) (1-3). On the other hand, aberrant activation of NMDARs has been implicated in a number of pathological conditions, including the deleterious neuronal impact of soluble Aβ oligomers (4-7). Aβ oligomers are neurotoxins that accumulate in the brains and CSF of Alzheimer's disease (AD) patients (8-10), acting as gain-of-function pathogenic ligands (11) that attack synapses (12-13) and block LTP (14-16). Recent studies have shown that binding of Aβ oligomers to neurons instigates AD-type tau hyperphosphorylation (17), changes in synapse structure and receptor composition (6, 18) and oxidative stress (7). The attack on synapses by Aβ oligomers thus provides a unifying mechanism linking major features of AD neuropathology with the characteristic memory dysfunction in AD (19-20).

Aβ oligomers cause deregulation of NMDAR function, initially disrupting calcium homeostasis and triggering neuronal oxidative stress (7, 21), followed by removal of NMDARs from dendrites (4-6, 18). These responses are thought to contribute to plasticity failure and memory dysfunction in AD. We recently found that antibodies against the extracellular domain of the NR1 subunit of NMDARs markedly reduce Aβ oligomer binding to neurons (7). This

suggests that Aβ oligomers bind to synapses in the close vicinity of NMDARs, raising the possibility that NMDARs are necessary components of or are required for assembly of the receptor complex that binds oligomers.

Here, we used herpes virus-derived amplicon vectors expressing an antisense sequence for the NR1 subunit (22-23) to quantitatively knock-down the expression of NMDARs in cultured hippocampal neurons. Results showed that while control neurons attacked by Aβ oligomers exhibit abnormally elevated ROS levels, this pathological response was abrogated in NMDAR knock-down neurons. Significantly, knock-down of NMDARs abolished the binding of Aβ oligomers to synapses. Insulin prevented oligomer-induced removal of NMDARs from neuronal membranes. Because we recently showed that insulin prevents Aβ oligomer binding to neurons by inducing down-regulation of oligomer binding sites (18), our current results indicate that NMDARs themselves are not the molecules to which oligomers bind but are likely essential components of an oligomer-binding complex. Identifying the molecular targets of Aβ oligomers may pave the way for development of treatments capable of eliminating oligomer binding to synapses, effectively halting the progression of AD.

Experimental procedures

Materials. $A\beta_{1-42}$ peptide was from American Peptides (Sunnyvale, California). Insulin, 1,1,1,3,3,3,-hexafluoro-2-propanol (HFIP), DMSO and poly-L-lysine were from Sigma (St. Louis, Missouri). Culture media/supplements, Alexa-labeled secondary antibodies, ProLong and DHE were from Invitrogen (Carlsbad, California). BCA protein assay kit was from Pierce (Deerfield, Illinois). Antibody against the NR1 subunit of NMDARs was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California).

Neuronal cultures. Primary cultures of hippocampal neurons from E18 rat embryos were prepared and maintained in Neurobasal medium supplemented with B27 (Invitrogen) for 18 days as previously described (7).

Viral vector construction. Vectors were prepared using amplicon plasmids expressing the open reading frame of EGFP and either the cDNA of NR1 in antisense (–) orientation (pA-GFP-NR1(–)) or the LacZ gene (pA-GFP-LacZ) (22). Vector stocks were prepared using amplicon plasmids expressing the open reading frame of EGFP and either the cDNA of NR1 in antisense (–) orientation (pA-GFP-NR1(–)) or the LacZ gene (pA-GFP-LacZ) (24). Vector stocks were prepared using the non-replicative, neuroattenuated HSV1 LaLΔJ helper virus as described (24) with slight modifications. Briefly, 7b cells (25) were transfected with either amplicon plasmid using Lipofectamine Plus (Invitrogen, Paisley, UK). One day later, cells were infected with the LaLΔJ helper virus at a multiplicity of infection of 0.3 p.f.u. (plaque forming unit) per cell. When the cytopathic effect was maximal, cells were collected by centrifugation, disrupted by three cycles of freeze/ thawing to release vector particles and centrifuged at 5,000 *g* for 5 min to pellet cell debris. The supernatant was collected and stored at -80 °C. HSV-1 LaLΔJ helper virus particles were titrated by plaque assay on 7b cells (26) and on Vero cells for identification of potential replication-competent revertant particles. To titrate vector particles, Gli36 cells were infected with serial dilutions of each vector stock and cells expressing fluorescent EGFP were scored using a Zeiss Axiophot microscope, as described (24). Titers of all amplicon vector stocks used in this study were above 10^8 particles/ml.

*Preparation and characterization of Aβ oligomers***.** Aβ oligomers (also known as ADDLs) were prepared as previously described (8, 27). Briefly, $A\beta_{1-42}$ (Bachem Inc., Torrance, CA) was dissolved in cold hexafluoro-2-propanol (Merck), incubated at room temperature for 60 min plus 10 min on

ice and the solution was allowed to evaporate. The dried films were stored at -80 ^{o}C. For oligomer preparation, films were resuspended to 5 mM Aβ in anhydrous DMSO (Sigma), diluted to 100 μM in cold sterile PBS and incubated at 4 ºC for 24 hours. The preparation was centrifuged at 14,000 *g* for 10 min at 4 °C to remove insoluble aggregates and the supernatant containing soluble Aβ oligomers was transferred to clean tubes and stored at 4 °C. Oligomer solutions were used within 24 hours of preparation. Protein concentration was determined using the BCA Protein assay (Pierce, Rockford, IL) and bovine serum albumin as a standard. Routine characterization of oligomer preparations was performed by size exclusion chromatography on a GPC-100 column (Eprogen, Darien, IL).

Experimental treatments of cultures and immunocytochemistry. Hippocampal neurons (18 DIV) were exposed to A-GFP-NR1(-) or A-GFP-LacZ (mock) vectors for 2 hours at 37 ^{o}C (in a 5% CO_2 atmosphere). Vector-containing medium was removed and cells were incubated for 30 hours at 37 ^{o}C in conditioned medium produced by the same culture. Cultures were immunolabeled for NMDAR (anti-NR1; Santa Cruz, Temecula, CA; 1:50 dilution) to determine the efficiency of knock-down (relative to control non-infected or LacZ-infected cultures). Additional infected cultures were treated for different times with Aβ oligomers or vehicle, as indicated under "Results". The insulin results were done in non-infected neurons and 1 μM of insulin were added 30 minutes prior Aβ oligomers treatment. Immunocytochemistry was performed as previously described (17) using anti-NR1 or monoclonal Aβ oligomer-selective NU4 antibody (28) (1:1,000 dilution) and anti-rabbit or anti-mouse Alexa Fluor 555-conjugated secondary antibody, respectively (1:1,000 dilution; Molecular Probes, Eugene, OR). Coverslips were mounted using Prolong Gold (Molecular Probes). Cells were imaged on a Nikon Eclipse TE300 microscope or on a Zeiss LSM510 META confocal microscope**.** Quantitative analysis of immunofluorescence data was carried out using NIH Image J (Windows version) as described (17).

Neuronal oxidative stress. Formation of reactive oxygen species (ROS) was measured in live neurons using dihydroethidium (DHE, Molecular Probes, Eugene, OR), a fluorescent probe sensitive to various ROS species, including hydrogen peroxide, hydroxyl radical, peroxyl radicals and peroxynitrite. Cultures incubated for 5 h at 37 °C with 1 μM Aβ oligomers or vehicle were loaded with DHE (10 μM) during the last 40 min of incubation with oligomers. Cells were rinsed three times with warm PBS, once with phenol red-free Neurobasal medium and were immediately imaged on the Nikon microscope. Analysis of DHE fluorescence was carried out using Image J as described (7). Appropriate thresholding was employed to eliminate background signal before histogram analysis. In each experiment, sixteen images were analyzed per experimental condition to allow quantitative determination of changes in neuronal ROS levels. At least three experiments using independent neuronal cultures were performed and integrated fluorescence levels were normalized by the number of cells in each image.

Data Analysis. Quantitative analysis of immunofluorescence data was carried out using NIH Image J (Windows version) as described (7). Appropriate thresholding was employed to eliminate background signal before histogram analysis. Cell bodies were digitally removed from the images so that only dendrite immunofluorescence was analyzed. In each experiment, twenty four images were analyzed per experimental condition to allow quantitative determination of changes in NMDAR or Aβ oligomers immunofluorescence levels. At least three experiments using independent cultures were performed and results were normalized by the number of cells in each image. NR1 or Aβ immunofluorescence levels in individual dendrites imaged by confocal microscopy were determined by

histogram analysis using Image J in 12 individual dendrite segments (20 μm each).

RESULTS

NMDAR knock-down in hippocampal neurons. To investigate the role of NMDARs in Aβ oligomer-induced synaptotoxicity, we initially aimed to knock-down NMDARs in mature hippocampal neurons in culture. Expression of NMDARs was disrupted by infection with an amplicon vector expressing an antisense transgene directed to the constitutive NR1 subunit of NMDARs. This vector has been previously shown to cause a major decrease in NR1 protein levels both in primary neurons in culture and in the hippocampi of adult rats (22-23). Neuronal cultures (18 DIV) were infected by either A-GFP-NR1(-) (NR1 antisense vector) or A-GFP-LacZ (control vector for mock infection) at a multiplicity of infection of 5. About 40% of the neurons were infected (as determined by GFP expression; supplemental information Figure S1A) and cell viability was fully preserved in infected cultures (Figure S1B). Neurons infected by A-GFP-LacZ (mock infection) exhibited punctate NR1 dendritic labeling, indistinguishable from the pattern exhibited by non-infected control neurons (Figure 1A, C). By contrast, overall NR1 immunoreactivity was markedly reduced in neurons infected by A-GFP-NR1(-) (Figure 1B, J) compared to mock-infected controls. Image analysis of individual dendrite segments revealed ~ 90% decrease in dendritic NMDAR expression in A-GFP-NR1(-)-infected neurons compared to mock-infected neurons (Figure 1H, K, I). These results demonstrate that NMDAR knock-down was efficiently achieved in our cultures.

Aβ oligomer-induced ROS formation is blocked in NMDAR knock-down neurons. Aβ oligomers have been shown to instigate excessive neuronal ROS formation through a mechanism that could be blocked by NMDAR antagonists (7). In harmony with those results, Aβ oligomer-induced ROS formation was evident in non-infected neurons and was blocked specifically in NMDAR knock-down neurons (Figure 2). This result demonstrates directly, for the first time, the crucial role of NMDARs in oligomer-induced ROS formation.

NMDAR knock-down eliminates synaptic binding of Aβ oligomers. We have recently shown that antibodies against the extracellular N-terminal domain of the NR1 subunit of NMDARs partially (~ 60%) blocked binding of Aβ oligomers to neurons in culture (7). APV, an NMDAR antagonist, caused a similar reduction in binding, suggesting that oligomers bind either directly to NMDARs or to a protein that interacts closely with NMDARs at synapses (7). To determine whether NMDARs are required for Aβ oligomer targeting to neurons, we next investigated oligomer binding to NMDAR knock-down neurons. Remarkably, A-GFP-NR1(-)-infected neurons showed virtually no binding of Aβ oligomers to their processes (Figure 3B, H, I). In contrast, both mock-infected and non-infected neurons exhibited a characteristic punctate pattern of dendritic Aβ oligomer binding (Figure 3A, C), ruling out the possibility that the reduced binding in knock-down neurons could be a non-specific consequence of infection by the amplicon vector. Aβ oligomer binding was markedly reduced in NMDAR knock-down neurons compared to mock-infected or non-infected neurons (Figure 3J). Image analysis of individual dendrite segments revealed ~ 90% decrease in oligomer binding to NMDAR knock-down neurons (Figure 3K), in excellent agreement with the reduction in dendritic NR1 immunoreactivity described above. These results show that oligomer binding to neurons strictly requires the presence of NMDARs at synapses.

NMDARs are necessary but not sufficient for Aβ oligomer binding. Results described above raised the possibility that Aβ oligomers might bind directly to NMDARs at synapses. However, inspection of hippocampal cultures that were double-labeled for Aβ oligomers and for NMDARs

suggested that this is not the case. In accord with previous reports (e.g., 9), Aβ oligomers bound only to a subset of hippocampal neurons in culture (Fig. 4D). Interestingly, both oligomer-attacked and non-attacked neurons exhibited similar levels of surface NMDAR immunoreactivity (Fig. 4B), suggesting that additional protein components (other than NMDARs) are necessary for assembly of a receptor complex that binds Aβ oligomers at synapses.

To further investigate this issue, we sought an independent way to down-regulate oligomer binding without interference with neuronal NMDAR levels. To this end, we took advantage of our recent finding that stimulation of insulin signaling down-regulates Aβ oligomer binding sites at the neuronal surface (18). Treatment of hippocampal neuronal cultures with insulin caused a significant (~ 50%) reduction in dendritic oligomer binding (Fig. 5E). If Aβ oligomers were indeed binding to NMDARs, one would expect to find a parallel decrease in dendritic NMDAR immunoreactivity in insulin-treated neurons. In contrast, we found that insulin treatment not only did not induce down-regulation of NMDARs, but rather prevented the internalization of NMDARs induced by Aβ oligomers (Fig. 5A-D). Thus, in the presence of insulin Aβ oligomer binding is markedly reduced despite the fact that NMDARs remain at the neuronal membrane. Taken together, these results indicate that NMDARs are necessary but not sufficient for Aβ oligomer binding to synapses.

DISCUSSION

Progress in AD research has been hampered by two fundamental issues with broad implications for our understanding of the molecular mechanisms of pathogenesis and for the rational development of novel and effective therapeutics. The first problem comprises the nature of the toxic species responsible for the initial memory impairment and for neuronal dysfunction in AD. In this regard, considerable advances have been made in the past decade with increased recognition that soluble Aβ oligomers are the proximal neurotoxins that attack synapses and cause synapse failure in the early phases of pathology. The other major unknown is the molecular identity of the molecule(s) that bind Aβ oligomers with high specificity at excitatory synapses. Identification of such Aβ oligomer-binding receptor(s) will open the way for development of drugs that block neuronal targeting of Aβ oligomers.

Aβ oligomers are ligands for post-synaptic spines and co-localize with PSD-95 (9). The specific binding of Aβ oligomers to synapses is lost upon controlled trypsin treatment of neurons, suggesting the involvement of cell-surface proteins (27). A number of candidate oligomer-binding proteins have been proposed in the past few years. For example, a recent study showed that Aβ oligomers bind with nanomolar affinity to cellular prion protein (PrP^C) and that anti-PrP antibodies reduce Aβ oligomer binding to neurons and rescue synaptic plasticity (29). These findings suggest that PrP^C is closely involved in synaptic binding and mediates synaptotoxicity of Aβ oligomers (30). On the other hand, another study has shown that PrP-expressing and PrP-knockout mice are equally susceptible to long-term memory impairment induced by Aβ oligomers injected into their brains (31), indicating that, at least in part, the deleterious effects of Aβ oligomers on plasticity are independent of PrP^C.

Co-immunoprecipitation and photoactivated amino acid cross-linking studies indicated that Aβ oligomers interact with complexes containing the GluR2 subunit of AMPA (α-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate) receptors, a conclusion that was corroborated by the observation that pharmacological removal of surface AMPA receptors or inhibition of AMPA receptors with antagonists reduced Aβ oligomer binding to neurons (32).

In addition, interaction of Aβ oligomers with the extracellular domain of p75 neurotrophin receptor ($p75^{NTR}$) has been reported to mediate Aβ oligomer-induced neuritic dystrophy *in vitro* and *in vivo* (33). Other putative receptors involved in neuronal binding of Aβ oligomers include the receptor for advanced glycation end products (RAGE) (34) and Frizzled (35), which leads to inhibition of Wnt/β-catenin signaling.

Until now, however, the identity of the specific receptor(s) that bind oligomers at synapses has remained elusive. Current results establish that presence of NMDARs is required for oligomer binding to synapses. We have previously demonstrated that NMDARs co-immunoprecipitate with Aβ oligomers from detergent-extracted oligomer-treated rat synaptosomal membranes (7). Consistent with our finding that an N-terminal anti-NR1 antibody markedly reduced oligomer binding to dendrites (7), we now show that oligomer binding is virtually abolished in dendrites of NMDAR knock-down neurons. One possible explanation for this result would be that NMDARs are the receptors that bind Aβ oligomers at synapses. If that were the case, one would expect changes in oligomer binding to parallel changes in NMDAR levels at the neuronal surface. This is in contrast with the observation that similar NMDAR levels are found in both oligomer-attacked and non-attacked neurons. Further insight into this issue was obtained by pre-treatment of neurons with insulin before addition of Aβ oligomers. Insulin induced a marked reduction in dendritic oligomer binding in the absence of changes in NMDAR immunoreactivity, i.e., oligomers failed to bind to dendrites despite the fact that the surface expression of NMDARs was unaffected. This result suggests that NMDARs are either constituents of a multi-protein receptor complex that binds Aβ oligomers (which may include other protein components such as those mentioned above) or they are required for the assembly/surface expression of the Aβ oligomer-binding receptor.

Recent studies have shown that Aβ oligomers disrupt neuronal calcium homeostasis via aberrant activation of NMDARs (7, 21). NMDARs have also been implicated in other neuronal pathologies induced by oligomers, e.g., tau hyperphosphorylation (17) and synapse loss (6). Directly demonstrating the role of NMDARs in Aβ oligomer-instigated neuronal damage, oligomers failed to induce oxidative stress in NMDAR knock-down neurons, while non-infected or mock-infected neurons exhibited robust ROS response to oligomers. These observations support the idea that, in addition to their role in oligomer binding, NMDARs also mediate aberrant signaling that culminates in neuronal damage in AD.

NMDAR function is essential for learning, memory and for the induction of LTP (36-38). Moreover, specific subunits of NMDARs, such as NR2B, mediate synaptic plasticity *in vivo* (39-40). Thus, new drugs optimized as blockers of Aβ oligomer binding that do not impair physiological NMDAR function potentially could provide improved AD therapeutics. In this regard, we recently showed that antibodies blocking the N-terminal extracellular domain of NMDARs significantly reduced Aβ oligomer binding to neurons without interference with receptor response to glutamate (7).

In conclusion, the current results demonstrate that NMDARs play a pivotal role in the assembly and/or expression of the receptor that binds Aβ oligomers at synapses. This discovery supports the new concept of a multi-component assembly mechanism required for stabilizing the toxic accumulation of Aβ oligomers at the synaptic membrane. Whether oligomers target a pre-assembled receptor complex that already exists at the membrane or whether they act as scaffolding molecules to promote the assembly of such complex remains to the determined. Whatever the case, a key concept that derives from this notion is that

clustering of Aβ oligomer-bound receptors may be required for toxicity, for example, for triggering excessive calcium influx and ROS formation. From a therapeutic point of view, this suggests that clustering and toxicity can possibly be blocked by interfering with a number of the constituent molecular components of the receptor complex. Uncovering the synaptic targets of Aβ oligomers may provide insight into the complexity of the mechanisms that underlie synapse failure in AD and may pave the way for development of novel and more effective AD therapeutics.

REFERENCES

1. Bliss T.V., Collingridge G.L. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361: 31-39.
2. Morris R.G., Anderson E., Lynch G.S., Baudry M. (1986) Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319: 774-776.
3. Collingridge G.L., Singer W. (1990) Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol Sci* 11: 290-296.
4. Snyder E.M., et al. (2005) Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci* 8: 1051-1058.
5. Shankar G.M., Bloodgood B.L., Townsend M., Walsh D.M., Selkoe D.J., Sabatini B.L. (2007) Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci* 27: 2866-2875.
6. Lacor P.N., Buniel M.C., Furlow P.W., Clemente A.S., Velasco P.T., Wood M., Viola K.L., Klein W.L. (2007) Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 27: 796-807.
7. De Felice F.G., Velasco P.T., Lambert M.P., Viola K., Fernandez S.J., Ferreira S.T., Klein W.L. (2007) Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *J Biol Chem* 282: 11590-11601.
8. Gong Y., Chang L., Viola K.L., Lacor P.N., Lambert M.P., Finch C.E., Krafft G.A., Klein W.L. (2003) Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 10417-10422.
9. Lacor P.N., et al. (2004) Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *J Neurosci* 24: 10191-10200.
10. Georganopoulou D.G., Chang L., Nam J.M., Thaxton C.S., Mufson E.J., Klein W.L., Mirkin C.A. (2005) Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 2273-2276.
11. Abazov V.M., et al. (2007) Study of the decay Bs(0)-->Ds(*)Ds(*). *Phys Rev Lett* 99: 241801.

12. Klein W.L., Stine W.B., Jr., Teplow D.B. (2004) Small assemblies of unmodified amyloid beta-protein are the proximate neurotoxin in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 25: 569-580.
13. Walsh D.M., Selkoe D.J. (2004) Oligomers on the brain: the emerging role of soluble protein aggregates in neurodegeneration. *Protein Pept Lett* 11: 213-228.
14. Walsh D.M., Klyubin I., Fadeeva J.V., Cullen W.K., Anwyl R., Wolfe M.S., Rowan M.J., Selkoe D.J. (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416: 535-539.
15. Wang H.W., et al. (2002) Soluble oligomers of beta amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus. *Brain Res* 924: 133-140.
16. Shankar G.M., et al. (2008) Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 14: 837-842.
17. De Felice F.G., et al. (2008) Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A beta oligomers. *Neurobiol Aging* 29: 1334-1347.
18. De Felice F.G., et al. (2009) Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: insulin signaling prevents the pathogenic binding of Abeta oligomers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 1971-1976.
19. Klein W.L. (2006) Synaptic targeting by A beta oligomers (ADDLS) as a basis for memory loss in early Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2: 43-55.
20. Ferreira S.T., Vieira M.N., De Felice F.G. (2007) Soluble protein oligomers as emerging toxins in Alzheimer's and other amyloid diseases. *IUBMB Life* 59: 332-345.
21. Kelly B.L., Ferreira A. (2006) beta-Amyloid-induced dynamin 1 degradation is mediated by N-methyl-D-aspartate receptors in hippocampal neurons. *J Biol Chem* 281: 28079-28089.
22. Adrover M.F., Guyot-Revol V., Cheli V.T., Blanco C., Vidal R., Alche L., Kornisiuk E., Epstein A.L., Jerusalinsky D. (2003) Hippocampal infection with HSV-1-derived vectors expressing an NMDAR1 antisense modifies behavior. *Genes Brain Behav* 2: 103-113.
23. Cheli V., Adrover M., Blanco C., Ferrari C., Cornea A., Pitossi F., Epstein A.L., Jerusalinsky D. (2006) Knocking-down the NMDAR1 subunit in a limited amount of neurons in the rat hippocampus impairs learning. *J Neurochem* 97 Suppl 1: 68-73.
24. Zaupa C., Revol-Guyot V., Epstein A.L. (2003) Improved packaging system for generation of high-level noncytotoxic HSV-1 amplicon vectors using Cre-loxP site-specific recombination to delete the packaging signals of defective helper genomes. *Hum Gene Ther* 14: 1049-1063.
25. Krisky D.M., Marconi P.C., Oligino T.J., Rouse R.J., Fink D.J., Cohen J.B., Watkins S.C., Glorioso J.C. (1998) Development of herpes simplex virus replication-defective multigene vectors for combination gene therapy applications. *Gene Ther* 5: 1517-1530.

