Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca

AGAUR

UNIÓ EUROPEA
Fons Social Europeu

Memòria justificativa de recerca de les beques predoctorals per a la formació de personal investigador (FI)

La memòria justificativa consta de les dues parts que venen a continuació:
1.- Dades bàsiques i resums
2.- Memòria del treball (informe científic)

Tots els camps són obligatoris

1.- Dades bàsiques i resums

Títol del projecte ha de sintetitzar la temàtica científica del vostre document.
Funcions de les molècules associades a la mielina i la proteïna priònica cel•lular (PrPc) en neurodegeneració (Malaltia d'Alzheimer) i neuroinflamació (Esclerosi Múltiple).

Dades de l'investigador (benficiari de l'ajut)

Nom
CRISTINA
Cognoms
VERGARA PAÑOS
Correu electrònic
crisvepa@gmail.com

Dades del director del projecte

Nom
JOSÉ ANTONIO
Cognoms
DEL RÍO FERNÁNDEZ
Correu electrònic
jadelrio@ibec.pcb.ub.es

Dades de la universitat / centre al que s'està vinculat
FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUT DE BIOENGINYERIA DE CATALUNYA

Número d'expedient
2011FI_B 00905

Paraules clau: cal que esmenteu cinc conceptes que defineixin el contingut de la vostra memòria.
Malalties priòniques, PrP, Alzheimer, Esclerosi Múltiple, NogoR

Data de presentació de la justificació
07/04/12

Nom i cognoms, i signatura del beneficiari/ària

Vist i plau del/de la director/a del projecte

Generalitat de Catalunya
Departament d'Economia i Coneixement

Resum en la llengua del projecte (màxim 300 paraules)

Les proteïnes associades a la mielina (MAIS), Nogo-A, MAG i OMgp, són molècules que presenten una capacitat inhibitòria molt important per el recreixement axonal i la neuroreparació després de lesió. No obstant des de fa anys les seves funcions han estat ampliades i s'han involucrat en diferents processos degeneratius del sistema nerviós o en processos neuroinflamatoris del sistema nerviós central i el perifèric com ara l'Escleresi Múltiple (MS). La base neurobiològica d'indicadors moleculars que són responsables del dany axonal en MS segueixen sense estar plenament descrits. Recentment s'ha publicat que el mecanisme de senyalització Nogo-A pot regir els primers canvis de la desmielinització immunomediada del sistema nerviós central en el model animal de MS, l'encefalomielitis autoimmune experimental (EAE). De la mateixa forma la proteïna priònica cel•lular és una proteïna que s'ha associat majoritàriament a malalties espongiformes, però que recentment s'ha vinculat (no sense controvèrsia) amb la seva possible relació amb la Malaltia d'Alzheimer (AD), ja que seria capaç de reclutar els oligòmers d'Aβ (ADDLs), els quals correlacionen millor amb el grau de demència, i amb els que interacciona directament, actuant així com un possible mediador de la fosforilació de tau en la malaltia. No obstant, les funcions de les MAIS i de la PrPc en aquests models de la malaltia no estan clarament definits i, per altra banda, es desconeixen els mecanismes de senyalització implicats, no descartant de forma clara el component neural i l'immune.

Resum en anglès(màxim 300 paraules)
Myelin associated proteins (MAIS), Nogo-A, MAG and OMgp, are molecules that have a great inhibitory capacity which is very important for the axonal regrowth and neurorepair after injury. However, their functions have been increased and have been involved in different degenerative processes of the nervous system or in neuroinflamatory processes of the central nervous system (CNS) and peripheral nervous system (PNS) like Multiple Sclerosis (MS). The neurologic basis of molecular markers that are responsible of the axonal injury in MS, are still not fully described. Recently, it has been published that the mechanism of Nogo-A signalling can trigger the first changes in the loss of myelin in the CNS in the animal model of MS, called Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE). Moreover, the Cellular Prion Protein (PrPc) has been mostly associated with spongiform diseases. Recently it has been connected with Alzheimer's Disease (AD), being able to interact directly with β- Amyloid oligomers, which correlate better with the degree of the disease, and may act as a mediator in the phosphorylation of Tau in AD. Nevertheless, the functions of MAIS and PrPc in those models of disease are not clearly understood, and, on the other hand, the mechanisms implied in the signalling are unknown.

