

$A\beta$ 42转基因AD果蝇的构建及在药物筛选中的运用

王俊杰 王 敏 张丽红 张 儒*

(上海市信号转导与疾病研究重点实验室, 同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092)

摘要 阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种以 β -淀粉样蛋白的形成和沉积为主要特征的神经退行性疾病, $A\beta$ 42被认为在AD的发病过程中起着重要的作用。果蝇是一种遗传操作简便的模式动物, 利用果蝇中经典的Gal4/UAS系统, 作者构建了在中枢神经系统中全神经元或运动神经元表达单拷贝或双拷贝 $A\beta$ 42的转基因AD果蝇, 并检验转基因果蝇在AD治疗药物筛选中的作用。结果显示, 转基因AD果蝇寿命明显缩短且运动能力降低, 而使用AD临床治疗药物安理申后, 可延长AD果蝇寿命, 改善AD果蝇的运动障碍。进一步的研究显示, δ 阿片受体拮抗剂naltrindole给药后, 也能缓解这些症状。该研究为AD治疗药物的初筛提供了一个经济便捷的工具。

关键词 阿尔茨海默病; 转基因果蝇; $A\beta$ 42; 安理申; naltrindole

Construction of $A\beta$ 42 Transgenic AD Flies and Their Applications in Drug Screening

Wang Junjie, Wang Min, Zhang Lihong, Zhang Ru*

(Shanghai Key Laboratory of Signaling and Disease Research, School of Life Sciences and technology, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by generation and deposition of β -amyloid ($A\beta$). $A\beta$ 42 has been suggested to play a central role in the pathogenesis of AD. Fly is a well-established model system with abundant genetic tools. Using the classic Gal4/UAS system, we constructed transgenic AD flies expressing one copy or two copies of $A\beta$ 42 in all neurons or cholinergic neurons and found all transgenic AD flies showed locomotor dysfunction and shortened lifespan. Such phenotype could be reversed by Aricept, an FDA-approved AD therapeutic drug. Moreover, further tests revealed that δ -opioid receptor (DOR) antagonist naltrindole improved locomotor function and prolonged the lifespan in transgenic AD flies. Our study offers a useful tool as a preliminary drug screen model for AD therapy.

Key words Alzheimer's disease; transgenic fly; $A\beta$ 42; Aricept; naltrindole

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD), 俗称老年痴呆, 是一种老年常见的神经系统退行性疾病, 病理改变主要以神经元大量减少、 $A\beta$ 大量沉积和神经纤维缠结等病变为主要特征^[1-4]。据报道, 随着老龄人口的增加, 老年性痴呆的发病率越来越高。目

前, 全球约有3 500万人受此病困扰, 预计2050年全球患者将达到1.15亿。AD发病机制十分复杂, 目前还不十分清楚, 可能与遗传及环境因素相关。病因学说也有多种, 如 $A\beta$ 级联学说、胆碱能学说、氧化应激学说和神经细胞凋亡学说等, 目前研究较多的为 $A\beta$ 级联学说。 $A\beta$ 级联学说认为, 在AD患者脑内大量 $A\beta$ 沉积可引发一系列病理过程, 如tau蛋白异常磷酸化、细胞凋亡的发生, 从而导致神经元死亡; 这些病理过程又进一步促进 $A\beta$ 沉积, 产生正反馈的级联放大效应, 最终导致神经元减少, 引发临床认知和行为障碍症状^[4-7]。传统研究AD的模型主要集中在

收稿日期: 2014-01-22 接受日期: 2014-02-25

国家自然科学基金(批准号: 31071227)资助的课题

*通讯作者: Tel: 021-65986852, E-mail: ru.zhang@tongji.edu.cn

Received: January 22, 2014 Accepted: February 25, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31071227)

*Corresponding author: Tel: +86-21-65986852, E-mail: ru.zhang@tongji.edu.cn

网络出版时间: 2014-05-16 15:02

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.06.0026.html>

啮齿类动物上,目前已经建立了多种转基因AD小鼠模型^[8]。与这些传统的动物模型相比,转基因果蝇模型有着繁殖周期快、遗传背景清晰、操作简单、经济等独特的优势,被广泛用于研究人类神经系统疾病^[9]。因此在本研究中,我们利用果蝇特有的Gal4/UAS系统,建立了在全神经元及胆碱能神经元中过表达A β 42基因的AD果蝇模型,该AD果蝇较正常果蝇有着显著的寿命缩短和运动能力损伤等表型。利用这两种表型,我们检测了目前已上市的AD治疗药物安理申的疗效,发现安理申可以改善AD果蝇的爬管能力和延长果蝇寿命;我们进一步在该果蝇中检验了前期报道在AD小鼠模型上有效的 δ 阿片受体(δ -opioid receptor, DOR)拮抗剂naltrindole的疗效^[10]。与前期报道一致,我们在AD果蝇模型中验证了naltrindole的疗效,说明该AD果蝇模型可以作为AD治疗新药的初筛模型,为AD治疗的新药研发提供了很好的工具。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 果蝇品系 本研究中所使用的果蝇均为黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*),品系分别为: *Elav*: *w*; *elav-Gal4*, *Cha*: *w*; *cha-Gal4/cyo*, *CS*: *w*; +/+, *Alz3*: *w*; *A β 42/A β 42*, *Alz38*: *w*; *A β 42/A β 42*; *A β 42/TM6BTb*, 所有果蝇均来自同济大学受体生物医药实验室。果蝇培养条件: (25.0 $\pm$ 0.5) °C, 相对湿度70% $\pm$ 5%, 光照周期为12 h照明: 12 h黑暗。