26. Machuca I., Jacquemont B., Epstein A. (1986) Multiple adjacent or overlapping loci affecting the level of gC and cell fusion mapped by intratypic recombinants of HSV-1. *Virology* 150: 117-125.
27. Lambert M.P., et al. (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 6448-6453.
28. Lambert M.P., et al. (2007) Monoclonal antibodies that target pathological assemblies of Abeta. *J Neurochem* 100: 23-35.
29. Lauren J., Gimbel D.A., Nygaard H.B., Gilbert J.W., Strittmatter S.M. (2009) Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* 457: 1128-1132.
30. Gimbel D.A., Nygaard H.B., Coffey E.E., Gunther E.C., Lauren J., Gimbel Z.A., Strittmatter S.M. (2010) Memory impairment in transgenic Alzheimer mice requires cellular prion protein. *J Neurosci* 30: 6367-6374.
31. Balducci C., et al. (2010) Synthetic amyloid-beta oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 2295-2300.
32. Zhao W.Q., et al. (2010) Inhibition of calcineurin-mediated endocytosis and alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors prevents amyloid beta oligomer-induced synaptic disruption. *J Biol Chem* 285: 7619-7632.
33. Knowles J.K., et al. (2009) The p75 neurotrophin receptor promotes amyloid-beta(1-42)-induced neuritic dystrophy in vitro and in vivo. *J Neurosci* 29: 10627-10637.
34. Sturchler E., Galichet A., Weibel M., Leclerc E., Heizmann C.W. (2008) Site-specific blockade of RAGE-Vd prevents amyloid-beta oligomer neurotoxicity. *J Neurosci* 28: 5149-5158.
35. Magdesian M.H., Carvalho M.M., Mendes F.A., Saraiva L.M., Juliano M.A., Juliano L., Garcia-Abreu J., Ferreira S.T. (2008) Amyloid-beta binds to the extracellular cysteine-rich domain of Frizzled and inhibits Wnt/beta-catenin signaling. *J Biol Chem* 283: 9359-9368.
36. Morris R.G. (2001) Episodic-like memory in animals: psychological criteria, neural mechanisms and the value of episodic-like tasks to investigate animal models of neurodegenerative disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356: 1453-1465.
37. Lau C.G., Zukin R.S. (2007) NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 8: 413-426.
38. Nakazawa K., McHugh T.J., Wilson M.A., Tonegawa S. (2004) NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory. *Nat Rev Neurosci* 5: 361-372.
39. Hu N.W., Klyubin I., Anwy R., Rowan M.J. (2009) GluN2B subunit-containing NMDA receptor antagonists prevent Abeta-mediated synaptic plasticity disruption in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 20504-20509.
40. Ronicke R., Mikhaylova M., Ronicke S., Meinhardt J., Schroder U.H., Fandrich M., Reiser G., Kreutz M.R., Reymann K.G. (2010) Early neuronal dysfunction by

amyloid beta oligomers depends on activation of NR2B-containing NMDA receptors. *Neurobiol Aging*.

FOOTNOTES

This work was supported by grants from Howard Hughes Medical Institute (STF), Human Frontier Science Program (FGF), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, Pronex-FAPERJ and Instituto Nacional de Neurociencia Translacional (STF and FGF), CONICET (DJ) and CNRS (ALE). We thank the Program for Technological Development of Tools for Health Research (PDTIS/FIOCRUZ) for use of the confocal microscope. HD thanks the Brazilian agency CAPES for fellowship support.

The abbreviations used: Aβ, amyloid-β peptide; AD, Alzheimer's disease; AMPA, α-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate; APV, 2-amino-5-phosphonopentanoic acid; PrP^{C}, cellular prion protein; CNS, central nervous system; LTP, long-term potentiation; CSF, cerebrospinal fluid; DHE, dihydroethidium; DMSO, dimethyl sulfoxide; HFIP, 1,1,1,3,3,3,-hexafluoro-2-propanol; NMDA, N-methyl-D-aspartate; NMDAR, NMDA subtype glutamate receptor; $p75^{NTR}$, p75 neurotrophin receptor; RAGE, receptor for advanced glycation end products; ROS, reactive oxygen species.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. NMDAR knock-down in mature hippocampal neurons. Cultured hippocampal neurons (18 DIV) were exposed to either A-GFP-NR1(-) vector [NR1 knockdown; indicated as NMDAR(-)] or A-GFP-LacZ vector (infection control; indicated as MOCK) followed by immunolabeling with anti-NMDAR (NR1 subunit). Panels *A* and *C,* respectively, show representative images from mock-infected or non-infected (CTRL) neurons; no differences in NR1 expression levels were detected between these conditions. Panel *B* shows a representative image from an NMDAR knock-down [NMDAR(-)] neuron showing markedly reduced dendritic NR1 expression. Panels *D* and *E*: GFP fluorescence images of the same fields as in panels *A* and *B*, respectively. Panels *F* and *G*: overlays of NR1 immunofluorescence (red) and GFP fluorescence (green). Panels *H* and *I* show high-magnification images of dendrite segments contained in the dotted rectangles indicated in panels *F* and *G*. Panels *J* and *K*: Quantification of NR1 levels based on integration of dendritic immunofluorescence in ~ 120 neurons (*J*) and in 12 individual (20 μm) dendrite segments (*K*). See also Figure S1. * or # indicate statistically significant ($p < 0.001$ or $p < 0.0001$, respectively) decreases compared to mock-infected neurons. Scale bar, 10 μm.

Fig. 2. ROS formation induced by Aβ oligomers (AβOs) is blocked in NMDAR knock-down neurons. Cultured hippocampal neurons (18 DIV) were exposed to either A-GFP-NR1(-) vector (NMDAR(-)) or A-GFP-LacZ vector (MOCK). After infection, neurons were incubated for 5 h at 37 °C with 1 μM AβOs or vehicle. They were loaded with DHE (10 μM) during the last 40 min of incubation with oligomers. Panels *A and B*: representative DHE fluorescence images from mock-infected or NMDAR(-) neurons, respectively, treated with AβOs. Panels *D* and *E*: GFP fluorescence images of the same fields as in panels *A* and *B*, respectively. Similar to non-infected neurons, a prominent increase in ROS production induced by Aβ oligomers is evident in mock-infected neurons (*A and C, arrowheads*). In contrast, very low DHE fluorescence is observed in NMDAR(-) neurons (*B and D, arrowheads*). Panel *E*: Quantification of DHE

fluorescence (see *SI Methods*). * Statistically significant ($p < 0.001$) decrease compared to both mock-infected and non-infected neurons treated with AβOs. *Scale bar*, 40 μm.

Fig. 3. Synaptic Aβ oligomer (AβO) binding is blocked in NMDAR knock-down neurons**.** Cultured hippocampal neurons (18 DIV) were exposed to either A-GFP-NR1(-) vector [NMDAR(-)] or A-GFP-LacZ vector (MOCK). After infection, neurons were treated for 15 min at 37 °C with 500 nM AβOs or an equivalent volume of vehicle followed by immunolabeling using NU4 anti-oligomer antibody (28). Panels *A, B* and *C* show representative images from mock-infected, NMDAR(-) and non-infected (CTRL) neurons, respectively. Panels *D* and *E*: GFP fluorescence images of the same fields as in panels *A* and *B*, respectively. Nuclear staining (DAPI) is shown in blue. Arrowheads point to cell bodies that were infected by A-GFP-NR1(-) or mock vectors. Panels *F* and *G*: overlays of AβO immunofluorescence (red) and GFP fluorescence (green) in mock-infected or NMDAR(-) neurons, respectively. Panels *H* and *I*: high-magnification confocal images of dendrite segments from mock-infected or NMDAR(-) neurons, respectively. Panels *J* and *K*: Quantification of AβO immunofluorescence based on integration of dendritic immunofluorescence in ~ 120 neurons (*J*) and in 12 individual (20 μm) dendrite segments (*K*). * or # indicate statistically significant ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively) decreases compared to mock-infected neurons. Scale bar, 10 μm.

Fig. 4. Surface NMDAR levels are similar in Aβ oligomer-attacked and non-attacked neurons. Cultured hippocampal neurons (18 DIV) were treated for 15 min at 37 °C with 500 nM Aβ oligomers (AβOs) or an equivalent volume of vehicle followed by double immunolabeling using anti-NMDAR (NR1 subunit) and NU4 anti-oligomer antibody. Note that similar NMDAR labeling is present in both Aβ oligomer-attacked and non-attacked (a*rrowhead*) neurons. Scale bar, 50 μm.

Fig. 5. Insulin blocks Aβ oligomer (AβO) binding but does not affect surface NMDAR levels. Cultures were pre-incubated with 1 μM insulin for 30 min and treated for 4 hours at 37 °C with 400 nM AβOs (or an equivalent volume of vehicle) followed by immunolabeling using anti-NMDAR (NR1 subunit) or NU4 anti-oligomer antibody. Panels *A, B* and *C*: representative images of vehicle-treated, AβO-treated and (insulin + AβO)-treated cells, respectively, immunolabeled against NMDAR (yellow) and stained with DAPI (blue). Quantification of NR1 (*D*) or AβO immunofluorescence (*E*) was based on integration of dendritic immunofluorescence in ~ 90 neurons. Bars represent means + SEM of four independent experiments carried out in triplicate each. * indicates a statistically significant difference ($p < 0.05$) compared to vehicle-treated neurons. # indicates statistically significant difference ($p < 0.05$) compared to AβO-treated neurons. Scale bar, 10 μm.

Figure 1

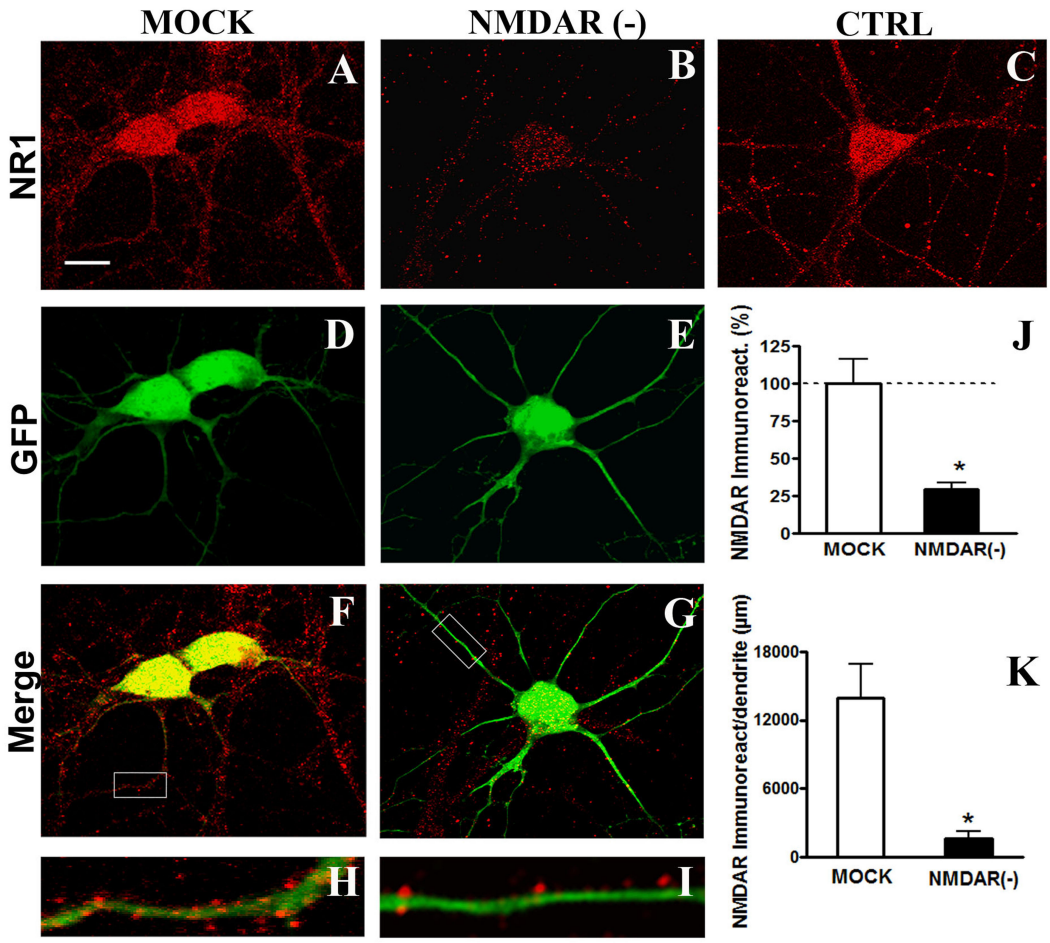

MOCK
NMDAR (-)
CTRL
NR1
GFP
Merge
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
NMDAR Immunoreact. (%)
125
100
75
50
25
0
MOCK
NMDAR(-)
NMDAR Immunoreact/dendrite (µm)
18000
12000
6000
0
MOCK
NMDAR(-)

Figure 2

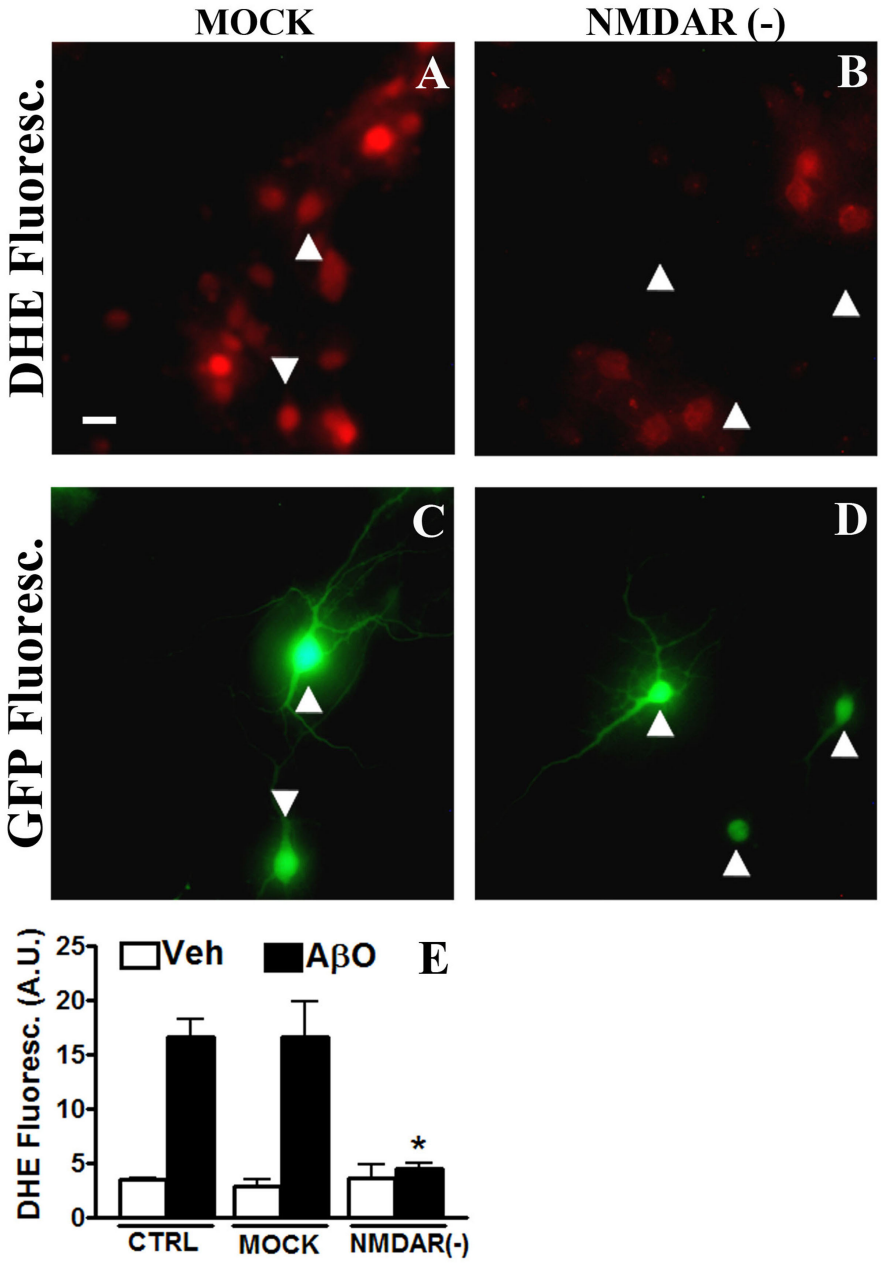

MOCK
NMDAR (-)
DHE Fluoresc.
A
B
GFP Fluoresc.
C
D
E
Veh
AβO
DHE Fluoresc. (A.U.)
25
20
15
10
5
0
*
CTRL
MOCK
NMDAR(-)

Figure 3

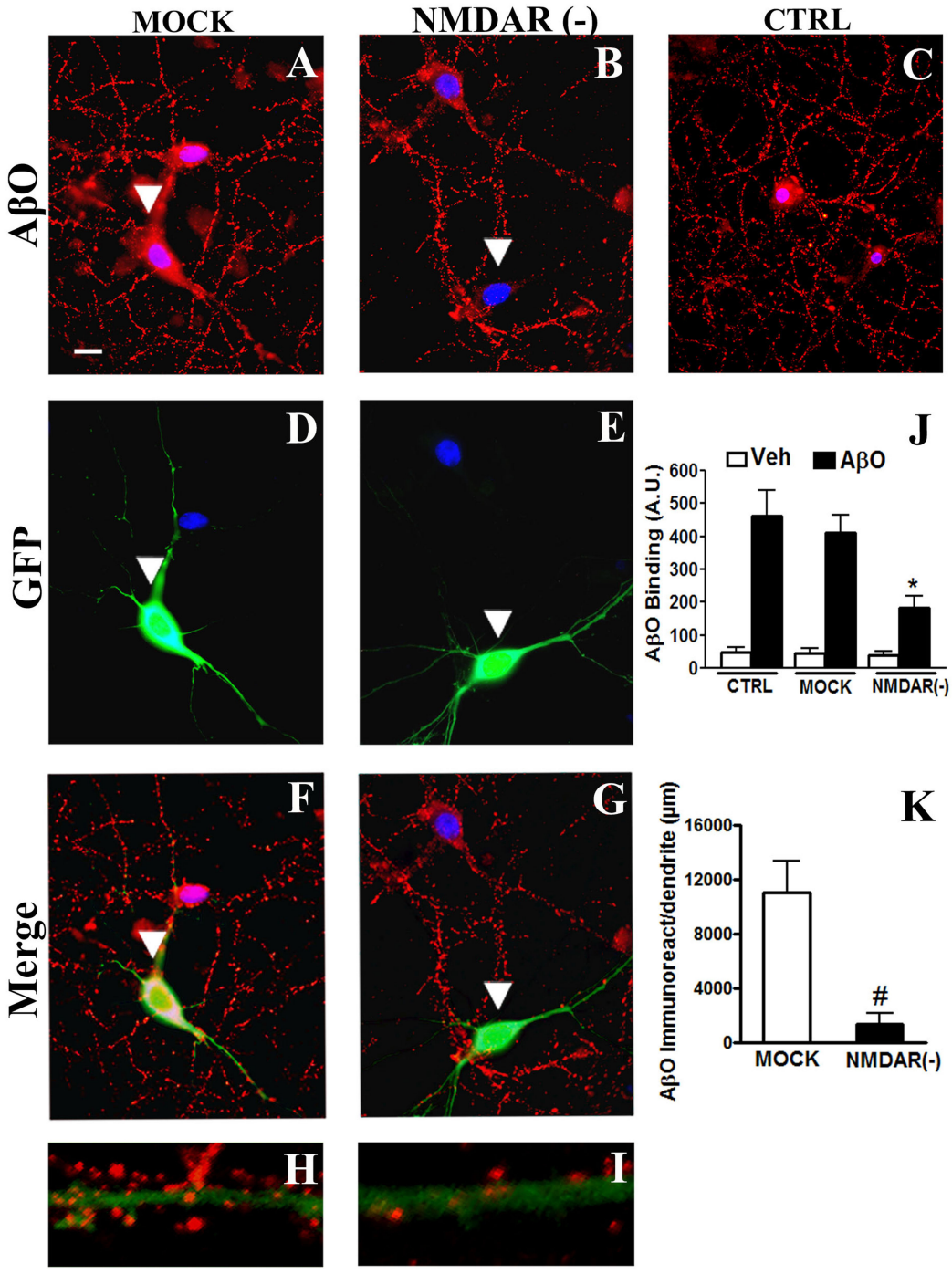

MOCK
NMDAR (-)
CTRL
A
B
C
AβO
D
E
GFP
J
Veh
AβO
AβO Binding (A.U.)
600
500
400
300
200
100
0
*
CTRL
MOCK
NMDAR(-)
F
G
Merge
K
AβO Immunoreact/dendrite (μm)
16000
12000
8000
4000
0
#
MOCK
NMDAR(-)
H
I