2.- Memòria del treball (informe científic sense limitació de paraules). Pot incloure altres fitxers de qualsevol mena, no més grans de 10 MB cadascun d'ells.

1-Antecedents

Les proteïnes associades a la mielina (MAIS), Nogo-A, MAG i OMgp, són molècules que presenten una capacitat inhibitòria molt important per el recreixement axonal i la neuroreparació després de lesió [1]. Totes elles presenten receptors neuronals específics però un receptor comú: el complex receptor de Nogo [2]. No obstant des de fa anys les seves funcions han estat ampliades i s'han involucrat en diferents processos degeneratius del sistema nerviós com les malalties associades al desenvolupament (p.e., esquizofrènia[3]) o processos neurodegeneratius com la malaltia d'Alzheimer (AD) [4] o en processos neuroinflamatoris del sistema nerviós central i el perifèric [5]. De la mateixa forma la proteïna priònica cel·lular és una proteïna que s'ha associat majoritàriament a malalties espongiformes, però que recentment s'ha vinculat (no sense controvèrsia) amb la seva possible relació amb la AD, ja que seria capaç de reclutar els oligòmers d'Aβ [6-8] i, a més, en l'esclerosi múltiple[9]. En aquest sentit són cada cop més comuns els estudis en què han relacionat la PrP^c amb el manteniment i estabilitat de la mielina (e.g. [10]).

L'AD és una malaltia neurodegenerativa, incurable i terminal. Es caracteritza per un deteriorament cognitiu i canvis en la conducta, i histològicament per l'acumulació de pèptids Aβ, resultants del processament seqüencial de la Proteïna Precursora Amiloide (APP) i per la formació dels cabdells neurofibrilars formats per l'acumulació de la proteïna Tau hiperfosforilada [11]. En condicions normals, la proteïna APP pateix un processament seqüencial que es duu a terme a partir de 2 enzims anomenats α i γ secretases en l'anomenada via antiamiloidogènica. En AD, aquest procés es veu modificat, de manera que la proteïna precursora és processada per un altre enzim, la β–secretasa, seguit de la γ-secretasa. Els fragments de 40-42 aminoàcids que s'alliberen en aquesta via amiloidogènica són els responsables de la formació de plaques amiloides (veure Figura 1).

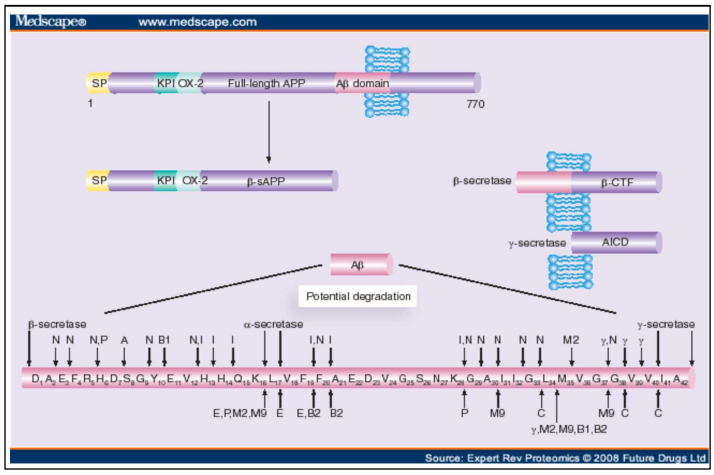

Figura 1. Via amiloidogènica. Generació d'A□ 1-42.