1.1.2 试剂 果蝇扩增培养基: 1 500 mL水、112.5 g蔗糖、130 g玉米粉、27 g酵母、16 g琼脂、23 mL的10%对羟基苯甲酸甲酯(溶剂为无水乙醇)。果蝇给药培养基: 0.5 g亨氏基础婴儿米粉, 1.5 mL含有各浓度的安理申或naltrindole的纯水。安理申和naltrindole均购自Sigma公司。

1.2 各转基因果蝇的构建

Elav-CS、*Elav-Alz3*、*Elav-Alz38*果蝇: 分别选取5只*Elav*处女雌蝇与5只*CS*、*Alz3*或者*Alz38*雄蝇杂交, 挑取杂交雄蝇后代。

Cha-CS、*Cha-Alz3*、*Cha-Alz38*果蝇: 分别选取5只*Cha*处女雌蝇与5只*CS*、*Alz3*或者*Alz38*雄蝇杂交, 挑取杂交后直翅雄蝇后代。

1.3 行为学实验

加药或对照溶剂培养基每管10只果蝇, 每个加

药点培养5管果蝇, 实验当天每个加药点随机选取3管果蝇转入无培养基的空管中, 暗室中预适应30 min。如图1C所示, 选取红光作为实验光源, 摄像机拍照截取图片。实验开始时, 同时震荡所有果蝇管使果蝇全部位于空管底部作为起始点, 由于果蝇具有背地性, 自发向空管顶部爬行。数据记录时将实验用试管分为均等的五个部分, 每个部分用一种颜色表示, 分别记录下震荡后10 s时每个部分对应的果蝇只数, 用只数对应管子中相应部分的长度, 即一柱状图中不同颜色的长度代表了五等分试管中各部分对应的果蝇只数, 从而直观表示出果蝇的爬管能力; 数据统计分析时以各部分的果蝇只数乘以不同的系数(从空管顶部往下系数分别为5、4、3、2、1)的加和作为爬管运动能力指数来衡量AD果蝇的运动能力。每个加药点每管果蝇重复6次实验。

1.4 寿命学实验

每个加药点3~5管, 每管20只果蝇。果蝇培养在给药培养基中, 每3 d换管一次, 每天记录死亡果蝇数量。

1.5 数据统计

实验数据以mean $\pm$ S.E.M.形式表示, 利用统计学软件Graphpad Prism 5.0对记录的行为学和寿命学数据进行分析, 得到运动能力和寿命曲线。寿命曲线采用Log-rank (Mantel-Cox) Test方法检验, 平均寿命柱状图采用Two-tailed T Test方法检验, 运动能力曲线采用Two-way ANOVA方法检验。 $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为更加显著, $P<0.001$ 为极其显著。

2 结果

2.1 AD转基因果蝇品系的建立

果蝇的杂交方案如图1A所示, 利用果蝇染色体平衡子的遗传学表型特征挑选所需要的基因型后代。在本研究中, 果蝇组织特异性表达模式*Gal4-UAS*系统被用来构建所需要的AD转基因果蝇模型。主要使用了全神经元表达的*Gal4-UAS(Elav-Gal4)*和胆碱能神经元表达的*Gal4-UAS(Cha-Gal4)*处女雌蝇和对照果蝇(*CS*)、携带一个拷贝A β 42的*Alz3*以及两个拷贝A β 42的*Alz38*雄蝇杂交。在*Elav-Gal4*与*CS*或*Alz3*杂交得到的后代中, 直接选取雄性后代作为实验用果蝇, 而与两个拷贝A β 42的*Alz38*果蝇杂交得到的后代中则选取肩甲部长毛的*Elav-Alz38*果蝇作为实验材料, 将带有*TM6BTb*平衡子的短毛果蝇

