

Departamento de Medicina / Universitat Autònoma de Barcelona.

Autora: Isabel Barroeta Espar.

GSK-3 como posible diana terapéutica en la Enfermedad de Alzheimer:

Un nuevo inhibidor de GSK-3 aumenta la densidad y rescata la pérdida de espinas dendríticas causada por A β en neuronas corticales primarias.

Director: Dr. Josep Maria Grau Veciana.

Director de Docencia del H. de Sant Pau.

Adjunto del Servicio de Neurología del H. Sant Pau.

Catedrático de la UAB.

Codirectora: Dra. Teresa Gómez- Isla.

Directora de la Unidad de Memoria del H. de Sant Pau.

Adjunta del Servicio de Neurología del H. de Sant Pau.

Trabajo de Investigación.

Convocatoria Suficiencia Investigadora: Septiembre 2010 .

Indice

Resumen.....	p.3
Resum.....	p.4
Introducción.....	p.5
Materiales y Métodos.....	p.7
Resultados.....	p.10
Discusión.....	p.13
Conclusión.....	p.14
Referencias Bibliográficas.....	p.15

GSK-3 como posible diana terapéutica en la Enfermedad de Alzheimer:

Un nuevo inhibidor de GSK-3 aumenta la densidad y rescata la pérdida de espinas dendríticas causada por A β en neuronas corticales primarias.

Resumen

La Enfermedad de Alzheimer(EA) es el tipo de demencia más frecuente en la edad avanzada. Entre los marcadores patológicos de la EA destacan: el depósito del péptido β amiloide(A β), los ovollos neurofibrilares , la muerte neuronal y la pérdida de sinapsis. La patología sináptica, incluyendo la pérdida de espinas parece ser especialmente temprana en el curso de la enfermedad y contribuir directamente al deterioro cognitivo. Por otra parte, un nuevo inhibidor del glicógeno-sintetasa-kinasa-3(GSK-3) de tipo tiadiazolidona(TDZD) demostró recientemente incrementar la supervivencia neuronal y prevenir el déficit de memoria en un ratón doble transgénico para APP y tau, sugiriendo que GSK-3 es una diana terapéutica relevante en la EA. Nuestra hipótesis es que los efectos beneficiosos de los compuestos tipo TDZD en la cognición podrían estar mediados por la prevención de la pérdida de espinas dendríticas asociada a la exposición a A β , y en especial a las formas solubles oligoméricas de A β (A β o). En el presente trabajo, estudiamos el efecto de A β o y de TDZD-8 en la densidad de espinas dendríticas en neuronas primarias corticales de ratón. Encontramos que el TDZD-8 rescata la pérdida de espinas dendríticas mediada por la exposición a A β o. Por tanto la inhibición de GSK-3 revierte el efecto sinapto-tóxico de A β o. Estos hallazgos sugieren que los efectos beneficiosos de los compuestos tipo TDZD sobre la cognición podrían estar mediados por la prevención de la pérdida de espinas A β o-dependiente. Nuestros resultados aportan una evidencia más de que GSK-3 podría ser una diana de interés en el tratamiento de la EA.

Palabras Clave:

Enfermedad de Alzheimer

Tau

Amiloide

Muerte neuronal

Espinás dendríticas

GSK-3

Resum

La Malaltia d'Alzheimer (EA) és el tipus de demència més freqüent en l'edat avançada. Entre els marcadors patològics de la MA destaquen: el dipòsit del péptido β amiloide (A β), els cabdells neurofibrilars, la mort neuronal i la pèrdua de sinapsis. La patologia sinàptica, incloent la pèrdua d'espines sembla ser especialment primerenca en el curs de la malaltia i contribuir directament al deteriorament cognitivo. D'altra banda, un nou inhibidor de l'glicogen-sintetasa-cinasa-3 (GSK-3) de tipus tiadiazolidona (TDZD) va demostrar recentment incrementar la supervivència neuronal i prevenir el dèficit de memòria en un ratolí doble transgènic per APP i tau, suggerint que GSK-3 és una diana terapèutica rellevant en la MA. La nostra hipòtesi és que els efectes beneficiosos dels compostos tipus TDZD en la cognició podrien estar mediats per la prevenció de la pèrdua d'espines dendrítiques associada a l'exposició a A β , i en especial a les formes solubles oligòmers de A β (A β o). En aquest treball, estudiem l'efecte de A β o i de TDZD-8 en la densitat d'espines dendrítiques en neurones primàries corticals de ratolí. Trobem que el TDZD-8 rescata la pèrdua d'espines dendrítiques mediada per l'exposició a A β o. Per tant la inhibició de GSK-3 reverteix l'efecte sinàptic-tòxic de A β o. Aquestes troballes suggereixen que els efectes beneficiosos dels compostos tipus TDZD sobre la cognició podrien estar mediats per la prevenció de la pèrdua d'espines A β o-dependent. Els nostres resultats aporten una evidència més de que GSK-3 podria ser una diana de gran interès en el tractament de la EA.