Estudis preliminars indiquen que les formes fibril·lars i insolubles dels pèptids β-amiloides, participen del dany cognitiu present en la malaltia, però recentment s'han publicat diversos estudis que demostren que són les formes oligomèriques i solubles (ADDLs), les que es correlacionen millor amb el grau de demència [12]. D'altra banda, s'ha descrit que la proteïna Tau pot comportar-se com agent de transmissió de la malaltia neurofibrilar entre diferents neurones [13] o entre animals [14]. L'any 2009 es va publicar un estudi que demostra la interacció entre els ADDLs i la proteïna priònica cel·lular (PrP^c), de manera que es pensava que aquesta última podria ser un possible receptor de les formes solubles oligomèriques d'Aβ [8]. D'altra banda, estudis previs del grup així com altres laboratoris

indicaven que l'agregació de PrP^c a la superfície neuronal mitjançant l'ús de l'anticòs SAF61, activa la via de Fyn i altres quinases intracel·lulars *in vitro* iniciant una cascada de transducció de senyal que indueix la fosforilació de Tau en l'epítop tirosina 18 [15]. La hiperfosforilació d'aquest epítop s'ha vist present en els agregats fibril·lars de malats d'AD [15].

D'altra banda, l'Esclerosi Múltiple (MS) és una malaltia crònica, inflamatòria i desmielinitzant, que afecta al sistema nerviós central (SNC) i presenta dos components, el dany neural i les alteracions en el sistema immunitari. Si bé no existeix un model complert que reprodueixi al 100% els trets característics de la malaltia, existeix un model murí, anomenat Encefalomielitis Autoimmune Experimental (EAE), basat en la immunització de ratolins amb MOG35-55, que serà l'utilitzat en aquest projecte per l'estudi de les funcions de les molècules associades a mielina.

La base neurobiològica d'indicadors moleculars que són responsables del dany axonal en MS segueixen sense estar plenament descrits. Recentment s'ha publicat que el mecanisme de senyalització Nogo-A pot regir els primers canvis de la desmielinització immunomediada del sistema nerviós central en el model animal de MS, l'encefalomielitis autoimmune experimental (EAE). S'ha demostrat que la vacunació amb un pèptid Nogo-A i la immunització passiva amb un anticòs anti-Nogo-A limita l'extensió del dèficit clínic en ratolins EAE [16]. Val a dir, però, que aquest tipus de teràpies poden desencadenar un desenvolupament de anticossos per part de l'hoste immunitzat que neutralitzarien el seu efecte. És per això que s'han intentat teràpies alternatives silenciant Nogo-A mitjançant siRNAs, aconseguint potenciar la recuperació funcional via reparació axonal, minimitzant alhora els afectes adversos [17]. De la mateixa forma un estudi indica que l'absència de PrP^c incrementa la susceptibilitat al dany neuronal en models d'esclerosi múltiple[9]. No obstant, les funcions de les MAIS i de la PrP^c en aquests models de la malaltia no estan clarament definits i, per altra banda, es desconeixen els mecanismes de senyalització implicats, no descartant de forma clara el component neural i l'immune.

De forma similar, les funcions de PrP^c com a element que pugui prevenir el desenvolupament de la AD estan sent molt debatudes en els últims anys. En aquest sentit hi ha estudis que defensen la participació de PrP^c com a receptor dels ADDLs en els processos de disminució de la memòria i/o la supervivència característica de l'AD. La unió directa entre els Aβ-oligòmers i PrP^c provocarien a l'hipocamp una disminució de la potenciació a llarg termini (LTP) *in vitro* i *in vivo* [6-8], tot i que hi ha estudis que contradiuen aquests resultats [18-20]. Altres autors mostren com la interacció dels ADDLs amb PrP^c provoca un increment de la proteïna priònica a la superfície cel·lular [21] però fins ara ningú s'ha centrat en l'estudi de la participació d'aquesta interacció en la hiperfosforilació de Tau, esdeveniment que com hem vist anteriorment pot estar relacionat amb processos d'agregació de PrP^c en membrana .