丢弃。由于胆碱能神经元表达的*Cha-Gal4*果蝇本身具有卷翅平衡子,所以在与*CS*或*Alz3*雄蝇杂交后代中应都选取直翅果蝇,而在与*Alz38*杂交得到的后代中,应选取直翅长毛的*Cha-Alz38*果蝇。杂交得到的这些后代果蝇均能正常存活,并没有致死的品系,这些AD转基因果蝇没有形态学上的明显缺陷,个体大小、肢体的完整性与对照组父母本果蝇相比没有明显的区别(图1B)。AD病人自主意识的逐渐丧失及行动能力的减弱是重要的疾病病程衡量指标。因此,在本研究中我们同时检测后代果蝇的寿命和爬管这一运动能力,作为重要的参数来表征AD果蝇的病变程度。在爬管实验中,试管分为均等的五个部分,用每个部分停留的果蝇只数对应各自部分的长度作图,可以直观地表现果蝇爬管能力(图1C)。

2.2 Aβ42转基因AD果蝇运动能力明显下降

如图2A所示,在全神经元表达Aβ42的AD转基因果蝇中,与对照组果蝇*Elav-cs*相比,表达一个拷贝Aβ42的*Elav-Alz3*和两个拷贝Aβ42的*Elav-Alz38*果蝇运动能力指数明显下降(*P*值分别为0.014 1和0.011 5, Two-way ANOVA),并且表达两个拷贝Aβ42的*Elav-*

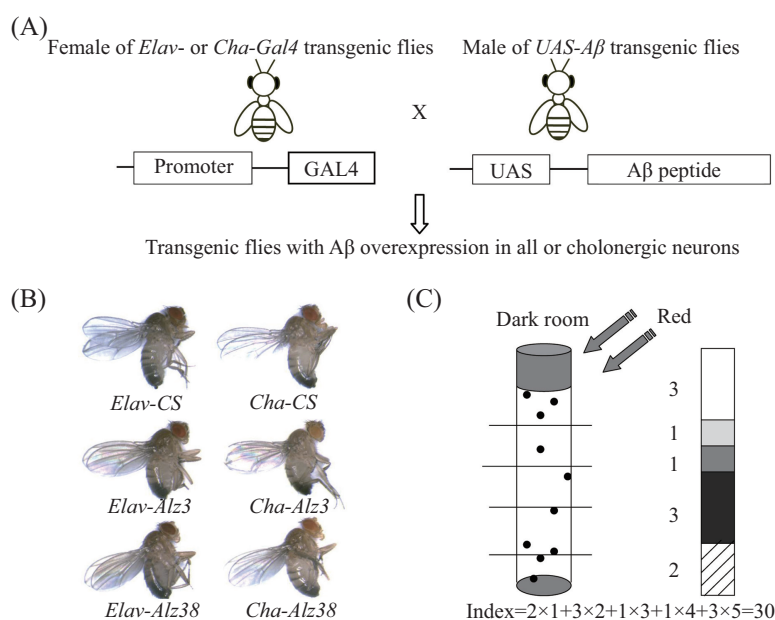
*Alz38*更为严重。同样,在胆碱能神经元中表达Aβ42的AD转基因果蝇,与对照组*Cha-CS*相比,*Cha-Alz3*和*Cha-Alz38*的运动能力指数也明显降低(*P*值分别为0.016 1和0.016 0)(图2B)。

2.3 Aβ42转基因AD果蝇寿命明显缩短

果蝇寿命是最容易获得的检测指标,也是衡量果蝇基本生理状况的常用指标,同时也可以作为药物筛选时的初筛指标。如图3所示,在全神经元表达Aβ42的AD转基因果蝇中,与对照组*Elav-cs*相比,表达一个拷贝Aβ42的*Elav-Alz3*和两个拷贝Aβ42的*Elav-Alz38*果蝇平均寿命也显著降低,生存曲线显著左移(*P*值均<0.000 1),表明AD转基因果蝇寿命明显缩短(图3A)。同样,在胆碱能神经元中表达Aβ42的AD转基因果蝇中,与对照组*Cha-cs*相比,*Cha-Alz3*和*Cha-Alz38*的寿命显著缩短,且表达两个拷贝Aβ42的*Cha-Alz38*更为严重(图3B)。