Paraules Clau:

Malaltia de Alzheimer

Tau

Amiloide

Mort neuronal

Espinas dendríticas

GSK-3

Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) fue descrita por vez primera en 1907 por el psiquiatra y neuropatólogo alemán Alois Alzheimer quien reportó el caso aislado de una mujer de 51 años que presentaba progresivamente delirio con ideas de perjuicio, alteración de la memoria y afasia (Alzheimer, 1907). Esta enfermedad es el tipo de demencia más frecuente en la edad avanzada, actualmente afecta a más de 600.000 personas en nuestro país y llegará a duplicarse en los próximos 20 años. La enfermedad de Alzheimer no tiene cura y conduce inexorablemente a la muerte en un plazo medio de 5 a 10 años. En consecuencia resulta prioritario delimitar nuevas dianas terapéuticas.

Los principales marcadores patológicos de la enfermedad de Alzheimer que afectan de forma selectiva a determinadas regiones son: el depósito del péptido β amiloide (A β), los ovillos neurofibrilares, la muerte neuronal y la pérdida de sinapsis. La pérdida de sinapsis resulta particularmente relevante por su alta correlación con el grado de deterioro cognitivo. (Terry et al., 1991; DeKosky et al., 1996; Coleman and Yao, 2003; Spires and Hyman, 2004). Sin embargo la causa de la pérdida de sinapsis se desconoce, podría ser secundaria a la pérdida neuronal (Gomez-Isla et al., 1996), a los ovillos neurofibrilares (Ingelsson et al., 2004), o al depósito de amiloide (Walsh et al., 2002).

El número y la densidad de espinas dendríticas permanece estable durante el envejecimiento, por el contrario en los ratones APP transgénicos existe una marcada disminución en el número total de espinas dendríticas (Lanz et al., 2003). Este hecho tiene relevancia porque las espinas dendríticas conforman el elemento post-sináptico de la gran mayoría de las sinapsis corticales, es allí donde asienta la plasticidad sináptica y donde subyacen el aprendizaje y la memoria (Segal, 2002).

La hipótesis del amiloide sostiene que la alteración en su procesamiento de proteína precursora de amiloide (APP) conduce al acúmulo anormal del péptido β -amiloide (A β) y en última instancia a la pérdida de función neuronal y a su muerte (Hardy and Selkoe,

2002). La pérdida de espinas dendríticas parece estar relacionada con la patología amiloide y contribuir de forma directa con el deterioro cognitivo de la enfermedad de Alzheimer (Spires et. al., 2007). Se ha asumido durante mucho tiempo que el A β tiene que agregarse en las clásicas placas seniles para ejercer sus efectos neurotóxicos, si bien esta hipótesis no ha podido ser probada hasta el momento. Más recientemente se ha propuesto una hipótesis alternativa o complementaria, que sugiere que formas solubles de A β , A β oligoméricas (A β o) podrían ser las responsables directas de la sinapto-toxicidad en la EA (Selkoe et al., 2008). Pese a todo se desconoce la cascada causal que englobaría el procesamiento aberrante de la proteína precursora de amiloide, la patología tau y la pérdida de neuronas y sinapsis. Por tanto resultarían útiles los tratamientos capaces de actuar sobre la patología amiloide y tau.

En dicho contexto, los inhibidores del enzima GSK-3 se presentan como atractivas estrategias terapéuticas en la Enfermedad de Alzheimer. La glicógeno sintetasa kinasa- 3 (GSK-3) es un enzima clave en la hiperfosforilación de tau lo cual conllevaría a formación de los ovillos neurofibrilares (Kosik, 1992; Lucas et al., 2001), está implicada en el procesamiento del amiloide (Phiel et al., 2003), en la apoptosis (Bhat et al., 2000; Hetman et al., 2000; Lucas et al., 2001; Beurel and Jope, 2006) y en el aprendizaje y la memoria (Hernandez et al., 2002). Por otra parte un nuevo compuesto del tipo tiadiazolidiona (TDZD) conocido por ser un inhibidor de GSK-3 demostró recientemente incrementar la sobrevida neuronal y prevenir el déficit de memoria en un ratón doble transgénico que coexpresa las mutaciones humanas para APP y tau, sugiriendo que la GSK-3 es una diana terapéutica relevante en la Enfermedad de Alzheimer (Serenó et al., 2009).