2-Resultats, Discussió i Conclusions

2.1 EAE:

Pel que fa a l'Esclerosi Múltiple (MS), durant aquest primer any he pogut ajudar a establir una colònia per cada genotip diferent dels ratolins mancants del receptor de Nogo (NgR1 -/-), Nogo-A (Nogo-A -/-) i el nou animal mutant doble NgR1 -/- y Nogo-A -/- desenvolupat pel grup.
Mitjançant la col·laboració de la Dra. Guadalupe Mengod, de l'Hospital Clínic de Barcelona, i prèvia selecció d'una cohort formada per animals de cada genotip, se'ls hi induirà la EAE, model murí de la MS, per tal d'analitzar el desenvolupament i la relació entre l'evolució de la malaltia i el genotip dels animals. S'analitzaran diversos factors en períodes des dels 10-12 dies (inici de símptomes) fins als 40-50 dies, en experiments de diferent grau de inoculació de MOG35-55.

2.2 Malaltia d'Alzheimer (AD)

2.2.1 Caracteritzar la participació de la PrP^c en la fosforilació de Tau en models *in vitro*

Durant aquest primer any s'han realitzat estudis bioquímics mitjançant la tècnica de Western Blot, per observar els canvis en la fosforilació de la proteïna Tau. Ens hem centrat en els epítops Tyr18, Thr181, Ser199/202 i Ser396/404 relacionats en el desenvolupament de l'AD, identificats amb els anticossos 9G3, Thr181, pSpS, AT8 i PHF1 respectivament (veure esquema de la figura 2).

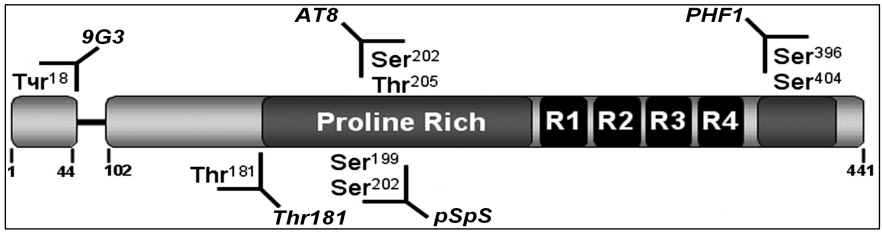

Figura 2. Esquema dels llocs de detecció dels anticossos anti Tau utilitzats en aquest treball.

Aquests estudis s'han realitzat *in vitro* mitjançant cultius primaris corticals de ratolins en E15-16 dels genotips $Prnp^{0/0}$ i wild type (WT) respectivament, en resposta a l'estímul amb ADDLs derivats de Aβ1-42 [22]. A la figura 3 es pot observar l'anàlisi electroforètic de les espècies emprades a l'estímul. Veiem com l'anticòs 6E10 marca bàsicament la presència de monòmers i oligòmers de 3 i 4-mer respectivament.

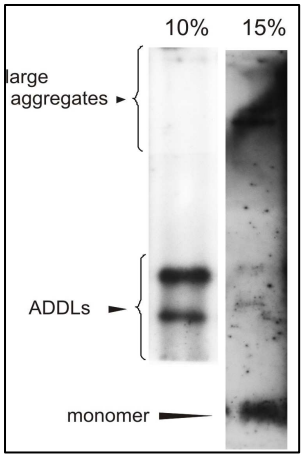

Figura 3. Perfil electroforètic del pèptid β1-42 utilitzat als estímuls.

A més, s'ha fet un assaig previ de mort neuronal com a control del funcionament dels ADDLs emprats en els nostres cultius mitjançant un assaig de captació de Iodur de Propidi i posterior medició de la fluorescència emesa per les cèl·lules mortes que l'hauran captat (Veure Taula 1).