2.4 安理申给药能改善*Elav-Alz3*果蝇运动能力并延长其寿命

安理申是一种高选择性、可逆、长效的乙酰胆碱酯酶抑制剂,通过抑制大脑突触间隙的乙酰胆

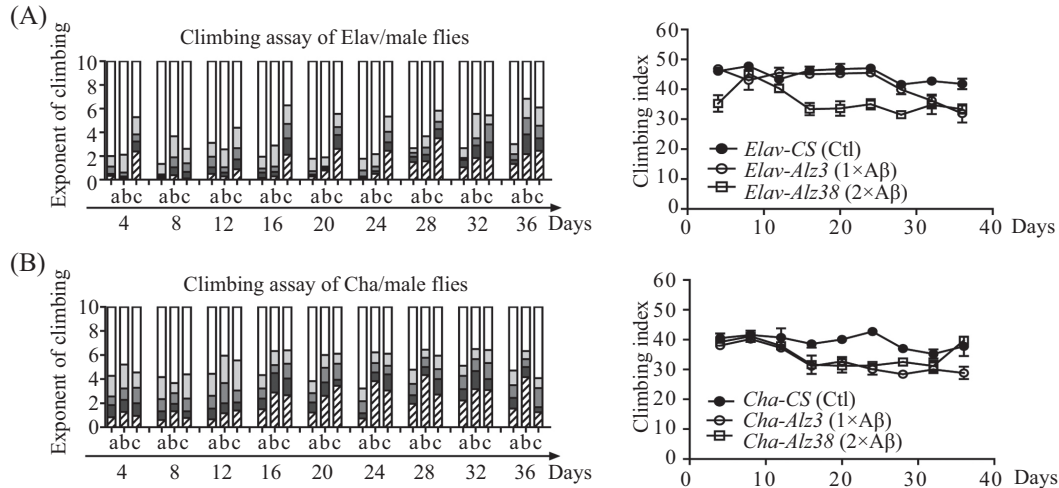


A: 果蝇的杂交方案,选取*Elav*或*Cha*处女蝇雌蝇与*CS*、*Alz3*或*Alz38*雄蝇杂交得到所需转基因AD果蝇; B: 所有品系转基因AD果蝇均能存活并且没有形态学上的缺陷; C: 运动能力指数检测及计算方法。右边柱状图中不同颜色代表左边试管中五等分的各部分,各部分的长度反映停留于该部分的果蝇只数。

A: the transgenic AD flies were generated by *Elav* or *Cha* virgin female crossed with *CS*, *Alz3* or *Alz38* male flies; B: all transgenic AD flies lines were viable and had no defects in morphology; C: calculation of Index of locomotivity. Length marked with different colours in column bar represented the number of flies stayed at the corresponding quintile of the vial.

图1 转基因AD果蝇的建立

Fig.1 Construction of transgenic AD flies

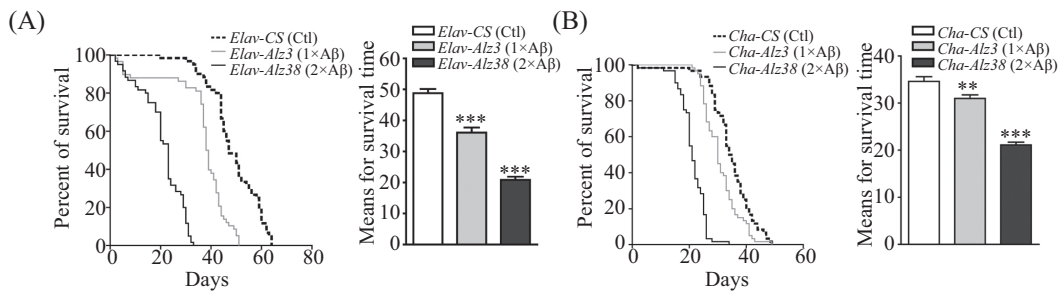


A: 与Elav-CS果蝇(a)相比, Elav-Alz3(b)和Elav-Alz38(c)的运动能力明显下降; B: 与Cha-CS(a)果蝇相比, Cha-Alz3(b)和Cha-Alz38(c)的运动能力明显下降。同一柱状图中不同颜色标记的长度代表五等分试管中各部分对应的果蝇只数。

A: locomotivity of *Elav-Alz3* (b) or *Elav-Alz38* (c) flies were significantly decreased compared to that of *Elav-CS* control flies (a); B: locomotivity of *Cha-Alz3* (b) or *Cha-Alz38* (c) flies were reduced compared to that of *Cha-CS* control flies (a). Length marked with different colours in column bar represented the number of flies stayed at the corresponding quintile of the vial.

图2 转基因AD果蝇运动能力下降

Fig.2 Locomotor function of transgenic AD flies was decreased



A: *Elav-Alz3*和*Elav-Alz38*转基因AD果蝇的寿命明显缩短; B: *Cha-Alz3*和*Cha-Alz38*果蝇寿命显著降低(*** $P < 0.001$, 与对照组相比; Two-tailed T Test). In comparison with control flies, life spans of *Elav-Alz3* and *Elav-Alz38* (A) or *Cha-Alz3* and *Cha-Alz38* (B) were reduced (*** $P < 0.001$; Two-tailed T Test).