Nuestra hipótesis es que los efectos beneficiosos de los compuestos tipo TDZD en la cognición podrían estar mediados por la prevención de la pérdida de espinas dendríticas asociada a A β . Para probarlo nuestro objetivo fue estudiar el efecto nocivo de A β en la densidad de espinas dendríticas y el efecto protector de un inhibidor de la GSK3, en concreto el TDZD-8, en neuronas primarias corticales de ratón.

Materiales y métodos

Realizamos el cultivo de neuronas primarias corticales de ratón, el tratamiento de las células con TDZD / A β , la toma de imágenes, el análisis de las espinas dendríticas y su correspondiente análisis estadístico tal y como se esquematiza en la **Figura 1**.

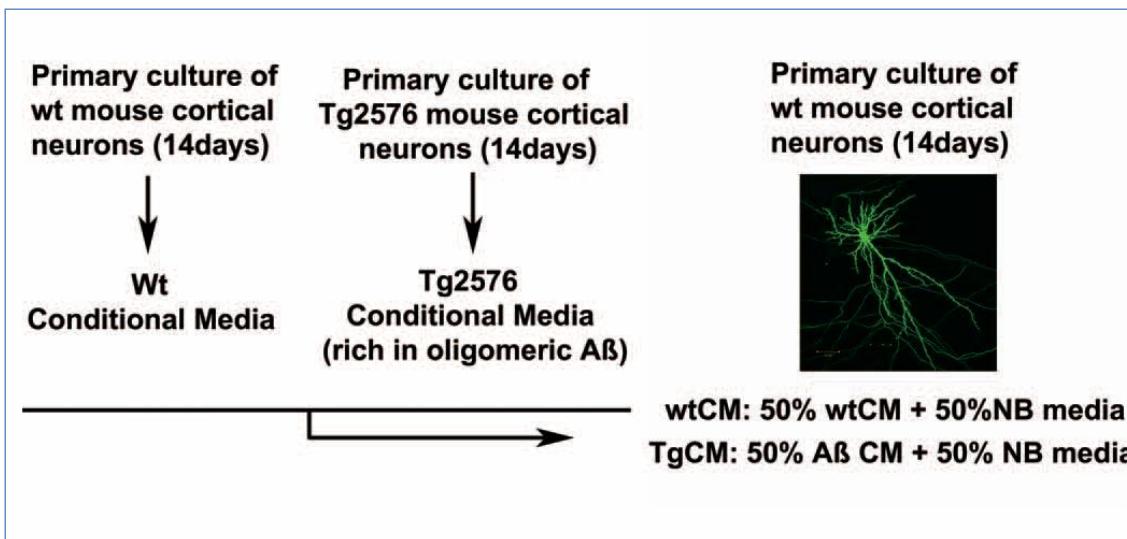


Figura 1. Representación esquemática de los métodos.

Cultivo de neuronas primarias y transfección.

El córtex procedente de embriones de ratón de 15 días de edad fue disecado, tratado durante 30 minutos con papaína (10 unidades / mL) e incubado durante 15 minutos con tripsina (10 μ g/ mL). Una vez trituradas, las neuronas extraídas fueron sembradas en platos de 35 mm previamente cubiertos por poly-D-lisina a una concentración de 8×10^5 células/ cm 2 y mantenidas en medio Neurobasal suplementado con FBS al 10 %, Pen/ Strept al 1% y l-glutamina al 1%. Al cabo de dos horas las células se transfirieron a medio Neurobasal suplementado con B27 al 2%, l-glutamina al 0.8 % y

Pen/ Strept al 1%. Las neuronas fueron de forma rutinaria transfectadas el día 7 después del cultivo y utilizadas para los experimentos 7-10 días después de la transfección. Las células se mantuvieron en un incubador humidificado con 5 % de CO₂ a 37 °C. Las neuronas fueron transfectadas con 4 µg del constructo pAAV_CMV_GFP junto con 3 µg de lipofectamina 2000.

Tratamiento con TDZD y amiloide.

Después de 14-17 días en cultivo las neuronas fueron incubadas con “wild type condition media” (wtCM) con un ratio de 1:1 al medio original de Neurobasal suplementado para obtener controles.

El tratamiento con A_β consistió en añadir medio condicionado Tg2576 (TgCM) con un ratio de 1:1 al medio original de Neurobasal suplementado , el TgCM fue obtenido el día 14 a partir de cultivos de neuronas corticales Tg2576.

Comprobamos que el medio condicionado obtenido a partir de neuronas Tg2576 (TgCM) contenía mayoritariamente especies de A_β en una proporción similar a la de los cerebros humanos con EA (**Figura 2**).