Untreated	Vehicle	Oligòmers 10 µM	Untreated	Vehicle	Oligòmers 10 µM	IP lectura 530/645 nm
2356	1682	1517	1477	2206	2008	**F1**
2683	1947	1923	1755	2890	2777	**Fn(24h)**
4599	3806	3119	3238	6256	5139	**Fmax**
14,58	12,48	25,34	15,79	16,89	24,56	**% cell death 24h**
WT	WT	WT	PrPKO	PrPKO	PrPKO	**Genotype**

Taula 1. Assaig de mort neuronal realitzat mitjançant la captació de Iodur de Propidi i posterior mesura de la fluorescència emesa.

Tal i com es deriva dels resultats obtinguts, els oligòmers de Aβ 1-42 són citotòxics en aquestes condicions de cultiu independentment del genotip.

Pel que fa als resultats obtinguts dels estudis de fosforilació de Tau, trobem un increment en la fosforilació dels epítops Ser396/404 dels animals WT paral·lelament a una baixada en la proteïna total (veure Figura 4) probablement degut a una fragmentació de la proteïna total que ja proposen altres autors [23,24].

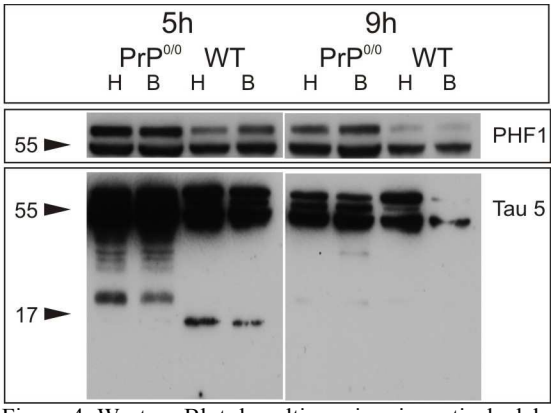

Figura 4. Western Blot de cultius primaris corticals dels animals $Prnp^{0/0}$ i WT estimulats amb ADDLs durant 5h i 9h respectivament.

Actualment tenim en marxa experiments en la mateixa línia i ampliant els diferents temps d'estímul per tal de confirmar els resultats obtinguts així com analitzar altres possibles epítops de Tau hiperfosforilats que fins ara no han mostrat diferències en els condicions d'estímul. La figura mostra els resultats per a 5 i 9 hores post-estímul respectivament. A priori s'observen clares diferències en la resposta dels cultius WT front els cultius procedents de neurones $Prnp^{0/0}$.
En paral·lel i per abordar *in vitro* les conseqüències d'una pèrdua de l'expressió de PrP^c posteriorment al desenvolupament de al malaltia, el grup ha desenvolupat vectors lentivirals com a eina per a silenciar l'expressió PrP^c. Per a la realització d'aquest objectiu s'estan analitzant actualment els cultius primaris corticals del model transgènic APP/PS1 per a la fosforilació dels diferents epítops de Tau esmentats anteriorment i amb diferent dies de cultiu *in vitro* (DIV) tot i que comptem encara amb resultats molt preliminars. Pel que fa al model murí APP/PS1 generat per [25] l'hem triat en aquest estudi perquè és una eina altament utilitzada en el seguiment de l'evolució dels dipòsits amiloides ja que presenta una avançada deposició dels mateixos [26].

2.2.2 Efecte de l'absència de la PrP^c en el desenvolupament de la AD

Tal i com s'ha esmentat anteriorment, hem triat el ratolí transgènic APP/PS1 com a model d'estudi dels trets característics de la AD per la seva ràpida evolució en la deposició de plaques senils (Fig 5). Però si és o no un bon model per a l'estudi de la hiperfosforilació de Tau derivada de la malaltia està per analitzar, tot i que alguns treballs apunten en aquest sentit [27,28]. Nosaltres en aquest punt hem volgut aportar una més àmplia caracterització tant a nivell bioquímic com histològic de la hiperfosforilació de Tau en el model, per a la qual cosa hem seleccionat animals de 3, 6, 9 i 12 mesos d'edat respectivament per a ser analitzats.