图3 转基因AD果蝇寿命缩短

Fig.3 Life span of transgenic AD flies was decreased

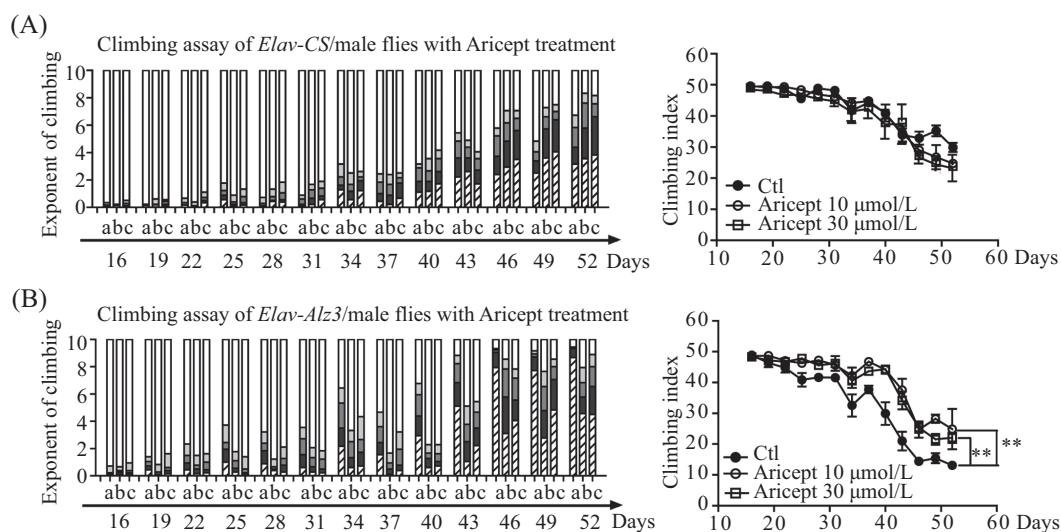
碱分解, 间接增加乙酰胆碱的含量, 从而改善AD的症状^[11-13]。安理申已被美国FDA批准上市, 用于治疗轻、中及重度AD。安理申在不同的转基因AD小鼠模型上均能缓解AD症状, 因此我们检测该药物在AD果蝇模型上的治疗效果, 从而评价该果蝇模型是否适用于AD治疗药物的疗效评价。不同浓度的安理申给药, 对Elav-CS对照果蝇的运动能力没有明显的影响(图4A); 而在Aβ42转基因果蝇中, 安理申给药可显著缓解Elav-Alz3果蝇的运动能力障碍(图4B)。

同时, 安理申给药也能延长Elav-Alz3果蝇的寿命(图5B), 而对Elav-CS对照组果蝇没有明显的影响(图5A)。安理申给药并未能延长表达两个拷贝Aβ42

的Elav-Alz38的寿命(图5C), 其原因可能与表达两个拷贝Aβ42对果蝇寿命的影响过于严重, 以至于药物治疗无法逆转有关。

2.5 安理申给药能延长Cha-Alz38寿命

我们同样检测了安理申在胆碱能神经元中表达Aβ42的AD果蝇中的治疗效果。与Elav果蝇不同, 安理申给药不能改善Cha-Alz3和Cha-Alz38果蝇的爬管能力, 其原因可能与Cha-Gal4驱动在果蝇的运动神经元中表达大量Aβ42, 从而对果蝇的运动能力造成了过于严重且不可逆转的损伤有关。有意思的是, 安理申给药仍能延长Cha-Alz38果蝇的寿命(图6B), 而对Cha-CS果蝇基本无影响, 甚至高浓度给药时有一定毒性(图6A)。

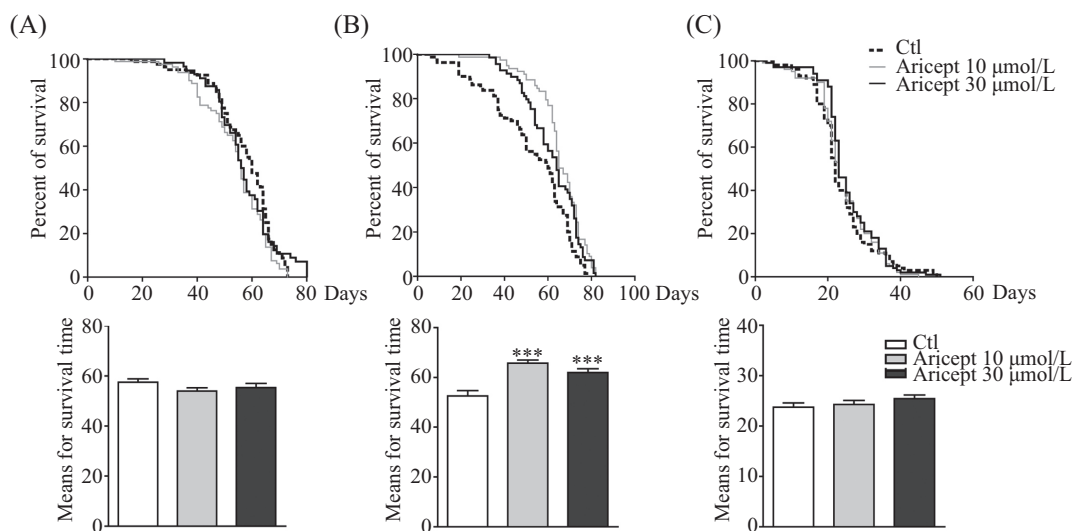


A: *Elav-CS*果蝇在安理申给药后运动能力检测; B: *Elav-Alz3*果蝇在安理申给药后运动能力检测。a: 0 $\mu\text{mol/L}$; b: 10 $\mu\text{mol/L}$; c: 30 $\mu\text{mol/L}$, 同一柱状图中不同颜色标记的长度代表五等分试管中各部分对应的果蝇只数。*** $P < 0.01$, 与对照组相比较。