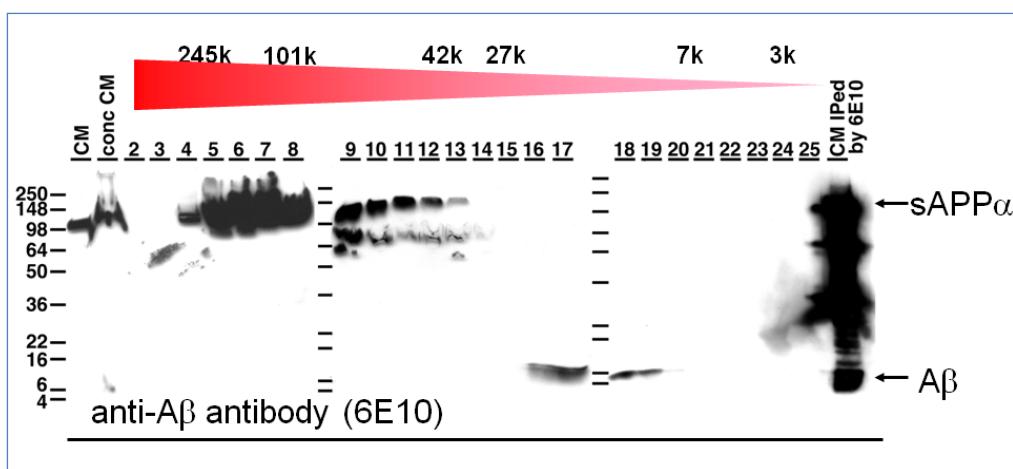
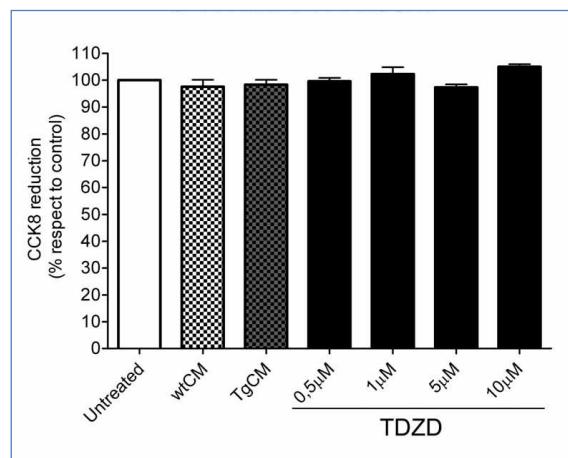


Figura 2. Western blot utilizando 6E10, las especies de A_β se observan en las fracciones 16-19. En la extracción de córtex con EA , se observó A_β en las fracciones 17-20. Esta alta correlación sugiere que el TgCM refleja de forma marcada la condición de los cerebros humanos con EA.

El tratamiento con TDZD-8 consistió en la adición de 1 μM de TDZD-8 (4-Benzyl-2-metil-1,2,4-tiadiazolidina-3,5-diona). Por último el tratamiento con A β / TDZD-8 se hizo añadiendo TDZD-8 30 minutos antes del tratamiento con A β . Todas las condiciones fueron incubadas a 37°C durante 24 horas. Se realizó estudio de toxicidad y de viabilidad celular CCK-8 (Cell Counting Kit) para el ajuste de las concentraciones de A β y TDZD-8 (Figura 3).

Figura 3. Estudio de viabilidad celular. Se incubaron 104 células por pocillo con wtCM más 0-10 μM TDZD-8 (Tratamiento TDZD) o tgCM (Tratamiento A β). Se utilizaron células sin tratamiento con wtCM como control del medio condicionado. n=4. Los valores son medias \pm DE. *p<0.05.



Imágenes y análisis de las espinas dendríticas.

Para determinar la densidad de las espinas dendríticas se tomaron imágenes de alta resolución utilizando el sistema de microscopía confocal Zeiss LSM510. El análisis de las espinas dendríticas se hizo utilizando el programa informático NeuronStudio tal y como se ilustra en la Figura 4.