A la figura es pot veure la immunoreactivitat a l'anticòs 4G8 del ratolí transgènic APP/PS1 de 9 mesos (Fig.5A-C) front a un ratolí WT (Fig. D). Les plaques senils es poden veure tant a l'hipocamp (Fig. 5A) com al neocortex de l'animal transgènic (Fig. 5B-C).

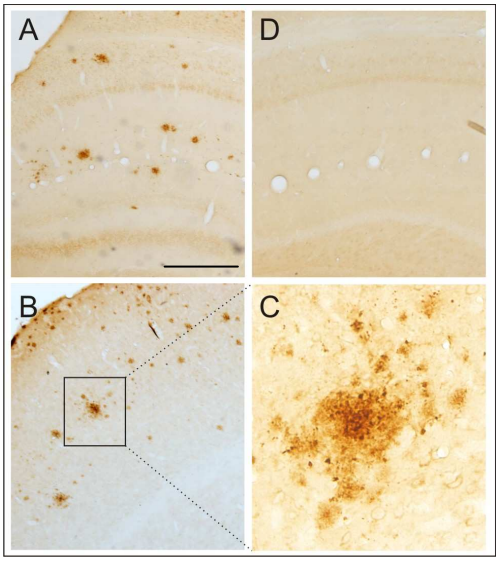

Figura 5. Immunohistoquímica d'hipocamp i neocortex. Anticòs 4G8.

Els western blots dels extractes de cervell dels animals seleccionats per a l'estudi mostren un increment en la fosforilació de l'epítop Ser396/404 reconegut mitjançant l'anticòs PHF1 als 6 mesos d'edat en els animals transgènics respecte als WT (Figura 6A-B), que en paral·lel es correlaciona amb una caiguda de la proteïna total. Així mateix, l'anticòs AT8 mostra més reactivitat en els animals transgènics (Figura 6B-C) tot i que a priori les diferències no són significatives i caldrà augmentar el nombre d'animals analitzats.

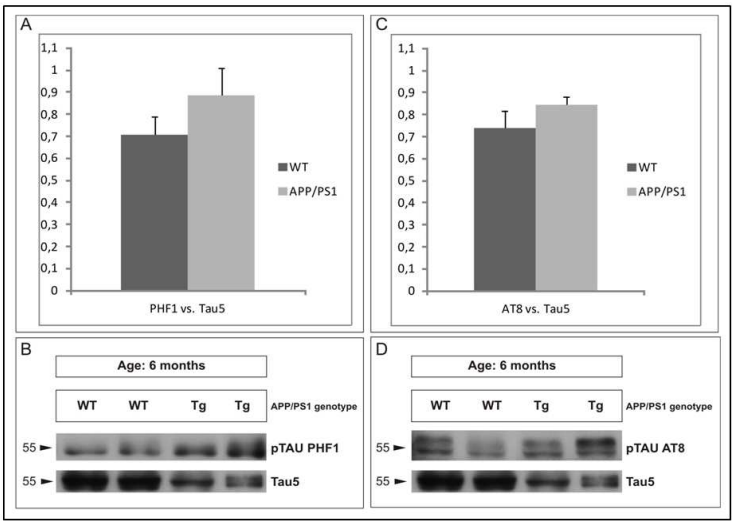

Figura 6. Western Blots d'extracte de cervell d'animals de 6 mesos pels epítops PHF1 i AT8.

En referència a la caracterització histològica, els experiments estan en curs actualment.

Per a l'estudi de la implicació de PrP^c en el desenvolupament de l'AD s'han desenvolupat diferents models animals en col·laboració amb el Prof. Francisco Wandosell. Tots ells són triples transgènics resultants de l'encreuament de la colònia APP/PS1 amb el knock out $Prnp^{0/0}$ o el model de sobrexpressió de PrP^c Tg20 respectivament.