Figure 4

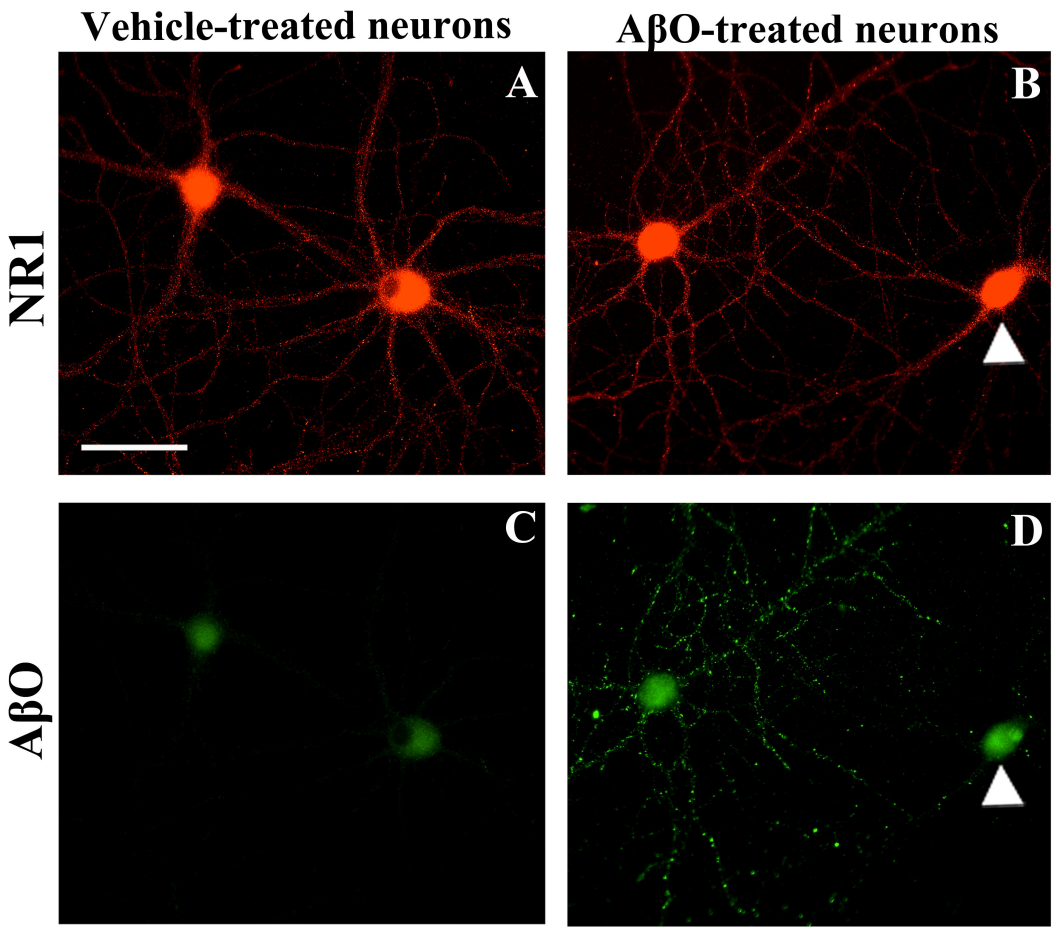
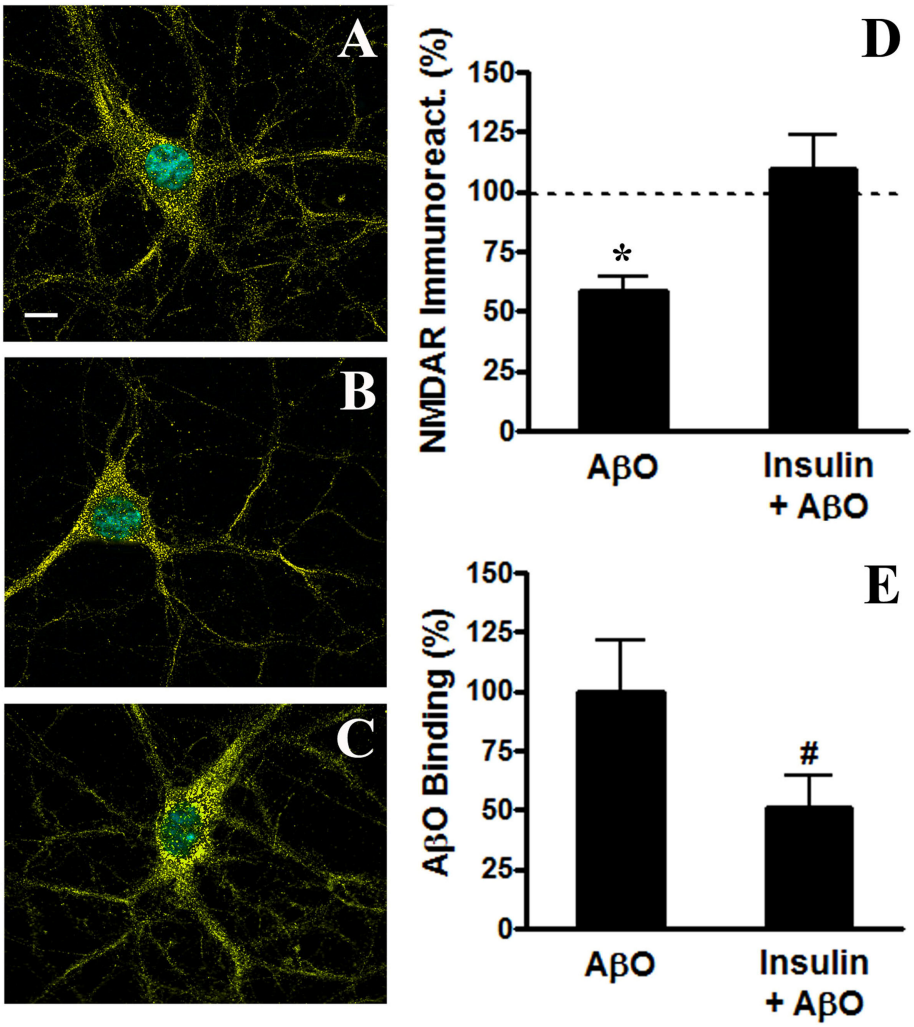


Figure 5


A
B
C
D
NMDAR Immunoreact. (%)
150
125
100
75
50
25
0
*
AβO
Insulin
+ AβO
E
AβO Binding (%)
150
125
100
75
50
25
0
#
AβO
Insulin
+ AβO

SUPPLEMENTAL DATA – Decker et al

Supplemental Figure 1

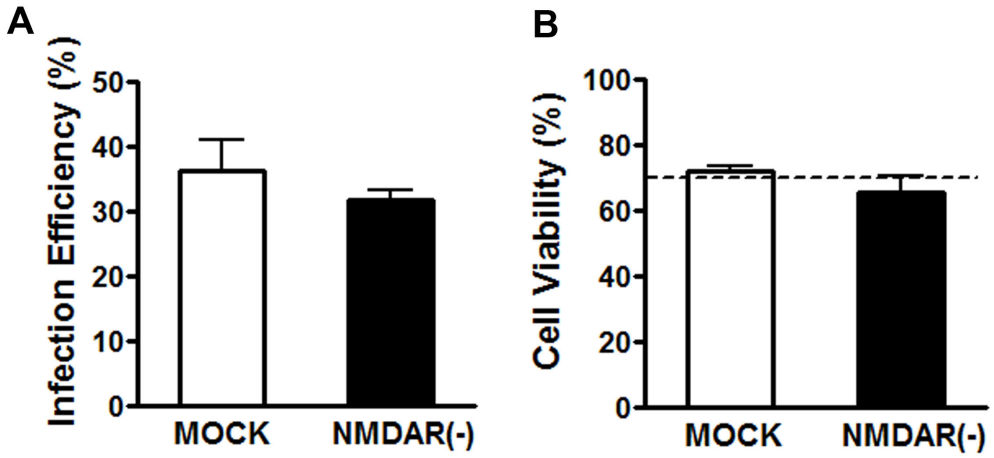


Fig. S1. Knockdown efficiency and cell viability. Cultured hippocampal neurons (18 DIV) were exposed to either A-GFP-NR1(-) vector [NR1 knockdown; indicated as NMDAR(-)] or A-GFP-LacZ vector (infection control; indicated as MOCK). Panel *A* shows the quantification of infected neurons; Panel *B* shows cell viability evaluated Live/Dead assay. Non-infected cultures presented 70 % (dashed line) viability at 18 DIV.

VIII. 2) ARTIGO 2:

"Oligômeros de Aβ comprometem o transporte axonal através de um mecanismo dependente de receptores NMDA e mediado pela glicogênio sintase quinase 3β em neurônios hipocampais em cultura"

"Aβ oligomers disrupt axonal transport via an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is mediated by glycogen synthase kinase 3β in primary cultured hippocampal neurons"

Helena Decker[1,2,3] , Karen Y. Lo[1], Sandra M. Unger[1], Sergio T. Ferreira[2], Michael A. Silverman[1]

1 Simon Fraser University, Department of Biological Sciences, Burnaby, BC, Canada;

2 Institute of Medical Biochemistry,

3 Morphological Sciences Program, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21944-590, Brazil.

No prelo. The Journal of Neuroscience.

THE JOURNAL OF NEUROSCIENCE

THE OFFICIAL JOURNAL OF THE SOCIETY FOR NEUROSCIENCE

Close Window

Print Email

Date: 17th May 10 09:37:35
Last Sent: 17th May 10 09:37:35
Triggered By: Karl Herrup
CC: Redacted
BCC: Redacted
Subject: Decision on Journal of Neuroscience JN-BC-1074-10R1
Message: 17th May 2010

Dear Prof. Silverman:

I am pleased to inform you that your revised paper, "Aβ oligomers disrupt axonal transport through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is mediated by glycogen synthase kinase 3β in primary cultured hippocampal neurons," is considered suitable for publication in the Journal of Neuroscience in its present form.

Your manuscript will now pass through a series of pre-production checks at our Central Office. Soon, you will probably receive correspondence from the Central Office about issues such as figure sizes and color, length of the paper, and various forms that need to be completed. Once your paper is completely ready, you will receive email notification that it has been forwarded to the publisher.

The Journal has replaced page charges with a flat-fee publication charge per published article ($950) or Brief Communication ($475). Your publication fee will be due upon acceptance and must be received before your manuscript will move into production. You will receive a payment form by e-mail after acceptance of your manuscript. Please contact the Central Office with any payment questions by e-mail: jn@sfn.org.

If you wish your article to be made immediately freely available via the Journal's Open Choice model, please contact Sola Yu at sola@sfn.org within in 48 hours to avoid delays in the publication of your manuscript. Authors will pay $2,500 for regular articles and $1,250 for Brief Communications. Your Open Choice charge will be included on the form on which you agree to pay publication charges and any applicable color charges.

Finally, the Journal publishes, at no cost to the author, color cover illustrations pertinent to an article in that issue. If you have a suitable cover illustration, we would be glad to consider it. Please visit the Journal's web site for detailed instructions regarding cover art submissions. Should you choose to submit an illustration, you may deposit it at our FTP site (URL link: afp://jn.sfn.org; Host: ftp.sfn.org; Account: jnauthor; Password: coverart) following the instructions on the web site (http://www.jneurosci.org

/misc/ifa_cover.shtml).

On behalf of the Editorial Board, I thank you for submitting this paper to The Journal of Neuroscience.

Yours sincerely,

Karl Herrup
Senior Editor, Neurobiology of Disease
Journal of Neuroscience
herrup@biology.rutgers.edu

Print Email

Close Window

Title: Aβ oligomers disrupt axonal transport via an *N*-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is mediated by glycogen synthase kinase 3β in primary cultured hippocampal neurons

Abbreviated title: Disruption of axonal transport by soluble Aβ oligomers

Authors and author addresses: Helena Decker[1,2,3] , Karen Y. Lo[1], Sandra M. Unger[1], Sergio T. Ferreira[2], Michael A. Silverman[1]

1 Simon Fraser University, Department of Biological Sciences, Burnaby, BC, Canada; 2 Institute of Medical Biochemistry, 3 Morphological Sciences Program, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21944-590, Brazil

Corresponding author with complete address: Michael A. Silverman. Simon Fraser University, Biological Sciences, 8888 University Drive - Burnaby BC, V5A 1S6, Canada. Phone: 778-782-3647 Fax: 778-782-3504 email: masilver@sfu.ca

Number of figures and tables: 3 figures

Contents of supplemental material: two movies, one table and 2 figures

Number of pages: 18

Six keywords: Aβ oligomers, dense core vesicles, axonal transport, glycogen synthase kinase 3β, microtubules, NMDA receptor

Abstract:

Disruption of axonal transport is a hallmark of several neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease (AD). Even though defective transport is considered an early pathologic event, the mechanisms by which neurodegenerative insults impact transport are poorly understood. We show that soluble oligomers of the amyloid-β peptide (AβOs), increasingly recognized as the proximal neurotoxins in AD pathology, induce disruption of organelle transport in primary hippocampal neurons in culture. Live imaging of fluorescent protein-tagged organelles revealed a marked decrease in axonal trafficking of dense-core vesicles and mitochondria in the presence of 0.5 μM AβOs. N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) antagonists, including D-AP5, MK801 and memantine, prevented the disruption of trafficking, thereby identifying signals for AβO action at the cell membrane. Significantly, both pharmacological inhibition of glycogen synthase kinase-3β (GSK-3β) and transfection of neurons with a kinase-dead form of GSK-3β prevented the transport defect. Finally, we demonstrate by biochemical and immunocytochemical means that AβOs do not affect microtubule stability, indicating that disruption of transport involves a more subtle mechanism than microtubule destabilization, likely the dysregulation of intracellular signaling cascades. Results demonstrate that AβOs negatively impact axonal transport by a mechanism that is initiated by NMDARs and mediated by GSK-3β and establish a new connection between toxic Aβ oligomers and AD pathology.

Introduction

Fast axonal transport (FAT) is crucial for neuronal function and survival. Because the axon is mostly devoid of biosynthetic machinery, proteins, lipids, and organelles are transported long distances from the cell body, and trophic factors secreted from axonal targets are transported retrogradely from the synapse to the cell body. Multiple neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease (AD), Huntington's disease, and amyotrophic lateral sclerosis display defective FAT as an early pathologic event (Morfini et al., 2009). In particular, axonal transport defects have been found in AD brain and in transgenic mouse models of AD (Salehi et al., 2006; Lazarov et al., 2007).

Soluble oligomers of the amyloid-β peptide (also known as AβOs or ADDLs) are neurotoxins that accumulate in the brains and cerebrospinal fluid of AD patients and AD mouse models, acting as gain-of-function pathogenic ligands that attack synapses and block LTP in experimental models (Walsh et al., 2002; Wang et al., 2002; Klein, 2006). An increasing body of evidence indicates that AβOs, which are distinct from Aβ fibrils and monomers, are the proximal neurotoxins responsible for synapse failure and the early manifestations of AD pathology (Klein, 2006; Ferreira et al., 2007). Although Aβ monomers and fibrils have been shown to interfere with transport (Hiruma et al., 2003; Rui et al., 2006) or when oligomeric Aβ is applied to isolated squid axoplasm (Pigino et al., 2009), a role of pathogenic AβOs in disruption of FAT has not been demonstrated.

AβOs interfere with *N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) function, inducing abnormal calcium influx and neuronal oxidative stress (De Felice et al., 2007) and instigate aberrant activation of kinases, including glycogen synthase kinase-3β (GSK-3β)

(Hoshi et al., 2003; De Felice et al., 2008). Of direct relevance to the present study, GSK-3β impairs kinesin-1-based transport in squid axoplasm (Morfini et al., 2002).

Here, we demonstrate that AβOs cause severe axonal transport defects in cultured hippocampal neurons by the direct imaging of actively transporting fluorescently-tagged organelles, most notably BDNF-containing secretory vesicles. This impact on FAT is prevented by NMDAR antagonists, including memantine, and by inhibition of GSK-3β by pharmacological or molecular tools. We also show that the integrity of the microtubule (MT) network and the protein levels of several microtubule-based motor proteins are unaffected by AβO exposure. Results establish that AβOs instigate transport defects in mammalian neurons through a GSK-3β-dependent mechanism that is independent of overt deleterious effects on the MT network.

Results

Disruption of organelle trafficking by soluble Aβ oligomers (AβOs)

To determine whether AβOs have an impact on fast axonal transport, hippocampal neuronal cultures expressing BDNF-mRFP, a dense core vesicle (DCV) cargo, or mitochondrially-targeted-YFP were live imaged 4 or 18 h after treatment with 0.5 μM AβOs. Representative kymographs of DCVs (Fig. 1*A*) and movies of DCV or mitochondria transport (Fig. S1*A, B*) readily demonstrate differences between organelle flux in control and AβO-treated neurons. Axonal fluxes of both DCVs (Fig. 1*B*) and mitochondria (Fig. S2) were dramatically decreased (by ~76% and ~74%, respectively) after 18 h (but not after 4 h) of exposure to AβOs. Interestingly, AβOs inhibited bidirectional organelle flux with a greater effect on anterograde DCV transport (Fig. S2).

Additionally, we found significant reductions in average run-lengths of both DCVs and mitochondria (by ~39% and ~56%, respectively) and in average velocity of DCVs (~ 21%) (Fig. S2). Importantly, and in line with previous reports (Deshpande et al., 2006; De Felice et al., 2007), during the time frame of our experiments AβOs had no effect on cell viability assessed using propidium iodide staining (data not shown). In addition, cellular morphology after 18 h exposure to AβOs was normal compared to controls; the axonal plasma membrane was intact, without any blebbing (Fig. S3*A*), and the Golgi apparatus, a key component of the secretory pathway, exhibited normal stacked appearance in perinuclear and dendritic compartments (Fig. S3*B*). These observations indicate that the effect of AβOs on axonal transport did not result from gross changes in cell morphology and viability.

Disruption of DCV transport is prevented by blocking NMDARs

Pre-treatment of neurons for 30 minutes with D-AP5 (35 μM), a competitive NMDAR antagonist, completely prevented the transport defect induced by AβOs (Fig. 1*B,* Fig. S2). To further investigate the role of NMDARs, the high affinity channel blocker MK-801 (10 μM) and a moderate affinity blocker, memantine (10 μM), were used. Both compounds prevented transport defects induced by AβOs, albeit to a lower extent than D-AP5 (Fig. 1*B,* Fig. S2). Interestingly, D-AP5, but not MK-801 and memantine, blocks AβO binding to neurons (De Felice et al., 2007). Results thus suggest that aberrant activation of NMDARs by AβOs plays a central role in initiating the disruption of FAT.

Involvement of GSK-3β signaling

Several kinases are activated by AβOs, including GSK-3β (Hoshi et al., 2003; Ferreira et al., 2007). To explore whether GSK-3β plays a role in AβO-induced inhibition of FAT in primary neurons, cultures expressing BDNF-mRFP were pre-treated for 30 minutes with GSK-3β inhibitor VIII (100 nM or 5 μM). GSK-3β inhibitor VIII completely prevented the transport defect induced by AβOs (Fig. 1*B*, F ig. S2) and LiCl (2 mM), another GSK-3β inhibitor, yielded partial protection (Fig. 1*B*, Fig. S2). Significantly, transfection of an inactive, kinase-dead form of GSK-3β (K85A) (Seo et al., 2008) fully blocked the transport defect in AβO-treated neurons (Fig. 2*B, C)*. Conversely, transfection with a constitutively active form of GSK-3β (S9A), significantly inhibited DCV transport even in the absence of AβOs (Fig. 2*B, C*). These data provide strong support for a role of GSK-3β in the deleterious impact of AβOs on FAT.

AβOs do not induce MT destabilization

AβOs induce an increase in tau phosphorylation (De Felice et al., 2008), a modification that may alter cytoskeletal dynamics in neurons. Although a possible role of tau hyperphosphorylation in the disruption of FAT remains to be fully investigated, we have examined whether changes in the microtubule network might be a cause of the transport defect. To this end, MT stability was assessed through biochemical and immunocytochemical means. We found the equilibrium between polymerized and unpolymerized tubulin was unchanged in AβO-treated cells compared with controls (Fig. 3*A*). As a positive control for MT depolymerization, cells were treated with nocodazole, and the amount of soluble tubulin increased significantly (Fig. 3*A*). To further assess the

integrity of the MT network, we evaluated the presence of bundled MT arrays using semi-quantitative immunocytochemistry. MT appearance between control and AβO-treated neurons (Fig. 3*A*) was indistinguishable (n=25 cells for both conditions).

Because degradation of synaptic proteins (e.g. PSD-95) results from AβO exposure (Roselli et al., 2005), we asked whether the AβO-induced transport defect might be explained by degradation of elements of the transport apparatus. To answer this question, we measured protein levels of the motor protein dynein, the primary motor for retrograde transport, and of the anterograde kinesins, KIF1A, KIF5A, and KIF5C, motors implicated in the transport of DCVs and/or mitochondria (Hirokawa and Noda, 2008; Park et al., 2008), as well as total tubulin levels. Treatment with AβOs for 18 h did not modify the total levels of tubulin or any of the motor proteins investigated, eliminating the possibility that axonal transport defects could be caused by protein degradation (Fig. 4*B*). Taken together, these data indicate that the mechanism by which AβOs disrupt transport is not related to MT destabilization or changes in protein levels directly required for organelle transport.

Discussion

AβOs are central to the pathology of AD and lead to neuronal dysfunction, including dysregulation of NMDARs and blockade of LTP (Lambert et al., 1998; Wang et al., 2002; De Felice et al., 2007). The present study demonstrates that AβOs instigate disruption of axonal transport via a mechanism initiated by NMDARs and mediated by GSK-3β. Notably, we demonstrate that AβOs do not alter cytoskeletal integrity,

indicating that dysregulation of intracellular signaling cascades, not disintegration of microtubules, may negatively impact FAT.