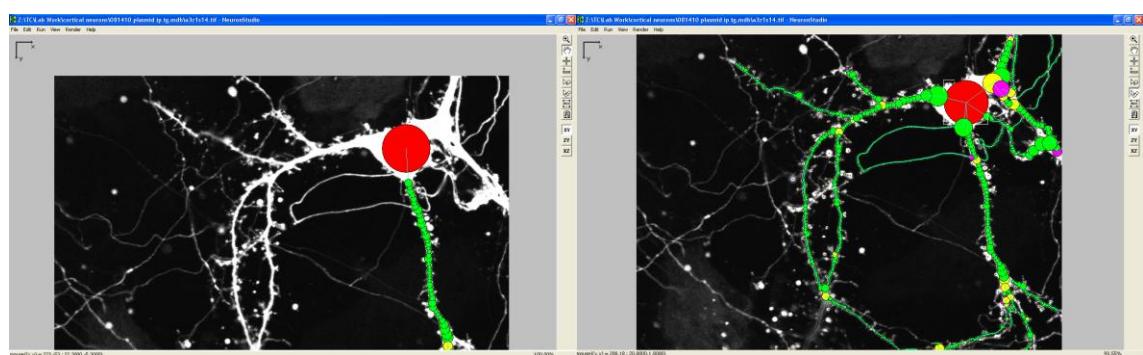


Figura 4. La longitud de dendritas se midió trazando su extensión al seleccionar una línea. Las espinas dendríticas fueron contadas manualmente utilizando la función de selección del programa y la complejidad del árbol dendrítico fue cuantificada al trazar las ramas. La densidad de espinas fue definido como el número de espinas por micrómetros de longitud de espinas.

Análisis estadístico.

El t-test de dos colas y el test de ANOVA seguidos del test post-hoc Bonferroni se utilizaron para el análisis estadístico. Una $P<0.05$ se consideró estadísticamente significativa.

Resultados

A β reduce la densidad de espinas dendríticas en las neuronas primarias corticales de ratón.

El grupo de neuronas expuestas a A β presentó una densidad de espinas dendríticas reducido en comparación con los controles, siendo la diferencia estadísticamente significativa $p<0.05$. (**Figura 5**).

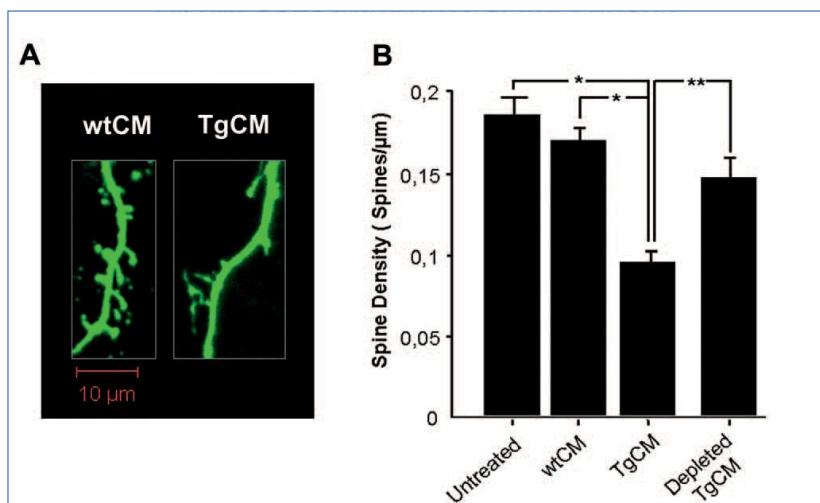


Figura 5. A β reduce la densidad de espinas dendríticas en las neuronas primarias corticales de ratón. Las neuronas primarias corticales de ratón transfectadas con GFP y cultivadas por 14-17 días, fueron incubadas con wtCM, TgCM y depletadas de TgCM durante 24 horas. (A) Imagen que muestra el efecto de wtCM o TgCM en la densidad de las espinas dendríticas. Barra escala 10 μ m. (B) Densidad de espinas definida como el número de espinas por micrómetro de longitud de espina. n=5-17. Los valores son medias \pm DE. * $p < 0.05$.

El TDZD-8 aumenta la densidad de espinas dendríticas en las neuronas primarias corticales de ratón.

El grupo de neuronas tratadas con TDZD-8 presentó una densidad de espinas dendríticas mayor en comparación con los controles, siendo la diferencia estadísticamente significativa $p<0.05$ (Figura 6).