De l'estudi dels triples transgènics comptem amb resultats preliminars de la fosforilació de la proteïna Tau en els diferents models. Dels dos genotips analitzats, s'han seleccionat animals dels 3 als 9 mesos d'edat per a l'anàlisi mitjançant western blot dels epítops de Tau mencionats anteriorment així com de la proteïna total. Els resultats d'aquests experiments demostren que en l'animal Tg20 hi ha un increment de la fosforilació de Tau en l'epítop Tyr18 als 9 mesos d'edat de manera independentment al genotip APP/PS1, i per tant depenent únicament dels alts nivells d'expressió de PrP^c (Figura 7). Tal i

com s'ha comentat anteriorment, quan PrP^c agrega a la membrana cel·lular mitjançant l'ús de l'anticòs SAF61, activa una cascada de transducció de senyal que indueix la fosforilació de Tau en el residu Tyr18, implicat en Alzheimer [29].

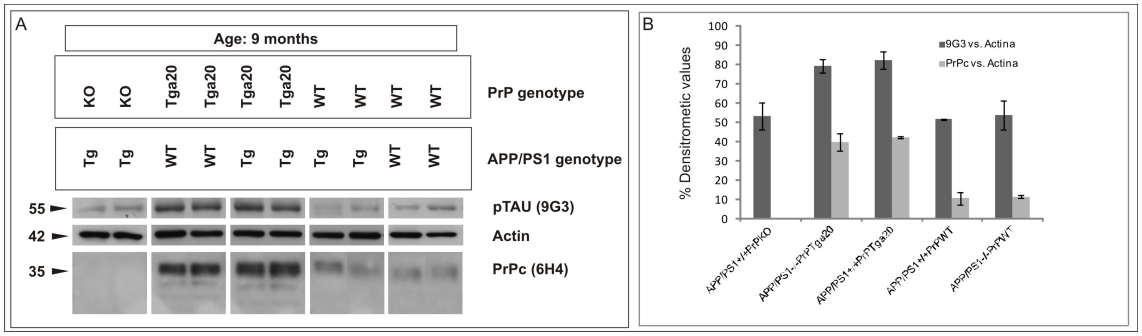

Figura 7. Western blot d'extractes de cervell d'animals de 9 mesos per l'epítop 9G3.

2.3 Conclusions:

Pel que fa a la EAE restem a l'espera de la obtenció dels resultats de la inducció de la malaltia en els animals dels 4 genotips per tal de confirmar així el paper de Nogo-A en la millora d'aquesta.

Respecte a l'AD, un cop caracteritzada l'eina principal amb la que estem treballant, els ADDLs, tant a nivell de composició com de funcionament citotòxic, esperem confirmar les diferències de resposta front els ADDLs que presenten els animals $Prnp^{0/0}$ *vs.* els animals WT.

Per últim, els models dels que disposem estan sent caracteritzats tant per western blot com per tècniques histològiques per conèixer l'estat de fosforilació de la proteïna Tau i determinar també el paper de PrP^c en aquest fenomen.

3-Bibliografia:

1. Schwab, J.M., S.K. Tuli, and V. Failli, *The Nogo receptor complex: confining molecules to molecular mechanisms.* Trends Mol Med, 2006. **12**(7): p. 293-7.
2. Hunt, D., R.S. Coffin, and P.N. Anderson, *The Nogo receptor, its ligands and axonal regeneration in the spinal cord; a review.* J Neurocytol, 2002. **31**(2): p. 93-120.
3. Willi, R., et al., *Constitutive genetic deletion of the growth regulator Nogo-A induces schizophrenia-related endophenotypes.* J Neurosci, 2010. **30**(2): p. 556-67.
4. Gil, V., et al., *Nogo-A expression in the human hippocampus in normal aging and in Alzheimer disease.* J Neuropathol Exp Neurol, 2006. **65**(5): p. 433-44.
5. David, S., E.J. Fry, and R. Lopez-Vales, *Novel roles for Nogo receptor in inflammation and disease.* Trends Neurosci, 2008. **31**(5): p. 221-6.
6. Chen, S., S.P. Yadav, and W.K. Surewicz, *Interaction between human prion protein and amyloid-beta (Abeta) oligomers: role OF N-terminal residues.* J Biol Chem, 2010. **285**(34): p. 26377-83.
7. Gimbel, D.A., et al., *Memory impairment in transgenic Alzheimer mice requires cellular prion protein.* J Neurosci, 2010. **30**(18): p. 6367-74.
8. Lauren, J., et al., *Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers.* Nature, 2009. **457**(7233): p. 1128-32.
9. Tsutsui, S., et al., *Absence of the cellular prion protein exacerbates and prolongs neuroinflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis.* Am J Pathol, 2008. **173**(4): p. 1029-41.
10. Radovanovic, I., et al., *Truncated prion protein and Doppel are myelinotoxic in the absence of oligodendrocytic PrPC.* J Neurosci, 2005. **25**(19): p. 4879-88.
11. Tiraboschi, P., et al., *Impact of APOE genotype on neuropathologic and neurochemical markers of Alzheimer disease.* Neurology, 2004. **62**(11): p. 1977-83.
12. Hardy, J., *The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal.* J Neurochem, 2009. **110**(4): p. 1129-34.
13. Avila, J., et al., *Tau phosphorylation in hippocampus results in toxic gain-of-function.* Biochem Soc Trans, 2010. **38**(4): p. 977-80.
14. Clavaguera, F., et al., *Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain.* Nat Cell Biol, 2009. **11**(7): p. 909-13.
15. Lee, G., et al., *Phosphorylation of tau by fyn: implications for Alzheimer's disease.* J Neurosci, 2004. **24**(9): p. 2304-12.

16. Karnezis, T., et al., *The neurite outgrowth inhibitor Nogo A is involved in autoimmune-mediated demyelination.* Nat Neurosci, 2004. **7**(7): p. 736-44.
17. Yang, Y., et al., *Silencing Nogo-A promotes functional recovery in demyelinating disease.* Ann Neurol, 2010. **67**(4): p. 498-507.
18. Ledford, H., *Key Alzheimer's findings questioned.* Nature, 2010. **466**(7310): p. 1031.
19. Balducci, C., et al., *Synthetic amyloid-beta oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(5): p. 2295-300.
20. Calella, A.M., et al., *Prion protein and Abeta-related synaptic toxicity impairment.* EMBO Mol Med, 2010. **2**(8): p. 306-14.
21. Caetano, F.A., et al., *Amyloid-beta oligomers increase the localization of prion protein at the cell surface.* J Neurochem, 2011. **117**(3): p. 538-53.
22. Lambert, M.P., et al., *Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(11): p. 6448-53.
23. Park, S.Y. and A. Ferreira, *The generation of a 17 kDa neurotoxic fragment: an alternative mechanism by which tau mediates beta-amyloid-induced neurodegeneration.* J Neurosci, 2005. **25**(22): p. 5365-75.
24. Reifert, J., D. Hartung-Cranston, and S.C. Feinstein, *Amyloid beta-mediated cell death of cultured hippocampal neurons reveals extensive Tau fragmentation without increased full-length tau phosphorylation.* J Biol Chem, 2011. **286**(23): p. 20797-811.
25. Jankowsky, J.L., et al., *Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: a comparison of strategies.* Biomol Eng, 2001. **17**(6): p. 157-65.
26. Garcia-Alloza, M., et al., *Characterization of amyloid deposition in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer disease.* Neurobiol Dis, 2006. **24**(3): p. 516-24.
27. Kurt, M.A., et al., *Hyperphosphorylated tau and paired helical filament-like structures in the brains of mice carrying mutant amyloid precursor protein and mutant presenilin-1 transgenes.* Neurobiol Dis, 2003. **14**(1): p. 89-97.
28. Crouch, P.J., et al., *Increasing Cu bioavailability inhibits Abeta oligomers and tau phosphorylation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(2): p. 381-6.
29. Mouillet-Richard, S., et al., *Signal transduction through prion protein.* Science, 2000. **289**(5486): p. 1925-8.