Influence of Aricept on locomotor function of *Elav-CS* (A) and *Elav-Alz3* (B) flies. a: 0 $\mu\text{mol/L}$; b: 10 $\mu\text{mol/L}$; c: 30 $\mu\text{mol/L}$. Length marked with different colours in column bar represented the number of flies stayed at the corresponding quintile of the vial. *** $P < 0.01$ vs Ctl group.

图4 安理申对*Elav-Alz3*的运动能力缺陷的治疗作用

Fig.4 Therapeutic effects of Aricept on the locomotor defect of *Elav-Alz3* flies



安理申对*Elav-CS*(A)、*Elav-Alz3*(B)和*Elav-Alz38*(C) 的寿命影响。*** $P < 0.001$, 与对照组相比较。

Influence of Aricept on life spans of *Elav-CS* (A), *Elav-Alz3* (B) and *Elav-Alz38* (C) flies. *** $P < 0.001$ vs Ctl group.

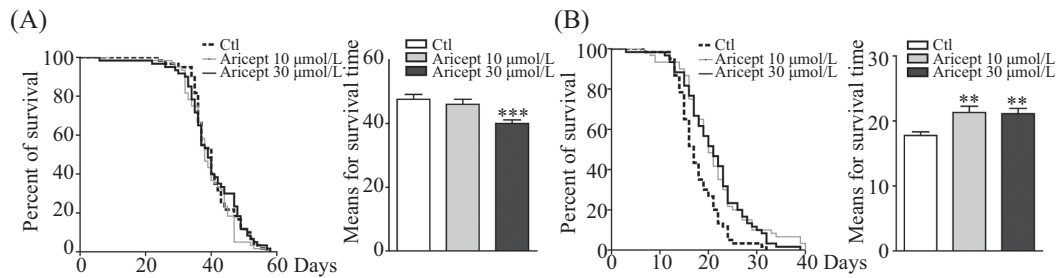
图5 安理申给药延长*Elav-Alz3*果蝇寿命

Fig.5 Life span of *Elav-Alz3* transgenic flies was increased with Aricept treatment

2.6 DOR受体拮抗剂naltrindole(NTI)给药能改善*Elav-Alz3*果蝇运动能力并延长其寿命

综合上述研究结果, 全神经元中表达一个拷贝的A β 42的*Elav-Alz3*果蝇的运动能力障碍及寿命缩短比较缓和, 而且在安理申药物治疗中的表现出较为稳定的治疗窗口, 因而我们选用*Elav-Alz3*果蝇作为AD治疗药物的初筛模型。为了进一步验证该果蝇模型的可靠性, 我们在*Elav-Alz3*果蝇上检测了

DOR受体拮抗剂naltrindole(NTI)的疗效。先前的研究已经证明, 在A β 前体蛋白(APP)转基因小鼠上, δ 阿片受体(DOR)促进了BACE1和 γ 分泌酶对APP的剪切, 进而促进了A β 的产生。而NTI拮抗DOR受体能够降低分泌酶的活性, 减少A β 的产生, 进而缓解由于A β 毒性引起的行为能力的缺陷^[10]。实验结果显示, 30 $\mu\text{mol/L}$ DOR受体拮抗剂naltrindole给药能缓解*Elav-Alz3*果蝇运动能力的缺陷, 且与报道剂量相