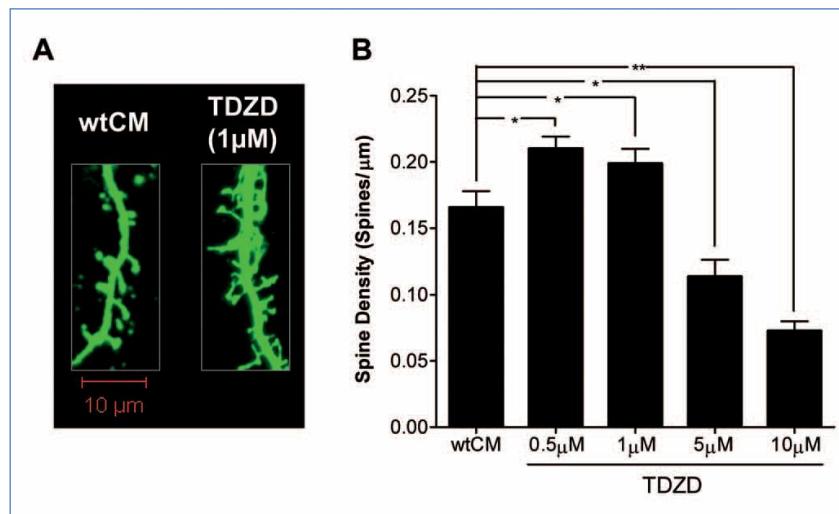


Figura 6. El TDZD-8 aumenta la densidad de espinas dendríticas en las neuronas primarias corticales de ratón. Las neuronas primarias corticales de ratón transfectadas con GFP y cultivadas por 14-17 días, fueron incubadas con 0.5 a 10 μ M de TDZD-8 durante 24 horas. (A) Imagen que muestra el efecto de incremento del TDZD-8 1 μ M sobre la densidad de las espinas dendríticas. Barra escala 10 μ m. (B) Densidad de espinas definida como el número de espinas por micrómetro de longitud de espina. n=5-17. Los valores son medias \pm DE. *p< 0.05.

El TDZD-8 rescata la pérdida de espinas dendríticas causada por A β .

El grupo de neuronas expuestas a A β y tratadas con TDZD-8 presentó una densidad de espinas dendríticas mayor en comparación con las neuronas expuestas a A β que no recibieron tratamiento con TDZD, siendo la diferencia estadísticamente significativa p<0.01(**Figura 7**).

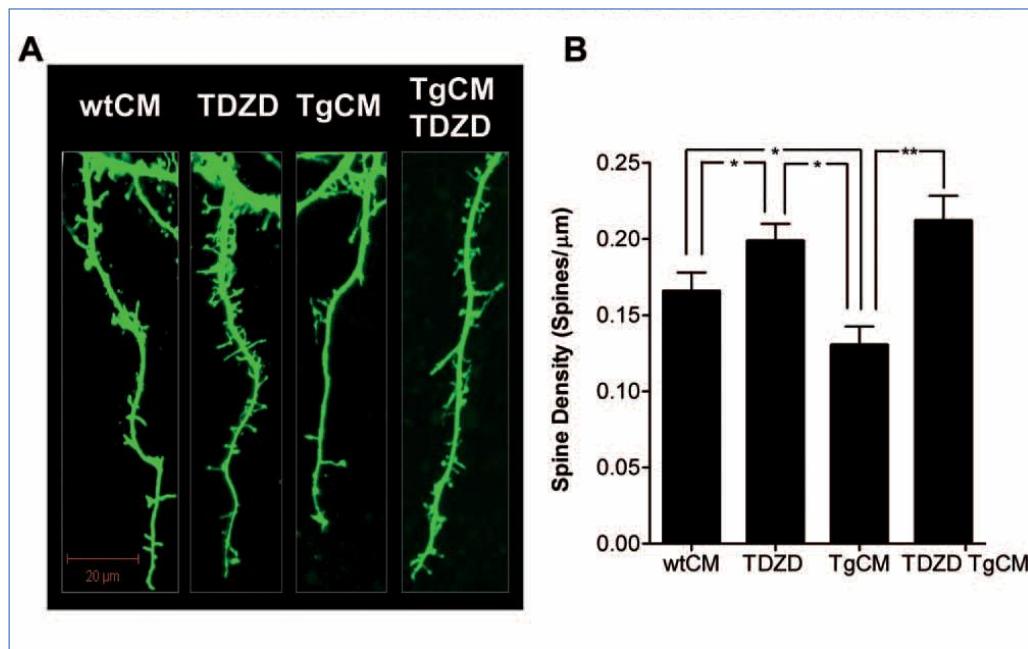


Figura 7. El TDZD-8 rescata la pérdida de espinas dendríticas causada por A β .

Las neuronas primarias corticales de ratón transfectadas con GFP y cultivadas por 14-17 días, fueron incubadas con TgCM por 24 horas en presencia y ausencia de TDZD-8 1 μM . (A) Imagen que muestra el efecto protector de TDZD-8 1 μM sobre la pérdida de densidad de espinas dendríticas A β -dependiente. Barra escala 20 μm . (B) Densidad de espinas definida como el número de espinas por micrómetro de longitud de espina. n=14-17. Los valores son medias \pm DE. *p<0.01.