Recent evidence indicates that AβOs compromise synaptic transmission via dysregulation of NMDAR function (De Felice et al., 2007). Notably, synaptic modulation and changes in transport are linked (Schlager and Hoogenraad, 2009), and thus perturbing synaptic activity might have a direct effect on transport. Although the mechanism of action of AβOs at the plasma membrane is not known specifically, it has been shown that AβOs modulate NMDA and insulin receptors (De Felice et al., 2007, 2009). To determine whether AβO-induced NMDAR dysfunction and transport impairment were mechanistically coupled, hippocampal neurons were treated with two NMDAR channel blockers and a competitive antagonist prior to AβO treatment. D-AP5, a strong antagonist, completely prevented the disruption of transport induced by AβOs. Interestingly, previous work from our group demonstrated that D-AP5 (but not memantine or MK-801) significantly reduced AβO binding to hippocampal neurons (De Felice et al., 2007), likely explaining the prevention of transport defects in the current experiments. Understanding the exact role of NMDARs on disruption of FAT will require further investigation; however, one possibility is that AβOs produce LTD-like stimuli via NMDARs by modulating signaling cascades that activate GSK-3β (Peineau et al., 2007), which in turn has deleterious effects on transport.

Alterations in intracellular calcium are another element coupling synaptic modulation via NMDARs and changes in transport. For example, Ca^{2+} is a regulator of mitochondrial transport via the Ca^{2+} responsive signaling protein Miro (Wang and Schwarz, 2009), and increases in cytosolic Ca^{2+} via synaptic activity lead to decreased

mitochondrial transport. Conversely, transport of AMPA receptors and of recycling endosomes is dependent on increased neuronal Ca^{2+} levels (Wang et al., 2008). The role of Ca^{2+} on DCV transport has been investigated in *Drosophila* motor neurons, where a transient increase is required for the capture of transiting vesicles (Wong et al., 2009). However, the role of Ca^{2+} in long-range microtubule transport in neurons is not fully understood. For example, axonal transport in isolated squid axoplasm is unaffected by changes in Ca^{2+} levels (Brady et al., 1984). Although we cannot rule out a role for Ca^{2+} influx via NMDARs affecting DCV transport, the fact that Ca^{2+} alterations are not synchronous with the observed changes in transport suggests that they are not likely to play a significant role. In fact, the timeframe of intraneuronal Ca^{2+} changes induced by AβOs is on the order of seconds to minutes (De Felice et al., 2007) whereas AβO-induced transport defects take several hours (> 4 h) to develop. Additionally, several forms of delayed calcium-triggered events described thus far, such as glutamate-induced excitotoxicity and delayed cytoplasmic Ca^{2+} deregulation, lead to neuronal death in less than two hours (Szydlowska and Tymianski, 2010), whereas our results demonstrate that neurons are not severely compromised for up to 18 hours in the presence of 0.5 μM AβOs. Finally, neuronal death is not induced by AβOs for up to five days at concentrations more than twice those used in the present study (Deshpande et al., 2006). Thus, it seems unlikely that Ca^{2+} deregulation induced by aberrant NMDAR activation is a primary cause for the disruption of transport.

Another pathology induced by AβOs is excessive generation of ROS (De Felice et al., 2007). Although ROS are thought to cause transport defects in neurodegenerative disorders (Morfini et al., 2009), a salient role for ROS in the present study is not

supported by the finding that N-acetyl-cysteine, a potent cell-permeant antioxidant, had no protective effect against AβO-induced inhibition of transport under our experimental conditions (data not shown).

Dysregulation of signaling cascades that modulate FAT could be a contributing factor in AD (Morfini et al., 2009). GSK-3β is of particular interest, as it can be activated by fibrillar forms of Aβ, and active GSK-3β is found in neurofibrillary tangles (NFTs) in post-mortem AD brains (Giese, 2009). GSK-3β activation by fibrillar Aβ has been implicated in disruption of mitochondrial transport in primary neurons (Rui et al., 2006). In addition, in squid axoplasm activated GSK-3β selectively disrupts anterograde transport of organelles by uncoupling kinesin-I from its cargo (Morfini et al., 2002). Our results demonstrate that bidirectional transport in hippocampal neurons is disrupted by AβOs. The impairment is higher for anterograde transport, with possible consequences in the distribution of organelles to distal portions of the cell, e.g. synapses. Although the motor for DCV transport has not been clearly identified in mammalian neurons, it appears likely that AβOs preferentially disrupt a plus-end motor, possibly KIF1A (Park et al., 2008). Whether KIF1A is regulated by GSK-3β is yet to be determined. Interestingly, inhibition of bidirectional transport was prevented in cells treated with GSK-3β inhibitors. It is possible that GSK-3β largely governs anterograde transport (Morfini et al., 2002); however, several recent studies have uncovered regulatory mechanisms that are coordinated through opposing motors, whereby disrupting the action of one motor disrupts bidirectional transport (Ally et al., 2009). Our results suggest that GSK-3β is a central regulator of DCV trafficking and that this kinase may phosphorylate components of the transport complex directly or indirectly.

AβOs are known to induce hyperphosphorylation of tau (De Felice et al., 2008); however, it is unclear how this modification of tau influences transport. Destabilization of microtubules results from exposure to high concentrations (up to 10-fold compared to this study) of both fibrillar and non-fibrillar Aβ aggregates (Blurton-Jones and Laferla, 2006; King et al., 2006); however, no change in microtubule stability was observed in our experiments using 0.5 μM AβOs. These results further support the notion that dysregulation of signaling cascades mediated by GSK-3β result in FAT defects.

One outstanding question is how the binding of AβOs, thought to localize predominantly to dendritic synaptic sites (Klein, 2006), leads to an axonal transport deficit. We have observed a reduction in dendritic transport of DCVs in the presence of AβOs (unpublished observations); however, we have yet to distinguish the temporal sequences of these events, i.e., to determine whether dendritic transport deficits precede axonal deficits. Nevertheless, the molecular constituents involved in regulation of transport, for example GSK-3β, are present in both axonal and dendritic compartments (Peineau et al., 2008). It is also possible that GSK-3β is activated in dendrites and then either diffuses or is actively transported into the axon. Finally, we propose that AβO-induced transport defects are a temporally intermediate insult faced by AD neurons, as has been suggested more generally for axonopathies (Morfini et al., 2009). Upon AβO binding to neurons, events such as aberrant calcium influx and generation of ROS are immediate effects; on the other hand, the generation of NFTs and the resulting neurodegeneration are longer-term effects. Transport defects likely contribute to neuropathophysiology on many levels due to the centrality of transport to neuronal function.

Material and Methods

Plasmids. p*β*-actin-BDNF-mRFP was received from G. Banker (OHSU, Oregon, USA). Mitochondrially-targeted YFP was received from G. Rintoul (SFU, BC, Canada). pcDNA3 HA-GSK3β S9A pcDNA3, HA-GSK3β K85A (Addgene, Cambridge). Information about additional antibodies and reagents are in supplemental data.

Hippocampal cell cultures and expression of transgenes. Primary neurons were prepared as described (Kaech and Banker, 2006), and cultured in Neurobasal/B27 medium with antioxidants. Constructs were transfected into neurons at 9 -12 days *in vitro* (DIV) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cells-expressed constructs for 24 h prior to imaging.

Aβ oligomers preparation. Soluble Aβ oligomers (ADDLs) were prepared by the method of (De Felice et al., 2007). 0.5 μM AβOs were added to cultures at the appropriate times (4 or 18 hours; see "Results") before imaging.

Imaging. Cells were imaged live using a wide-field fluorescent microscope (DMI 6000 B, Leica, Wetzlar, Germany) as described (Kwinter et al., 2009). Axons and dendrites were initially distinguished based on morphology and confirmed retrospectively by antibody staining against MAP-2, a dendritic cytoskeletal protein. Quantification of binding of AβOs was done in 9-12 DIV neurons (Fig. S4).

Biochemical quantification of tubulin. Neurons were treated for 18 h with 0.5 μM AβOs. Cells were extracted with MT-stabilizing buffer I as described (Black et al., 1996). Equal volumes of triton-soluble and -insoluble fractions were then analyzed by immunoblotting with anti–α-tubulin. Information about immunobloting is in supplemental data.

Immunocytochemistry. Cells were fixed and stained as previously described (Kwinter et al., 2009). For saponin extractions, cells were washed with MT-stabilizing buffer II (Kempf et al., 1996).

Movies and quantitative analyses. Videos were processed using MetaMorph (Universal Imaging, Downingtown, PA) as described (Kwinter et al., 2009). Quantitative analysis of the p-tau spatial-gradient was performed using MetaMorph, comparing the ratio of fluorescent signals between the initial and distal portions of the axon. Quantitative analysis of immunofluorescence data was carried out using Image J (De Felice et al., 2008).

ACKNOWLEDGEMENTS: This research was supported by grants from the National Science and Engineering Research Council (NSERC; # 327100–06), the Canadian Foundation for Innovation (CFI; # 12793), and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; # 90396) (to MAS). STF is supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro and Instituto Nacional de Neurociência Translacional

(Brazil). We thank Cheng Fang (OHSU) for the pβ-actin-BDNF-mRFP plasmid and H. Hutter for critical reading of this manuscript. HD thanks the Brazilian agency CAPES for fellowship support.

References

Ally S, Larson AG, Barlan K, Rice SE and Gelfand VI (2009). Opposite-polarity motors activate one another to trigger cargo transport in live cells. *J Cell Biol* 187(7): 1071-1082.

Black MM, Slaughter T, Moshiach S, Obrocka M and Fischer I (1996). Tau is enriched on dynamic microtubules in the distal region of growing axons. *J Neurosci* 16(11): 3601-3619.

Blurton-Jones M and Laferla FM (2006). Pathways by which Abeta facilitates tau pathology. *Curr Alzheimer Res* 3(5): 437-448.

Brady ST, Lasek RJ, Allen RD, Yin HL and Stossel TP (1984). Gelsolin inhibition of fast axonal transport indicates a requirement for actin microfilaments. *Nature* 310(5972): 56-58.

De Felice FG, Velasco PT, Lambert MP, Viola K, Fernandez SJ, Ferreira ST and Klein WL (2007). Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *J Biol Chem* 282(15): 11590-11601.

De Felice FG, Vieira MN, Bomfim TR, Decker H, Velasco PT, Lambert MP, Viola KL, Zhao WQ, Ferreira ST and Klein WL (2009). Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: insulin signaling prevents the pathogenic binding of Abeta oligomers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(6): 1971-1976.

De Felice FG, Wu D, Lambert MP, Fernandez SJ, Velasco PT, Lacor PN, Bigio EH, Jerecic J, Acton PJ, Shughrue PJ, Chen-Dodson E, Kinney GG and Klein WL (2008). Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A beta oligomers. *Neurobiol Aging* 29(9): 1334-1347.

Deshpande A, Mina E, Glabe C and Busciglio J (2006). Different conformations of amyloid beta induce neurotoxicity by distinct mechanisms in human cortical neurons. *J Neurosci* 26(22): 6011-6018.

Ferreira ST, Vieira MN and De Felice FG (2007). Soluble protein oligomers as emerging toxins in Alzheimer's and other amyloid diseases. *IUBMB Life* 59(4-5): 332-345.

Giese KP (2009). GSK-3: a key player in neurodegeneration and memory. *IUBMB Life* 61(5): 516-521.

Hirokawa N and Noda Y (2008). Intracellular transport and kinesin superfamily proteins, KIFs: structure, function, and dynamics. *Physiol Rev* 88(3): 1089-1118.

Hiruma H, Katakura T, Takahashi S, Ichikawa T and Kawakami T (2003). Glutamate and amyloid beta-protein rapidly inhibit fast axonal transport in cultured rat hippocampal neurons by different mechanisms. *J Neurosci* 23(26): 8967-8977.

Hoshi M, Sato M, Matsumoto S, Noguchi A, Yasutake K, Yoshida N and Sato K (2003). Spherical aggregates of beta-amyloid (amylospheroid) show high neurotoxicity and activate tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(11): 6370-6375.

Kaech S and Banker G (2006). Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc* 1(5): 2406-2415.

Kempf M, Clement A, Faissner A, Lee G and Brandt R (1996). Tau binds to the distal axon early in development of polarity in a microtubule- and microfilament-dependent manner. *J Neurosci* 16(18): 5583-5592.

King ME, Kan HM, Baas PW, Erisir A, Glabe CG and Bloom GS (2006). Tau-dependent microtubule disassembly initiated by prefibrillar beta-amyloid. *J Cell Biol* 175(4): 541-546.

Klein WL (2006). Synaptic targeting by Abeta oligomers (ADDLS) as a basis for memory loss in early Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2(1): 43-55.

Kwinter DM, Lo K, Mafi P and Silverman MA (2009). Dynactin regulates bidirectional transport of dense-core vesicles in the axon and dendrites of cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* 162(4): 1001-1010.

Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA and Klein WL (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(11): 6448-6453.

Lazarov O, Morfini GA, Pigino G, Gadadhar A, Chen X, Robinson J, Ho H, Brady ST and Sisodia SS (2007). Impairments in fast axonal transport and motor neuron deficits in transgenic mice expressing familial Alzheimer's disease-linked mutant presenilin 1. *J Neurosci* 27(26): 7011-7020.

Morfini G, Szebenyi G, Elluru R, Ratner N and Brady ST (2002). Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates kinesin light chains and negatively regulates kinesin-based motility. *EMBO J* 21(3): 281-293.

Morfini GA, Burns M, Binder LI, Kanaan NM, LaPointe N, Bosco DA, Brown RH, Jr., Brown H, Tiwari A, Hayward L, Edgar J, Nave KA, Garberrn J, Atagi Y, Song Y, Pigino G and Brady ST (2009). Axonal transport defects in neurodegenerative diseases. *J Neurosci* 29(41): 12776-12786.

Park JJ, Cawley NX and Loh YP (2008). A bi-directional carboxypeptidase E-driven transport mechanism controls BDNF vesicle homeostasis in hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 39(1): 63-73.

Peineau S, Bradley C, Taghibiglou C, Doherty A, Bortolotto ZA, Wang YT and Collingridge GL (2008). The role of GSK-3 in synaptic plasticity. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1: S428-437.

Peineau S, Taghibiglou C, Bradley C, Wong TP, Liu L, Lu J, Lo E, Wu D, Saule E, Bouschet T, Matthews P, Isaac JT, Bortolotto ZA, Wang YT and Collingridge GL (2007). LTP inhibits LTD in the hippocampus via regulation of GSK3beta. *Neuron* 53(5): 703-717.

Pigino G, Morfini G, Atagi Y, Deshpande A, Yu C, Jungbauer L, LaDu M, Busciglio J and Brady S (2009). Disruption of fast axonal transport is a pathogenic

mechanism for intraneuronal amyloid beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(14): 5907-5912.

Roselli F, Tirard M, Lu J, Hutzler P, Lamberti P, Livrea P, Morabito M and Almeida OF (2005). Soluble beta-amyloid1-40 induces NMDA-dependent degradation of postsynaptic density-95 at glutamatergic synapses. *J Neurosci* 25(48): 11061-11070.

Rui Y, Li R, Liu Y, Zhu S, Yu X, Sheng Z and Xie Z (2006). Acute effect of beta amyloid on synchronized spontaneous Ca2+ oscillations in cultured hippocampal networks. *Cell Biol Int* 30(9): 733-740.

Salehi A, et al. (2006). Increased App expression in a mouse model of Down's syndrome disrupts NGF transport and causes cholinergic neuron degeneration. *Neuron* 51(1): 29-42.

Schlager MA and Hoogenraad CC (2009). Basic mechanisms for recognition and transport of synaptic cargos. *Mol Brain* 2(1): 25.

Seo YH, Jung HJ, Shin HT, Kim YM, Yim H, Chung HY, Lim IK and Yoon G (2008). Enhanced glycogenesis is involved in cellular senescence via GSK3/GS modulation. *Aging Cell* 7(6): 894-907.

Szydlowska K and Tymianski M (2010). Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium*.

Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ and Selkoe DJ (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416(6880): 535-539.

Wang HW, Pasternak JF, Kuo H, Ristic H, Lambert MP, Chromy B, Viola KL, Klein WL, Stine WB, Krafft GA and Trommer BL (2002). Soluble oligomers of beta amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus. *Brain Res* 924(2): 133-140.

Wang X and Schwarz TL (2009). The mechanism of Ca2+ -dependent regulation of kinesin-mediated mitochondrial motility. *Cell* 136(1): 163-174.

Wang Z, Edwards JG, Riley N, Provance DW, Jr., Karcher R, Li XD, Davison IG, Ikebe M, Mercer JA, Kauer JA and Ehlers MD (2008). Myosin Vb mobilizes recycling endosomes and AMPA receptors for postsynaptic plasticity. *Cell* 135(3): 535-548.

Wong MY, Shakiryanova D and Levitan ES (2009). Presynaptic ryanodine receptor-CamKII signaling is required for activity-dependent capture of transiting vesicles. *J Mol Neurosci* 37(2): 146-150.

Figure Legends

Fig. 1. AβOs block organelle flux in hippocampal neurons. (A) Representative kymographs comparing axonal DCV transport in control (vehicle) and AβO-treated neurons (18 h, 0.5 μM AβOs). Organelle flux is markedly reduced in the presence of AβOs (right kymograph). (B) Effects of AβOs and other treatments on DCV flux. Disruption of transport can be partially prevented by memantine (Mem), MK-801, lithium, while full protection was obtained with D-AP5 and GSK-3β inhibitor VIII (GSK inh.). A minimum of 15 cells from at least 2 different cultures were analyzed per condition; ** $p<0.0001$ relative to vehicle-treated cultures, * p ranging from 0.007 to 0.05 relative to vehicle-treated cultures in different experimental conditions. # p ranging from 0.0001 to 0.01 relative to AβO-treated cultures in different experimental conditions. + $p<0.05$ comparing Mem+AβOs and D-AP5+AβOs;, ++ $p< 0.005$ comparing AβOs + LiCl and AβOs+GSK inh. (5μM). The first 4 bars are not significantly different between them ($p>0.05$). Complete statistic evaluation is presented in Fig. S2.

Fig. 2. Expression of kinase-dead GSK-3β (GSK-3β KD) (K85A) prevents AβO-induced transport defects. (A) Expression of BDNF-RFP and HA-tagged GSK-3β KD in the same neuron; star indicates cell body, arrows indicate the axon. (B) Expression of GSK-3β KD in neurons prevents AβO-induced transport defect. Conversely, expression of constitutively kinase-active GSK-3β (GSK-3β KA) (S9A) in the absence of AβOs disrupts 50% of DCV transport. Cells were fixed post-imaging and stained with anti-HA to confirm the presence of GSK-3β (K85A or S9A). (C) Summary of transport data. Vehicle/GSK-3β KD n=12 kymographs (12 cells, 1930 vesicles); AβO/GSK-3β KD n=19

kymographs (19 cells, 3468 vesicles); GSK-3β KA n=13 kymographs (13 cells, 1320 vesicles). * ($p<0.05$); ** ($p<0.0001$) indicate a statistically significant difference compared to vehicle KD; $^{+}$ ($p<0.05$) $^{++}$ ($p<0.0001$) indicates a statistically significant difference compared to AβO KD; Scale bar = 25 μm.

Fig. 3. Neuronal cytoskeleton integrity is unaffected by AβO treatment. (A) Top panel - immunoblots of tubulin from neurons extracted in MT buffer I. The ratio of soluble (S) to polymerized (P) tubulin in vehicle- and AβO-treated cells is unchanged. Bottom panels: Representative images of tubulin immunocytochemistry in neurons fixed in MT buffer II. (B) Motor proteins implicated in the transport of DCVs and/or mitochondria display similar levels between control and AβO-treated neurons. For immunocytochemistry, a minimum of 24 cells per condition from at least 3 different cultures were analyzed; for immunoblots, extracts from three different cultures were analyzed. * and ** indicate statistically significant differences ($p<0.05$ and $p<0.005$, respectively) from vehicle-treated neurons (100%). Scale bars = 25 μm.