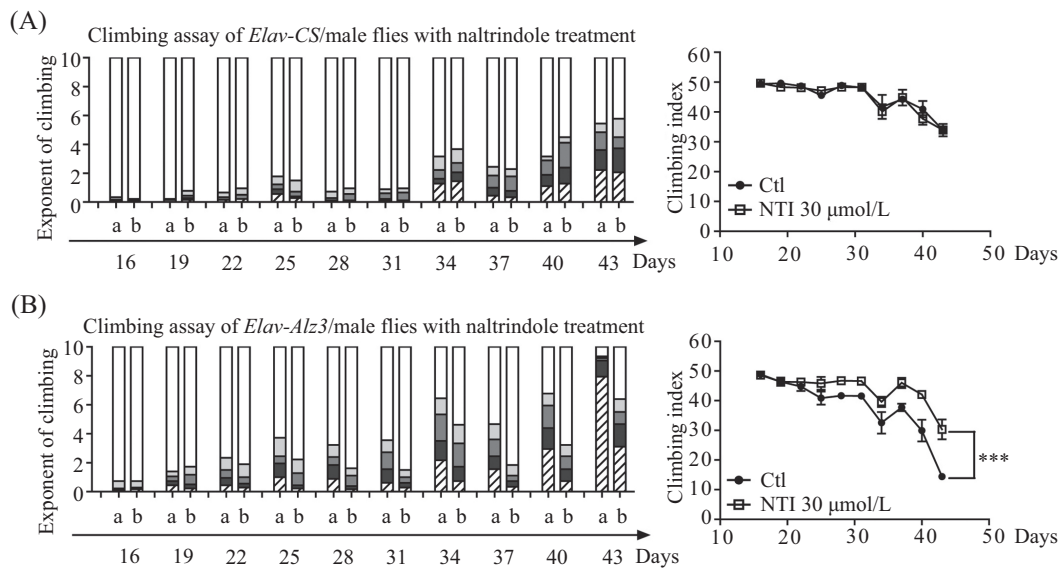


安理申对*Cha-CS*(A)和*Cha-Alz38*(B)果蝇寿命的影响。*** $P < 0.001$, 与对照组相比较。

Influence of Aricept on life span of *Cha-CS* (A) and *Cha-Alz38* (B) flies. *** $P < 0.001$ vs Ctl group.

图6 安理申延长*Cha-Alz38*果蝇的寿命

Fig.6 Life span of *Cha-Alz38* transgenic flies was increased with Aricept treatment

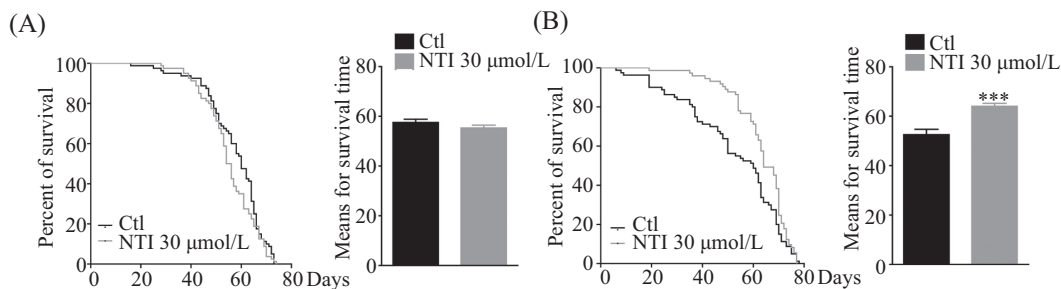


A: *Elav-CS*果蝇在NTI给药后运动能力检测; B: *Elav-Alz3*果蝇在NTI给药后运动能力检测。a: 0 μmol/L; b: 30 μmol/L。同一柱状图中不同颜色标记的长度代表五等分试管中各部分对应的果蝇只数。*** $P < 0.001$, 与对照组相比较。

Influence of NTI on locomotor function of *Elav-CS* (A) and *Elav-Alz3* (B) flies. a: 0 μmol/L, b: 30 μmol/L. Length marked with different colours in column bar represented the number of flies stayed at the corresponding quintile of the vial. *** $P < 0.001$ vs Ctl group.

图7 NTI对*Elav-Alz3*的运动能力缺陷的治疗作用

Fig.7 Therapeutic effects of NTI on the locomotor defect of *Elav-Alz3* flies



NTI对*Elav-CS*(A)和*Elav-Alz3*(B)的寿命影响。*** $P < 0.001$, 与对照组相比较。

Influence of NTI on life spans of *Elav-CS* (A) and *Elav-Alz3* (B) flies. *** $P < 0.001$ vs Ctl group.

图8 NTI给药延长*Elav-Alz3*果蝇寿命

Fig.8 Life span of *Elav-Alz3* transgenic flies was increased with NTI treatment

当(图7B),而对对照组果蝇没有明显的影响(图7A)。

同样,我们发现NTI给药后, *Elav-Alz3*果蝇的寿命也能显著延长(图8B),而对*Elav-CS*果蝇没有明显作用(图8A)。

3 讨论

目前,对于AD的研究使用最多的是转基因AD小鼠模型。与高等动物模型相比,转基因果蝇模型有着很多独特的优势,如:(1)果蝇生命周期短,一般为2~3个月;(2)饲养成本低廉,繁殖迅速,短时间内通过杂交可以获得大量子代;(3)遗传背景清晰,只有4对染色体,并且可以携带多种平衡子作为遗传操作的标记。与单细胞生物或者细胞系相比,果蝇有着复杂的神经系统和脑组织,适合作为多种神经系统疾病的动物模型。果蝇的神经退行性疾病模型与人类神经退行性疾病有着很多类似的表型,如疾病的进程性和神经系统的高毒性;也有利用转基因AD果蝇模型研究APP剪切的最终产物A β 的毒性作用^[14],所以运用转基因果蝇研究AD是非常有潜力的方法。此外,果蝇大脑中阻止药物到达中枢神经系统的脑屏障很弱,使之可能成为大规模筛选中枢神经系统疾病治疗药物的体内模型^[15]。