Discusión

La pérdida de espinas dendríticas es un rasgo común de varias enfermedades neurodegenerativas, en la Enfermedad de Alzheimer este hecho adquiere relevancia por su alta correlación con el deterioro cognitivo (Spires and Hyman, 2007). Varios modelos animales con patología amiloide muestran un descenso en la densidad de espinas y actualmente se postula que las placas de amiloide podrían actuar como fuente de especies oligoméricas solubles de A β que difunden hacia la sinapsis y están directamente implicadas en la neurotoxicidad(Lanz et al., 2003; Moolman et al .,2004; Spires et al., 2005, Spires et al 2007). Por otra parte, estudios en cultivos celulares postulan un efecto sinapto-tóxico de A β que acabaría desestabilizando las espinas dendríticas (Snyder et al., 2005; Roselli et al. 2005). En nuestros cultivos celulares de neuronas primarias corticales de ratón encontramos que la exposición a A β reduce la densidad de espinas dendríticas (p<0.05)(**Figura 5**). Este resultado apoya la idea de que existe un efecto nocivo de A β sobre la sinapsis que se traduce en una disminución de la cantidad de espinas dendríticas . El efecto sinapto-tóxico de A β podría estar mediado , entre otros, por la activación de GSK-3, enzima implicado en el procesamiento de amiloide cuya inhibición por un compuesto del tipo TDZD, inhibidor de GSK-3, demostró recientemente incrementar la supervivencia neuronal en un modelo *in vivo* (Serenó et al. 2009). Las neuronas primarias corticales de ratón tratadas con un inhibidor de GSK-3, en concreto el TDZD-8, presentaron un aumento de la densidad de espinas dendríticas (p<0.05) (**Figura 6**). Por tanto la inhibición de GSK-3 parece tener un efecto trófico sobre dichos elementos sinápticos.

Nuestro hallazgo más relevante se observa en el grupo de neuronas primarias corticales de ratón expuestas a A β y tratadas con TDZD-8. Las células expuestas a A β y tratadas con TDZD-8 1 μ M presentaron una densidad de espinas dendríticas mayor en comparación con los controles, siendo la diferencia estadísticamente significativa con una p<0.01 (**Figura 7**). Encontramos que el TDZD-8 rescata la pérdida de espinas dendríticas mediada por A β . Por tanto la acción inhibitoria sobre GSK-3 del compuesto TDZD-8 revierte el efecto sinapto-tóxico de A β en nuestros cultivos celulares , sugiriendo que el efecto nocivo

de A β o sobre la sinapsis ocurriría vía activación aberrante de GSK-3. Por otra parte, dada la correlación ya conocida entre pérdida de espinas y deterioro cognitivo, pensamos que los efectos beneficiosos de los compuestos tipo TDZD sobre la cognición , observados previamente en el doble modelo transgénico en ratón (Serenó et al., 2009) podrían estar mediados por la prevención de la pérdida de espinas A β o-dependiente.

Nuestros resultados son una evidencia más del gran interés que tiene GSK-3 como diana terapéutica en la Enfermedad de Alzheimer. Para ampliar nuestro grado de evidencia proponemos estudiar los efectos in vivo de la inhibición de la GSK-3 sobre la sinaptotoxicidad mediada por el acúmulo anormal de A β o en ratones transgénicos, hecho que podría ser relevante en la EA en humanos.

Conclusión

El efecto protector de TDZD-8 , un inhibidor de GSK-3, sobre las espinas dendríticas en las neuronas primarias corticales expuestas a A β aporta una evidencia más de que GSK-3 podría ser una diana de gran interés en el tratamiento futuro de la Enfermedad de Alzheimer.