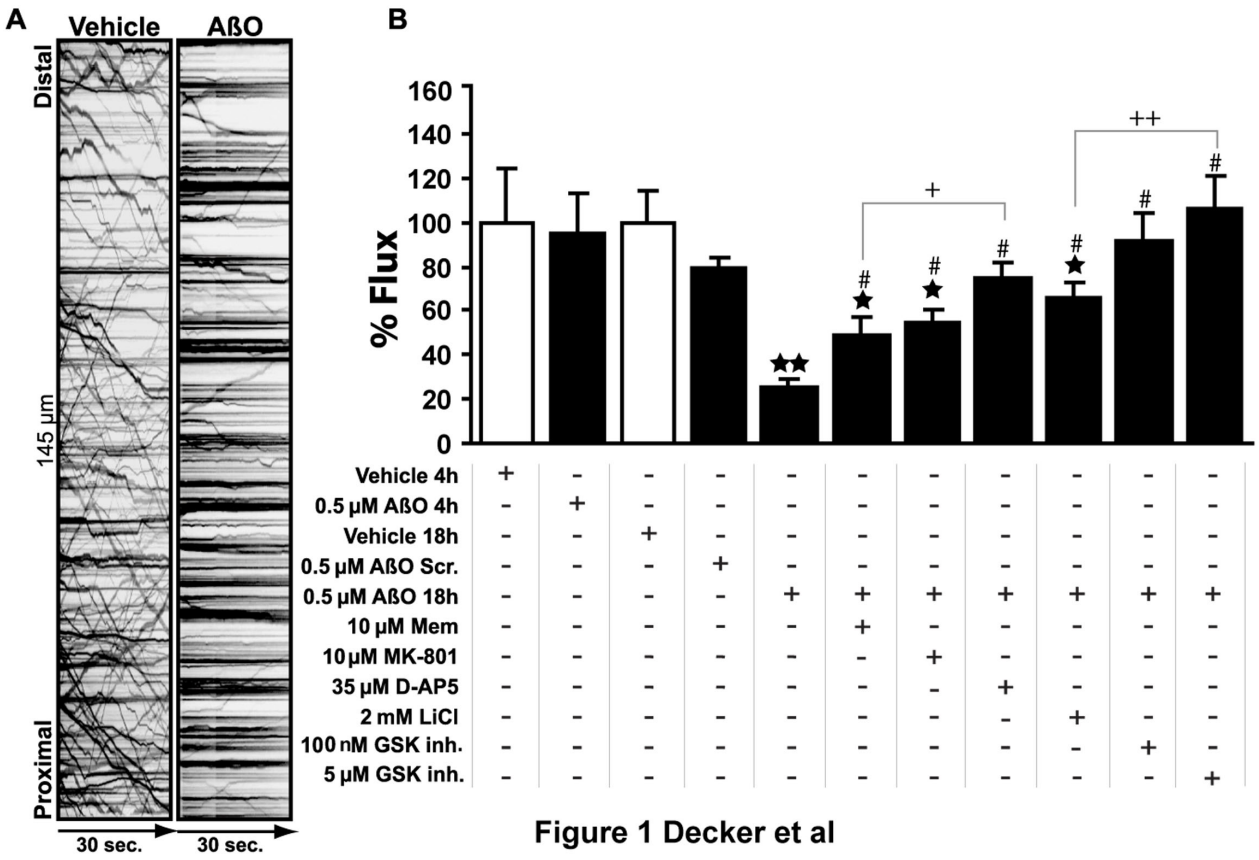
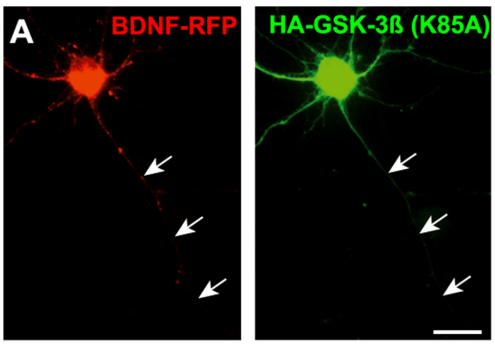
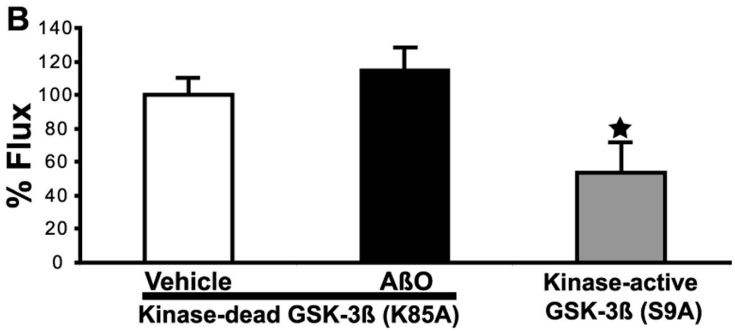


Figure 1 Decker et al





C

	Traffic Values			%
Flux (min^{-1})	**All events**	**Anterograde**	**Retrograde**	**All events**
Vehicle - GSK-3ß KD (K85A)	6.50 ± 0.68	2.79 ± 0.51	3.71 ± 0.34	100.00 ± 10.44
AßOs - GSK-3ß KD (K85A)	7.43 ± 0.91	3.28 ± 0.45	4.15 ± 0.57	114.28 ± 13.94
GSK-3ß KA (S9A)	3.50 ± 1.17	1.59 ± 0.58 $^{+}$	1.91 ± 0.61 $^{*/+}$	53.83 ± 17.98 $^{*/+}$
Velocity (µm/s)				
Vehicle - GSK-3ß KD (K85A)	1.91 ± 0.08	1.84 ± 0.09	1.96 ± 0.08	100.00 ± 3.99
AßOs - GSK-3ß KD (K85A)	1.78 ± 0.06	1.69 ± 0.07	1.83 ± 0.07	93.17 ± 2.90
GSK-3ß KA (S9A)	1.35 ± 0.10	1.41 ± 0.12 $^{*/+}$	1.22 ± 0.13 $^{**/++}$	70.45 ± 5.10 $^{**/++}$
Run Length (µm)				
Vehicle - GSK-3ß KD (K85A)	5.40 ± 0.35	5.32 ± 0.43	5.38 ± 0.37	100.00 ± 6.48
AßOs - GSK-3ß KD (K85A)	4.97 ± 0.15	5.14 ± 0.24	5.86 ± 0.16	92.13 ± 2.70
GSK-3ß KA (S9A)	5.64 ± 0.62	6.54 ± 1.17	4.71 ± 0.60	104.52 ± 11.52

Figure 2 Decker et al

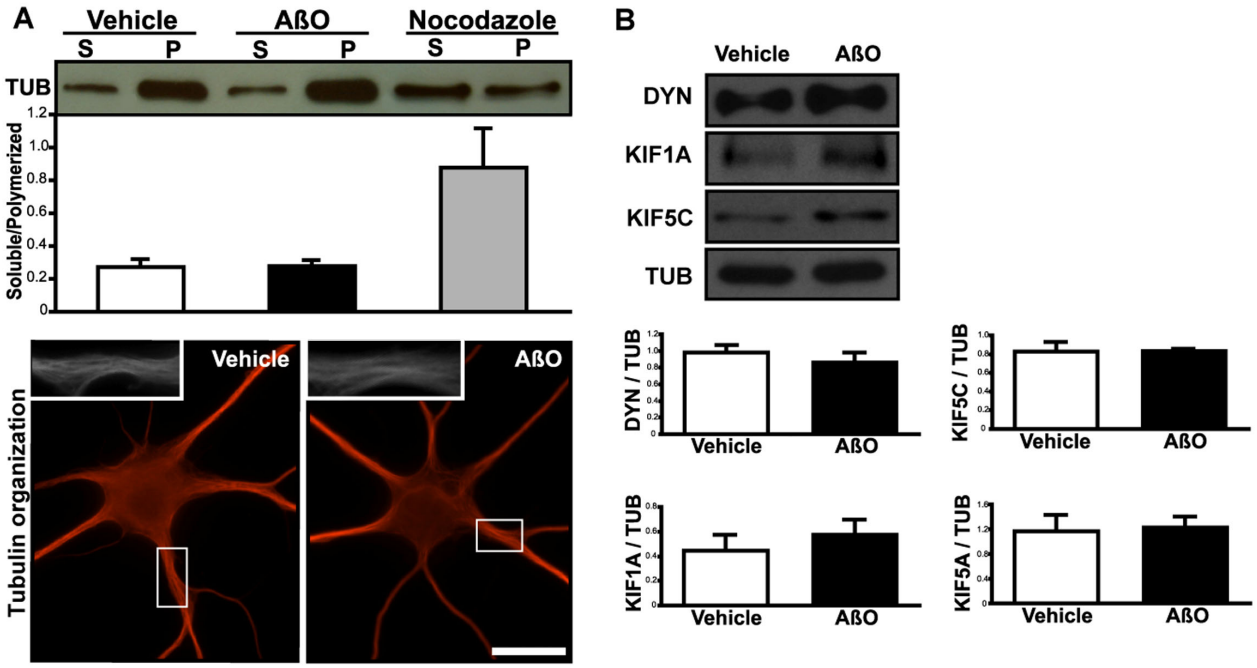


Figure 3 Decker et al

Supplemental Material

Antibodies and reagents. Mouse monoclonal antibody against dynein IC 74 KD was received from Kevin Pfister (University of Virginia, Charlottesville). Rabbit polyclonal KIF1A, KIF5A and KIF5C antibodies were received from Lawrence S. B. Goldstein (University of California at San Diego). Rabbit polyclonal AβO antibody was prepared in the Laboratory of Neurodenegerative Diseases, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil. Mouse monoclonal antibody against Golgi matrix protein of 130 kDa (cis-Golgi marker GM130) was from BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ). Rabbit polyclonal or mouse monoclonal MAP-2 antibodies were from Chemicon (Billerica, MA). Mouse monoclonal tubulin (DM1A clone), lithium chloride (LiCl), Memantine (Mem), N-acetyl-cysteine (NAC), nocodazole, ((+)-5-methyl-10,11- dihydro-5*H*-dibenzo[*a*,*d*]cyclohepten-5,10-imine maleate (MK-801) were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Propidium iodide was from Bioshop (Burlington, ON). D(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (D-AP5) was from Precision Biochemical (Vancouver, Canada). GSK-3β inhibitor VIII was from Calbiochem (Darmstadt, Germany).

Immunobloting. 12 DIV neurons exposed to 0.5 μM AβOs for 18 h were lysed in RIPA buffer with a cocktail of protease inhibitors (Roche, Nutley, NJ). Samples were resolved on a 10% SDS–polyacrylamide gel followed by transfer to PVDF membranes. Membranes were probed using dynein IC 74 KD, KIF1A, KIF5C, KIF5A or tubulin antibodies. Immunoreactive bands were visualized using peroxidase-conjugated secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA).

Densitometric scanning and quantitative analysis were carried out using Image J software (National Institutes of Health, MD).

Fig. S1. (A) Live imaging showing dense-core vesicle transport in control versus AβO-treated (18h, 0.5 μM) neurons. Note the significant difference between BDNF-mRFP vesicle flux in controls compared to AβO-treated neurons. (B) Time-lapse imaging of mitochondria transport in control versus AβO-treated (18h, 0.5 μM) neurons. Note the significant difference between mitochondria flux in controls compared to AβO-treated neurons.

Fig. S2. Hippocampal cultures expressing the dense-core vesicle (DCV) cargo, BDNF-mRFP or mitochondrially-targeted-YFP were imaged 18 hours after treatment with 0.5 μM AβO. Transport parameters (organelle flux, velocity, run length) of DCVs and mitochondria were extracted from quantitative analysis of kymograph traces as described in "Methods".

Fig. S3. Cell morphology is not altered by AβO treatment. (A) Representative segments of live-imaged axons transfected with eGFP. Note that cellular morphology after 18 h exposure to AβOs was normal compared to controls. (B) Representative images of vehicle- and AβO-treated cells stained with Golgi and MAP-2 antibodies. Golgi apparatus distribution and organization was preserved after 18h of AβOs treatment. Cytoskeletal and Golgi structures are unaffected by AβO treatment. Scale bars = 15 μm (A), 10 μm (B).

Fig. S4. Dendritic binding of AβOs in 9-12 DIV hippocampal neurons. (A) Representative image of a 12 DIV cultured hippocampal neuron treated with 0.5 μM AβOs (18 h) followed by immunolabeling under non-permeabilizing conditions using anti-AβO antibody. (B) Overlay of AβO immunofluorescence (green), MAP-2 (a dendrite-specific marker, red) and nuclear staining (DAPI, blue). (C) Quantification of the percentage of neurons immunostained with AβOs antibody in hippocampal cultures as a function of age in culture (days in vitro, DIV). A minimum of 60 neurons per condition from 3 different cultures were analyzed. Scale bar = 20 μm.

Supplemental Figure 2. Quantitative analysis of DCV and mitochondria transport

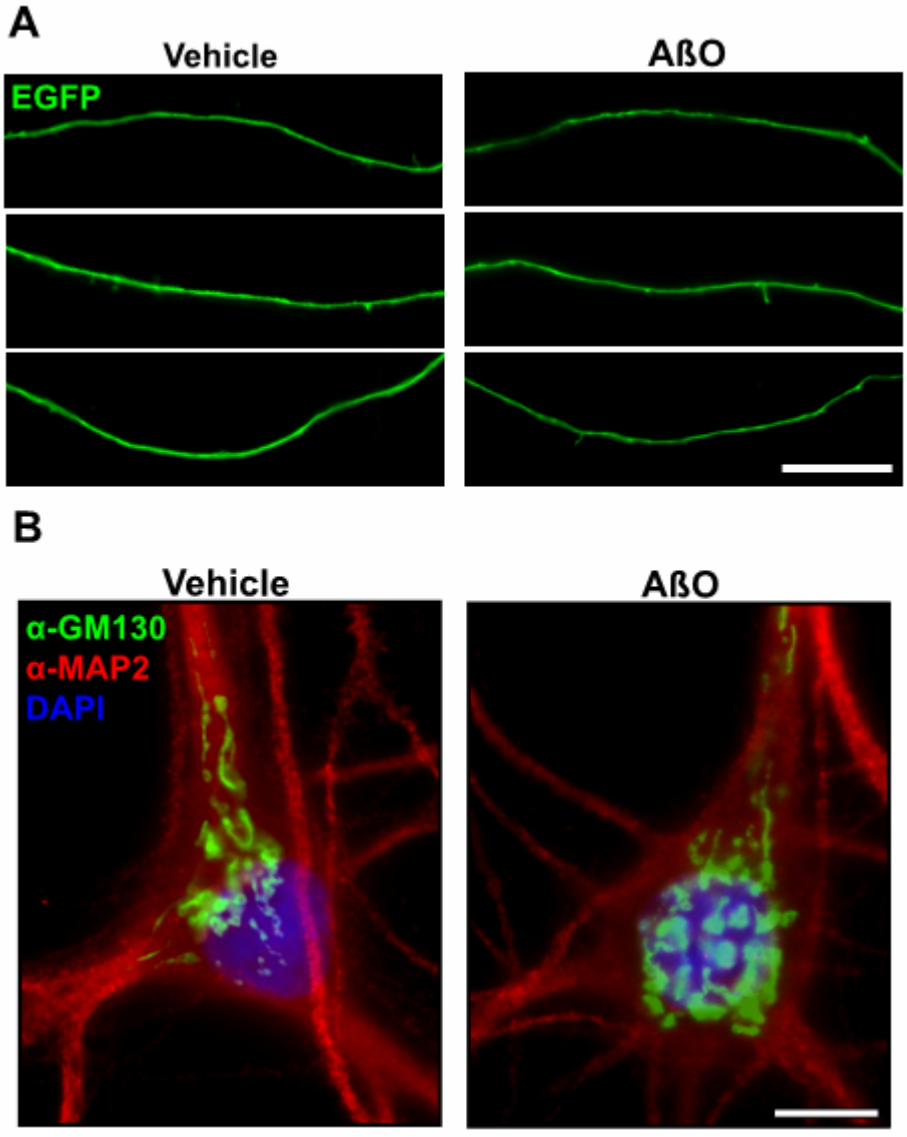
	Dense core vesicles			
	Traffic values			%
	All events	Anterograde	Retrograde	All events
Flux (min^{-1})				
Vehicle 18h	10.28 ± 1.49	6.60 ± 1.18	3.67 ± 0.55 #	100.00 ± 14.09
AßOs 18h	2.55 ± 0.49	1.40 ± 0.29 **	1.15 ± 0.23 **	24.78 ± 4.75 **
AßOs scrambled	8.05 ± 0.55	4.42 ± 0.41 ++	3.63 ± 0.44 ++	78.29 ± 5.35 ++
NAC + AßOs	2.36 ± 0.43	1.23 ± 0.27 **	1.13 ± 0.20 **	22.99 ± 4.20 **
Mem + AßOs	4.98 ± 0.90	2.55 ± 0.60 *	2.43 ± 0.41 +	48.39 ± 8.71 */+
MK-801 + AßOs	5.50 ± 0.69	2.78 ± 0.36 */+	2.72 ± 0.46 +	53.49 ± 6.75 */+
D-AP5 + AßOs	7.57 ± 0.88	4.53 ± 0.57 ++	3.04 ± 0.38 ++	73.64 ± 8.57 ++
LiCl + AßOs	6.66 ± 0.84	3.81 ± 0.55 +	2.85 ± 0.49 +	64.83 ± 8.18 ++
GSK inh.100 nM + AßOs	9.29 ± 1.36	4.44 ± 0.75 +	4.86 ± 0.79 ++	90.41 ± 13.23 ++
GSK inh. 5 mM + AßOs	10.88 ± 1.52	5.71 ± 0.79 ++	5.17 ± 1.07 ++	105.79 ± 14.76 ++
Velocity (µm/s)				
Vehicle 18h	1.66 ± 0.11	1.66 ± 0.10	1.63 ± 0.12	100.00 ± 6.68
AßOs 18h	1.32 ± 0.07	1.32 ± 0.08 *	1.34 ± 0.07	79.94 ± 4.15 *
AßOs scrambled	1.68 ± 0.09	1.74 ± 0.07 +	1.59 ± 0.14	101.51 ± 5.72 +
NAC + AßOs	1.95 ± 0.12	1.91 ± 0.11 ++	1.95 ± 0.14 +	117.60 ± 7.23 ++
Mem + AßOs	1.38 ± 0.11	1.39 ± 0.13	1.37 ± 0.11	83.31 ± 6.73
MK-801 + AßOs	1.38 ± 0.07	1.36 ± 0.07 *	1.38 ± 0.07	83.32 ± 4.17 *
D-AP5 + AßOs	1.71 ± 0.08	1.83 ± 0.09 ++	1.56 ± 0.07 +	103.45 ± 4.59 +
LiCl + AßOs	1.77 ± 0.76	1.78 ± 0.89 ++	1.71 ± 0.65 +	107.35 ± 4.56 ++
GSK inh.100 nM + AßOs	1.96 ± 0.09	1.96 ± 0.09 ++	1.93 ± 0.09 ++	118.15 ± 5.26 ++
GSK inh. 5 mM + AßOs	1.99 ± 0.06	1.99 ± 0.06 ++	1.99 ± 0.07 ++	120.76 ± 3.49 ++
Run length (µm)				
Vehicle 18h	8.45 ± 0.69	9.53 ± 0.83	6.78 ± 0.51	100.00 ± 8.19
AßOs 18h	5.20 ± 0.33	5.30 ± 0.42 **	4.90 ± 0.39 *	61.56 ± 3.85 **
AßOs scrambled	6.03 ± 0.45	6.52 ± 0.56 *	5.39 ± 0.46	71.32 ± 5.31 *
NAC + AßOs	6.17 ± 0.60	6.46 ± 1.06 *	5.97 ± 0.39	72.99 ± 7.06 *
Mem + AßOs	6.40 ± 0.67	6.42 ± 0.94 *	6.05 ± 0.45	75.72 ± 7.88
MK-801 + AßOs	5.04 ± 0.18	5.43 ± 0.24 **	4.58 ± 0.20 **	59.66 ± 2.17 ++
D-AP5 + AßOs	6.61 ± 0.37	7.67 ± 0.60 +	5.53 ± 0.26 *	78.28 ± 4.42 */+
LiCl + AßOs	5.15 ± 0.29	5.36 ± 0.38 **	4.60 ± 0.16 **	60.96 ± 3.46 **
GSK inh.100 nM + AßOs	6.49 ± 0.42	6.85 ± 0.58 +	6.05 ± 0.35 +	76.78 ± 4.94 +
GSK inh. 5 mM + AßOs	8.16 ± 0.65	8.92 ± 0.86 ++	7.16 ± 0.62 +	96.54 ± 7.72 ++

	Mitochondria			
	Traffic values			%
	All events	Anterograde	Retrograde	All events
Flux (min^{-1})				
Vehicle 18h	0.24 ± 0.05	0.10 ± 0.03	0.14 ± 0.03	100.00 ± 21.71
AßOs 18h	0.06 ± 0.03	0.02 ± 0.01 *	0.04 ± 0.02 *	26.56 ± 11.84 *
Velocity (µm/s)				
Vehicle 18h	0.42 ± 0.04	0.30 ± 0.04	0.46 ± 0.07	100.00 ± 8.73
AßOs 18h	0.27 ± 0.07	0.10 ± 0.05	0.35 ± 0.10	63.32 ± 4.65
Run length (µm)				
Vehicle 18h	8.26 ± 1.07	5.36 ± 0.89	8.89 ± 1.50	100.00 ± 12.93
AßOs 18h	3.27 ± 0.98	1.89 ± 0.94 **	2.80 ± 0.95 *	39.60 ± 11.87 *

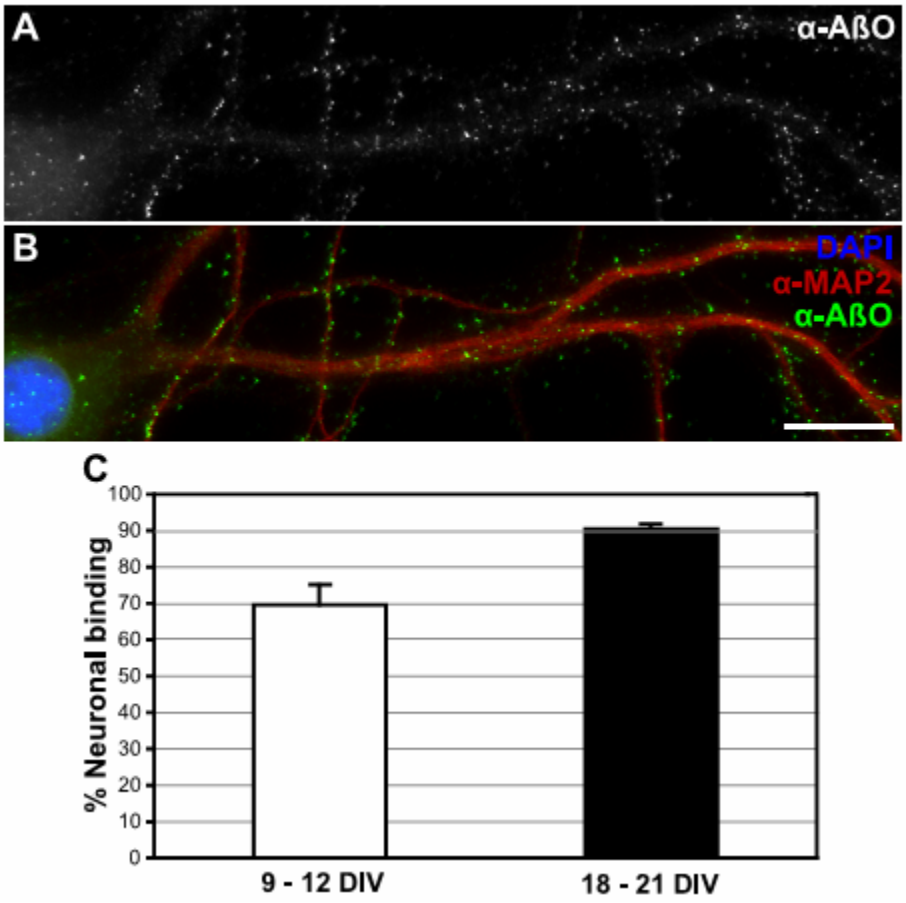
DCVs: Vehicle n=21 kymographs (21 cells, 3669 vesicles) / AβOs n=25 kymographs (25 cells, 1332 vesicles)
AβOscr. n=10 kymographs (10 cells, 1917 vesicles) / NAC + AβOs n=17 kymographs (17 cells, 872 vesicles)
Mem + AβOs n=14 kymographs (14 cells, 1024 vesicles) / MK-801 + AβOs n=18 kymographs (18 cells, 2539 vesicles)
D-AP5+AβOs n=18 kymographs (18 cells, 3110 vesicles) / LiCl +AβOs n=17 kymographs (17 cells, 2988 vesicles)
GSK inh.5 mM+AβOs n=18 kymographs (18 cells, 3602 vesicles) / GSK inh.100 nM+AβOs n=19 kymographs (19 cells, 3583 vesicles)
Mitochondria: Vehicle n=15 kymographs (15 cells, 229 vesicles) / AβOs n=15 kymographs (15 cells, 56 vesicles)

* p<0.05, when compared with vehicle (from each column)
** p<0.0001, when compared with vehicle (from each column)
\+ p<0.05, when compared with AβOs (from each column)
++ p<0.0001, when compared with AβOs (from each column)
\# p<0.0001, when compared anterograde vehicle with retrograde vehicle

Supplemental Figure 3, Decker et al.