在本研究中,无论在全神经元还是在胆碱能神经元特异性表达A β 42均可导致果蝇在行为和寿命上与对照组存在显著差异,且表达两个拷贝A β 42的果蝇无论是行为学还是在寿命上均比仅表达一个拷贝A β 42的果蝇症状明显,体现了良好的量效关系,说明A β 42的转基因果蝇均可以模拟AD症状,为筛选治疗药物提供了工具。而在药物筛选过程中,A β 42的表达部位和表达量对病理改变的影响程度不同,可能导致药物筛选窗口的变化。在全神经元表达单拷贝A β 42的*Elav-Alz3*果蝇中,安理申的给药有效缓解了其行为能力的下降(图4B),且延长了寿命(图5B)。但对于表达两个拷贝A β 42的*Elav-Alz38*果蝇而言,安理申并没有表现出类似的治疗作用(图5C),这可能是由于高表达量的A β 42具有较大的毒性,安理申的给药不足以缓解由此引发的损伤。同样,在胆碱能神经元特异性表达A β 42的模型中,安理申的给药能延长AD果蝇的寿命(图6B),但并不能缓解该AD果蝇的运动能力缺陷,这可能是由于不同组织特异性地表达A β 最终导致的症状的严重程度不同。另外,寿命检测是一个较为简单检测方法,而

行为运动能力所涉及到的检测过程相对复杂,因而在选择药物筛选模型时要综合评价各方面指标。我们的实验结果发现, *Elav-Alz3*果蝇具有相对明显而适中的表型,在药物疗效鉴定中能显示稳定的疗效窗口,可以作为AD治疗药物的初筛模型,可为寻找治疗AD新药提供便捷的新工具。

参考文献 (References)

- 1 Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. J Biol Chem 1986; 261(13): 6084-9.
- 2 Selkoe DJ. Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. Nat Cell Biol 2004; 6(11): 1054-61.
- 3 Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. 1984. Biochem Biophys Res Commun 2012; 425(3): 534-9.
- 4 Creed MC, Milgram NW. Amyloid-modifying therapies for Alzheimer's disease: Therapeutic progress and its implications. Age (Dordr) 2010; 32(3): 365-84.
- 5 Pleckaityte M. Alzheimer's disease: A molecular mechanism, new hypotheses, and therapeutic strategies. Medicina (Kaunas) 2010; 46(1): 70-6.
- 6 Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. Nature 2000; 403(6765): 98-103.
- 7 Zheng WH, Bastianetto S, Mennicken F, Ma W, Kar S. Amyloid beta peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures. Neuroscience 2002; 115(1): 201-11.
- 8 Bilkei-Gorzo A. Genetic mouse models of brain ageing and Alzheimer's disease. Pharmacol Ther 2014; 142(2): 244-57.
- 9 Lenz S, Karsten P, Schulz JB, Voigt A. *Drosophila* as a screening tool to study human neurodegenerative diseases. J Neurochem 2013; 127(4): 453-60.
- 10 Teng L, Zhao J, Wang F, Ma L, Pei G. A GPCR/secretase complex regulates beta- and gamma-secretase specificity for Abeta production and contributes to AD pathogenesis. Cell Res 2010; 20(2): 138-53.
- 11 Cutuli D, De Bartolo P, Caporali P, Tartaglione AM, Oddi D, D'Amato FR, et al. Neuroprotective effects of donepezil against cholinergic depletion. Alzheimers Res Ther 2013; 5(5): 50.
- 12 Dong H, Yuede CM, Coughlan CA, Murphy KM, Csernansky JG. Effects of donepezil on amyloid-beta and synapse density in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. Brain Res 2009; 1303: 169-78.
- 13 Capsoni S, Giannotta S, Stebel M, Garcia AA, De Rosa R, Villetti G, et al. Ganstigmine and donepezil improve neurodegeneration in AD11 antinerve growth factor transgenic mice. Am J Alzheimers Dis Other Dement 2004; 19(3): 153-60.
- 14 Iijima K, Iijima-Ando K. *Drosophila* models of Alzheimer's amyloidosis: the challenge of dissecting the complex mechanisms of toxicity of amyloid-beta 42. J Alzheimers Dis 2008; 15(4): 523-40.
- 15 Bilen J, Bonini NM. *Drosophila* as a model for human neurodegenerative disease. Annu Rev Genet 2005; 39: 153-71.