Referencias Bibliográficas

- Alzheimer A, 1907. Über eine eigenartige erkrankung der Hirnrinde. Allg Zeits f Psychia. 64: 146-148.
- Bhat RV, Shanley J, Correll MP, Fieles WE, Keith RA, Scott CW, Lee CM., 2000. Regulation and localization of tyrosine216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta in cellular and animal models of neuronal degeneration. Proc Natl Acad Sci U S A. 26, 11074-9.
- Beurel E, Jope RS. 2006. The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. Prog Neurobiol. 79, 173-89.
- DeKosky ST, Scheff SW, Styren SD., 1996. Structural correlates of cognition in dementia: quantification and assessment of synapse change. Neurodegeneration 5:417-21.
- Coleman PD, Yao PJ., 2003. Synaptic slaughter in Alzheimer's disease. Neurobiol Aging. 24, 1023-7.
- Gómez-Isla, T., West, H.L., Rebeck, G.W., Harr, S.D., Growdon, J.H., Locascio, J.J., Perls, T.T., Lipsitz, L.A., Hyman, B.T., 1996. Clinical and pathological correlates of apolipoprotein E epsilon 4 in Alzheimer's disease. Ann. Neurol. 39, 62–70.
- Gómez-Isla T, Price JL, McKeel Jr DW, Morris JC, Growdon JH, Hyman BT ., 1996. Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in verymild Alzheimer's disease. J Neurosci. 16, 4491– 4500.
- Gómez-Isla, T., Irizarry, M.C., Mariash, A., Cheung, B., Soto, O., Schrump, S., Sondel, J., Kotilinek, L., Day, J., Scharwzchild, M..A, Cha, J.H., Newell, K., Miller, D.W., Ueda, K., Young, A.B., Hyman, B.T., Ashe, K.H., 2003. Motor dysfunction and gliosis withpreserved dopaminergic markers in human alpha-synuclein A30P transgenic mice. Neurobiol. Aging 24, 245–258.
- Hardy J, Selkoe DJ. , 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. Science. 19, 353-6.
- Hernández F, Borrell J, Guaza C, Avila J, Lucas JJ., 2002. Spatial learning deficit in transgenic mice that conditionally over-express GSK-3beta in the brain but do not form tau filaments. J Neurochem.;83, 1529-33.
- Hetman M, Xia Z., 2000.Signaling pathways mediating anti-apoptotic action of neurotrophins. Acta Neurobiol Exp (Wars).60, 531-45.

- Ingelsson M, Fukumoto H, Newell KL, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Frosch MP, Albert MS, Hyman BT, Irizarry MC., 2004. Early Abeta accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. *Neurology.* 23:925-31.
- Kosik KS , 1992. Cellular aspects of Alzheimer neurofibrillary pathology. *Prog Clin Biol Res.* 379, 183-93.
- Lanz TA, Carter DB, Merchant KM, 2003. Dendritic spine loss in the hippocampus of young PDAPP and Tg2576 mice and its prevention by the ApoE2 genotype. *Neurobiol Dis.* 13, 246-53.
- Lucas JJ, Hernández F, Gómez-Ramos P, Morán MA, Hen R, Avila J., 2001. Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *EMBO J.* 15, 27-39.
- Moolman DL, Vitolo OV, Vonsattel JP, Shelanski ML. 2004. Dendrite spine alterations in Alzheimer models. *J Neurocytol.* .33:377–387.
- Phiel CJ, Wilson CA, Lee VM, Klein PS. 2003. GSK-3alpha regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature.* 22, 435-9.
- Roselli F, Tirard M, Lu J, Hutzler P, Lamberti P, Livrea P, Morabito M, Almeida OF, 2005. Soluble β -amyloid1-40 induces NMDA-dependent degradation of postsynaptic density-95 at glutamatergic synapses. *J Neurosci,* 25:11061-11070.
- Segal M., 2002. Dendritic spines: elementary structural units of neuronal plasticity. *Prog Brain Res.*;138:53-9.
- Selkoe DJ. 2008. Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav Brain Res.* 1:106-13.
- Serenó L, Coma M, Rodríguez M, Sánchez-Ferrer P, Sánchez MB, Gich I, Agulló JM, Pérez M, Avila J, Guardia-Laguarta C, Clarimón J, Lleó A, Gómez-Isla T., 2009. A novel GSK-3beta inhibitor reduces Alzheimer's pathology and rescues neuronal loss in vivo. *Neurobiol Dis.*35,:359-67.
- Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, Nairn AC, Salter MW, Lombroso PJ, Gouras GK, Greengard P., 2005. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid. *Nat Neurosci.* 8:1051–1058.
- Spires TL, Hyman BT., 2004. Neuronal structure is altered by amyloid plaques. *Rev Neurosci.* 15, 267-78.

Spires TL, Melanie Meyer-Luehmann, Edward A. Stern, Pamela J. McLean, Jesse Skoch, Paul T. Nguyen, Brian J. Bacskai, and Bradley T. Hyman., 2005. Dendritic Spine Abnormalities in Amyloid Precursor ProteinTransgenic Mice Demonstrated by Gene Transfer and Intravital Multiphoton Microscopy. *The JournalNeuroscience* 31, 7278 -7287.

Spires-Jones TL, Meyer-Luehmann M, Osetek JD, Jones PB, Stern EA, Bacskai BJ, Hyman BT, 2007. Impaired spine stability underlies plaque-related spine loss in an Alzheimer's disease mouse model.*Am J Pathol.* 171, 1304-11.

Terry RD, Masliah E, Salmon DP, et al., 1991. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: Synapse loss in the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 30:572-580.

Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Rowan MJ, Selkoe DJ., 2002 . Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition. *Biochem Soc Trans.* 30:552-7.