Supplemental Figure 4, Decker et al.



VIII. 3) ARTIGO 3:

"Proteção das sinapses contra as toxinas da Doença de Alzheimer: sinalização de insulina previne a ligação patogênica dos oligômeros de Abeta".

"Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: insulin signaling prevents the pathogenic binding of Abeta oligomers".

Fernanda G. De Felice,[ab1] Marcelo N. N. Vieira,[bc] Theresa R. Bomfim,[b] **Helena Decker**,[bc] Pauline T. Velasco,[a] Mary P. Lambert,[a] Kirsten L. Viola,[a] Wei-Qin Zhao,[a2] Sergio T. Ferreira,[b] and William L. Klein[a1]

[a] Department of Neurobiology and Physiology, Northwestern University, Evanston, IL 60208;

[b] Instituto de Bioquímica Médica

[c] Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21944-590, Brazil.

Publicado na Proc Natl Acad Sci USA, 2009 February 10; 106(6): 1971–1976.

Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: Insulin signaling prevents the pathogenic binding of Aβ oligomers

Fernanda G. De Felice[a,b,1], Marcelo N. N. Vieira[b,c], Theresa R. Bomfim[b], Helena Decker[b,c], Pauline T. Velasco[a], Mary P. Lambert[a], Kirsten L. Viola[a], Wei-Qin Zhao[a,2], Sergio T. Ferreira[b], and William L. Klein[a,1]

[a]Department of Neurobiology and Physiology, Northwestern University, Evanston, IL 60208; and [b]Instituto de Bioquímica Médica and [c]Instituto de Ciencias Biomedicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21944-590, Brazil

Edited by Joseph S. Takahashi, Northwestern University, Evanston, IL, and approved December 15, 2008 (received for review September 13, 2008)

Synapse deterioration underlying severe memory loss in early Alzheimer's disease (AD) is thought to be caused by soluble amyloid beta (Aβ) oligomers. Mechanistically, soluble Aβ oligomers, also referred to as Aβ-derived diffusible ligands (ADDLs), act as highly specific pathogenic ligands, binding to sites localized at particular synapses. This binding triggers oxidative stress, loss of synaptic spines, and ectopic redistribution of receptors critical to plasticity and memory. We report here the existence of a protective mechanism that naturally shields synapses against ADDL-induced deterioration. Synapse pathology was investigated in mature cultures of hippocampal neurons. Before spine loss, ADDLs caused major downregulation of plasma membrane insulin receptors (IRs), via a mechanism sensitive to calcium calmodulin-dependent kinase II (CaMKII) and casein kinase II (CK2) inhibition. Most significantly, this loss of surface IRs, and ADDL-induced oxidative stress and synaptic spine deterioration, could be completely prevented by insulin. At submaximal insulin doses, protection was potentiated by rosiglitazone, an insulin-sensitizing drug used to treat type 2 diabetes. The mechanism of insulin protection entailed a marked reduction in pathogenic ADDL binding. Surprisingly, insulin failed to block ADDL binding when IR tyrosine kinase activity was inhibited; in fact, a significant increase in binding was caused by IR inhibition. The protective role of insulin thus derives from IR signaling-dependent downregulation of ADDL binding sites rather than ligand competition. The finding that synapse vulnerability to ADDLs can be mitigated by insulin suggests that bolstering brain insulin signaling, which can decline with aging and diabetes, could have significant potential to slow or deter AD pathogenesis.

therapeutics | diabetes | aging | receptors | plasticity

Alzheimer's disease (AD) is a neurological disorder characterized by profound memory loss and progressively catastrophic dementia. Currently there is no effective treatment for AD, but the pursuit of novel disease-modifying therapeutics is the object of intense investigation. Significant attention focuses on strategies that could neutralize the mechanism(s) initiating memory loss, the major manifestation of early AD (1, 2). Why memory is specifically targeted in AD has long been a fundamental mystery, but it is increasingly evident that the crucial pathogenic event is the functional and morphological deterioration of specific memory center synapses induced by potent neurotoxins that accumulate in AD brain (3–9).

Recent evidence shows that the neurotoxins in AD comprise aggregates of the amyloid-β peptide (Aβ) (10), a molecule generated by proteolytic cleavage of the amyloid precursor protein. While monomeric Aβ is not neurotoxic, the peptide exhibits a marked toxic gain-of-function upon self-association. Fibrillar forms of Aβ found in amyloid plaques were until recently considered responsible for neuronal damage in AD, but the discovery that small Aβ oligomers, also known as Aβ-derived diffusible ligands (ADDLs), are potent central nervous system (CNS) neurotoxins (11), has led to a new view of AD pathogenesis (3). Unlike the insoluble fibrils, ADDLs are diffusible molecules that attach with specificity to particular synapses, acting as pathogenic ligands (1, 12). The attack on synapses inhibits long-term potentiation (LTP) (11, 13, 14), a classic paradigm for memory-related synaptic mechanisms. ADDL binding further induces AD-like pathology including neuronal tau hyperphosphorylation (15), oxidative stress (16), and synapse deterioration and loss (17–21). The pathological relevance of ADDLs has been substantiated by their disease-specific accumulation in human brain and CSF (1, 22) and by the accumulation of structurally equivalent oligomers in transgenic mouse AD models (23). By explaining why AD targets memory and accounting for major features of neuropathology, the ligand-based attack on specific synapses by ADDLs provides a potentially unifying mechanism for AD pathogenesis.

Predictably, therapeutic drugs and antibodies targeting ADDLs have shown promise in preclinical studies and early clinical trials (24, 25). Nonetheless, because no effective approach to AD therapeutics is yet available, the need to identify novel drug targets remains. We have hypothesized that cellular mechanisms exist that physiologically protect synapses against ADDL toxicity. Such active synaptic protection mechanisms could contribute to preserved cognitive function in normal individuals, while impaired mechanisms might serve as drug targets for individuals at early stages of AD or presenting mild cognitive impairment. Recent reports are consistent with the possibility that one such protective mechanism could be provided by CNS insulin signaling. Insulin plays a key role in plasticity mechanisms in the CNS (26, 27) and it recently has been shown that insulin and the insulin-sensitizing drug rosiglitazone improve cognitive performance in mouse models of AD and in patients with early AD (28–30). Conversely, insulin-resistant type 2 diabetes patients show significantly increased risk for developing AD (31). Moreover, experimental induction of diabetes in mouse models of AD results in premature cognitive failure and degeneration of synapse structure (32, 33).

To test the hypothesis that insulin signaling provides a physiological defense mechanism against ADDLs' synaptotoxicity, we have used highly differentiated hippocampal nerve cell cultures, a preferred model for studies of synapse cell biology (34, 35) and

Author contributions: F.G.D.F., M.N.V., S.F., and W.L.K. designed research; F.G.D.F., M.N.V., T.R.B., H.D., and W.-Q.Z. performed research; P.T.V., M.P.L., and K.L.V. contributed new reagents/analytic tools; F.G.D.F., M.N.V., T.R.B., H.D., S.F., and W.L.K. analyzed data; and F.G.D.F., S.F., and W.L.K. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Freely available online through the PNAS open access option.

[1]To whom correspondence may be addressed. E-mail: wklein@northwestern.edu or felice@bioqmed.ufrj.br.

[2]Current address: Alzheimer's Department, Merck Research Laboratories, PO Box 4, 44K, West Point, PA 19486.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0809158106/DCSupplemental.

© 2009 by The National Academy of Sciences of the USA

mechanisms of ADDL pathogenicity (12, 18). Results show that insulin blocks ADDL binding to synapses, thereby preventing the ensuing neurotoxicity. Decreased binding is the result of downregulation of ADDL binding sites through a mechanism requiring insulin receptor (IR) tyrosine kinase activity. This downregulation is the converse of ADDL-induced IR downregulation, which we have recently described as a mechanism underlying CNS insulin resistance in AD (9). Thus, physiological insulin and pathological ADDLs negatively regulate the abundance of each other's binding sites, creating a competitive balance between synapse survival and degeneration. Because insulin signaling in the brain is known to decline with age (36), the outcome of this balance represents a unique risk factor for AD well suited for therapeutic intervention. By restoring the balance to favor synapse survival, new drugs designed to specifically enhance CNS insulin signaling would provide a new and potentially significant class of AD therapeutics.

Results

ADDLs Induce Loss of IRs from Neuronal Surfaces. We recently reported that ADDLs cause a major loss of IRs from neuronal dendrites (9), in harmony with the impact of ADDLs on other essential plasticity-related neuronal molecules such as N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors (18, 20). We have now extended those observations using both immunocytochemistry and surface biotinylation. Immunocytochemical analysis showed that ADDLs induced elimination of dendritic IRs (Fig. 1 *A–E*) and a parallel increase in immunoreactivity in the cell body, indicating IR redistribution (Fig. 1 *A* and *B*). Remarkably, neurons attacked by ADDLs (green puncta) showed virtual absence of dendritic IRs and intense somatic labeling whereas neurons devoid of ADDLs exhibited abundant dendritic IR labeling (red puncta) (Fig. 1*F*). Control experiments showed that a peptide corresponding to a scrambled Aβ sequence and subjected to exactly the same procedure as used for preparation of ADDLs had no effect on insulin receptor levels (Fig. 1*E*) and was not detected by oligomer-specific antibodies (data not shown). Surface biotinylation results showed that surface-exposed IR levels were decreased by 22% and 68%, respectively, after 30 min or 3 h of exposure to 100 nM ADDLs (Fig. 1*G*). We did not detect any changes in intracellular IR levels in ADDL-treated neurons, in line with our previous results showing no changes in total IR levels measured by Western blots in total homogenates from ADDL-treated neurons (9). Importantly, surface levels of the membrane protein Na^+/K^+-ATPase, used as a control, were not affected by ADDLs [supporting information (*SI*) Fig. S1]. Surface biotinylation results also indicated that ADDLs had no measurable impact on overall surface protein levels (Fig. S1). These results are consistent with the notion that ADDLs have a selective impact in accelerating the endocytosis of particular surface proteins, such as IRs.

Casein Kinase 2 (CK2) and Ca^{2+}/Calmodulin-Dependent Kinase II (CaMKII) Mediate ADDL-Induced Loss of IRs and NMDA subtype glutamate receptors (NMDARs). IRs play key roles in important neurological processes including learning and memory (26, 27) and tau phosphorylation (37, 38). Thus, ADDL-induced loss of IRs might represent an important early mechanism underlying memory impairment and other pathological features of AD. As noted above, Aβ oligomers also cause internalization of NMDARs. Physiologically, activity-dependent internalization of NMDARs is mediated by CK2 and CaMKII (39). We therefore tested the hypothesis that ADDL-induced internalization of NMDARs and IRs might share common mechanisms involving CK2 and CaMKII. Consistent with this hypothesis, we found that DMAT, a CK2 inhibitor, completely blocked ADDL-induced loss of both IRs and NMDARs from the dendrites of hippocampal neurons and that KN93, a CaMKII inhibitor, afforded partial protection against ADDL-induced loss of both receptors (Fig. 2 and Fig. S2). Neither DMAT nor KN93 alone had any statistically significant effect on dendritic IR and NMDAR levels (Fig. 2*E*). These results indicate that CK2 and CaMKII mediate ADDL-induced loss of synaptic receptors germane to plasticity.

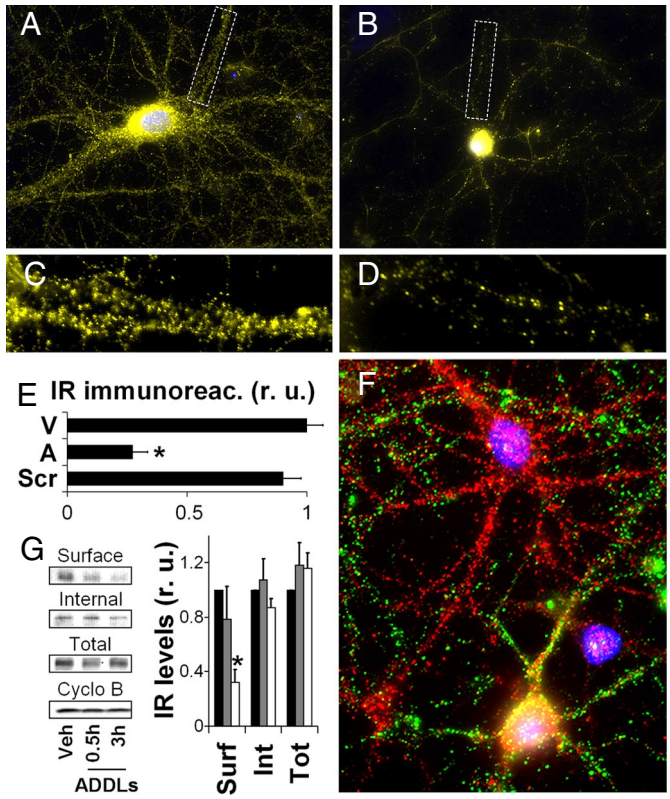


Fig. 1. ADDLs induce the removal of IRs from dendritic plasma membranes. Cultured hippocampal neurons were exposed to 100 nM ADDLs at 37 °C for 3 h followed by immunolabeling with anti-IRα (yellow). Nuclear staining (DAPI) is shown in blue. *A* and *B* show representative images from vehicle- and ADDL-treated cultures, respectively. *C* and *D* show high-magnification images of dendrites contained in the dotted rectangles indicated in *A* and *B*, respectively. (*E*) Quantification of IR immunofluorescence levels (see *SI Methods*) for cultures treated with vehicle (V), ADDLs (A), or scrambled Aβ peptide (Scr). (*F*) A representative image showing double labeling for ADDL binding (NU4 oligomer antibody; green) and IRα (red). (*G*) Surface abundance of IRs in hippocampal neurons exposed to vehicle or 100 nM ADDLs for 0.5 or 3 h, assessed by surface biotinylation (see *SI Methods*). Asterisk indicates statistically significant (*, $P < 0.0002$) decrease compared to vehicle-treated cultures.

Insulin Blocks ADDL-Induced Loss of IRs. Recent studies have shown that intranasal administration of insulin improves memory in both nondemented humans and in AD patients (30, 40). Moreover, insulin ameliorates Aβ-induced inhibition of LTP in hippocampal slices (41, 42). We therefore asked whether insulin might protect surface IRs in neurons exposed to ADDLs. Significantly, we found that 100 nM insulin partially prevented and 1 μM insulin completely blocked ADDL-induced loss of dendritic IRs in hippocampal cultures (Fig. 3 *A–E*) and IR accumulation in the cell body (Fig. 3 *A–D*).

Rosiglitazone Potentiates the Neuroprotective Action of Insulin. Rosiglitazone, a peroxysome proliferator-activating receptor (PPAR)-γ agonist, is an insulin-sensitizing drug that stimulates IR protein kinase activity. It is used for treating insulin-resistant type II diabetes and is currently in clinical trials for AD (28, 43). We next investigated whether rosiglitazone might potentiate the ability of submaximal insulin doses to protect against ADDL-induced IR loss. In ADDL-treated cultures, neurons exhibiting

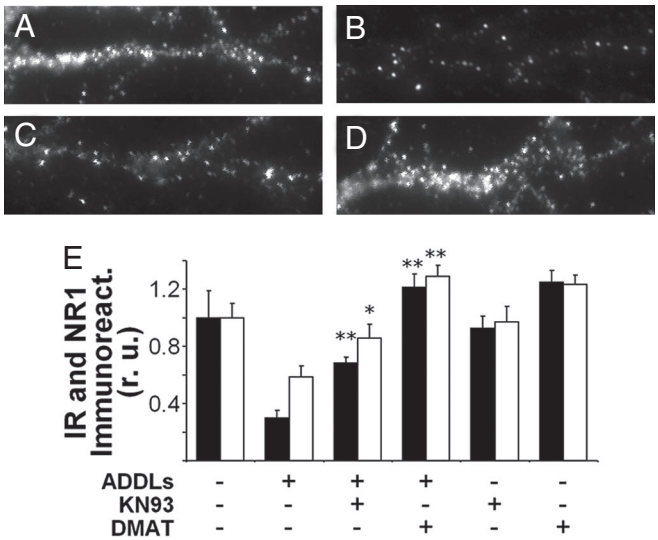


Fig. 2. CK2 and CaMKII mediate ADDL-induced loss of insulin and NMDA receptors. (*A–D*) Representative high magnification images of IRα labeling in dendrites from hippocampal neurons treated for 3 h with vehicle (*A*), 100 nM ADDLs (*B*), 100 nM ADDLs + 5 μM KN93 (*C*), or 100 nM ADDLs + 10 μM DMAT (*D*). (*E*) Quantification of IR (black bars) and NMDAR (white bars) immunofluorescence. Bars correspond to integrated immunofluorescence intensities (see *SI Methods*) from 3 experiments using independent cultures (30 images analyzed per experimental condition per culture). Asterisks indicate statistically significant (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.001$) increases compared to ADDL-treated cultures.

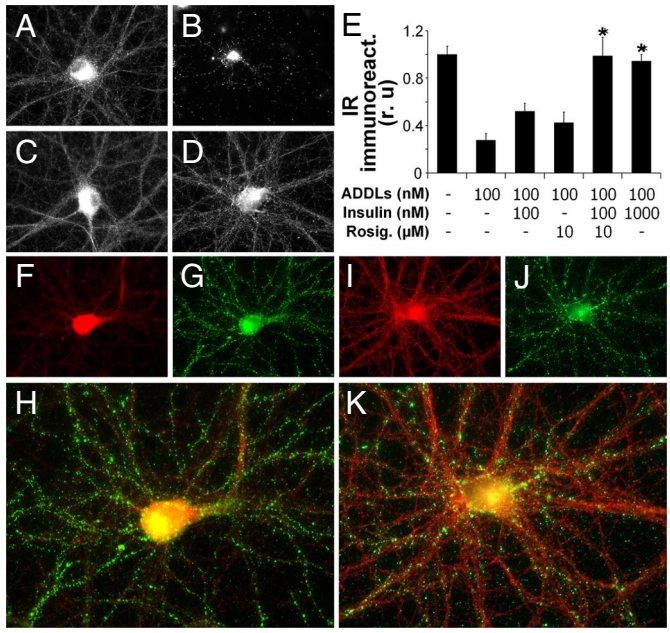


Fig. 3. Insulin prevents ADDL-induced pathological trafficking of IRs. (*A–D*) Representative IR immunofluorescence images from hippocampal neurons treated with vehicle (*A*), 100 nM ADDLs (*B*), 100 nM ADDLs + 100 nM insulin (*C*), and 100 nM ADDLs + 1 μM insulin (*D*). (*E*) Integrated IR immunofluorescence from 6 experiments using independent cultures (30 images analyzed per experimental condition per culture). Asterisk indicates statistically significant (*, $P < 0.005$) increase compared to ADDL-treated cultures. (*F–K*) Neurons treated for 3 h with 100 nM ADDLs alone (*F–H*) or with 100 nM ADDLs + 100 nM insulin + 10 μM rosiglitazone (*I–K*) followed by double labeling for IR (red) and ADDLs (green). (*H* and *K*) Merged images of IR and ADDL immunolabeling. Note the inverse correlation between ADDL binding and dendritic IRα immunoreactivities on dendritic process.

the characteristic punctate pattern of synaptic ADDL binding showed very low dendritic IR levels (Fig. 3 *F–H*). In contrast, neurons that were pretreated with 100 nM insulin + 10 μM rosiglitazone showed markedly reduced ADDL binding and abundant IRs in dendrites (Fig. 3 *I–K*). Quantitative analysis showed that dendritic IR levels in cells exposed to ADDLs in the presence of 100 nM insulin + 10 μM rosiglitazone were similar to the levels found in control cultures and in cultures treated with ADDLs in the presence of 1 μM insulin (Fig. 3*E*). In the absence of exogenous insulin, rosiglitazone conferred partial protection against ADDL-induced loss of IRs (Fig. 3*E*). We note, however, that the effects of rosiglitazone and insulin were synergistic rather than additive, indicating potentiation of insulin protection by rosiglitazone.

Insulin Prevents ADDL-Binding to Neurons and Protects Against ADDL-Induced Oxidative Stress. Double-labeling for IRs and ADDL binding (detected by oligomer-selective NU4 antibody) (44) revealed that neurons treated with insulin + rosiglitazone showed markedly reduced ADDL binding (Fig. 3 *J* and *K*). This result suggested an insulin-dependent regulation of ADDL-binding sites. We next pretreated hippocampal neurons with either 100 nM or 1 μM insulin for 30 min and then added 100 nM ADDLs for an additional 30 min. Low (100 nM) insulin caused a noticeable reduction and high (1 μM) insulin caused a major ($\approx$70%) blockade of ADDL binding to neurons (Fig. 4 *A–E*).

We recently showed that ADDLs induce oxidative stress in hippocampal neurons (16), thus establishing a connection between the neuronal impact of ADDLs and a major AD neuropathology. As might be predicted from the blockade of ADDL binding, we found that insulin effectively inhibited ADDL-induced neuronal oxidative stress (Fig. 4 *F–I*).

Insulin Prevents ADDL-Induced Synapse Loss. To allow direct comparison of ADDL-induced changes in dendritic spine density relative to changes in IR levels, spines were labeled with phalloidin in tandem with the IR antibody. IRs were eliminated while the number of spines was unaffected in hippocampal neurons exposed to ADDLs for 3 h (Fig. S3). This indicates that loss of insulin receptors precedes and is not a consequence of overall collapse and retraction of synaptic spines. We also note that after a 3-h exposure to ADDLs, a time at which insulin receptors are largely removed from the surface, there is no loss of EphB2 receptors (18). Interestingly, after a 24-h exposure to ADDLs a pronounced loss of spines was detected (Fig. 5), confirming our previous results (18). Remarkably, insulin completely protected against ADDL-induced spine degeneration (Fig. 5). Double labeling using phalloidin and the NU4 anti-ADDLs antibody revealed a marked reduction in spine density in isolated dendrites attacked by ADDLs (Fig. 5*E*) compared to vehicle-treated neurons (Fig. 5*D*). In insulin-treated neurons, a marked reduction of ADDL binding was observed along with the presence of abundant, healthy spines (Fig. 5*F*).

Protection by Insulin Requires IR Activity. Previous work from our group has shown that ADDLs colocalize with PSD-95 and synaptic spines labeled with CaMKII (12). We recently suggested that ADDLs interact with a receptor complex that includes IRs (9). This raised the possibility that blockade of neuronal ADDL binding by insulin could be the result of direct competition between ADDLs and insulin for a common binding site on neuronal surfaces, as also recently suggested (41). Surprisingly, however, inhibition of IR protein tyrosine kinase (PTK) activity by AG1024 completely abolished the ability of insulin to block ADDL binding (Fig. 5). In fact, AG1024 caused significant increases in neuronal ADDL binding both when AG1024 was

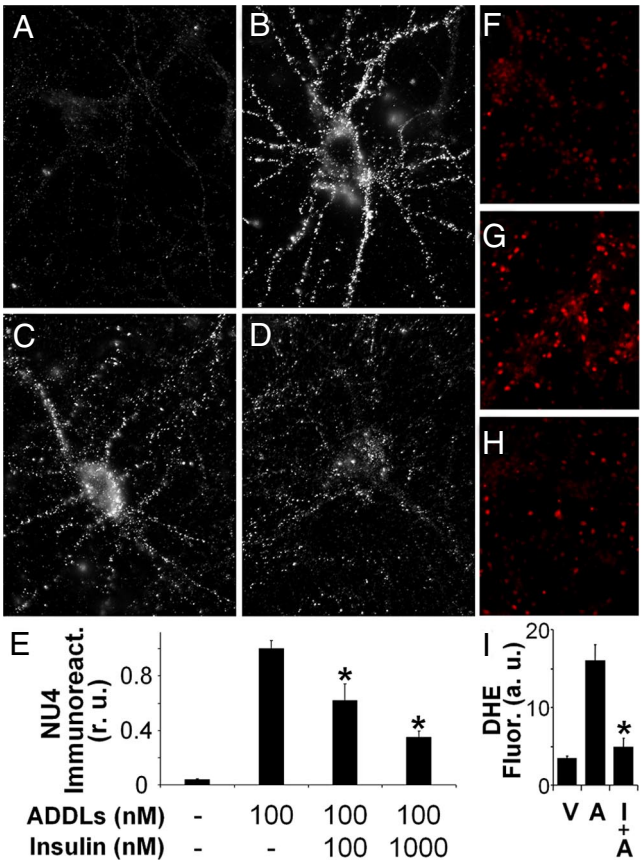


Fig. 4. Insulin blocks neuronal ADDL binding and ADDL-induced oxidative stress. (*A–D*) Representative images from hippocampal neurons treated with vehicle (*A*), 100 nM ADDLs (*B*), 100 nM ADDLs + 100 nM insulin (*C*), and 100 nM ADDLs + 1 μM insulin (*D*). ADDL binding was detected using NU4 antibody. (*E*) Integrated ADDL immunofluorescence intensities from 6 experiments using independent cultures (25 images analyzed per experimental condition per culture). Asterisk indicates statistically significant (*, $P < 0.01$) decrease compared to ADDL-treated cultures. (*F–H*) Representative DHE fluorescence images in hippocampal cultures treated with vehicle (*F*), 1 μM ADDLs (*G*), or 1 μM insulin + 1 μM ADDLs (*H*). (*I*) Integrated DHE fluorescence. Asterisk indicates statistically significant (*, $P < 0.007$) differences relative to ADDL-treated cultures.

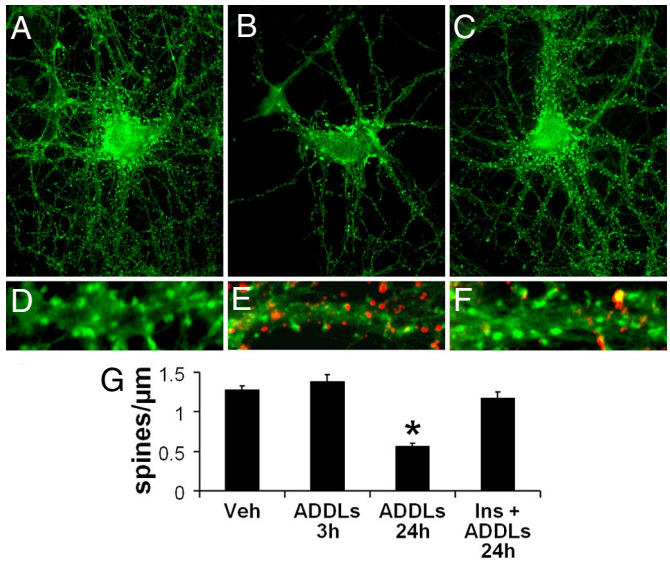


Fig. 5. Insulin blocks ADDL-induced synapse loss. (*A–C*) Representative images from hippocampal neurons treated with vehicle (*A*), 100 nM ADDLs (*B*), or 100 nM ADDLs + 1 μM insulin (*C*) for 24 h. Spines were labeled using phalloidin (green). (*D–F*) Double-labeling high-magnification images of dendrites from neurons treated with vehicle (*D*), ADDLs (*E*), or ADDLs + insulin (*F*). Spines were labeled by phalloidin (green) and ADDLs were detected using the NU4 antibody (red). (*G*) Quantification of spine number per unit dendrite length. Asterisk indicates statistically significant difference (*, $P < 0.001$) relative to vehicle-treated neurons.

added alone and in the presence of exogenous insulin. These results suggest that inhibition of ADDL binding by insulin involves an IR signaling-dependent downregulation of ADDL binding sites, consistent with known effects of neuronal IRs on synaptic receptor trafficking (45, 46).

Discussion

We have identified a unique molecular mechanism that protects CNS neurons against ADDLs, soluble neurotoxins putatively responsible for the synaptic deterioration underlying Alzheimer's memory failure. ADDLs are known to initiate deterioration by acting as highly specific pathogenic ligands. We have found that ADDL binding to particular synaptic sites and the resulting neuronal oxidative stress, IR downregulation, and synapse loss are markedly decreased by the presence of insulin. Interestingly, neuroprotection by insulin requires IR activity. Thus the mechanism of protection does not involve simple competition between ADDLs and insulin for a common binding site on the neuronal surface, but rather is a signaling-dependent downregulation of ADDL binding sites. The insulin-sensitizing drug rosiglitazone, a PPARγ agonist, potentiated the ability of insulin to protect synapses against ADDLs. Results strongly support the hypothesis that insulin signaling plays a role in defending CNS neurons against AD and provide a disease-specific basis for treatments based on stimulating CNS insulin pathways.

Although the brain once was considered insulin insensitive, it is now known that CNS insulin signaling is important for many aspects of neuronal function, including plasticity and memory

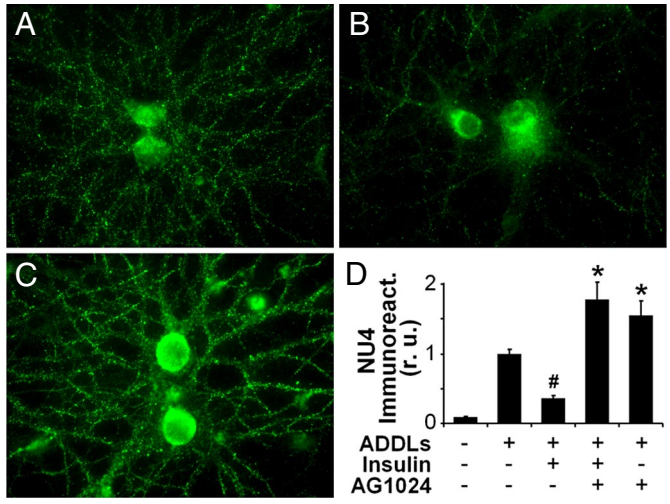


Fig. 6. Protection by insulin requires IR tyrosine kinase activity. (*A–C*) Representative images from hippocampal neurons treated with 100 nM ADDLs (*A*), 100 nM ADDLs + 1 μM insulin (*B*), or 100 nM ADDLs + 1 μM insulin + 5 μM AG1024 (*C*). ADDL binding was detected using the NU4 anti-ADDL antibody. (*D*) Integrated ADDL immunofluorescence from 3 experiments using independent neuronal cultures (25 images analyzed per experimental condition per culture). Pound sign indicates statistically significant (#, $P < 0.001$) difference relative to ADDL-treated cultures. Asterisk indicates statistically significant (*, $P < 0.007$) differences relative to cultures treated with ADDLs + insulin.

formation (26, 27, 47). Recently, human subjects have been found to respond to CNS insulin signaling stimulation with enhanced verbal memory performance (40). When given to subjects with early AD, intranasal insulin also improves performance (30) but only at higher doses, suggesting involvement of additional mechanisms other than stimulation of plasticity. Results here support the hypothesis that the beneficial effect of insulin in AD derives at least in part from an acute decrease in ADDL synaptotoxicity. In harmony with this possibility, it recently was shown that insulin ameliorates Aβ oligomer-induced inhibition of LTP (41, 42), a standard paradigm for plasticity and memory mechanisms. Long-term CNS insulin stimulation potentially could increase cognitive benefits to AD patients further by reducing ADDL-induced neuronal deterioration. Insulin, besides decreasing ADDL binding, ADDL-induced spine degeneration, oxidative stress, and insulin receptor loss (as shown here), also protects against accumulation of hyperphosphorylated tau (48), a pathological hallmark of AD that is induced by ADDLs (15).

The marked decrease in ADDL binding caused by insulin ostensibly could be a simple competitive interaction at the cell surface, which would be consistent with coimmunoprecipitation data (9, 41). However, this mechanism is not supported by the current experiments using AG1024, an inhibitor of IR PTK. When receptor activity is blocked, insulin no longer prevents ADDL binding. Furthermore, we note that addition of rosiglitazone markedly enhanced the ability of submaximal insulin to block ADDL binding (Fig. 3 *E–J*). These findings indicate that the mechanism of protection involves insulin signaling-dependent downregulation of ADDL binding sites from the neuronal surface. Future identification of proteins lost from the membrane in response to insulin could provide insight into the nature of the ADDL binding sites, which have yet to be determined.

It is intriguing that insulin and ADDLs have reciprocal effects on their neuronal binding sites. Insulin signaling downregulates ADDL binding, while ADDLs downregulate IRs. Given that insulin protects neurons against AD-causing neurotoxins, it follows that dysfunctional CNS insulin signaling would be an AD risk factor. In fact, brain insulin signaling declines with age (36), the primary risk factor for AD. An elevated risk for AD also exists in type 2 diabetes patients, who manifest deficient CNS insulin signaling. This deficiency is likely a consequence of decreased insulin uptake into the brain following sustained peripheral hyperinsulinemia (31). Experimentally induced diabetes moreover causes AD mice models to exhibit accelerated cognitive failure (32, 33). Significantly, the marked loss of IRs from synaptic plasma membranes seen in response to ADDLs (9) has been confirmed in neuropathology studies showing that IRs are lost from dendrites in AD brain (49).

Recent clinical trials indicate that insulin-sensitizing drugs such as rosiglitazone improve cognition and memory in both AD and type 2 diabetes patients (28, 43, 50, 51). The basis for the cognitive benefits of rosiglitazone has not been established, although reductions in inflammation and amyloid plaque burden have been hypothesized. However, rosiglitazone attenuates deficits in learning and memory in AD animal models without affecting amyloid deposition (29). A plausible mechanism of protection is provided by the current finding that rosiglitazone potentiates the ability of insulin to protect synapses against ADDLs. This effect is particularly salient given the relevance of synaptotoxic Aβ oligomers to AD memory impairment (7, 8). Overall, an appealing strategy to protect synaptic memory mechanisms would be to increase the inherent synaptic defense against ADDLs while, in tandem, reducing ADDL abundance. Improved insulin-signaling sensitizing drugs may serve the first function, while therapeutic antibodies may serve the latter, as suggested by promising results from recent clinical trials (25).

Materials and Methods

Materials. Synthetic Aβ_{1-42} peptide was from American Peptides (Sunnyvale, California). Scrambled Aβ_{1-42} peptide was from Anaspec (San Jose, California). Bovine and human insulin, 1,1,1,3,3,3,-hexafluoro-2-propanol (HFIP), DMSO, papain and poly-L-lysine were from Sigma (St. Louis, Missouri). Culture medium/reagents were from Invitrogen (Carlsbad, California). Precast electrophoresis gels, Alexa-labeled secondary antibodies, ProLong, Alexa 488-conjugated phalloidin, and DHE were from Invitrogen. Electrophoresis buffers were from BioRad (Hercules, California). SuperSignal chemiluminescence reagents, Sulfo-NHS-SS-biotin, neutravidin, and the BCA protein assay kit were from Pierce (Deerfield, Illinois). Streptavidin was from Fluka (Sigma, Buchs, Switzerland). Antibodies against the α subunit of insulin receptors (IRα), Na^+,K^+-ATPase and NR1 subunit of NMDA receptors were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California).

ADDL and Scrambled Aβ_{1-42} Preparation. These were prepared from Aβ_{1-42} or scrambled Aβ as previously described (1, 11) and detailed in *SI Methods*.

Mature Hippocampal Cultures. Primary hippocampal neuronal cultures were prepared according to established procedures (15, 16) and were used after 21 DIV. Cultures were treated at 37 °C for 3 h with 100 nM ADDLs or an equivalent volume of F12 vehicle. Insulin (100 nM or 1 μM) or rosiglitazone (10 μM), when present, were added 30 min before ADDLs. AG1024 (5 μM) was added to cultures 30 min before insulin.

Surface Biotinylation-Based Western Blot Assay. Surface proteins from neuronal cultures treated with vehicle or ADDLs were biotinylated and analyzed by Western immunoblotting as detailed in *SI Methods*.

Immunocytochemistry and Phalloidin Labeling. Cells were fixed and blocked as previously described (15), incubated with both ADDL-selective NU4 mouse monoclonal antibody (44; 1 μg/mL) and IR-α rabbit polyclonal antibody (1:500) overnight at 4 °C and then incubated for 3 h at 23 °C with Alexa-conjugated secondary antibodies. Spines were labeled with Alexa 488-conjugated phalloidin (which binds to spine-localized dense bundles of F-actin) for 20 min at 23 °C, according to manufacturer's instructions. Coverslips were mounted with Prolong and imaged on a Nikon Eclipse TE 2000-U microscope.

Oxidative Stress. Formation of reactive oxygen species (ROS) was evaluated in live neurons using dihydroethidium (DHE) as detailed in *SI Methods*.

Data Analysis. IR and ADDL binding immunofluorescence intensities were analyzed using NIH Image J as described in *SI Methods*.

ACKNOWLEDGMENTS. This work was supported by grants from the American Health Assistance Foundation, Alzheimer's Association, National Institutes of Health-National Institute on Aging Grants RO1-AG18877 and RO1-AG22547 (to W.L.K.); Howard Hughes Medical Institute (S.T.F.), Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnologico/Brazil (F.G.F. and S.T.F.) and Fundacao de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro/Brazil (F.G.F. and S.T.F.). F.G.F. is supported by Human Frontier Science Program.

1. Gong Y, *et al.* (2003) Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:10417–10422.
2. Mattson MP (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430:631–639.
3. Scheibel ME, Lindsay RD, Tomiyasu U, Scheibel AB (1975) Progressive dendritic changes in aging human cortex. *Exp Neurol* 47392–47403.
4. Terry RD, *et al.* (1991) Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 30:572–580.
5. Klein WL, Krafft GA, Finch CE (2001) Targeting small A beta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci* 24:219–224.
6. Selkoe DJ (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298:789–791.
7. Haass C, Selkoe DJ (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:101–112.
8. Ferreira ST, Vieira MN, De Felice FG (2007) Soluble protein oligomers as emerging toxins in Alzheimer's and other amyloid diseases. *IUBMB Life* 59:332–345.
9. Zhao WQ, *et al.* (2008) Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors. *FASEB J* 22:246–260.

10. Klein WL, Stine WB, Jr, Teplow DB (2004) Small assemblies of unmodified amyloid beta-protein are the proximate neurotoxin in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 25:569–580.
11. Lambert MP, *et al.* (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A beta1–42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6448–6453.
12. Lacor PN, *et al.* (2004) Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *J Neurosci* 24:10191–10200.
13. Walsh DM, *et al.* (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416:535–539.
14. Selkoe DJ (2008) Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav Brain Res* 192:106–113.
15. De Felice FG, *et al.* (2008) Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A beta oligomers. *Neurobiol Aging* 29:1334–1347.
16. De Felice FG, *et al.* (2007) A beta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *J Biol Chem* 282:11590–11601.
17. Roselli F, *et al.* (2005) Soluble beta-amyloid1–40 induces NMDA-dependent degradation of postsynaptic density-95 at glutamatergic synapses. *J Neurosci* 25:11061–11070.
18. Lacor PN, *et al.* (2007) A beta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 27:796–807.
19. Shankar GM, *et al.* (2007) Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci* 27:2866–2875.
20. Snyder EM, *et al.* (2005) Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci* 8:1051–1058.
21. Hsieh H, *et al.* (2006) AMPAR removal underlies A beta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron* 52:831–843.
22. Georganopoulou DG, *et al.* (2005) Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:2273–2276.
23. Lesné S, *et al.* (2006) A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 440:352–357.
24. Klyubin I, *et al.* (2005) Amyloid beta protein immunotherapy neutralizes A beta oligomers that disrupt synaptic plasticity in vivo. *Nat Med* 11:556–561.
25. Relkin NR, *et al.* (2008) 18-Month study of intravenous immunoglobulin for treatment of mild Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* [Epub ahead of print]
26. Zhao W, *et al.* (1999) Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. *J Biol Chem* 274:34893–34902.
27. Zhao WQ, Alkon DL (2001) Role of insulin and insulin receptor in learning and memory. *Mol Cell Endocrinol* 177:125–134.
28. Watson GS, *et al.* (2005) Preserved cognition in patients with early Alzheimer disease and amnestic mild cognitive impairment during treatment with rosiglitazone: a preliminary study. *Am J Geriatr Psychiatry* 13:950–958.
29. Pedersen WA, *et al.* (2006) Rosiglitazone attenuates learning and memory deficits in Tg2576 Alzheimer mice. *Exp Neurol* 199:265–273.
30. Reger MA, *et al.* (2008) Intranasal insulin improves cognition and modulates beta-amyloid in early AD. *Neurology* 70:440–448.
31. Craft S (2007) Insulin resistance and Alzheimer's disease pathogenesis: potential mechanisms and implications for treatment. *Curr Alzheimer Res* 4:147–152.
32. Ho L, *et al.* (2004) Diet-induced insulin resistance promotes amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J* 18:902–904.
33. Cao D, Lu H, Lewis TL, Li L (2007) Intake of sucrose-sweetened water induces insulin resistance and exacerbates memory deficits and amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 282:36275–36282.
34. Crump FT, Dillman KS, Craig AM (2001) cAMP-dependent protein kinase mediates activity-regulated synaptic targeting of NMDA receptors. *J Neurosci* 21:5079–5088.
35. Boyer C, Schikorski T, Stevens CF (1998) Comparison of hippocampal dendritic spines in culture and in brain. *J Neurosci* 18:5294–5300.
36. Cole GM, Frautschy SA (2007) The role of insulin and neurotrophic factor signaling in brain aging and Alzheimer's Disease. *Exp Gerontol* 42:10–21.
37. Clodfelder-Miller BJ, Zmijewska AA, Johnson GV, Jope RS (2006) Tau is hyperphosphorylated at multiple sites in mouse brain in vivo after streptozotocin-induced insulin deficiency. *Diabetes* 55:3320–3325.
38. Grünblatt E, Salkovic-Petrisic M, Osmanovic J, Riederer P, Hoyer S (2007) Brain insulin system dysfunction in streptozotocin intracerebroventricularly treated rats generates hyperphosphorylated tau protein. *J Neurochem* 101:757–770.
39. Chung HJ, Huang YH, Lau LF, Huganir RL (2004) Regulation of the NMDA receptor complex and trafficking by activity-dependent phosphorylation of the NR2B subunit PDZ ligand. i24:10248–10259.
40. Benedict C, *et al.* (2007b) Intranasal insulin improves memory in humans: superiority of insulin aspart. *Neuropsychopharmacology* 32:239–243.
41. Townsend M, Mehta T, Selkoe DJ (2007) Soluble A beta inhibits specific signal transduction cascades common to the insulin receptor pathway. *J Biol Chem* 282:33305–33312.
42. Lee CC, Kuo YM, Huang CC, Hsu KS (2007) Insulin rescues amyloid beta-induced impairment of hippocampal long-term potentiation. *Neurobiol Aging.* [Epub ahead of print]
43. Risner ME, *et al.* (2006) Efficacy of rosiglitazone in a genetically defined population with mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Pharmacogenomics J* 6:246–254.
44. Lambert MP, *et al.* (2007) Monoclonal antibodies that target pathological assemblies of A beta. *J Neurochem* 100:23–35.
45. Skeberdis VA, Lan J, Zheng X, Zukin RS, Bennett MV (2001) Insulin promotes rapid delivery of N-methyl-D- aspartate receptors to the cell surface by exocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:3561–3566.
46. Huang CC, You JL, Lee CC, Hsu KS (2003) Insulin induces a novel form of postsynaptic mossy fiber long-term depression in the hippocampus. *Mol Cell Neurosci* 24:831–841.
47. Gispen WH, Biessels GJ (2000) Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci* 23:542–549.
48. Spillantini MG, Goedert M (2008) Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 21:428–433.
49. Moloney AM, *et al.* (2008) Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signalling. *Neurobiol Aging.* [Epub ahead of print]
50. Landreth G (2007) Therapeutic use of agonists of the nuclear receptor PPARgamma in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 4:159–164.
51. Ryan CM, *et al.* (2006) Improving metabolic control leads to better working memory in adults with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 29:345–351.

Supporting Information

De Felice *et al.* 10.1073/pnas.0809158106

SI Text

ADDL and Scrambled Aβ_{1-42} Preparation. ADDLs were prepared from Aβ_{1-42} as previously described (1, 2). Briefly, the peptide was dissolved in HFIP to 1 mM and stored as a dried film at −80 °C after solvent evaporation. The film was resuspended in DMSO to a final concentration of 5 mM, thoroughly vortexed and sonicated for 10 min. The solution was then diluted with ice-cold phenol red-free Ham's F12 medium to 100 μM and left at 4 °C overnight. The solution was centrifuged at 14,000 × *g* for 10 min and the supernatant was collected. Solutions of the scrambled peptide were prepared and treated under conditions identical to those used to obtain ADDLs.

Surface Biotinylation-Based Western Blot Assay. Neuronal cultures treated with vehicle or ADDLs were washed with ice-cold PBS and incubated for 15 min at 4 °C in 1.5 mg/mL of the cell-impermeant sulfo-NHS-SS-biotin reagent. Unreacted biotinylation reagent was quenched and removed by washes with ice-cold TBS. Cultures were harvested with 1% Triton X-100, 0.1% SDS in PBS + a protease inhibitor mixture. Lysates were incubated on ice for 30 min with 5-sec vortexing every 5 min and centrifuged at 10,000 × *g* for 5 min at 4 °C. Protein concentration in the supernatant was determined by the BCA assay. Fifty micrograms of protein (from soluble lysates) were mixed with 50 μL of agarose-immobilized streptavidin or neutravidin at 23 °C under agitation for 1 h. Samples were centrifuged at 5,000 × *g* for 2 min and the supernatants containing the nonbiotinylated (nonsurface) proteins were collected. Pellets containing streptavidin- or neutravidin-conjugated beads were washed with lysis buffer and biotinylated (surface) proteins were eluted from the beads with Laemli sample buffer + 50 mM DTT or 2% β-mercaptoethanol for 30 min at 23 °C. Surface, nonsurface, and total proteins were analyzed by Western blot using anti-IRα or anti-Na^+,K^+-ATPase antibodies. In a parallel set of experiments, total biotinylated surface proteins from control or ADDL-treated cultures were determined by dot immunoblots probed with HRP-conjugated streptavidin.

Oxidative Stress. Formation of reactive oxygen species (ROS) was evaluated in live neurons using dihydroethidium (DHE), a fluorescent probe sensitive to superoxide anion formation. Cultures were incubated in neurobasal medium without phenol red for 4 h at 37 °C with vehicle, ADDLs, or insulin + ADDLs and were immediately imaged. DHE fluorescence was analyzed using National Institutes of Health (NIH) Image J software (3) as previously described (4). Sixteen images were analyzed in each experimental condition (carried out in quadruplicate from 2 independent experiments) and were combined to allow quantitative estimates of changes in neuronal ROS levels.

Data Analysis. IR and ADDL binding immunofluorescence intensities were analyzed in 3–6 experiments (see figure legends) using independent neuronal cultures. Twenty to 30 images were acquired in each experimental condition per experiment. Histogram analysis of fluorescence intensities at each pixel across the images was performed using NIH Image J (3) as described (4). Cell bodies were digitally removed from the images so that only ADDL or IR immunostaining on dendritic processes was quantified.

1. Gong Y, *et al.* (2003) Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:10417–10422.
2. Lambert MP, *et al.* (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A beta1–42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6448–6453.
3. Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ (2004) Image processing with Image J. *Biophoton Int* 11:36–42.
4. De Felice FG, *et al.* (2007) A beta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *J Biol Chem* 282:11590–11601.

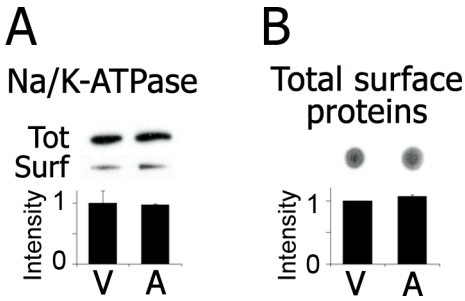


Fig. S1. Levels of surface-exposed membrane proteins in ADDL-treated neurons. (*Left*) Surface abundance of Na^+/K^+-ATPase in hippocampal neurons exposed to vehicle (V) or 100 nM ADDLs (A) for 3 h, assessed by surface biotinylation (see *Methods*) followed by probing with anti-Na/K-ATPase antibody. Total and surface-exposed Na^+/K^+-ATPase levels were determined by densitometry using NIH Image J. (*Right*) Overall abundance of surface-exposed proteins in hippocampal neurons exposed to vehicle (V) or 100 nM ADDLs (A) for 3 h, assessed by surface biotinylation (see *Methods*) followed by probing using HRP-conjugated streptavidin. Intensities were determined by densitometric analysis of dot blots.

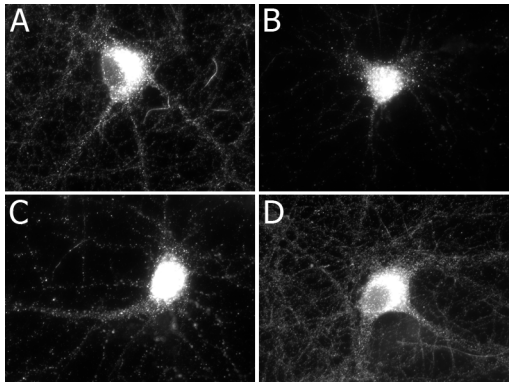


Fig. S2. CK2 and CaMKII mediate ADDL-induced loss of insulin and NMDA receptors. (*A–D*) Representative images of IRα labeling in hippocampal neurons treated for 3 h with vehicle (*A*), 100 nM ADDLs (*B*), 100 nM ADDLs + 5 μM KN93 (*C*), or 100 nM ADDLs + 10 μM DMAT (*D*).

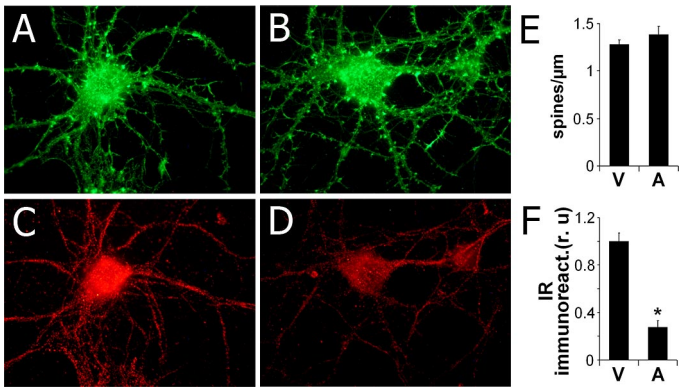


Fig. S3. Lack of overall impact on synapses by short-term exposure to ADDLs. (*A* and *B*) Representative images from hippocampal neurons treated with vehicle (*A*) or 100 nM ADDLs (*B*) for 3 h. Spines were labeled using phalloidin (green) in tandem with the IR antibody (red). (*C* and *D*) IRα labeling in the same neurons as in *A* and *B*, respectively. (*E* and *F*) Quantitation of spine numbers per unit dendrite length (*E*) and integrated IRα immunofluorescence intensities (*F*). Asterisk indicates statistically significant (*, $P < 0.001$) difference relative to vehicle-treated cultures. Note that short-term exposure to ADDLs eliminates dendritic insulin receptors in the absence of spine loss.

VIII. 4) ***Curriculum Vitae***

HELENA DECKER

CURRICULUM VITAE – Junho 2010

DADOS PESSOAIS

Nome Helena Decker
Nascimento 07/02/1981 - Jaraguá do Sul/SC - Brasil
CPF 00701804904
E-mail decker@bioqmed.ufrj.br

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Instituto de Bioquímica Médica
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Rio de Janeiro - RJ - Brazil
CEP: 21941-590
Telefone: +55 21 3888-8308
FAX: +55 21 2270-8647
http://www.bioqmed.ufrj.br/ldn

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2006 Doutorado em Ciências Morfológicas.
Título: Disfunção Sináptica e Comprometimento do Transporte Axonal induzidos por Oligômeros do Peptídeo β-amilóide.
Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio De Janeiro, Brasil
Orientador: Sérgio T Ferreira
&
Departamento de Ciências Biológicas
Simon Fraser University - Canada
Co-orientador: Dr. Michael A. Silverman
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2004 - 2006 Mestrado em Neurociências.
Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, Brasil
Título: O Efeito Trófico dos Derivados da Guanina em Culturas de Astrócitos e Neurônios Cerebelares, Ano de obtenção: 2006
Orientador: Carla Inês Tasca
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2003 - 2005 Graduação em Farmácia Análises Clínicas.

Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, Brasil
Título: A Importância da Avaliação dos Autoanticorpos Antiantígenos Citoplasmáticos de Neutrófilos no diagnóstico de Vasculite Sistêmica
Orientador: Raquel Maria Teixeira

2000 - 2003 Graduação em Farmácia.
Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, Brasil
Título: Métodos de Prevenção da Transmissão Vertical do HIV
Orientadora: Daniela De Marco

EXPERIÊNCIA PROFESSIONAL

Fevereiro 2009 - Novembro 2009	Orientadora da aluna de iniciação científica: Sandra M. Unger Simon Fraser University – Vancouver – Canadá
Júlio 2007 – Março 2008	Orientadora da aluna de iniciação científica: Theresa R. Bomfim Universidade Federal do Rio de Janeiro – Brasil
Março 2006 – Junho 2006	Professora de farmacologia do curso técnico de Enfermagem Escola Saúde & Vida – Florianópolis – Brasil.
Março 2005 – Júlio 2005	Estágio de docência – Mestrado Disciplina Bioquímica Básica (BMM 5116) Universidade Federal de Santa Catarina - Brasil
Março 2005 – Março 2006	Orientadora da aluna de iniciação científica: Tharine Dal-Cin Universidade Federal de Santa Catarina - Brasil
Março 2004 – Dezembro 2004	Orientadora da aluna de iniciação científica: Carla Cremonez Universidade Federal de Santa Catarina - Brasil
Agosto 2001 – Março 2004	Iniciação Científica Orientação: Dr. Carla I. Tasca Universidade Federal de Santa Catarina - Brasil

PUBLICAÇÕES

ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS:

Aβ oligomers disrupt axonal transport through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is mediated by glycogen synthase kinase 3β in primary cultured hippocampal neurons. **Decker H**, Lo K.Y., Unger S.M., Ferreira S.T., Silverman M.A. The Journal of Neuroscience. *No prelo.*

Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: Insulin signaling prevents the pathogenic binding of Aβ oligomers. De Felice, F.G., Vieira, M.N.N., Bonfim, T.R., **Decker, H.,** Viola, K., Velasco, P., Zhao, W.- Q., Lambert, M., Ferreira, S.T., Klein, W.L. (2009) Proc. Natl. Acad. Science USA 106:1971-1976.

Impaired astrocytic extracellular matrix distribution under congenital hypothyroidism affects neuronal development in vitro. Mendes-de-Aguiar, C.B.N., Alchini, R., Zucco, J.K., Costa-Silva, B., **Decker, H.,** Alvarez-Silva, M., Tasca, C.I., Trentin, A.G. (2010) J. Neurosci. Res. *No prelo.*

Biochemical alterations in caged Nile tilapia Oreochromis niloticus. Franco, J.L., Trevisan, R., Posser, T., Trivella, D.B., Hoppe, R., Martins Rosa, J., Fernandes Dinslaken D., **Decker, H.,** Tasca, I.C., Bainy Leal, R., Freire Marques, M.R., Dias Bainy, A.C., Luiz Dafre, A. Ecotoxicol Environ Saf. (2010) Mar 24. [Epub ahead of print].

GMP prevents excitotoxicity mediated by NMDA receptor activation but not by reversal activity of glutamate transporters in rat hippocampal slices. Molz, S., Dal-Cim, T., **Decker, H**., Tasca, C.I. (2008) Brain Res. 1231:113-20.

Thyroid hormone increases astrocytic glutamate uptake and protects astrocytes and neurons against glutamate toxicity. Mendes-de-Aguiar, C.B., Alchini, R., **Decker, H**., Alvarez-Silva, M., Tasca, C.I., Trentin, A.G. (2008) J. Neurosci. Res. 86:3117-3125.

Glutamate-induced toxicity in hippocampal slices involves apoptotic features and P_{38}MAPK signalling. Molz, S., **Decker, H**., Dal-Cim, T., Cremonez, C., Cordova, F.M., Leal, R.B., Tasca, C.I. (2008) Neurochem. Res. 33:27-36.

Guanine derivatives modulate extracellular matrix proteins organization and improve neuron-astrocyte co-culture. **Decker, H**., Francisco, S.S., Mendes-de-Aguiar, C.B., Romão, L.F., Boeck, C.R., Trentin, A.G., Moura-Neto, V., Tasca, C.I. (2007) J. Neurosci. Res. 85:1943-1951.

Antineutrophil cytoplasmic antibodies. Silva, B.C., **Decker, H**., Andrigueti, M., Volpato, M.T.S., Teixeira, R.M. (2007) Revista Brasileira de Análises Clínicas 39:201-203.

Neurotoxicity induced by glutamate in glucose-deprived rat hippocampal slices is prevented by GMP. Molz, S. **Decker, H**, Oliveira, I.J.L., Souza, D.O., Tasca, C.I. (2005) Neurochem. Res. 30:83-89.

ARTIGOS COMPLETOS SUBMETIDOS EM PERIÓDICOS:

N-methyl-D-aspartate receptors are required for synaptic targeting of Alzheimer's toxic Aβ oligomers. **Decker H.,** Adrover M.F., Brito-Moreira, J., Bomfim, T.R., Klein, W.L., Epstein, A.L., De Felice, F.G., Jerusalinsky, D., Ferreira, S.T. *manuscrito submetido.*

Alzheimer's toxic Aβ oligomers trigger brain insulin resistance by mechanisms common to type 2 diabetes: Protection by exendin-4 and infliximab. Bomfim, T.R., **Decker**, H., Brito-Moreira, J., Kazi, H., Arnold, S.E., Silverman, M.A., Talbot, K., Klein, W.L., Ferreira S.T, and De Felice F.G. *manuscrito submetido.*

TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS (RESUMO):

Disruption of axonal transport by Aβ oligomers in cultured hippocampal neurons. **Decker H**, Lo K, Unger SM, Ferreira ST, Silverman MA. 39th Annual Meeting of the Society for Neuroscience - SfN - 17-21 October - Chicago/ USA 2009. *Apresentação oral na forma de nanosimpósio.*

Synaptic targeting by Aβ oligomers requires the presence of N-methyl-D-aspartate receptors. **Decker H.,** Adrover M.F., Brito-Moreira, J., Bomfim, T.R., Klein, W.L., Epstein, A.L., De Felice, F.G., Jerusalinsky, D., Ferreira, S.T. 3rd Annual Canadian Neuroscience Meeting – Vancouver/Canada 2009. *Poster presentation.*

Evaluation of the mechanisms involved on the increase of cerebelar neurons in culture induced by guanosine or GMP. **Decker, H**., Mendes de Aguiar, C.B.N., Romão, L.F., Boeck, C.R., Moura-Neto, V., Tasca, C.I. XXI Biennal Meeting International Society for Neurochemistry - ISN - Cancun/Mexico 2007. Abstract published in supplement to J. Neurochem. (2007) 102:272. *Poster presentation.*

NMDA- Preconditioning protects mice hippocampal against necrotic cellular death induced by quinolinic acid. Boeck, C.R., Ganzella, M., **Decker, H**., Vendite, D., Leal, R.B., Tasca, C.I. XX Biennal Meeting International Society for Neurochemistry - ISN - Innsbruck/Austria 2005. Abstract published in supplement to J. Neurochem. (2005) 94:48.

NMDA- and Glutamate- induced neurotoxicity in hippocampal slices are differentially modulated by GMP. Tasca, C.I., Molz, S., **Decker, H**., Cremonez, C., Dal-Cim, T.A. XX Biennal Meeting International Society for Neurochemistry - ISN - Innsbruck/Austria 2005. Abstract published in supplement to J. Neurochem. (2005) 94:53.

Trophic effects of GMP and guanosine on cerebellar neuron-astrocyte coculture. Tasca, C.I., Francisco, S.R., Romão, L.F., **Decker, H**., Moura-Neto, V. XXXV Annual Meeting of the American Society for Neurochemistry - ASN - New York City/USA 2004. Abstract published in supplement to J. Neurochem. (2004) 90:75.

ERK-2 and P_{38}MAPK Pathways are involved on Glutamate-induced cell damage in hippocampal slices. Tasca, C.I., **Decker, H**., Molz, S., Cremonez, C., Cordova, F.M., Leal, R.B. XXXV Annual Meeting of the American Society for Neurochemistry - ASN - New York City/USA 2004. Abstract published in supplement to J. Neurochem. (2004) 90:15.

Mechanisms involved on the increase of granular cerebellar neurons in culture induced by guanosine or GMP. **Decker, H.**, Mendes de Aguiar, C.B.N., Romão, L.F., Boeck, C.R., Moura-Neto, V., Tasca, C.I. XIII International Summer School in Behavioral Neurogenetics – Florianópolis/Brazil, 2006. *Poster and oral presentation.*

Thyroid hormone (T3) increases glutamate uptake in cerebellar astrocytes, and neuroprotection in astrocyte/neuron cocultures. Mendes de Aguiar, C.B.N., Alchini, R., **Decker, H.**, Trentin, A.G., Tasca, C.I. Advances in the Diagnosis and Treatment of Brain Diseases - Porto Alegre/Brazil, 2006.

NMDA preconditionig protects mice hippocampal against necrotic cellular death induced by quinolinic acid. Boeck, C.R., Ganzella, M., **Decker, H.**, Leal, R.B., Vendite, D., Tasca, C.I. Advances in the Diagnosis and Treatment of Brain Diseases - Porto Alegre/Brazil, 2006.

Guanine derivatives modulate extracelullar matrix proteins organization in cerebellar astrocytes. **Decker, H.**, Mendes de Aguiar, C.B.N., Romão, L.F., Dal-Cin, T.A., Moura-Neto, V., Tasca, C.I. **IV** Internacional Symposium on Extracellular Matrix - SBBC SIMEC - Búzios/Brazil, 2006.
Poster presentation.

ERK-2 and P_{38}MAPK pathways are involved on glutamate-induced cell damage in hippocampal slices. **Decker, H.**, Molz, S., Leal, R.B., Tasca, C.I. II International Congress on Neuroregeneration - Rio de Janeiro/Brazil, 2004. *Poster presentation.*

PRÊMIOS

2009 Trabalho selecionado para apresentação oral na forma de Nanosimpósio no '39th Annual Meeting of the Society for Neuroscience - SfN' - 17-21 October - Chicago/ USA 2009.

2008 Bolsa de doutorado CAPES PDEE para realização de 1 ano de doutorado na Simon Fraser University – Vancouver, Canadá.

2007 'Travel Award' para participar da 'XXI Biennal Meeting International Society for Neurochemistry – ISN' realizado em Cancun, México, 2007.

2006 Primeira colocação na seleção de doutorado do Programa de Ciências Morfológicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Brasil.

Bolsa de doutorado da CAPES para realizar 4 anos de doutorado na Universidade Federal do Rio de Janeiro – Brasil.

Aluna selecionada para participar do 'XIII International Summer School in Behavioral Neurogenetics' – 20 dias - Florianópolis - Brasil, 2006.

REFERÊNCIAS

Dr. Sérgio T. Ferreira
Federal University of Rio de Janeiro
Institute of Medical Biochemistry – CCS
Bl. H, 2º andar, sala 19
Rio de Janeiro - RJ – Brazil CEP: 21941-590
Phone: +55 21 3888-8308
FAX: +55 21 2270-8647
e-mail: ferreira@bioqmed.ufrj.br
web site: http://www.bioqmed.ufrj.br/ldn

Dr. Carla I. Tasca
Federal University of Santa Catarina
Dept. of Biochemistry – CCB
CEP: 88040-900
Florianopolis - SC - Brazil
Phone: +55 48 3721-5046
FAX: +55 48 3721-9672
e-mail: tasca@ccb.ufsc.br

Dr. Michael A. Silverman
Department of Biological Sciences
Simon Fraser University
Burnaby, British Columbia, V5A 1S6 Canada
Phone: 778-782-3647
FAX: 778-782-3496
e-mail: masilver@sfu.ca
web site: http://www.silvermanlab.org

Dr. Vivaldo Moura-Neto
Federal University of Rio de Janeiro
Institute of Biomedical Sciences - CCS
CEP: 21941-590 Rio de Janeiro - RJ - Brazil
Phone: +55 21 2562-6465
FAX: +55 21 2290-0587
e-mail: vivaldo@anato.ufrj.br

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo