

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento de Biología Molecular

TRUNCACIÓN DE GSK-3 POR
CALPAÍNA:
IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS Y
PATOLÓGICAS

TESIS DOCTORAL

Paloma Goñi Oliver

Madrid, 2009



Departamento de Biología Molecular
Universidad Autónoma de Madrid

Madrid, 30 de Abril de 2009

Félix Hernández Pérez, Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular del Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid

INFORMA

Que la presente tesis doctoral titulada *“Truncación de GSK-3 por calpaina: implicaciones fisiológicas y patológicas”* ha sido realizada bajo mi dirección por *Dña Paloma Goñi Oliver*. Considero que el trabajo reviste las características de originalidad y calidad científica requeridas para ser defendido como Tesis Doctoral para optar al Grado de Doctor.

El director de la tesis.

Dr. Félix Hernández Pérez

A mis padres
A mi hermano Mateo
A mis abuelos

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar las gracias a todas aquellas personas que me han acompañado durante estos años y han hecho posible la realización de esta tesis.

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mi director de tesis Félix Hernández por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis e iniciarme en la investigación. También por su apoyo, su constante paciencia y su optimismo contagioso. ¡Muchísimas gracias!

También me gustaría agradecer a Jesús Ávila por haberme acogido en su laboratorio y en su grupo. Tampoco quisiera olvidar a Pilar Gómez Ramos y a Asunción Morán porque me han introducido en el mundo de la Microscopía Electrónica. Y a Jose J. Lucas por sus consejos científicos y dejarme utilizar la cámara CCD.

Quiero agradecer también la ayuda prestada por todo el personal del CBM, en especial de los servicios de Microscopía (la infinita paciencia de Vero y de Maite, siempre dispuestas a explicar cualquier duda) y del Animalario.

También tengo que dar las gracias a todos los compañeros del labo, aunque algunos ya no estén, cuya compañía ha hecho que todos estos años aquí hayan sido muy especiales para mí, y sin vuestras bromas, risas y comentarios el día a día sería mucho más difícil.

En primer lugar, Elenita, que fuiste la primera persona que conocí en este laboratorio y me enseñaste, siempre con una sonrisa, la mayoría de las técnicas que he aprendido. Por eso, cuando hay diversidad de opiniones en el laboratorio sobre algún protocolo, yo siempre defiendo el “Método Elenita”. ¡Te voy a echar mucho de menos! ¡Muchas gracias y mucha suerte en tu nuevo labo!

Siguiendo con la gente que ya no está, pero su paso por el laboratorio ha dejado huella, no puedo olvidarme de Adriana, Cristina, que fuiste la primera persona del labo con la que empecé a hablar de música e intercambiar CDs; Eva y Tobías (Tobi), quien me enseñó a trabajar en el Animalario y me dejó en herencia 1000 ratones, siempre dispuesto a compensar cualquier favor con unas cervezas. Y por último, a Miguel, por tus risas e historias: ¡alpargata!, ¡descampado!

Y, por supuesto, a todos los que seguís en el laboratorio agradeceremos vuestra paciencia con mi estado de no-presencia en estos últimos meses. Quiero agradecer su compañía, ayuda, consejos, comentarios y risas a Nuria, Laura (la risueña salvajona minimalista), las chilenas Zahady y Carola (¡espero verte pronto de vuelta!). También a Esther, que haces el laboratorio mucho más ameno con tus sustos y risas. Mil gracias a Raquel Cuadros, también de las primeras personas que conocí y fundamental para que el laboratorio se mantenga en pie y en orden. También a Mar, compañera de risas con Raquel, por su constante simpatía, aunque claro siendo de Hortaleza... No puedo olvidarme de Santi, que es un auténtico cielo, siempre dispuesto a ayudar, ¡muchas gracias por tu gran paciencia informática!

Isma, siempre haciendo bromas, pero dispuesto a dejar todo lo que esté haciendo para ayudar o... hacer alguna foto, ¡como el clásico de Paloma Curring!

Muchísimas gracias también a Thorsten, el guiri majo, por toda su gran ayuda en esta tesis y ánimos en los momentos bajos. *Du bist eine Wolke!*

Alberto, el veterano, también de los primeros que conocí y que me echó de su sitio. Eres una persona muy especial para mí, a la que aprecio muchísimo, me encantan tus chistes y soy la fan nº 1 del chiste del bar de pinchos.

También gracias a las “niñas”: Almu, la nueva heredera de los 1000 ratones, a la que siempre defiendo cuando se meten con ella en el labo. ¡No les hagas caso, no eres tan desastre! Elena T, una de las personas más buenas que conozco, aunque sus ratones sean feos. Y Patri, la mujer de rojo, aprendiz de mujer fatal.

Y por último, Ali (Zipi), Elena G y Marta, verdaderas amigas que he conocido haciendo esta tesis. Ya sólo por conocerlos habrían merecido la pena todos estos años. Ali, mi compañera y amiga de escritorio, fuiste muy importante para mí en momentos muy difíciles que no me imagino cómo los habría pasado sin ti, muchas gracias por haber estado ahí. Elena, la mítica supersónica, mi compañera de salir y de fiesta y, ya de paso, del laboratorio; algún día montaremos alguno de los negocios que se nos ocurren. Muchas gracias por todos los momentos que hemos pasado juntas. Y, por supuesto, Marta, también compañera de fiestas y festivales, muchas gracias también por todo y... ¡por venir conmigo al concierto de Budapest! Muchísimas gracias a las tres por todo: conocerlos ha sido genial, pero no tengo espacio para deciros todo lo que os merecéis.

Por supuesto, no se me olvidan las chicas del labo de al lado, siempre pidiéndoos cosas, muchas gracias también por ser tan simpáticas: Desi, Charo, que es la persona más sonriente del CBM, Cris, Zaira y Raquelina, ¡ese Torremolinos 2005!

Tampoco se me olvidan los del 119, Filip, las dos Maites, Chus, Vega y Anita.

Quiero también agradecer a toda la gente del CBM, que habéis contribuido a hacer tan buen ambiente y venir contentos a trabajar, salir a tomar algo, viajar juntos, ¡lo que haga falta! Sois todos un encanto y “desbordáis radiante simpatía”: Héctor, Olga, Diana, Ana Franco, Alejandro, Laura Contreras junto con toda la gente del laboratorio de Elisa (antiguo 450) e Inma, mi compi de Pilates, ¡espero visitarte en Bristol! Y, bueno, muchos más que me dejo...

También quiero agradecer a todos mis amigos, con los que he compartido estos últimos años. La gente de Biología y de Bioquímica: Gema y Miguel, Javi, echo de menos nuestras conversaciones a la puerta del Mondo; Javi Médico, por tu ayuda con Hacienda; mis compañeras de viajes Pilar y Laura, por esas noches a orillas del Jónico. Laura, aunque me engañes metiéndome en bares de flamenco, te aprecio muchísimo y también fuiste muy importante para mí en momentos difíciles, muchísimas gracias. Y no me puedo olvidar tampoco de mis compañeras de conciertos Raquel Conciertos, Vane y Elisa, por compartir tantos momentos y tanta música conmigo. Bueno, Elisa, mi supercompi de todo, Biología, Bioquímica, la tesis en el CBM, de fiesta, conciertos, festivales, viajes...etc. ¡Eres una amiga genial y además eres capaz de hablar con las piedras y debajo del agua a la vez! También, gracias a Rob por cuidarla y ser tan encantador.

Por último a mi amigo más antiguo y al que quiero muchísimo, Boby. Muchísimas gracias simplemente por ser mi amigo, ¡eres lo mejor!

Tampoco quisiera olvidar a dos personas que fueron muy importantes para mí en el comienzo de esta tesis, Javi, por aguantar escuchándome durante horas ya sea bien de la GSK-3 y mis cultivos o bien de Proust y su Tiempo Perdido; y David, por el número 13 y un millón de cosas más.

Por supuesto, no podría olvidar a mi familia por su ayuda y apoyo. Muchísimas gracias, por vuestra paciencia y estar siempre ahí, a mi madre y a mi padre. También a mi hermano Mateo ¡porque siempre viene bien hacer un descanso para jugar! También dar las gracias a mis dos abuelas y a la madrina (mi tercera abuela). Y, por último, a todos mis tíos/ as y primos/ as, en especial a mi primi Elena. Y... ¡no me puedo olvidar de mi Freya!

Resumiendo, quiero agradecer a toda la gente que habéis estado conmigo durante todos estos últimos años y también a los que solo habéis estado en momentos puntuales, como Aga (*Piwo, It's the only word I know in Polish*) o Matt (*grandma shaker*), pero me habéis hecho sonreír. ¡Muchas gracias!

Y para finalizar, gracias a Marcel Proust por haber escrito En busca del Tiempo Perdido y sobre todo por haberlo encontrado en El Tiempo Recobrado. Porque su lectura también ha sido muy importante para mí y me ha acompañado durante este tiempo. ¡Gracias Proust!

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	i
ÍNDICE	v
ABREVIATURAS	xi
SUMMARY	xvii

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. GLUCÓGENO SINTASA QUINASA 3 (GSK-3)	3
1.1.1. Estructura de GSK-3	5
1.1.2. Regulación de GSK-3	5
1.1.2.1.Regulación por fosforilación	5
1.1.2.2.Regulación por formación de complejos proteicos	9
1.1.2.3.Regulación por localización intracelular	11
1.1.2.4.Recambio de GSK-3	12
1.1.3. Funciones de GSK-3	12
1.1.3.1. GSK-3 en el sistema nervioso central	13
• <i>Regulación de la arquitectura y movilidad celular</i>	13
• <i>Consolidación de la memoria</i>	15
• <i>Regulación de la supervivencia celular</i>	16
1.1.4. Implicación de GSK-3 en patologías	18
1.2. CALPAÍNA	18
1.2.1. Estructura de la Calpaína	19
1.2.2. Regulación de la Calpaína	21
1.2.2.1.Regulación por unión a calcio	21
1.2.2.2.Regulación por unión a su inhibidor fisiológico	22
1.2.2.3.Regulación por fosforilación	23
1.2.3. Funciones de la Calpaína	23
1.2.3.1. La Calpaína en el sistema nervioso central	24
1.2.4. Implicación de la Calpaína en patologías	27

2. OBJETIVOS	29
3. MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1. MATERIALES	35
3.1.1. Reactivos	35
3.1.2. Anticuerpos	35
3.1.3. Plásmidos	37
3.1.4. Animales utilizados	37
3.1.5. Muestras humanas	37
3.2. MÉTODOS	38
3.2.1. Ensayo <i>in vitro</i> de la calpaína	38
3.2.2. Tratamiento de muestras de muestras de cerebro de ratón o humanas con calcio e inhibidoras de proteasas	39
3.2.3. Ensayo de actividad enzimática de GSK-3	39
3.2.4. <i>Pull-down</i>	40
3.2.5. Desfosforilación de proteínas con la fosfatasa- λ	41
3.2.6. Secuenciación de GSK-3 β truncada por calpaína	41
3.2.7. Construcción del plásmido de GSK-3 β truncada	42
3.2.8. Mantenimiento de líneas celulares	43
3.2.9. Transfección de líneas celulares	43
3.2.10. Cultivos primarios neuronales corticales	44
3.2.11. Extractos proteicos	45
3.2.12. Electroforesis, electrotransferencia e inmuno- detección (<i>Western blot</i>)	46
3.2.13. Inmunofluorescencia de cultivos celulares	46
3.2.14. Inmunohistoquímica	47
3.2.15. Tinción con Fluoro Jade	48
3.2.16. Tratamiento de los animales	48
3.2.16.1. Tratamiento de ratas con kainato	48
3.2.16.2. Análisis <i>post-mortem</i> de la truncación de GSK-3 y tratamiento de ratones con MDL 28170	48
3.2.17. Análisis estadístico	49

4. RESULTADOS	51
4.1. GSK-3 es cortada por calpaína en extractos cerebrales	53
4.2. La forma truncada de GSK-3 tiene mayor actividad enzimática que la forma intacta	54
4.3. La calpaína corta a GSK-3 α y a GSK-3 β en el extremo N-terminal	55
4.4. Las formas truncadas de GSK-3 α y GSK-3 β son quinasas activas	57
4.5. La truncación de GSK-3 β es independiente del dominio Ser-9	59
4.6. La truncación de GSK-3 β impide su unión a 14-3-3 ζ	60
4.7. Identificación del sitio de corte de la calpaína en GSK-3 β	62
4.8. Transfección de células COS-7 con el plásmido GSK-3 β -Fragmento II	64
4.9. IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS	67
4.10.1 Un incremento en la concentración de calcio intracelular induce proteólisis de GSK-3 mediante activación de calpaína en cultivos primarios de corteza	67
4.10.2 Estimulación glutamatérgica	67
4.10.3 Truncación de otros sustratos de la calpaína en cultivos primarios corticales tratados con NMDA	70
4.10.4 Aumento de la actividad quinasa GSK-3 en cultivos primarios corticales tratados con NMDA	70
4.10.5 Fosforilación de Tau mediada por NMDA. Implicación de la calpaína	70
4.10.6 Disminución de los niveles de GSK-3 producida por estimulación prolongada de los receptores de NMDA	72
4.10.7 La truncación de GSK-3 por calpaína vía receptores de NMDA se produce por calcio extracelular	72
4.10. IMPLICACIONES PATOLÓGICAS	73
4.10.1 Truncación de GSK-3 mediada por calpaína en un modelo animal de epilepsia por inducción con kainato	74

4.10.1 Neurodegeneración en el hipocampo tras la inducción de epilepsia	74
4.10.2. Activación de calpaína en hipocampo tras la inducción de epilepsia	76
4.10.3. Proteólisis de GSK3 tras la inducción de epilepsia	78
4.10.2. Truncación de GSK-3 vía calpaína en muestras de cerebro <i>post-mortem</i>	82
4.10.3.1. Degradación <i>post-mortem</i> de GSK-3 en muestras de ratón	82
4.10.3.2. Truncación de GSK-3 por calpaína en muestras humanas	85
4.10.3. Análisis de la truncación de GSK-3 en la enfermedad de Alzheimer	87
4.10.3.1. Truncación de GSK-3 en muestras humanas de Alzheimer	87
4.10.3.2. Inhibición por memantina de la truncación de GSK-3 mediada por calpaína	88
5. DISCUSIÓN	91
5.1. El extremo N-terminal de GSK3 es proteolizado por calpaína	93
5.2. Implicaciones fisiopatológicas de la truncación de GSK-3	101
6. CONCLUSIONES	107
7. BIBLIOGRAFÍA	111
8. ANEXO	131

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AA: Angiopatía Amiloide
A β : *Amyloid β -peptide* / Péptido β Amiloide
AIF: *Apoptosis Inducing Factor* / Factor Inductor de Amiloide
AMP: *Adenosine monophosphate* / Adenosina monofosfato.
AMPc: *cyclic adenosine monophosphate* / Adenosina monofosfato cíclica.
AMPA: *alpha-amino-3hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid* / Ácido alfa-amino-3hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico
Apaf-1: *Apoptosis protease-activating factor-1* / Factor de Activación de proteasas apoptóticas 1
APC: *Adenomatous polyposis coli gene product* / Proteína de la poliposis adenomatosa de colon
AP-1: *Activator Protein-1* / Proteína activadora 1
APP: *Amyloid Precursor Protein* / Proteína Precursora de Amiloide
Ara-C: *Arabinofuranosylcytosine* / Arabinofuranosilcitosina
ATP: *Adenosine triphosphate* / Adenosina trifosfato
 β -cat: β -catenina
BSA: *Bovine Serum Albumin* / Seroalbúmina Bovina
C-terminal: Carboxi terminal
CA: Cuerno de Ammon
CaMK: *Calcium/ Calmodulin-dependent protein Kinase* / Proteína Quinasa dependiente de Calcio/ Calmodulina
CDK-5: *Cyclin-Dependent Kinase 5* / Quinasa Dependiente de Ciclina 5
C/EBP α : *CCAAT/enhancer binding protein* / Proteína de unión al potenciador CCAAT
CK-I: *Casein Kinase I* / Caseína Quinasa I
CK-II: *Casein Kinase II* / Caseína Quinasa II
CREB: *Cyclic AMP Response Element Binding Protein* / Proteína de unión al elemento de respuesta a AMP cíclico
CRMP: *Collapsin Response Mediator Protein* / Proteína mediadora de respuesta a colapsina
Cx: *Cortex* / Corteza
DF3/MUC1: *high molecular weight mucin-like glycoprotein* / Glicoproteína similar a la mucina de alto peso molecular
DISC-1: *Disrupted in Schizophrenia 1* / Proteína afectada en Esquizofrenia 1
DIV: *Days in vitro* / Días *in vitro*
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* / Medio Eagle modificado de Dulbecco
DMSO: *Dimethyl sulfoxide* / Dimetilsulfóxido
DNA: *Deoxyribonucleic Acid* / Ácido Desoxirribonucleico
DTT: *Dithiothreitol* / Ditiotreitól
Dvl: *Dishevelled*
EA: Enfermedad de Alzheimer
ECL: *Enhanced Chemiluminescent* / Sustrato quimioluminiscente
EDTA: *Ethylenediaminetetracetic acid* / Ácido Etildiaminotetracético
EGTA: *Ethylenglycoltetracetic* / Ácido Etilenglicoltetracético
eIF2B: *eukaryotic initiation factor 2B* / Factor de Iniciación Eucariótico 2B
eIF4G: *eukaryotic initiation factor 4G* / Factor de Iniciación Eucariótico 4G
ERK: *Extracellular signal Regulated Kinase* / Quinasa regulada por señal extracelular
FBS: *Foetal Bovine Serum* / Suero Fetal Bovino
FRAT: *Frequently Rearranged in Advanced T cell lymphocytes* / Frecuentemente Reordenado en linfocitos T avanzados
Fz1-R: *Frizzled Receptor* / Receptor de Frizzled
GAP-43: *Growth Associated Protein-43* / Proteína Asociada al crecimiento 43
GBP: *GSK-3 Binding Protein* / Proteína de unión a GSK-3
GFAP: *Glial Fibrillary Protein* / Proteína Glial Fibrilar
GluR1: Receptor de AMPA 1

GRIP: *Glutamate Receptor Interacting Protein* / Proteína de Interacción con el Receptor de Glutamato

GS-1: *Glycogen Synthase 1* / Glucógeno Sintasa 1

GSK-3: *Glycogen Synthase Kinase 3* / Glucógeno Sintasa Quinasa 3

GST: *Glutathione-S-Transferases* / Transferasas de Glutacion

HA: *Hemmagglutinin* / Hemaglutinina

HEPES: *N-(2-hydroxyetil)-piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)* / N-(2-hidroxietil)-piperacina-N'-(2-ácido etanolsulfónico)

Hh: *Hedgehog*

HIF-1: *Hypoxia-inducible factor-1* / Factor inducible por Hipoxia 1

Hipp: *Hippocampus* / Hipocampo

hnRNP: *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein* / Ribonucleoproteína nuclear heterogénea

htt: Huntingtina

HSF-1: *Heat shock factor-1* / Factor de choque térmico 1

Hsp90: *Heat shock protein 90* / Proteína de choque térmico 90

IC₅₀: *Inhibitory Concentration* / Concentración Inhibitoria

IF: Inmunofluorescencia

IHQ: Inmunohistoquímica

ILK: *Interleukin Linked Kinase* / Quinasa unida a Integrina

IP₃: *Inositol triphosphate* / Inositol trifosfato

IP₃R: *Inositol triphosphate Receptor* / Receptor de Inositol trifosfato

i.p.: intraperitonealmente

IRS: *Insulin receptor substrate* / Sustrato del Receptor de Insulina

KA: *Kainic Acid* / Ácido Kainico

kDa: kilo Dalton

kb: kilobases

KRP: *kinase-related protein* / proteína relacionada con quinasas

LTD: *Long-Term Depression* / Depresión a largo plazo

LTP: *Long-Term Potentiation* / Potenciación a largo plazo

LRP5/6: *Low density Lipoprotein Receptor-related Protein 5/6* / Proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad 5/6

μ-calpaína: micro-calpaína

m-calpaína: mili-calpaína

MAP: *Microtubule Associated Protein* / Proteína Asociada a Microtúbulos

MAPK: *Mitogen Activated Protein Kinase* / Proteína Quinasa Activada por Mitógenos

Mash 1: *Mammalian Achaete-scute homolog 1* / Homólogo del *achaete-scute* de mamífero 1

MEK1: *MAP kinase kinase* / MAP quinasa quinasa

mGluR1α: *metabotropic Glutamate Receptor* / Receptor metabotrópico de Glutamato

mhtt: huntingtina mutante

MITF: *Microphthalmia-associated Transcription Factor* / Factor de transcripción asociado a Microftalmia

mNOS: *neuronal Nitric Oxide Synthase* / Óxido Nítrico sintasa neuronal

mRNA: *Messenger Ribonucleic Acid* / Ácido Ribonucleico mensajero

NB: *Neurobasal Medium* / Medio Neurobasal

NCAM: *Neural Cell Adhesion Molecule* / Molécula de Adhesión Celular Neuronal

NCX: *sodium-calcium exchanger* / Intercambiador de calcio-sodio

NES: *Nuclear Export Signal* / Señal de Exportación Nuclear

NF200, 160, 68: *Neurofilament Protein 200, 160, 68* / Proteína de Neurofilamento 200, 160, 68

NFAT: *Nuclear Factor of Activated T cells* / Factor Nuclear de células T Activadas

NF-κB: *Nuclear Factor κB* / Factor nuclear κB

NFP: *Axonal Neurofilament Protein* / Proteína de Neurofilamento axonal

NGF: *Nerve Growth Factor* / Factor de Crecimiento Nervioso

NMDA: *N-methyl-D-Aspartate* / N-Metil-D-Aspartato

NLS: *Nuclear Localization Signal* / Señal de Localización Nuclear

NR2A: Subunidad NR2A del receptor de NMDA

NR2B: Subunidad NR2B del receptor de NMDA
NR2C: Subunidad NR2C del receptor de NMDA
N-terminal / Amino Terminal
OCT: *Octreotide / Octreotide*
P: *Phosphate / Fosfato*
p90 RSK: p90 Ribosomal S6 Kinase / p90 Quinasa Ribosomal S6
PARP: *poly (ADP-ribose) polymerase / polimerasa poli (ADP-ribosa)*
PBS: *Phosphate-Buffered Saline / Solución Salina de Fosfato Tamponada*
PCR: *Polymerase Chain Reaction / Reacción en Cadena de la Polimerasa*
PKD: *Phosphoinositide-Dependent Kinase / Quinasa dependiente de fosfoinosítido*
PFA: *Paraformaldehyde / Paraformaldehído*
PI3K: *Phosphoinositide-3-Kinase / Fosfoinosítido-3-Quinasa*
PIP₂: *Phosphatidylinositol bisphosphate / Fosfatidil Inositol bifosfato*
PIP₃: *Phosphatidylinositol trisphosphate / Fosfatidil Inositol trifosfato*
PKA: *Protein Kinase A / Proteína Quinasa A*
PKB: *Protein Kinase B / Proteína Quinasa B*
PKC: *Protein Kinase C / Proteína Quinasa C*
PKM: *Protein Kinase M / Proteína Quinasa M*
PLC: *Phospholipase C / Fosfolipasa C*
PMCA: *Plasma Membrane Ca²⁺ ATPase / Ca²⁺ ATPasa de la membrana plasmática*
PMSF: *Phenylmethylsulphonyl Fluoride / Fluoruro de Fenilmetilsulfonato*
PP1: *Protein Phosphatase 1 / Proteína Fosfatasa 1*
PP2A: *Protein Phosphatase 2A / Proteína Fosfatasa 2A*
PrP^C: *Prion-related Peptide / Péptido relacionado con el Prión*
PrP^{Sc}: *Scrapie form of Prion-related Peptide / Forma scrapie del Péptido relacionado con el Prión*
PSD: *Postsynaptic Density / Densidad Postsináptica*
PSD95: *Postsynaptic Density-95 Protein / Proteína de la Densidad Postsináptica 95*
PYK2: *Proline-Rich Tyrosine Kinase 2 / Tirosinquinasa 2 Rica en Prolina*
RNA: *Ribonucleic Acid / Ácido Ribonucleico*
SAP-97: *Synapse-Associated Protein-97 / Proteína Asociada a la Sinapsis 97*
SDS: *Sodium Dodecyl Sulphate / Dodecil Sulfato Sódico*
SDS-PAGE: *SDS-Polyacrilamide Gel Electrophoresis / Gel de Electroforesis de Poliacrilamida con SDS*
SERCA: *sarcoplasmic/ endoplasmic reticulum calcium ATPase / Calcio ATPasa del retículo endoplásmico/ sarcoplásmico.*
SLS: sin lesiones
TCF: *T Cell Factor / Factor de células T*
TNF- α : *Tumor necrosis factor- α / Factor de necrosis tumoral α*
WB: *Western-Blot*
ZAK1: *Zaphod kinase 1 / Zaphod quinasa 1*

SUMMARY

SUMMARY

GSK-3 activity can be regulated by phosphorylation and through interaction with GSK-3-binding proteins; here we describe N-terminal proteolysis as a novel way to regulate GSK-3. GSK-3 α and GSK-3 β were truncated by calpain, generating two fragments of 40 and 30 kDa, a proteolytic process that was inhibited by specific calpain inhibitors. The 30 kDa fragment was originated by cleavage of the ⁴⁹Asp - ⁵⁰Arg peptide bond. These truncated isoforms were active kinases. We also found that lithium, a GSK-3 inhibitor, inhibits full-length and cleaved GSK-3 isoforms with the same IC₅₀ value. When cultured cortical neurons were exposed with ionomycin, glutamate, or NMDA, GSK-3 was truncated. This truncation was blocked by the calpain inhibitor calpeptin, at the same concentration at which it inhibits calpain-mediated cleavage of other well-known calpain substrates. Truncated GSK-3 forms did not accumulate, suggesting that a short-lived product is formed. GSK-3 truncation mediated by calpain prevents its binding to 14-3-3 ζ . In addition, overexpression of the truncated GSK-3 form ([50–420]-GSK-3 β) in COS-7 cells showed that the N-terminal is involved in nuclear import, since the truncated form is only present in the cytoplasm.

Then, we studied if GSK-3 truncation was involved in different pathological disorders where calpain is implicated. Thus, we found GSK-3 proteolysis in rat injected with kainate (10 mg/Kg) intraperitoneally, an epilepsy animal model. The CA1 hippocampal region was the area more susceptible.

Deregulation of GSK-3 activity is involved in the pathogenesis of Alzheimer disease. The data obtained with human Alzheimer disease samples suggest that truncated GSK-3 does not accumulate. We previously demonstrated that human samples with a post-mortem period of 7 h did not show significant GSK-3 proteolysis. However, memantine, an NMDA receptor antagonist which has been approved for the treatment of moderate-to-severe Alzheimer disease patients, was able to inhibit GSK-3 truncation induced by NMDA in primary cultures of cortical neurons in a dose dependent manner.

Together, our data demonstrate that calpain activation produces a truncation of GSK-3 that removes an N-terminal inhibitory domain. These data provide the first direct evidence that calpain promotes GSK-3 truncation in a way that has implications in signal transduction, and probably in pathological disorders such as epilepsy and Alzheimer disease.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

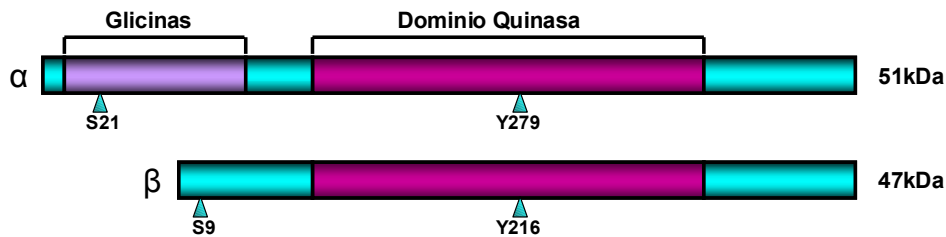
1.1 GLUCÓGENO SINTASA QUINASA 3 (GSK-3)

La enzima glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3) es una serina/ treonina quinasa que fosforila a numerosas proteínas y está implicada en numerosas rutas de señalización intracelular. Fue descubierta como una de las proteínas responsables de la fosforilación de la glucógeno sintasa (Cohen, 1985), de ahí su nombre. GSK-3 fue aislada por primera vez de músculo esquelético de conejo (Embi et al., 1980).

Existen varias isoformas de GSK-3, dos son formas altamente homólogas en mamíferos, GSK-3 α y GSK-3 β , codificadas por dos genes distintos (Woodgett, 1990). La isoforma GSK-3 β presenta una variante que se genera por *splicing* alternativo llamada GSK-3 β 2, la cual contiene el exón 8A, que está ausente en la forma mayoritaria. Esta variante se encuentra principalmente en el soma de las neuronas (Mukai et al., 2002). También existe otra variante de GSK-3 β que no contiene el exón 10. Esta forma es muy minoritaria, observándose principalmente en el cerebro (Schaffer et al., 2003). GSK-3 α tiene un peso molecular de 51 kDa, mientras que GSK-3 β es más pequeña con un peso molecular de 47 kDa (Woodgett, 1990). Las isoformas α y β presentan una homología de secuencia del 97% dentro de su dominio catalítico, pero se diferencian significativamente una de la otra fuera de esta región, presentando la isoforma α un dominio rico en glicinas en su extremo N-terminal (Esquema 1) (Woodgett, 1990). Ambas se expresan en todos los tejidos, aunque presentan niveles particularmente altos en cerebro y en los axones de las neuronas (Woodgett, 1990; Kim et al., 2006), siendo la isoforma GSK-3 β la forma mayoritaria en el sistema nervioso central. La presencia de las dos isoformas no es redundante, ya que la presencia de la isoforma α no es capaz de suplir la ausencia de la β . Este hecho fue constatado al observar que ratones carentes de GSK-3 β eran letales, y GSK-3 α no era capaz de rescatar la función de GSK-3 β (Hoefflich et al., 2000).

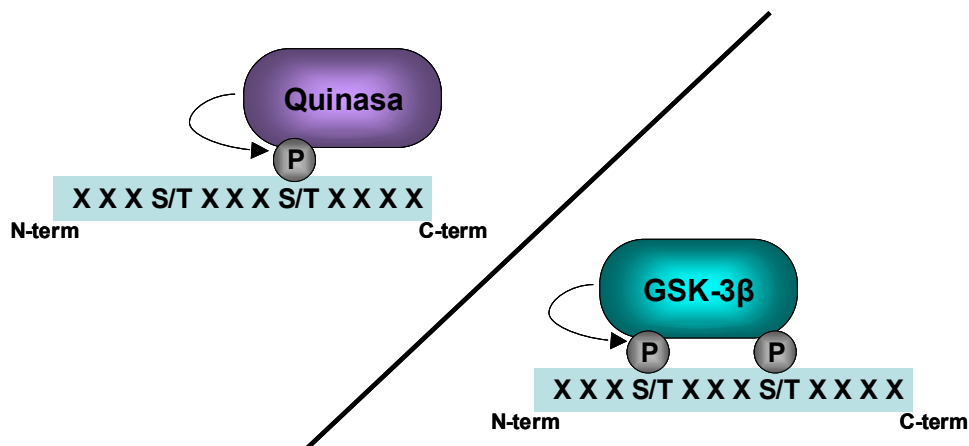
Aunque GSK-3 β está presente en todos los estadios del desarrollo, así como en el cerebro adulto, se ha observado en roedores que alcanza un pico de expresión en el cerebro durante las primeras semanas del desarrollo, disminuyendo considerablemente

sus niveles a partir del día 20 postnatal, coincidiendo con la terminación de la extensión dendrítica y la formación de sinapsis (Takahashi et al., 1994; Leroy and Brion, 1999). Por el contrario, la isoforma GSK-3 α se mantiene más o menos constante a lo largo de todo el desarrollo (Takahashi et al., 1994)



Esquema 1. Esquema de las isoformas de GSK-3, α y β . GSK-3 α tiene un peso molecular de 51 kDa y GSK-3 β de 47 kDa. Ambas isoformas presentan un dominio quinasa con una homología de secuencia del 97%. Sin embargo, la isoforma α presenta en su extremo N-terminal un dominio rico en glicinas del que carece la isoforma β . En el esquema también se indican los lugares de fosforilación de GSK-3: serina 21 y tirosina 279 en GSK-3 α , y serina 9 y tirosina 216 en GSK-3 β .

No existe una secuencia estricta para el reconocimiento de los sustratos, pero muchos de ellos, aunque no todos, necesitan una fosforilación previa (*priming*) por otras quinazas en una serina o treonina separada cuatro residuos del sitio de fosforilación de GSK-3, es decir en el motivo -S/T-X-X-X-S/T(P)-, lo cual posibilita su fosforilación por GSK-3 (Esquema 2).



Esquema 2. Fosforilación de GSK-3 en un sustrato pre-fosforilado previamente por otra quinasa. En primer lugar, una quinasa fosforila a su sustrato en una serina o treonina (imagen izquierda). A continuación, GSK-3 reconoce a dicho sustrato fosforilado, y actúa sobre una serina o treonina localizada cuatro residuos antes (dirección N-terminal) del sitio de fosforilación inicial (imagen derecha).

1.1.1 Estructura de GSK-3

La estructura del cristal de GSK-3 β presenta una conformación similar a la observada en otras quinasas. Sin embargo, el estudio cristalográfico de la proteína ha permitido explicar la preferencia de GSK-3 por los sustratos pre-fosforilados, así como su regulación por fosforilación en serina 9, que provoca la inhibición de la enzima, y en tirosina 216, que provoca su activación (Ver apartado 1.1.2).

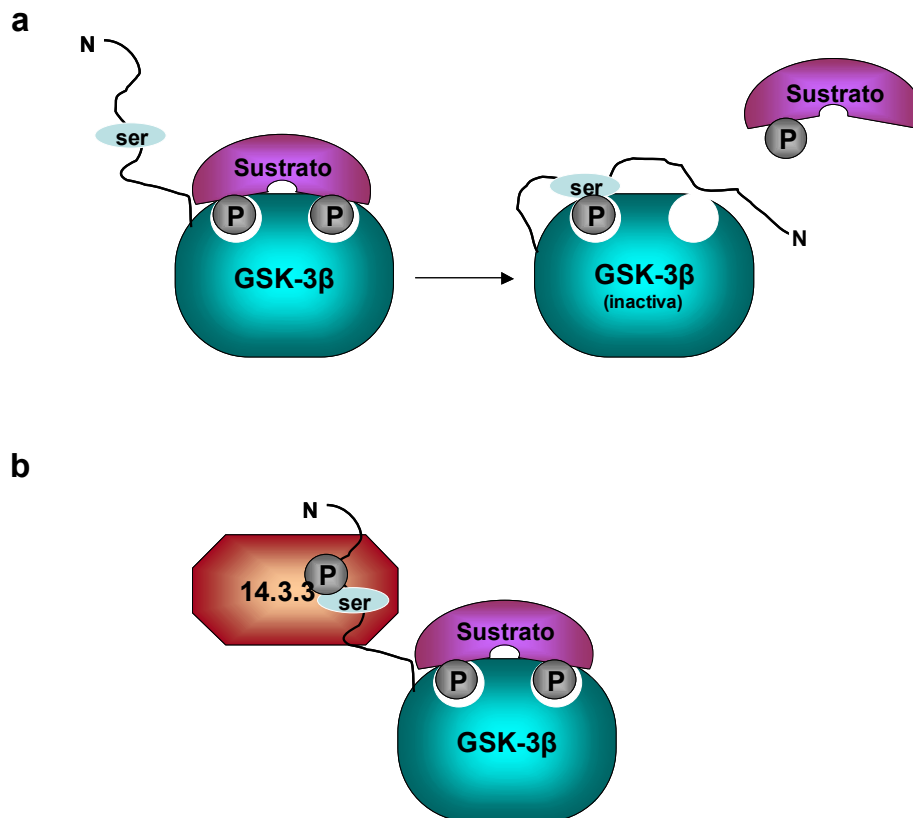
GSK-3 β presenta los dos dominios típicos de las quinasas: un dominio β -lámina en el extremo N-terminal (comprende los residuos 25 al 138) y un dominio α -hélice en su extremo C-terminal (residuos 139 a 343). Entre ambos, se encuentra el sitio de unión a ATP, bordeado por una zona rica en glicinas. El sitio activo se encuentra entre los aminoácidos 200 a 226, mientras que los residuos arginina 96, arginina 180 y lisina 205 van a ser los responsables de la unión del fosfato primario del sustrato, favoreciendo su unión al sitio activo de la quinasa (Dajani et al., 2001; ter Haar et al., 2001).

1.1.2. Regulación de GSK-3

GSK-3 se regula por diferentes mecanismos, entre ellos, fosforilación, tanto de la propia quinasa como de sus sustratos, formación de complejos multiproteicos y localización subcelular.

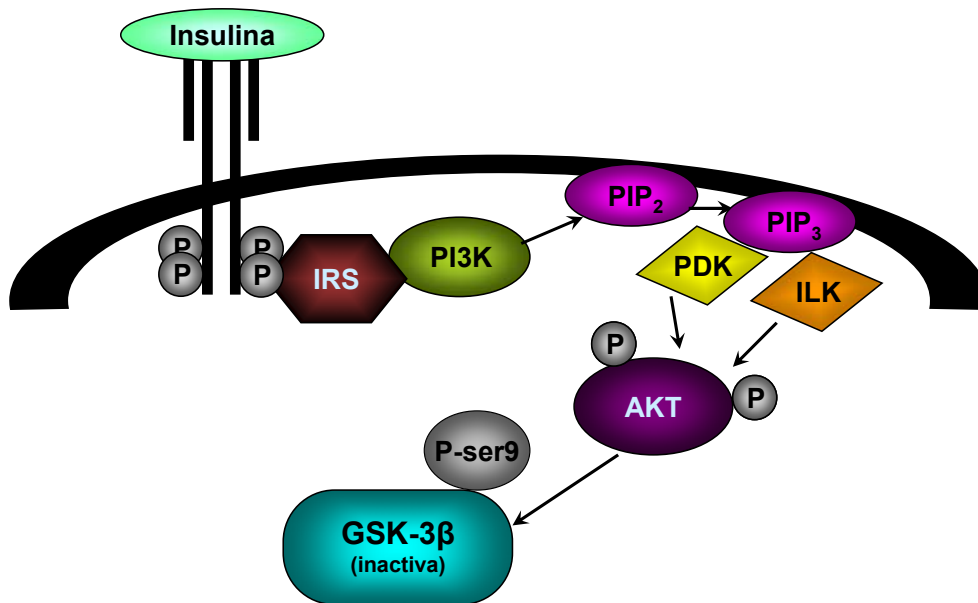
1.1.2.1. Regulación por fosforilación

La actividad enzimática de GSK-3 se reduce significativamente tras la fosforilación de la serina 9 en el caso de GSK-3 β y serina 21 en el caso de GSK-3 α . La fosforilación de esta serina transforma el extremo N-terminal en un pseudosustrato el cual ocupa el sitio activo de la enzima, que normalmente está reservado para los sustratos prefosforilados (Dajani et al., 2001; Frame and Cohen, 2001) (Esquema 3A). Sin embargo, se ha observado que GSK-3 β fosforilada en serina 9 es capaz de fosforilar a uno de sus sustratos, la proteína Tau (una proteína de unión a microtúbulos) en presencia de zeta-14-3-3 (14-3-3 ζ), una isoforma de las proteínas 14-3-3 con afinidad por dominios fosforilados (Hashiguchi et al., 2000). Se ha sugerido que esta proteína secuestra el extremo N-terminal fosforilado en la serina 9 de GSK-3 β , no pudiendo así actuar como pseudosustrato y, por lo tanto, inhibir a GSK-3 (Yuan et al., 2003) (Esquema 3B).



Esquema 3. Inhibición de GSK-3 por fosforilación en la serina 9 de GSK-3 β o serina 21 de GSK-3 α . **A.** Cuando se fosforila la serina del extremo N-terminal de GSK-3, éste va a actuar como pseudosustrato impidiendo la unión de GSK-3 con su sustrato. Adaptado de (Frame and Cohen, 2001). **B.** La proteína 14-3-3 secuestra el extremo N-terminal de GSK-3 fosforilado en serina impidiendo que éste actúe como pseudosustrato, de tal forma que GSK-3 es una quinasa activa aún estando fosforilada en serina.

Existen distintas quinasas capaces de fosforilar GSK-3 en serina 9/21: diferentes isoformas de la proteína quinasa C (PKC), p70 S6 quinasa, p90 RSK, proteína quinasa A (PKA) y proteína quinasa B (PKB o Akt) (Jope and Johnson, 2004). La vía de señalización mejor descrita que regula la fosforilación de GSK-3 β en serina 9 es la vía mediada por el receptor de insulina (Esquema 4). La insulina se une a su receptor lo que provoca la activación de una cascada de señalización que finalmente lleva a la fosforilación y consiguiente activación de PKB. Esta quinasa, por último, fosforila la serina 9 de GSK-3 β o la serina 21 de GSK-3 α (Jope and Johnson, 2004).



Esquema 4. Regulación de GSK-3 α/β por fosforilación en la serina 21/9. Inhibición por la vía de señalización de la insulina. La insulina inicia una cascada de señalización que conlleva la activación de varias quinasas, entre ellas PI3K y Akt ó PKB, y culminará con la fosforilación de GSK-3 en la serina 21/9 y su consiguiente inactivación. Adaptado de (Grimes and Jope, 2001).

La reactivación de GSK-3 β podría estar mediada por las fosfatasas PP2A (Sutherland et al., 1993; Welsh and Proud, 1993) y PP1. En este último caso, la reactivación se produce mediante un mecanismo de autorregulación: GSK-3 provoca un incremento de la fosforilación del Inhibidor 2 (I2) de PP1, lo que conlleva un aumento de la activación de PP1, que resulta en la desfosforilación de GSK-3 en la serina 9, provocando, por último, la activación de GSK-3. De esta forma, tanto inhibidores directos de GSK-3 como una bajada de sus niveles de expresión van a provocar un incremento de la fosforilación de GSK-3 α/β en la serina 21/9 (Zhang et al., 2003).

La fosforilación de la tirosina 216 de GSK-3 β y la tirosina 279 de la GSK-3 α es otra forma de regulación de la actividad GSK-3. Dichas fosforilaciones son necesarias para su actividad (Hughes et al., 1993). A partir de las estructuras del cristal de la isoenzima GSK-3 β , se ha propuesto que las formas desfosforiladas bloqueen el acceso de los sustratos pre-fosforilados (Dajani et al., 2001). La enzima fosforilada sufre un cambio conformacional que permite el acceso al centro activo de los sustratos. Sin embargo, existe cierta controversia sobre el origen de esta fosforilación. Todavía no está claro si este proceso es un fenómeno de autofosforilación (Cole et al., 2004; Lochhead et al., 2006) o si están implicadas otras quinasas y/ o fosfatasas (Simon et al., 2008).

Algunas quinasas propuestas son Fyn (Lesort et al., 1999), PYK2 (Hartigan et al., 2001), o MEK1 (Takahashi-Yanaga et al., 2004). También la quinasa ZAK1 de *Dictyostelium discoideum* fosforila a GSK-3 en dicho residuo de tirosina (Kim et al., 1999). Sin embargo no se ha encontrado el ortólogo de esta tirosina quinasa en mamíferos.

Otros autores proponen que el proceso que tiene lugar es una auto-fosforilación. Este proceso es intramolecular, es decir, no es una fosforilación entre distintas moléculas de GSK-3 (Cole et al., 2004; Lochhead et al., 2006). Esta fosforilación en tirosina es necesaria para la actividad de GSK-3, produciéndose en un paso previo a la formación de la quinasa madura y mediado por la chaperona Hsp90 (Lochhead et al., 2006).

Recientemente, han sido estudiados otros residuos en los que también podría estar fosforilada GSK-3. Se ha descrito que la fosforilación en la serina 389 de GSK-3 β por la proteína p38 MAPK promovería la inactivación de la enzima. Esta fosforilación no se observa en todos los tejidos, sino que predomina en el cerebro (Thornton et al., 2008). En otro estudio se propone la fosforilación en treonina 43 para facilitar la inactivación de GSK-3 β en serina 9. En este caso, se formaría un complejo multiproteico (ver apartado 1.1.2.2), en el que la quinasa ERK fosforilaría a GSK-3 en la treonina 43, favoreciendo la actuación de la quinasa p90 RSK sobre la serina 9 (Ding et al., 2005).

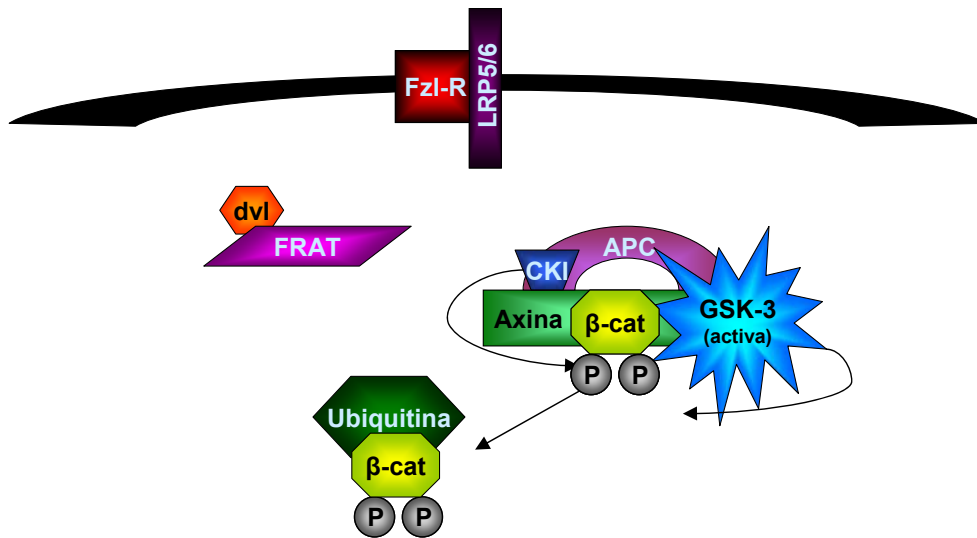
Por último, otro mecanismo, en este caso indirecto, de regulación por fosforilación lo constituye la pre-fosforilación de sus sustratos, comentado anteriormente (Esquema 2). Algunas de las quinasas implicadas en dicha pre-fosforilación son la caseína quinasa-I que fosforila a la β -catenina (Rubinfeld et al., 1996), la caseína-quinasa II que fosforila a la glucógeno sintasa (DePaoli-Roach, 1984) y la CDK-5 que prefosforila la proteína Tau (Sengupta et al., 1997; Noble et al., 2003; Li et al., 2006). Esta pre-fosforilación no siempre es necesaria así, por ejemplo, la proteína Tau puede ser fosforilada por GSK-3 tanto en sitios primados como no primados. Sin embargo, se ha observado una mayor reducción de su afinidad por los microtúbulos sólo cuando es fosforilada en sitios primados (Cho and Johnson, 2003).

1.1.2.2. Regulación por formación de complejos proteicos

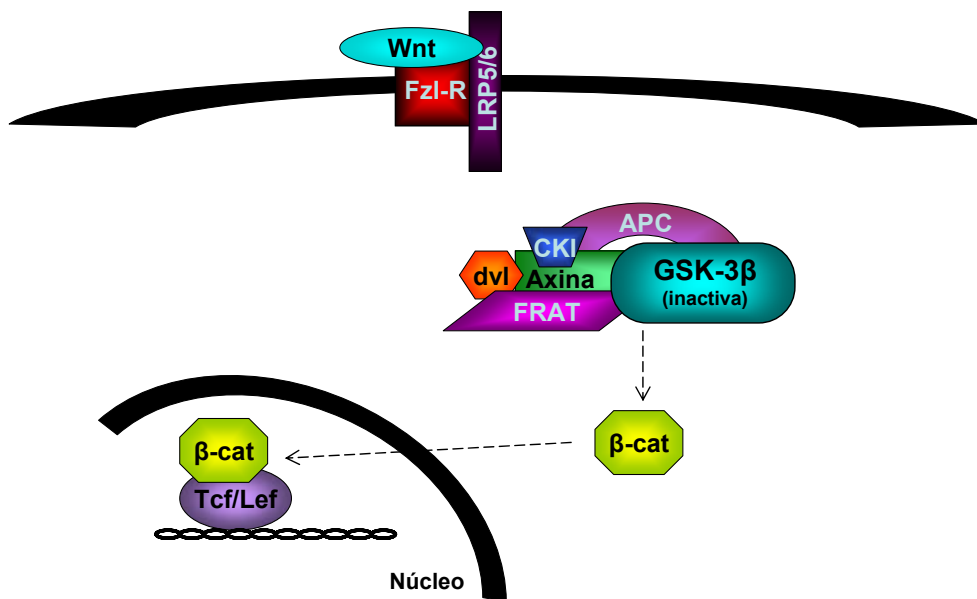
GSK-3 también puede regularse por la formación de complejos proteicos. En esta forma de regulación están implicadas una familia de proteínas de unión a GSK-3 (GBP), en la que están incluidas FRAT-1 y 2 (Jonkers et al., 1997; Li et al., 1999; Thomas et al., 1999), que inhiben la actividad de GSK-3 al unirse a ésta. En el lado opuesto estaría la axina, que es una proteína que al unirse a GSK-3 aumenta su actividad facilitando la fosforilación de su sustrato, en este caso β -catenina. Esto es lo que ocurre en la vía de Wnt (Esquema 5), vía fundamental en el desarrollo embrionario y una de las vías mejor caracterizadas que regulan la actividad de GSK-3 β a través de complejos proteicos. En ausencia de Wnt, la proteína adaptadora axina posibilita la unión de GSK-3, caseína quinasa I (CK-I), β -catenina y otras proteínas permitiendo la fosforilación de β -catenina por CK-1 (pre-fosforilación o *priming*) y su consiguiente fosforilación por GSK-3 β . La β -catenina es entonces ubiquitilada y posteriormente degradada por el proteosoma. Sin embargo, en presencia de Wnt se activa una cascada de señalización en la que se activa *dishevelled* (dvl), la cual al unirse a FRAT o GBP (proteínas de unión a GSK-3), desestabiliza el complejo, liberándose β -catenina, lo cual contribuye a su acumulación citoplasmática y posterior translocación al núcleo donde activará factores de transcripción de la familia Tcf/ Lef (Jope and Johnson, 2004). Recientemente, se ha observado otra proteína implicada en esta ruta, DISC-1, que se une a GSK-3 β inhibiéndola, lo que reduce la fosforilación de β -catenina favoreciendo su estabilización. DISC-1 juega un importante papel en el desarrollo y proliferación de progenitores neuronales. Alteraciones en la función de esta proteína están implicadas en el desarrollo de enfermedades mentales como la esquizofrenia (Mao et al., 2009).

Existen otros complejos proteicos en los que participa GSK-3 como el que forma con la proteína supresora de tumores (p53) o su interacción con la presenilina 1 (Jope and Johnson, 2004). En algunas ocasiones la formación de complejos proteicos puede regular la localización intracelular de GSK-3 (ver apartado 1.1.2.3); por ejemplo, la unión a FRAT-1 posibilita su exportación del núcleo (Franca-Koh et al., 2002).

- Wnt



+ Wnt



Esquema 5. Regulación de GSK-3 por formación de complejos proteicos en la vía de señalización de Wnt. En ausencia de Wnt (imagen superior), GSK-3 se encuentra formando un complejo con las proteínas APC, axina, CK1 y β-catenina, la cuál es fosforilada primero por CK1 y posteriormente por GSK-3. Esta fosforilación favorece su ubiquitilación y posterior degradación por el proteosoma. En presencia de Wnt (imagen inferior), las proteínas FRAT y dvl se unen al complejo, inactivando a GSK-3 y favoreciendo la liberación de β-catenina, la cual se acumula en el citosol y se transloca al núcleo donde participará en la regulación de la expresión de determinados genes uniéndose a proteínas de la familia Tcf/ Lef. Adaptado de (Jope and Johnson, 2004).

1.1.2.3. Regulación por localización intracelular

La localización intracelular de la enzima regula el acceso de GSK-3 a sus sustratos. GSK-3 se ha considerado tradicionalmente como una proteína citoplasmática, donde sus niveles son más elevados, pero también está presente en el núcleo y en las mitocondrias donde se encuentra altamente activada en comparación con la enzima citoplasmática (Bijur and Jope, 2003).

Los niveles de GSK-3 nuclear no son estáticos sino que cambian en respuesta a determinadas señales, tanto intra como extracelulares (Jope and Johnson, 2004) y durante el ciclo celular. Determinados estímulos proapoptóticos inducen la acumulación de GSK-3 β en el núcleo, mientras que la estimulación de factores de crecimiento disminuyen los niveles de GSK-3 β nuclear (Bijur and Jope, 2001, 2003). Muchos de sus sustratos son factores de transcripción y su fosforilación por GSK-3 promueve su exportación del núcleo. En la fase S del ciclo celular aumentan los niveles de GSK-3 en el núcleo donde puede fosforilar a la ciclina D1, importante proteína en la regulación del ciclo celular, y favorecer su salida del núcleo (Diehl et al., 1998; Alt et al., 2000). Otros ejemplos de sustratos de GSK-3 en el núcleo serían NFAT (Beals et al., 1997), cuya exportación del núcleo tras señales proapoptóticas también es mediada por GSK-3 (Crabtree and Olson, 2002; Benedito et al., 2005); HSF-1 (He et al., 1998; Bijur and Jope, 2000; Xavier et al., 2000) y CREB (Bullock and Habener, 1998) entre otras. Recientemente se ha encontrado la señal de localización nuclear (NLS) de GSK-3. Ésta se encuentra entre los aminoácidos 85-103, aunque también son necesarios los primeros 9 aminoácidos de GSK-3 β para que se transloque eficazmente al núcleo. A pesar de la señal de localización nuclear, la mayoría de la GSK-3 es citosólica, ya que se encuentra asociada a otras proteínas que podrían estar bloqueando la secuencia de señalización nuclear (Meares and Jope, 2007). Para su salida del núcleo se ha sugerido su asociación con la proteína FRAT-1/ GBP, la cuál presenta una secuencia de exportación nuclear (NES) (Franca-Koh et al., 2002).

La GSK-3 β también está presente en mitocondrias (Hoshi et al., 1996), donde se puede activar en respuesta a estímulos proapoptóticos (Bijur and Jope, 2003) y actuar sobre proteínas implicadas en apoptosis, siendo también capaz de alterar la morfología de la mitocondria (King et al., 2008). Sin embargo, también se ha observado que la GSK-3 mitocondrial puede inhibirse al ser fosforilada por Akt en respuesta a

determinados estímulos de supervivencia celular, pero sin variar sus niveles de proteína total (Bijur and Jope, 2003).

También se encuentra en otras estructuras como en las espinas dendríticas, donde estaría implicada en la consolidación de la memoria (Peineau et al., 2007).

1.1.2.4. Recambio de GSK-3

Además de estos mecanismos de regulación, los mecanismos implicados en el recambio de GSK-3 podrían ser críticos no sólo para entender la regulación fisiológica de la enzima, sino también para comprender aquellas enfermedades en las que está alterada su actividad enzimática. En cuanto a la regulación de la síntesis de la GSK-3, poco se sabe. El promotor de GSK-3 β ha sido secuenciado observándose características similares a las de los promotores de otros genes implicados en el metabolismo. Se ha observado la ausencia de la caja TATA y la presencia de cajas CCAAT, que podrían ser esenciales para la unión de factores de transcripción que regulan la expresión de genes de manera específica del tejido. (Lau et al., 1999a). También se ha descrito una diferente distribución del mRNA de GSK-3 α y GSK-3 β en distintos tejidos, la cual no siempre coincide con la distribución de los niveles de proteína (Lau et al., 1999b). De hecho se ha observado que el promotor de la GSK-3 β es más activo en células neuronales que en otros tipos celulares (Lau et al., 1999a).

GSK-3 β es una proteína con una vida media larga (Hongisto et al., 2008). Pero si la regulación de la síntesis de GSK-3 está poco analizada, menos se sabe de la degradación de la enzima, no existiendo datos bibliográficos relacionados con este tema.

1.1.3. Funciones de GSK-3

Los sustratos de GSK-3 forman un grupo muy diverso, GSK-3 fosforila a proteínas implicadas en metabolismo, señalización, proteínas estructurales y factores de transcripción (Tabla 1), de tal forma que GSK-3 realiza multitud de funciones. Así, además de participar en distintas rutas de señalización, como las vías ya comentadas de Wnt e insulina, también juega un importante papel en la síntesis de proteínas, en la proliferación y diferenciación celular, en el dinamismo de los microtúbulos y la

movilidad celular (Frame and Cohen, 2001) y también en el fenómeno de *splicing* (Hernandez et al., 2004).

GSK-3 participa en la regulación de enzimas metabólicas. Es la responsable de la inhibición de la glucógeno sintasa, que fue la primera proteína identificada como sustrato de GSK-3 (Embi et al., 1980) y cuya función es catalizar el último paso de la síntesis de glucógeno. También participa en la regulación de otras enzimas que participan en el metabolismo intermediario como, por ejemplo, la piruvato deshidrogenasa (Hoshi et al., 1996).

También puede inhibir la síntesis de proteínas ya que inactiva por fosforilación al factor de iniciación eucariótico 2B (eIF2B), factor necesario para la iniciación de la síntesis de proteínas, promoviendo en este caso la apoptosis (Pap and Cooper, 2002).

Juega también un importante papel en el desarrollo embrionario, puesto que determina la formación del eje dorsoventral en *Xenopus* (Dominguez et al., 1995; He et al., 1995). La vía de Wnt, explicada anteriormente, es una ruta clave en la regulación del desarrollo. Otra vía de señalización implicada en la regulación del desarrollo es la vía de Hedgehog (Hh). Esta vía es muy similar a la de Wnt, inhibiéndose también GSK-3 por la formación de complejos multiproteicos (Kim and Kimmel, 2006).

1.1.3.1. GSK-3 en el sistema nervioso central

Como ya se expuso anteriormente, GSK-3 se expresa altamente en el sistema nervioso. A continuación se detallan algunas de las funciones de GSK-3 que presentan mayor relevancia en el sistema nervioso.

- **Regulación de la arquitectura y movilidad celular**

En el sistema nervioso, GSK-3 juega un importante papel en la regulación de la polaridad neuronal, fundamentalmente al tener como sustratos proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) como Tau, MAP1B o MAP2 que pueden ser fosforiladas por GSK-3. Estas fosforilaciones regulan su unión a microtúbulos y su dinamismo (Jope and Johnson, 2004). Sin embargo, hay controversia de opiniones sobre su función exacta.

Proteínas Metabólicas y de Señalización	Proteínas Estructurales	Factores de Transcripción
AcetilCoA carboxilasa	DF3/ MUC1	AP-1 (familia de Jun)
Proteína quinasa dependiente de AMPcíclico	Proteína dinamina-like	β -catenina
APC	MAP1B	C/EBP α
APP	MAP2	c-Myb
ATP-citrato liasa	NCAM	c-Myc
Axina	Neurofilamentos	CREB
Ciclina D	Nineína	GATA4
Ciclina E	Cadena ligera de las Quinesinas	Receptor de Glucocorticoides
eIF2B	Tau	HIF-1
Glucógeno Sintasa	Teloquina (KRP)	HSF-1
hnRNP		Mash1
IRS-1		MITF
Proteína básica de Mielina		NeuroD
Receptor NGF		NFAT
Nucleoporina p62		NF- κ B (p65 y p105)
P21		Notch
Piruvato deshidrogenasa		p53
Subunidad RII-PKA		TCF
PP1		
Inhibidor 2 de la proteína fosfatasa		
Presenilina-1		
RIGF-1		

Tabla 1. Sustratos de GSK-3. Adaptada de (Jope and Johnson, 2004).

Se ha observado que GSK-3 β se expresa altamente durante la remodelación de las neuritas, ya que es crítica para establecer la polaridad neuronal y transformar neuritas en axones (Jiang et al., 2005; Yoshimura et al., 2005). La inhibición de GSK-3 promueve la formación de múltiples axones y la transformación de las dendritas existentes en axones (Jiang et al., 2005), mientras que su activación causa colapso del cono de crecimiento y supresión de la formación del axón (Zhou et al., 2004; Jiang et al., 2005; Chadborn et al., 2006). Por otro lado, otros trabajos proponen que GSK-3 es esencial para la formación del axón (Shi et al., 2004; Garrido et al., 2007).

Un trabajo de Kim y colaboradores propone que podemos observar un efecto u otro dependiendo del grado de inhibición de GSK-3. Una inhibición parcial de GSK-3 provoca la ramificación del axón, mientras que una inhibición total de ambas isoformas de GSK-3 impide la formación del axón (Kim et al., 2006).

Una aplicación de estos estudios podría ser la regeneración axonal tras daños en el sistema nervioso central. Recientemente se ha observado que inhibidores de GSK-3

son capaces de promover crecimiento axonal *in vitro* e *in vivo* tras producir daños en el sistema nervioso central (Dill et al., 2008).

También se ha relacionado a GSK-3 con procesos de migración neuronal (Del Rio et al., 2004).

- **Consolidación de la memoria**

La presencia de GSK-3 β en espinas dendríticas, donde se produce la sinapsis (Peineau et al., 2007; Peineau et al., 2008), así como en la fracción sinaptosomal (Ahmad-Annur et al., 2006; Hooper et al., 2007) sugieren su participación en procesos que tienen lugar en la sinapsis. Todas las formas de plasticidad sináptica pueden entenderse como alteraciones de la eficiencia de la transmisión sináptica. Existen dos formas de plasticidad sináptica implicadas en la consolidación de la memoria a largo plazo: LTP (*long-term potentiation*) y LTD (*long-term depression*), que se producen en respuesta a estímulos glutamatérgicos. GSK-3 β participa en la regulación de ambas vías. Se ha descrito que GSK-3 β es activada durante la LTD y a su vez, es necesaria para la inducción de LTD, ya que inhibidores de GSK-3 inhiben la LTD sináptica. La activación de GSK-3 durante la LTD se explica por la activación de fosfatasa en respuesta a NMDA que desfosforilan a GSK-3 en la serina 9 (Peineau et al., 2007; Peineau et al., 2008).

Por otro lado, se ha observado que existe inhibición de GSK-3 β cuando se induce LTP (Hooper et al., 2007; Peineau et al., 2007). Así, la sobreexpresión de GSK-3 β conlleva a la inhibición de LTP (Hooper et al., 2007; Peineau et al., 2007; Zhu et al., 2007). Este hecho podría relacionarse con el déficit de memoria observado en animales que sobreexpresan GSK-3 β (Hernandez et al., 2002; Engel et al., 2006a) o que presentan la enzima sobreactivada por inhibición de PI3K y PKC (Liu et al., 2003).

Se ha propuesto un modelo de plasticidad neuronal en el que LTP inhibe LTD mediante la inhibición de GSK-3 β por la ruta de PI3K. Puesto que se ha observado que GSK-3 β forma un complejo con los receptores AMPA, un tipo de receptores ionotrópicos glutamatérgicos y la actividad de este complejo es regulada por LTP, la importancia de GSK-3 β en este proceso podría residir en su implicación en la internalización de dichos receptores que tiene lugar durante la LTD (Peineau et al., 2007; Peineau et al., 2008). De hecho, la exposición crónica a litio, un inhibidor de

GSK-3, en cultivos de hipocampo disminuye la expresión de los receptores de AMPA en la superficie celular (Du et al., 2004; Du et al., 2007).

Por otro lado, un incremento de la activación de GSK-3 produce una inhibición de la expresión de la sinapsina, una proteína que forma parte de las vesículas presinápticas que liberan glutamato. La disminución de glutamato en la sinapsis también podría explicar la inhibición de LTP (Zhu et al., 2007).

- **Regulación de la supervivencia celular**

GSK-3 juega un papel clave en la regulación de la supervivencia celular, puede actuar como enzima pro-apoptótica y como enzima anti-apoptótica. Existen dos rutas de señalización de apoptosis: la ruta intrínseca, en la que se produce desorganización de la mitocondria; y la ruta extrínseca, que es iniciada por señales extracelulares y están involucrados los llamados “receptores de muerte”. En el primer caso, GSK-3 promueve la apoptosis mientras que por la otra ruta GSK-3 tiene un efecto anti-apoptótico (Beurel and Jope, 2006).

La ruta intrínseca puede ser inducida por numerosos estímulos que causan daño celular. GSK-3 β promueve apoptosis en condiciones como la retirada de factores tróficos (Hetman et al., 2000), inhibición de la ruta de PI3K/ Akt (Crowder and Freeman, 2000), daño en el DNA (Watcharasit et al., 2002), estrés del retículo endoplasmático (Song et al., 2002), toxinas de la mitocondria (King et al., 2001), también en la neurotoxicidad inducida por A β (Takashima et al., 1993), por la proteína del prión (Perez et al., 2003) o por poliglutaminas en la enfermedad de Huntington (Carmichael et al., 2002). Aunque también ha sido observado que simplemente la sobreexpresión de GSK-3 puede inducir apoptosis (Beurel and Jope, 2006). De hecho, el litio, inhibidor selectivo de GSK-3, actúa como neuroprotector (Alvarez et al., 1999).

GSK-3 regula por fosforilación proteínas que actúan en la desorganización de la mitocondria, por ejemplo activa la proteína pro-apoptótica Bax (Linseman et al., 2004) y facilita la degradación de una proteína anti-apoptótica de la familia de Bcl-2 (Maurer et al., 2006). Por otro lado, también puede promover apoptosis regulando factores de transcripción y traducción, de tal forma que facilita la expresión de proteínas pro-apoptóticas e inhibe la expresión de proteínas que promueven supervivencia celular (Beurel and Jope, 2006). Por ejemplo, inhibe el factor de transcripción HSF-1, que promueve la supervivencia celular (Chu et al., 1996; Khaleque et al., 2005). También se

ha relacionado a GSK-3 con apoptosis inducida por p53 (Watcharasit et al., 2002). GSK-3 no sólo promueve la transcripción de genes específicos mediante la activación del factor de transcripción p53 (Watcharasit et al., 2003; Beurel et al., 2004), sino que también puede regular la localización intracelular de p53 (Beurel et al., 2004). Se ha observado que GSK-3 se une a dicha proteína tanto en núcleo como en mitocondria, donde p53 también es capaz de actuar directamente sobre otras proteínas para promover apoptosis (Sansome et al., 2001). Por último, GSK-3 también induce apoptosis al inhibir la síntesis de proteínas por fosforilación del factor eIF2B (Pap and Cooper, 2002). Además, algunos de los cambios morfológicos que tienen lugar durante el proceso de apoptosis también pueden ser explicados por la acción de GSK-3 sobre proteínas estructurales como Tau o las quinesinas (Beurel and Jope, 2006).

Sin embargo, la inhibición de GSK-3 también causa apoptosis. Se observó que ratones carentes de GSK-3 β no eran viables porque TNF- α inducía apoptosis masiva en el hígado. Para contrarrestar el efecto de TNF- α es necesario la activación de NF- κ B, la cual es fosforilada por GSK-3 (Hoefflich et al., 2000). Además, el litio, inhibidor de GSK-3, potencia el efecto citotóxico de TNF- α en cultivos celulares (Hoefflich et al., 2000; Schwabe and Brenner, 2002). También se ha observado inducción de apoptosis en respuesta a otros ligandos, además de TNF- α , en presencia de inhibidores de GSK-3, o usando RNA de interferencia (Song et al., 2004; Rottmann et al., 2005). Recientemente, también se ha observado apoptosis en un ratón dominante negativo para GSK-3 β bajo un promotor específico neuronal (Gomez-Sintes et al., 2007). Estos efectos anti-apoptóticos de GSK-3 pueden explicarse por la participación, en este caso, de GSK-3 en la ruta extrínseca de la apoptosis, en lugar de en la ruta intrínseca donde realiza acciones pro-apoptóticas (Beurel and Jope, 2006).

La ruta extrínseca se inicia en respuesta a ligandos extracelulares, como TNF- α , que se unen a unos determinados receptores en la superficie celular. Estos receptores se denominan receptores de muerte y cuando se activan reclutan proteínas del citoplasma y se produce la activación de la caspasa-8, que va a desencadenar el proceso de apoptosis. GSK-3 va a inhibir este proceso antes de la activación de caspasa-8 (Beurel and Jope, 2006).

Por tanto, para mantener la supervivencia celular es necesario mantener los niveles apropiados de GSK-3, ni demasiado altos ni demasiado bajos, dentro de un rango que no provoque la inducción de las rutas apoptóticas.

1.1.4. Implicación de GSK-3 en patologías

GSK-3 es una proteína clave en la regulación de numerosos procesos. Tanto la supresión como el exceso de su actividad pueden provocar la desregulación de estos procesos. Por tanto, es muy importante que esta enzima esté sometida a una fina regulación para mantener unos niveles de actividad adecuados. En la mayoría de los procesos aquí descritos, ha sido más estudiada la isoforma β , pero no se excluye que la isoforma α participe en dichas funciones. Sin embargo, el hecho de que el ratón transgénico que no expresa GSK-3 β sea letal, aunque exprese la isoforma α (Hoeflich et al., 2000), hace pensar que ambas isoformas juegan papeles diferentes. Por el contrario, este ratón no presenta alteraciones en el desarrollo del sistema nervioso, lo cual puede indicar que en este caso, GSK-3 α sí está rescatando la función de GSK-3 β (Kim et al., 2006).

Así, una desregulación de GSK-3 se ha asociado a varias patologías. Entre ellas, las mejor estudiadas son la enfermedad de Alzheimer (Engel et al., 2008; Hernandez and Avila, 2008; Hooper et al., 2008) y la diabetes tipo II (Cole et al., 2007), pero también está implicada en los trastornos bipolares, la hipertrofia muscular, el cáncer, la esquizofrenia, la enfermedad de Parkinson, la isquemia y la enfermedad de Huntington, entre otros (Jope and Johnson, 2004).

1.2. CALPAÍNA

Las calpaínas forman parte de una familia de cisteín-proteasas independientes de las caspasas que requieren calcio para su actividad. Aunque tradicionalmente se han considerado enzimas intracelulares, también se han encontrado algunas en el espacio extracelular (Nishihara et al., 2001; Xu and Deng, 2004). Además pueden tener una localización subcelular variable (Franco and Huttenlocher, 2005). Son activas a pH neutro a diferencia de otras proteasas como las catepsinas que se encuentran en compartimentos ácidos como los lisosomas (Turk and Stoka, 2007; Liu et al., 2008). Las calpaínas cortan proteínas un número limitado de veces, produciendo largos fragmentos peptídicos en lugar de producir pequeños péptidos o aminoácidos (Wu et al., 2007).

Existen distintas isoformas de calpaína, algunas de las cuales se expresan de forma ubicua mientras que otras son específicas de tejido. La mayoría de las calpaínas son proteínas heterodiméricas formadas por una subunidad catalítica de unos 80 kDa y una subunidad reguladora más pequeña de 29 kDa. Se han identificado catorce genes humanos distintos que codifican para la subunidad catalítica y dos para la subunidad reguladora. Según la subunidad catalítica, las calpaínas se pueden clasificar en dos grupos, típicas y atípicas. Las calpaínas típicas se caracterizan por tener en su extremo C-terminal un dominio que incluye los denominados motivos EF, que son dominios con una determinada estructura conformacional que permiten la unión de Ca^{2+} . Mientras que las atípicas tienen otros motivos de unión a Ca^{2+} diferentes (Goll et al., 2003; Wu et al., 2007). Las dos isoformas más estudiadas pertenecen al grupo de las calpaínas típicas y son la calpaína I o μ -calpaína, descubierta en 1964 (Guroff, 1964) y la calpaína II o m-calpaína, purificada en 1976 (Dayton et al., 1976b; Dayton et al., 1976a). La micro-calpaína se encuentra en el citosol y cerca de la membrana, y la mili-calpaína se localiza en la membrana (Vosler et al., 2008). Ambas isoformas se encuentran en la mayoría de los órganos, pero son especialmente abundantes en el sistema nervioso central (Liu et al., 2008). En el sistema nervioso, la μ -calpaína se encuentra principalmente en dendritas y en el soma de las neuronas, mientras que la m-calpaína predomina en axones y glía (Onizuka et al., 1995).

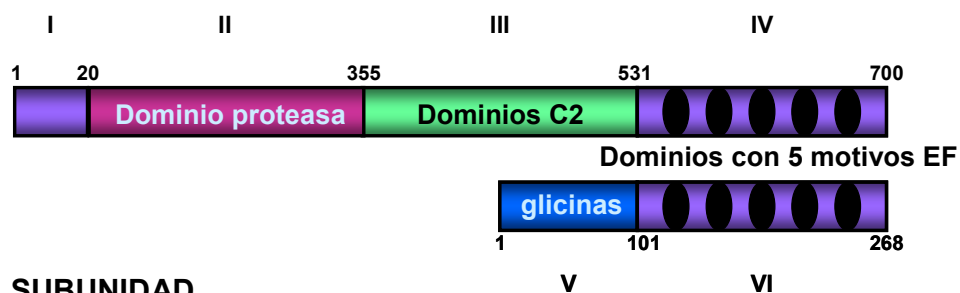
1.2.1 Estructura de la Calpaína

La m-calpaína y la μ -calpaína tienen una estructura muy similar. La subunidad catalítica de la m-calpaína fue la primera en ser cristalizada en 1999 (Hosfield et al., 1999a; Hosfield et al., 1999b). Sin embargo, se han hallado más dificultades en obtener el cristal de la μ -calpaína. En 2003, se obtuvo el cristal de un péptido que contenía el 85% de la secuencia de la μ -calpaína (Pal et al., 2003b; Pal et al., 2003a).

La subunidad catalítica consta de cuatro dominios (I-IV) y la subunidad reguladora de dos (V y VI). El dominio I es una α -hélice que corresponde al extremo N-terminal de la subunidad catalítica. Este dominio puede interactuar con el dominio VI de la subunidad reguladora, por lo que podría ser importante para la estabilidad. En el dominio II se encuentra el centro catalítico (donde se encuentra la tríada catalítica: los residuos Cys 105, His 262 y Asn 286) y es similar a los dominios catalíticos de otras cisteín-proteasas. Está compuesto por dos subdominios, IIa y IIb, y entre ellos el sitio de

unión al sustrato (Reverter et al., 2001; Moldoveanu et al., 2004). El dominio III puede unir Ca^{2+} y fosfolípidos (Tomba et al., 2001), y es similar a los dominios C2 que se encuentran en enzimas como la fosfolipasa C o la proteína quinasa C cuya función es unir fosfolípidos de una manera dependiente de Ca^{2+} . El dominio IV corresponde al extremo C-terminal y es la región de unión al Ca^{2+} , presentando cinco motivos EF, similar a los de la calmodulina. El dominio V corresponde al extremo N-terminal de la subunidad reguladora y es una región rica en glicinas, por lo que podría servir de anclaje a la membrana (Gil-Parrado et al., 2003). Por último, el dominio VI es el extremo C-terminal y es similar al dominio IV de la subunidad catalítica. También tiene cinco motivos EF que unen Ca^{2+} . Ambas subunidades se unen por estos motivos EF de los dominios IV y VI (Esquema 6 (Wu et al., 2007)).

SUBUNIDAD CATALÍTICA



SUBUNIDAD REGULADORA

Esquema 6: Esquema de la estructura de la calpaína, que consta de dos subunidades: la subunidad catalítica y la subunidad reguladora. La subunidad catalítica está formada por los dominios I – VI. El dominio I abarca desde el residuo 1 hasta el 20. El dominio II es el dominio proteasa (residuos 20-355). El dominio III (residuos 355-531) presenta dominios C2 de unión a Ca^{2+} . El dominio IV (residuos 531-700) tiene cinco motivos EF de unión a Ca^{2+} . La subunidad catalítica está formada por los dominios V y VI. El dominio V (residuos 1-101) es un dominio rico en glicinas y el dominio VI (residuos 101-268) es análogo al dominio IV de la subunidad catalítica, presentando cinco motivos EF de unión a Ca^{2+} . Adaptado de (Wu et al., 2007).

1.2.2. Regulación de Calpaína

La calpaína proteoliza de manera irreversible numerosas proteínas por lo que es necesario que su actividad en la célula esté altamente regulada. Por esta razón, existen distintos mecanismos implicados en su regulación.

1.2.2.1. Regulación por unión a calcio

Estas dos isoformas difieren principalmente en su requerimiento de calcio: la μ -calpaína se activa a bajas concentraciones de calcio, de orden micromolar (1 a 20 μ M); por el contrario, la m-calpaína, en su estado purificado, requiere para su completa activación una concentración de calcio de orden milimolar (0,250 a 0,750 mM). Ésta es una concentración de calcio muy alta y sólo se produce en el interior celular en condiciones patológicas. Por lo tanto, *in vivo* deben existir otros mecanismos de regulación que incrementen su sensibilidad al calcio, como interacciones con otras proteínas o con fosfolípidos. Algunos estudios proponen que la calpaína se sitúa cerca de los canales de calcio, dónde la concentración de Ca^{2+} es mayor (Friedrich, 2004). Además, cuando el calcio se une a su sitio de unión en la calpaína, ésta sufre un cambio conformacional y se autoproteoliza disminuyendo así su requerimiento de calcio (Wu et al., 2007). Aún así, el denominado problema del calcio no está resuelto, ya que los requerimientos de calcio, tanto de m-calpaína como de μ -calpaína, siguen siendo muy elevados.

La unión del calcio a la calpaína va a provocar un cambio conformacional que permite que su sitio catalítico sea activo. Hay diversidad de opiniones sobre el mecanismo de activación de la calpaína por calcio. Hay estudios que proponen una activación en dos pasos (Moldoveanu et al., 2002). Primero, el calcio se une a la región III y IV de la subunidad catalítica y provoca la autoproteólisis del dominio I, liberándose así la subunidad reguladora, lo que permite el acercamiento de los subdominios IIa y IIb que van a formar el sitio activo. Durante este proceso de autoproteólisis, la subunidad catalítica de la μ -calpaína pasa de 80 kDa a 76 kDa y la de la m-calpaína de 80 kDa a 78 kDa, mientras que la subunidad reguladora pasa de 28 kDa a 18 kDa (Graham-Siegenthaler et al., 1994). En el segundo estado, el calcio se une directamente a un residuo de cisteína del centro activo permitiendo una disposición espacial favorable para la hidrólisis del sustrato. Sin embargo, este mecanismo aunque podría explicar la activación de las calpaínas en general, no puede explicar la activación

ni de aquellas calpaínas atípicas que no tienen estos mismos motivos de unión a calcio, ni de aquellas proteínas no heterodiméricas. Por tanto, tendrían que activarse por otros mecanismos, o puede que simplemente con el segundo estado de activación (Wu et al., 2007). También hay diversidad de opiniones sobre si la autoproteólisis es necesaria para la iniciación o la progresión de la activación (Hata et al., 2001; Franco and Huttenlocher, 2005).

Al comparar los cristales de las dos isoformas de la calpaína, se ha observado que los residuos que forman la tríada catalítica se encuentran menos separados en la μ -calpaína que en la m-calpaína, lo que podría explicar el menor requerimiento de calcio de la μ -calpaína (Pal et al., 2003b; Pal et al., 2003a).

1.2.2.2. Regulación por unión a su inhibidor fisiológico

La calpastatina es el único inhibidor fisiológico y específico tanto de la m-calpaína como de la μ -calpaína. Fue descubierta en 1976 en el mismo trabajo en que se purificó la m-calpaína por primera vez (Dayton et al., 1976b; Dayton et al., 1976a). La calpastatina está formada por cuatro dominios inhibitorios idénticos y un dominio correspondiente al extremo N- terminal que no tiene actividad inhibitoria. Teóricamente esta estructura permite que cada molécula de calpastatina pueda unirse a cuatro moléculas de calpaína (Maki et al., 1987). La calpastatina se une a la calpaína de manera reversible en un proceso dependiente de calcio (Imajoh and Suzuki, 1985; Otsuka and Goll, 1987), siendo incapaz de unirse al calcio en ausencia de calpaína (Takano and Maki, 1999; Bevers and Neumar, 2008). Hay estudios que sugieren que la unión de la calpastatina a la calpaína es anterior a su activación, ya que de esta forma la cantidad de calcio requerida es menor (Otsuka and Goll, 1987; Kapprell and Goll, 1989). Aunque la calpaína es capaz de proteolizar a la calpastatina, los fragmentos originados siguen conservando su función inhibitoria (DeMartino et al., 1988). Por otro lado, se ha propuesto que el estado de fosforilación de la calpastatina altera su afinidad a la μ -calpaína o a la m-calpaína de diferente forma (Pontremoli et al., 1992; Salamino et al., 1994), aunque es un tema sujeto a controversia (Goll et al., 2003).

2.2.3. Regulación por fosforilación

La actividad de la calpaína también se puede regular por fosforilación. La calpaína tiene muchos sitios de fosforilación. Por ejemplo, se inhibe al ser fosforilada por la proteína quinasa A (Shiraha et al., 2002), mientras que si es fosforilada por la vía de las MAP quinasas puede activarse (Cuevas et al., 2003; Franco and Huttenlocher, 2005).

1.2.3. Funciones de la Calpaína

Aunque la calpaína puede degradar completamente a su proteína sustrato, generalmente la corta de forma limitada, obteniéndose una proteína estable que puede tener funciones independientes de las que tenía la forma intacta. Existen numerosas proteínas identificadas como sustrato de la calpaína (Tabla 2), pero no existe una secuencia consenso de corte, sino que lo que reconoce es una determinada conformación. Suele favorecer el corte que la estructura sea abierta y fácilmente accesible. La calpaína necesita zonas largas ya que no corta pequeños péptidos. La acción de la calpaína también puede verse afectada por el estado de fosforilación de su sustrato. De esta forma, la actividad de la calpaína no sólo se va a modular por modificaciones de la calpaína, sino también por modificaciones en sus sustratos (Goll et al., 2003).

Los sustratos pueden ser factores de transcripción, receptores transmembrana, enzimas implicadas en transducción de señales y proteínas del citoesqueleto, entre otras (Tabla 2). En muchos casos, el fragmento obtenido tras la truncación por calpaína va a seguir siendo activo. Por ejemplo, la calpaína corta la proteína quinasa C, obteniendo una forma constitutivamente activa (Kishimoto et al., 1989; Shea et al., 1996). También regula la actividad de CDK-5, ya que la acción de la calpaína genera la formación de dos activadores de CDK-5, p25 y p29 a partir de sus precursores p35 y p39 (Kusakawa et al., 2000; Nath et al., 2000a; Patzke and Tsai, 2002). La CaM quinasa II también es degradada por calpaína a un fragmento activo e independiente de la regulación por calmodulina (Hajimohammadreza et al., 1997).

Esta variedad de sustratos provoca la implicación de la calpaína en multitud de funciones (Goll et al., 2003; Bevers and Neumar, 2008). Así, participa en el ciclo celular; en la regulación de la expresión génica, actuando sobre factores de transcripción como c-jun, c-fos o p53; en la apoptosis de ciertos tipos celulares y en respuesta a

determinadas señales específicas; en la transducción de señales, activando distintas vías como la de PKC o la de las integrinas; en el crecimiento y movilidad celular; y también en la memoria y aprendizaje, contribuyendo a la formación de LTP.

Merece la pena señalar que la activación de la calpaína en condiciones fisiológicas dura poco tiempo, ya que los niveles de calcio intracelular son rápidamente vueltos a la normalidad, por lo que la calpaína vuelve a su estado inactivo (Liu et al., 2008).

Aunque ambas isoformas pueden proteolizar prácticamente los mismos sustratos *in vitro*, el estudio de ratones transgénicos que carecen de una u otra isoforma hace pensar que podrían tener distintas funciones fisiológicas. El ratón transgénico que no expresa la subunidad catalítica de la μ -calpaína es un ratón viable que, aunque tiene problemas en el funcionamiento de las plaquetas (Azam et al., 2001), no tiene problemas en otras funciones en las que están implicadas las calpaínas, como por ejemplo, la LTP (Grammer et al., 2005). Sin embargo, la falta de la subunidad catalítica de la m -calpaína (Dutt et al., 2006) resulta letal, al igual que el ratón sin la subunidad reguladora, donde los embriones mueren alrededor del día once de gestación (Arthur et al., 2000; Zimmerman et al., 2000). Otros estudios usando RNA de interferencia de una u otra isoforma han mostrado las diferencias en las funciones fisiológicas de cada una de las isoformas (Bever and Neumar, 2008).

1.2.3.1. La Calpaína en el sistema nervioso central

En el sistema nervioso central, la activación de la calpaína que se encuentra próxima a la membrana plasmática, podría ser crítica en la sinapsis y en la formación de la memoria. Se ha aislado μ -calpaína en membranas plasmáticas del sinaptosoma (Siman et al., 1983), y además se ha visto inhibición de LTP por administración de un inhibidor de cisteín-proteasas (leupeptina) (Staubli et al., 1988). Como se ha comentado anteriormente, la LTP es una forma de plasticidad sináptica en la cuál reside la consolidación de la memoria a largo plazo. La calpaína es necesaria para la formación de la LTP (Oliver et al., 1989; Denny et al., 1990; del Cerro et al., 1994; Vanderklish et al., 2000). En la LTP se producen cambios morfológicos en la sinapsis y en las densidades postsinápticas (PSDs). Estos cambios morfológicos podrían estar producidos por la proteólisis de sustratos de la calpaína como la espectrina. En respuesta a un aumento de glutamato en la sinapsis se produce un incremento de calcio intracelular en

la neurona postsináptica, lo cual produce una activación de la calpaína, que va a actuar sobre proteínas del citoesqueleto y otras proteínas adaptadoras, produciéndose una reorganización de la PSD y de la sinapsis. La calpaína va a proteolizar proteínas como GRIP (Lu et al., 2001) y PSD95 (Vinade et al., 2001) que intervienen en el anclaje a la membrana de los receptores de AMPA y NMDA respectivamente, lo que va a favorecer la función sináptica.

Además, la calpaína también puede activar la ruta de las MAP quinasas, provocando la activación de factores de transcripción implicados en plasticidad y en la consolidación de la memoria (Liu et al., 2008).

Por otro lado, β -catenina es un elemento esencial para mantener las uniones sinápticas por ser parte del complejo catenina-cadherina (Takeichi and Abe, 2005). La calpaína corta el extremo N-terminal de β -catenina, desestabilizando este complejo; además también va a impedir su fosforilación por GSK-3 en el extremo N-terminal y su consiguiente degradación permitiendo su translocación al núcleo donde activará factores de transcripción (Abe and Takeichi, 2007). De esta forma, β -catenina truncada es capaz de estimular la transcripción de genes y de modular la estructura de la sinapsis.

Otro sustrato de la calpaína es la proteína quinasa C, generando como fragmento la proteína quinasa M (PKM), constitutivamente activa y de corta vida media (Liu et al., 2007). La PKM está implicada, entre otras funciones, en el aprendizaje y la memoria, lo que sugiere que la calpaína contribuye a estos procesos (Osten et al., 1996).

Categoría	Sustrato	Localización
Proteína del Citoesqueleto	α -sinucleína	Citosol
Proteína del Citoesqueleto	Cadherina	Extracelular/ Citosol
Proteína del Citoesqueleto	Catenina (p120)	Citosol/ Membrana
Proteína del Citoesqueleto	GFAP	Citosol
Proteína del Citoesqueleto	MAP-1	Citosol
Proteína del Citoesqueleto	MAP-2	Citosol
Proteína del Citoesqueleto	NF200, NF160 y NF68	Citosol
Proteína del Citoesqueleto	Tau	Citosol
Proteína del Citoesqueleto	Tubulina (α , β)	Citosol
Proteína Estructural	Espectrina	Membrana
Proteína Estructural	PSD-95	Citosol (Sinapsis)
Proteína Estructural	SAP-97, proteína activadora del receptor de glutamato	Citosol (Sinapsis)
Proteína de Membrana	APP	Membrana/ Citosol
Proteína de Membrana	NCX	Membrana
Proteína de Membrana	PMCA	Membrana
Proteína de Membrana	PrP ^C	Membrana
Receptor	GluR1	Membrana
Receptor	mGluR1 α	Membrana
Receptor	Subunidad NR2A del receptor de NMDA	Membrana
Receptor	Subunidad NR2B del receptor de NMDA	Membrana
Receptor	Receptor de Rianodina	Retículo Endoplásmico
Proteína Sináptica	Dinamina 1	Citosol
Proteína Sináptica	GAP-43	Citosol
Neuropéptido	Quiotorfina	Citosol
Proteína de la Mielina	Glicoproteína asociada a Mielina	Extracelular
Proteína de la Mielina	Proteína básica de Mielina	Extracelular
Proteína de la Mielina	NFP	Extracelular
Proteína Citosólica	CRMP 1-5	Citosol/ Núcleo
Proteína Citosólica	htt, mhtt	Citosol
Enzima Citosólica	IP ₃ quinasa B	Membrana/ Citosol
Enzima Citosólica	mNOS	Citosol
Enzima Citosólica	p35/p39	Citosol/ Núcleo
Enzima Citosólica	PLC β	Citosol
Enzima Citosólica	PKA	Citosol
Enzima Citosólica	Tirosina Hidroxilasa	Citosol
Factor de Transcripción	β -catenina	Citosol/ Núcleo
Factor de Transcripción	c-Fos	Núcleo
Factor de Transcripción	c-Jun	Núcleo
Factor de Transcripción	p53	Citosol/ Núcleo
Factor de Transcripción	Sp3 y Sp4	Núcleo
Señalización de Calcio	Cain/ cabin1	Citosol
Señalización de Calcio	Calpastatina	Citosol
Señalización de Calcio	CaMKII α	Citosol (Sinapsis)
Señalización de Calcio	CaMKIV	Núcleo
Señalización de Calcio	Calcineurina A	Citosol
Señalización de Calcio	IP ₃ R	Retículo Endoplásmico

Categoría	Sustrato	Localización
Señalización de Calcio	Canales de Calcio tipo L	Membrana
Señalización de Calcio	PKC	Citosol
Señalización de Calcio	SERCA	Retículo Endoplásmico
Muerte Celular	AIF	Mitocondria/ Núcleo
Muerte Celular	Apaf-1	Citosol
Muerte Celular	Bax	Citosol/ Mitocondria
Muerte Celular	Bcl-xL	Citosol
Muerte Celular	Bid	Citosol/ Mitocondria
Muerte Celular	Caspasa-3	Citosol
Muerte Celular	Caspasa-7	Citosol
Muerte Celular	Caspasa-9	Citosol
Muerte Celular	Caspasa-12	Citosol
Muerte celular	Caspasa-14	Citosol
Reparación de DNA	PARP	Núcleo
Traducción	eIF4G	Citosol
Degradación de Proteínas	Lisosomas	Citosol
Proteína Prión	PrP ^{Sc}	Citosol

Tabla 2. Sustratos de la calpaína. Adaptada de (Vosler et al., 2008).

1.2.4. Implicación de la Calpaína en patologías

Puesto que la calpaína tiene tantas funciones es lógico que esté implicada en numerosas patologías. Sin embargo, existen muy pocas enfermedades genéticas relacionadas con la calpaína, siendo la mayoría de las enfermedades en las que está implicada originadas por una desregulación de la homeostasis del calcio, ya que cualquier efecto de desregulación del calcio va a implicar un cambio en la activación de la calpaína.

En condiciones fisiológicas, la entrada de calcio en el interior celular provoca la activación de algunas moléculas de calpaína, mientras que en condiciones patológicas, la entrada masiva de calcio provoca la hiperactivación de calpaína, activándose todas las moléculas de calpaína disponibles de la célula, lo que va a provocar la proteólisis descontrolada de sus sustratos y llevar a la muerte celular (Liu et al., 2008).

La activación de la calpaína ha sido implicada en múltiples enfermedades, como por ejemplo la distrofia muscular, la formación de cataratas, la isquemia, y enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington, entre otras (Goll et al., 2003; Wu et al., 2007; Bevers and Neumar, 2008; Liu et al., 2008; Vosler et al., 2008).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

En esta tesis, nos hemos propuesto estudiar la presencia de isoformas de bajo peso molecular de la quinasa glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3), presentes tanto en muestras obtenidas a partir de tejidos animales como de cultivos celulares, que sugieren la actuación de alguna proteasa sobre dichas quinasas. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos parciales:

1. Identificación de la proteasa responsable de la truncación de la quinasa GSK-3.
2. Identificación del punto de corte y generación de un plásmido de expresión con dicha forma truncada.
3. Implicaciones fisiológicas de dicha truncación en cultivos primarios neuronales.
4. Estudio de dicho proceso en procesos neurodegenerativos en los que esté implicada la enzima GSK-3.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Reactivos

Los reactivos y productos químicos de uso general empleados en el desarrollo de este trabajo fueron de MERCK, SIGMA y GIBCO. A continuación se indican las casas comerciales de otros reactivos más específicos.

Glutamato, NMDA y ácido kainico son de SIGMA, glicina de MERCK, ionomicina y BAPTA-AM de Calbiochem. El inhibidor de los receptores de glutamato MK-801 es de Calbiochem, el inhibidor de los receptores de NMDA memantina y el inhibidor de proteosoma MG-132 es de SIGMA, y los inhibidores de calpaína calpeptina, ALLN y MDL 28170 son de Calbiochem. Leupeptina, pepstatina y aprotinina son de SIGMA. La enzima recombinante GSK-3 β es de SIGMA y GSK-3 α de Upstate Cell Signaling. La calpaína de Calbiochem (calpaína II). La proteína 14-3-3 ζ -GST es de Calbiochem y glutation-agarosa de SIGMA. La fosfatasa λ es de Biolabs. Para los ensayos de actividad de GSK-3 se empleó como sustrato un péptido sintético de la glucógeno sintasa (YRRAAVPPSPSLSRHSSPHQS*EDEE) con la serina 21 fosforilada de Neosystem.

3.1.2. Anticuerpos

Los anticuerpos primarios empleados en la inmunodetección, en inmunofluorescencia (IF) y en inmunohistoquímica (IHQ) se describen en la Tabla 3. En los ensayos de *Western blot* (WB) se utilizó como anticuerpo secundario anticuerpo de conejo anti-ratón a una dilución 1/1000 (DAKO) y un anticuerpo secundario cabra anti-conejo a una dilución 1/1000 (DAKO). En los estudios de inmunofluorescencia, los anticuerpos secundarios que se emplearon fueron cabra anti-ratón y cabra anti-conejo *Oregon Green 488* (Molecular Probes, Invitrogen) a una dilución 1/200 y cabra anti-ratón y cabra anti-conejo *Texas Red* (Molecular Probes/ Invitrogen) a una dilución 1/400.

Anticuerpo primario	Proteína	Especie	Casa comercial	Dilución WB	Dilución IHQ/ IF
Anti- α -tubulina	α -tubulina	Ratón	Sigma	1:5000	-
Anti- β -actina	β -actina	Ratón	Sigma	1:2000	-
Anti-GSK-3 α/β	GSK-3 α/β	Ratón	Cell Signaling (Biosource)	1:1000	1:100
Anti-p-ser-21/9-GSK-3 α/β	GSK-3 α/β -p-ser21/9	Conejo	Cell Signaling	1:500	-
Anti-MYC	Epítipo MYC	Ratón	Developmental Studies Hybridoma Bank	1:150	-
Anti-His	Poli-histidinas	Ratón	Sigma	1:500	-
Anti-HA	Epítipo HA	Ratón	Developmental Studies Hybridoma Bank	1:1000	-
Anti-Tau-1	Tau desfosforilado	Ratón	Chemicon	1:1000	-
Anti-PHF-1	Tau-P-Ser396/404	Ratón	Dr. Davies (Albert Einstein College, NY, E.E.U.U) (Greenberg et al., 1992)	1:100	-
Anti-7.51	Tau murino y humano en la región de unión a microtúbulos	Ratón	Dr. Wishik (Cambridge, Reino Unido) (Novak et al., 1991)	1:100	-
Anti-NR2C	La subunidad NR2C del receptor de NMDA (25-130)*	Conejo	Molecular Probes	1:200	-
Anti-espectrina	espectrina	Ratón	Chemicon International	1:1000	1:100
Anti-calpastatina	calpastatina	Conejo	Santa Cruz	1:200	-
Anti-p35/p25	p35 y p25	Ratón	Santa Cruz	1:500	-

Tabla 3. Relación de anticuerpos primarios y las diluciones a las que se emplearon en Western blot (WB), Inmunofluorescencia (IF) e Inmunohistoquímica (IHQ). * El anticuerpo anti-NR2C también es capaz de reconocer las subunidades NR2A y NR2B (Simpkins et al., 2003)

3.1.3. Plásmidos

El plásmido pcDNA3.1 es de Invitrogen. El plásmido pcDNA3/GSK-3 β expresa GSK-3 β y está unido al epítipo myc en el extremo N-terminal (Sanchez et al., 2001). El plásmido pCGN/GSK-3 β - Δ 9 expresa GSK-3 β al que le faltan los nueve primeros aminoácidos y está unido al epítipo HA en el extremo N-terminal fue cedido por Dr. A Kikuchi (Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Hiroshima, Japón). El plásmido pcDNA3/GSK-3 β -FragmentoII que expresa GSK-3 β truncada fue obtenido en el laboratorio como se detalla en el apartado 3.2.7 de esta memoria.

3.1.4. Animales utilizados

Se utilizaron ratones de la cepa C57/ BL6 y ratas Wistar que fueron criados en el Animalario del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”. Se mantuvieron entre cuatro y cinco animales por jaula, con comida y agua disponibles y en un ambiente con temperatura controlada y en un ciclo de luz/ oscuridad de 12/ 12 horas.

El uso de animales para experimentación (ratas y ratones) cumplía estrictamente las normas implantadas por la Unión Europea (86/609/EEC).

3.1.5. Muestras humanas

Las muestras humanas de cerebro (corteza temporal) se extrajeron de la autopsia de ocho controles (Tabla 4) o de cinco controles y cinco enfermos de Alzheimer (Tabla 5) siguiendo el protocolo para donación de tejido nervioso aprobado por los Comités de Ética de los bancos de cerebros de Barcelona y Bellvitge. El tiempo *post-mortem* del procesamiento del tejido fue entre 2,25 y 7 horas. Las muestras de cerebro congeladas se homogeneizaron y procesaron como se describe en la sección 3.2.11. En la Tabla 4 se muestran los cerebros empleados en el ensayo del tiempo *post-mortem* y la truncación de GSK-3 en muestras humanas, y en la Tabla 5, los cerebros empleados en el estudio de la truncación de GSK-3 en la enfermedad de Alzheimer.

Sexo	Edad	Diagnóstico	Intervalo de tiempo <i>Post-Mortem</i>
MUJER	49	SLS	7 h
HOMBRE	79	SLS	7 h
MUJER	75	SLS	3 h
MUJER	65	SLS	4 h
HOMBRE	53	SLS	3 h
HOMBRE	78	SLS	2 h 15 min
HOMBRE	59	SLS	7 h 5 min
HOMBRE	59	SLS	6 h 25 min

Tabla 4. Sexo, edad e intervalo del tiempo *post-mortem* de los cerebros usados en los experimentos de análisis de la truncación de GSK-3 en muestras humanas (apartado 10.2.2 de los Resultados). SLS: sin lesiones

Sexo	Edad	Diagnóstico	Intervalo de tiempo <i>Post-Mortem</i>
MUJER	49	SLS	7 h
HOMBRE	79	SLS	7 h
MUJER	75	SLS	3 h
MUJER	65	SLS	4 h
HOMBRE	53	SLS	3 h
HOMBRE	69	EA V	6 h
MUJER	83	EA V	5 h
HOMBRE	79	EA V + AA	5 h 25 min
HOMBRE	86	EA V + AA	4 h 15 min
MUJER	82	EA V	1h 45 min

Tabla 5. Sexo, edad e intervalo del tiempo *post-mortem* de cerebros control y de enfermos de Alzheimer usados en los experimentos de análisis de la truncación de GSK-3 en la enfermedad de Alzheimer (apartado 10.3.1 de los Resultados). SLS: sin lesiones; EA V: estadio V de la enfermedad de Alzheimer; AA: angiopatía amiloide.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Ensayo *in vitro* de la calpaína

Incubamos 0,5 µg de GSK-3β o 0,5 µg de GSK-3α con calpaína (0,2 U/ml) en el siguiente tampón: TrisHCl 50 mM pH 7,5, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, β-mercaptoetanol 5 mM. Las muestras fueron incubadas a 30°C en agitación durante los tiempos correspondientes en presencia o ausencia de CaCl₂ 5 mM y calpeptina 10 µM. La reacción se inició añadiendo calcio 5 mM y se paró añadiendo el tampón de carga de

electroforesis cuya composición se detalla en el apartado 3.2.11 (extractos proteicos), suplementado con el inhibidor de calpaína calpeptina (20 μ M).

3.2.2. Tratamiento de muestras de cerebro de ratón o humanas con calcio e inhibidores de proteasas

Los extractos corticales de cerebro de ratón fueron homogeneizados en 50 mM Tris-HCl, pH 7,4 y en presencia de EDTA 1 mM. Las muestras fueron incubadas a 30°C durante los tiempos indicados en el texto con o sin CaCl_2 5 mM, y en ausencia o presencia de los siguientes inhibidores de proteasas: aprotinina, pepstatina, calpeptina y ALLN. A continuación las muestras fueron mezcladas con el tampón de carga de electroforesis (ver apartado 3.2.11). En el caso de los extractos para medir actividad enzimática, la reacción se paró con una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche Applied Science) suplementado con el inhibidor de calpaína calpeptina (20 μ M).

El mismo protocolo se siguió con las muestras humanas que presentaban un tiempo *post-mortem* de 3 horas (ver Tabla 4).

3.2.3. Ensayo de actividad enzimática de GSK-3

La actividad quinasa de GSK-3 procedente del ensayo *in vitro* de calpaína utilizando GSK-3 recombinante, procedente de extracto de cerebro de ratón incubado con CaCl_2 o procedente de extracto de cultivos primarios de neuronas corticales estimuladas por NMDA fue ensayada como se indica a continuación y como ha sido previamente descrito (Hernandez et al., 2002). Como sustrato fue usado el péptido GS-1, (YRRAAVPPSPSLSRHSSPHQS*EDEE), que es un péptido sintético de la glucógeno sintasa con la serina 21 en forma fosforilada (Stambolic and Woodgett, 1994). Las muestras fueron incubadas a 30°C con 30 μ M del péptido GS-1 en presencia de ATP 50 μ M (1.000 cpm/pmol de [γ - 32 P] ATP, PerkinElmer Life Sciences) en 25 mM TrisHCl pH 7.5, 1 mM DTT, 10 mM MgCl_2 y, o bien 10 mM NaCl o bien 10 mM LiCl. Los ensayos fueron parados alicuoteando las muestras sobre papel de fosfocelulosa P81, y los filtros fueron procesados como se ha descrito previamente (Moreno et al., 1996). La actividad de GSK-3 fue calculada como la diferencia entre la actividad en presencia de NaCl 10 mM y la actividad en presencia de LiCl 10mM. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de la actividad con respecto a las muestras control.

Para medir la IC_{50} del litio, la actividad enzimática de GSK-3 se midió como se ha descrito en presencia o ausencia de distintas concentraciones de LiCl (0,01 – 20 mM).

La actividad de GSK-3 fue normalizada midiendo los niveles de proteína total de GSK-3 mediante *Western blot* (ver apartado 3.2.12).

3.2.4. *Pull-down*

Se hizo un ensayo *in vitro* de GSK-3 β y calpaína, en presencia y ausencia de $CaCl_2$ como se ha descrito previamente (apartado 3.2.1). La reacción se paró en hielo añadiendo el cóctel de inhibidores de proteasas (Roche Applied Science), calpeptina 20 μ M y EGTA 2 mM. A continuación se incubó en presencia o ausencia de GST-14-3-3 ζ (Calbiochem) durante 2 h en agitación suave a 4°C. La proporción estequiométrica entre ambas proteínas fue de cuatro moléculas de 14-3-3 ζ por cada molécula de GSK-3 β . A continuación se añadió 50 μ l de glutation-agarosa (38,45 mg/ml) (SIGMA) por cada tubo, al que previamente se había añadido BSA 1%, NaCl 100 mM, el cóctel de inhibidores de proteasas (Roche Applied Science), calpeptina 20 μ M y EGTA 2 mM y se incubó durante 2 h en agitación suave a 4°C. Para recoger las bolas de glutation-agarosa unidas a GST se centrifugó durante 1 minuto a 800 x g. Se recogió el sobrenadante y el precipitado se lavó 5 veces con 1 ml del tampón de lavado que contiene: PBS Tritón X-100 1 %, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, cóctel de inhibidores de proteasas (Roche Applied Science), calpeptina 20 μ M y EGTA 2 mM. Se centrifugó tras cada lavado 30 seg a 800 x g. Finalmente, el precipitado se resuspendió en tampón de carga de electroforesis (apartado 3.2.11), se hirvió durante 5 minutos y se centrifugó para no cargar la agarosa cuando se realice la electroforesis (apartado 3.2.12).

El mismo protocolo se siguió con GSK-3 β fosforilada y sin fosforilar, tras ser tratada con fosfatasa- λ como se describe a continuación.

3.2.5. Desfosforilación de proteínas con la fosfatasa- λ

Las isoformas GSK-3 α y GSK-3 β comerciales fueron desfosforiladas con fosfatasa- λ (BioLabs) durante 30 minutos a 30°C en agitación en 50 mM Tris-HCl, pH 7,8, 300 mM NaCl, 10% glicerol, 0,5 mM MnCl₂, 5 mM DTT y el cóctel de inhibidores de proteasas (Roche Applied Science). La desfosforilación de la proteína fue confirmada por *Western blot* (apartado 3.2.12) con el anticuerpo anti-p-Ser-21/9-GSK-3 α/β y el anticuerpo anti-GSK-3 α/β .

3.2.6. Secuenciación de GSK-3 β truncada por calpaína

Para determinar la secuencia N-terminal del fragmento de GSK-3 β generado por la proteólisis de calpaína, la muestra obtenida tras incubar 7,5 μ g de GSK-3 β con 52 U de calpaína durante 2,5 minutos fue separada en un gel de acrilamida del 10% y posteriormente transferida a una membrana de PVDF (Immobilon-P; MILLIPORE), la cual se tiñó con Azul de *Coomassie* como se indica a continuación. Las bandas correspondientes a GSK-3 β intacta y truncada por calpaína fueron recortadas y enviadas a secuenciar por el método de EDMAN en el Departamento de Química de proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), Madrid, España.

La correcta truncación de GSK-3 por calpaína fue comprobada realizando *Western blot* con una alícuota de la muestra.

Transferencia a membrana de PVDF y Tinción de Coomassie

Antes de la transferencia se incubó la membrana de PVDF en Metanol 100% durante 3 minutos, hasta que la membrana fuese translúcida. A continuación se sumergió completamente en H₂O durante 5 minutos y, por último, se lavó 3 – 4 veces en tampón de transferencia durante 10 – 20 minutos. Cuando terminó la electroforesis (apartado 3.2.12), el gel se lavó en H₂O durante 1 minuto y se incubó en tampón de transferencia durante 20 minutos. La transferencia se realizó igual que con las membranas de nitrocelulosa (apartado 3.2.12). Después de la transferencia, la membrana se lavó en H₂O durante 2 minutos en agitación y se incubó 10 segundos en Metanol 100%. A continuación se tiñó con *Coomassie* durante 5 minutos y se destiñó en 50% Metanol y 10% ácido acético, la solución se cambió varias veces. Finalmente, se aclaró con H₂O y se dejó secar.

3.2.7. Construcción del plásmido de GSK-3 β truncada

Para la construcción del plásmido de expresión pcDNA3/GSK-3 β -FragmentoII amplificamos por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la secuencia del fragmento II de GSK-3 β truncada por calpaína, utilizando los cebadores que diseñamos, a los que habíamos añadido las dianas de las enzimas de restricción *Hind* III y BamH I para su posterior clonación en el vector pcDNA3.1 (INVITROGEN).

Los cebadores utilizados (ISOGEN) fueron: 5' – CCC AAG CTT ATG CGA CAG CAA GAA GTC AGC TAT AC – 3' y 5' – CGC GGA TCC TCA GGA GGA GTT GGA GGC AGA TGC AG – 3'. La PCR se realizó con la polimerasa PFU (Promega) y la concentración de MgCl₂ fue 2 mM. El programa de la PCR fue el siguiente: la desnaturalización inicial se realizó a 94°C durante 45 seg, seguido de 25 ciclos de 94°C 45 seg / 65°C 45 seg / 72°C 3 minutos y la extensión final se realizó a 72°C durante 10 minutos.

Tras comprobar con un gel de agarosa del 0,8% que se amplificó el fragmento con un tamaño adecuado (1,1 kb), éste fue digerido con las enzimas de restricción *Hind* III y BamH I (Roche Applied Biosystems) durante 30 minutos a 37°C.

Posteriormente, purificamos el resultado de la digestión de una banda de un gel de agarosa (Gel extraction kit, Qiagen) y se ligó al plásmido pcDNA3, usando la DNA ligasa del bacteriófago T4 (BioLabs). El plásmido pcDNA3 había sido previamente digerido también con las enzimas *Hind* III y BamH I, purificado y desfosforilado con la fosfatasa alcalina (Roche Applied Biosystems).

Con el producto de ligación se transformaron bacterias competentes de la cepa *E. coli* DH5 α (Servicio de Fermentación, Centro Biología Molecular “Severo Ochoa”, Madrid, España), se plaquearon en placas LB-agar con el antibiótico de selección ampicilina (0,1 μ g/ml) y a las 24 horas se aislaron los clones potencialmente positivos de bacterias. Para ello, se pusieron a crecer en el medio líquido LB, a 37°C y en agitación. Tras 24 horas, se paró el cultivo, y una alícuota de éste se utilizó para purificar el DNA plasmídico (Miniprep Kit, Promega) para determinar por digestión con las enzimas de restricción *Hind* III y BamH I los clones positivos que contenían el fragmento II de GSK-3 β . Se seleccionaron cinco clones positivos para ser analizados por secuenciación (Unidad de Genómica, Parque científico de Madrid, España). Una vez comprobada que la secuencia era correcta, se purificó el DNA plasmídico (Maxiprep Kit, Qiagen).

3.2.8. Mantenimiento de líneas celulares

En este trabajo se utilizaron las siguientes líneas celulares: las células COS-7 de fibroblastos de riñón de mono verde africano (Gluzman, 1981) y las células HEK-293 de riñón de embrión humano, las cuales se encontraban establemente transfectadas con la proteína Tau 3R (cedida por el Dr. Miguel Medina, actualmente en NOSCIRA, Madrid, España).

Las células fueron crecidas en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal (FBS) (Invitrogen Life Technologies-Gibco) inactivado por calor, 2 mM de glutamina y 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina en un incubador humidificado a 37°C y con 5% de CO₂. Las células HEK-293 Tau 3R fueron crecidas en presencia del antibiótico de selección Zeocina (200 µg/ml; Invivo Gen)

Los pases para mantenerlas se hicieron con tripsina/ EDTA, durante 5 minutos a 37°C, para ser disgregadas antes de volver a ser plaqueadas. Antes de plaquearlas, las células se centrifugaron y se contaron.

3.2.9. Transfección de líneas celulares

Se transfectó 0,5 µg de plásmido myc-GSK-3β por 50.000 células COS-7 o HEK-293 plaqueadas en un pocillo de M24 y como control se usó el plásmido pcDNA3.1 (Invitrogen) vacío con Lipofectamina TM 2000 (Invitrogen) en el medio de transfección Optimem (GIBCO). Para cada transfección, fueron preparados 0,5 µg de DNA en 50 µl de Optimem y 1 µl de Lipofectamina TM 2000 en otros 50 µl de Optimem, dejándolo incubando 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, ambas diluciones fueron mezcladas e incubadas durante 20 minutos. La mezcla fue añadida gota a gota a las células, a las cuales se les había cambiado a un medio Optimem y sin antibióticos. A las 4 horas se retiró el medio de transfección y se sustituyó por DMEM 10% FBS con el tratamiento correspondiente si es necesario.

Se siguió el mismo protocolo para transfectar con el plásmido HA-GSK-3β-Δ9 y para transfectar con el plásmido GSK-3β-FragmentoII.

Las células COS-7 transfectadas con GSK-3β-FragmentoII fueron incubadas con LiCl 10 mM, en presencia de Inositol 100 µM disuelto en medio de cultivo.

Los extractos celulares se realizaron lavando dos veces con PBS y se hizo el extracto con 100 µl de tampón de carga de electroforesis por pocillo de M24.

La fijación de las células para observarlas por inmunofluorescencia se realizó incubando las células con 4% paraformaldehído (PFA) / 10 mM MgCl₂ en PBS durante 10 minutos en un incubador humedecido a 37°C y, a continuación, se lavó tres veces con PBS.

En el caso de las células COS-7 transfectadas con MYC-GSK-3β o HA-GSK-3β-Δ9 que se van a utilizar para realizar el ensayo de la calpaína se recogieron a las 48 horas, se lavaron dos veces con PBS y se recogieron en 200 µl de tampón Tris-HCl 50 mM y EGTA 2 mM pH 7,4 en hielo y se homogeneizaron posteriormente con 20 pases en un homogeneizador vidrio-vidrio con el émbolo B.

3.2.10. Cultivos primarios de neuronas corticales

Las neuronas de corteza fueron obtenidas de ratones postnatales de la cepa swiss de 1 día de edad básicamente siguiendo el método descrito previamente (Banker and Cowan, 1977). Las células disociadas con papaína siguiendo las instrucciones del fabricante (Worthington) fueron sembradas en placas M24 cubiertas con polilisina (SIGMA) (100 µg/ml) más laminina (SIGMA) (10 µg/ml) y cultivadas en medio NeuroBasal (NB-GIBCO) suplementado con 10% (v/v) de suero de caballo, 2 mM de glutamina, 2 mM de piruvato, 100 U/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomicina. Tres horas después, el medio anterior se sustituye por otro que contiene NB suplementado con 2% (v/v) B27 (GIBCO) suplementado con 2 mM de glutamina, 2 mM de piruvato, 100 U/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomicina.

El crecimiento de otras células no neuronales fue inhibido con AraC (1-β-D-arabinofuranosilcitosina; Calbiochem) 5 µM desde el tercer día de cultivo. Las células se mantuvieron en una atmósfera humedecida con 5% de CO₂ a 37°C y la mitad del medio de cultivo se reemplazó cada 2-3 días. A los 12 días de cultivo, fueron añadidos al medio de cultivo las diferentes drogas a las concentraciones y los tiempos indicados para cada tratamiento.

Los extractos celulares se realizaron lavando dos veces con PBS y se hizo el extracto con 100 µl de tampón de carga de electroforesis por pocillo de M24.

Los tratamientos de los cultivos primarios se realizaron el DIV 12. Calpeptina, ALLN, MK-801 y BAPTA-AM (100 μ M) fueron disueltos en DMSO, siendo la concentración final de DMSO en el medio 0,2 - 0,4%. EGTA (5 mM) y memantina fueron disueltos en medio de cultivo. La concentración de las drogas excepto BAPTA-AM y EGTA se indica en la sección 4.9. NMDA 100 μ M y glutamato 1 mM también fueron disueltos en medio de cultivo. Las drogas fueron añadidas 30 minutos antes de la estimulación con NMDA o glutamato. Los experimentos fueron realizados en presencia de glicina 100 μ M que fue añadida 15 minutos antes de la estimulación con NMDA o glutamato. Los tiempos de incubación para cada tratamiento son indicados en cada caso en el texto.

3.2.11. Extractos proteicos

Los extractos totales de proteínas procedentes de tejido cerebral de rata, ratón y muestras humanas se obtuvieron mediante la homogeneización en 20 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 1% Tritón X-100, inhibidores de proteasas (cóctel de Roche: 1mM PMSF, 10 μ g/ml aprotinina, 10 μ g/ml pepstatina, 10 μ g/ml leupeptina) e inhibidores de fosfatasa (50 mM NaF, 1 μ M Na_2VO_4 (ácido okadaico), 30 mM glicerofosfato y 5 mM pirofosfato), utilizando un homogeneizador vidrio-vidrio, con el émbolo B. Posteriormente, se determinó la concentración proteica de las muestras mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

En el caso de los ensayos *in vitro* de calpaína el tampón utilizado fue Tris-HCl 50 mM y EGTA 2 mM pH 7,4.

Los extractos totales de proteínas de cultivos neuronales se obtuvieron añadiendo directamente a la placa de cultivo el tampón de carga de electroforesis (Tris 50 mM pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 100 mM β -mercaptoetanol, y 0,1% azul de bromofenol), con inhibidores de fosfatasa (10 mM glicerofosfato y 2,5 mM pirofosfato). Posteriormente se hirvieron las muestras durante 5 minutos.

3.2.12. Electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección (Western blot)

Los extractos proteicos se hirvieron durante 5 minutos en tampón de carga de electroforesis. Las proteínas (15 µg de proteína total por pocillo) fueron separadas en presencia de SDS en geles de poliacrilamida SDS-PAGE (Laemmli, 1970) al 10% (p/v) excepto en el caso de espectrina, NR2B, y calpastatina (8% (p/v)) y en el caso de p35/p25 (12% (p/v)). Posteriormente, las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell) según el método de Towbin (Towbin et al., 1979). Para comprobar la eficiencia de la transferencia, las membranas se tiñeron con Rojo Ponceau. Las membranas se bloquearon con leche en polvo desnatada al 5% (p/v) en PBS-0.1% Tween-20 (v/v), durante 30 minutos. Se procedió a la incubación con el anticuerpo primario diluido en medio de bloqueo (Tabla 3) toda la noche a 4°C. Las membranas fueron lavadas durante cinco minutos dos veces consecutivas con PBS-0.1% Tween-20. Los anticuerpos secundarios de conejo anti-ratón o cabra anti-conejo acoplados a peroxidasa (DAKO) fueron diluidos en medio de bloqueo (1/1000). Las membranas fueron incubadas durante 60 minutos con los anticuerpos secundarios para posteriormente ser lavadas (7 veces, 5 minutos) con PBS-0.1% Tween-20. Las proteínas inmunoreactivas fueron visualizadas utilizando el sistema ECL de Amersham. La cuantificación de las proteínas fue realizada utilizando el programa Quantity One y el densitómetro GS-800 de Bio-Rad. Los valores de densitometría obtenidos con estos anticuerpos en el rango lineal de detección se normalizaron con respecto a los valores obtenidos con el anticuerpo anti-β-tubulina o anti-β-actina para corregir cualquier desviación en las cantidades de proteínas cargadas.

3.2.13. Inmunofluorescencia de cultivos celulares

Las células fueron crecidas sobre cubres (Menzel-Glaser) y se fijaron con 4% paraformaldehído durante 10 minutos a 37°C como se ha indicado anteriormente.

Las células fijadas se permeabilizaron durante 15 minutos con 0.1% Tritón X-100/ PBS, y se bloquearon con 1% albúmina de suero bovino (BSA) en PBS. Para evitar la autofluorescencia, antes del bloqueo fueron incubados durante 30 minutos con glicina 1 mM. Los anticuerpos primarios se añadieron en 1% BSA/ PBS y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Tras 2 lavados con PBS, se añadieron los anticuerpos secundarios en 1% BSA/ PBS. Además, para marcar las

células utilizamos faloidina, que se une a actina polimerizada. La faloidina se presenta acoplada al fluoróforo Alexa 488 (Invitrogen) y se puso en la solución de bloqueo a dilución 1:800 junto con el anticuerpo secundario. Después, se hicieron 2 lavados con PBS y un lavado de H₂O, y se montaron con FluorSave Reagent (Calbiochem), para su observación al microscópico.

Las imágenes se tomaron en un microscopio vertical AxiosKop 2 (Zeiss) acoplado a láser confocal MicroRadiance (BioRad) o en un microscopio vertical Axioskop 2 plus (Zeiss) acoplado a una cámara CCD color.

3.2.14. Inmunohistoquímica

Los cerebros se extrajeron y uno de los dos hemisferios se fijó en PFA 4% durante una noche a 4°C y después se crioprotegió en una solución de sacarosa 30 % en PBS durante 2 días, tras 3 lavados de 30 minutos en PBS. Dicho hemisferio se incluyó en un bloque de Tissue-Tek OCT (Sakura). Se cortaron secciones sagitales de 30 µm en un microtomo de congelación o criostato (Leica) y se recogieron en una solución crioprotectora compuesta por etilenglicol 30%, glicerol 26% y tampón fosfato pH 7.2.

Las secciones se pretrataron durante 45 minutos con H₂O₂ al 1% en PBS para inactivar la peroxidasa endógena. A continuación se incubaron durante 1 h en una solución de bloqueo compuesta por BSA 1%, FBS 5% y Tritón X-100 0.2% en PBS. Posteriormente, las secciones se incubaron con el anticuerpo primario preparado en la solución de bloqueo durante toda la noche. A continuación, se incubaron las secciones con el anticuerpo secundario biotinilado caballo-anti-ratón o cabra-anti-conejo (ABC Vectastain kit) durante 1 h. Por último, se incubaron con un complejo avidina-peroxidasa (ABC Vectastain kit) durante 1 h. La reacción cromógena se llevó a cabo con diaminobenzidina (DAB) (SIGMA) y 0.003% H₂O₂ durante un tiempo de 10 a 30 minutos, dependiendo del anticuerpo. Las muestras se lavaron con agua destilada y se montaron con FluorSave Reagent (Calbiochem).

Las imágenes se tomaron en un microscopio Olympus acoplado a una cámara CCD color (Color View) y se utilizó el programa Cell A de Olympus.

3.2.15. Tinción con Fluoro-Jade

La tinción de Fluoro Jade, que tiñe neuronas degeneradas, se realizó de acuerdo a lo previamente descrito (Schmued et al., 1997). Las secciones se montaron en portas gelatinizados y se dejaron secar en una estufa a 60°C durante 2 h. Los portas se sumergieron sucesivamente 3 minutos en etanol 100%, 1 minuto en etanol 70% y 1 minuto en H₂O destilada. A continuación se incubaron 20 minutos con permanganato de potasio 0.06%. Después se realizaron 2 lavados de 1 minuto con H₂O destilada, y se incubaron 30 minutos con 0,01 mg/ml Fluoro Jade B en 0,1% ácido acético que fue preparado en el momento a partir de la solución stock de Fluoro Jade B que se encuentra a 10 mg/ml. Después se realizaron 12 lavados de 2 minutos con H₂O destilada y se secaron en la estufa a 60°C durante 2 h. Por último, se deshidrataron lavando 3 veces durante 2 minutos con la solución HistoClear II (Nacional Diagnostics), y se montaron los cubres con DPX (Serva).

Las imágenes se tomaron en un microscopio vertical Axioskop 2 plus (Zeiss) acoplado a una cámara CCD color.

3.2.16. Tratamiento de los animales:

3.2.16.1. Tratamiento de ratas con kainato

Ratas Wistar de cuatro meses de edad cuyo peso oscilaba entre 270 – 330 g fueron inyectadas intraperitonealmente (i.p.) con kainato en una dosis de 10 mg/kg. El kainato fue disuelto en solución salina (0,9% NaCl) (Braun). Se inyectaron ocho ratas, de las cuales sobrevivieron siete. Los animales se sacrificaron a 3, 7, 24 y 48 h del pinchazo mediante CO₂. La mitad del cerebro fue fijada en PFA 4% a 4°C para inmunohistoquímica y de la otra mitad, fue extraída la corteza y el hipocampo congelándose en nitrógeno líquido, para ser guardado a -80°C, y posteriormente homogeneizarse y ser analizadas por *Western blot*.

3.2.16.2. Análisis *post-mortem* de la truncación de GSK-3 y tratamiento de ratones con MDL 28170

Ratones de dos meses de edad fueron sacrificados mediante CO₂ y se conservaron a temperatura ambiente (22°C) antes de sacarles el cerebro. Los cerebros fueron extraídos a 0, 1, 3, 6, 12 y 24 horas tras la muerte y se procesaron como se ha

indicado anteriormente para ser analizados por *Western blot*. La inhibición de la calpaína fue llevada a cabo con el inhibidor de la calpaína permeable a la barrera hematoencefálica MDL 28170 (Calbiochem) (Li et al., 1998). El inhibidor fue administrado intraperitonealmente como ha sido descrito previamente (Araujo et al., 2008). El tratamiento se inició con el vehículo (DMSO), 20, 40 o 60 mg/kg, i.p., seguido de dos inyecciones adicionales similares cada 3 h. Los animales fueron sacrificados a las 9 h del pinchazo, y las muestras del cerebro fueron obtenidas como se ha descrito anteriormente a las 12 h de la muerte del animal.

3.2.17. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó usando el análisis de varianza (*one-way ANOVA*).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. GSK-3 es cortada por calpaína en extractos cerebrales

Al sobreexponer *Western blot* realizados con un anticuerpo anti-GSK-3 α/β tanto en muestras obtenidas a partir de tejidos animales como de cultivos celulares, suelen aparecer unas bandas de peso molecular ligeramente inferior al de GSK-3 β lo cual sugiere la actuación de alguna proteasa sobre dichas quinasas. Para confirmar esta sospecha, realizamos homogeneizados de cerebros de ratón en un medio que sólo contenía Tris/ EGTA y observamos mediante *Western blot* si GSK-3 era proteolizada. En ausencia de calcio no se observó degradación alguna, mientras que si añadíamos calcio a los homogeneizados sí se producía degradación de GSK-3 de una manera dependiente del tiempo (Fig. 1A). Se observaron dos productos de degradación de GSK-3, el primero de ellos con un peso molecular aparente de 40 kDa (fragmento I) y el segundo con un peso de 30 kDa (fragmento II). Esta degradación inducida por calcio era inhibida por calpeptina y por ALLN, dos inhibidores específicos de calpaína, de una manera dependiente de la dosis (IC_{50} = 11 y 60 nM respectivamente, Fig. 1B-C). Para confirmar que GSK-3 es proteolizada por calpaína utilizamos otros inhibidores selectivos de proteasas en las mismas condiciones. Sin embargo, el inhibidor de serin-proteasas aprotinina y el de aspartil-proteasas pepstatina no fueron capaces de inhibir significativamente la degradación de GSK-3 inducida por calcio (Fig. 1B-C), lo que excluye este tipo de proteasas en la proteólisis de GSK-3. Todos estos resultados sugieren la implicación de la proteasa calpaína en la truncación de GSK-3.

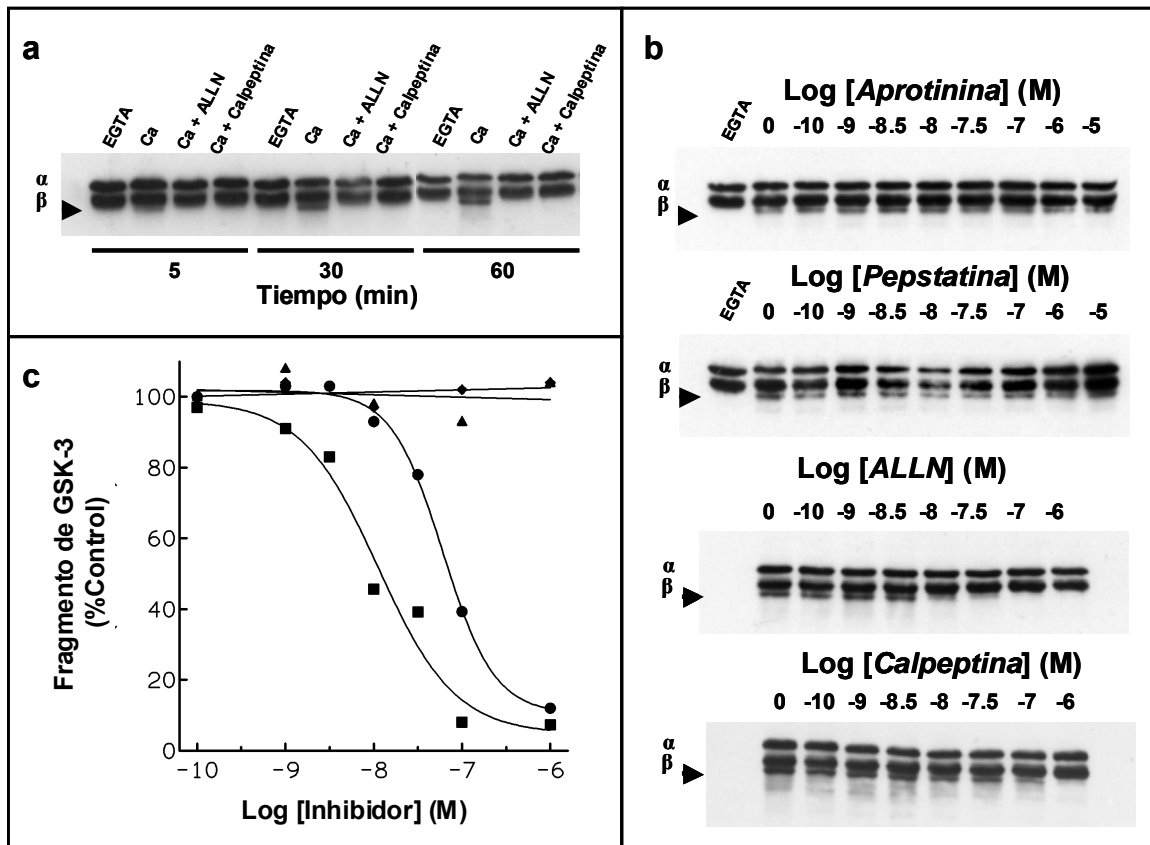


Fig. 1. Proteólisis de GSK-3 en extractos de cerebro de ratón. **A.** Acumulación de GSK-3 truncada en función del tiempo en presencia de CaCl_2 5 mM. Extractos corticales de cerebro de ratón fueron incubados a 30°C en presencia o ausencia de CaCl_2 , y posteriormente analizados por *Western blot* con el anticuerpo anti-GSK-3 α/β . También se probó el efecto sobre estos extractos de ALLN 10 μM y calpeptina 10 μM . **B.** Inhibición de la proteólisis de GSK-3 inducida por la incubación con CaCl_2 durante 30 minutos por distintas concentraciones de varios inhibidores de proteasas. **C.** Cuantificación de la inhibición de la proteólisis de GSK-3 en función de la dosis de inhibidor. ALLN (■), calpeptina (●), aprotinina (◊), y pepstatina (▲)

4.2. La forma truncada de GSK-3 tiene mayor actividad enzimática que la forma intacta

Para saber si la truncación de GSK-3 afectaba a su actividad quinasa medimos la actividad enzimática de los extractos de cerebro de ratón previamente analizados (Fig. 1). Se observó un incremento significativo de la actividad enzimática ($51.8 \pm 6\%$, $p < 0.02$) en los extractos tratados con calcio respecto al extracto control. Este incremento en la actividad fue inhibido por el inhibidor de calpaína calpeptina (Fig. 2).

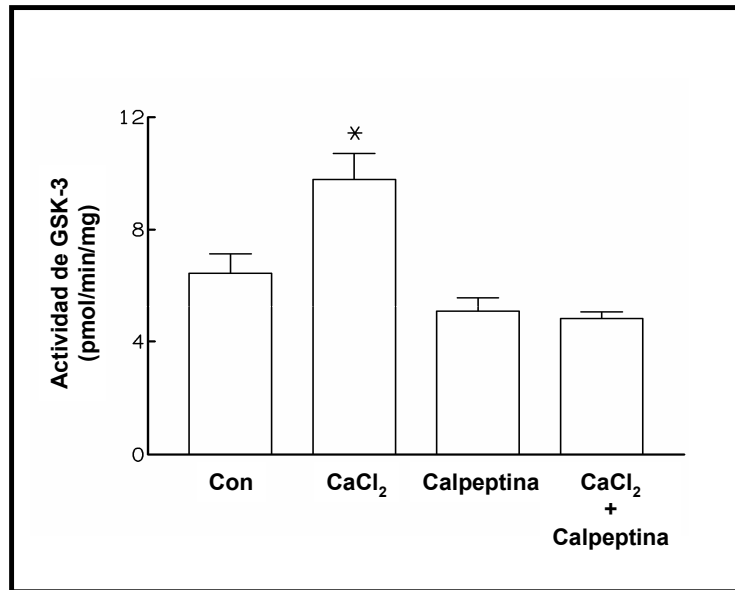


Fig. 2. Actividad específica de GSK-3 medida en extractos de cerebro de ratón en Tris/ EGTA incubados a 30°C durante 30 minutos con CaCl₂ 5 mM, o con calpeptina 1 μM, o con ambos. La actividad quinasa fue medida como se indica en Materiales y Métodos durante 10 minutos. El histograma muestra la comparación de la actividad GSK-3 de los extractos de cerebro tras los distintos tratamientos. La actividad de GSK-3 corresponde a la diferencia de la actividad obtenida en presencia de NaCl 10 mM y la actividad en presencia de LiCl 10 mM.

4.3. La calpaína corta a GSK-3α y GSK-3β en el extremo N-terminal

Para estudiar si ambas isoenzimas de GSK-3 eran sustrato de la calpaína incubamos GSK-3α y GSK-3β recombinante con m-calpaína purificada. Observamos que ambas isoenzimas son cortadas por calpaína produciéndose dos fragmentos (Fig. 3A). Cuando analizamos ambos fragmentos en el mismo gel (Fig. 3C), observamos que ambas isoenzimas producen un fragmento de 30 kDa (fragmento II), mientras que el fragmento I de GSK-3α tiene un peso molecular aparente (42 kDa) mayor que el de la isoforma β (40 kDa). La cuantificación de estos productos proteolíticos (Fig. 3B) muestra que la forma intacta de ambas isoformas es rápidamente digerida por la calpaína. Sin embargo, el fragmento I de la isoforma β es mejor sustrato para la calpaína que el generado a partir de la isoforma α. Tras cinco minutos de digestión con calpaína, el fragmento I generado a partir de GSK-3β representa el 25% de la GSK-3β total; mientras que, en las mismas condiciones experimentales, el fragmento I de la isoforma α representa el 60% de la proteína GSK-3α.

La GSK-3 recombinante utilizada lleva en el extremo N-terminal una cola de histidinas. Usando un anticuerpo que reconoce este epítipo, observamos que la calpaína corta en el extremo N-terminal de GSK-3 ya que las formas truncadas no son reconocidas por dicho anticuerpo (Fig. 3D). Además, este hecho también confirma que la calpaína digiere rápidamente la proteína generando el fragmento I. De hecho, dicho anticuerpo es incapaz de detectar las formas intactas de GSK-3 tras dos minutos de incubación con calpaína.

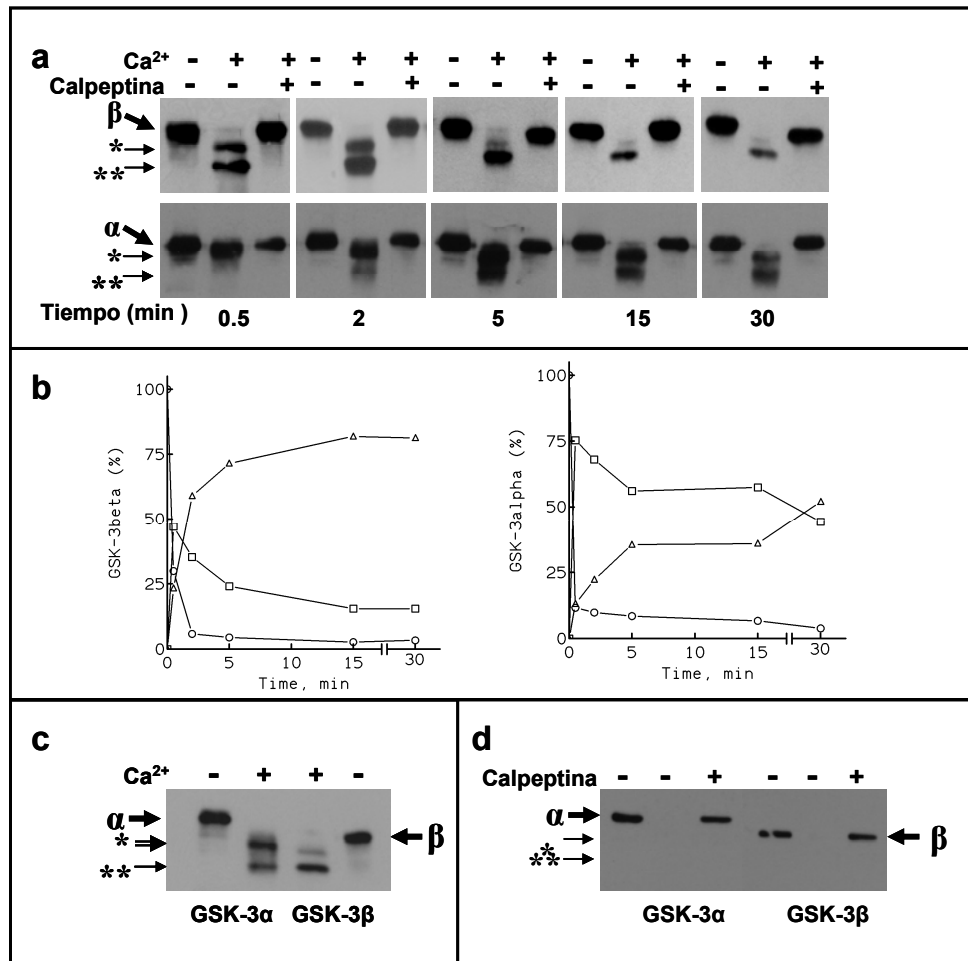


Fig. 3. Proteólisis por calpaína de GSK-3 α y GSK-3 β *in vitro*. **A.** Incubación de GSK-3 α y GSK-3 β recombinante con calpaína (0,2 unidades/ml) a 30° C durante 0,5, 2, 5, 15 y 30 minutos. No se observó degradación en ausencia de calcio o en presencia de calcio y calpeptina. Todas las muestras fueron incubadas con calpaína (* indica el fragmento I y ** indica el fragmento II). **B.** Cuantificación de las isoformas de GSK-3 expresados como el porcentaje de la enzima total presente en cada tratamiento respecto al tiempo (○, forma intacta; □, fragmento I; Δ, fragmento II). **C.** Analizamos los fragmentos de ambas isoformas en un mismo gel, y observamos que ambas isoformas producen un fragmento con un peso molecular aparente de 30 kDa (fragmento II, dos asteriscos), mientras que el fragmento I (un asterisco) tiene un peso molecular aparente ligeramente mayor en el caso de la isoforma α (42 kDa) que la isoforma β (40 kDa). **D.** *Western blot* con el anticuerpo anti-histidinas que reconoce la cola de histidinas del extremo amino terminal de GSK-3 α y GSK-3 β recombinantes.

Para confirmar estos resultados, transfectamos células COS-7 con un vector de expresión que lleva el epítipo MYC unido al extremo amino terminal de GSK-3 β . A las 48 horas de transfección se recogieron las células en presencia de Tris/ EGTA. A continuación los extractos fueron incubados con m-calpaína. La proteólisis por calpaína de GSK-3 β transfectada fue confirmada mediante *Western blot* en ausencia o presencia de calcio (Fig. 4A). Esta degradación inducida por calpaína fue inhibida por calpeptina. Estos mismos extractos fueron ensayados con un anticuerpo que reconoce el epítipo MYC del extremo N-terminal y observamos que sólo detecta la proteína intacta, pero es incapaz de detectar las formas truncadas (Fig. 4B).

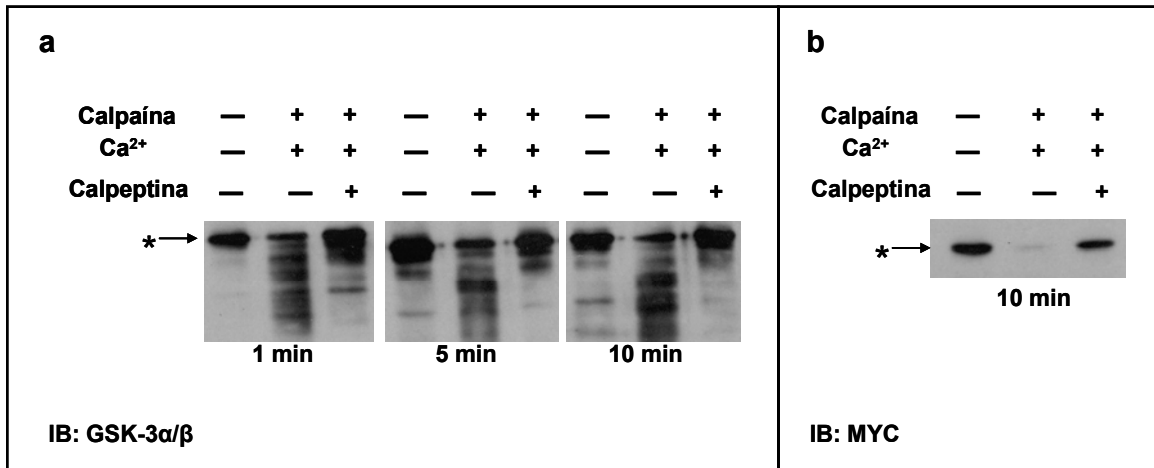


Fig. 4. Transfección de células COS-7 con myc-GSK-3 β . A las 48 horas se recogieron las células y se lisaron en el tampón Tris/ EGTA. Posteriormente se incubaron a 30°C en presencia o ausencia de m-calpaína y CaCl₂ 5 mM. El efecto del inhibidor calpeptina 10 μ M también se ensayó. **A.** WB con un anticuerpo que reconoce GSK-3 α/β . **B.** WB con un anticuerpo que reconoce el epítipo MYC. El asterisco (*) indica MYC-GSK-3 β .

4.4 Las formas truncadas de GSK-3 α y GSK-3 β son quinasas activas

Para determinar si la proteólisis de GSK-3 mediada por calpaína altera su actividad quinasas, estudiamos los efectos de la calpaína sobre la GSK-3 recombinante. Tratamos ambas isoformas de GSK-3 con calpaína durante 0,5, 2 y 5 minutos. La Fig. 5A muestra que la actividad de GSK-3 β incrementa al aumentar el tiempo de incubación con calpaína. Este incremento de su actividad ($330,1 \pm 7,3\%$ a los cinco minutos de incubación con calpaína) es estadísticamente significativo ($p < 0,01$) comparándolo con la actividad de la enzima sin tratar. Cuando realizamos este mismo

experimento con la isoforma GSK-3 α , no se observa un incremento similar al observado con la isoforma β . Estos datos demuestran que los fragmentos de GSK-3 son catalíticamente activos y sugieren que la proteólisis mediada por calpaína aumenta selectivamente la actividad quinasa de GSK-3 β .

Es bien conocido que un mecanismo para incrementar la actividad de GSK-3 es la desfosforilación de la serina 21/9 en el extremo N-terminal de GSK-3 α/β . Para conocer el estado de fosforilación de las enzimas GSK-3 α y β recombinantes, hicimos un *Western blot* con el anticuerpo anti-P-Ser21/9-GSK-3 α/β y demostramos que la isoforma β estaba fosforilada mientras que la GSK-3 α no lo estaba (Fig. 5B). Estos datos los confirmamos tratando ambas isoformas de GSK-3 con fosfatasa λ , de tal forma que defosforilamos las serinas 9 y 21 de GSK-3 β/α , sin alterar la cantidad total de proteína GSK-3 (Fig. 5B). A la luz de estos resultados, el incremento en la actividad de la GSK-3 β puede explicarse del siguiente modo: la calpaína, al eliminar el extremo N-terminal inhibitorio de la GSK-3 β provoca su activación; por el contrario, la proteólisis del mismo dominio de la GSK-3 α no afecta a su actividad quinasa al no estar fosforilada.

El litio (Li⁺) es un inhibidor selectivo de GSK-3 (Klein et al. 1996). No se ha identificado su sitio de unión, pero se sabe que es un inhibidor competitivo del magnesio (Ryves et al. 2001). Cuando estudiamos los efectos del litio sobre GSK-3 recombinante (Fig. 5C) vimos que el litio inhibe GSK-3 β con un valor de IC₅₀ de 3,91 \pm 1,25 mM y GSK-3 α con un valor de IC₅₀ de 2,63 \pm 1,13 mM, reduciendo la actividad quinasa un 90% (en presencia de LiCl 20 mM). El litio fue capaz de inhibir, con unos valores de IC₅₀ similares, las formas truncadas de ambas isoformas de GSK-3 generadas a 0,5 y 5 minutos de incubación con calpaína. De estos experimentos podemos concluir que el litio es capaz de inhibir tanto la forma intacta como la forma truncada de GSK-3 α y de GSK-3 β , lo cual sugiere que la proteólisis de GSK-3 por calpaína no afecta al sitio de unión al litio y que éste no se encuentra en el extremo N-terminal.

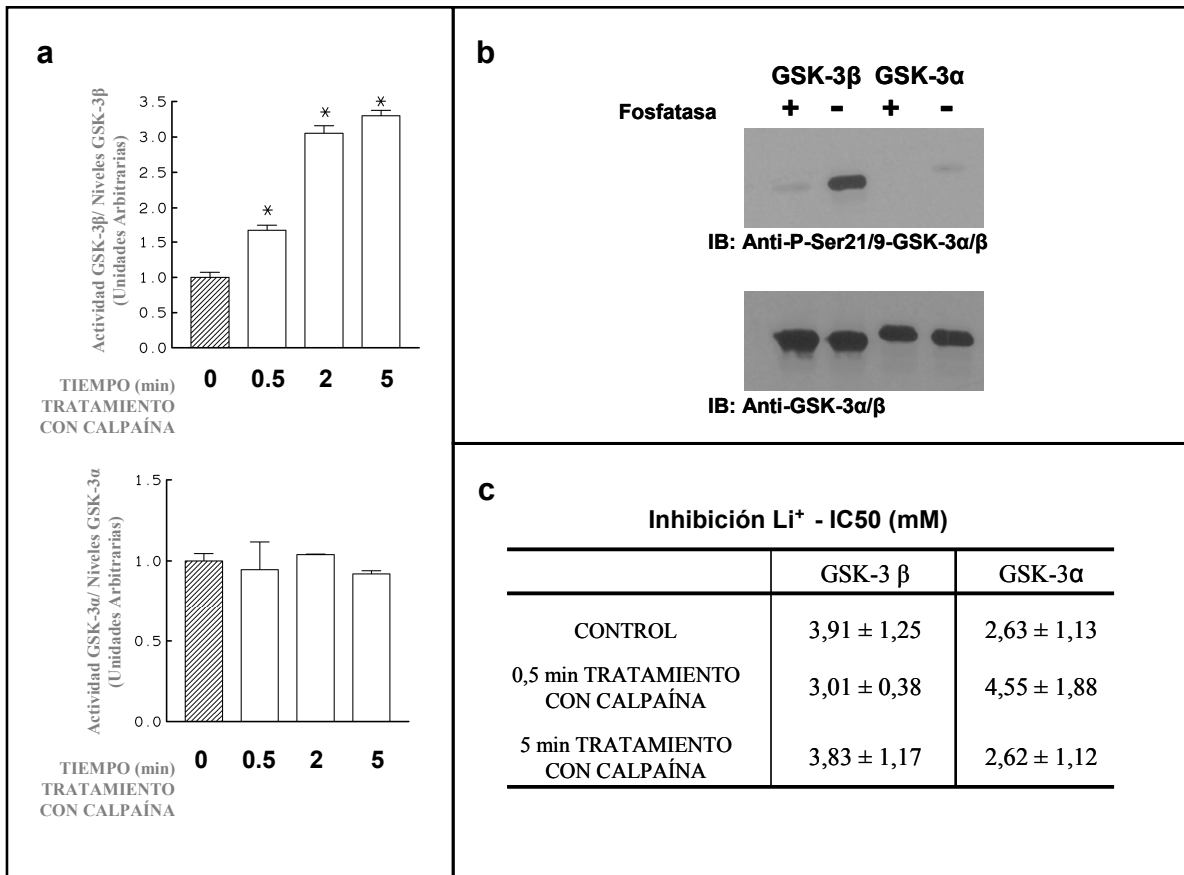


Fig. 5. Efecto de la truncación de GSK-3 sobre su actividad enzimática. **A.** Se incubó GSK-3α o GSK-3β con calpaína recombinante en presencia de CaCl₂ 5 mM durante 0,5, 2 y 5 minutos. La actividad enzimática fue medida como se describe en Materiales y Métodos. Las barras sombreadas representan la actividad de GSK-3 obtenida antes del tratamiento con calpaína (*, p < 0,01). **B.** Niveles de fosforilación en la ser-9/21 de ambas isoformas comerciales. Las dos isoformas fueron tratadas con fosfatasa-λ durante 30 min. Las muestras fueron inmunodetectadas con el anticuerpo p-Ser-9/21-GSK-3α/β o el anticuerpo GSK-3α/β como control de carga. **C.** Inhibición por litio de la forma intacta de GSK-3α o GSK-3β (CONTROL) y sus formas truncadas tras 0,5 o 5 minutos de tratamiento con calpaína. La tabla muestra los valores de IC₅₀ de la inhibición por litio. Este valor se calculó a partir de la curva dosis-respuesta de la actividad de GSK-3 a concentraciones crecientes de litio (0,01 – 20 mM).

4.5. La truncación de GSK-3β es independiente del dominio Ser-9

La fosforilación en la serina 9 del N-terminal es el principal mecanismo de inhibición de GSK-3β. Para determinar si este dominio de la serina 9 es necesario para la truncación de GSK-3 por calpaína, transfectamos células COS-7 con un vector de expresión que lleva GSK-3β sin los primeros nueve aminoácidos (GSK-3β-Δ9) unido al epítipo HA en el extremo N-terminal. A las 48 horas, los extractos celulares homogeneizados en Tris/ EGTA fueron incubados con m-calpaína y, a continuación, se

realizó un *Western blot* con el anticuerpo anti-HA o con el anticuerpo anti-GSK-3 α/β . Como muestra la Figura 6, ambos anticuerpos detectaron la proteína transfectada intacta mientras que el anticuerpo anti-HA fue incapaz de reconocer las formas truncadas de GSK-3. Estos resultados muestran que la proteólisis de GSK-3 β puede tener lugar aún cuando falten los primeros nueve aminoácidos y confirman, de nuevo, que la truncación tiene lugar en el extremo N-terminal. Sin embargo, GSK-3 β - $\Delta 9$ parece ser peor sustrato que la enzima completa, puesto que aún a los diez minutos de tratamiento con calpaína se detecta la forma no truncada.

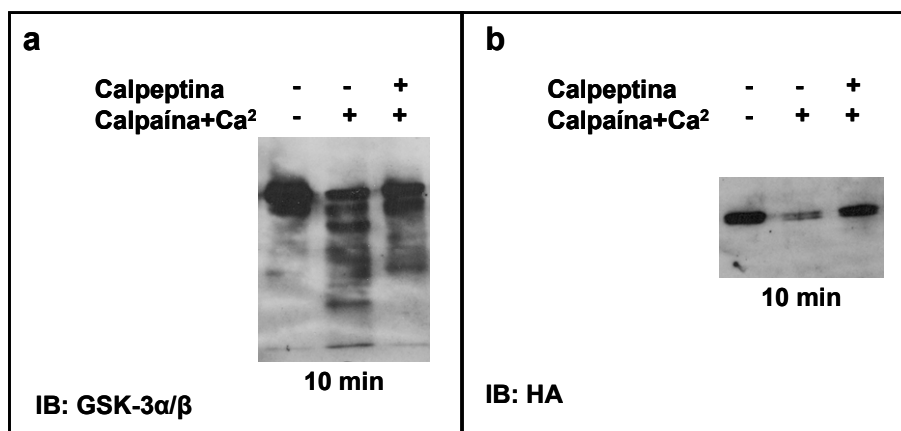


Fig. 6. Transfección de células COS-7 con HA-GSK-3 β - $\Delta 9$. A las 48 horas se recogieron y lisaron con Tris/ EGTA, posteriormente se incubaron a 30°C en presencia o ausencia de m-calpaína, CaCl₂ y calpeptina 10 μ M durante 1, 5 y 10 minutos. La figura sólo muestra los resultados obtenidos a 10 minutos. **A.** WB con un anticuerpo que reconoce GSK-3 α/β . **B.** WB con un anticuerpo que reconoce el epítipo HA.

4.6. La truncación de GSK-3 β impide su unión a 14-3-3 ζ

Otro mecanismo de regulación de GSK-3 es la formación de complejos proteicos. Una de estas proteínas a la que se une GSK-3 β es 14-3-3 ζ . Esta proteína se une al extremo N-terminal de GSK-3 β , permitiendo que GSK-3 β actúe sobre sus sustratos aunque esté fosforilada en la serina 9 (Agarwal-Mawal et al., 2003; Yuan et al., 2004; Li and Paudel, 2007). Para determinar si la truncación del extremo N-terminal de GSK-3 afecta a su unión a 14-3-3 realizamos un *pull-down* con la proteína 14-3-3 ζ y GSK-3 β digerida y sin digerir por calpaína. La proteína 14-3-3 ζ comercial está unida a GST, así que hicimos un *pull-down* utilizando una matriz de glutation-agarosa que une GST. Incubamos GSK-3 β con calpaína durante dos minutos y, a continuación, lo

incubamos con 14-3-3ζ-GST. Observamos, mediante *Western blot* con el anticuerpo anti-GSK-3α/β, que la GSK-3β se une a 14-3-3ζ, sin embargo 14-3-3ζ no es capaz de unirse a la GSK-3β digerida por calpaína a la que le falta el extremo N-terminal (Fig. 7).

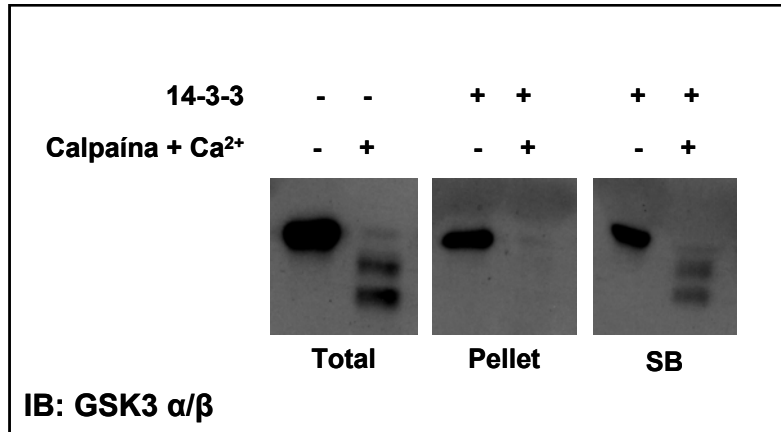


Fig.7. *Pull-down* de 14-3-3ζ-GST y GSK-3β digerida y sin digerir con calpaína. WB con el anticuerpo anti-GSK-3α/β. En la fracción del pellet, que muestra las proteínas que se han unido a 14-3-3ζ, observamos solamente GSK-3β no digerida (panel central). La fracción del sobrenadante (SB) representa aquellas formas de GSK-3β que no se han unido a 14-3-3ζ; se puede observar como las formas truncadas se encuentran en esta fracción (panel derecho). El panel izquierdo muestra la fracción total, donde observamos tanto GSK-3β digerida como sin digerir por calpaína.

Aunque 14-3-3ζ se une principalmente a proteínas fosforiladas (Hashiguchi et al., 2000) también se une a proteínas no fosforiladas como p53 (Waterman et al., 1998) o Tau no fosforilado (Hashiguchi et al., 2000). Puesto que la enzima GSK-3β recombinante está fosforilada en ser-9, estudiamos si 14-3-3ζ es capaz de unirse a GSK-3β sin fosforilar. Para ello hicimos el *pull-down* de 14-3-3ζ con GSK-3β tratada y sin tratar con fosfatasa λ tal y como se indica en los Materiales y Métodos. Observamos que 14-3-3ζ se une preferiblemente a GSK-3β sin fosforilar, aunque también es capaz de unirse a GSK-3β fosforilada en serina 9 (Fig. 8).

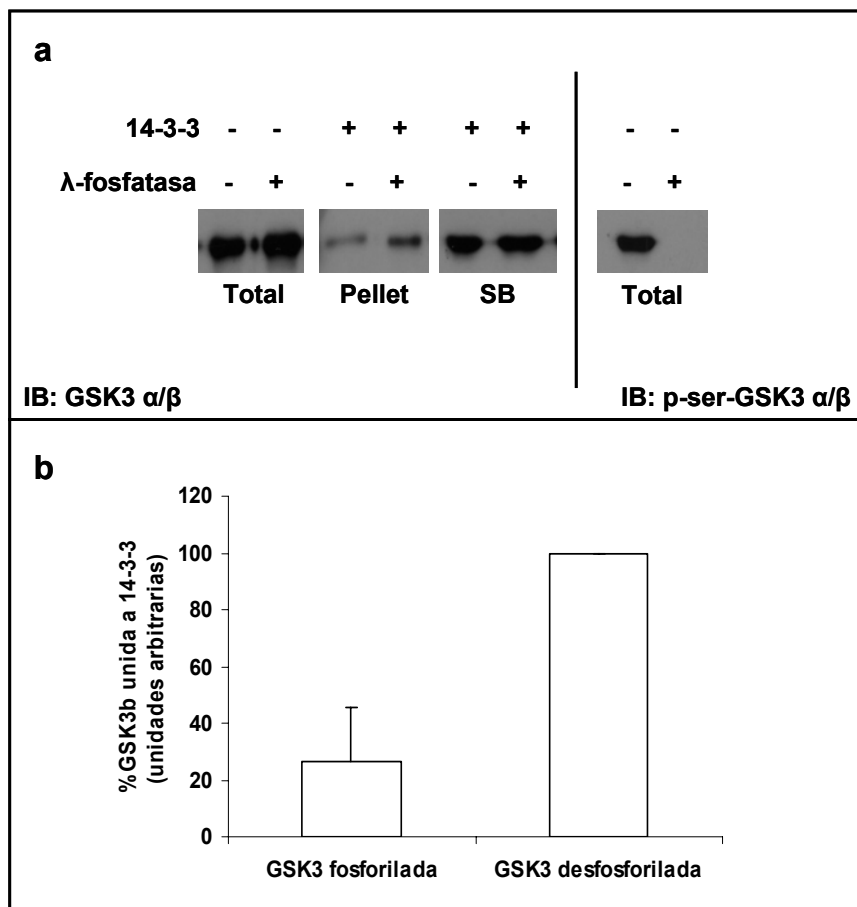


Fig.8. Pull-down de 14-3-3ζ y GSK-3β tratada y sin tratar con fosfatasa-λ. **A.** WB con el anticuerpo anti-GSK-3α/β. En la fracción del pellet, que muestra las proteínas que se han unido a 14-3-3ζ, observamos mayor cantidad de GSK-3β desfosforilada que fosforilada. En el panel derecho observamos con el anticuerpo anti-p-ser-21/9-GSK-3α/β que GSK-3β fue totalmente desfosforilada tras su tratamiento con fosfatasa-λ. **B.** Cuantificación de la unión de 14-3-3ζ a GSK-3β fosforilada y desfosforilada.

4.7. Identificación del sitio de corte de la calpaína en GSK-3β

La calpaína es una proteasa que reconoce la estructura secundaria de sus proteínas sustrato, en lugar de una secuencia de aminoácidos determinada, por lo que no existe una secuencia consenso de corte (Goll et al., 2003). Para determinar el sitio de corte de la calpaína en nuestra proteína, secuenciamos GSK-3β truncada por el método de EDMAN. Para ello, incubamos 7,5 µg de GSK-3β recombinante con 52 U de calpaína purificada durante 2,5 minutos en presencia de calcio (5 mM). Tras la digestión obtuvimos los dos fragmentos de degradación de GSK-3β, siendo el fragmento II el fragmento mayoritario (Fig. 9A y 9B). El resultado de la secuenciación de dicho fragmento por el método de EDMAN fue el péptido RPQEV. Esta secuencia se

encuentra en el extremo N-terminal de GSK-3 β (entre el aminoácido 49 y 50), y está muy conservada en distintas especies como humano y ratón (Fig. 9C).

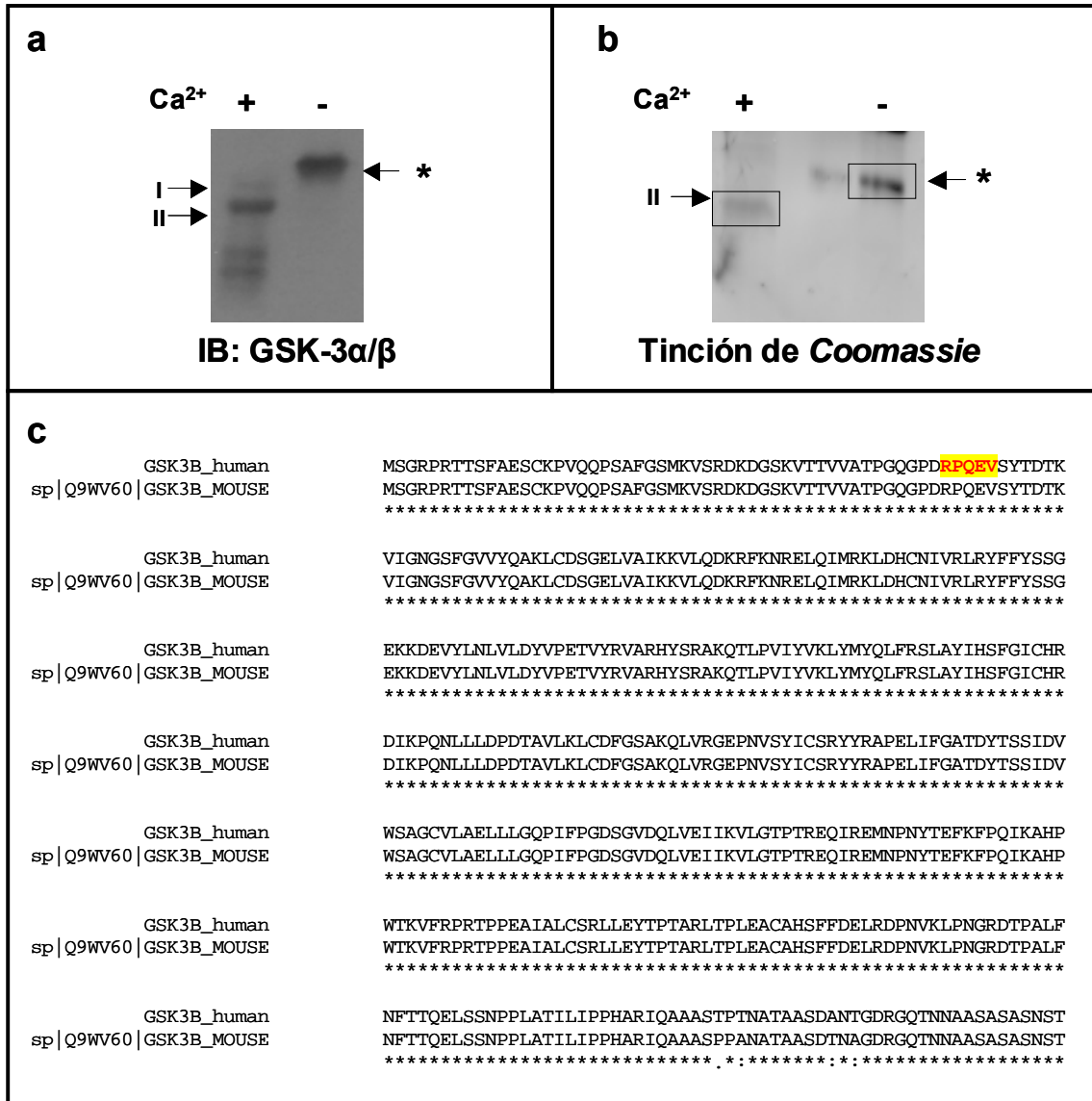


Fig.9. Identificación del sitio de corte de GSK-3 β . **A.** WB con el anticuerpo anti-GSK-3 α/β tras digestión de GSK-3 β por calpaína en presencia de CaCl₂ 5 mM. Observamos los dos fragmentos generados (I y II), siendo el mayoritario el fragmento II. El asterisco indica GSK-3 β sin digerir. **B.** Tinción de *Coomassie* de una membrana de PVDF con esas mismas muestras. En este caso solo observamos el fragmento II. El asterisco indica GSK-3 β sin digerir. **C.** Secuencia comparada de GSK-3 β humana y murina (Woodgett, 1990). La secuencia de inicio del fragmento II se indica subrayada en amarillo.

4.8. Transfección de células COS-7 con el plásmido GSK-3 β -Fragmento II

El siguiente punto que nos planteamos fue qué efecto observaríamos en células que sobreexpresasen GSK-3 β truncada. Para ello, creamos un plásmido que expresaba el fragmento II de la GSK-3 β (GSK-3 β -Fragmento II). El plásmido fue obtenido a partir del sitio de corte de la GSK-3 β por la calpaína identificado en el apartado anterior, tal y como se describe en los Materiales y Métodos. Tras transfectar células COS-7 con distintas cantidades del vector durante varios intervalos de tiempo, observamos mediante *Western blot* con el anticuerpo anti-GSK-3 α/β que nuestro plásmido se expresa en estas células (Fig. 11A). Se empieza a expresar a 4 h y presenta su pico de máxima expresión entre 12 h y 24 h. Sin embargo, parece que no es estable y este fragmento se degrada, obteniéndose otro menor. Este efecto podría explicarse por la arginina que presenta en el extremo N-terminal (Fig. 9C), propio de proteínas con una corta vida media (Varshavsky, 1996). También es interesante destacar que cuando sobreexpresamos GSK-3 β también aparece esta banda (Fig. 11A). Realizamos la transfección en ausencia y presencia de Litio (inhibidor de GSK-3) para analizar si un exceso de la actividad de GSK-3 producía muerte celular. Sin embargo, no observamos diferencias en presencia o ausencia de litio (Fig. 11A).

Para estudiar la distribución intracelular de GSK-3 β truncada realizamos una inmunofluorescencia de células COS-7 transfectadas con GSK-3 β -Fragmento II con el anticuerpo anti-GSK-3 α/β . Observamos que se distribuye principalmente alrededor del núcleo, pero no en el interior de éste (Fig. 10B, D y F). Sin embargo, cuando transfectamos estas células con GSK-3 β intacta, sí observamos una localización citoplasmática y nuclear (Fig. 10A, C y E). Estos datos se corresponden con lo descrito recientemente en un trabajo de Meares y colaboradores donde demuestran que la señal de localización nuclear (NLS) se encuentra entre los aminoácidos 85-103 de la secuencia de GSK-3 β . Sin embargo, también observan que los primeros nueve aminoácidos de GSK-3 β son necesarios para que se transloque eficazmente al núcleo (Meares and Jope, 2007). Este trabajo explicaría por qué no observamos en el núcleo nuestra construcción, la cuál expresa GSK-3 β truncada a la que le faltan los primeros 49 aminoácidos.

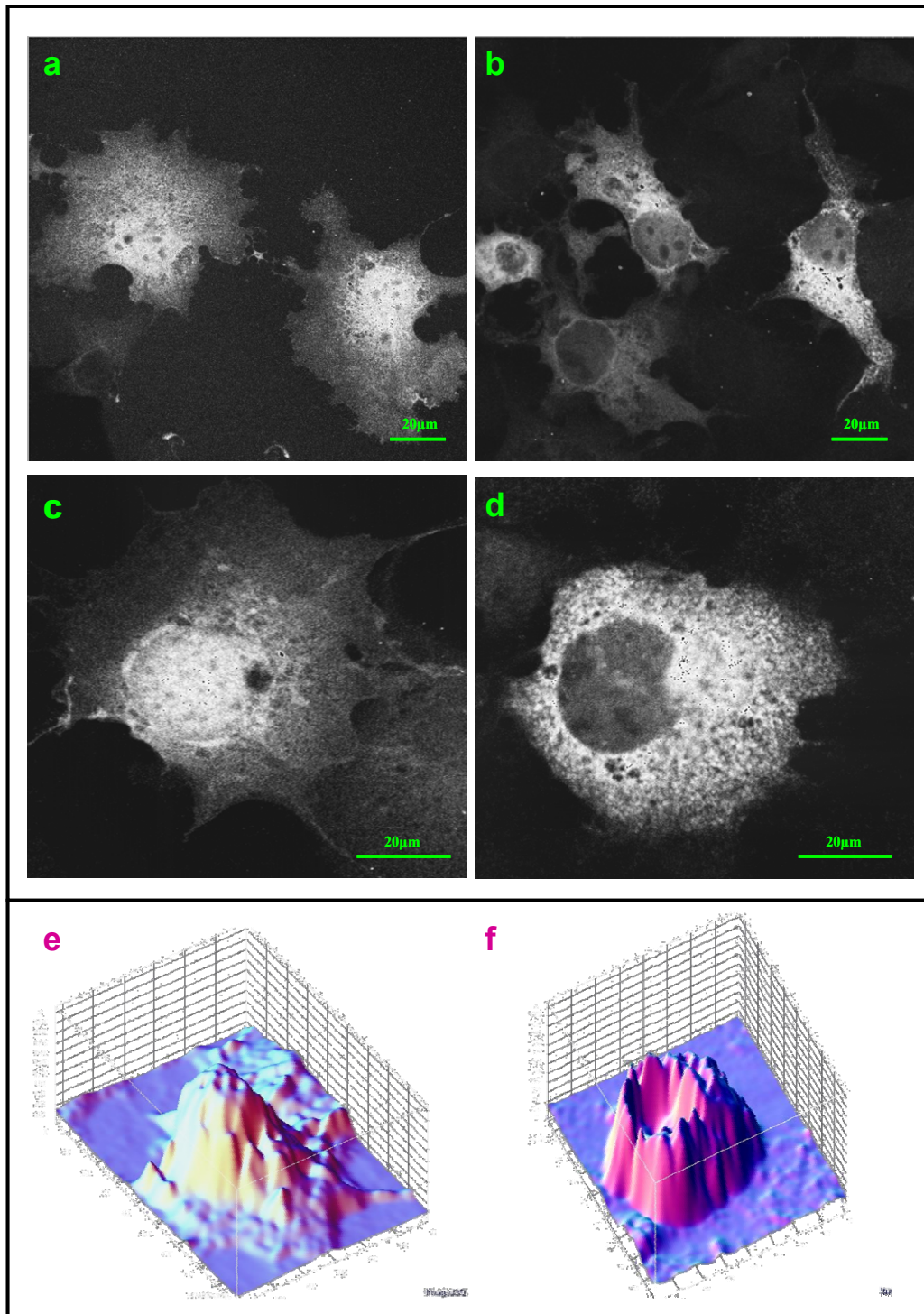


Fig. 10. Inmunofluorescencia de COS-7 transfectadas con GSK-3 β (**A**, **C**) o con GSK-3 β -Fragmento II (**B**, **D**) con el anticuerpo anti-GSK-3 α/β . En **A** y **C** se observa que GSK-3 β se distribuye por toda la célula, localizándose especialmente en el núcleo. Sin embargo, en **B** y **D** GSK-3 β truncada no se observa en el núcleo. **E**. Representa la imagen tridimensional de la distribución de la intensidad de GSK-3 en una célula transfectada con GSK-3 β (la célula mostrada en la figura C). **F**. Representa la imagen tridimensional de la distribución de la intensidad de GSK-3 en una célula transfectada con GSK-3 β truncada (la célula mostrada en la figura D). Imágenes tomadas con un microscopio vertical AxiosKop 2 (Zeiss) acoplado a láser confocal MicroRadiance (BioRad) y procesadas con el programa Image J.

Para estudiar si nuestra construcción GSK-3 β -Fragmento II es activa, utilizamos una línea celular HEK 293 establemente transfectada con la proteína Tau (Santa-Maria et al., 2007). Tau es un conocido sustrato de GSK-3, por lo tanto medimos la fosforilación de Tau mediante el anticuerpo PHF-1 para analizar si el fragmento de GSK-3 β es activo. El anticuerpo PHF-1 reconoce la proteína Tau fosforilada en Ser-396/404, donde es fosforilada por GSK-3 (Lovestone et al., 1994). Observamos un incremento en la fosforilación de Tau en las células transfectadas con GSK-3 β truncada, lo que demuestra que el fragmento generado por la calpaína es activo (Fig. 11B).

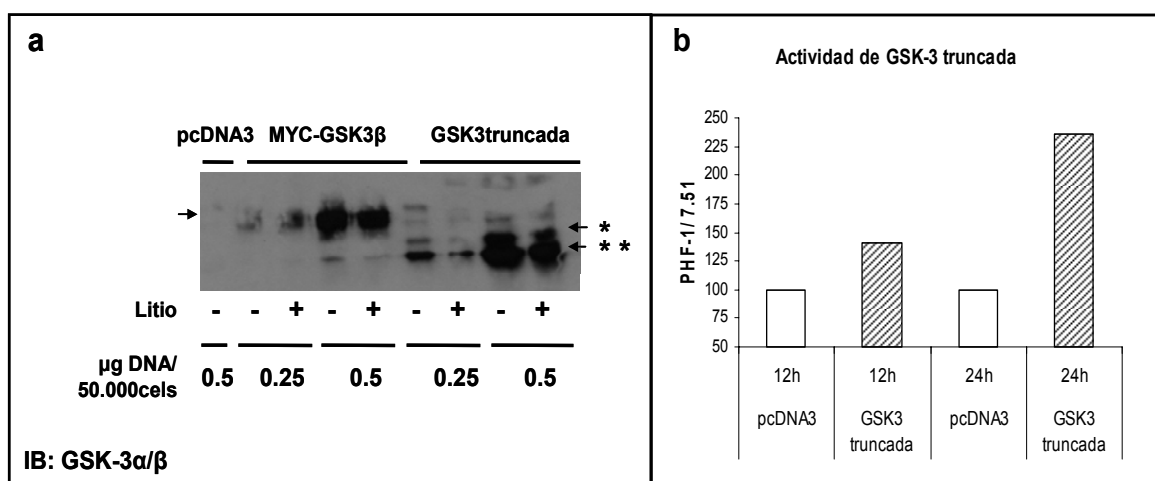


Fig. 11. Transfección de células COS-7 con GSK-3 β -Fragmento II y MYC-GSK-3 β . **A.** WB con el anticuerpo anti-GSK-3 α/β que muestra la expresión a 12 h de MYC-GSK-3 β (indicado con una flecha) y GSK-3 β truncada (un asterisco), esta última se degrada dando lugar a otro fragmento de peso molecular inferior (dos asteriscos). **B.** Cuantificación de la actividad quinasa medida por la fosforilación de Tau en células transfectadas con GSK-3 β truncada respecto a células transfectadas con el plásmido vacío (pcDNA3).

4.9. IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS

4.9.1. Un incremento en la concentración de calcio intracelular induce proteólisis de GSK-3 mediante activación de calpaína en cultivos primarios de corteza

Para estudiar si la truncación de GSK-3 por calpaína también era un proceso fisiológico, analizamos si dicho proceso tenía lugar cuando incrementábamos la concentración de calcio intracelular en un cultivo celular, lo que produciría activación de la calpaína y la consiguiente truncación de GSK-3. El tratamiento de cultivos primarios de neuronas corticales con el ionóforo de calcio ionomicina indujo la truncación de GSK-3 de forma dependiente del tiempo de tratamiento (Fig. 12). Este efecto fue prevenido por la adición de calpeptina al cultivo.

4.9.2. Estimulación glutamatérgica

A continuación estudiamos si la truncación de GSK-3 por calpaína también se producía tras la estimulación de los receptores de NMDA, cuya activación incrementa la concentración intracelular de calcio. Para ello, lo primero que analizamos fue si las subunidades del receptor de NMDA eran cortadas por la calpaína, ya que éste es un fenómeno mediado por calpaína bien caracterizado (Guttmann et al., 2001; Simpkins et al., 2003). Como se puede observar en la figura 13A la activación del receptor de NMDA por NMDA y/o glutamato provoca la proteólisis de la subunidad NR2B del receptor de NMDA. La activación de los receptores de NMDA produjo el incremento de la banda de 115 kDa correspondiente al fragmento producido por la proteólisis de NR2B (Simpkins et al., 2003). A su vez se produjo la disminución de la banda de 170 kDa correspondiente a la forma intacta de la proteína. Este efecto fue mediado por calpaína ya que la formación del fragmento de 115 kDa fue bloqueado al pretratar los cultivos con calpeptina o ALLN, ambos inhibidores de calpaína (Fig. 13B). MK-801, inhibidor del receptor de NMDA, también bloqueó la formación de la banda de 115 kDa y la disminución de la banda de 170 kDa (Fig. 13A). Posteriormente, en estas mismas muestras, estudiamos el estado de GSK-3 realizando un *Western blot* con un anticuerpo anti-GSK-3 α/β y observamos la aparición de las formas truncadas de GSK-3 (Fig. 13A).

Este efecto fue dependiente del tiempo y mediado por receptores de NMDA, ya que fue suprimido por el inhibidor MK-801 (Fig. 13A). El glutamato, que es el ligando fisiológico de los receptores de NMDA, produjo la misma respuesta sobre GSK-3 y NR2B siendo dicha respuesta bloqueada por MK-801 (Fig. 13A). La truncación de GSK-3 inducida por NMDA fue inhibida de manera dependiente de la dosis tanto por calpeptina como por ALLN (Fig. 13C) y se produjo de una manera dependiente del tiempo de tratamiento (Fig. 13B). Todos estos datos indican que el glutamato, a través de los receptores de NMDA induce la truncación de GSK-3 mediante activación de la proteasa calpaína. Es decir, el glutamato induce la truncación de GSK-3 mediada por calpaína a través de los receptores de NMDA y puede ser inhibida por calpeptina o ALLN de una manera dependiente de la dosis (Fig. 13B), lo que confirma la implicación de la calpaína. En estos experimentos se observa sobre todo el fragmento I, el fragmento II se observa sólo en películas sobrepuestas.

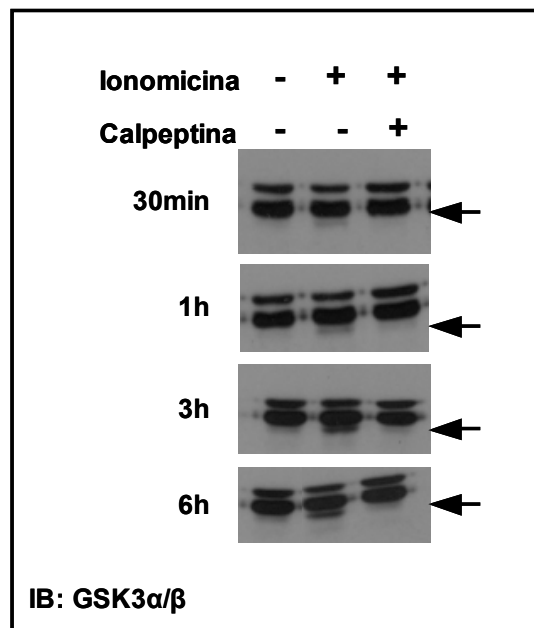


Fig. 12. El calcio induce la proteólisis de GSK-3 en cultivo primario de neuronas de corteza. Las neuronas fueron tratadas con el ionóforo ionomicina 5 μ M durante 0.5, 1, 3 y 6 horas. Este efecto no tenía lugar en presencia de calpeptina 10 μ M. La proteólisis de GSK-3 inducida por calcio se observa por la aparición de una banda de 40 kDa, reconocida por el anticuerpo anti GSK-3 α/β . La flecha indica la forma proteolizada de GSK-3.

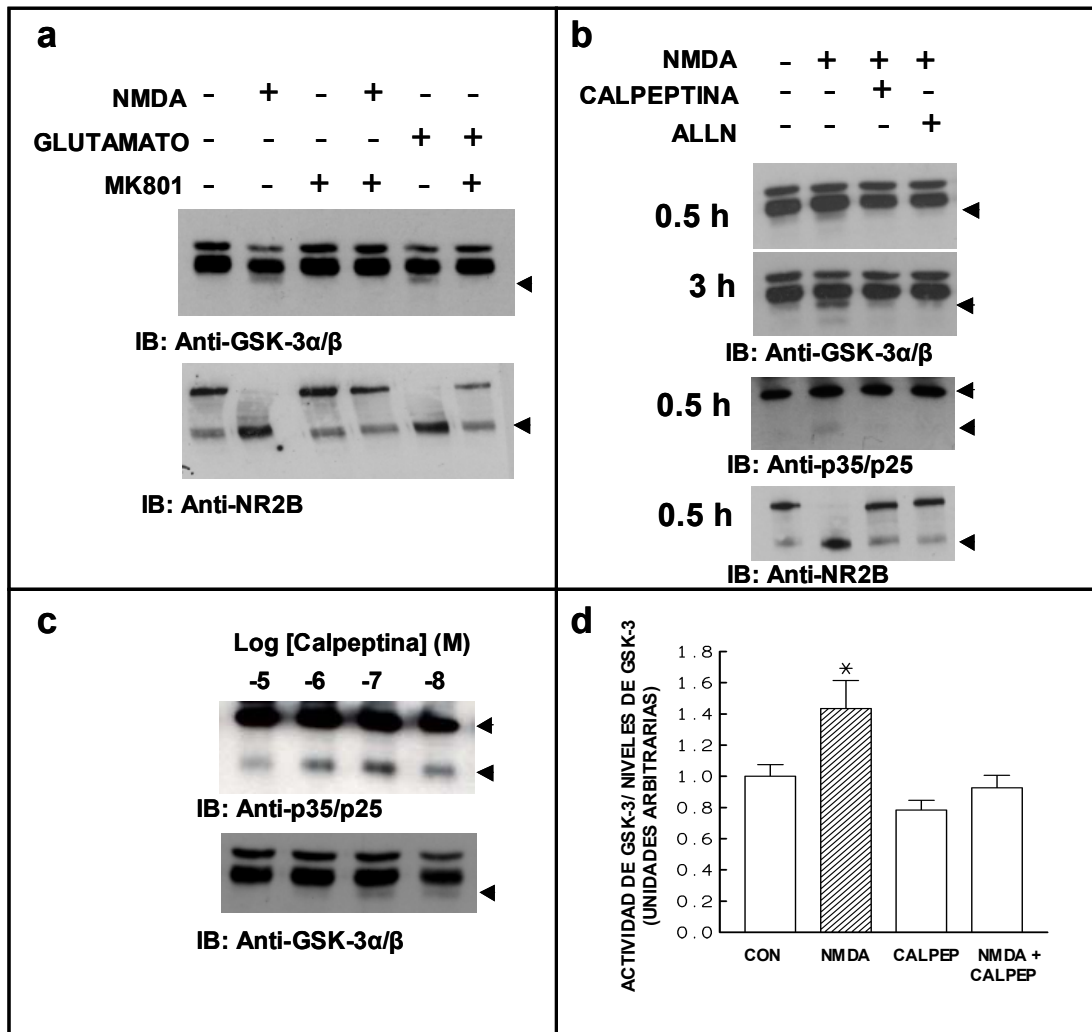


Fig. 13. La formación de GSK-3 truncada vía NMDA/ glutamato es mediada por calpaína. **A.** Neuronas procedentes de un cultivo primario de corteza (DIV 12) fueron tratadas con NMDA 100 μ M o glutamato 1 mM durante 3 horas. También se trataron con el inhibidor de receptores de glutamato, MK801 10 μ M. El panel superior muestra *Western blot* con el anticuerpo anti-GSK-3 α/β . La flecha indica la forma truncada de GSK-3. En el panel inferior se observa *Western blot* con el anticuerpo que reconoce la forma intacta (170 kDa) y truncada (115 kDa) de los receptores de NMDA (NR2B). En este caso la flecha indica la banda de 115 kDa procedente de la truncación de NMDAR. En ambos casos esta truncación se inhibió al tratar las células con MK-801. **B.** La truncación de GSK-3 mediada por NMDA es un proceso dependiente del tiempo y se inhibe por calpeptina 10 μ M y ALLN 10 μ M. Estas mismas muestras fueron ensayadas con el anticuerpo anti-p35/p25 (la flecha superior indica p35 y la inferior p25) y con el anticuerpo anti-NMDAR. La flecha indica la forma truncada de 115 kDa. **C.** La respuesta a la estimulación por NMDA 100 μ M (truncación de GSK-3 y p35) fue inhibida por calpeptina de una manera dependiente de la dosis. **D.** Neuronas procedentes de un cultivo primario de corteza (DIV 12) fueron tratadas con NMDA 100 μ M durante 3 horas en presencia o ausencia de calpeptina 10 μ M. Entonces, la actividad enzimática fue medida como se describe en Materiales y Métodos. La barra sombreada representa la actividad de GSK-3 obtenida tras 3 horas de tratamiento con NMDA (*, $p < 0,01$, $n=9$).

4.9.3. Truncación de otros sustratos de la calpaína en cultivos primarios corticales tratados con NMDA

La proteína CDK-5 es otra serin treonin quinasa que se expresa en neuronas junto con su subunidad reguladora p35. La calpaína trunca el extremo amino terminal de p35 para obtener p25, lo que conlleva a una desregulación de CDK-5 que contribuye a muerte neuronal asociada con muchas enfermedades neurodegenerativas. Nosotros probamos si también tenía lugar la truncación de p35 a p25 en nuestras condiciones experimentales. Utilizamos un anticuerpo que reconoce p35/p25 en los cultivos primarios realizados y observamos que p25 se genera en paralelo con las isoformas truncadas de GSK-3 (Fig. 13C) y también se inhibe su formación, de una manera similar a la de los fragmentos de GSK-3, al incrementar la concentración de calpeptina, el inhibidor de calpaína.

4.9.4. Aumento de la actividad quinasa GSK-3 en cultivos primarios corticales tratados con NMDA

Lo siguiente que estudiamos fue si la proteólisis de GSK-3 mediada por NMDA altera su actividad quinasa. Observamos que los cultivos estimulados por NMDA presentan un incremento en la actividad quinasa de GSK-3 respecto a los cultivos control ($43,5 \pm 17,8$ % sobre los niveles basales, $p < 0,01$). Además este incremento de actividad fue inhibido al pretratar los cultivos con calpeptina $10 \mu\text{M}$ (Fig. 13D).

4.9.5. Fosforilación de Tau mediada por NMDA. Implicación de la calpaína

Aunque ya hemos observado un incremento de la actividad GSK-3 mediante un ensayo de actividad enzimática, analizamos también si este incremento se ve reflejado en un aumento de la fosforilación del sustrato de GSK-3 Tau. Para ello, estudiamos los efectos de NMDA sobre la fosforilación de Tau utilizando el anticuerpo anti-PHF-1. Como ya vimos anteriormente, este anticuerpo reconoce la proteína Tau fosforilada en Ser-396/404, epítipo fosforilado por GSK-3 (Lovestone et al., 1994). Se observó un incremento de la fosforilación de este epítipo en un 41,5% en neuronas tratadas con

NMDA durante 30 minutos, lo que sugiere la activación de GSK-3 (Fig. 14A y B). Este aumento en la fosforilación es inhibido por calpeptina y ALLN, lo que demuestra que el proceso está mediado por calpaína. Sin embargo, a tiempos más largos desaparece este efecto (datos no mostrados), lo cuál se corresponde con lo descrito en trabajos previos donde se demuestra la activación de fosfatasa que desfosforilan Tau tras la estimulación prolongada con NMDA (Fleming and Johnson, 1995; Adamec et al., 1997). Así, cuando analizamos el estado de fosforilación de Tau con el anticuerpo anti-Tau-1, que reconoce Tau desfosforilado, observamos un incremento de la desfosforilación de Tau a las tres horas de estimulación por NMDA (Fig. 14C). De hecho, con este mismo anticuerpo podemos observar la truncación de Tau por calpaína, truncación que genera un fragmento de 17 kDa, cuya presencia demuestra la acción de la proteasa sobre Tau (Fig. 14D) (Nicholson and Ferreira, 2009).

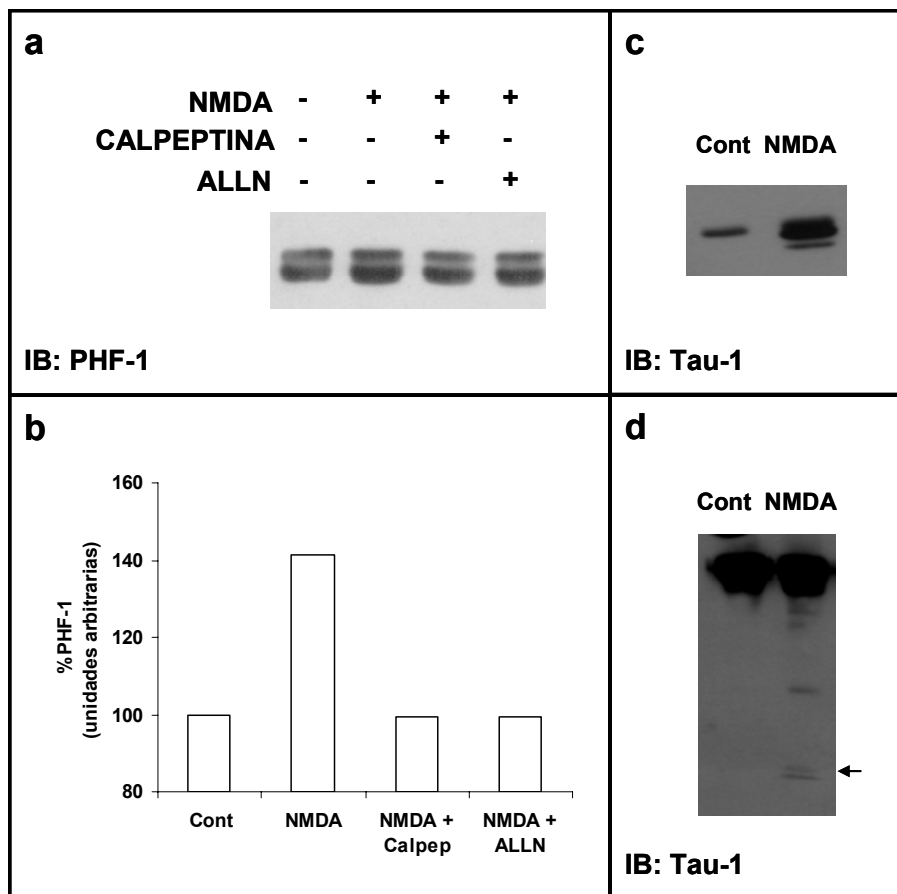


Fig. 14. Incremento de la fosforilación de Tau en el epítipo PHF-1 en neuronas de corteza tras 30 minutos de incubación con NMDA 100 μ M. Este efecto fue bloqueado por la preincubación con calpeptina 10 μ M o ALLN 10 μ M. **A.** WB con el anticuerpo PHF-1. **B.** Cuantificación de la fosforilación de Tau en el epítipo PHF-1 en neuronas corticales estimuladas por NMDA. **C.** Incremento en los niveles de Tau no fosforilado en neuronas corticales tras 3 horas de incubación con NMDA 100 μ M. **D.** Truncación de Tau por calpaína en neuronas corticales tras 3 horas de incubación con NMDA 100 μ M. La flecha indica el fragmento de 17 kDa generado por la calpaína.

4.9.6. Disminución de los niveles de GSK-3 producida por una estimulación prolongada de los receptores de NMDA

Analizamos la truncación de GSK-3 inducida por NMDA durante tiempos largos de incubación para estudiar si el fragmento originado era estable. Aunque se observa degradación de GSK-3 en función del tiempo de incubación con NMDA, el fragmento de 40 kDa generado no se acumula. De hecho, los niveles de proteína GSK-3 (de ambas isoformas) disminuyen un $75,9 \pm 15,2\%$ tras 48 horas de tratamiento, sin verse afectados los niveles de proteína totales (Fig. 15). Una posible explicación para este hecho es que el producto originado tras la truncación de GSK-3 por calpaína tiene una corta vida media, siendo rápidamente degradado.

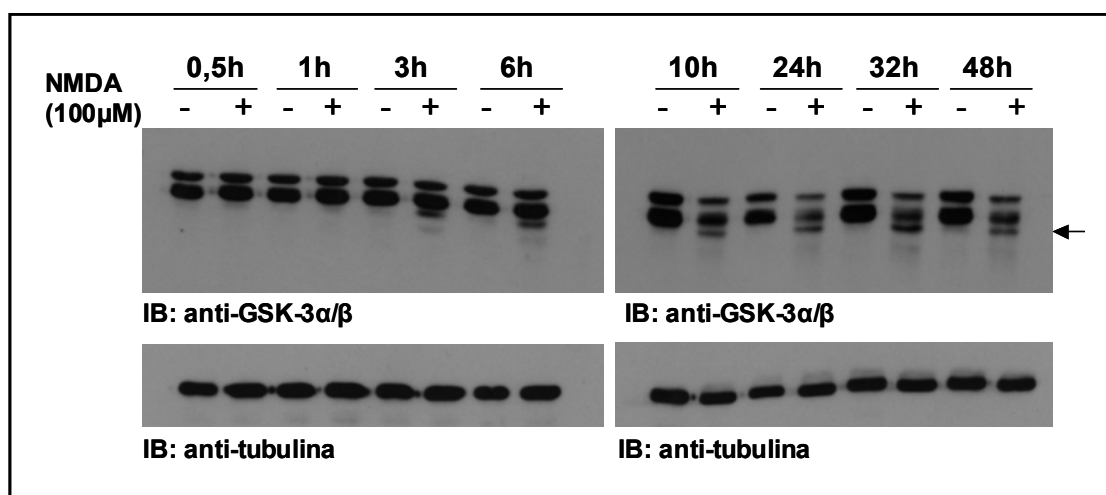


Fig. 15. Proteólisis de GSK-3 inducida por la activación de los receptores de NMDA. Neuronas corticales de ratón fueron tratados con NMDA 100 μ M desde 30 minutos hasta 48 horas. Las muestras fueron inmunodetectadas con el anticuerpo anti-GSK-3 α/β . Los paneles superiores muestran la degradación de GSK-3 en función del tiempo de incubación con NMDA, y la generación de la forma truncada, mostrada por la flecha. El panel inferior muestra un *Western blot* con el anticuerpo anti-tubulina, indicando que la cantidad de proteína total no varía con el tratamiento.

4.9.7. La truncación de GSK-3 por calpaína vía receptores de NMDA se produce por calcio extracelular

Por último, nos planteamos si el calcio que estaba activando la proteólisis de GSK-3 mediada por calpaína provenía del interior celular o del medio extracelular. Para

ello, preincubamos los cultivos neuronales con el quelante de calcio intracelular BAPTA-AM, o el quelante de calcio extracelular EGTA. Observamos que el EGTA inhibía la truncación de GSK-3 (Fig. 16), presentando el mismo efecto que el inhibidor de la calpaína, calpeptina. Sin embargo el BAPTA-AM no producía ningún efecto. Esto nos indica que el calcio que está activando la calpaína que actúa sobre GSK-3 vía receptores de NMDA proviene del medio extracelular.

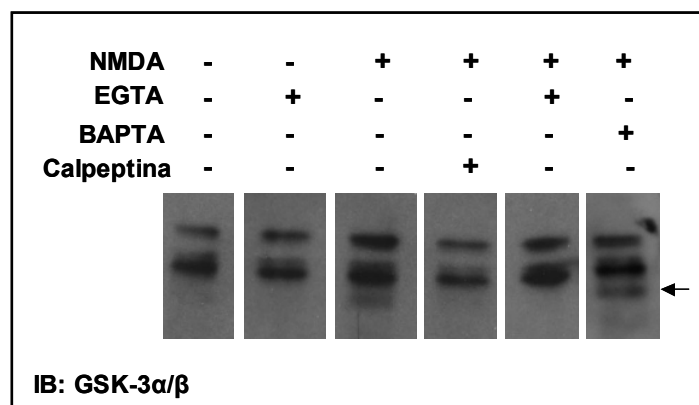


Fig. 16. Inhibición de la proteólisis de GSK-3 por el quelante de Ca^{2+} extracelular EGTA. WB con el anticuerpo anti-GSK-3α/β que muestra la truncación de GSK-3 vía receptores de NMDA. Este efecto es inhibido por calpeptina, lo que demuestra la implicación de la calpaína en el proceso y por EGTA, que muestra que dicho efecto es dependiente del calcio extracelular. Sin embargo, el quelante de calcio intracelular BAPTA no inhibió la proteólisis de GSK-3.

4.10. IMPLICACIONES PATOLÓGICAS

Como ya se vio en la Introducción, la actividad de la calpaína se encuentra incrementada en multitud de enfermedades neurodegenerativas (Wu et al., 2007; Bevers and Neumar, 2008; Liu et al., 2008; Vosler et al., 2008). Entre ellas se encuentran la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson, la epilepsia. En la mayoría de estas enfermedades los niveles homeostáticos de calcio se encuentran alterados, lo que conlleva a una sobreactivación de la calpaína. Por ello, nos propusimos estudiar el estado proteolítico de la GSK-3 en algunas de estas patologías en las que está descrito que la actividad de la calpaína o de la GSK-3 están alteradas.

4.10.1. Truncación de GSK-3 mediada por calpaína en un modelo animal de epilepsia por inducción con kainato

Un modelo muy usado para estudiar neurodegeneración *in vivo* es un modelo de epilepsia en ratas. La epilepsia se define como una sobreactivación de los receptores ionotrópicos de glutamato, lo que provoca un incremento en las concentraciones intracelulares de calcio, lo que lleva en último término a la muerte celular (Choi, 1992). Tanto en los modelos animales como en los pacientes con epilepsia se observa neurodegeneración en el hipocampo relacionada con deterioro de la memoria (Letty et al., 1995; Sutula et al., 1995; Hermann et al., 1997; Mikati et al., 2001). El daño observado en los modelos de rata se puede mimetizar por inyección de kainato, un agonista de los receptores de AMPA (Goodman, 1998). Está descrito que en estos modelos se encuentra incrementada la actividad de la calpaína (Araujo et al., 2005; Araujo et al., 2008). Por esta razón indujimos epilepsia a ratas por inyección con kainato y analizamos el estado de GSK-3.

4.10.1.1. Neurodegeneración en el hipocampo tras la inducción de epilepsia

En los modelos de epilepsia, la inyección de kainato a ratas causa muerte neuronal en muchas áreas del cerebro. Una de las áreas más afectadas es el hipocampo, así que evaluamos principalmente esta área 24 horas después de haber inyectado kainato 10 mg/kg a ratas Wistar de cuatro meses de edad. Para estudiar la degeneración neuronal, utilizamos la tinción con Fluoro Jade (FJ). Se observó neurodegeneración en corteza (Fig. 17E y 17F) y en la región de CA1 del hipocampo (Fig. 17B y 17C). Sin embargo en otras áreas del hipocampo, como en el giro dentado, no se aprecian células positivas en la tinción con Fluoro Jade, salvo en la zona del *hilus* (datos no mostrados). En los animales control no se observaron células teñidas con Fluoro Jade en ningún área cerebral (Fig. 17A y 17D).

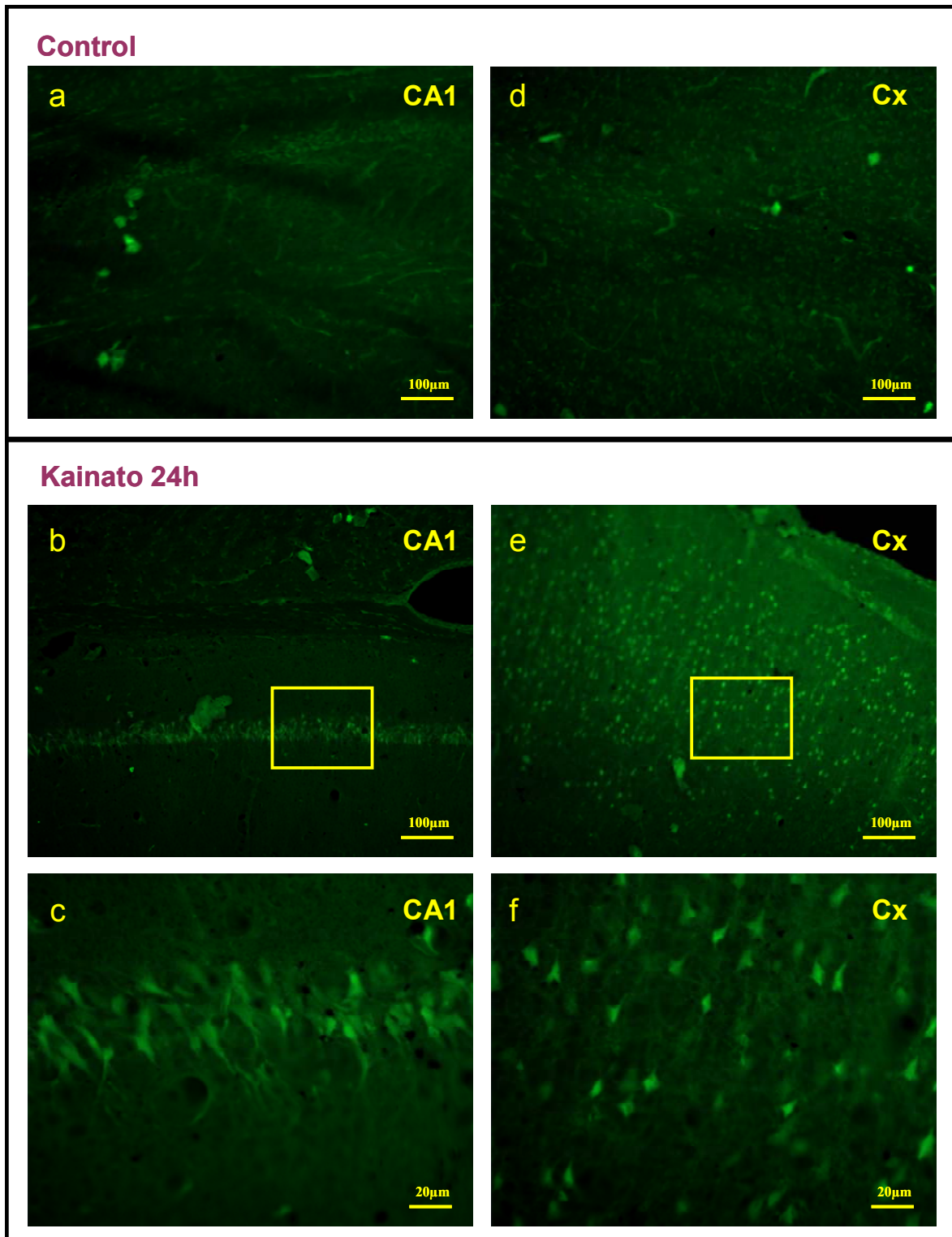


Fig. 17. Neurodegeneración en hipocampo y corteza de ratas tratadas con kainato. La neurodegeneración fue observada mediante la tinción con Fluoro Jade. **A.** Tinción de Fluoro Jade de la región CA1 del hipocampo de animales control. No se observan células positivas. **B y C.** Tinción de Fluoro Jade de la región CA1 del hipocampo de animales tratados con kainato durante 24 h. En este caso sí se observan células teñidas con Fluoro Jade, lo que indica neurodegeneración. **C.** Detalle de la región CA1. **D.** Tinción de Fluoro Jade de la corteza de animales control. No se observan células positivas. **E y F.** Tinción de Fluoro Jade de la corteza de animales tratados con kainato durante 24 h. En este caso sí se observan células teñidas con Fluoro Jade, lo que indica neurodegeneración. **F.** Detalle de la corteza. Imágenes tomadas en un microscopio vertical Axioskop 2 plus (Zeiss) acoplado a una cámara CCD color.

4.10.1.2. Activación de calpaína en hipocampo tras la inducción de epilepsia

Estudiamos la activación de la calpaína para determinar si estaba implicada en la muerte neuronal observada en la corteza y en el hipocampo tras la inducción de epilepsia. Para ello, analizamos la truncación de la espectrina, sustrato de la calpaína (Czogalla and Sikorski, 2005), mediante inmunohistoquímica (Fig.18) y *Western blot* tanto en muestras de hipocampo como de corteza (Fig. 20 y 21 respectivamente). Transcurridas 24 horas después de la inyección con kainato, observamos una marcada tinción de espectrina en la zona de CA1 del hipocampo (Fig. 18C, D y E), mientras que en otras áreas del hipocampo, como en el giro dentado, no se observó tal tinción. En los controles no se observa tinción de espectrina en ninguna zona del hipocampo (fig. 18A y B). Tampoco observamos tinción en la corteza.

Para corroborar estos datos, realizamos *Western blot* con el anticuerpo anti-espectrina que reconoce tanto la forma intacta de la proteína como sus formas truncadas. Observamos truncación de espectrina en hipocampo y en corteza (Fig. 20 y 21 respectivamente), la cual se producía de una manera dependiente del tiempo, teniendo su máximo a las 24 horas. Esta truncación es debida a la calpaína, ya que observamos dos bandas de 145 y 150 kDa características de la acción de esta proteasa sobre la espectrina (Siman et al., 1984; Nixon, 1986), y no observamos la banda de 120 kDa que indicaría la acción de caspasas (Nath et al., 1996; Pike et al., 1998; Nath et al., 2000b).

También analizamos por *Western blot* la truncación de otro sustrato de la calpaína, la subunidad NR2B del receptor de NMDA, cuya proteólisis se produce cuando hay estimulación glutamatérgica. En este caso la truncación que observamos es menos evidente, tanto en hipocampo, como en corteza (Fig. 20 y 21, panel superior). En este modelo de inducción de epilepsia por kainato la calpaína se activa vía receptores AMPA/ KA y no vía receptores NMDA, lo que explicaría que solo observemos una truncación parcial del receptor de NMDA (Araujo et al., 2008)

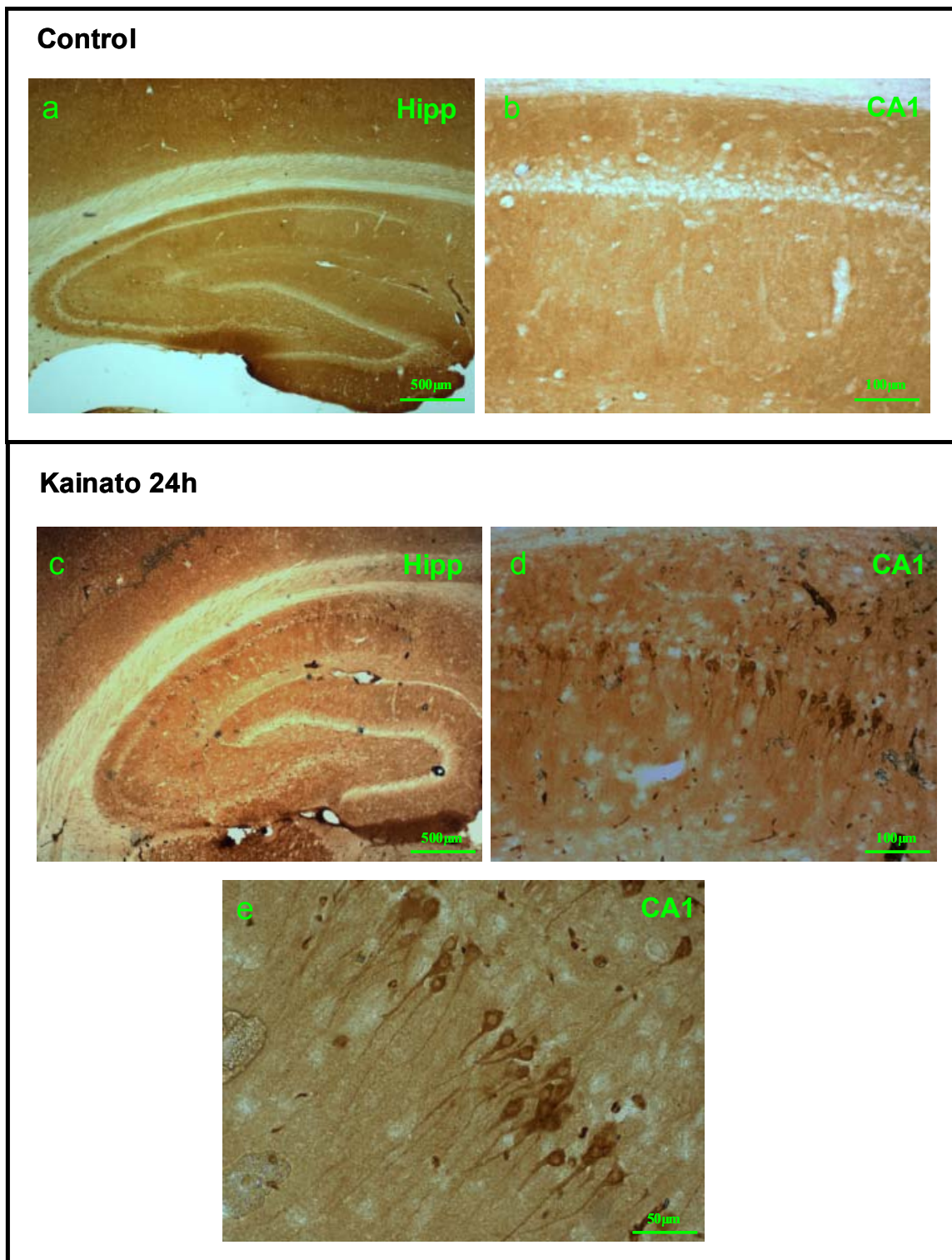


Fig.18. Inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-espectrina en hipocampo de ratas tratadas con kainato. **A.** Hipocampo de un animal control. No se observa tinción con el anticuerpo anti-espectrina. **B.** Detalle de la región CA1 del hipocampo de un animal control. **C.** Hipocampo de un animal tratado i.p. 24 h con kainato 10 mg/kg. Observamos que sólo aparecen células positivas en la región de CA1, y no en otras regiones como el giro dentado. **D.** y **E.** Detalle de la región CA1 del hipocampo, donde podemos observar neuronas teñidas con el anticuerpo anti-espectrina. Imágenes tomadas con un microscopio Olympus acoplado a una cámara CCD Color View.

4.10.1.3. Proteólisis de GSK-3 tras la inducción de epilepsia

Los resultados previos demuestran una activación de calpaína en ratas tratadas intraperitonealmente con kainato, siendo el efecto más evidente en hipocampo. Con estos antecedentes analizamos el estado de GSK-3 en dicho modelo. Para ello, realizamos una inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-GSK-3 α/β en los animales que se sacrificaron a las 24 horas de la inducción de epilepsia. Así, mientras en los animales control GSK-3 se distribuye en todo el hipocampo (Fig. 19A, B y C), en las ratas inyectadas con kainato se observa que desaparece la tinción con GSK-3 α/β en la zona de CA1 (Fig. 19D y E), pero no en otras zonas como en el giro dentado (Fig. 19F). Esta distribución se corresponde con lo observado en el caso de la espectrina y de la muerte neuronal marcada por Fluoro Jade, lo que indicaría que la activación de calpaína inducida por kainato, se está produciendo principalmente en la región CA1 del hipocampo, lo que corresponde con lo descrito previamente (Araujo et al., 2008).

También estudiamos la truncación de GSK-3 mediante *Western blot* con el anticuerpo anti-GSK-3 α/β (Fig. 20 y 21, paneles inferiores). Observamos que se produce una proteólisis de GSK-3 en corteza e hipocampo. Esta truncación se produce en paralelo a la truncación de espectrina (Fig. 20 y 21, paneles superiores), aumentando con el tiempo y observándose el máximo a las 24 horas de la inducción con kainato. En el panel inferior se observa GSK-3 en una película menos expuesta donde se puede observar que la cantidad de GSK-3 es constante en todos los animales.

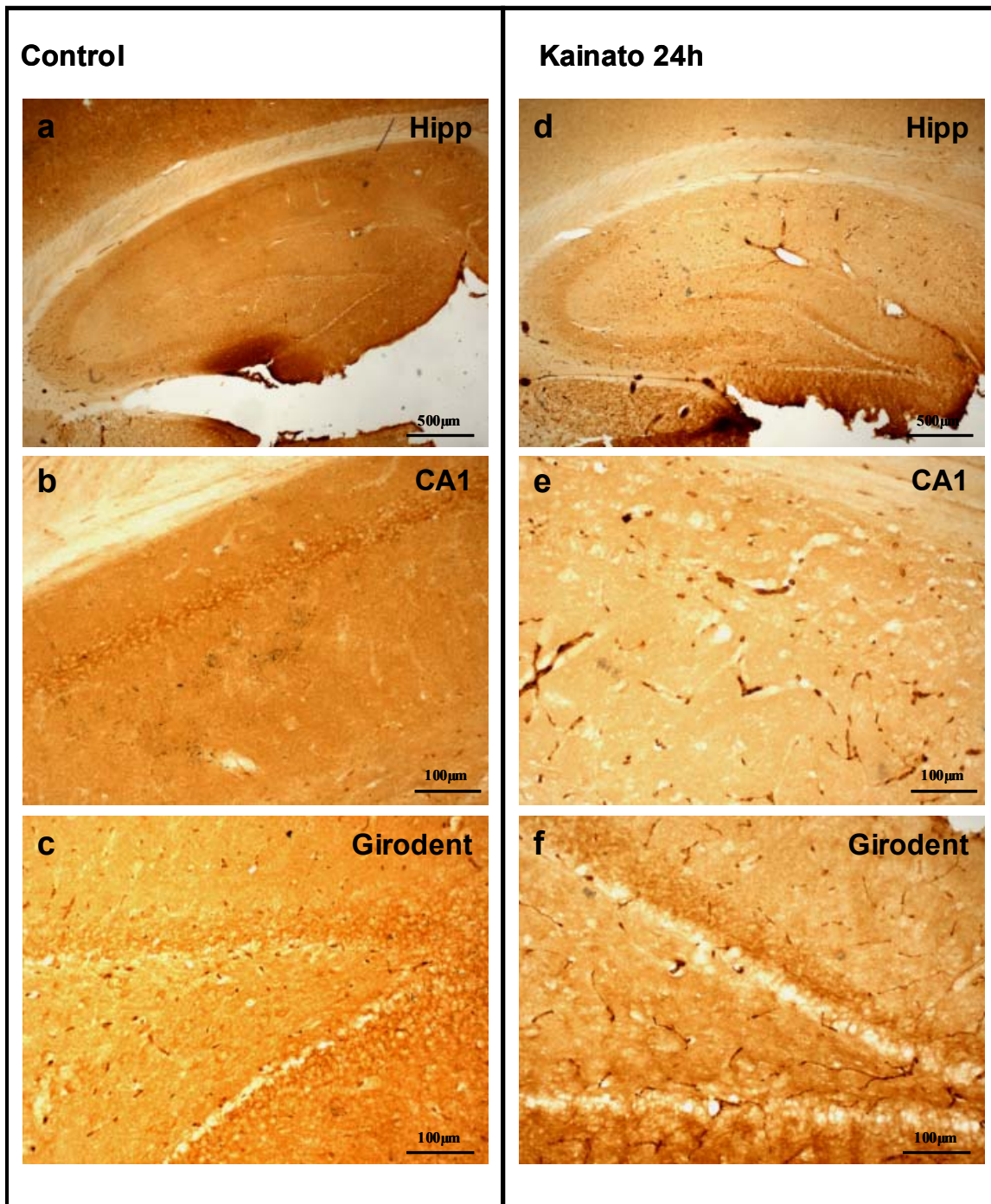


Fig.19. Inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-GSK-3 α/β en hipocampo de ratas tratadas con kainato. **A.** Hipocampo de un animal control. Observamos células positivas en toda la región del hipocampo, tanto en la región de CA1 (**B**) como en el giro dentado (**C**). **D.** Hipocampo de un animal tratado con kainato durante 24 h. En este caso observamos que el anticuerpo anti-GSK-3 α/β no reconoce las células de la región de CA1 (**E**), pero sí de otras áreas del hipocampo como el giro dentado (**F**). Imágenes tomadas con un microscopio Olympus acoplado a una cámara CCD Color View.

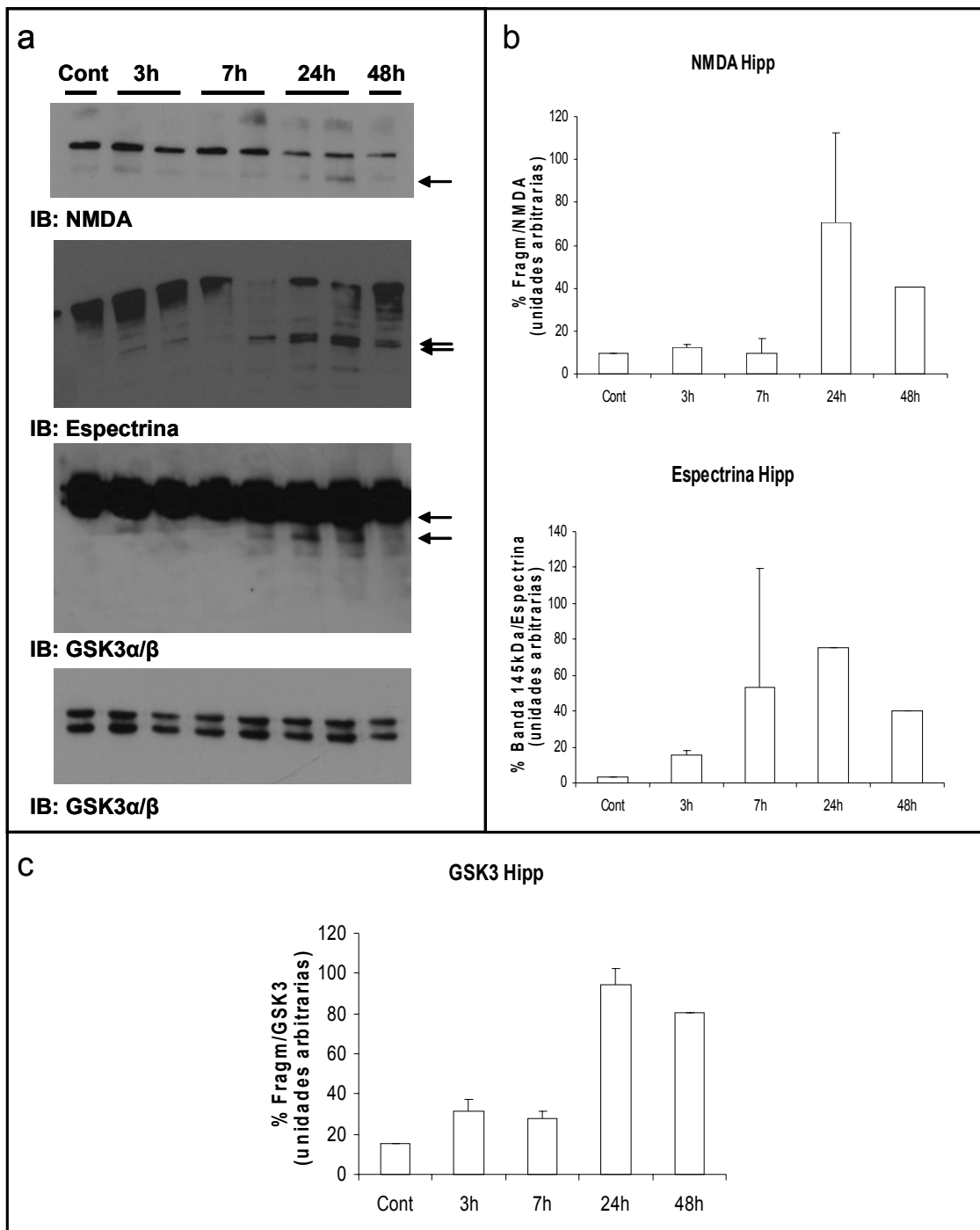


Fig.20. Proteólisis de GSK-3 en extractos de hipocampo de rata inyectadas con kainato durante distintos intervalos de tiempo. **A.** WB con los anticuerpos anti-NR2B, anti-espectrina y anti-GSK-3 α/β . Las flechas indican las formas truncadas del receptor de NMDA, espectrina y GSK-3. El panel inferior muestra que la carga de GSK-3 es constante en todos los animales. Obsérvese que las formas truncadas de la espectrina corresponden a las bandas de 145 y 150 kDa, originadas por la calpaína y no la banda de 120 kDa originado por caspasas. **B.** Cuantificación de la truncación de los sustratos de la calpaína, el receptor de NMDA y espectrina. Se observó un pico máximo a 24 h. **C.** Cuantificación de la truncación de GSK-3 en función del tiempo de tratamiento con kainato. De nuevo, el máximo se encuentra a 24 h.

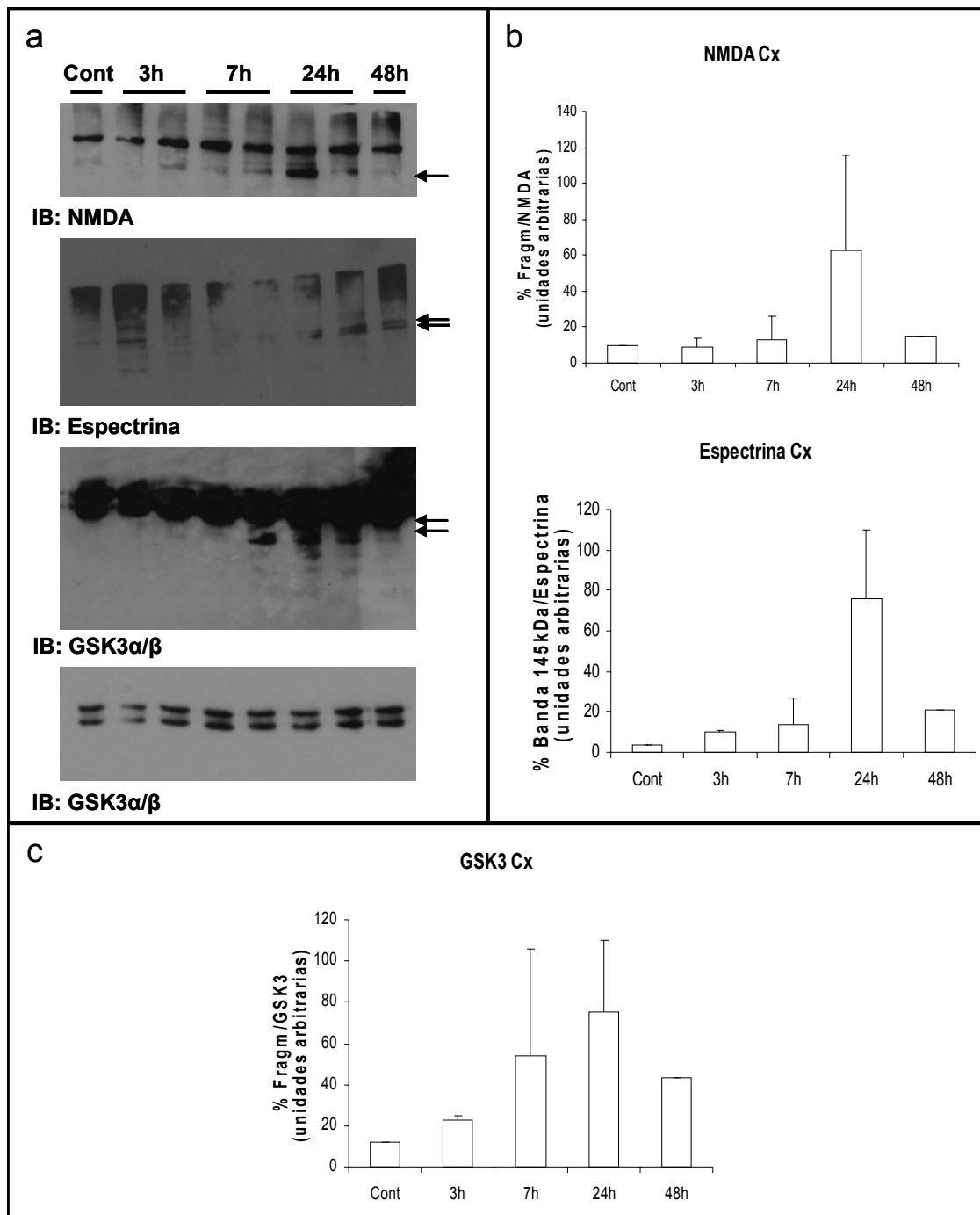


Fig.21. Proteólisis de GSK-3 en extractos de corteza de rata inyectadas con kainato durante distintos intervalos de tiempo. **A.** WB con los anticuerpos anti-NR2B, anti-espectrina y anti-GSK-3 α/β . Las flechas indican las formas truncadas del receptor de NMDA, espectrina y GSK-3. El panel inferior muestra que la carga de GSK-3 es constante en todos los animales. Obsérvese que las formas truncadas de la espectrina corresponden a las bandas de 145 y 150 kDa, originadas por la calpaína y no la banda de 120 kDa originado por caspasas. **B.** Cuantificación de la truncación de los sustratos de la calpaína, el receptor de NMDA y espectrina. Se observó un pico máximo a 24 h. **C.** Cuantificación de la truncación de GSK-3 en función del tiempo de tratamiento con kainato. De nuevo, el máximo se encuentra a 24 h.

4.10.2. Truncación de GSK-3 por calpaína en muestras de cerebro *post-mortem*

Tras haber observado truncación de GSK-3 en un modelo animal de neurodegeneración en el cual la calpaína se encuentra activa, el siguiente punto que nos planteamos estudiar fue si también existía truncación de GSK-3 en muestras humanas de alguna enfermedad neurodegenerativa en la que estén implicadas ambas proteínas. Sin embargo, antes de comprobar si la truncación de GSK-3 también se produce en muestras humanas de enfermos debemos analizar si el tiempo *post-mortem* de las muestras va a estar relacionado con la truncación de GSK-3, y si dicha truncación se produce también en muestras humanas. De hecho, está descrito que la actividad de la calpaína se incrementa con el tiempo *post-mortem* de la muestra (Taniguchi et al., 2001). Por ello, analizamos si existe truncación de GSK-3 en muestras de cerebro de ratón a distintos tiempos *post-mortem* y, posteriormente, estudiamos si la truncación de GSK-3 también se produce en muestras humanas.

4.10.2.1. Degradación *post-mortem* de GSK-3 en muestras de ratón

Para estudiar el efecto del tiempo *post-mortem* en la degradación de proteínas, examinamos los niveles de GSK-3, p35 y espectrina en muestras de cerebros de ratón a distintos tiempos *post-mortem*, 1, 3, 6, 12 y 24 h. Observamos por *Western blot* que GSK-3 no se degrada durante las tres primeras horas. El fragmento I se detectaba a partir de las 6 h y el fragmento II a partir de las 12 h (Fig. 22). Después de 24 h, ya no se detectaba la forma intacta de la proteína y sólo se observaban las formas truncadas. Observamos un patrón de degradación similar para la p35, que es la subunidad reguladora de CDK-5 y un conocido sustrato de la calpaína (Kusakawa et al., 2000; Lee et al., 2000). Como se muestra en la Fig. 22, p35 se degrada en función del tiempo *post-mortem*. Cuando se homogeneiza el cerebro inmediatamente después de la muerte del animal, se aprecia claramente la banda correspondiente a p35 y una banda muy débil que corresponde a p25 (la forma truncada de p35). Según aumenta el tiempo *post-mortem*, los niveles de p35 van decreciendo y aumentando los de p25 (Fig. 22B). Sin embargo, existen diferencias entre la degradación de GSK-3 y p35: p25 se genera más

rápidamente que los fragmentos de GSK-3. La espectrina, otro conocido sustrato de la calpaína (Czogalla and Sikorski, 2005), también se degradó. Así, se observó un incremento de las formas truncadas de espectrina de 145 y 150 kDa según aumentaba el tiempo *post-mortem*. Además también encontramos degradación de calpastatina, el inhibidor fisiológico de la calpaína, de manera dependiente del tiempo *post-mortem*, lo cual sugiere una relación entre degradación de la calpastatina, activación de la calpaína y truncación de proteínas sustrato de la calpaína.

Como ya fue expuesto en apartados anteriores, la truncación de GSK-3 por calpaína tiene lugar en el extremo N-terminal, donde se encuentra su dominio de inhibición por fosforilación. De acuerdo con esto, el anticuerpo anti-p-Ser-9/21-GSK-3 no reconoce ninguno de los fragmentos de degradación de GSK-3 (Fig. 22A). Tampoco observamos desfosforilación antes de las tres horas de tiempo *post-mortem*, lo que sugiere que como las proteasas, las fosfatasas no actúan durante las primeras tres horas.

Para confirmar que la proteólisis de GSK-3 era producida por la calpaína, los ratones fueron tratados con cantidades crecientes de MDL 28179, un inhibidor de la calpaína que atraviesa la barrera hematoencefálica (Li et al., 1998). Se inyectó intraperitonealmente MDL 28179 a los ratones y se analizó la truncación de GSK-3 a las 12 h *post-mortem*. Los animales tratados con MDL 28179 presentaron unos niveles más altos de la forma intacta de GSK-3 comparados con los animales controles, así como una disminución de las formas truncadas de GSK-3 (Fig. 23A). Se observó hasta una disminución del 70% en el caso del fragmento II en los ratones inyectados con 240 mg/Kg. (Fig. 23B). Además, en los ratones tratados con el vehículo apenas se observa la banda p35 a las 12 h *post-mortem*, mientras que en los pretratados con MDL 28179 se observa la inhibición de su degradación. Por lo tanto, observamos que el inhibidor MDL 28179 previene parcialmente la truncación *post-mortem* de GSK-3, lo que señala a la calpaína como responsable de la truncación de GSK-3 en el periodo *post-mortem*.

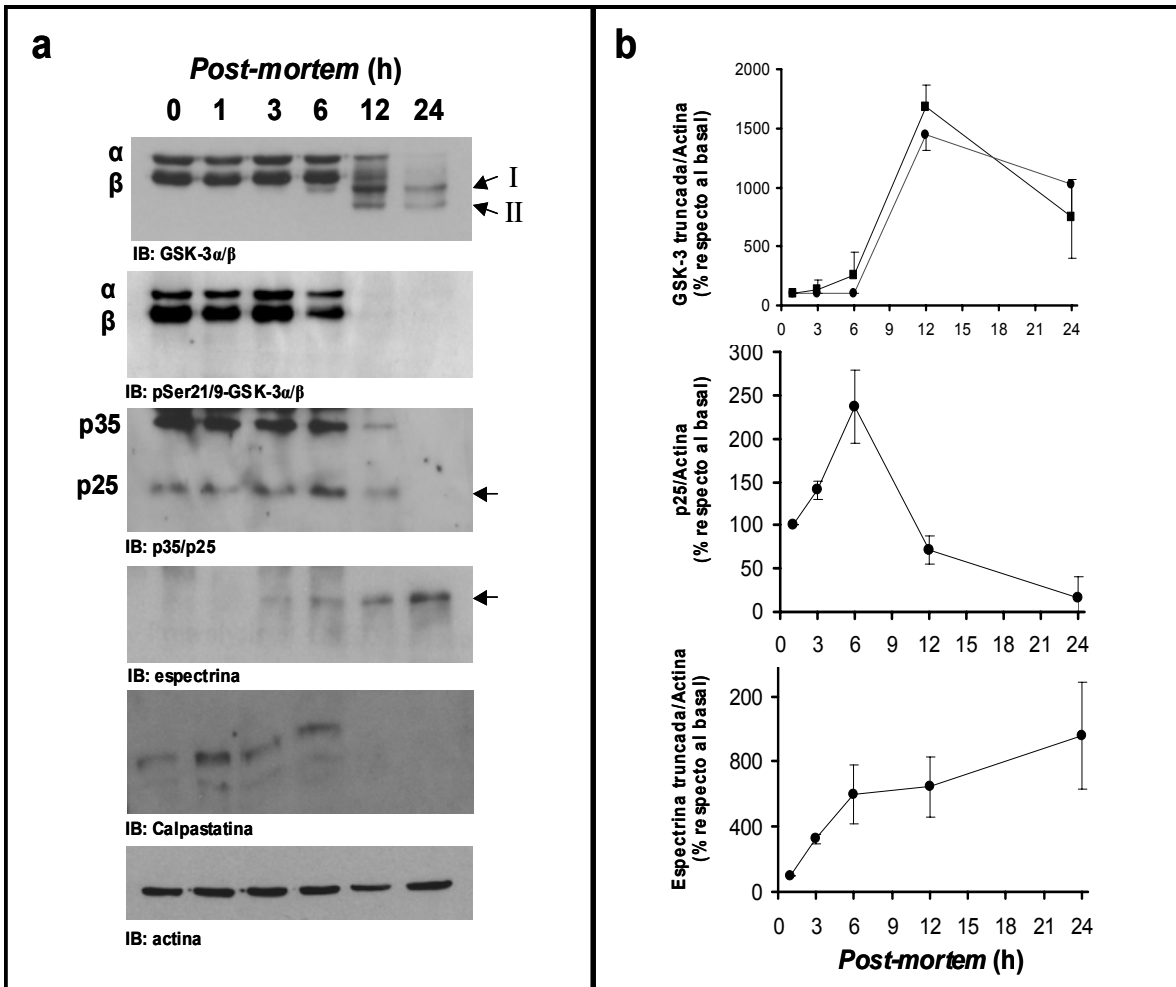


Fig. 22. Proteólisis de GSK-3 en extractos de cerebros de ratón a distintos tiempos *post-mortem*. **A.** *Western blot* con los anticuerpos anti-GSK-3α/β, anti-p-Ser-21/9-GSK-3α/β, anti-p35/p25, anti-espectrina, anti-calpastatina y anti-actina. Las flechas muestran las formas truncadas de las distintas proteínas ensayadas: el fragmento I y II de GSK-3, la forma p25 de p35, y los fragmentos de la espectrina de 145 y 150 kDa. **B.** Cuantificación de los datos mostrados en A. Los datos son expresados como el porcentaje de proteína truncada en cada tiempo *post-mortem* respecto a sus controles. (En la gráfica superior: ■, fragmento I de GSK-3; ●, fragmento II de GSK-3).

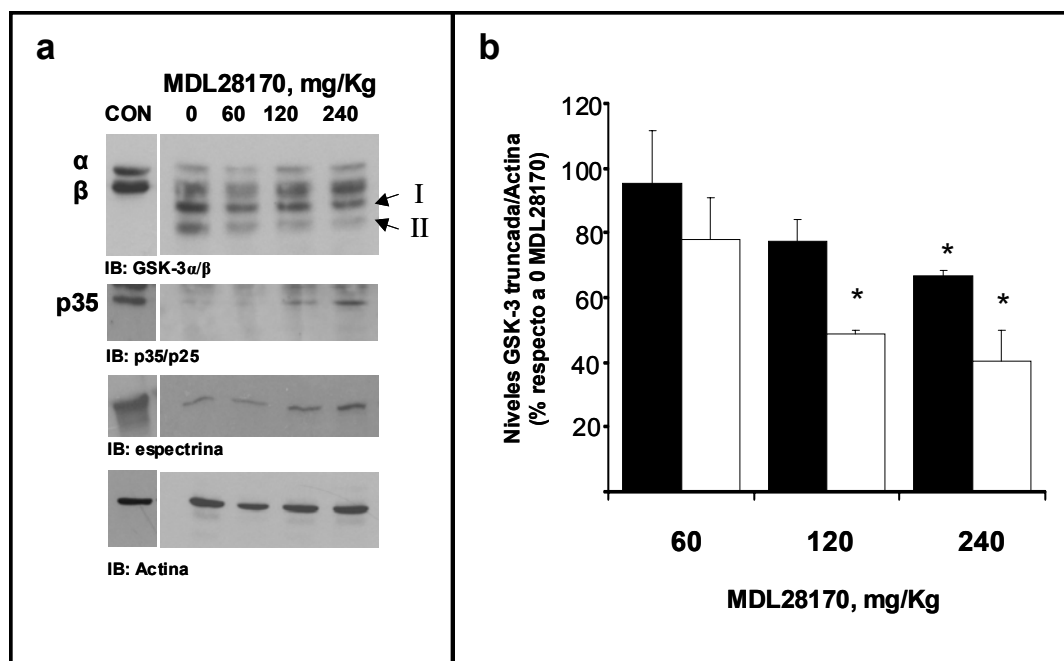


Fig. 23. Proteólisis de GSK-3 en extractos de cerebro de ratón tratados con el inhibidor de calpaína MDL 28170 tras 12 h de tiempo *post-mortem*. **A.** *Western blot* con los anticuerpos anti-GSK-3α/β, anti-p35/p25, anti-espectrina y anti-actina. Las flechas muestran el fragmento I y II de GSK-3. Los paneles de la izquierda representan los niveles de proteína durante un intervalo de tiempo *post-mortem* de 0 h. **B.** Cuantificación de la truncación de GSK-3 durante 12 h *post-mortem* en ratones tratados con distintas concentraciones de MDL 28170. Las barras negras representan el fragmento I y las barras blancas el fragmento II (* $p < 0,05$ ($n=2$) respecto a ratones sin tratar con el inhibidor).

4.10.2.2. Truncación de GSK-3 por calpaína en muestras humanas

El siguiente punto que nos planteamos fue si GSK-3 también era proteolizada en muestras humanas. Para ello analizamos por *Western blot* muestras de cerebro humano homogeneizadas en Tris/ EGTA. En ausencia de calcio no observamos truncación de GSK-3 (Fig. 24A), mientras que cuando añadíamos calcio se producía una degradación de GSK-3 dependiente del tiempo de incubación con calcio. Observamos una banda de 40 kDa (fragmento I) y otra banda de 30 kDa que corresponde al fragmento II, aunque ésta se observa más débilmente y se genera más lentamente (Fig. 24B). Este efecto era inhibido por calpeptina, lo que indica que la calpaína está involucrada en el proceso.

Sabiendo que se produce truncación de GSK-3 en muestras humanas, analizamos el estado de GSK-3 en muestras humanas a distintos tiempos *post-mortem* de cinco adultos que no presentan ninguna enfermedad neurológica como se puede ver

en la tabla mostrada en los Materiales y Métodos (Tabla 4). Examinamos muestras de un intervalo de tiempo *post-mortem* de 3 a 7h. La Figura 24C muestra la cuantificación de las intensidades de las bandas correspondientes a las formas truncadas de GSK-3 y p25 en un *Western blot*. Estos datos muestran una pequeña variación, aunque no estadísticamente significativa, en los niveles de las formas truncadas de GSK-3 y p25 en función del tiempo *post-mortem*, lo cuál sugiere que los datos de muestras humanas con un tiempo *post-mortem* mayor de siete horas hay que utilizarlos con precaución, ya que puede haber degradación producida por el tiempo *post-mortem*.

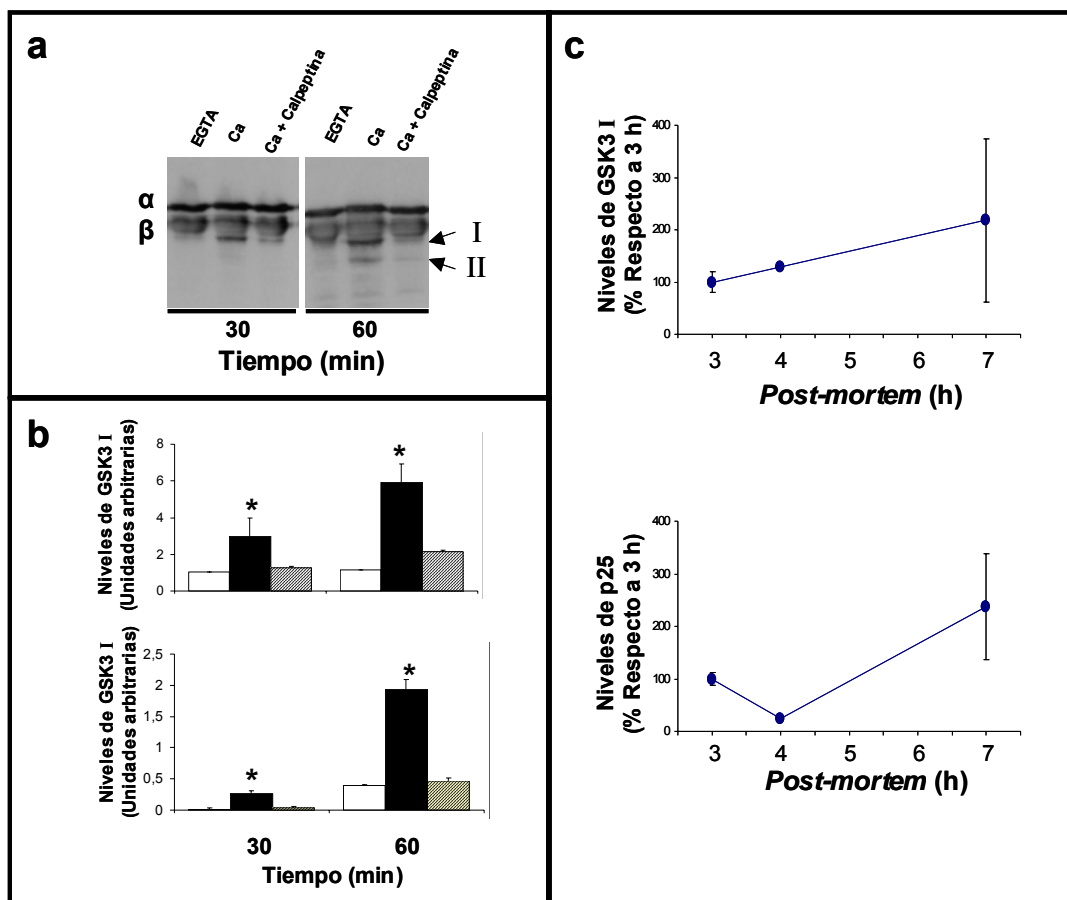


Fig.24. Proteólisis de GSK-3 en extractos de cerebro humano. **A.** Acumulación de GSK-3 truncada en presencia de CaCl_2 en función del tiempo. *Western blot* con el anticuerpo anti-GSK-3 α/β de extractos de cerebro humano que fueron incubados a 30°C en presencia de CaCl_2 5 mM o EGTA 1 mM. También fue ensayado el efecto de calpeptina 10 μM . **B.** Cuantificación de las formas truncadas de GSK-3. La gráfica de la izquierda muestra el fragmento I y la de la derecha el fragmento II. Las barras blancas representan las muestras en ausencia de calcio; las barras negras, el tratamiento con calcio; y las barras sombreadas, el tratamiento con calpeptina (* $p < 0,05$ respecto a las muestras en EGTA). **C.** Muestras de extractos de cerebro humano de distintos intervalos de tiempo *post-mortem* (ver Tabla 4 de Materiales y Métodos) fueron ensayadas con los anticuerpos anti-GSK-3 α/β y anti-p35/p25. Agrupamos las muestras humanas en intervalos de tiempos de 3, 4 y 7 h para comparar la truncación de proteínas.

4.10.3. Análisis de la truncación de GSK-3 en la enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa en la que se encuentra alterada la actividad de GSK-3. De hecho, GSK-3 contribuye a la formación de las dos marcas histopatológicas que caracterizan la enfermedad de Alzheimer: los ovillos neurofibrilares y las placas β -amiloides (Lucas et al., 2001; Engel et al., 2006b; Engel et al., 2006c; Hooper et al., 2008). También se han observado altos niveles de calpaína activa en la enfermedad de Alzheimer, cuya actuación sobre determinados sustratos se sugiere que puede contribuir a la progresión de la enfermedad (Goll et al., 2003; Chong et al., 2005). Puesto que ambas proteínas están implicadas en la enfermedad de Alzheimer, nos propusimos analizar si se producía truncación de GSK-3 por calpaína en la enfermedad de Alzheimer.

4.10.3.1. Truncación de GSK-3 en muestras humanas de Alzheimer

Tras observar que no hay truncación estadísticamente significativa durante las primeras siete horas de tiempo *post-mortem*, nos propusimos comparar el estado de GSK-3 en cinco muestras de cerebros humanos controles, sin ninguna alteración neurológica evidente y cinco muestras de cerebros humanos con la enfermedad de Alzheimer (EA) dentro de este margen de tiempo (Tabla 5, Materiales y Métodos).

Analizamos por *Western blot* la truncación de GSK-3 y observamos un ligero incremento de la forma truncada de 40 kDa en las muestras de Alzheimer respecto a sus controles. Sin embargo, esta variación no es estadísticamente significativa (Fig. 25). También analizamos dichas muestras con el anticuerpo PHF-1 que reconoce Tau hiperfosforilado para dilucidar si hay correlación entre truncación de GSK-3 e intensidad de PHF-1 en las muestras de Alzheimer (Fig. 25). De nuevo, observamos una ligera correlación entre ambos estados, aunque no estadísticamente significativa ($R^2=0,523$; Fig. 25)

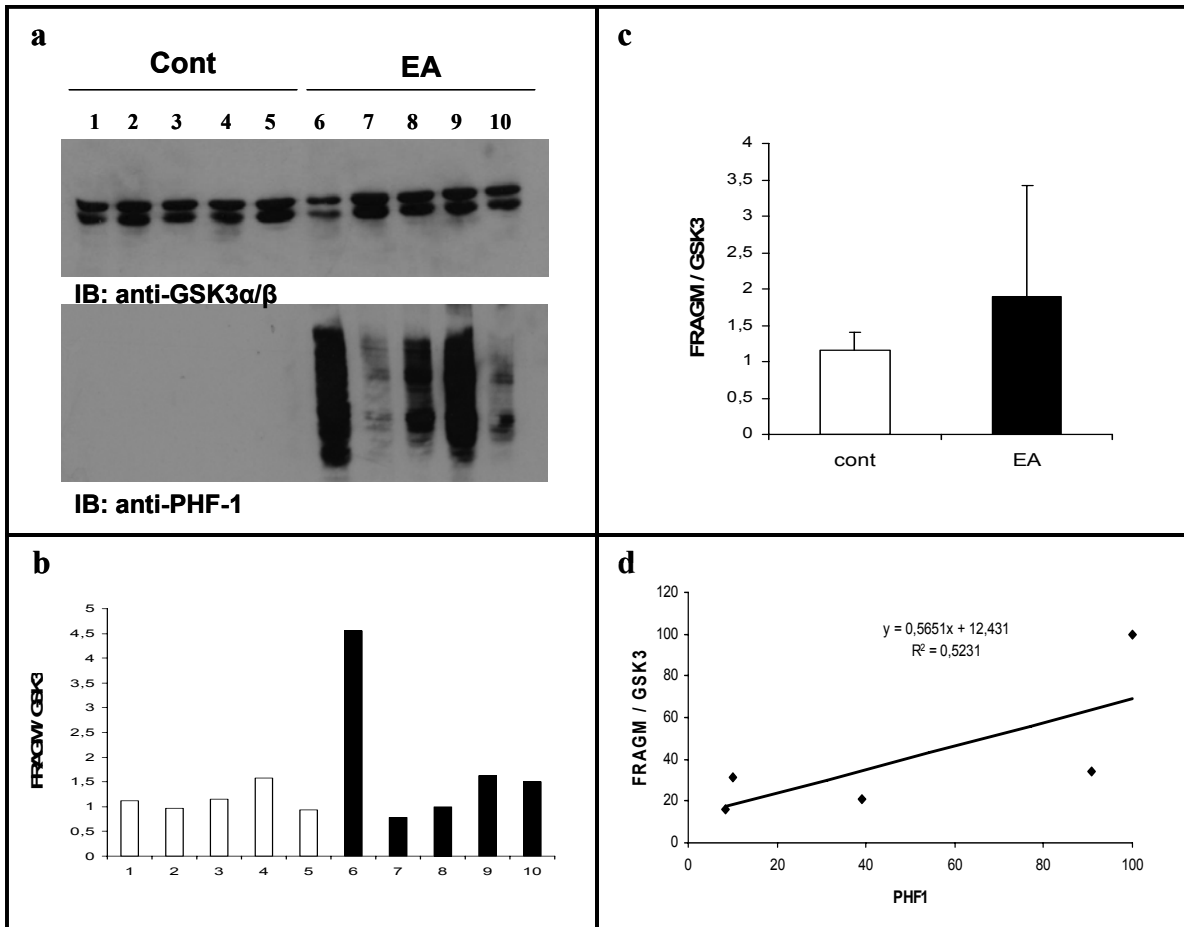


Fig. 25. Proteólisis de GSK-3 en muestras humanas de cerebro de enfermos de Alzheimer. **A.** *Western blot* con el anticuerpo anti-GSK-3 α/β (panel superior) y anti-PHF-1 (panel inferior) de extractos de cerebros humanos controles (1-5) y enfermos de Alzheimer (6-10). **B.** Cuantificación de la cantidad de fragmento de GSK-3 frente a cantidad total de GSK-3 de cada muestra. **C.** Media de los datos mostrados en el panel B. Las barras blancas representan las muestras control, mientras que las negras representan las muestras de Alzheimer. **D.** Correlación de la truncación de GSK-3 (eje Y) frente a intensidad de PHF-1 (eje X) en las muestras de Alzheimer. No se encontró una correlación positiva ($R^2=0,523$).

4.10.3.2. Inhibición por memantina de la truncación de GSK-3 mediada por calpaína

La memantina es un inhibidor de los receptores de NMDA y un medicamento usado en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, ya que la activación de dichos receptores se ha propuesto que podrían contribuir a la enfermedad de Alzheimer (Reisberg et al., 2003). Hemos visto previamente que GSK-3 se corta por calpaína vía receptores de NMDA en cultivos primarios de ratón. Por ello estudiamos si la memantina era capaz de inhibir la truncación de GSK-3, pudiéndose relacionar la acción de la memantina en Alzheimer con GSK-3 y la calpaína.

Analizamos en cultivos primarios de corteza de ratón si la memantina era capaz de inhibir la proteólisis de GSK-3 producida por la estimulación con NMDA (100 μ M). Observamos por *Western blot* que la memantina inhibía la truncación de GSK-3 de una manera dependiente de la dosis con una $IC_{50} = 1,81 \pm 0,95 \mu$ M (Fig. 26B). Además la truncación de GSK-3 era causada por la calpaína, ya que el inhibidor de ésta, calpeptina, producía el mismo efecto que la memantina (Fig. 26A). Probamos también si la memantina inhibía la truncación de p35 a p25 en nuestras condiciones experimentales. Utilizamos el anticuerpo que reconoce p35/p25 y observamos que la memantina inhibe la formación de p25 por la proteólisis de p35 de una manera paralela a lo observado en el caso de GSK-3, presentando una $IC_{50} = 6,33 \pm 3,41 \mu$ M (Fig. 26B). Otro sustrato de la calpaína, la espectrina, presentó un patrón similar ($IC_{50} = 1,14 \pm 0,87 \mu$ M) (Fig. 26B). El mismo resultado observamos cuando analizamos la truncación del receptor de NMDA (Fig. 26B). De esta forma, la memantina previene la truncación del receptor de NMDA, espectrina, p35 y GSK-3 inducida por NMDA.

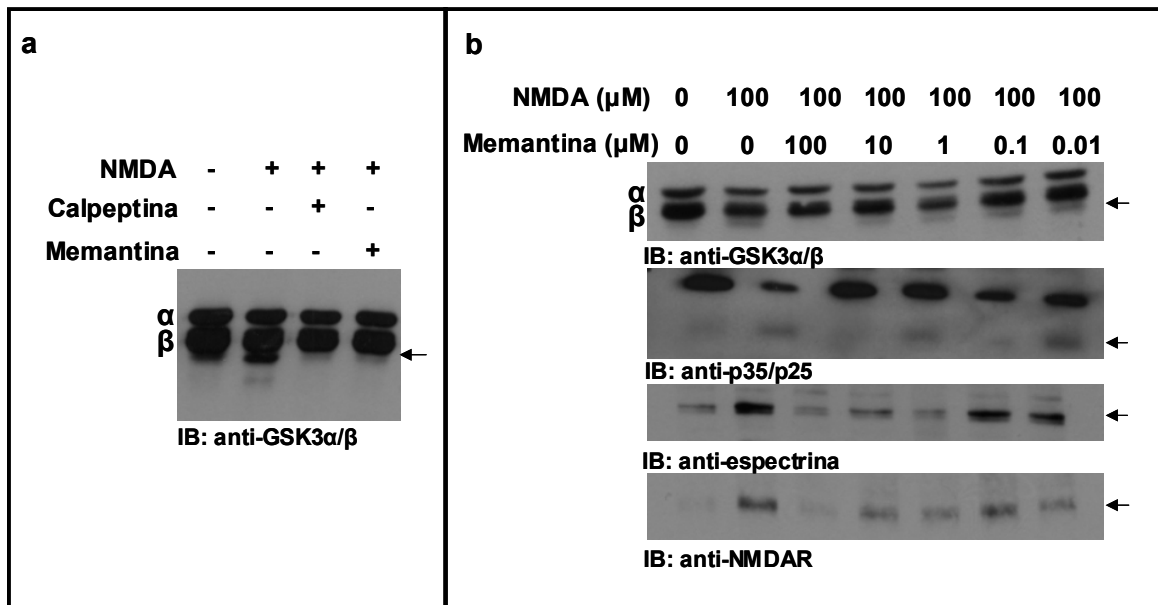


Fig. 26. La truncación de GSK-3 vía NMDA es inhibida por memantina. **A.** Neuronas de corteza de ratón (DIV 12) fueron tratadas con NMDA 100 μ M durante 3 horas en ausencia o presencia del inhibidor de calpaína, calpeptina (10 μ M) o del inhibidor de NMDA, memantina (100 μ M). La proteólisis de GSK-3 inducida por NMDA fue inhibida por ambos inhibidores. **B.** Neuronas de corteza de ratón (DIV 12) fueron tratadas con NMDA 100 μ M durante 3 horas y con concentraciones crecientes de memantina. En el panel superior se muestra *Western blot* con el anticuerpo anti-GSK-3 α/β . El fragmento de 40 kDa se indica con una flecha. En el siguiente panel fue usado el anticuerpo anti-p35/p25, y la flecha indica p25, la forma truncada. El panel siguiente muestra la truncación de la espectrina, y el panel inferior la del receptor de NMDA. Las flechas indican las formas truncadas de estas proteínas.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. El extremo N-terminal de GSK-3 es proteolizado por calpaína

GSK-3 es una quinasa constitutivamente activa que se inactiva por fosforilación en el extremo N-terminal. En este trabajo hemos demostrado que la actividad de GSK-3 también puede ser regulada por la calpaína al proteolizar el extremo N-terminal de la quinasa. Estas conclusiones se basan en los siguientes datos: (1) La calpaína corta a GSK-3 *in vitro*; (2) esta truncación elimina el extremo N-terminal; (3) las formas truncadas de GSK-3 son quinazas activas que pueden ser inhibidas por litio con una IC₅₀ similar a la de GSK-3 intacta; y (4) la estimulación de neuronas con ionomicina, glutamato y NMDA produce la truncación de GSK-3 a través de la activación de calpaína. Además, nuestros datos también muestran que las isoformas α y β presentan una diferente susceptibilidad a ser truncadas por calpaína, lo cuál sugiere una diferente manera de regular ambas isoenzimas. Todos estos datos proporcionan un nuevo papel para la calpaína en la regulación de la actividad de GSK-3 y describen una nueva forma de regulación de GSK-3.

El incremento de la concentración de calcio intracelular en cultivos primarios de neuronas corticales producido por la incubación con el ionóforo de calcio, ionomicina, produjo la aparición del fragmento de GSK-3 de manera dependiente del tiempo de incubación. Este efecto fue bloqueado por inhibidores específicos de calpaína, lo que sugiere la implicación de la enzima en la truncación de GSK-3 producida por un incremento de calcio en el interior celular.

Para confirmar que este proceso tenía implicaciones fisiológicas estudiamos en cultivos primarios neuronales el sistema glutamatérgico. La estimulación de neuronas corticales con glutamato o NMDA también produjo la truncación de GSK-3 de manera dependiente de la activación de calpaína. Además, este proceso proteolítico correlaciona con un incremento de la actividad de GSK-3. Para comprobar la activación de la calpaína estudiamos la degradación de la subunidad NR2B del receptor de NMDA, sustrato de la calpaína y que juega un importante papel en su activación (Simpkins et

al., 2003; Wu et al., 2005), así como la truncación de la subunidad reguladora de CDK-5, p35, en su forma truncada denominada p25.

La continua activación del receptor de NMDA (en presencia de glicina) provoca la truncación de GSK-3, siendo el calcio extracelular responsable de este proceso, ya que el quelante de calcio extracelular, EGTA, fue capaz de bloquear totalmente los efectos de la estimulación por NMDA, mientras que el quelante de calcio intracelular, BAPTA, no fue capaz.

El incremento de la actividad de GSK-3 producido por la estimulación de neuronas mediante el receptor de NMDA también se refleja en un incremento en la fosforilación de sus sustratos en dicho sistema. Este efecto fue observado por el incremento de la fosforilación de Tau en el epítipo PHF-1 (sitio de fosforilación de GSK-3). Está descrito que la activación de los receptores de NMDA provocan un incremento de la actividad de GSK-3 producido por la desfosforilación de GSK-3 β en la serina 9 por la acción de la fosfatasa PP1 (De Sarno et al., 2006); (Szatmari et al., 2005). En este trabajo observamos que este efecto fue inhibido tanto por inhibidores del receptor de NMDA como por inhibidores de la calpaína, indicando que el aumento en la actividad de GSK-3 tras la estimulación por NMDA está también mediado por calpaína. Son necesarios más estudios para comprender el mecanismo exacto de la activación de GSK-3 mediante la estimulación de los receptores de NMDA así como para conocer la contribución relativa tanto de la calpaína como de la PP1 en la fosforilación de Tau mediada por receptores de NMDA.

La generación de un fragmento similar de GSK-3 con mayor actividad que la forma intacta ha sido descrito previamente (Wang et al., 1994). Sin embargo, estos autores consideraban dicho fragmento como resultado de un proceso proteolítico aberrante en el proceso de purificación de la enzima. En este trabajo, demostramos que esta proteólisis es un mecanismo de regulación con implicaciones fisiológicas. La calpaína corta el extremo N-terminal de GSK-3, evitando que pueda inhibirse por fosforilación. De esta forma, provoca que la regulación de GSK-3 sea independiente del balance de quinasas y fosfatasas celulares. De hecho, esta proteólisis de GSK-3 β es independiente de la fosforilación en serina 9, ya que la calpaína es capaz de cortar una isoforma de GSK-3 β sin los nueve primeros aminoácidos (GSK-3 β - Δ 9). Sin embargo, esta forma a la que le faltan los primeros nueve aminoácidos, parece peor sustrato que GSK-3 β intacta. Esto podría ser explicado porque la calpaína no tuviese suficiente

superficie de unión para unirse a la GSK-3, o bien porque esta forma está unida al epítipo HA, que también podría estar interfiriendo en el reconocimiento de la calpaína por su sustrato. De hecho, GSK-3 β unida al epítipo MYC es mejor sustrato que HA-GSK-3 β - Δ 9, pero peor que GSK-3 β nativa.

En la célula, GSK-3 puede encontrarse formando complejos multiproteicos, como ya fue expuesto en la Introducción. Una de las proteínas a las que puede asociarse es 14-3-3. Además esta proteína se une al extremo N-terminal de GSK-3, por lo que la truncación de GSK-3 en el extremo N-terminal podría evitar su unión a esta proteína. De hecho, hemos observado que así ocurre, 14-3-3 no es capaz de unirse a GSK-3 truncada. El posible papel de la unión de 14-3-3 a GSK-3 es el secuestro del dominio inhibitorio del extremo N-terminal de la quinasa, de tal forma que aunque esté fosforilada en serina 9, GSK-3 pueda ser una quinasa activa.

La truncación de GSK-3 por calpaína también posibilita la activación de GSK-3 independientemente de su estado de fosforilación, por lo que la existencia de ambos mecanismos de regulación a la vez sería redundante. Por último, también sería interesante estudiar si este proceso ocurre al revés, es decir, si la unión de GSK-3 a la proteína 14-3-3 impide su truncación por calpaína.

Lo que sí hemos observado es que parece que 14-3-3 tiene más afinidad por GSK-3 desfosforilada que fosforilada. Está descrito que 14-3-3 se une a GSK-3 cuando ésta se encuentra fosforilada en la serina 9 (Agarwal-Mawal et al., 2003), sin embargo hemos observado que no sólo es capaz también de unirse a GSK-3 sin fosforilar, sino que incluso presenta más afinidad por esta forma de GSK-3. Este hecho no es incompatible con lo anterior, ya ha sido descrito anteriormente que 14-3-3 es capaz de unirse a una misma proteína tanto fosforilada como no fosforilada, por ejemplo en el caso de la proteína Tau (Hashiguchi et al., 2000). De hecho, al unirse 14-3-3 a GSK-3, tanto fosforilada como no, va a proteger de la inhibición por fosforilación en el extremo N-terminal.

Aunque la calpaína puede degradar completamente a su proteína sustrato, generalmente la corta, como ocurre en el caso de GSK-3, de forma limitada, obteniendo una proteína estable que puede tener funciones independientes de las que tenía la forma intacta. Existen numerosas proteínas identificadas como sustrato de la calpaína, pero no existe una secuencia consenso de corte. Nosotros secuenciamos el extremo N-terminal del fragmento II, fragmento (con idéntico peso molecular para GSK-3 α y GSK-3 β) obtenido de la truncación de GSK-3 β por calpaína, y obtuvimos, por el método de

EDMAN, el péptido RPQEV. Ésta es una secuencia que se encuentra en el extremo N-terminal de GSK-3 β y se encuentra muy conservada en distintas especies como humano y ratón (Fig. 9). Observando dicha secuencia en el cristal de GSK-3 β (Dajani et al., 2001; ter Haar et al., 2001) se puede observar que se encuentra en una posición accesible (Fig. 27), que posibilitaría la interacción entre ambas proteínas.



Fig. 27. Esquema del cristal de GSK-3 β . Se ha utilizado el fichero 1Q5K (Bhat et al., 2003). En rojo se muestra el inhibidor competitivo de ATP AR-A014418 en el centro activo de la enzima. En verde, los aminoácidos identificados por el método de EDMAN (RPQEV). En azul, el punto de corte de la calpaína en el fragmento II. La estructura secundaria en beta lámina se muestra en amarillo, mientras que la alfa hélice se muestra en rosa

Existe una relación entre la estabilidad metabólica de una proteína y la identidad del residuo que se encuentra en la posición N-terminal denominada con el nombre de *N-end rule* (Bachmair et al., 1986; Ciechanover and Schwartz, 1989; Varshavsky, 1996).

La existencia de una arginina en el extremo N-terminal de una proteína confiere a dicha proteína una gran inestabilidad, ya que dicha arginina va a favorecer su ubiquitilación y posterior degradación por el proteosoma. Sin embargo, todas las proteínas recién sintetizadas presentan una metionina inicial, la cual confiere a la proteína una gran estabilidad y una larga vida media. Para desestabilizar estas proteínas, o bien pueden actuar unas enzimas llamadas Met-aminopeptidasas que retiran la metionina inicial, quedando expuesto el segundo aminoácido del extremo N-terminal, o bien pueden actuar endopeptidasas, entre las que se encuentran las calpaínas, cortando el extremo N-terminal de la proteína y dejando expuesto un aminoácido que confiera mayor inestabilidad a la proteína. Este último proceso puede tener una importancia fisiológica al crear proteínas con una corta vida media cuyas concentraciones deben variar según el estado de la célula (Varshavsky, 1992, 1996; Tasaki and Kwon, 2007).

Tras la secuenciación del fragmento II de GSK-3 β , hemos encontrado que dicho fragmento comienza por una arginina, lo cuál, de acuerdo con lo anteriormente expuesto, podría explicar por qué dicho fragmento no parece que sea estable y por qué no es observado en cultivos primarios ni en extractos de tejido.

En los ensayos *in vitro* hemos observado que la calpaína corta a ambas isoenzimas, GSK-3 α y GSK-3 β , si bien es cierto, que parece presentar distinta dinámica en una y otra isoforma. La forma intacta de ambas isoenzimas es rápidamente digerida en ambos casos, sin embargo, el fragmento I de GSK-3 β parece ser mejor sustrato para la calpaína que el fragmento I de GSK-3 α . Así, en el primer caso, tras cinco minutos de digestión sólo queda el 25% del fragmento I porque ya ha sido degradado originando el fragmento II, mientras que en el caso de la isoforma GSK-3 α todavía queda el 60%.

Cuando analizamos los productos de ambas isoformas en un mismo gel, observamos que ambas presentan un fragmento II con el mismo peso molecular (30 kDa). Sin embargo, el fragmento I difiere ligeramente en una y otra isoforma, presentando un peso molecular de 42 kDa en el caso de GSK-3 β y 40 kDa en el caso de GSK-3 α . Esta diferencia podría explicarse por un diferente sitio de corte de la calpaína en cada una de las isoformas o, porque aunque corte en el mismo punto, se genere un fragmento mayor por la diferencia de secuencia que hay entre ambas isoenzimas en su extremo N-terminal. De hecho, el fragmento I de GSK-3 α va a presentar el dominio rico en glicinas que no presenta el de la otra isoenzima, pudiendo así explicar la diferente cinética de la calpaína en uno y otro fragmento (Fig. 28).

De esta forma, la región de poli-glicinas de GSK-3 α podría promover una diferente manera de regular ambas isoenzimas. Estos residuos de glicina generalmente confieren a la proteína libertad conformacional, ya que tienen un efecto negativo en la formación de estructuras secundarias como las α -hélices o las β -láminas (Tzul et al., 2007). Repeticiones de este aminoácido se encuentran no solo en GSK-3 α sino también en la subunidad pequeña de la calpaína y son frecuentes en los factores de transcripción (Hernandez et al., 2008). Como ya se expuso en la Introducción, GSK-3 β se inhibe cuando se fosforila en la serina 9 de su extremo N-terminal, y GSK-3 α cuando se fosforila en la serina 21, la cuál se encuentra flanqueada por poli-glicinas. Aunque ambas isoformas responden de manera similar a la regulación por insulina, no se sabe si las poli-glicinas podrían estar influyendo en que la regulación por fosforilación de ambas isoenzimas fuese diferente. En este trabajo hemos observado que la calpaína promueve la activación de GSK-3 eliminando su extremo N-terminal, donde se encuentra la serina 9 de la isoforma β . En el caso de la isoforma α , esta zona es rica en glicinas. Así, estas repeticiones de glicina podrían provocar que la fosforilación en serina y/o la proteólisis por calpaína afectase de diferente manera a ambas isoenzimas de GSK-3 (Hernandez et al., 2008). De hecho, ha sido previamente descrito que la proteólisis de otras proteínas como NF- κ B se ve modulada por una región rica en glicinas (Cohen and Goedert, 2004).

Por otro lado, el fragmento II presenta el mismo peso molecular en ambas isoenzimas, lo que podría hacer pensar, que en este caso sí que la calpaína corta en el mismo punto. Tras secuenciar el fragmento II de la isoenzima β obtuvimos el péptido RPQEV, sin embargo, la secuencia de ambas isoformas se diferencia justo en este punto en un aminoácido, siendo la secuencia de GSK-3 α , RSQEV (Fig. 28). Por tanto, sería interesante hallar el punto de corte de GSK-3 α para dilucidar todas estas cuestiones, así como el punto de corte del fragmento I en ambas isoformas.

También es interesante señalar que el litio, inhibidor de GSK-3, es capaz de inhibir la actividad de las formas truncadas de ambas isoformas de GSK-3 con una IC₅₀ similar a la de las formas no proteolizadas, lo cual sugiere que los inhibidores de GSK-3 también podrían ser útiles para la inhibición de las formas truncadas.

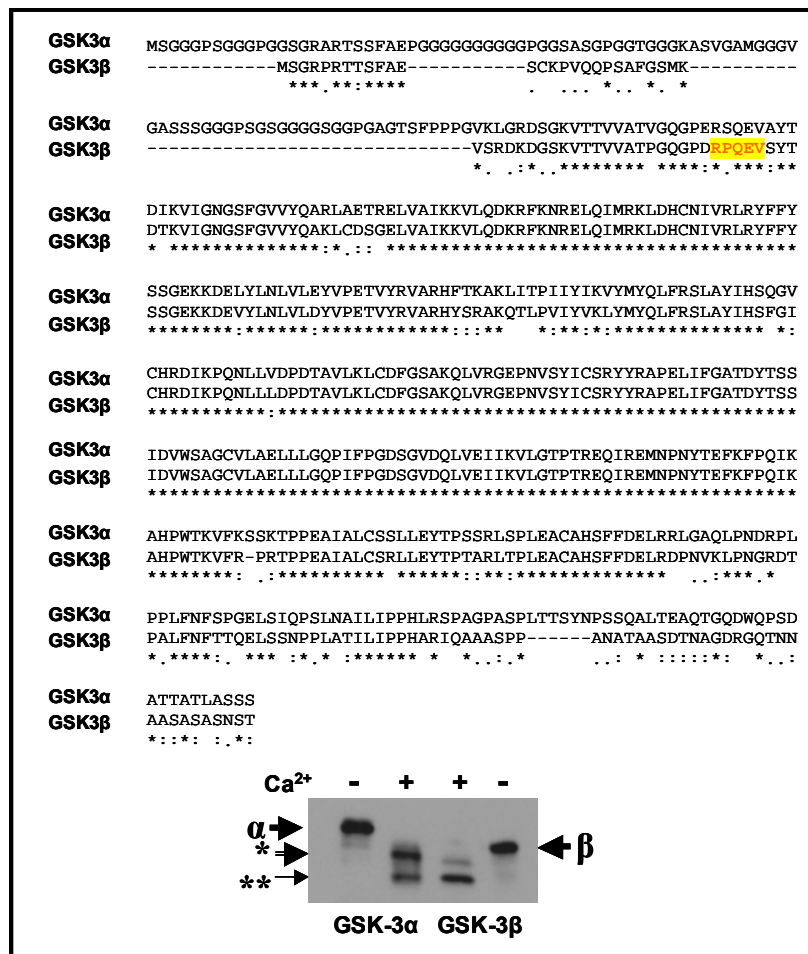


Fig. 28. Secuencia comparada de GSK-3 α y GSK-3 β (Woodgett, 1990), indicándose en amarillo el péptido obtenido tras la secuenciación de EDMAN del fragmento II de GSK-3 β . En la imagen inferior se pueden observar los fragmentos de ambas isoformas. Mientras que el fragmento II (dos asteriscos) presenta el mismo peso molecular en ambas isoformas, el fragmento I (un asterisco) presenta un peso ligeramente mayor en el caso de la isoforma α .

Analizando la truncación de GSK-3 en neuronas, observamos que los fragmentos generados por la estimulación glutamatérgica no se acumulan. De hecho, tras largos tiempos de estimulación con NMDA (48 horas), observamos una bajada en los niveles de GSK-3, pero no se corresponde con un incremento de los fragmentos de degradación. Estos datos sugieren que la calpaína corta el dominio regulador del extremo N-terminal, obteniéndose una forma constitutivamente activa de la enzima, pero de corta vida media. Es interesante señalar que en los ensayos *in vitro* realizados con GSK-3 α y β recombinantes, tampoco se observa acumulación del fragmento I, sino que el que parece acumularse es el fragmento II de 30 kDa. Cuando analizamos la

truncación de GSK-3 en cultivos primarios neuronales o en extractos de tejido de cerebro, sólo observamos el fragmento de 40 kDa. Una posible explicación para este hecho, podría ser que GSK-3 es truncada por la calpaína generando primero el fragmento I, y a continuación el fragmento II, siendo este último rápidamente degradado, y por lo tanto difícilmente detectable.

Cuando transfectamos células COS-7 con un plásmido que expresa el fragmento II de GSK-3 β , obtenido a partir de la secuenciación del sitio de corte de la calpaína sobre GSK-3 β , observamos que rápidamente se degrada y se forma otra banda de menor peso molecular. Cuando sobrexpresamos GSK-3 β intacta, también observamos una banda del mismo peso molecular. Sin embargo, esta banda no es observada en cultivos de neuronas, por lo que su aparición podría deberse a la acción de alguna proteasa de este tipo celular pero que no exista en las neuronas, o bien, que en las neuronas este fragmento de degradación más pequeño tenga una vida media todavía menor, por acción de otras proteasas o por acción del proteosoma. La rápida degradación de este fragmento en células transfectadas corrobora lo ya expuesto anteriormente, a saber, que la calpaína trunca primero a GSK-3 obteniéndose el fragmento I, y a partir de éste genera el fragmento II que tiene una vida media muy corta.

A pesar de ello, cuando analizamos en células transfectadas con el fragmento II la actividad quinasa de GSK-3 mediante la fosforilación de su sustrato Tau, utilizando el anticuerpo PHF-1, observamos que su actividad quinasa está intacta, y es capaz de fosforilar a Tau.

Una mayor actividad de GSK-3 en la célula podría provocar muerte celular por apoptosis (Beurel and Jope, 2006). Por ello cuando transfectamos células con el fragmento II de GSK-3, el cual presenta una mayor actividad que GSK-3 intacta, tratamos a las células con litio, para inhibir GSK-3 truncada. No obtuvimos diferencias entre las células tratadas y sin tratar con litio. Esto podría indicar que la sobreexpresión del fragmento no está provocando muerte celular masiva. Este es un punto que se debería analizar en más detalle en estudios posteriores.

También analizamos la localización intracelular del fragmento. Observamos que GSK-3 β truncada se distribuye principalmente alrededor del núcleo, pero no en el interior nuclear, mientras que la GSK-3 β intacta sí se localiza en el núcleo. Estos datos se corresponden con lo descrito por Meares y colaboradores (Meares and Jope, 2007) donde demuestran que aunque la señal de localización nuclear se encuentra entre los aminoácidos 85-103 de la secuencia de GSK-3 β , los primeros nueve aminoácidos de

GSK-3 β son necesarios para que se transloque eficazmente al núcleo. El fragmento II al carecer de este extremo N-terminal, presenta una menor eficiencia para translocarse al núcleo.

Resumiendo, la truncación de GSK-3 promovida por calpaína genera una enzima con actividad quinasa, pero sin el dominio inhibitorio. Por otra parte, estas formas carentes del extremo N-terminal no interaccionan con 14-3-3 ζ ni se translocan al núcleo.

5.2. Implicaciones fisiopatológicas de la truncación de GSK-3

Como ya fue comentado en la Introducción, las calpaínas pueden regular la actividad de proteínas quinasas implicadas en diversas vías de transducción de señales (Goll et al., 2003). Así, la calpaína corta el dominio regulador de la PKC, obteniendo una forma constitutivamente activa, aunque de corta vida media (Kishimoto et al., 1989; Shea et al., 1996). También regula la actividad de CDK-5, ya que la acción de la calpaína genera la formación de dos activadores de CDK-5, p25 y p29 a partir de sus precursores p35 y p39 (Kusakawa et al., 2000; Nath et al., 2000a; Patzke and Tsai, 2002). La CaM quinasa II también es degradada por calpaína a un fragmento activo independiente de la regulación por calmodulina (Hajimohammadreza et al., 1997). En este trabajo proponemos a GSK-3 como una nueva quinasa cuya actividad es regulada por proteólisis. Estos datos podrían sugerir un patrón común que conecta la calpaína con la regulación de diferentes proteínas quinasas. De esta forma, las calpaínas liberan a las quinasas de los mecanismos de inhibición que inactivan sus dominios catalíticos.

Estos resultados pueden tener claras implicaciones en todas las cascadas de señalización en las que está implicada GSK-3, así como en procesos neurodegenerativos como la epilepsia o la enfermedad de Alzheimer, procesos donde también está alterada la actividad de la calpaína.

Un modelo muy usado para estudiar neurodegeneración es un modelo de epilepsia inducida por inyección de kainato intraperitonealmente en ratas. En este modelo se observa una activación de la calpaína en el hipocampo (Araujo et al., 2005; Araujo et al., 2008). Nosotros observamos que también se produce truncación de GSK-3 en este modelo de neurodegeneración animal. La truncación de GSK-3 la observamos por *Western blot* tanto en hipocampo como en corteza, acompañada de la truncación de la espectrina, un conocido sustrato de la calpaína. Esta truncación se produce de una

manera dependiente del tiempo de inyección con kainato, si bien es cierto que se observa gran variabilidad entre los distintos animales. También se ensayó la proteólisis de los receptores de NMDA, otro sustrato de la calpaína. Se produjo truncación, pero no fue tan dramática como en el caso de los cultivos primarios. Este hecho es esperable, primero, porque se trata de extractos de tejido, mientras que en el otro caso era un cultivo neuronal donde todas las células eran estimuladas por NMDA; y segundo, porque no es un proceso tan directo, ya que el kainato está actuando sobre los receptores AMPA/ KA y no sobre los receptores de NMDA (Araujo et al., 2008).

Por otro lado, cuando la truncación de GSK-3 es analizada por inmunohistoquímica, observamos disminución de los niveles de GSK-3 en la zona CA1 del hipocampo en los animales tratados con kainato. Justamente en esta zona es donde observamos que se produce la truncación de la espectrina. Estos datos también correlacionan con lo observado con la tinción con Fluoro Jade, que tiñe neurodegeneración, la cual se observa principalmente en CA1 y más débilmente en CA3 del hipocampo.

Sin embargo, en este modelo también observamos neurodegeneración mediante la tinción con Fluoro Jade en corteza, pero no observamos degradación de GSK-3 ni truncación de espectrina por técnicas inmunohistoquímicas en esta estructura, aunque sí la detectamos por *Western blot*. La activación de la calpaína tiene lugar en el hipocampo y la activación de caspasas, en la corteza (Araujo et al., 2008). La acción de las caspasas en la corteza también podría explicar la neurodegeneración observada por la tinción con Fluoro Jade. Sin embargo observamos, mediante *Western blot*, que la calpaína también está activa en la corteza, ya que trunca a su sustrato espectrina generando dos bandas de 145 y 150 kDa, características de la acción de la calpaína sobre la espectrina (Siman et al., 1984; Nixon, 1986). Mientras que si fuesen las caspasas las que actúan sobre la espectrina debería obtenerse una banda de 120 kDa (Nath et al., 1996; Pike et al., 1998; Nath et al., 2000b).

Tras observar que la truncación de GSK-3 se produce en un modelo animal de neurodegeneración, nos propusimos estudiar si también existía truncación de GSK-3 en muestras humanas y especialmente en la enfermedad de Alzheimer.

Un primer paso ha consistido en analizar *in vitro* y con extractos humanos si se produce dicha truncación y, en segundo lugar, analizar el efecto que el tiempo *post-mortem* tiene sobre la misma.

Así, hemos observado, al igual que en muestras murinas, la truncación de GSK-3 dependiente de calcio en muestras humanas. GSK-3 fue truncada en muestras humanas expuestas a calcio, generando los dos fragmentos observados previamente, de 40 y 30 kDa respectivamente. Este proceso fue inhibido por calpeptina, inhibidor de la calpaína. También estudiamos si GSK-3 era truncada en muestras *post-mortem*, y el efecto del tiempo *post-mortem* en esta proteólisis. La calpaína parece estar involucrada en la generación *post-mortem* de los fragmentos proteolíticos de GSK-3, aunque este proceso no tiene lugar durante las primeras horas de tiempo *post-mortem*.

En estudios previos (Li et al., 2005) en los que analizaron la degradación *post-mortem* de GSK-3, no observaron variación en los niveles de ésta en los primeros 30 minutos, aunque sí que observaron una rápida desfosforilación de GSK-3. Nosotros también demostramos que la truncación de GSK-3 no es un proceso que se produzca rápidamente, aunque observamos que la desfosforilación es un proceso más lento de lo descrito previamente. En nuestro caso no se observa desfosforilación hasta las tres horas. Estas diferencias se pueden explicar por el protocolo *post-mortem* seguido.

También analizamos el estado de otros sustratos de la calpaína. Comprobamos que p35 es más rápidamente truncada que GSK-3 en muestras de ratón *post-mortem*. Este suceso podría ser explicado por varias hipótesis. Por un lado, como ya ha sido expuesto anteriormente, GSK-3 puede encontrarse formando complejos multiproteicos, por ejemplo unido a la axina y a APC, unido a las proteínas 14-3-3 o a otras proteínas. En este caso, la calpaína no podría acceder a GSK-3, y ésta se encontraría protegida de ser degradada por la proteasa. Por otro lado, las calpaínas se encuentran en el citosol, pero se translocan a las membranas en respuesta a calcio (Sheppard et al., 1991), de tal forma que las proteínas asociadas a la membrana son más susceptibles que las citosólicas a la proteólisis por la calpaína (Jiang et al., 2007). Así, teniendo en cuenta que p35-CDK-5 es un complejo asociado a la membrana (Kusakawa et al., 2000), y GSK-3 es principalmente una enzima citosólica, podría ser que p35 fuese más accesible a la calpaína que GSK-3. Finalmente, podría ser que p35 fuese mejor sustrato que GSK-3, sin excluir la posible contribución de alguna proteasa más.

La razón por la cuál la calpaína es activada en muestras *post-mortem* no ha sido estudiada en este trabajo. Sin embargo, debido a la liberación de calcio de las reservas celulares que tiene lugar durante el período *post-mortem* y su consiguiente activación de calpaína, también observamos degradación de calpastatina, el inhibidor endógeno de la

calpaína, lo que podría explicar la activación de la calpaína en esta situación (Sorimachi et al., 1996).

De nuevo observamos que ambos fragmentos de GSK-3 se generan de forma diferente, lo que podría confirmar que primero se genera el fragmento I, y a partir de éste el fragmento II.

La truncación de GSK-3 no parece ser un proceso que tenga lugar inmediatamente tras la muerte. De hecho, muestras de cerebro humano no muestran truncación significativa de GSK-3 en el intervalo analizado, de tres a siete horas. Estos datos son interesantes para estudiar la implicación de calpaína y GSK-3 en muestras humanas de distintas patologías como en el caso de la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas relacionadas.

En resumen, hemos observado que la truncación de GSK-3 por calpaína también tiene lugar en muestras humanas y que la calpaína no promueve la truncación de GSK-3 en muestras con un largo intervalo de tiempo *post-mortem* (hasta las siete horas). Este último dato nos permite estudiar la implicación de la truncación de GSK-3 de muestras humanas de enfermedades neurodegenerativas, como por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, muestras que suelen tener tiempos *post-mortem* de entre una a siete horas.

Se sabe que la fosforilación aberrante de Tau en Alzheimer es debida a la activación de GSK-3 y/o CDK-5, aunque la conexión y relativa contribución de ambas no está clara. La calpaína induce la truncación y activación de ambas (como hemos demostrado). Por tanto, una desregulación en la homeostasis de calcio, podría llevar a una alteración en la fosforilación de Tau a través del sistema calpaína/GSK-3/CDK-5. De esta forma la calpaína sería el nexo de unión entre ambas quinasas y una alteración de la regulación de la calpaína podría conducir a la fosforilación aberrante de Tau (Fig. 29). Además esto explicaría los altos niveles de calpaína activa encontrados en la enfermedad de Alzheimer (Chong et al., 2005).

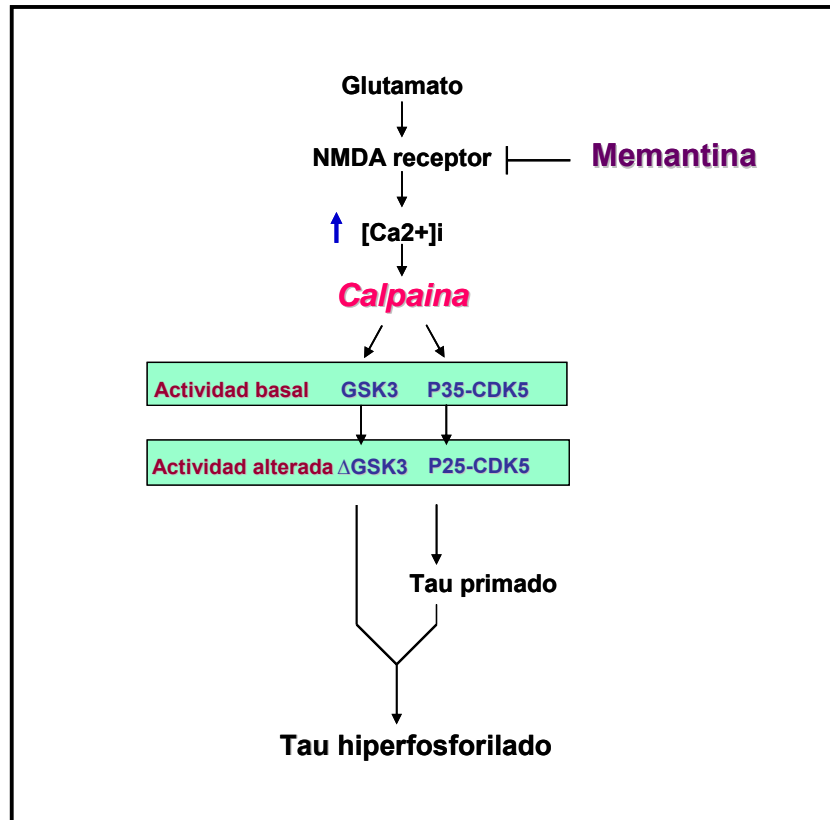


Fig. 29. Diagrama que indica como una alteración en la homeostasis del calcio tras la activación del receptor de NMDA podría contribuir en la activación de sistema calpaína/GSK-3/CDK-5 que podría conducir a la fosforilación aberrante de Tau. La memantina, medicamento utilizado en la enfermedad de Alzheimer, es un antagonista de los receptores de NMDA por lo que inhibe esta vía.

Para dilucidar si realmente la proteólisis de GSK-3 está implicada en la enfermedad de Alzheimer, es importante tener en cuenta el estudio realizado sobre la truncación de GSK-3 durante el período *post-mortem*. Como ya observamos previamente, no se produce truncación de GSK-3 en las primeras siete horas de tiempo *post-mortem*. Así que analizamos las muestras humanas de enfermos de Alzheimer en este intervalo de tiempo. No observamos una diferencia significativa entre las muestras de Alzheimer y las muestras controles, aunque sí detectamos una importante variabilidad entre las distintas muestras. Por otro lado, podría sugerirse una correlación positiva, aunque no significativa, entre la truncación de GSK-3 y la fosforilación de Tau (medida por el anticuerpo PHF-1).

Estos resultados muestran que la truncación de GSK-3 no tiene lugar de una manera clara en los últimos estadios de la enfermedad de Alzheimer (estadio V, ver Tabla 5 de los Materiales y Métodos). Sin embargo, teniendo en cuenta que una

continuada exposición a NMDA en cultivos primarios de neuronas no produce acumulación del fragmento de truncación de GSK-3 (Fig. 15), podría pensarse que la truncación de GSK-3 podría tener lugar en los primeros estadios de la enfermedad, no siendo sorprendente no encontrar la forma truncada en muestras de las últimas etapas de la enfermedad de Alzheimer.

En cultivos primarios de neuronas hemos observado que los niveles de GSK-3 pueden ser regulados por memantina. La memantina es un inhibidor de los receptores de NMDA y un medicamento usado en la enfermedad de Alzheimer. La memantina fue capaz de inhibir la truncación de GSK-3 inducida por la estimulación de los receptores de NMDA en cultivos primarios de neuronas. Merece la pena señalar que los valores de IC_{50} obtenidos para la inhibición por memantina de la truncación de GSK-3, son similares a los obtenidos en el caso de p35 y espectrina, ambas proteínas bien conocidos sustratos de la calpaína. Estos datos sugieren que los efectos observados de la memantina pueden ser explicados por la inhibición de la activación de la calpaína.

Por tanto, los fragmentos de GSK-3 no se acumulan significativamente en muestras *post-mortem* de la enfermedad de Alzheimer, aunque la memantina, un antagonista de los receptores de NMDA, el cual ha sido aprobado para el tratamiento de pacientes en estadios intermedios de la enfermedad, es capaz de inhibir la truncación de GSK-3 inducida por NMDA en cultivos primarios de neuronas de una manera dependiente de la dosis (Fig. 29). Así, teniendo en cuenta nuestros resultados podría sugerirse que la truncación de GSK-3 quizás tenga lugar en los primeros estadios de la enfermedad y no en los últimos.

En resumen, en este trabajo demostramos por primera vez, que la calpaína origina la truncación del extremo amino terminal de GSK-3 dando lugar a un fragmento catalíticamente activo. Este proceso puede tener implicaciones en cascadas de señalización, así como ser activado por estimulación glutamatérgica a través de los receptores de NMDA. Además, nuestros datos sugieren que la truncación de GSK-3 podría tener importancia en enfermedades neurodegenerativas como la epilepsia y el Alzheimer.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. La calpaína corta a las quinasas GSK-3 α y GSK-3 β en el extremo N-terminal.
2. La truncación de GSK-3 por calpaína genera dos fragmentos. El fragmento I presenta diferente peso molecular para cada isoforma, mientras que el fragmento II tiene idéntico tamaño (30 kDa).
3. Las formas truncadas de GSK-3 son formas catalíticamente activas e inhibibles por litio.
4. Cuando se sobrexpresas el fragmento II de la GSK-3 β en cultivos celulares presenta una localización preferentemente citoplasmática.
5. La unión de la proteína 14-3-3 ζ a GSK-3 no tiene lugar en las formas truncadas.
6. La estimulación de neuronas corticales con ionomicina, glutamato y NMDA produce truncación de GSK-3 a través de la activación de calpaína.
7. Se observa activación de la calpaína y consiguiente truncación de GSK-3 en un modelo de rata de epilepsia.
8. Aunque se observa un ligero incremento en la truncación de GSK-3 en muestras humanas de pacientes de Alzheimer, dicho incremento no es estadísticamente significativo.
9. La memantina, medicamento utilizado en el tratamiento de enfermos de Alzheimer, es capaz de inhibir la truncación de GSK-3 por calpaína en neuronas tratadas con NMDA.
10. **CONCLUSIÓN FINAL:** Todos estos datos proporcionan un nuevo papel a la calpaína en la regulación de la GSK-3 y describen una nueva forma de regulación de esta quinasa.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abe K, Takeichi M (2007) NMDA-receptor activation induces calpain-mediated beta-catenin cleavages for triggering gene expression. *Neuron* 53:387-397.
- Adamec E, Mercken M, Beermann ML, Didier M, Nixon RA (1997) Acute rise in the concentration of free cytoplasmic calcium leads to dephosphorylation of the microtubule-associated protein tau. *Brain Res* 757:93-101.
- Agarwal-Mawal A, Qureshi HY, Cafferty PW, Yuan Z, Han D, Lin R, Paudel HK (2003) 14-3-3 connects glycogen synthase kinase-3 beta to tau within a brain microtubule-associated tau phosphorylation complex. *J Biol Chem* 278:12722-12728.
- Ahmad-Annur A, Ciani L, Simeonidis I, Herreros J, Fredj NB, Rosso SB, Hall A, Brickley S, Salinas PC (2006) Signaling across the synapse: a role for Wnt and Dishevelled in presynaptic assembly and neurotransmitter release. *J Cell Biol* 174:127-139.
- Alt JR, Cleveland JL, Hannink M, Diehl JA (2000) Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation. *Genes Dev* 14:3102-3114.
- Alvarez G, Munoz-Montano JR, Satrustegui J, Avila J, Bogonez E, Diaz-Nido J (1999) Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. *FEBS Lett* 453:260-264.
- Araujo IM, Xapelli S, Gil JM, Mohapel P, Petersen A, Pinheiro PS, Malva JO, Bahr BA, Brundin P, Carvalho CM (2005) Proteolysis of NR2B by calpain in the hippocampus of epileptic rats. *Neuroreport* 16:393-396.
- Araujo IM, Gil JM, Carreira BP, Mohapel P, Petersen A, Pinheiro PS, Soulet D, Bahr BA, Brundin P, Carvalho CM (2008) Calpain activation is involved in early caspase-independent neurodegeneration in the hippocampus following status epilepticus. *J Neurochem* 105:666-676.
- Arthur JS, Elce JS, Hegadorn C, Williams K, Greer PA (2000) Disruption of the murine calpain small subunit gene, *Capn4*: calpain is essential for embryonic development but not for cell growth and division. *Mol Cell Biol* 20:4474-4481.
- Azam M, Andrabi SS, Sahr KE, Kamath L, Kuliopulos A, Chishti AH (2001) Disruption of the mouse mu-calpain gene reveals an essential role in platelet function. *Mol Cell Biol* 21:2213-2220.
- Bachmair A, Finley D, Varshavsky A (1986) In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* 234:179-186.
- Banker GA, Cowan WM (1977) Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res* 126:397-342.

- Beals CR, Sheridan CM, Turck CW, Gardner P, Crabtree GR (1997) Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science* 275:1930-1934.
- Benedito AB, Lehtinen M, Massol R, Lopes UG, Kirchhausen T, Rao A, Bonni A (2005) The transcription factor NFAT3 mediates neuronal survival. *J Biol Chem* 280:2818-2825.
- Beurel E, Jope RS (2006) The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Prog Neurobiol* 79:173-189.
- Beurel E, Kornprobst M, Blivet-Van Eggelpoel MJ, Ruiz-Ruiz C, Cadoret A, Capeau J, Desbois-Mouthon C (2004) GSK-3beta inhibition by lithium confers resistance to chemotherapy-induced apoptosis through the repression of CD95 (Fas/APO-1) expression. *Exp Cell Res* 300:354-364.
- Bevers MB, Neumar RW (2008) Mechanistic role of calpains in postischemic neurodegeneration. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:655-673.
- Bhat R, Xue Y, Berg S, Hellberg S, Ormo M, Nilsson Y, Radesater AC, Jerning E, Markgren PO, Borgegard T, Nylof M, Gimenez-Cassina A, Hernandez F, Lucas JJ, Diaz-Nido J, Avila J (2003) Structural insights and biological effects of glycogen synthase kinase 3-specific inhibitor AR-A014418. *J Biol Chem* 278:45937-45945.
- Bijur GN, Jope RS (2000) Opposing actions of phosphatidylinositol 3-kinase and glycogen synthase kinase-3beta in the regulation of HSF-1 activity. *J Neurochem* 75:2401-2408.
- Bijur GN, Jope RS (2001) Proapoptotic stimuli induce nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 beta. *J Biol Chem* 276:37436-37442.
- Bijur GN, Jope RS (2003) Glycogen synthase kinase-3 beta is highly activated in nuclei and mitochondria. *Neuroreport* 14:2415-2419.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Bullock BP, Habener JF (1998) Phosphorylation of the cAMP response element binding protein CREB by cAMP-dependent protein kinase A and glycogen synthase kinase-3 alters DNA-binding affinity, conformation, and increases net charge. *Biochemistry* 37:3795-3809.
- Carmichael J, Sugars KL, Bao YP, Rubinsztein DC (2002) Glycogen synthase kinase-3beta inhibitors prevent cellular polyglutamine toxicity caused by the Huntington's disease mutation. *J Biol Chem* 277:33791-33798.
- Ciechanover A, Schwartz AL (1989) How are substrates recognized by the ubiquitin-mediated proteolytic system? *Trends Biochem Sci* 14:483-488.
- Cohen P (1985) The role of protein phosphorylation in the hormonal control of enzyme activity. *Eur J Biochem* 151:439-448.
- Cohen P, Goedert M (2004) GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 3:479-487.

- Cole A, Frame S, Cohen P (2004) Further evidence that the tyrosine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in mammalian cells is an autophosphorylation event. *Biochem J* 377:249-255.
- Cole AR, Astell A, Green C, Sutherland C (2007) Molecular connexions between dementia and diabetes. *Neurosci Biobehav Rev* 31:1046-1063.
- Crabtree GR, Olson EN (2002) NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* 109 Suppl:S67-79.
- Crowder RJ, Freeman RS (2000) Glycogen synthase kinase-3 beta activity is critical for neuronal death caused by inhibiting phosphatidylinositol 3-kinase or Akt but not for death caused by nerve growth factor withdrawal. *J Biol Chem* 275:34266-34271.
- Cuevas BD, Abell AN, Witowsky JA, Yujiri T, Johnson NL, Kesavan K, Ware M, Jones PL, Weed SA, DeBiasi RL, Oka Y, Tyler KL, Johnson GL (2003) MEKK1 regulates calpain-dependent proteolysis of focal adhesion proteins for rear-end detachment of migrating fibroblasts. *Embo J* 22:3346-3355.
- Czogalla A, Sikorski AF (2005) Spectrin and calpain: a 'target' and a 'sniper' in the pathology of neuronal cells. *Cell Mol Life Sci* 62:1913-1924.
- Chadborn NH, Ahmed AI, Holt MR, Prinjha R, Dunn GA, Jones GE, Eickholt BJ (2006) PTEN couples Sema3A signalling to growth cone collapse. *J Cell Sci* 119:951-957.
- Cho JH, Johnson GV (2003) Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylates tau at both primed and unprimed sites. Differential impact on microtubule binding. *J Biol Chem* 278:187-193.
- Choi DW (1992) Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 23:1261-1276.
- Chong ZZ, Li F, Maiese K (2005) Stress in the brain: novel cellular mechanisms of injury linked to Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev* 49:1-21.
- Chu B, Soncin F, Price BD, Stevenson MA, Calderwood SK (1996) Sequential phosphorylation by mitogen-activated protein kinase and glycogen synthase kinase 3 represses transcriptional activation by heat shock factor-1. *J Biol Chem* 271:30847-30857.
- Dajani R, Fraser E, Roe SM, Young N, Good V, Dale TC, Pearl LH (2001) Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. *Cell* 105:721-732.
- Dayton WR, Reville WJ, Goll DE, Stromer MH (1976a) A Ca²⁺-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Partial characterization of the purified enzyme. *Biochemistry* 15:2159-2167.
- Dayton WR, Goll DE, Zeece MG, Robson RM, Reville WJ (1976b) A Ca²⁺-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Purification from porcine muscle. *Biochemistry* 15:2150-2158.

- De Sarno P, Bijur GN, Zmijewska AA, Li X, Jope RS (2006) In vivo regulation of GSK3 phosphorylation by cholinergic and NMDA receptors. *Neurobiol Aging* 27:413-422.
- del Cerro S, Arai A, Kessler M, Bahr BA, Vanderklish P, Rivera S, Lynch G (1994) Stimulation of NMDA receptors activates calpain in cultured hippocampal slices. *Neurosci Lett* 167:149-152.
- Del Rio JA, Gonzalez-Billault C, Urena JM, Jimenez EM, Barallobre MJ, Pascual M, Pujadas L, Simo S, La Torre A, Wandosell F, Avila J, Soriano E (2004) MAP1B is required for Netrin 1 signaling in neuronal migration and axonal guidance. *Curr Biol* 14:840-850.
- DeMartino GN, Wachendorfer R, McGuire MJ, Croall DE (1988) Proteolysis of the protein inhibitor of calcium-dependent proteases produces lower molecular weight fragments that retain inhibitory activity. *Arch Biochem Biophys* 262:189-198.
- Denny JB, Polan-Curtain J, Ghuman A, Wayner MJ, Armstrong DL (1990) Calpain inhibitors block long-term potentiation. *Brain Res* 534:317-320.
- DePaoli-Roach AA (1984) Synergistic phosphorylation and activation of ATP-Mg-dependent phosphoprotein phosphatase by F A/GSK-3 and casein kinase II (PC0.7). *J Biol Chem* 259:12144-12152.
- Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ (1998) Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 12:3499-3511.
- Dill J, Wang H, Zhou F, Li S (2008) Inactivation of glycogen synthase kinase 3 promotes axonal growth and recovery in the CNS. *J Neurosci* 28:8914-8928.
- Ding Q, Xia W, Liu JC, Yang JY, Lee DF, Xia J, Bartholomeusz G, Li Y, Pan Y, Li Z, Bargou RC, Qin J, Lai CC, Tsai FJ, Tsai CH, Hung MC (2005) Erk associates with and primes GSK-3beta for its inactivation resulting in upregulation of beta-catenin. *Mol Cell* 19:159-170.
- Dominguez I, Itoh K, Sokol SY (1995) Role of glycogen synthase kinase 3 beta as a negative regulator of dorsoventral axis formation in *Xenopus* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8498-8502.
- Du J, Gray NA, Falke CA, Chen W, Yuan P, Szabo ST, Einat H, Manji HK (2004) Modulation of synaptic plasticity by antimanic agents: the role of AMPA glutamate receptor subunit 1 synaptic expression. *J Neurosci* 24:6578-6589.
- Du J, Suzuki K, Wei Y, Wang Y, Blumenthal R, Chen Z, Falke C, Zarate CA, Jr., Manji HK (2007) The anticonvulsants lamotrigine, riluzole, and valproate differentially regulate AMPA receptor membrane localization: relationship to clinical effects in mood disorders. *Neuropsychopharmacology* 32:793-802.
- Dutt P, Croall DE, Arthur JS, Veyra TD, Williams K, Elce JS, Greer PA (2006) m-Calpain is required for preimplantation embryonic development in mice. *BMC Dev Biol* 6:3.

- Embi N, Rylatt DB, Cohen P (1980) Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem* 107:519-527.
- Engel T, Hernandez F, Avila J, Lucas JJ (2006a) Full reversal of Alzheimer's disease-like phenotype in a mouse model with conditional overexpression of glycogen synthase kinase-3. *J Neurosci* 26:5083-5090.
- Engel T, Goni-Oliver P, Lucas JJ, Avila J, Hernandez F (2006b) Chronic lithium administration to FTDP-17 tau and GSK-3beta overexpressing mice prevents tau hyperphosphorylation and neurofibrillary tangle formation, but pre-formed neurofibrillary tangles do not revert. *J Neurochem* 99:1445-1455.
- Engel T, Lucas JJ, Gomez-Ramos P, Moran MA, Avila J, Hernandez F (2006c) Coexpression of FTDP-17 tau and GSK-3beta in transgenic mice induce tau polymerization and neurodegeneration. *Neurobiol Aging* 27:1258-1268.
- Engel T, Goni-Oliver P, Gomez de Barreda E, Lucas JJ, Hernandez F, Avila J (2008) Lithium, a potential protective drug in Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis* 5:247-249.
- Fleming LM, Johnson GV (1995) Modulation of the phosphorylation state of tau in situ: the roles of calcium and cyclic AMP. *Biochem J* 309 (Pt 1):41-47.
- Frame S, Cohen P (2001) GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* 359:1-16.
- Franca-Koh J, Yeo M, Fraser E, Young N, Dale TC (2002) The regulation of glycogen synthase kinase-3 nuclear export by Frat/GBP. *J Biol Chem* 277:43844-43848.
- Franco SJ, Huttenlocher A (2005) Regulating cell migration: calpains make the cut. *J Cell Sci* 118:3829-3838.
- Friedrich P (2004) The intriguing Ca²⁺ requirement of calpain activation. *Biochem Biophys Res Commun* 323:1131-1133.
- Garrido JJ, Simon D, Varea O, Wandosell F (2007) GSK3 alpha and GSK3 beta are necessary for axon formation. *FEBS Lett* 581:1579-1586.
- Gil-Parrado S, Popp O, Knoch TA, Zahler S, Bestvater F, Felgentrager M, Holloschi A, Fernandez-Montalvan A, Auerswald EA, Fritz H, Fuentes-Prior P, Machleidt W, Spiess E (2003) Subcellular localization and in vivo subunit interactions of ubiquitous mu-calpain. *J Biol Chem* 278:16336-16346.
- Gluzman Y (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23:175-182.
- Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J (2003) The calpain system. *Physiol Rev* 83:731-801.

- Gomez-Sintes R, Hernandez F, Bortolozzi A, Artigas F, Avila J, Zaratin P, Gotteland JP, Lucas JJ (2007) Neuronal apoptosis and reversible motor deficit in dominant-negative GSK-3 conditional transgenic mice. *Embo J* 26:2743-2754.
- Goodman JH (1998) Experimental models of status epilepticus. In: *Neuropharmacology Methods In Epilepsy Research* (Peterson SL, ed), pp 95–125: CRC Press, Boca Raton.
- Graham-Siegenthaler K, Gauthier S, Davies PL, Elce JS (1994) Active recombinant rat calpain II. Bacterially produced large and small subunits associate both in vivo and in vitro. *J Biol Chem* 269:30457-30460.
- Grammer M, Kuchay S, Chishti A, Baudry M (2005) Lack of phenotype for LTP and fear conditioning learning in calpain 1 knock-out mice. *Neurobiol Learn Mem* 84:222-227.
- Greenberg SG, Davies P, Schein JD, Binder LI (1992) Hydrofluoric acid-treated tau PHF proteins display the same biochemical properties as normal tau. *J Biol Chem* 267:564-569.
- Grimes CA, Jope RS (2001) The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog Neurobiol* 65:391-426.
- Guroff G (1964) A Neutral, Calcium-Activated Proteinase from the Soluble Fraction of Rat Brain. *J Biol Chem* 239:149-155.
- Guttman RP, Baker DL, Seifert KM, Cohen AS, Coulter DA, Lynch DR (2001) Specific proteolysis of the NR2 subunit at multiple sites by calpain. *J Neurochem* 78:1083-1093.
- Hajimohammadreza I, Raser KJ, Nath R, Nadimpalli R, Scott M, Wang KK (1997) Neuronal nitric oxide synthase and calmodulin-dependent protein kinase IIalpha undergo neurotoxin-induced proteolysis. *J Neurochem* 69:1006-1013.
- Hartigan JA, Xiong WC, Johnson GV (2001) Glycogen synthase kinase 3beta is tyrosine phosphorylated by PYK2. *Biochem Biophys Res Commun* 284:485-489.
- Hashiguchi M, Sobue K, Paudel HK (2000) 14-3-3zeta is an effector of tau protein phosphorylation. *J Biol Chem* 275:25247-25254.
- Hata S, Sorimachi H, Nakagawa K, Maeda T, Abe K, Suzuki K (2001) Domain II of m-calpain is a Ca(2+)-dependent cysteine protease. *FEBS Lett* 501:111-114.
- He B, Meng YH, Mivechi NF (1998) Glycogen synthase kinase 3beta and extracellular signal-regulated kinase inactivate heat shock transcription factor 1 by facilitating the disappearance of transcriptionally active granules after heat shock. *Mol Cell Biol* 18:6624-6633.
- He X, Saint-Jeannet JP, Woodgett JR, Varmus HE, Dawid IB (1995) Glycogen synthase kinase-3 and dorsoventral patterning in *Xenopus* embryos. *Nature* 374:617-622.
- Hermann BP, Seidenberg M, Schoenfeld J, Davies K (1997) Neuropsychological characteristics of the syndrome of mesial temporal lobe epilepsy. *Arch Neurol* 54:369-376.

- Hernandez F, Avila J (2008) The role of glycogen synthase kinase 3 in the early stages of Alzheimer's disease. *FEBS Lett* 582:3848-3854.
- Hernandez 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* 83:1529-1533.
- Hernandez F, Gomez-Ramos A, Goni-Oliver P, Avila J, Villanueva N (2008) Role of polyglycine repeats in the regulation of glycogen synthase kinase activity. *Protein Pept Lett* 15:586-589.
- Hernandez F, Perez M, Lucas JJ, Mata AM, Bhat R, Avila J (2004) Glycogen synthase kinase-3 plays a crucial role in tau exon 10 splicing and intranuclear distribution of SC35. Implications for Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 279:3801-3806.
- Hetman M, Cavanaugh JE, Kimelman D, Xia Z (2000) Role of glycogen synthase kinase-3beta in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal. *J Neurosci* 20:2567-2574.
- Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett JR (2000) Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature* 406:86-90.
- Hongisto V, Vainio JC, Thompson R, Courtney MJ, Coffey ET (2008) The Wnt pool of glycogen synthase kinase 3beta is critical for trophic-deprivation-induced neuronal death. *Mol Cell Biol* 28:1515-1527.
- Hooper C, Killick R, Lovestone S (2008) The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 104:1433-1439.
- Hooper C, Markevich V, Plattner F, Killick R, Schofield E, Engel T, Hernandez F, Anderton B, Rosenblum K, Bliss T, Cooke SF, Avila J, Lucas JJ, Giese KP, Stephenson J, Lovestone S (2007) Glycogen synthase kinase-3 inhibition is integral to long-term potentiation. *Eur J Neurosci* 25:81-86.
- Hosfield CM, Elce JS, Davies PL, Jia Z (1999a) Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca(2+)-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation. *Embo J* 18:6880-6889.
- Hosfield CM, Ye Q, Arthur JS, Hegadorn C, Croall DE, Elce JS, Jia Z (1999b) Crystallization and X-ray crystallographic analysis of m-calpain, a Ca2+-dependent protease. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55:1484-1486.
- Hoshi M, Takashima A, Noguchi K, Murayama M, Sato M, Kondo S, Saitoh Y, Ishiguro K, Hoshino T, Imahori K (1996) Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2719-2723.
- Hughes K, Nikolakaki E, Plyte SE, Totty NF, Woodgett JR (1993) Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *Embo J* 12:803-808.
- Imajoh S, Suzuki K (1985) Reversible interaction between Ca2+-activated neutral protease (CANP) and its endogenous inhibitor. *FEBS Lett* 187:47-50.

- Jiang H, Guo W, Liang X, Rao Y (2005) Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: critical roles of GSK-3 β and its upstream regulators. *Cell* 120:123-135.
- Jiang SX, Kappler J, Zurakowski B, Desbois A, Aylsworth A, Hou ST (2007) Calpain cleavage of collapsin response mediator proteins in ischemic mouse brain. *Eur J Neurosci* 26:801-809.
- Jonkers J, Korswagen HC, Acton D, Breuer M, Berns A (1997) Activation of a novel proto-oncogene, *Frat1*, contributes to progression of mouse T-cell lymphomas. *Embo J* 16:441-450.
- Jope RS, Johnson GV (2004) The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci* 29:95-102.
- Kapprell HP, Goll DE (1989) Effect of Ca²⁺ on binding of the calpains to calpastatin. *J Biol Chem* 264:17888-17896.
- Khaleque MA, Bharti A, Sawyer D, Gong J, Benjamin IJ, Stevenson MA, Calderwood SK (2005) Induction of heat shock proteins by heregulin beta1 leads to protection from apoptosis and anchorage-independent growth. *Oncogene* 24:6564-6573.
- Kim L, Kimmel AR (2006) GSK3 at the edge: regulation of developmental specification and cell polarization. *Curr Drug Targets* 7:1411-1419.
- Kim L, Liu J, Kimmel AR (1999) The novel tyrosine kinase ZAK1 activates GSK3 to direct cell fate specification. *Cell* 99:399-408.
- Kim WY, Zhou FQ, Zhou J, Yokota Y, Wang YM, Yoshimura T, Kaibuchi K, Woodgett JR, Anton ES, Snider WD (2006) Essential roles for GSK-3 α and GSK-3 β -primed substrates in neurotrophin-induced and hippocampal axon growth. *Neuron* 52:981-996.
- King TD, Bijur GN, Jope RS (2001) Caspase-3 activation induced by inhibition of mitochondrial complex I is facilitated by glycogen synthase kinase-3 β and attenuated by lithium. *Brain Res* 919:106-114.
- King TD, Clodfelder-Miller B, Barksdale KA, Bijur GN (2008) Unregulated mitochondrial GSK3 β activity results in NADH: ubiquinone oxidoreductase deficiency. *Neurotox Res* 14:367-382.
- Kishimoto A, Mikawa K, Hashimoto K, Yasuda I, Tanaka S, Tominaga M, Kuroda T, Nishizuka Y (1989) Limited proteolysis of protein kinase C subspecies by calcium-dependent neutral protease (calpain). *J Biol Chem* 264:4088-4092.
- Kusakawa G, Saito T, Onuki R, Ishiguro K, Kishimoto T, Hisanaga S (2000) Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator to p25. *J Biol Chem* 275:17166-17172.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

- Lau KF, Miller CC, Anderton BH, Shaw PC (1999a) Molecular cloning and characterization of the human glycogen synthase kinase-3beta promoter. *Genomics* 60:121-128.
- Lau KF, Miller CC, Anderton BH, Shaw PC (1999b) Expression analysis of glycogen synthase kinase-3 in human tissues. *J Pept Res* 54:85-91.
- Lee MS, Kwon YT, Li M, Peng J, Friedlander RM, Tsai LH (2000) Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature* 405:360-364.
- Leroy K, Brion JP (1999) Developmental expression and localization of glycogen synthase kinase-3beta in rat brain. *J Chem Neuroanat* 16:279-293.
- Lesort M, Jope RS, Johnson GV (1999) Insulin transiently increases tau phosphorylation: involvement of glycogen synthase kinase-3beta and Fyn tyrosine kinase. *J Neurochem* 72:576-584.
- Letty S, Lerner-Natoli M, Rondouin G (1995) Differential impairments of spatial memory and social behavior in two models of limbic epilepsy. *Epilepsia* 36:973-982.
- Li L, Yuan H, Weaver CD, Mao J, Farr GH, 3rd, Sussman DJ, Jonkers J, Kimelman D, Wu D (1999) Axin and Frat1 interact with dvl and GSK, bridging Dvl to GSK in Wnt-mediated regulation of LEF-1. *Embo J* 18:4233-4240.
- Li PA, Howlett W, He QP, Miyashita H, Siddiqui M, Shuaib A (1998) Postischemic treatment with calpain inhibitor MDL 28170 ameliorates brain damage in a gerbil model of global ischemia. *Neurosci Lett* 247:17-20.
- Li T, Paudel HK (2007) 14-3-3zeta facilitates GSK3beta-catalyzed tau phosphorylation in HEK-293 cells by a mechanism that requires phosphorylation of GSK3beta on Ser9. *Neurosci Lett* 414:203-208.
- Li T, Hawkes C, Qureshi HY, Kar S, Paudel HK (2006) Cyclin-dependent protein kinase 5 primes microtubule-associated protein tau site-specifically for glycogen synthase kinase 3beta. *Biochemistry* 45:3134-3145.
- Li X, Friedman AB, Roh MS, Jope RS (2005) Anesthesia and post-mortem interval profoundly influence the regulatory serine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 in mouse brain. *J Neurochem* 92:701-704.
- Linseman DA, Butts BD, Precht TA, Phelps RA, Le SS, Laessig TA, Bouchard RJ, Florez-McClure ML, Heidenreich KA (2004) Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylates Bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis. *J Neurosci* 24:9993-10002.
- Liu J, Liu MC, Wang KK (2008) Calpain in the CNS: from synaptic function to neurotoxicity. *Sci Signal* 1:re1.
- Liu SJ, Zhang AH, Li HL, Wang Q, Deng HM, Netzer WJ, Xu H, Wang JZ (2003) Overactivation of glycogen synthase kinase-3 by inhibition of phosphoinositol-3 kinase and protein kinase C leads to hyperphosphorylation of tau and impairment of spatial memory. *J Neurochem* 87:1333-1344.

- Liu Y, Dore J, Chen X (2007) Calcium influx through L-type channels generates protein kinase M to induce burst firing of dopamine cells in the rat ventral tegmental area. *J Biol Chem* 282:8594-8603.
- Lochhead PA, Kinstrie R, Sibbet G, Rawjee T, Morrice N, Cleghon V (2006) A chaperone-dependent GSK3beta transitional intermediate mediates activation-loop autophosphorylation. *Mol Cell* 24:627-633.
- Lovestone S, Reynolds CH, Latimer D, Davis DR, Anderton BH, Gallo JM, Hanger D, Mulot S, Marquardt B, Stabel S, et al. (1994) Alzheimer's disease-like phosphorylation of the microtubule-associated protein tau by glycogen synthase kinase-3 in transfected mammalian cells. *Curr Biol* 4:1077-1086.
- Lu X, Wyszynski M, Sheng M, Baudry M (2001) Proteolysis of glutamate receptor-interacting protein by calpain in rat brain: implications for synaptic plasticity. *J Neurochem* 77:1553-1560.
- Lucas JJ, Hernandez F, Gomez-Ramos P, Moran MA, Hen R, Avila J (2001) Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *Embo J* 20:27-39.
- Maki M, Takano E, Mori H, Sato A, Murachi T, Hatanaka M (1987) All four internally repetitive domains of pig calpastatin possess inhibitory activities against calpains I and II. *FEBS Lett* 223:174-180.
- Mao Y, Ge X, Frank CL, Madison JM, Koehler AN, Doud MK, Tassa C, Berry EM, Soda T, Singh KK, Biechele T, Petryshen TL, Moon RT, Haggarty SJ, Tsai LH (2009) Disrupted in schizophrenia 1 regulates neuronal progenitor proliferation via modulation of GSK3beta/beta-catenin signaling. *Cell* 136:1017-1031.
- Maurer U, Charvet C, Wagman AS, Dejardin E, Green DR (2006) Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Mol Cell* 21:749-760.
- Meares GP, Jope RS (2007) Resolution of the nuclear localization mechanism of glycogen synthase kinase-3: functional effects in apoptosis. *J Biol Chem* 282:16989-17001.
- Mikati MA, Tarif S, Lteif L, Jawad MA (2001) Time sequence and types of memory deficits after experimental status epilepticus. *Epilepsy Res* 43:97-101.
- Moldoveanu T, Campbell RL, Cuerrier D, Davies PL (2004) Crystal structures of calpain-E64 and -leupeptin inhibitor complexes reveal mobile loops gating the active site. *J Mol Biol* 343:1313-1326.
- Moldoveanu T, Hosfield CM, Lim D, Elce JS, Jia Z, Davies PL (2002) A Ca(2+) switch aligns the active site of calpain. *Cell* 108:649-660.
- Moreno FJ, Munoz-Montano JR, Avila J (1996) Glycogen synthase kinase 3 phosphorylation of different residues in the presence of different factors: analysis on tau protein. *Mol Cell Biochem* 165:47-54.

- Mukai F, Ishiguro K, Sano Y, Fujita SC (2002) Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta. *J Neurochem* 81:1073-1083.
- Nath R, Davis M, Probert AW, Kupina NC, Ren X, Schielke GP, Wang KK (2000a) Processing of cdk5 activator p35 to its truncated form (p25) by calpain in acutely injured neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 274:16-21.
- Nath R, Huggins M, Glantz SB, Morrow JS, McGinnis K, Nadimpalli R, Wang KK (2000b) Development and characterization of antibodies specific to caspase-3-produced alpha II-spectrin 120 kDa breakdown product: marker for neuronal apoptosis. *Neurochem Int* 37:351-361.
- Nath R, Raser KJ, Stafford D, Hajimohammadreza I, Posner A, Allen H, Talanian RV, Yuen P, Gilbertsen RB, Wang KK (1996) Non-erythroid alpha-spectrin breakdown by calpain and interleukin 1 beta-converting-enzyme-like protease(s) in apoptotic cells: contributory roles of both protease families in neuronal apoptosis. *Biochem J* 319 (Pt 3):683-690.
- Nicholson AM, Ferreira A (2009) Increased membrane cholesterol might render mature hippocampal neurons more susceptible to beta-amyloid-induced calpain activation and tau toxicity. *J Neurosci* 29:4640-4651.
- Nishihara H, Nakagawa Y, Ishikawa H, Ohba M, Shimizu K, Nakamura T (2001) Matrix vesicles and media vesicles as nonclassical pathways for the secretion of m-Calpain from MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 285:845-853.
- Nixon RA (1986) Fodrin degradation by calcium-activated neutral proteinase (CANP) in retinal ganglion cell neurons and optic glia: preferential localization of CANP activities in neurons. *J Neurosci* 6:1264-1271.
- Noble W, Olm V, Takata K, Casey E, Mary O, Meyerson J, Gaynor K, LaFrancois J, Wang L, Kondo T, Davies P, Burns M, Veeranna, Nixon R, Dickson D, Matsuoka Y, Ahljianian M, Lau LF, Duff K (2003) Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo. *Neuron* 38:555-565.
- Novak M, Jakes R, Edwards PC, Milstein C, Wischik CM (1991) Difference between the tau protein of Alzheimer paired helical filament core and normal tau revealed by epitope analysis of monoclonal antibodies 423 and 7.51. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5837-5841.
- Oliver MW, Baudry M, Lynch G (1989) The protease inhibitor leupeptin interferes with the development of LTP in hippocampal slices. *Brain Res* 505:233-238.
- Onizuka K, Kunimatsu M, Ozaki Y, Muramatsu K, Sasaki M, Nishino H (1995) Distribution of mu-calpain proenzyme in the brain and other neural tissues in the rat. *Brain Res* 697:179-186.
- Osten P, Valsamis L, Harris A, Sacktor TC (1996) Protein synthesis-dependent formation of protein kinase Mzeta in long-term potentiation. *J Neurosci* 16:2444-2451.

- Otsuka Y, Goll DE (1987) Purification of the Ca²⁺-dependent proteinase inhibitor from bovine cardiac muscle and its interaction with the millimolar Ca²⁺-dependent proteinase. *J Biol Chem* 262:5839-5851.
- Pal GP, DeVeyra T, Elce JS, Jia Z (2003a) Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of a mu-like calpain. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59:369-371.
- Pal GP, De Veyra T, Elce JS, Jia Z (2003b) Crystal structure of a micro-like calpain reveals a partially activated conformation with low Ca²⁺ requirement. *Structure* 11:1521-1526.
- Pap M, Cooper GM (2002) Role of translation initiation factor 2B in control of cell survival by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3beta signaling pathway. *Mol Cell Biol* 22:578-586.
- Patzke H, Tsai LH (2002) Calpain-mediated cleavage of the cyclin-dependent kinase-5 activator p39 to p29. *J Biol Chem* 277:8054-8060.
- Peineau S, Bradley C, Taghibiglou C, Doherty A, Bortolotto ZA, Wang YT, 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, Collingridge GL (2007) LTP inhibits LTD in the hippocampus via regulation of GSK3beta. *Neuron* 53:703-717.
- Perez M, Rojo AI, Wandosell F, Diaz-Nido J, Avila J (2003) Prion peptide induces neuronal cell death through a pathway involving glycogen synthase kinase 3. *Biochem J* 372:129-136.
- Pike BR, Zhao X, Newcomb JK, Posmantur RM, Wang KK, Hayes RL (1998) Regional calpain and caspase-3 proteolysis of alpha-spectrin after traumatic brain injury. *Neuroreport* 9:2437-2442.
- Pontremoli S, Viotti PL, Michetti M, Salamino F, Sparatore B, Melloni E (1992) Modulation of inhibitory efficiency of rat skeletal muscle calpastatin by phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 187:751-759.
- Reisberg B, Doody R, Stoffler A, Schmitt F, Ferris S, Mobius HJ (2003) Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 348:1333-1341.
- Reverter D, Strobl S, Fernandez-Catalan C, Sorimachi H, Suzuki K, Bode W (2001) Structural basis for possible calcium-induced activation mechanisms of calpains. *Biol Chem* 382:753-766.
- Rottmann S, Wang Y, Nasoff M, Deveraux QL, Quon KC (2005) A TRAIL receptor-dependent synthetic lethal relationship between MYC activation and GSK3beta/FBW7 loss of function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15195-15200.
- Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S, Polakis P (1996) Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* 272:1023-1026.

- Salamino F, De Tullio R, Michetti M, Mengotti P, Melloni E, Pontremoli S (1994) Modulation of calpastatin specificity in rat tissues by reversible phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 199:1326-1332.
- Sanchez S, Sayas CL, Lim F, Diaz-Nido J, Avila J, Wandosell F (2001) The inhibition of phosphatidylinositol-3-kinase induces neurite retraction and activates GSK3. *J Neurochem* 78:468-481.
- Sansome C, Zaika A, Marchenko ND, Moll UM (2001) Hypoxia death stimulus induces translocation of p53 protein to mitochondria. Detection by immunofluorescence on whole cells. *FEBS Lett* 488:110-115.
- Santa-Maria I, Hernandez F, Del Rio J, Moreno FJ, Avila J (2007) Tramiprosate, a drug of potential interest for the treatment of Alzheimer's disease, promotes an abnormal aggregation of tau. *Mol Neurodegener* 2:17.
- Schaffer B, Wiedau-Pazos M, Geschwind DH (2003) Gene structure and alternative splicing of glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3beta) in neural and non-neural tissues. *Gene* 302:73-81.
- Schmued LC, Albertson C, Slikker W, Jr. (1997) Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain Res* 751:37-46.
- Schwabe RF, Brenner DA (2002) Role of glycogen synthase kinase-3 in TNF-alpha-induced NF-kappaB activation and apoptosis in hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283:G204-211.
- Sengupta A, Wu Q, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Singh TJ (1997) Potentiation of GSK-3-catalyzed Alzheimer-like phosphorylation of human tau by cdk5. *Mol Cell Biochem* 167:99-105.
- Shea TB, Spencer MJ, Beermann ML, Cressman CM, Nixon RA (1996) Calcium influx into human neuroblastoma cells induces ALZ-50 immunoreactivity: involvement of calpain-mediated hydrolysis of protein kinase C. *J Neurochem* 66:1539-1549.
- Sheppard A, Wu J, Bahr BA, Lynch G (1991) Compartmentation and glycoprotein substrates of calpain in the developing rat brain. *Synapse* 9:231-234.
- Shi SH, Cheng T, Jan LY, Jan YN (2004) APC and GSK-3beta are involved in mPar3 targeting to the nascent axon and establishment of neuronal polarity. *Curr Biol* 14:2025-2032.
- Shiraha H, Glading A, Chou J, Jia Z, Wells A (2002) Activation of m-calpain (calpain II) by epidermal growth factor is limited by protein kinase A phosphorylation of m-calpain. *Mol Cell Biol* 22:2716-2727.
- Siman R, Baudry M, Lynch G (1983) Purification from synaptosomal plasma membranes of calpain I, a thiol protease activated by micromolar calcium concentrations. *J Neurochem* 41:950-956.

- Siman R, Baudry M, Lynch G (1984) Brain fodrin: substrate for calpain I, an endogenous calcium-activated protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:3572-3576.
- Simon D, Benitez MJ, Gimenez-Cassina A, Garrido JJ, Bhat RV, Diaz-Nido J, Wandosell F (2008) Pharmacological inhibition of GSK-3 is not strictly correlated with a decrease in tyrosine phosphorylation of residues 216/279. *J Neurosci Res* 86:668-674.
- Simpkins KL, Guttman RP, Dong Y, Chen Z, Sokol S, Neumar RW, Lynch DR (2003) Selective activation induced cleavage of the NR2B subunit by calpain. *J Neurosci* 23:11322-11331.
- Song L, De Sarno P, Jope RS (2002) Central role of glycogen synthase kinase-3beta in endoplasmic reticulum stress-induced caspase-3 activation. *J Biol Chem* 277:44701-44708.
- Song L, Zhou T, Jope RS (2004) Lithium facilitates apoptotic signaling induced by activation of the Fas death domain-containing receptor. *BMC Neurosci* 5:20.
- Sorimachi Y, Harada K, Yoshida K (1996) Involvement of calpain in postmortem proteolysis in the rat brain. *Forensic Sci Int* 81:165-174.
- Stambolic V, Woodgett JR (1994) Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta in intact cells via serine 9 phosphorylation. *Biochem J* 303 (Pt 3):701-704.
- Staubli U, Larson J, Thibault O, Baudry M, Lynch G (1988) Chronic administration of a thiol-proteinase inhibitor blocks long-term potentiation of synaptic responses. *Brain Res* 444:153-158.
- Sutherland C, Leighton IA, Cohen P (1993) Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem J* 296 (Pt 1):15-19.
- Sutula T, Lauersdorf S, Lynch M, Jurgella C, Woodard A (1995) Deficits in radial arm maze performance in kindled rats: evidence for long-lasting memory dysfunction induced by repeated brief seizures. *J Neurosci* 15:8295-8301.
- Szatmari E, Habas A, Yang P, Zheng JJ, Hagg T, Hetman M (2005) A positive feedback loop between glycogen synthase kinase 3beta and protein phosphatase 1 after stimulation of NR2B NMDA receptors in forebrain neurons. *J Biol Chem* 280:37526-37535.
- Takahashi-Yanaga F, Shiraishi F, Hirata M, Miwa Y, Morimoto S, Sasaguri T (2004) Glycogen synthase kinase-3beta is tyrosine-phosphorylated by MEK1 in human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 316:411-415.
- Takahashi M, Tomizawa K, Kato R, Sato K, Uchida T, Fujita SC, Imahori K (1994) Localization and developmental changes of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta in rat brain. *J Neurochem* 63:245-255.
- Takano E, Maki M (1999) Structure of Calpastatin and its Inhibitory Control of Calpain. In: *Calpains: Pharmacology and Toxicology of Calcium-Dependent Protease* (Wang KKW, Yuen P, eds), pp 25-50. Philadelphia: CRC - Taylor & Francis.

- Takashima A, Noguchi K, Sato K, Hoshino T, Imahori K (1993) Tau protein kinase I is essential for amyloid beta-protein-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:7789-7793.
- Takeichi M, Abe K (2005) Synaptic contact dynamics controlled by cadherin and catenins. *Trends Cell Biol* 15:216-221.
- Taniguchi S, Fujita Y, Hayashi S, Kakita A, Takahashi H, Murayama S, Saido TC, Hisanaga S, Iwatsubo T, Hasegawa M (2001) Calpain-mediated degradation of p35 to p25 in postmortem human and rat brains. *FEBS Lett* 489:46-50.
- Tasaki T, Kwon YT (2007) The mammalian N-end rule pathway: new insights into its components and physiological roles. *Trends Biochem Sci* 32:520-528.
- ter Haar E, Coll JT, Austen DA, Hsiao HM, Swenson L, Jain J (2001) Structure of GSK3beta reveals a primed phosphorylation mechanism. *Nat Struct Biol* 8:593-596.
- Thomas GM, Frame S, Goedert M, Nathke I, Polakis P, Cohen P (1999) A GSK3-binding peptide from FRAT1 selectively inhibits the GSK3-catalysed phosphorylation of axin and beta-catenin. *FEBS Lett* 458:247-251.
- Thornton TM, Pedraza-Alva G, Deng B, Wood CD, Aronshtam A, Clements JL, Sabio G, Davis RJ, Matthews DE, Doble B, Rincon M (2008) Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation. *Science* 320:667-670.
- Tompa P, Emori Y, Sorimachi H, Suzuki K, Friedrich P (2001) Domain III of calpain is a Ca^{2+} -regulated phospholipid-binding domain. *Biochem Biophys Res Commun* 280:1333-1339.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350-4354.
- Turk B, Stoka V (2007) Protease signalling in cell death: caspases versus cysteine cathepsins. *FEBS Lett* 581:2761-2767.
- Tzul FO, Kurchan E, Bowler BE (2007) Sequence composition effects on denatured state loop formation in iso-1-cytochrome c variants: polyalanine versus polyglycine inserts. *J Mol Biol* 371:577-584.
- Vanderklish PW, Krushel LA, Holst BH, Gally JA, Crossin KL, Edelman GM (2000) Marking synaptic activity in dendritic spines with a calpain substrate exhibiting fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:2253-2258.
- Varshavsky A (1992) The N-end rule. *Cell* 69:725-735.
- Varshavsky A (1996) The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:12142-12149.
- Vinade L, Petersen JD, Do K, Dosemeci A, Reese TS (2001) Activation of calpain may alter the postsynaptic density structure and modulate anchoring of NMDA receptors. *Synapse* 40:302-309.

- Vosler PS, Brennan CS, Chen J (2008) Calpain-mediated signaling mechanisms in neuronal injury and neurodegeneration. *Mol Neurobiol* 38:78-100.
- Wang QM, Park IK, Fiol CJ, Roach PJ, DePaoli-Roach AA (1994) Isoform differences in substrate recognition by glycogen synthase kinases 3 alpha and 3 beta in the phosphorylation of phosphatase inhibitor 2. *Biochemistry* 33:143-147.
- Watcharasit P, Bijur GN, Song L, Zhu J, Chen X, Jope RS (2003) Glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) binds to and promotes the actions of p53. *J Biol Chem* 278:48872-48879.
- Watcharasit P, Bijur GN, Zmijewski JW, Song L, Zmijewska A, Chen X, Johnson GV, Jope RS (2002) Direct, activating interaction between glycogen synthase kinase-3beta and p53 after DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:7951-7955.
- Waterman MJ, Stavridi ES, Waterman JL, Halazonetis TD (1998) ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nat Genet* 19:175-178.
- Welsh GI, Proud CG (1993) Glycogen synthase kinase-3 is rapidly inactivated in response to insulin and phosphorylates eukaryotic initiation factor eIF-2B. *Biochem J* 294 (Pt 3):625-629.
- Woodgett JR (1990) Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *Embo J* 9:2431-2438.
- Wu HY, Tomizawa K, Matsui H (2007) Calpain-calcineurin signaling in the pathogenesis of calcium-dependent disorder. *Acta Med Okayama* 61:123-137.
- Wu HY, Yuen EY, Lu YF, Matsushita M, Matsui H, Yan Z, Tomizawa K (2005) Regulation of N-methyl-D-aspartate receptors by calpain in cortical neurons. *J Biol Chem* 280:21588-21593.
- Xavier IJ, Mercier PA, McLoughlin CM, Ali A, Woodgett JR, Ovsenek N (2000) Glycogen synthase kinase 3beta negatively regulates both DNA-binding and transcriptional activities of heat shock factor 1. *J Biol Chem* 275:29147-29152.
- Xu L, Deng X (2004) Tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone induces phosphorylation of mu- and m-calpain in association with increased secretion, cell migration, and invasion. *J Biol Chem* 279:53683-53690.
- Yoshimura T, Kawano Y, Arimura N, Kawabata S, Kikuchi A, Kaibuchi K (2005) GSK-3beta regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity. *Cell* 120:137-149.
- Yuan H, Michelsen K, Schwappach B (2003) 14-3-3 dimers probe the assembly status of multimeric membrane proteins. *Curr Biol* 13:638-646.
- Yuan Z, Agarwal-Mawal A, Paudel HK (2004) 14-3-3 binds to and mediates phosphorylation of microtubule-associated tau protein by Ser9-phosphorylated glycogen synthase kinase 3beta in the brain. *J Biol Chem* 279:26105-26114.

- Zhang F, Phiel CJ, Spece L, Gurvich N, Klein PS (2003) Inhibitory phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) in response to lithium. Evidence for autoregulation of GSK-3. *J Biol Chem* 278:33067-33077.
- Zhou FQ, Zhou J, Dedhar S, Wu YH, Snider WD (2004) NGF-induced axon growth is mediated by localized inactivation of GSK-3beta and functions of the microtubule plus end binding protein APC. *Neuron* 42:897-912.
- Zhu LQ, Wang SH, Liu D, Yin YY, Tian Q, Wang XC, Wang Q, Chen JG, Wang JZ (2007) Activation of glycogen synthase kinase-3 inhibits long-term potentiation with synapse-associated impairments. *J Neurosci* 27:12211-12220.
- Zimmerman UJ, Boring L, Pak JH, Mukerjee N, Wang KK (2000) The calpain small subunit gene is essential: its inactivation results in embryonic lethality. *IUBMB Life* 50:63-68.

ANEXO

N-terminal Cleavage of GSK-3 by Calpain

A NEW FORM OF GSK-3 REGULATION*

Received for publication, April 2, 2007, and in revised form, June 13, 2007 Published, JBC Papers in Press, June 14, 2007, DOI 10.1074/jbc.M702793200

Paloma Goñi-Oliver, José J. Lucas, Jesús Avila, and Félix Hernández¹

From the Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa," Consejo Superior de Investigaciones Científicas/Universidad Autónoma (CSIC/UAM), Fac. Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

Although GSK-3 activity can be regulated by phosphorylation and through interaction with GSK-3-binding proteins, here we describe N-terminal proteolysis as a novel way to regulate GSK-3. When brain extracts were exposed to calcium, GSK-3 was truncated, generating two fragments of ~40 and 30 kDa, a proteolytic process that was inhibited by specific calpain inhibitors. Interestingly, instead of inhibiting this enzyme, GSK-3 truncation augmented its kinase activity. When we digested recombinant GSK-3 α and GSK-3 β protein with calpain, each isoform was cleaved differently, yet the truncated GSK-3 isoforms were still active kinases. We also found that lithium, a GSK-3 inhibitor, inhibits full-length and cleaved GSK-3 isoforms with the same IC₅₀ value. Calpain removed the N-terminal ends of His-tagged GSK-3 isoenzymes, and exposing cultured cortical neurons with ionomycin, glutamate, or *N*-methyl-D-aspartate led to the truncation of GSK-3. This truncation was blocked by the calpain inhibitor calpeptin, at the same concentration at which it inhibits calpain-mediated cleavage of NMDAR-2B and of p35 (the regulatory subunit of CDK5). Together, our data demonstrate that calpain activation produces a truncation of GSK-3 that removes an N-terminal inhibitory domain. Furthermore, we show that GSK-3 α and GSK-3 β isoenzymes have a different susceptibility to this cleavage, suggesting a means to specifically regulate these isoenzymes. These data provide the first direct evidence that calpain promotes GSK-3 truncation in a way that has implications in signal transduction, and probably in pathological disorders such as Alzheimer disease.

The GSK-3 protein (EC 2.7.11.26) is a proline-directed serine/threonine protein kinase that was originally identified and named for its ability to phosphorylate the enzyme glycogen synthase (1). Since its discovery, GSK-3 has been postulated to be involved in many physiological processes, and it plays important roles in embryonic development, cell differentiation, microtubule dynamics, cell cycle division, cell adhesion, glucose metabolism, and apoptosis (2, 3). Deregulation of GSK-3

activity is believed to play a key role in the pathogenesis of chronic central nervous system disorders such as Alzheimer disease (AD),² bipolar disorder, and Huntington disease (3, 4), as well as of metabolic disorders such as type II diabetes (5). In AD, GSK-3 has been shown to phosphorylate Tau at most of the hyperphosphorylated serine and threonine residues in paired helical filament Tau, both in cells (6) and *in vivo* (7–10). Furthermore, GSK-3 modulates β -amyloid production from its precursor amyloid precursor protein (11) and its accumulation in the cytoplasm of pretangle neurons (12, 13).

In mammals, two GSK-3 isoenzymes (α and β) that share 95% amino acid identity have been described (14), although there is weaker homology at the N- and C-terminal ends than the central portions. Both isoenzymes are the products of two independent genes (mapped to chromosome 19q12.3 and 3q13.3, respectively (15, 160), and whereas the *GSK-3 α* gene encodes a 51-kDa protein, the *GSK-3 β* gene encodes a 47-kDa protein. Recently, a new alternative splice isoform of GSK-3 β with an additional 13-amino-acid insert in the catalytic domain has also been described (17). Furthermore, the *GSK-3 β* gene has been analyzed (18) and its promoter studied to identify variations that could be associated with abnormal function (19).

GSK-3 can phosphorylate a variety of cytoplasmic and nuclear proteins, and its substrates include cytoskeletal proteins, transcription factors, and metabolic regulators. Thus, GSK-3 plays a prominent role in establishing and maintaining cell architecture, gene expression, and apoptosis (3). Many GSK-3 substrates require prior phosphorylation by a priming kinase on a Ser or Thr residue four amino acids C-terminal to the GSK-3 target residue. Indeed, the crystal structure of human GSK-3 β has provided a model for the binding of pre-phosphorylated substrates to the kinase (Protein Data Bank ID are 1I09 (20) and 1H8F (21)). Thus, the primed Ser/Thr is recognized by a positively charged "binding pocket" that facilitates the binding of primed substrates. Identifying the priming kinase is clearly of interest, and kinases such as cdk-5 (22–24), PAR-1 (25), casein kinase I (26), or protein kinase A (27) could act as priming kinases for GSK-3 phosphorylation.

GSK-3 is regulated at the post-translational level by phosphorylation, and autophosphorylation at Tyr-216 of GSK-3 β or Tyr-276 of GSK-3 α is necessary for its activation (28, 29). From the crystal structure, it has been proposed that unphosphorylated Tyr-216/276 blocks the access of primed substrates. Indeed, the published structure of phosphorylated GSK-3 β (30)

* This work was supported by grants from the Fundación La Caixa, Neuropharma, Fundación Botín, the Spanish Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, the Comunidad de Madrid (NEURODEGMODELS-CM), and the CIBER on Neurodegeneration and by institutional grants from the Fundación Ramón Areces. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 34-91-497-8443; Fax: 34-91-497-4799; E-mail: fherandez@cbm.uam.es.

² The abbreviations used are: AD, Alzheimer disease; NMDA, *N*-methyl-D-aspartate; ALLN, acetyl-leucine, norleucinal; DIV, days *in vitro*.

shows that phosphorylated Tyr-216 suffers a conformational change that allows the primed substrate to bind the enzyme. In *Dictyostelium*, the Zaphod kinase activates GSK-3 by Tyr-phosphorylation (31), whereas in mammals, Fyn tyrosine kinase (32) or some related tyrosine kinase may be involved in this process. However, it seems that phosphorylation of these residues may also be the result of autophosphorylation (29, 33).

Inhibition of the enzyme can be achieved by two different mechanisms (2). The first mechanism is triggered by insulin and growth factors, and it is mainly mediated by protein kinase B, which phosphorylates Ser-9 in GSK-3 β and Ser-21 in GSK-3 α . A model for this inhibition has been generated through structural studies (20, 21), and accordingly, the phosphorylated Ser-9/21 binds as a competitive pseudosubstrate to the primed-binding site, inhibiting the binding of the protein and its ensuing phosphorylation. The second mechanism of GSK-3 inhibition involves the wingless (Wnt) signaling pathway. GSK-3 contributes to a multiprotein complex formed by axin and adenomatous polyposis coli, in which it is able to phosphorylate β -catenin, targeting it for proteasome degradation (34). Wnt proteins bind to the Frizzled receptor, activating the Dishevelled protein, which in turn inhibits GSK-3 activity by disrupting this multiprotein complex. As a consequence, β -catenin accumulates and translocates into the nucleus, where it activates transcription by interacting with certain transcription factors.

In addition to these regulatory mechanisms, the mechanisms governing the turnover of GSK-3 may be critical in diseases in which GSK-3 activity is altered. The GSK-3 β promoter is a TATA-less promoter with the characteristics of housekeeping genes, and with regard to Alzheimer disease, there are no reports of alterations in GSK-3 β transcription (18, 19). On the other hand, the degradation of GSK-3 is poorly understood. In this context, we have consistently observed additional lower apparent molecular weight bands in overexposed immunoblots probed with some anti-GSK-3 antibodies, suggesting the presence of specific proteolytic fragments. Here, we have examined the effects of calpain on the cleavage of GSK-3. First we demonstrate that GSK-3 β is truncated by calpain *in vitro*, whereas GSK-3 α is not such a good substrate. We then identified the kinase region that is cleaved by calpain and demonstrated that this cleavage of GSK-3 takes place in cortical neurons after glutamatergic stimulation. Together, these data demonstrate a new means of regulating GSK-3 with important implications for all its physiological and pathological roles.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Antibodies, Enzymes, and Reactives—The commercial antibodies used were: anti-GSK-3 β/α (pS9/21) and anti-GSK-3 β/α obtained from BioSource (Camarillo, CA); anti-p35/25 obtained from Santa Cruz (Santa Cruz, CA); anti-His and anti- α -tubulin obtained from Sigma; and anti-NR2C (35) obtained from Molecular Probes (Eugene, OR). Calpain was purchased from Calbiochem (catalogue number 208718), GSK-3 α was from Upstate-Millipore (Chicago, IL; catalogue number 14-492), and GSK-3 β was from Sigma (catalogue number G1663). Ionomycin, aprotinin, and pepstatin were all obtained from Sigma, whereas MK801, ALLN, and calpeptin were from Calbiochem.

Calpain Cleavage of GSK-3—Cortical mouse brain extracts were homogenized in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, containing 1.0 mM EDTA. Samples were then incubated at 30 °C for several minutes with or without 5.0 mM CaCl₂ and in the presence or absence of protease inhibitors. The samples were then mixed with Laemmli sample buffer, electrophoresed, and Western blotted to identify the products of proteolysis by probing with antibodies against GSK-3. Commercial GSK-3 isoforms (0.5 μ g) were incubated in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, and 5 mM β -mercaptoethanol and 0.2 units calpain/ml. Samples were then incubated at 30 °C for several minutes in the presence or absence of 5.0 mM CaCl₂ and 10 μ M calpeptin. Samples were then mixed with Laemmli sample buffer supplemented with 10 μ M calpeptin and separated by electrophoresis.

GSK-3 Activity Assay—Cortical mouse brain extracts were homogenized in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, containing 1.0 mM EDTA. Samples were then incubated at 30 °C for several minutes in the presence or absence of 5.0 mM CaCl₂ and 10 μ M calpeptin. Reactions were terminated by adding a mixture of peptidase inhibitors (Roche Applied Science, Basel, Switzerland) supplemented with 20 μ M calpeptin. Extracts were centrifuged at 14,000 \times *g* for 15 min, and the supernatants were collected to assay GSK-3 activity. The GS1 peptide (YRRAAVPPSPSLSRHSSPHQS*EDEE) in which Ser-21 is phosphorylated was used as a substrate as described previously (36). Samples were incubated at 30 °C with 30 μ M GS1 peptide in the presence of 50 μ M ATP (1,000 cpm/pmol of [γ -³²P]ATP, PerkinElmer Life Sciences) in 25 mM Tris, pH 7.5, 1 mM dithiothreitol, 10 mM MgCl₂, and either 10 mM NaCl or 10 mM LiCl. The assays were stopped by spotting aliquots onto P81 phosphocellulose paper, and the filters were processed as described previously (36). GSK-3 activity was calculated as the difference between the activity in the presence of 10 mM NaCl and the activity in the presence of 10 mM LiCl. The results were expressed as the percentage of activity with respect to the wild-type extracts. Commercial GSK-3 isoforms (0.5 μ g) were incubated in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5 mM β -mercaptoethanol, and 0.2 units calpain/ml. Samples were then incubated at 30 °C for several minutes in the presence or absence of 5.0 mM CaCl₂. The reactions were stopped with calpeptin 20 μ M and a mixture of peptidase inhibitors (Roche Applied Science). GSK-3 activity was then measured as described above in the presence or absence of LiCl at different concentrations (0.01–20 mM). GSK-3 activity was normalized to the total GSK-3 protein levels measured after SDS-PAGE and immunoblotting.

Dephosphorylation Experiments—Commercial GSK-3 isoenzymes were dephosphorylated with λ -phosphatase (BioLabs, IZASA SA, Barcelona, Spain) in 50 mM Tris, pH 7.8, 300 mM NaCl, 10% glycerol, 0.5 mM MnCl₂, 5 mM dithiothreitol, and a mixture of peptidase inhibitors (Roche Applied Science) for 0.5 h at 30 °C to remove the adventitious phosphorylation that occurs during expression. The dephosphorylation of the protein was confirmed by Western blotting using the antibody anti-GSK-3 β/α (pS9/21) and the anti-GSK-3 β/α antibody as loading control.

Calpain-mediated Truncation of GSK-3

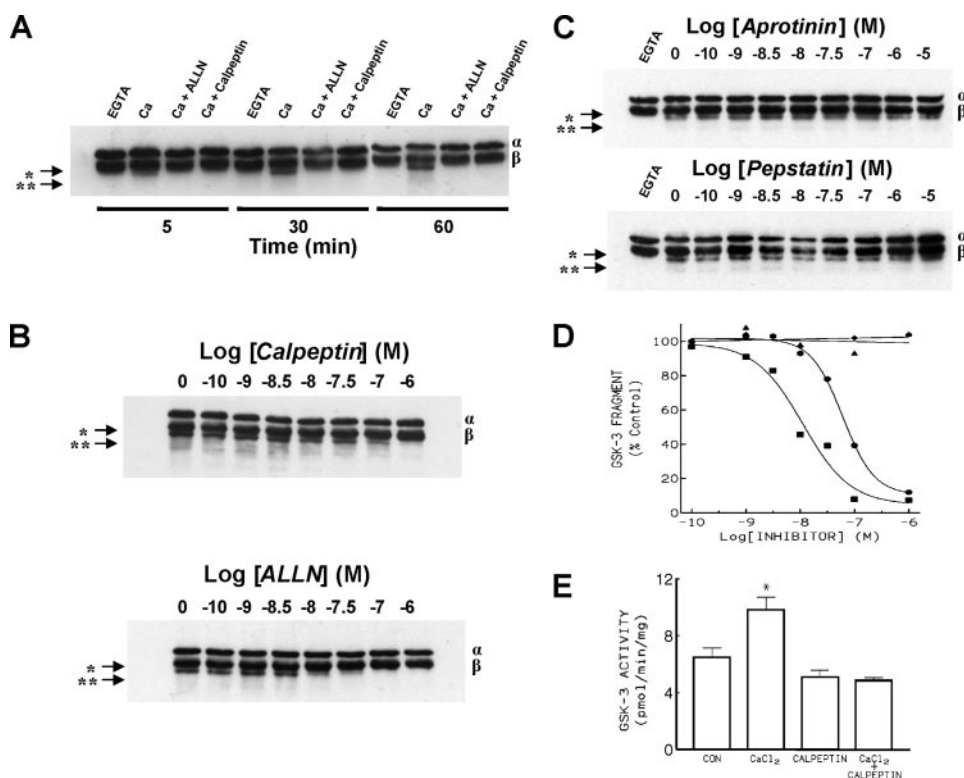


FIGURE 1. Proteolysis of GSK-3 in mouse brain extracts. *A*, time course of truncated GSK-3 accumulation in the presence of 5 mM CaCl₂. Equal amounts of brain extracts (20 μ g) were incubated at 30 °C in the presence of CaCl₂ or EGTA (1 mM), and the Western blots were probed with anti-GSK-3 α/β . The effect of 10 μ M ALLN and 10 μ M calpeptin was also tested. *B* and *C*, inhibition of CaCl₂-induced (30 min) GSK-3 truncation in brain extracts in the presence of increasing concentrations of protease inhibitors. *D*, dose-response profiles for CaCl₂-stimulated GSK-3 truncation in brain extracts in the presence of ALLN (■), calpeptin (●), aprotinin (◆), and pepstatin (▲). The truncated fragment I (one asterisk) of GSK-3 was quantified by densitometry of the Western blots shown in *B* and *C*. Data are presented as the percentage of the brain extract treated with calcium alone, and they are the means of triplicate determinations. Arrows indicate the truncated GSK-3 isoforms, and the asterisk shows the 40-kDa fragment I, whereas two asterisks represent the 30-kDa fragment II. *E*, brain extracts in Tris/EDTA buffer were preincubated for 30 min as shown in *A* with 5 mM CaCl₂ or 10 μ M calpeptin or both. GSK-3 activity was then assayed by analyzing peptide phosphorylation after 10 min as described under "Experimental Procedures." Histograms show the comparison of GSK-3 activity (the difference between the activity in the presence of 10 mM NaCl and the activity in the presence of 10 mM LiCl) in brain extracts from different treatment (*, $p < 0.02$). CON, control.

Primary Cultures—Primary cultures of cortical neurons were prepared according to modified versions of established procedures (37). Briefly, pups were sacrificed at postnatal day 1, and the cortical tissue was dissected and dissociated individually from each pup with the papain dissociation system (Worthington Biochemical Corp.; Lakewood, NJ). Cortical neurons were maintained in Neurobasal medium (Invitrogen) supplemented with 1% B-27, 5% fetal calf serum, 0.5 mM glutamine, 100 units/ml penicillin, and 100 mg/ml streptomycin, and they were grown on 3 μ g/ml laminin (Sigma) and 10 μ g/ml poly-L-lysine-coated plates. The cells were incubated in 95% air, 5% CO₂ in a humidified incubator at 37 °C. Cytosine arabinoside (2.5 μ M) was added to the cultures on the third day after seeding (DIV3) to inhibit the proliferation of non-neuronal cells, and the cells were used for experiments at DIV12.

Drug Treatment—Dizocilpine maleate (MK-801) was dissolved in Me₂SO, and the final concentration of Me₂SO in the medium was 0.2–0.4%. NMDA and glutamate were dissolved in culture medium, and the drugs were added 30 min before the stimulation of NMDA receptors with 100 μ M NMDA or 1 mM

glutamate. Experiments were performed in the presence of glycine 100 μ M.

SDS-PAGE and Immunoblotting—Samples were resolved on 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred to a nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell). The membranes were probed with the following primary monoclonal antibodies: anti-GSK-3 β/α (1/1,000), anti- α -tubulin (1/5,000), anti-His (1/1,000), anti-NR2C (1/100), anti-p35/25 (1/200), and anti-GSK-3 β/α (pS9/21) (1/200). The filters were incubated with the antibody at 4 °C overnight in 5% nonfat dried milk. The immunoreactive bands were detected with a secondary goat anti-mouse antibody (1/5,000; Invitrogen) and visualized by ECL (Amersham Biosciences). Quantification of GSK-3 was performed by densitometric scanning, and the densitometry values were obtained in the linear range of detection with these antibodies. These values were normalized with respect to the values obtained with an anti- α -tubulin antibody to correct for any deviation in protein loading or with respect to the values obtained with anti-tubulin antibody to correct for total protein content.

Statistical Analysis—Statistical analysis of the data were performed using one-way analysis of variance.

RESULTS

GSK-3 Is Cleaved by Calpain in Brain Extracts—We have previously observed that when immunoblots probed with some anti-GSK-3 antibodies are overexposed, additional bands smaller than the full-length GSK-3 isoenzymes (about 40–30 kDa) can be detected, suggesting the presence of proteolytic fragments. To test this possibility, we analyzed by Western blotting the pattern of GSK-3 bands and fragments in mouse brain tissue homogenized in the presence of Tris/EGTA. Although in the absence of Ca²⁺, no degradation of GSK-3 was observed (Fig. 1A), the addition of CaCl₂ to these homogenates induced the time-dependent degradation of GSK-3 (Fig. 1A). Two breakdown products with apparent molecular masses of ~40 (fragment I) and 30 (fragment II) kDa were observed, although the 30-kDa band was fainter. The Ca²⁺-induced degradation was inhibited in a dose-dependent manner by ALLN and calpeptin, two calpain inhibitors, with an IC₅₀ of 11 and 60 nM, respectively (Fig. 1, B and D). To confirm that GSK-3 is proteolyzed by calpain, we studied the inhibition of the Ca²⁺-stimulated proteolysis of GSK-3 with selective inhibitors of dif-

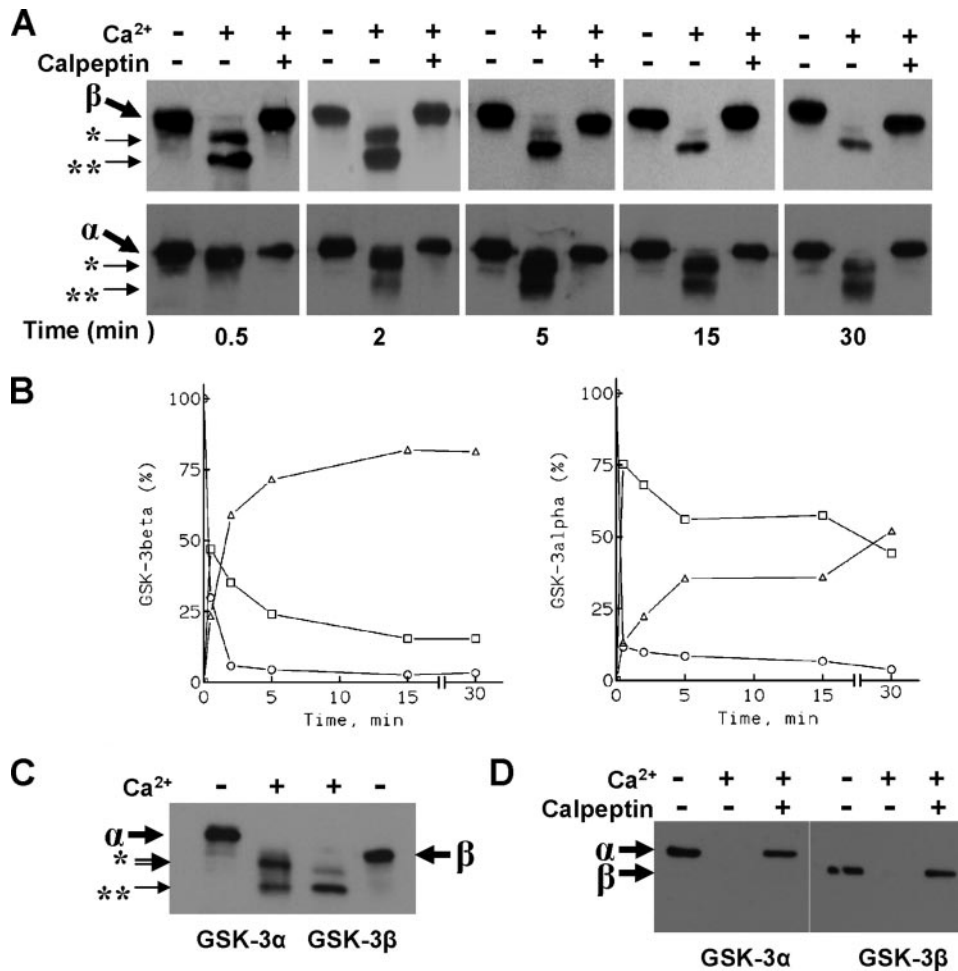


FIGURE 2. *In vitro* proteolysis of GSK-3 β and GSK-3 α by calpain. *A*, representative immunoblots of GSK-3 β and GSK-3 α digested with calpain (0.2 units/ml) for up to 30 min are shown. No degradation was observed in the absence of calcium or in the presence of calcium and calpeptin. All samples were incubated with calpain. Arrows and asterisks represent fragment I (one asterisk) and fragment II (two asterisks). *B*, quantified data of GSK-3 isoforms are expressed in terms of the percentage of the total enzyme present in each treatment versus time (○, full-length isoforms; □, fragment I; △, fragment II). *C*, the fragments were analyzed in the same gel, and it can be seen that both isoenzymes produced a fragment with an apparent molecular mass of 30 kDa (fragment II, two asterisks), whereas the fragment I (40 kDa, one asterisk) has a slightly higher apparent molecular mass (42 kDa) in the case of the GSK-3 α than in the case of the β -isoform. *D*, calpain and His-GSK-3 β or His-GSK-3 α were incubated in the presence or absence of 5 mM CaCl₂ with or without 10 μ M calpeptin for 0.5 min. N-terminal His-labeled proteins were analyzed in Western blots probed with the anti-His antibody.

ferent proteases. Neither aprotinin nor pepstatin, serine, and aspartic protease inhibitors, respectively, significantly inhibited the Ca²⁺-induced degradation of GSK-3 (Fig. 1, *C* and *D*), excluding the involvement of these types of proteases in the GSK-3 proteolysis. Taken together, these results indicated that elevated Ca²⁺ most probably activates calpain, which in turn cleaves GSK-3 (38).

We then investigated whether the truncation of GSK-3 affects its kinase activity. GSK-3 activity was assessed in the same manner as analyzed previously in brain extracts (Fig. 1*A*). Interestingly, the Ca²⁺-treated extracts showed a significant increase ($p < 0.02$, 51.8 \pm 6%) in GSK-3 activity (Fig. 1*E*) when compared with control extracts. Furthermore, the Ca²⁺-induced increase in GSK-3 activity was inhibited by calpeptin.

Calpain Cleaves GSK-3 α and GSK-3 β at Their N-terminal End—To assess whether both GSK-3 isoenzymes were substrates for calpain, recombinant GSK-3 α and GSK-3 β were

incubated with the protease. Both isoenzymes were cleaved by calpain, producing two calpain-derived fragments (Fig. 2*A*). When these fragments were analyzed in the same gel (Fig. 2*C*), we observed that both isoenzymes produce a fragment of apparent molecular mass of 30 kDa (fragment II), whereas fragment I of GSK-3 α had a slightly higher apparent molecular mass (42 kDa) than that from the β -isoform (40 kDa). Quantification of these proteolytic products (Fig. 2*B*) showed that both full-length isoforms were rapidly digested by calpain (Fig. 2*B*, *open circles*). However, fragment I generated from the β -isoform is a better substrate for calpain than the one generated from the α -isoform since after 5 min of calpain digestion, fragment I generated from GSK-3 β represented about 25% of the total GSK-3 β , whereas in the same experimental conditions, the equivalent fragment represented the 60% of the GSK-3 α protein.

The recombinant GSK-3 isoenzymes used were His-tagged at their N-terminal ends, and when assayed as above and probed with an antibody against the His tag, the breakdown products generated from both GSK-3 isoforms were not detected, indicating that the N-terminal end was that removed by calpain (Fig. 2*D*). Furthermore, this confirms that calpain digests both full-length isoforms rapidly to generate fragment I. Indeed, the antibody that recognizes the His-tagged epitope is

unable to detect the full-length GSK-3 isoforms 2 min after exposure to calpain.

Truncated GSK-3 Isoenzymes Are Active Kinases—To determine whether calpain-mediated GSK-3 proteolysis alters its kinase activity, the effects of calpain on recombinant GSK-3 isoenzymes were studied. The study was performed with GSK-3 isoforms treated with calpain for 0.5–5 min. Fig. 3*A* shows that the GSK-3 β kinase activity increased over incubation time. Thus, calpain-mediated proteolysis of recombinant GSK-3 β showed a significant ($p < 0.01$) increase in GSK-3 activity (330.1 \pm 7.3% at 5 min) when compared with the untreated enzyme. When the same experiment was carried out with the GSK-3 α isoform, a similar increase in kinase activity was not observed. These data demonstrate that the GSK-3 fragments are catalytic and suggest that calpain-mediated proteolysis selectively augments the kinase activity of the β isoform.

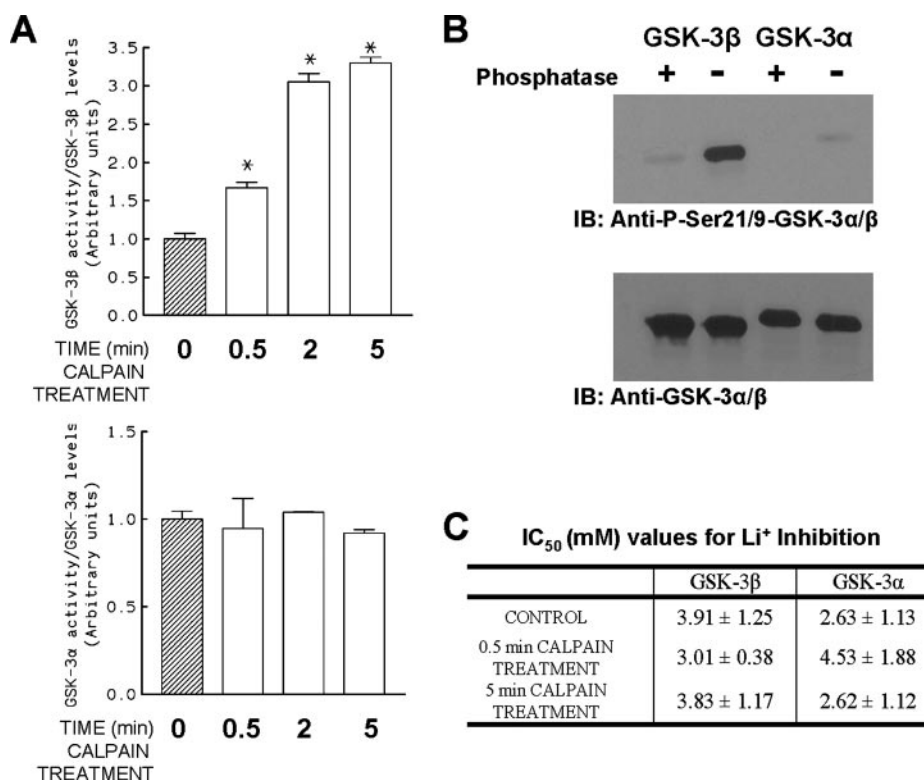


FIGURE 3. **Effect of GSK-3 truncation on enzymatic activity.** A, recombinant calpain and GSK-3β or GSK-3α were incubated in the presence of 5 mM CaCl₂ for 0.5, 2, and 5 min. Then, the enzymatic activity was measured as described under "Experimental Procedures." Shaded bars represent the GSK-3 activity obtained before calpain treatment (*, *p* < 0.01). B, levels of Ser-9/21 phosphorylation present in commercial isoforms. GSK-3 isoforms were treated with phosphatase-λ for 30 min, and then the samples were immunoblotted (IB) and probed with the anti-P-Ser-9/21-GSK-3β/α antibody (upper panel) or the anti-GSK-3β/α antibody as a loading control. C, inhibition of full-length GSK-3 isoenzymes (CONTROL) and truncated GSK-3β and GSK-3α forms after 0.5 or 5 min of calpain treatment. The table shows the IC₅₀ values for Li⁺ inhibition. Dose-response profiles for GSK-3 activity in the presence of increasing concentrations of lithium (0.01–20 mM) were fitted to sigmoidal curves, and the IC₅₀ were values calculated.

A well established mechanism that increases GSK-3 activity involves dephosphorylating the Ser-21/9 present in the N-terminal end of GSK-3. To validate the differential effect of calpain on each isoform, it was important to investigate whether the recombinant enzymes were similarly phosphorylated at Ser-21/9. We found that although recombinant GSK-3β was phosphorylated at Ser-9, there was very little phosphorylation of Ser-21 in the α-isoform (Fig. 3B). These results were confirmed by treating GSK-3 isoforms with phosphatase-λ, which abolished the binding of the anti-P-Ser 21/9-GSK-3α/β antibody without altering the total amount of protein (Fig. 3B). Thus, the differential effect on the β-isoform can be explained by the removal of its inhibitory domain, leading to increased kinase activity. On the contrary, the α-isoform was not phosphorylated at Ser-21, and therefore, its cleavage did not affect the kinase activity.

Li⁺ selectively inhibits GSK-3, which may explain some of its pharmacological effects (39). Although its binding site has not been identified, Li⁺ is a competitive inhibitor of

magnesium with respect to GSK-3 (40). We investigated the effects of Li⁺ on truncated GSK-3 activity using commercial GSK-3 isoenzymes (Fig. 3C). Li⁺ inhibited GSK-3β and GSK-3α with IC₅₀ values of 3.91 ± 1.25 and 2.63 ± 1.13 mM, respectively, reducing kinase activity by 90% at 20 mM LiCl. Interestingly, lithium inhibited the truncated GSK-3 isoforms generated after 0.5 and 5 min of calpain treatment with a similar IC₅₀. Therefore, full-length and truncated GSK-3α and GSK-3β are inhibited by Li⁺ in the same way, suggesting that GSK-3 cleavage does not affect the Li⁺-binding site.

Calcium Influx in Cultured Cortical Neurons Induces GSK-3 Proteolysis through Calpain Activation—Treatment of cultured cortical neurons with the calcium ionophore ionomycin in the presence of extracellular calcium induced GSK-3 truncation in a time-dependent manner (Fig. 4). This GSK-3 truncation was prevented by the addition of the calpain inhibitor calpeptin to the culture. Thus, we addressed whether the GSK-3 truncation by calpain could also be observed after stimulation of ionotropic NMDA receptors, which upon activation, increase intracellular Ca²⁺ concentrations. We first analyzed the cleavage of NMDA subunits by calpain in primary neuronal cultures, a well characterized system where calpain activation occurs (35, 41). Activation of the NMDA receptor by NMDA or glutamate led to calpain-specific proteolysis of the NR2B subunit (Fig. 5A).

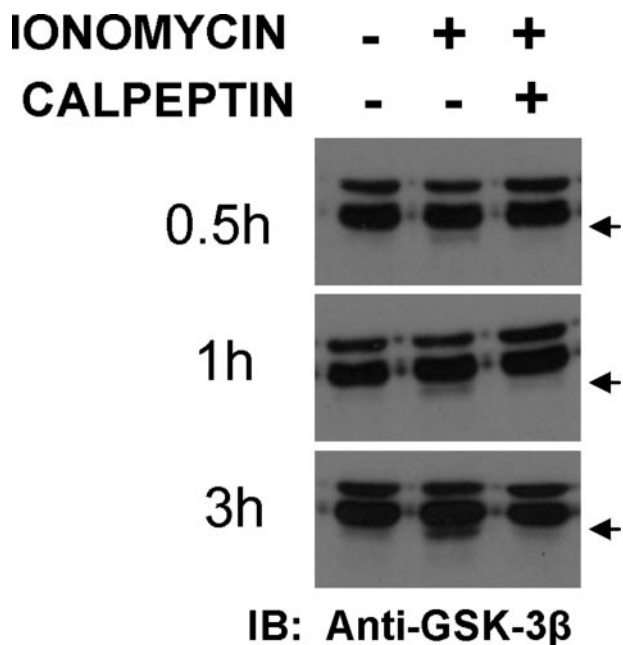


FIGURE 4. **Calcium influx induces GSK-3 proteolysis.** Cortical neurons were treated with ionomycin (5 μM) in the presence or absence of the calpain inhibitor calpeptin (10 μM) for 0.5–3 h. Calcium influx induced GSK-3 proteolysis as seen by the appearance of a 40-kDa immunoreactive peptide recognized by the antibody anti-GSK-3α/β. IB indicates immunoblot.

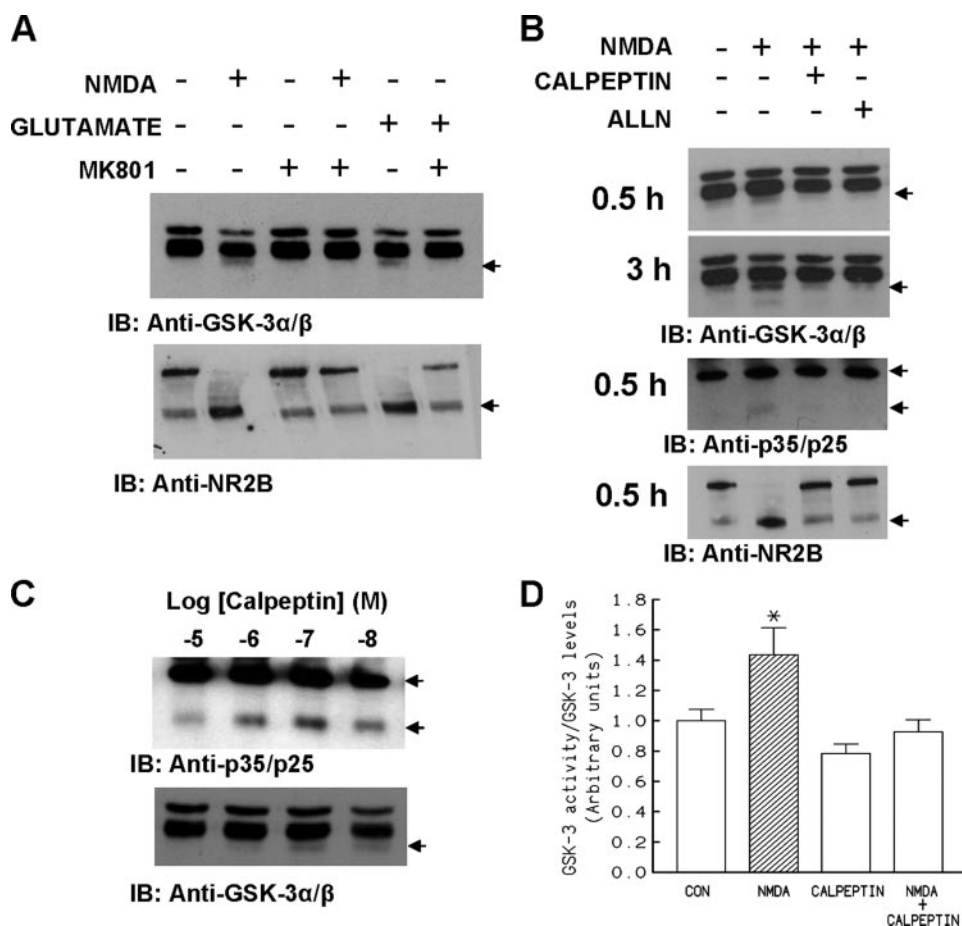


FIGURE 5. Glutamate/NMDA-triggered generation of truncated GSK-3 is mediated by calpain. *A*, cortical neurons (DIV12) were treated with 100 μ M NMDA or 1 mM glutamate for 30 min. In addition, cells were treated with either vehicle or 10 μ M MK801. The samples were immunoblotted (IB) with the anti-GSK-3 α/β antibody (upper panel). The generation of a 40-kDa GSK-3 truncated form is shown by the arrow. MK-801, the specific NMDAR antagonist, inhibited the truncation of GSK-3 and NR2B induced by NMDA and glutamate (lower panel, the arrow shows the generated 115-kDa truncated fragment). *B*, the NMDA-mediated GSK-3 truncation is a time-dependent process, and it is inhibited by calpeptin (10 μ M) and ALLN (10 μ M). The same samples were immunoblotted with the anti-p35/p25 antibody and the antibody that recognizes the 170-kDa full-length NR2B subunit as well as the 115-kDa product. Arrows show the full-length p35 protein (upper arrow) and the truncated p25 fragment (lower arrow) as well as the 115-kDa truncated fragment generated (lower arrow). *C*, NMDA (100 μ M) responses (GSK-3 and p35 truncation) were inhibited by calpeptin in a dose-dependent manner. Similar results were obtained in three independent experiments. *D*, cortical neurons (DIV12) were treated with 100 μ M NMDA for 30 min in the presence or absence of calpeptin (10 μ M), and then, enzymatic activity was measured as described under "Experimental Procedures." The shaded bar represents the GSK-3 activity obtained after a 30 min incubation with NMDA (*, $p < 0.01$, $n = 9$).

This activation of NMDA receptors increased the levels of a 115-kDa product recognized by a specific antibody (35), whereas a parallel decrease of the 170-kDa full-length NR2B subunit was observed. The effect of NMDA was mediated by calpain as calpeptin and ALLN prevented the formation of the 115-kDa product (Fig. 5B). MK-801 preincubation blocked both the decrease of the full-length NR2B subunit and the increase of the low molecular weight form. We then analyzed the status of GSK-3 in Western blots of the same samples, and we detected the additional low molecular weight isoforms of GSK-3 (Fig. 5A). This effect was time-dependent (Fig. 5B) and mediated by NMDA receptors as MK-801 abolished GSK-3 truncation (Fig. 5A). Glutamate, the physiological ligand of NMDA receptors, induced the same response in cultured cortical neurons. Moreover, since MK-801 prevented both effects (GSK-3 and NR2B subunit truncation, Fig. 5A), the effect of

glutamate was mediated by NMDA receptors. Thus, glutamate induces calpain-mediated truncation of GSK-3 by acting on NMDA receptors, which can be inhibited by calpeptin in a dose-dependent manner (Fig. 5C), confirming the involvement of calpains. Although fragment I was prominent in these experiments (Fig. 5), fragment II was only detected in overexposed immunoblots.

We then investigated whether NMDA-mediated GSK-3 proteolysis alters its kinase activity (Fig. 5, A and B). Interestingly, the NMDA-treated cultures showed a significant increase in GSK-3 activity when compared with control cultures (43.5 \pm 17.8% over basal levels, $p < 0.01$). Furthermore, the NMDA-induced increase in GSK-3 activity was inhibited by 10 μ M calpeptin (Fig. 5D).

Cdk5 is another proline-directed Ser/Thr protein kinase that is expressed in neurons together with its regulatory subunit p35. The N-terminal truncation of p35 to p25 by calpain results in deregulation of Cdk5 and contributes to the neuronal cell death associated with several neurodegenerative diseases (42–44). We tested whether the breakdown of p35 to p25 also occurs in our experimental conditions. When primary cultures were probed with an antibody that recognizes the p35/p25 protein, the p25 fragment was generated in parallel with the truncated GSK-3 isoforms (Fig. 5B) and with a similar sensitiv-

ity to the increase in the concentration of the calpain inhibitor calpeptin (Fig. 5C).

DISCUSSION

GSK-3 is a constitutively active kinase that is inactivated by phosphorylation at its N-terminal end. In this study, we show that GSK-3 activity can be also regulated by calpain-induced proteolysis of the N terminus, based on the fact that: (i) GSK-3 is truncated by calpain *in vitro*; (ii) this truncation eliminates the regulatory N-terminal domain; (iii) truncated GSK-3 forms are active kinases that are inhibited by Li⁺ with an IC₅₀ value similar to that of the full-length isoforms; and (iv) ionomycin-, glutamate-, and NMDA-stimulated neurons induce GSK-3 truncation by activating calpain. Furthermore, our data show a different susceptibility of GSK-3 α and GSK-3 β isoenzymes, suggesting that this may be a means to differentially regulate

Calpain-mediated Truncation of GSK-3

both isoenzymes. Collectively, these data identify a novel role for calpain in the regulation of GSK-3 activity and describe a new way of regulating GSK-3.

Calcium influx into cortical neurons caused by an ionophore increased GSK-3 truncation in a time-dependent manner. This increase was prevented by calpain inhibitors, indicating that calpains were required to mediate the effect of intracellular calcium on GSK-3 truncation. Incubation of cortical neurons with glutamate or NMDA caused the same calpain-dependent GSK-3 truncation. Interestingly, this proteolytic event correlates with an increase in GSK-3 activity (Fig. 5D). As an indicator of calpain activation, we measured the degradation of the NMDA subunit NR2B, a well characterized calpain-dependent process (45), as well as the truncation of the p35 regulatory subunit of CDK-5 into the p25 truncated form. Our data show that the proteolytic fragment generated by NMDA/glutamate stimulation is not accumulated. This suggests that calpain cleaves the regulatory N-terminal end, yielding a short-lived, constitutively active form of the enzyme. It is interesting to note that in *in vitro* assays with recombinant GSK-3 isoenzymes, the truncated fragment I does not accumulate, and it is the 30-kDa fragment that accumulates. When similar studies were performed on primary neuronal cultures and on brain tissue, only the 40-kDa form accumulates. A possible explanation for this is that when GSK-3 is sequentially truncated by calpain first into the fragment I and then into fragment II, this latter product is rapidly degraded, and it is, therefore, not easily detected.

Calpains can regulate protein kinases involved in several signal transduction pathways (38). Thus, calpains cleave the regulatory domain of protein kinase C, yielding a short-lived, constitutively active form of the enzyme (46, 47). Cdk5 is also altered by the calpain-mediated generation of two cdk5 activators, p25 and p29, from their respective p35/p39 precursors (42–44). Calmodulin kinase II is degraded by calpain to an active fragment, which is not regulated by calmodulin (48). We add here GSK-3 as a new protein kinase whose activity is up-regulated by proteolysis. Together, these data suggest a common pattern that connects calpain and different protein kinases. Thus, calpains release kinase from the inhibitory mechanisms that ensure the normal repression of catalytic domains.

The generation of a similar GSK-3 fragment with a higher specific activity than the intact form has been reported previously (49). The generation of such a proteolytic fragment was described as an aberrant process thought to take place during the purification procedure. Our data demonstrate that this fragment is not merely due to aberrant proteolysis but that it reflects a regulated mechanism with physiological implications. More precisely, N-terminal truncation eliminates the regulatory domain that inhibits the catalytic activity and offers a new way to regulate GSK-3 that is independent of the protein kinase/protein phosphatase equilibrium.

The present results have clear implications in all the transduction pathways in which GSK-3 is involved and especially in neurodegenerative processes such as AD. Thus, it is well established that aberrant Tau phosphorylation in AD is due to GSK-3 and/or CDK5 activation, although the connection and the relative contribution of each protein remains unclear. Tak-

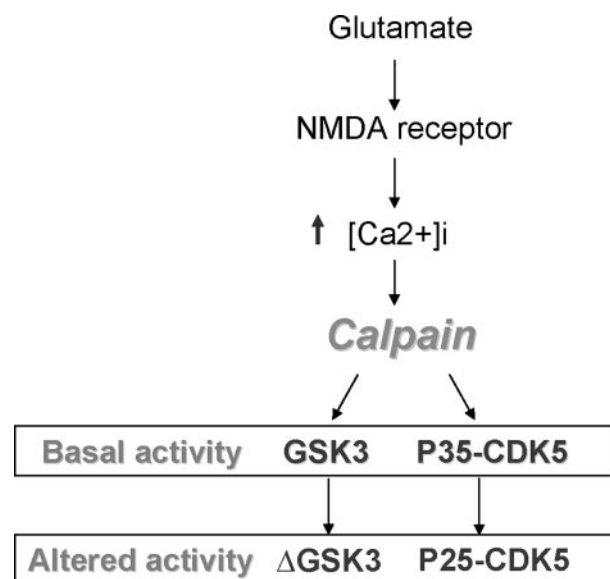


FIGURE 6. Diagram showing how altered calcium homeostasis following NMDA receptor activation may contribute to the physiology and eventually to neuropathological activation of the calpain/GSK-3/CDK5 pathway.

ing into account that calpains induce p35 truncation (42, 43) and that calpain also induces GSK-3 activation through N-terminal truncation (present data), it is possible that the deregulation of calcium homeostasis may contribute to AD neuropathology through the calpain/GSK-3/CDK5 system. Thus, our data support the view that calpains may provide a link between both kinases (Fig. 6).

In summary, the present study has demonstrated for the first time that calpain promotes N-terminal GSK-3 truncation. This has implications in signal transduction pathways such as those activated through glutamatergic stimulation of NMDA receptors. Furthermore, GSK-3 truncation may have important consequences in pathological disorders such as AD, in which this kinase has been implicated. Further studies will be required to fully elucidate the role of calpain-mediated GSK-3 truncation and to evaluate how this process affects transduction pathways in which GSK-3 is involved.

REFERENCES

1. Cohen, P., and Frame, S. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 769–776
2. Frame, S., and Cohen, P. (2001) *Biochem. J.* **359**, 1–16
3. Jope, R. S., and Johnson, G. V. (2004) *Trends Biochem. Sci.* **29**, 95–102
4. Avila, J., Lucas, J. J., Perez, M., and Hernandez, F. (2004) *Physiol. Rev.* **84**, 361–384
5. Eldar-Finkelman, H. (2002) *Trends Mol. Med.* **8**, 126–132
6. Lovestone, S., Reynolds, C. H., Latimer, D., Davis, D. R., Anderton, B. H., Gallo, J. M., Hanger, D., Mulot, S., Marquardt, B., Stabel, S., Woodgett, J. R., and Miller, C. C. J. (1994) *Curr. Biol.* **4**, 1077–1086
7. Hong, M., Chen, D. C., Klein, P. S., and Lee, V. M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 25326–25332
8. MunozMontano, J. R., Moreno, F. J., Avila, J., and DiazNido, J. (1997) *FEBS Lett.* **411**, 183–188
9. 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) *J. Biol. Chem.* **275**, 41340–41349
10. Lucas, J. J., Hernandez, F., Gomez-Ramos, P., Moran, M. A., Hen, R., and Avila, J. (2001) *EMBO J.* **20**, 27–39

11. Phiel, C. J., Wilson, C. A., Lee, V. M., and Klein, P. S. (2003) *Nature* **423**, 435–439
12. Shiurba, R. A., Ishiguro, K., Takahashi, M., Sato, K., Spooner, E. T., Mercken, M., Yoshida, R., Wheelock, T. R., Yanagawa, H., Imahori, K., and Nixon, R. A. (1996) *Brain Res.* **737**, 119–132
13. Pei, J. J., Braak, E., Braak, H., GrundkeIqbal, I., Iqbal, K., Winblad, B., and Cowburn, R. F. (1999) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **58**, 1010–1019
14. Woodgett, J. R. (1990) *EMBO J.* **9**, 2431–2438
15. Hansen, L., Arden, K. C., Rasmussen, S. B., Viars, C. S., Vestergaard, H., Hansen, T., Moller, A. M., Woodgett, J. R., and Pedersen, O. (1997) *Dia-betologia* **40**, 940–946
16. Shaw, P. C., Davies, A. F., Lau, K. F., Garcia-Barcelo, M., Wayne, M. M., Lovestone, S., Miller, C. C., and Anderton, B. H. (1998) *Genome* **41**, 720–727
17. Mukai, F., Ishiguro, K., Sano, Y., and Fujita, S. C. (2002) *J. Neurochem.* **81**, 1073–1083
18. Lau, K. F., Miller, C. C., Anderton, B. H., and Shaw, P. C. (1999) *Genomics* **60**, 121–128
19. Russ, C., Lovestone, S., and Powell, J. F. (2001) *Mol. Psychiatry* **6**, 320–324
20. ter Haar, E., Coll, J. T., Austen, D. A., Hsiao, H. M., Swenson, L., and Jain, J. (2001) *Nat. Struct. Biol.* **8**, 593–596
21. Dajani, R., Fraser, E., Roe, S. M., Young, N., Good, V., Dale, T. C., and Pearl, L. H. (2001) *Cell* **105**, 721–732
22. Li, T., Hawkes, C., Qureshi, H. Y., Kar, S., and Paudel, H. K. (2006) *Bio-chemistry* **45**, 3134–3145
23. Noble, W., Olm, V., Takata, K., Casey, E., Mary, O., Meyerson, J., Gaynor, K., LaFrancois, J., Wang, L., Kondo, T., Davies, P., Burns, M., Veeranna, Nixon, R., Dickson, D., Matsuoka, Y., Ahljanian, M., Lau, L. F., and Duff, K. (2003) *Neuron* **38**, 555–565
24. Sengupta, A., Wu, Q. L., GrundkeIqbal, I., Iqbal, K., and Singh, T. J. (1997) *Mol. Cell Biochem.* **167**, 99–105
25. Nishimura, I., Yang, Y., and Lu, B. (2004) *Cell* **116**, 671–682
26. Amit, S., Hatzubai, A., Birman, Y., Andersen, J. S., Ben-Shushan, E., Mann, M., Ben-Neriah, Y., and Alkalay, I. (2002) *Genes Dev.* **16**, 1066–1076
27. Singh, T. J., Zaidi, T., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (1995) *FEBS Lett.* **358**, 4–8
28. Hughes, K., Nikolakaki, E., Plyte, S. E., Totty, N. F., and Woodgett, J. R. (1993) *EMBO J.* **12**, 803–808
29. Lochhead, P. A., Kinstrie, R., Sibbet, G., Rawjee, T., Morrice, N., and Cleg-hon, V. (2006) *Mol. Cell* **24**, 627–633
30. Bax, B., Carter, P. S., Lewis, C., Guy, A. R., Bridges, A., Tanner, R., Pettman, G., Mannix, C., Culbert, A. A., Brown, M. J., Smith, D. G., and Reith, A. D. (2001) *Structure (Camb.)* **9**, 1143–1152
31. Kim, L., Liu, J., and Kimmel, A. R. (1999) *Cell* **99**, 399–408
32. Lesort, M., Jope, R. S., and Johnson, G. V. (1999) *J. Neurochem.* **72**, 576–584
33. Cole, A., Frame, S., and Cohen, P. (2004) *Biochem. J.* **377**, 249–255
34. Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., and Kemler, R. (1997) *EMBO J.* **16**, 3797–3804
35. Simpkins, K. L., Guttman, R. P., Dong, Y., Chen, Z., Sokol, S., Neumar, R. W., and Lynch, D. R. (2003) *J. Neurosci.* **23**, 11322–11331
36. Hernandez, F., Borrell, J., Guaza, C., Avila, J., and Lucas, J. J. (2002) *J. Neuro-chem.* **83**, 1529–1533
37. Hernandez, F., Perez, M., Lucas, J. J., Mata, A. M., Bhat, R., and Avila, J. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 3801–3806
38. Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W., and Cong, J. (2003) *Physiol. Rev.* **83**, 731–801
39. Klein, P. S., and Melton, D. A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 8455–8459
40. Ryves, W. J., and Harwood, A. J. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 720–725
41. Guttman, R. P., Baker, D. L., Seifert, K. M., Cohen, A. S., Coulter, D. A., and Lynch, D. R. (2001) *J. Neurochem.* **78**, 1083–1093
42. Kusakawa, G., Saito, T., Onuki, R., Ishiguro, K., Kishimoto, T., and Hisanaga, S. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 17166–17172
43. Nath, R., Davis, M., Probert, A. W., Kupina, N. C., Ren, X., Schielke, G. P., and Wang, K. K. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **274**, 16–21
44. Patzke, H., and Tsai, L. H. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 8054–8060
45. Wu, H. Y., Yuen, E. Y., Lu, Y. F., Matsushita, M., Matsui, H., Yan, Z., and Tomizawa, K. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 21588–21593
46. Kishimoto, A., Mikawa, K., Hashimoto, K., Yasuda, I., Tanaka, S., Tomi-naga, M., Kuroda, T., and Nishizuka, Y. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 4088–4092
47. Shea, T. B., Spencer, M. J., Beermann, M. L., Cressman, C. M., and Nixon, R. A. (1996) *J. Neurochem.* **66**, 1539–1549
48. Hajimohammadreza, I., Raser, K. J., Nath, R., Nadimpalli, R., Scott, M., and Wang, K. K. (1997) *J. Neurochem.* **69**, 1006–1013
49. Wang, Q. M., Fiol, C. J., DePaoli-Roach, A. A., and Roach, P. J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 14566–14574

Role of Polyglycine Repeats in the Regulation of Glycogen Synthase Kinase Activity

Félix Hernández¹, Alberto Gómez-Ramos¹, Paloma Goñi-Oliver¹, Jesús Avila^{1,*} and Nieves Villanueva²

¹Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" CSIC/UAM, Fac. Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain; ²Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Madrid. Majadahonda. 28220, Spain

Abstract: Glycogen synthase kinase (GSK3) activity present in one cell is the consequence of the sum of the activities of two different proteins called GSK3 α and GSK3 β . These isoenzymes are coded by two different genes and share an almost identical sequence at their catalytic domain, but differ in the sequence of putative regulatory regions. In this review, we propose that glycine repeats present only in GSK3 α may result in the different cleavage of both isoenzymes by the protease calpain, a cleavage that modifies GSK3 activity.

Keywords: GSK3 activity, polyglycine repeats, calpain.

INTRODUCTION

It is well known that the different twenty aminoacids, that can build a protein, appear with a different frequency in human proteins. In Table 1 is shown the frequency of those twenty aminoacids in an average human protein [1].

This different presence of an aminoacid in one protein could be the consequence of different factors like: A) The difference in the proportion of nucleotides, G + C or A + T, present in the gene that codifies for the protein. In the whole human genome, the G + C content is about 40%. B) The frequency of the presence of an aminoacid in a protein could be a consequence of the different number of codons used by a single aminoacid [2]. For example, leucine, the most abundant residue in human proteins, could be codified by six different codons, whereas tryptophan, the least abundant aminoacid, is only codified by one codon. C) In addition, other factors could be involved in that different frequency of appearance of single aminoacids in proteins. For example, it has been suggested that during evolution specific sequences of aminoacids have been selected to perform equivalent functions in different proteins [3,4], and, therefore, the prevalent aminoacids found in these sequences may account for their frequency in a proteome.

One of the specific sequences found in homologous and in analogous proteins [5] are single aminoacid repeats (longer than 10 residues). About 2,5% of the approximately 30.000 human gene products (Swiss Protein database) [6,7] contain some of these repeats (Table 2). Curiously, the aminoacid frequency in proteins, shown in Table 1, does not correspond to the frequency of single aminoacid repeats indicated in Table 2. The mechanism underlying the frequency

of single aminoacids repeats in proteins is, in germinal cells, the consequence of the selection through the evolution of those sequences whereas in somatic cells it is known that, in some neurodegenerative disorders, it could be the consequence of a deficient (repetitive) replicative lecture of the nucleotide triplet that codifies the repeated aminoacid [8].

The possible function for these single aminoacid repeats is not known. It has been suggested that depending on the nature of the repeated residue, the repeat could be involved in the stabilization of a specific protein conformation or, on the other hand, it may be related with the flexibility of the protein [9]. Also, a role for the repeats in the interaction with other proteins has been suggested [10]. In addition, as previously indicated, in some neurodegenerative disorders, the presence of some of these repeats could result in a toxic effect for the cells [11]. Some general functions for the single aminoacid repeats have been proposed (Table 3) based in the type and nature of proteins where they are present. Mainly, these repeats are present in transcription factors, or in proteins related with phosphorylation or dephosphorylation activities. Also, these repeats could be involved, as previously indicated, in an aberrant protein aggregation when the length of the repeat increases on a threshold [11].

Now, in this review, we propose that, for glycine repeats, the repeats could have a regulatory function in the enzymatic activity of a kinase. Mainly, in this minireview we will focus on the possible role of polyglycine when it is present in protein kinase, GSK3.

GLYCINE POLYMERS

Glycine residues confer conformational freedom to a protein by having a negative effect on the formation of secondary structures like β -sheet or α -helix [9]. Polyglycine can appear as two different structures, polyglycine I and II [12] that could be involved in different protein functions or dysfunctions [13-16]. Also, glycine could be post-translationally

*Address correspondence to this author at the Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", CSIC/UAM, Fac. Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain; Fax: +34 911964420; E-mail: javila@cbm.uam.es

Table 1. Percentage (Frequency) of Single Amino Acids in Human Proteome

Aminoacids	% Human in Proteoma
Alanine	8,0
Arginine	5,8
Asparagine	3,2
Aspartic Acid	4,5
Cysteine	2,1
Glutamic Acid	6,2
Glutamine	5,0
Glycine	7,3
Histidine	2,2
Isoleucine	3,8
Leucine	10,0
Lysine	5,0
Methionine	2,0
Phenilalanine	3,2
Proline	7,1
Serine	9,0
Threonine	6,0
Tryptophan	1,2
Tyrosine	2,2
Valine	6,2
	100,0

The frequency of the twenty aminoacids in human proteins is indicated (see reference 1).

Table 2.

Aminoacids	Number of Human Proteins with an Aminoacid Repeat Length ≥ 10
Poly-Alanine (A)	87
Poly-Arginine (R)	5
Poly-Asparagine (N)	50
Poly-Aspartic Acid (D)	26
Poly-Cysteine (C)	1
Poly-Glutamic Acid (E)	74
Poly-Glutamine (Q)	173
Poly-Glycine (G)	76
Poly-Histidine (H)	40

Poly-Isoleucine (I)	0
Poly-Leucine (L)	10
Poly-Lysine (K)	2
Poly-Methionine (M)	0
Poly-Phenilalanine (F)	2
Poly-Proline (P)	39
Poly-Serine (S)	70
Poly-Threonine (T)	25
Poly-Tryptophane (W)	0
Poly-Tyrosine (Y)	1
Poly-Valine (V)	0

The data were from Unit Prot Knowledgebase, Swiss protein data base (see text).

Table 3. Major Functions of Proteins Containing Contiguous Repeats (More than Two Proteins)

Poly-Alanine (A)	Transcription factors
Poly-Arginine (R)	Spermatc protein, protamine
Poly-Asparagine (N)	Transcription factors, PI3-kinases
Poly-Aspartic Acid (D)	PP2A regulatory subunit B, nuclear proteins
Poly-Cysteine (C)	Only one protein contain this repeat
Poly-Glutamic Acid (E)	Transcription factors, actin binding proteins, channel proteins, centromere B protein
Poly-Glutamine (Q)	Transcription factors, ataxins, huntingtin
Poly-Glycine (G)	Transcription factors, calpain small subunit, GSK3 α
Poly-Histidine (H)	Transcription factors
Poly-Isoleucine (I)	None
Poly-Leucine (L)	Membrane proteins
Poly-Lysine (K)	Only two proteins contain this repeat
Poly-Methionine (M)	None
Poly-Phenilalanine (F)	Only two proteins contain this repeat
Poly-Proline (P)	Transcription factors, actin binding proteins, PP2B- catalytic subunit
Poly-Serine (S)	Transcription factors, ataxin 7, glycogen synthase-homolog
Poly-Threonine (T)	None
Poly-Tryptophane (W)	None
Poly-Tyrosine (Y)	Only one protein contain this repeat
Poly-Valine (V)	None

Data were from Hnit Prot Knowledge (Swiss Protein) and TrEMBL.

incorporated in proteins like tubulin, from the flagellum of spermatozoa [17], or as polyglycine stretches in delta 2-tubulin [18]. Also, in axonemal tubulin of *Tetrahymena* [19], a tubulin polyglycylation that favours the stability of microtubule organelles [19], has been reported. In other proteins, as 14-3-3 from *Giardia duodenalis*, posttranslational modification by polyglycylation has been also observed [20].

By looking at proteins containing ten or more glycine repeats, these repeats are found in transcription factors (Table 3), in the small subunit of the calcium dependent protease calpain and in glycogen synthase-kinase 3 alpha isoenzyme (GSK3 α). Briefly, we will comment on calpain and GSK3 α .

CALPAIN

The first member of calpain family proteins was described long time ago [21]. Today, a whole calpain protein family has been identified [22]. Calpain proteins exist as heterodimers composed of a major catalytic subunit and a small regulatory subunit. This small subunit contains a polyglycine stretch [22] of unknown function. Calpains are calcium-dependent proteases that carry out limited proteolytic cleavage of cellular substrates including key signaling proteins as protein kinases. Thus, calpains cleave the regulatory domain of protein kinase C, the regulatory subunit of Cdk5 and also that of calmodulin kinase II (for a review see [22]). In addition, we have recently described that GSK3 is also a substrate for calpains [23]. All these data suggest a common pattern that connects calpain and different protein kinases. Thus, calpains may release kinases from their inhibitory mechanisms.

GSK3A

Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) is a serine/threonine kinase that was first identified as one of the several kinases that could modify glycogen synthase (GS). In mammals, there are two GSK-3 isoenzymes (α and β) that are the products of two independent genes. *GSK-3 α* gene encodes a 51-kDa protein while the *GSK-3 β* gene encodes a 47-kDa protein. GSK3 α and GSK3 β share 95% amino acid identity but they mainly differ in the presence, in GSK3 α but not in GSK3 β , of polyglycine stretches [24,25]. Apart from being an enzyme capable of phosphorylating glycogen synthase to inhibit glycogen synthesis [26], GSK3 may play a role in gene expression, cell dysfunction and apoptosis [27]. Also, it has been suggested that GSK3 activity can play a role in some viral infections since some residues of viral proteins, with the motif for GSK3 phosphorylation, are modified during the infection process [28]. In addition, a role for this kinase in neurodegenerative disorders, like Alzheimer disease, has been proposed [29].

GSK3 can be negatively regulated by the addition of insulin. This peptide initiates a cascade of events that results in the activation of protein kinase B, also known as Akt. The activated Akt phosphorylates a serine residue of GSK3 isoenzymes, Ser 21 in GSK3 α and Ser 9 in GSK3 β . These modifications result in GSK3 inactivation [30]. In the case of Ser 21 of GSK3 α , this residue is located in a region surrounded by polyglycine stretches. Despite a similar catalytic activity of both GSK3 isoforms, little is known about differ-

ences in their regulation. A similar response to insulin regulation has been indicated [30].

Wnt signalling could be another mechanism to regulate GSK3 activity [30]. It has been suggested, that in certain conditions, for example when GSK3 is bound to other proteins like the Wnt signalling complex, GSK3 can not be totally phosphorylated in response to insulin [31] but it is not known if GSK3 α and GSK3 β could behave in a similar way in these conditions.

However, different regulatory mechanisms for GSK3 α and GSK3 β must exist. Thus, it has been suggested a different functionality for GSK3 α and GSK3 β for the regulation of the production of Alzheimer disease amyloid β peptides [32] or in the regulation of hepatic glycogen metabolism [33], but little is known about the nature of these differences.

Also, it has been indicated that there is a different behaviour for GSK3 α and GSK3 β deficient mice. Mouse lacking GSK3 β die before birth, but GSK3 α knockout animals are viable [33]. Thus, those disorders that could be promoted by an increase in GSK3 activity could be treated by decreasing GSK3 activity, by trying a specific inhibition of GSK3 α , since the presence of that GSK3 isoform is not essential for the development of the animal. If a different type of regulation for GSK3 α and GSK3 β is found, it will be easier to look for specific inhibitors of GSK3 α that will not affect GSK3 β 's essential functions.

IS THERE A DIFFERENT MECHANISM FOR GSK3A AND GSK3B REGULATION?

Recently, it was indicated that calpain increases GSK3 α and β activity, although with different kinetics, suggesting a form to specifically regulate these isoenzymes [23]. Preliminary studies suggest that GSK3 activation, by calpain, is the consequence of the removal by the protease of the N-terminal region of the kinase molecule, where Ser 9 is present in GSK3 β . Around this region there are the glycine stretches in GSK3 α . Thus, our hypothesis is that those glycine stretches could modulate serine phosphorylation and/or calpain cleavage that could affect, in a different way, to both GSK3 isoenzymes. Indeed, for other proteolytic events a similar effect has been described, since in the ubiquitin-dependent proteolysis of NF- κ B p105, a glycine region appears to be "a processing stop signal for the proteolysis of the protein" [34].

Interestingly, lithium, a GSK-3 inhibitor, inhibits full-length and calpain-cleaved GSK-3 isoforms with the same IC(50) value [23] suggesting that GSK3 inhibitors could be also useful to inhibit that truncated forms. In addition, it should be tested if the presence of glycine stretches in calpain small subunit could also affect, in any way, that possible regulation of the cleavage of GSK3 isoenzymes by the protease. If it is the case, a possible role for polyglycine in calpain small subunit will be suggested.

In summary, little is known about the role of single amino acid repeats in proteins and a new type of analyses are needed to identify that role. However, we here propose that, at least in GSK3, polyglycine repeats could be able to modulate the amino terminal truncation induced by calpain in

those isoforms. It will suggest a different way to specifically regulate both GSK3 isoenzymes.

REFERENCES

- [1] Echols, N., Harrison, P., Balasubramanian, S., Luscombe, N.M., Bertone, P., Zhang, Z. and Gerstein, M. (2002) *Nucleic Acids Res* 30, 2515-23.
- [2] Nirenberg, M. and Leder, P. (1964) *Science* 145, 1399-407.
- [3] Perez-Iratxeta, C., Palidwor, G. and Andrade-Navarro, M.A. (2007) *EMBO Rep* 8, 1135-41.
- [4] Doolittle, R.F. (1995) *Annu Rev Biochem* 64, 287-314.
- [5] Fitch, W.M. (1970) *Syst Zool* 19, 99-113.
- [6] Bairoch, A. and Boeckmann, B. (1991) *Nucleic Acids Res* 19 Suppl, 2247-9.
- [7] Mulder, N.J. *et al.* (2007) *Nucleic Acids Res* 35, D224-8.
- [8] Gatchel, J.R. and Zoghbi, H.Y. (2005) *Nat Rev Genet* 6, 743-55.
- [9] Tzul, F.O., Kurchan, E. and Bowler, B.E. (2007) *J Mol Biol* 371, 577-84.
- [10] Friedman, M.J., Shah, A.G., Fang, Z.H., Ward, E.G., Warren, S.T., Li, S. and Li, X.J. (2007) *Nat Neurosci* 10, 1519-28.
- [11] Zoghbi, H.Y. and Orr, H.T. (2000) *Annu Rev Neurosci* 23, 217-47.
- [12] Krimm, S. (1966) *Nature* 212, 1482-3.
- [13] Brockschmidt, F.F., Nothen, M.M. and Hillmer, A.M. (2007) *J Mol Endocrinol* 39, 1-8.
- [14] Brito, M. *et al.* (2005) *Carcinogenesis* 26, 2046-9.
- [15] Tuzikov, A.B. *et al.* (2003) *Chembiochem* 4, 147-54.
- [16] Bonner, O.D. (1978) *Physiol Chem Phys* 10, 25-35.
- [17] Kann, M.L., Prigent, Y., Levilliers, N., Bre, M.H. and Fouquet, J.P. (1998) *Cell Motil Cytoskeleton* 41, 341-52.
- [18] Banerjee, A. (2002) *J Biol Chem* 277, 46140-4.
- [19] Thazhath, R., Liu, C. and Gaertig, J. (2002) *Nat Cell Biol* 4, 256-9.
- [20] Lalle, M., Salzano, A.M., Crescenzi, M. and Pozio, E. (2006) *J Biol Chem* 281, 5137-48.
- [21] Guroff, G. (1964) *J Biol Chem* 239, 149-55.
- [22] Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H., Wei, W. and Cong, J. (2003) *Physiol Rev* 83, 731-801.
- [23] Goni-Oliver, P., Lucas, J.J., Avila, J. and Hernandez, F. (2007) *J Biol Chem* 282, 22406-13.
- [24] Woodgett, J.R. (1990) *Embo J* 9, 2431-8.
- [25] Bhat, R.V., Budd Haeberlein, S.L. and Avila, J. (2004) *J Neurochem* 89, 1313-7.
- [26] Embi, N., Rylatt, D.B. and Cohen, P. (1980) *Eur J Biochem* 107, 519-27.
- [27] Beurel, E. and Jope, R.S. (2006) *Prog Neurobiol* 79, 173-89.
- [28] Asenjo, A., Rodriguez, L. and Villanueva, N. (2005) *J Gen Virol* 86, 1109-20.
- [29] Lucas, J.J., Hernandez, F., Gomez-Ramos, P., Moran, M.A., Hen, R. and Avila, J. (2001) *Embo J* 20, 27-39.
- [30] Cohen, P. and Goedert, M. (2004) *Nat Rev Drug Discov* 3, 479-87.
- [31] Ding, V.W., Chen, R.H. and McCormick, F. (2000) *J Biol Chem* 275, 32475-81.
- [32] Phiel, C.J., Wilson, C.A., Lee, V.M. and Klein, P.S. (2003) *Nature* 423, 435-9.
- [33] MacAulay, K., Doble, B.W., Patel, S., Hansotia, T., Sinclair, E.M., Drucker, D.J., Nagy, A. and Woodgett, J.R. (2007) *Cell Metab* 6, 329-37.
- [34] Cohen, S., Lahav-Baratz, S. and Ciechanover, A. (2006) *Biochem Biophys Res Commun* 345, 7-13.

Received: ?????????????? Revised: ?????????????? Accepted: ??????????????

Calpain-Mediated Truncation of GSK-3 in Post-Mortem Brain Samples

Paloma Goñi-Oliver,¹ Jesús Avila,^{1,2} and Félix Hernández^{1*}

¹Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa,” CSIC/UAM, Fac. Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

²CIBERNED, Madrid, Spain

GSK-3 activity can be regulated by phosphorylation and through interaction with GSK-3-binding proteins. In addition, we have recently demonstrated that calpain activation produces a truncation of GSK-3 that removes the N-terminal inhibitory domain (Goñi-Oliver et al. [2007] *J. Biol. Chem.* 282:22406). Given that calpain is involved in post-mortem proteolysis in brain samples, the objective of this investigation was to test whether GSK-3 is truncated in post-mortem samples. To achieve this objective, we first investigated the degradation of GSK-3 during different post-mortem intervals in mouse brains and found that the conversion of GSK-3 to proteolytic fragments of 40 and 30 kDa takes place in a way similar that of p35-CDK-5 subunit and spectrin, two well-known calpain substrates. In addition, we demonstrated that this truncation is mediated by calpain, insofar as pretreatment with MDL 28170, a permeable blood-brain barrier calpain inhibitor, partially inhibited that degradation. When human brain extracts were exposed to calcium, GSK-3 was truncated, generating two fragments of approximately 40 and 30 kDa, a proteolytic process that was inhibited by calpeptin, a specific calpain inhibitor. Thus, this is the first report of calcium-dependent truncation of human GSK-3. These data demonstrate that control samples with similar post-mortem delay are essential to interpret correctly the changes observed in GSK-3 levels in human post-mortem brain, especially when studying human neurodegenerative diseases. © 2008 Wiley-Liss, Inc.

Key words: calpain; post-mortem; GSK-3

GSK-3 is a serine/threonine protein kinase originally identified and named for its ability to phosphorylate the enzyme glycogen synthase (Cohen and Frame, 2001). GSK-3 exists as two isoenzymes (Woodgett, 1990), and it is now known to phosphorylate a variety of cytoplasmic and nuclear proteins, and their substrates include cytoskeletal proteins, transcription factors, and metabolic regulators. Accordingly, GSK-3 is involved in many physiological processes, and it plays important roles in embryonic development, cell differentiation, microtubule dynamics, cell cycle division, cell adhesion, glucose metabolism, and apoptosis (Frame and Cohen, 2001; Jope and Johnson, 2004). Deregulation of GSK-3 activity is believed to play a key role in the pathogenesis of

chronic central nervous system disorders such as Alzheimer's disease (AD), bipolar disorder, and Huntington's disease (Jope and Johnson, 2004; Avila and Hernández, 2007) as well as of metabolic disorders such as type II diabetes (Eldar-Finkelman, 2002). GSK-3 is regulated at the posttranslational level by phosphorylation at Ser-9 in GSK-3 β and at Ser-21 in GSK-3 α , and autophosphorylation at Tyr-216 of GSK-3 β or Tyr-276 of GSK-3 α seems necessary for its activation (Hughes et al., 1993; Lochhead et al., 2006). The first mechanism is triggered by insulin and growth factors, and it is mediated mainly by protein kinase B. A model for this inhibition has been generated through structural studies (Dajani et al., 2001; ter Haar et al., 2001) in which the phosphorylated Ser-9/21 binds as a competitive pseudosubstrate. The second mechanism of GSK-3 inhibition involves the wingless signaling pathway. GSK-3 contributes to a multiprotein complex formed by axin and adenomatous polyposis coli, in which it is able to phosphorylate β -catenin, targeting it for proteasome degradation (Aberle et al., 1997). Wnt proteins bind to the Frizzled receptor, activating the Dishevelled protein, which in turn inhibits GSK-3 activity by disrupting this multiprotein complex. As a consequence, β -catenin accumulates and translocates into the nucleus, where it activates transcription by interacting with certain transcription factors. Finally, an additional way of regulating GSK-3 has been recently proposed (Goñi-Oliver et al., 2007). This regulation involves the removal by calpain of a fragment from the N-terminal region of GSK-3, encompassing serines 9/21; after removal of that fragment, GSK-3 becomes activated. In primary cultures N-methyl-D-aspartate

Contract grant sponsor: Comunidad de Madrid (NEURODEGMO-DELS-CM); Contract grant sponsor: Spanish Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología; Contract grant sponsor: CIBER on Neurodegeneration; Contract grant sponsor: Fundación Ramón Areces.

*Correspondence to: Félix Hernández, Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa,” CSIC/UAM, Fac. Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain.
E-mail: fherandez@cbm.uam.es

Received 22 May 2008; Revised 13 August 2008; Accepted 10 September 2008

Published online 11 November 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jnr.21932

TABLE I. Sex, Age at Death, and Post-Mortem Interval of Control Brains Used in This Study*

Sex	Age (years)	Post-mortem interval
F	49	7 Hr
M	79	7 Hr
F	75	3 Hr
F	65	4 Hr
M	53	3 Hr
M	78	2 Hr 15 min
M	59	7 Hr 5 min
M	59	6 Hr 25 min

*Samples were from temporal cortex.

(NMDA)-activation induces calpain-mediated truncation of GSK-3 (Goñi-Oliver et al., 2007). Thus calpain has emerged as a new player in GSK-3 regulation.

Calpain is a family of calcium-activated intracellular cysteine proteases that catalyze limited proteolytic cleavage of a variety of cellular proteins in all eukaryotes (Goll et al., 2003). Calpain I and II, the two main components of the family, are present mainly as inactive precursors in the cell and bound to their endogenous inhibitor, called *calpastatin*. They are activated by autoproteolytic cleavage of the N-terminal sequence in response to calcium influx. Altered calcium homeostasis as well as truncation and activation of calpain I have been reported for AD brain (Saito et al., 1993; Taniguchi et al., 2001; LaFerla, 2002) and in different neurodegenerative processes (Patrick et al., 1999; Huang and Wang, 2001; Camins et al., 2006). Thus, calpains carry out limited proteolytic cleavage of cellular substrates, including such key signaling proteins as protein kinases (Goll et al., 2003).

GSK-3 is cleaved by calpain generating two breakdown products with apparent molecular masses of 40 (fragment I) and 30 (fragment II) kDa (Goñi-Oliver et al., 2007). A practical implication of that earlier study is in determining whether GSK-3 truncation is involved in chronic central nervous system disorders. However, taking into account that calpain is involved in post-mortem proteolysis in brain samples (Sorimachi et al., 1996), it is necessary to study whether GSK-3 is truncated in post-mortem samples and the effect of post-mortem delay in order to interpret correctly the changes observed in GSK-3 levels in human post-mortem brain samples, especially in human neurodegenerative disease. Thus, we have studied that process in post-mortem mice samples and then studied GSK-3 truncation in human samples.

MATERIALS AND METHODS

Human Samples

The brain samples were removed at autopsy from eight controls (Table I), following the protocol for donation of nervous tissue approved by the local Ethical Committees of the Barcelona and Bellvitge brain banks. The post-mortem delay in tissue processing was between 2.25 and 7 hr. Frozen

human brain tissues were homogenized in ice-cold extraction buffer as described below.

Animal Treatment

Animals (C57BL/6) were bred at the Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (Madrid, Spain). Four or five mice were housed per cage with food and water available ad libitum. Mice were maintained in a temperature-controlled environment on a 12/12-hr light-dark cycle with light onset at 07:00 hr. Two-month-old mice were killed with CO₂ and kept at room temperature (22°C) prior to brain excision. Then, the brains were removed at 0, 1, 3, 6, 12, and 24 hr. Inhibition of calpains was carried out with the blood-brain barrier-permeable calpain inhibitor MDL 28170 (Calbiochem, La Jolla, CA; Li et al., 1998). The inhibitor was administered i.p. The administration of MDL 28170 was carried out basically as described previously (Araujo et al., 2008). The treatment started with vehicle (DMSO), 20, 40, or 60 mg/kg, i.p., followed by two similar additional injections every 3 hr. The mice were then killed, and the brain samples were obtained as described previously 12 hr after death.

Calpain Cleavage of GSK-3

Human samples with a post-mortem period of 3 hr (see Table I) were homogenized in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, containing 1.0 mM EDTA. Samples were then incubated at 30°C for several minutes with or without 5.0 mM CaCl₂ and in the presence or absence of 10 μM calpeptin. Samples were then mixed with Laemmli sample buffer, electrophoresed, and processed for identification of the products of proteolysis by immunoblotting developed with antibodies to GSK-3 as described below.

SDS-PAGE and Immunoblotting

Extracts for Western blot analysis were prepared by homogenizing the tissues in ice-cold extraction buffer consisting of 20 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM NaCl, 10 mM NaF, 5 mM sodium pyrophosphate, 30 mM glycerol phosphate, 10 μM okadaic acid, 1% Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, and protease inhibitors (Roche cocktail). The samples were homogenized at 4°C, and protein content was determined by the Bradford method (Bio-Rad, Hercules, CA). Total protein (15 μg) was electrophoresed on 10% SDS-PAGE gel and transferred to a nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH). The experiments were performed with the following primary antibodies: anti-GSK-3α/β (1/1,000; from BioSource, Camarillo, CA), anti-pSer9/21-GSK-3α/β (1/500; from Cell Signaling Technology, Beverly, MA), anti-p25/35 (1/200) and anticalpastatin (1/200; from Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), antispectrin (1/1,000; from Chemicon International, Temecula, CA), and anti-β-actin (1/2,500; from Sigma, St. Louis, MO). The filters were incubated with the antibody at 4°C overnight in 5% nonfat dried milk. A secondary goat anti-mouse (1/1,000; Gibco, Grand Island, NY) followed by ECL detection reagents (Amersham, Arlington Heights, IL) was used for immunodetection.

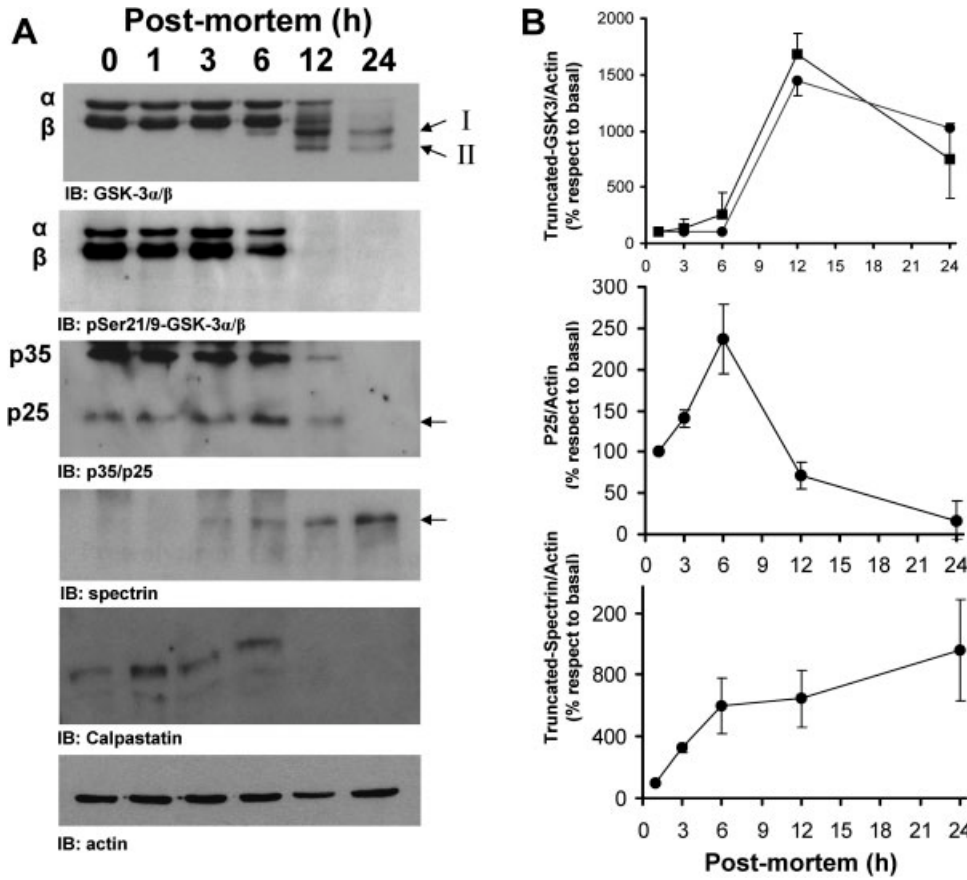


Fig. 1. Proteolysis of GSK-3 in mouse brain extracts with different post-mortem intervals. **A:** Equal amounts of brain extracts (15 μg) were immunoblotted (IB) at different post-mortem intervals (0–24 hr) with anti-GSK-3α/β, anti-pSer21/9-GSK-3α/β, anti-p35/25, antispectrin, anticalpastatin, and antiactin. Arrows show the truncated fragments of the different proteins. Arrows represent fragment I and fragment II from GSK-3, p25 from p35, and 150/145-kDa truncated spectrin fragments. **B:** Quantified data of samples shown in A. Data are expressed in terms of the percentage of protein present in each post-mortem time with respect to control levels (squares, fragment I; circles, fragment II).

Statistical Analysis

Statistical analysis of the data was performed by one-way analysis of variance.

RESULTS

Post-Mortem GSK-3 Degradation in Mouse Samples

To investigate the effect of post-mortem delay on protein degradation, we examined the levels of GSK-3, p35, and spectrin in mouse brains with post-mortem intervals of 1, 3, 6, 12, and 24 hr. Western blotting analysis showed that GSK-3 was not degraded during the first 3 hr. However, fragment I was generated after 6 hr of post-mortem, and fragment II was evident after 12 hr (Fig. 1). After 24 hr, no full-length isoforms were detected, and only the truncated forms were evident. A similar pattern was observed with p35, the CDK-5 regulatory subunit and a well-known calpain substrate (Kusakawa et al., 2000; Lee et al., 2000). As shown in Figure 1, p35 was degraded during the post-mortem period. When the brain was immediately homogenized after death, a strong p35 band and a weak p25 band were detected. After death, the p35 levels decreased, and p25, its cleaved product, increased (Fig. 1B). However, some differences seem to exist between GSK-3 and p35. Thus, the p35 post-mortem degradation showed a differ-

ent time course; p25 is generated more rapidly than GSK-3 fragments. Interestingly, the 150 kDa and 145 kDa fragments generated from spectrin, a well-known substrate for calpain (Czogalla and Sikorski, 2005), showed a different pattern. Thus the levels of truncated spectrin increased over post-mortem time. Interestingly, time course degradation of calpastatin follows a similar pattern, suggesting a relationship among calpain activation, calpastatin degradation, and protein truncation.

Calpain-mediated GSK-3 truncation takes place in the N-terminal end (Goñi-Oliver et al., 2007), where the phosphorylatable inhibitory domain exists. Thus, in good agreement, pSer9/21-GSK-3 antibody does not recognize fragments I and II (Fig. 1A). Again, no dephosphorylation process is evident at 3 hr, suggesting that, as proteases, phosphatases do not act on GSK-3 during the first 3 hr.

To confirm further that GSK-3 is cleaved by calpain, mice were treated with increasing amounts of the blood-brain barrier calpain inhibitor MDL 28170 (Li et al., 1998). MDL 28170 was given i.p. to mice, and then GSK-3 truncation was analyzed after a 12-hr post-mortem period. Compared with the control group, the MDL 28170-treated group showed better preserved GSK-3 levels (Fig. 2A) as well as a reduction of truncated forms (up to a 70% in the case of GSK-3 fragment II with 240 mg/kg; Fig. 2B). In addition, mice injected

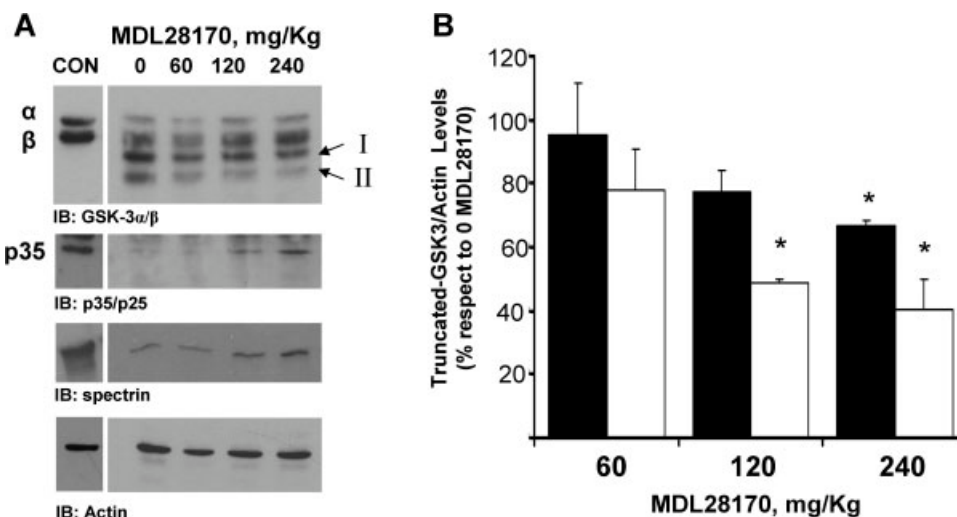


Fig. 2. Proteolysis of GSK-3 in mouse brain extracts of mice treated i.p. with MDL 28170. **A:** Equal amounts of brain extracts (15 μ g) with 12 hr post-mortem interval were tested with anti-GSK-3 α/β , anti-p35/25, antispectrin, and antiactin. Left panels show protein levels with a post-mortem period of 0 hr. **B:** Quantization of GSK-3 truncated forms is shown. Solid bars, fragment I; open bars, fragment II. * $P < 0.05$ ($n = 2$) vs. samples of mice untreated with MDL 28170.

with vehicle showed almost no p35 while MDL 28179 pretreatment markedly inhibited its degradation (Fig. 2A). Thus MDL 28179 partially prevents post-mortem GSK-3 truncation, further supporting the idea that calpain is responsible for the cleavage of GSK-3 in post-mortem samples.

Post-Mortem GSK-3 Degradation in Human Samples

We then tested whether GSK-3 was cleaved in human samples. We analyzed by Western blotting the pattern of GSK-3 bands and fragments in human brain tissue homogenized in the presence of Tris/EGTA. Although in the absence of calcium no degradation of GSK-3 was observed (Fig. 3A), the addition of CaCl_2 to these homogenates induced the time-dependent degradation of GSK-3 (Fig. 3A). Two breakdown products with apparent molecular masses of 40 (fragment I) and 30 (fragment II) kDa were observed, although the 30-kDa band was fainter, and its generation time course was slower (Fig. 3B). The involvement of calpain in the process was demonstrated insofar as the calcium-induced degradation was inhibited by calpeptin, a calpain inhibitor.

Next, we studied the status of GSK-3 in post-mortem samples from eight adult human brains without evident neurological diseases (Table I). To investigate the effect of post-mortem delay on GSK-3 degradation, we examined human samples with a post-mortem interval of 3–7 hr. Figure 3C shows quantification of the band intensities from the Western blot analysis. These data revealed a slight variation (although not statistically significant) in the levels of GSK-3 and p25 truncation with

respect to post-mortem delay, strongly suggesting that the data obtained with higher post-mortem delays should be interpreted with caution.

DISCUSSION

Here, we report for the first time calcium-dependent truncation of GSK-3 in human samples. Thus, GSK-3 was truncated in human brain extracts exposed to calcium, generating two fragments of approximately 40 and 30 kDa, a proteolytic process that was inhibited by calpeptin, a specific calpain inhibitor. In addition, we studied whether GSK-3 is truncated in post-mortem samples and the effect of post-mortem delay on that proteolysis. The main conclusion is that calpain seems to be involved in post-mortem generation of GSK-3 proteolytic fragments, although that process does not take place during the first post-mortem hours.

Previous post-mortem studies carried out in mice did not find any variation in the first 30 min in GSK-3 levels, although a rapid post-mortem dephosphorylation of GSK-3 was reported (Li et al., 2005). We also demonstrate here that GSK-3 truncation is not a process that happens rapidly, although dephosphorylation was slower than previously reported, probably because of differences in the post-mortem protocol. When we analyzed what happens with other related substrates, we observed that p35 is more rapidly truncated than GSK-3 in mouse samples. Several hypotheses can be suggested to explain that observation. First, GSK-3 is able to form multiprotein complexes, such as with axin and adenomatous polyposis coli (Aberle et al., 1997) or with 14-3-3 proteins (Agarwal-Mawal et al., 2003). GSK-3 in those complexes is likely protected against calpain degradation.

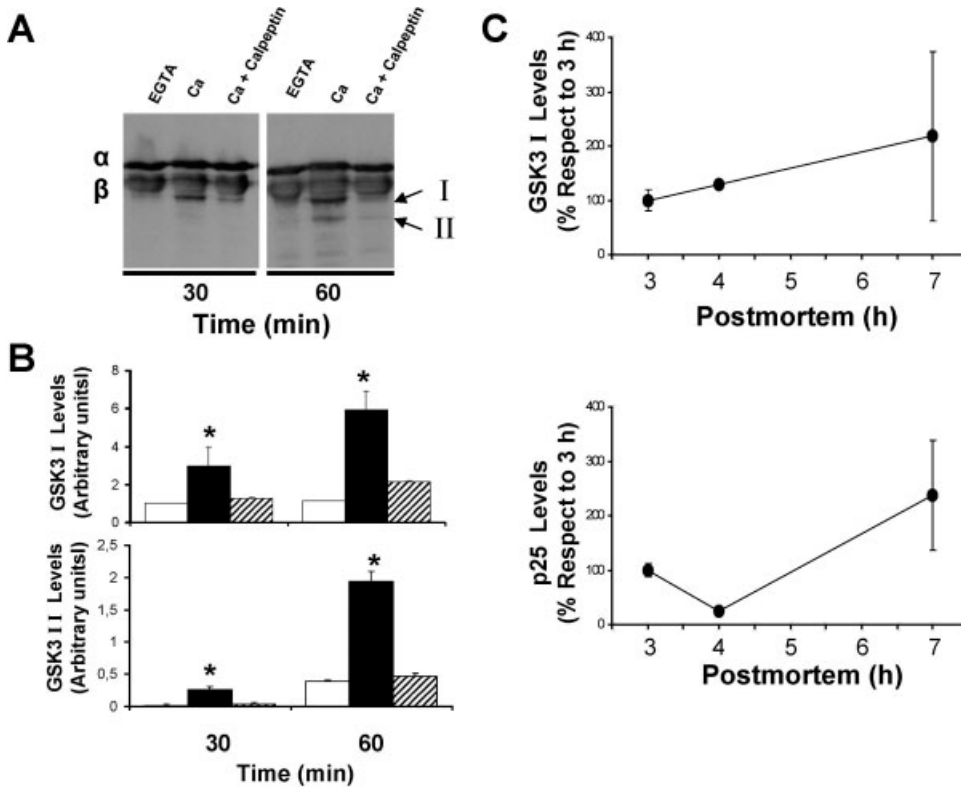


Fig. 3. Proteolysis of GSK-3 in human brain extracts. **A:** Time course of GSK-3 truncated accumulation in the presence of CaCl_2 . Equal amounts of human brain extracts (15 μg) were incubated at 30°C in the presence of 5 mM CaCl_2 or 1 mM EGTA, followed by Western blots probed with anti-GSK3 α/β . The effect of 10 μM calpeptin was also tested. **B:** Quantitation of GSK-3 truncated forms is shown. Open bars, without calcium; solid bars, with calcium; shaded bars, calcium plus calpeptin (* $P < 0.05$ vs. EGTA samples). **C:** Equal amounts of human brain extracts (15 μg) with different post-mortem intervals (see Table I) were tested with anti-GSK-3 α/β and anti-p35/25. To compare protein truncation in human samples, they were grouped into 3-, 4-, and 7-hr times. Quantizations of the reactions are shown.

Second, calpains exist in the cytosol in a latent form and translocate to membranes in response to calcium (Shepard et al., 1991), being membrane proteins more accessible to calpain degradation than the cytosolic ones (Jiang et al., 2007). Thus, taking into account that p35-CDK-5 is a membrane complex (Kusakawa et al., 2000), whereas GSK-3 is mainly a cytoplasmatic enzyme, it could be speculated that p35 is more accessible than GSK-3. Finally, although the contribution of other proteinases cannot be excluded, it is also possible that p35 would be a better calpain substrate than GSK-3.

The reason why calpain is activated in post-mortem samples has not been studied here. However, in addition to the dissipation of calcium stores taking place during the post-mortem period and the subsequent activation of calpain, degradation of calpastatin, the endogenous calpain inhibitor, seems to be the main reason, because calpain is activated (Fig. 1; see also Sorimachi et al., 1996).

As described previously (Goñi-Oliver et al., 2007), we have observed here a different time-course generation among GSK-3 fragments. A possible explanation for this is that GSK-3 is sequentially truncated by calpain first into the fragment I and then into fragment II. The physiological and pathological significance of GSK-3 cleavage by calpain is unclear. However, calpains cleave the regulatory domain of protein kinase C, the regulatory subunit of Cdk5, as well as calmodulin kinase II (for review see Goll et al., 2003). Given that GSK3 is also a substrate for calpains (present data; Goñi-Oliver

et al., 2007), a common pattern that connects calpain and different protein kinases seems to exist.

Our study has one main practical implication. GSK-3 truncation seems to be a process that does not take place immediately after death. In fact, human brain samples do not show a statistically significant increase in GSK-3 truncation during the interval analyzed, 3–7 hr. These data will help in studying the involvement of the calpain/GSK-3 pathway in human samples from different nervous system disorders such as AD and related diseases.

In summary, the present study is the first showing calpain-dependent truncation of human GSK-3 and that calpain promotes GSK-3 truncation in samples with a long post-mortem interval. Further studies will be required to elucidate fully the role of calpain-mediated GSK-3 truncation and to evaluate how this process affects transduction pathways in which GSK-3 is involved.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. J.J. Lucas for helpful discussion and comments and Dr. Isidro Ferrer for human brain samples.

REFERENCES

- Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. 1997. Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 16:3797–3804.
- Agarwal-Mawal A, Qureshi HY, Cafferty PW, Yuan Z, Han D, Lin R, Paudel HK. 2003. 14-3-3 Connects glycogen synthase kinase-3 beta to

- tau within a brain microtubule-associated tau phosphorylation complex. *J Biol Chem* 278:12722–12728.
- Araujo IM, Gil JM, Carreira BP, Mohapel P, Petersen A, Pinheiro PS, Soulet D, Bahr BA, Brundin P, Carvalho CM. 2008. Calpain activation is involved in early caspase-independent neurodegeneration in the hippocampus following status epilepticus. *J Neurochem* 105:666–676.
- Avila J, Hernández F. 2007. GSK-3 inhibitors for Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother* 7:1527–1533.
- Camins A, Verdager E, Folch J, Pallas M. 2006. Involvement of calpain activation in neurodegenerative processes. *CNS Drug Rev* 12:135–148.
- Cohen P, Frame S. 2001. The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:769–776.
- Czogalla A, Sikorski AF. 2005. Spectrin and calpain: a “target” and a “sniper” in the pathology of neuronal cells. *Cell Mol Life Sci* 62:1913–1924.
- Dajani R, Fraser E, Roe SM, Young N, Good V, Dale TC, Pearl LH. 2001. Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. *Cell* 105:721–732.
- Eldar-Finkelman H. 2002. Glycogen synthase kinase 3: an emerging therapeutic target. *Trends Mol Med* 8:126–132.
- Frame S, Cohen P. 2001. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* 359:1–16.
- Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. 2003. The calpain system. *Physiol Rev* 83:731–801.
- Goñi-Oliver P, Lucas JJ, Avila J, Hernández F. 2007. N-terminal cleavage of GSK-3 by calpain: a new form of GSK-3 regulation. *J Biol Chem* 282:22406–22413.
- Huang Y, Wang KK. 2001. The calpain family and human disease. *Trends Mol Med* 7:355–362.
- Hughes K, Nikolakaki E, Plyte SE, Totty NF, Woodgett JR. 1993. Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *EMBO J* 12:803–808.
- Jiang SX, Kappler J, Zurakowski B, Desbois A, Aylsworth A, Hou ST. 2007. Calpain cleavage of collapsin response mediator proteins in ischemic mouse brain. *Eur J Neurosci* 26:801–809.
- Jope RS, Johnson GV. 2004. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci* 29:95–102.
- Kusakawa G, Saito T, Onuki R, Ishiguro K, Kishimoto T, Hisanaga S. 2000. Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator to p25. *J Biol Chem* 275:17166–17172.
- LaFerla FM. 2002. Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 3:862–872.
- Lee MS, Kwon YT, Li M, Peng J, Friedlander RM, Tsai LH. 2000. Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature* 405:360–364.
- Li PA, Howlett W, He QP, Miyashita H, Siddiqui M, Shuaib A. 1998. Postischemic treatment with calpain inhibitor MDL 28170 ameliorates brain damage in a gerbil model of global ischemia. *Neurosci Lett* 247:17–20.
- Li X, Friedman AB, Roh MS, Jope RS. 2005. Anesthesia and post-mortem interval profoundly influence the regulatory serine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 in mouse brain. *J Neurochem* 92:701–704.
- Lochhead PA, Kinstry R, Sibbet G, Rawjee T, Morrice N, Cleghon V. 2006. A chaperone-dependent GSK3beta transitional intermediate mediates activation-loop autophosphorylation. *Mol Cell* 24:627–633.
- Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, delaMonte S, Dikkes P, Tsai LH. 1999. Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* 402:615–622.
- Saito K, Elce JS, Hamos JE, Nixon RA. 1993. Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: a potential molecular basis for neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2628–2632.
- Sheppard A, Wu J, Bahr BA, Lynch G. 1991. Compartmentation and glycoprotein substrates of calpain in the developing rat brain. *Synapse* 9:231–234.
- Sorimachi Y, Harada K, Yoshida K. 1996. Involvement of calpain in postmortem proteolysis in the rat brain. *Forensic Sci Int* 81:165–174.
- Taniguchi S, Fujita Y, Hayashi S, Kakita A, Takahashi H, Murayama S, Saïdo TC, Hisanaga S, Iwatsubo T, Hasegawa M. 2001. Calpain-mediated degradation of p35 to p25 in postmortem human and rat brains. *FEBS Lett* 489:46–50.
- ter Haar E, Coll JT, Austen DA, Hsiao HM, Swenson L, Jain J. 2001. Structure of GSK3beta reveals a primed phosphorylation mechanism. *Nat Struct Biol* 8:593–596.
- Woodgett JR. 1990. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J* 9:2431–2438.

**MEMANTINE INHIBITS CALPAIN-MEDIATED TRUNCATION OF GSK-3
INDUCED BY NMDA; ALZHEIMER DISEASE IMPLICATIONS**

Paloma Goñi-Oliver, Jesús Avila and Félix Hernández

**From the Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, CSIC/UAM, Fac. Ciencias,
Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain**

Running title: Memantine inhibits GSK-3 truncation

Address correspondence to: Félix Hernández, Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”,
CSIC/UAM, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain; Tel.:
+34 91 196 45 63; fax: +34 91 196 44 20; E-mail address: fhernandez@cbm.uam.es

Running title: Memantine inhibits GSK-3 truncation

ABSTRACT

Deregulation of GSK-3 activity is believed to play a key role in the pathogenesis of Alzheimer disease. GSK-3 activity is regulated by phosphorylation and through interaction with GSK-3-binding proteins. Besides, we have recently demonstrated that calpain activation produces a truncation of GSK-3 (*J Biol. Chem* 282:22406, 2007). We here first demonstrate that calpain-mediated GSK-3 truncation induced by NMDA depend on extracellular calcium. Primary cultures of cortical neurons treated with NMDA reduce GSK-3 levels up to a 75%, although truncated GSK-3 form does not accumulate, suggesting that a short-lived product is formed. The data obtained with human Alzheimer disease samples suggest that, although a great variability exists, at least in post-mortem samples, truncated GSK-3 does not accumulate. However, memantine, an un-competitive NMDA receptor which has been approved for the treatment of moderate-to-severe Alzheimer Disease patients, is able to inhibit GSK-3 truncation induced by NMDA in primary cultures of cortical neurons in a dose dependent manner. Thus, memantine modulates GSK-3 signalling and can explain its protective role in Alzheimer disease. The data here provided reinforce the important relationship between the NMDA receptors and GSK-3 suggesting its involvement in the first steps of neurodegenerative diseases as Alzheimer Disease.

195 words

Keywords: Alzheimer disease; calpain; GSK-3; NMDA; proteolysis.

INTRODUCTION

Deregulation of GSK-3 activity is believed to play a key role in the pathogenesis of chronic central nervous system disorders such as Alzheimer disease (AD), bipolar disorder, and Huntington disease [1, 2], as well as of metabolic disorders such as type II diabetes [3]. In addition, altered calcium homeostasis as well as truncation and activation of calpain, have been reported in AD brain [4-8] and in different neurodegenerative process [9-11]. Thus, calpains carry out limited proteolytic cleavage of cellular substrates including key signaling proteins as protein kinases [12].

We have recently described a link between both processes. Thus, GSK-3 is cleaved by calpain generating breakdown products [13]. Accordingly, GSK-3 activity can be regulated by phosphorylation, interaction with GSK-3-binding proteins and through truncation promoted by calpain. Moreover, we have previously demonstrated that in the same experimental conditions used in this study, NMDA-mediated GSK-3 proteolysis alters its kinase activity. Thus, primary cultures treated with NMDA showed a significant increase in GSK-3 activity when compared with cultures treated with vehicle and NMDA-induced increase in GSK-3 activity was inhibited by calpeptin [13]. The more likely hypothesis is that calpain activation produces a truncation of GSK-3 that removes the N-terminal inhibitory domain. Interestingly, activation of NMDA receptors has been proposed to contribute to AD. In fact, treatment of AD patients with memantine, an inhibitor of NMDA receptor channels, results in functional improvement and reduction of care dependence [14]. Memantine exerts its therapeutic effect through its action as an uncompetitive NMDA receptor antagonist. Memantine prevents the overactivation of NMDA-type glutamate receptors, which results in excessive Ca²⁺ influx through the ion channel.

An important implication of those studies is to know if GSK-3 truncation is involved in chronic central nervous system disorders as AD. To further deep in that hypothesis we have

first analysed GSK-3 truncation in post-mortem AD samples and, in second place, studied the effect of memantine on NMDA-induced GSK-3 truncation in primary neuronal cultures.

MATERIALS AND METHODS

Primary Cultures. Primary cultures of cortical neurons were prepared according to modifications of established procedures [15]. Briefly, pups were sacrificed at postnatal day 1. Cortical tissue was then dissected and dissociated individually from each pup with the papain dissociation system (Worthington Biochemical Corp.). Cortical neurons were maintained in neurobasal medium (Invitrogen) supplemented with 1% B-27, 5% fetal calf serum, 0.5 mM glutamine, 100 units/ml penicillin, and 100 mg/ml streptomycin and grown on 3 µg/ml laminin (Sigma) and 10 µg/ml poly-L-lysine-coated cover plates. The cells were incubated in 95% air, 5% CO₂ in a humidified incubator at 37 °C. Cytosine arabinoside (2.5 µM) was added to cultures on the second day after seeding (DIV3) to inhibit the proliferation of non-neuronal cells. Cells were used for experiments at DIV12.

Drug Treatment. Memantine was dissolved in water. IC₅₀ values were calculated between 100-0.1 µM concentration of memantine (n=3). NMDA was dissolved in culture medium. Drugs were added 30 min before the stimulation of NMDA receptors with 100 µM NMDA. Experiments were performed in the presence of glycine 100 µM.

Human samples. The brain samples (temporal cortex) were removed at autopsy from five controls and five Alzheimer disease (Table I) following the protocol for donation of nervous tissue approved by the local Ethical Committees of the Barcelona and Bellvitge brain banks. The post-mortem delay in tissue processing was between 1.45 and 7 h. Frozen human brain tissues were homogenized in ice-cold extraction buffer consisting of 20 mM HEPES (pH 7.4),

100 mM NaCl, 50 mM NaF, 5 mM sodium pyrophosphate, 30 mM glycerol phosphate, 10 μ M okadaic acid, 1% Triton X-100, 1mM sodium orthovanadate, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA and protease inhibitors (Roche cocktail). The samples were homogenized at 4°C and protein content determined by Bradford method (BioRad).

SDS-PAGE and immunoblotting. Samples were electrophoresed on 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred to a nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell, Keene, NH). The experiments were performed using the following primary antibodies: anti-GSK-3 α/β (1/1000; from BioSource, Camarillo, CA), anti-p25/35 (1/200; from Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-spectrin (1/1000, from Chemicon International, Temecula, CA), anti- α -tubulin (1/2500, from Sigma), PHF-1(1/100, which recognize tau protein when serines 396 and 404 are phosphorylated was a kind gift of Dr. Davies). The filters were incubated with the antibody at 4°C overnight in 5% nonfat dried milk. A secondary goat anti-mouse antibody (1/1000; Invitrogen, San Diego, CA) and ECL detection reagents (Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL) were used for immunodetection. Quantification was performed by densitometric scanning. The densitometry values were obtained in the linear range of detection with these antibodies. These values were normalized with respect to the values obtained with an anti- α -tubulin antibody to correct for any deviation in loaded amounts of protein or respect to the values obtained with anti-tubulin antibody to correct for total protein content.

Statistical Analysis. Statistical analysis of the data was performed using one-way analysis of variance (ANOVA).

RESULTS

Truncation of GSK-3 is mediated by NMDA

Treatment of cultured cortical neurons with NMDA(100 μ M) induced GSK-3 truncation in a time-dependent manner ([13] and (Fig. 1A)). It is interesting to note that the truncated GSK-3 fragment does not accumulate. In fact, after 48 h of treatment GSK-3 protein (isoforms α and β) decreased a $75.9\pm 15.2\%$. A possible explanation for this is that when GSK-3 is truncated by calpain a short-lived product is formed which is rapidly degraded.

The NMDA effect was mediated by calpain as evidenced by the fact that calpeptin (10 μ M) prevented the formation of the 40 kDa truncated form (Fig. 1B). We next addressed whether the GSK-3 truncation by calpain after stimulation of ionotropic NMDA receptors could be observed in the presence of an extracellular calcium chelator as EGTA or after treatment with BAPTA-AM, an intracellular calcium chelator. BAPTA-AM (25 and 100 μ M, Fig. 1B) had any effect on GSK-3 truncation. In contrast, activation of the NMDA receptors in the presence of extracellular EGTA (5 mM) led to inhibition of GSK-3 proteolysis. These data suggest that extracellular calcium influx into cortical neurons caused by NMDA receptors increase GSK3 truncation through calpain activation.

Post-mortem GSK-3 degradation in human Alzheimer disease samples

Human control brain samples do not show a statistically significant increase in GSK-3 truncation during the 3-7 first post-mortem hours [16]. Accordingly, we studied the status of GSK-3 in post-mortem samples from five adult human brains without evident neurological diseases and from five adult human brains with Alzheimer disease with 3-7 h post-mortem delay (Table I). Fig. 2 shows western-blot and quantification of the 40 kDa-truncated form. These data revealed a slight variation (although no statistically significant) in the levels of GSK-3 truncation. We also analyzed by western blotting the human samples with the antibody PHF-1 which recognize hyperphosphorylated tau (Fig. 2) in order to find a correlation among GSK-3 truncation and PHF-1 intensity. However, when we performed that analysis only a slight positive correlation but not significant between both signals was found

in AD samples ($R^2=523$; Fig. 1C). Nevertheless, it should be indicated that PHF-1 epitope is phosphorylated by GSK-3 and other kinases as for example CDK-5 and CK-1 (for a review see [17]).

NMDA-triggered generation of truncated GSK-3 is inhibited by memantine.

As we have seen before incubation of mouse cortical neurons with NMDA causes calpain dependent GSK3 truncation[13]. Taking into account that memantine, a non-competitive NMDA antagonist, is clinically used in the treatment of Alzheimer disease, we studied the effect of that compound in primary cultures of cortical neurons. Memantine preincubation blocked in a dose-dependent manner ($IC_{50}=1.81\pm 0.95 \mu M$) NMDA(100 μM) - mediated GSK-3 proteolysis (Fig. 3). We then investigated whether p35, the regulator subunit of Cdk-5 which is truncated to p25 by calpain [18, 19] takes place in our experimental conditions. When we blotted the primary culture samples with an antibody which recognizes the p35/p25 protein we observed a similar pattern with an $IC_{50}= 6.33\pm 3.41 \mu M$. Thus, memantine prevents the overactivation of NMDA-type glutamate receptors resulting in inhibition of NMDA-triggered generation of truncated GSK-3 and p35. Interestingly, spectrin, a well-known substrate for calpain [20], showed a similar pattern ($IC_{50}= 1.14\pm 0,87 \mu M$).

DISCUSSION

The present investigation examined, in first place, NMDA-induced truncation of GSK-3 in cortical primary cultures. These studies extend previous one demonstrating that calpain promotes GSK-3 truncation and increases GSK-3 activity [13]. We here demonstrate that continuous NMDA receptor activation (in the presence of glycine) provokes GSK-3 truncation, being that process dependent of extracellular calcium since extracellular EGTA is able to totally block NMDA effects. Interestingly, 40 kDa-truncated form does not

accumulate, suggesting that when GSK-3 is truncated by calpain a short-lived product is formed which is rapidly degraded.

We also show that GSK-3 levels can be regulated by memantine. The present investigation examined NMDA-induced truncation of GSK-3 β in cortical primary cultures demonstrating that memantine is able to inhibit that truncation. Interestingly the IC₅₀ values obtained for NMDA-induced truncation of GSK-3 β are similar to spectrin and p35, two proteins that has been previously demonstrated to be good calpain substrates. These data suggest that memantine effects can be explained as down-stream inhibition of the activation of calpain.

A related question is whether GSK-3 truncation is linked to mechanisms of AD. To carry out that study, a first concern is involved with the post-mortem interval. Thus, calpain is involved in post-mortem proteolysis in brain samples [21], being necessary to study the effect of post-mortem delay in order to interpret correctly the changes observed in proteins. However, GSK-3 truncation seems to be a process that does not take place immediately after death. In fact, human brain samples do not show a statistically significant increase in GSK-3 truncation during the interval analyzed, 3-7 h [16]. When we analyzed GSK-3 truncation in AD human samples we did not find accumulation of 40 kDa-truncated forms. In addition, we did not find a significant difference with the control samples, although a great variability could be observed. On the other hand, a positive correlation between tau phosphorylation (measured with the antibody PHF-1) and GSK-3 truncation could be suggested although is not significant (Fig. 2C). These results show that GSK-3 truncation does not take place clearly at least in the final stage of AD (stage V, see Table I). However, taking into account that continuous NMDA activation does not induce an accumulation of the truncated form (Fig. 1A), it can be speculated that GSK-3 truncation could takes place in the first stages of AD.

Moreover, calpain activation at very early stages of NFT formation has been previously described [22].

In summary, GSK-3 fragments do not significantly accumulate in postmortem AD samples although memantine, a NMDA receptor antagonist which has been approved for the treatment of moderate-to-severe Alzheimer Disease patients, is able to inhibit GSK-3 truncation induced by NMDA in primary cultures of cortical neurons in a dose dependent manner.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Isidro Ferrer for human brain samples. This work was supported by grants from the Comunidad de Madrid (NEURODEGMODELS-CM), the Spanish Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, , and the CIBER on Neurodegeneration and by institutional grants from the Fundación Ramón Areces.

References

- [1] Avila J, Hernandez F (2007) GSK-3 inhibitors for Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother* **7**, 1527-1533.
- [2] Jope RS, Johnson GV (2004) The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci* **29**, 95-102.
- [3] Eldar-Finkelman H (2002) Glycogen synthase kinase 3: an emerging therapeutic target. *Trends Mol Med* **8**, 126-132.
- [4] LaFerla FM (2002) Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* **3**, 862-872.
- [5] Saito K, Elce JS, Hamos JE, Nixon RA (1993) Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: a potential molecular basis for neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2628-2632.
- [6] Taniguchi S, Fujita Y, Hayashi S, Kakita A, Takahashi H, Murayama S, Saido TC, Hisanaga S, Iwatsubo T, Hasegawa M (2001) Calpain-mediated degradation of p35 to p25 in postmortem human and rat brains. *FEBS Lett* **489**, 46-50.
- [7] Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Oda Y, Tomizawa K, Gong CX (2005) Truncation and activation of calcineurin A by calpain I in Alzheimer disease brain. *J Biol Chem* **280**, 37755-37762.

- [8] Liang Z, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX (2007) Down-regulation of cAMP-dependent protein kinase by over-activated calpain in Alzheimer disease brain. *J Neurochem* **103**, 2462-2470.
- [9] Camins A, Verdaguer E, Folch J, Pallas M (2006) Involvement of calpain activation in neurodegenerative processes. *CNS Drug Rev* **12**, 135-148.
- [10] Huang Y, Wang KK (2001) The calpain family and human disease. *Trends Mol Med* **7**, 355-362.
- [11] Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, delaMonte S, Dikkes P, Tsai LH (1999) Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* **402**, 615-622.
- [12] Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J (2003) The calpain system. *Physiol Rev* **83**, 731-801.
- [13] Goni-Oliver P, Lucas JJ, Avila J, Hernandez F (2007) N-terminal cleavage of GSK-3 by calpain: a new form of GSK-3 regulation. *J Biol Chem* **282**, 22406-22413.
- [14] Reisberg B, Doody R, Stoffler A, Schmitt F, Ferris S, Mobius HJ (2003) Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N Engl J Med* **348**, 1333-1341.
- [15] Hernandez F, Perez M, Lucas JJ, Mata AM, Bhat R, Avila J (2004) Glycogen synthase kinase-3 plays a crucial role in tau exon 10 splicing and intranuclear distribution of SC35. Implications for Alzheimer's disease. *J Biol Chem* **279**, 3801-3806.
- [16] Goni-Oliver P, Avila J, Hernandez F (2009) Calpain-mediated truncation of GSK-3 in post-mortem brain samples. *J Neurosci Res* **87**, 1156-1161.
- [17] Hanger DP, Anderton BH, Noble W (2009) Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med* **15**, 112-119.
- [18] Kusakawa G, Saito T, Onuki R, Ishiguro K, Kishimoto T, Hisanaga S (2000) Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator to p25. *J Biol Chem* **275**, 17166-17172.
- [19] Lee MS, Kwon YT, Li M, Peng J, Friedlander RM, Tsai LH (2000) Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature* **405**, 360-364.
- [20] Czogalla A, Sikorski AF (2005) Spectrin and calpain: a 'target' and a 'sniper' in the pathology of neuronal cells. *Cell Mol Life Sci* **62**, 1913-1924.
- [21] Sorimachi Y, Harada K, Yoshida K (1996) Involvement of calpain in postmortem proteolysis in the rat brain. *Forensic Sci Int* **81**, 165-174.
- [22] Grynspan F, Griffin WR, Cataldo A, Katayama S, Nixon RA (1997) Active site-directed antibodies identify calpain II as an early-appearing and pervasive component of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Brain Res* **763**, 145-158.

Table I. Sex, age at death and post-mortem interval of control and Alzheimer disease brains used in this study. Samples were from temporal cortex.

	SEX	AGE	DIAGNOSTIC	POST-MORTEM INTERVAL
1	WOMAN	49	WL	7 h
2	MAN	79	WL	7 h
3	WOMAN	75	WL	3 h
4	WOMAN	65	WL	4 h
5	MAN	53	WL	3 h
6	MAN	69	AD V	6h
7	WOMAN	83	AD V	5 h
8	MAN	79	AD V + AA	5 h 25 min
9	MAN	86	AD V + AA	4 h 15 min
10	WOMAN	82	AD V	1 h 45 min

WL: without lesions; **AD V:** stage V of Alzheimer disease; **AA:** amyloid angiopathy.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Calcium influx through NMDA receptors induces GSK-3 proteolysis. **A**, cortical neurons (DIV12) were treated with 100 μ M NMDA for 0.5 to 48 h. The samples were immunoblotted (*IB*) with the anti-GSK-3 α/β antibody. The generation of a 40-kDa GSK-3 truncated form is shown by the *arrow*. **B**, Cortical neurons were treated with 100 μ M NMDA in the presence or absence of the calpain inhibitor calpeptin (10 μ M) for 3 h. NMDA induces GSK-3 proteolysis as seen by the appearance of a 40-kDa immunoreactive peptide recognized by the antibody anti-GSK-3 α/β (*arrow*). Extracellular EGTA (5 mM) inhibits that truncation, while BAPTA-AM (25 μ M) does not inhibit GSK-3 truncation (BAPTA-AM 100 μ M shows the same effect, data not shown). Tubulin is shown as loading control.

Figure 2. Proteolysis of GSK-3 in human Alzheimer disease brain extracts. **A**, equal amounts of human brain extracts (15 μ g) were probed with anti-GSK-3 α/β antibody. The same samples were immunoblotted with the PHF-1 antibody. Numbers correspond to human samples described in Table I. **B**, quantization of 40-kDa GSK-3 truncated form of human samples shown in A. Open bars, media \pm SD of control samples; dark bars, media \pm SD of Alzheimer disease samples. **C**, correlation of GSK-3 truncation (*Y* axis) with PHF-1 intensity (*X* axis). A positive correlation was not found between both signals in AD samples ($r^2=0.523$).

Figure 3. NMDA-triggered generation of truncated GSK-3 is inhibited by memantine. **A**, Cortical neurons were treated with 100 μ M NMDA in the presence or absence of the calpain inhibitor calpeptin (10 μ M) or Memantine (100 μ M) for 3 h. GSK-3 proteolysis induced by NMDA is inhibited by both inhibitors. **B**, cortical neurons (DIV12) were treated with 100 μ M NMDA for 3 h. In addition, cells were treated with either vehicle or growing concentrations of memantine. The samples were immunoblotted (*IB*) with the anti-GSK-3 α/β antibody (*upper panel*). The generation of a 40-kDa GSK-3 truncated form is shown by the *arrow*. The same samples were immunoblotted with the anti-p35/p25 antibody and the antibody that recognizes spectrin, a well known calpeptin substrate. *Arrows* show the full-length p35 protein (*upper arrow in middle panel*) and the truncated p25 fragment (*lower arrow in middle panel*) as well as the 150/145-kDa truncated spectrin fragments (*lower panel*). Tubulin is shown as loading control.

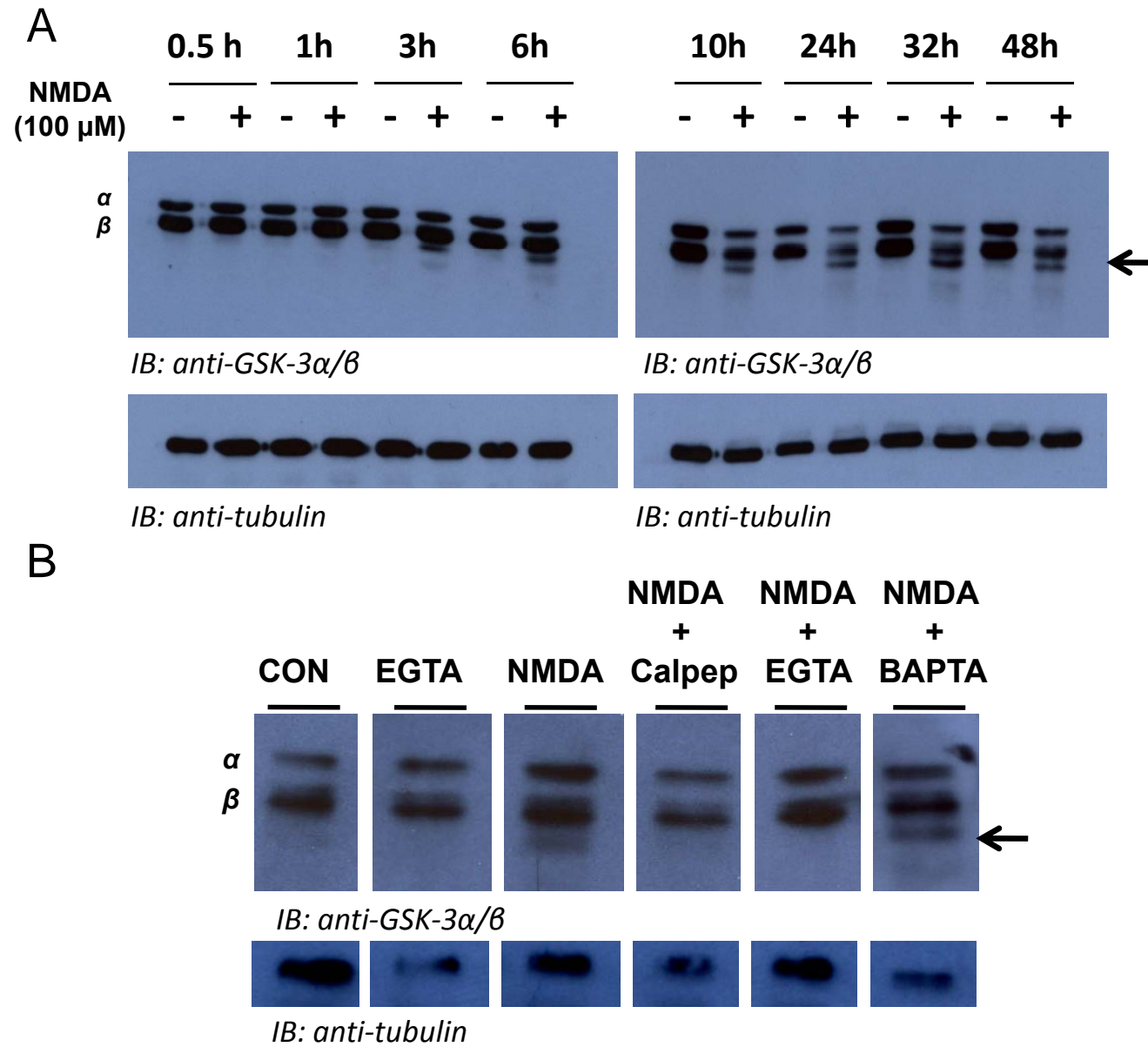


Figure 1. Goñi-Oliver et al.

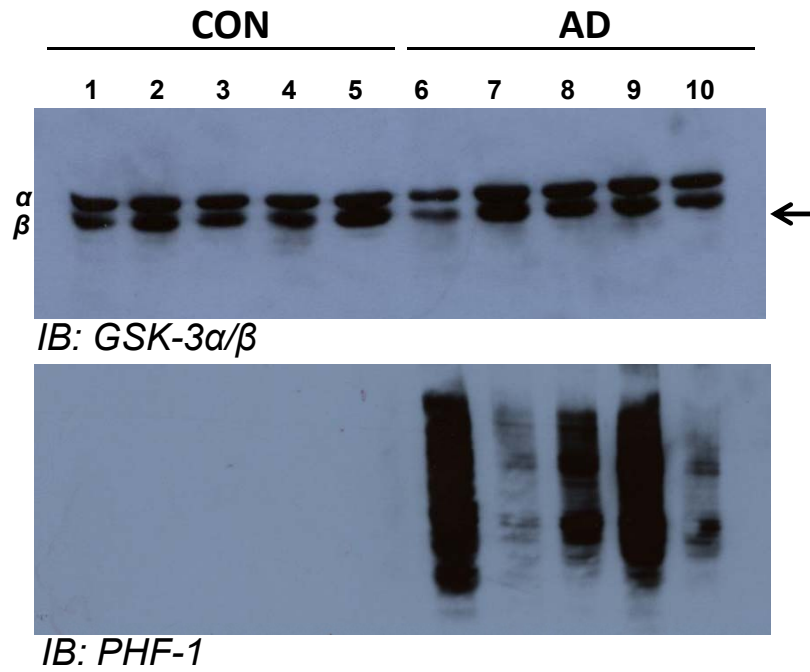
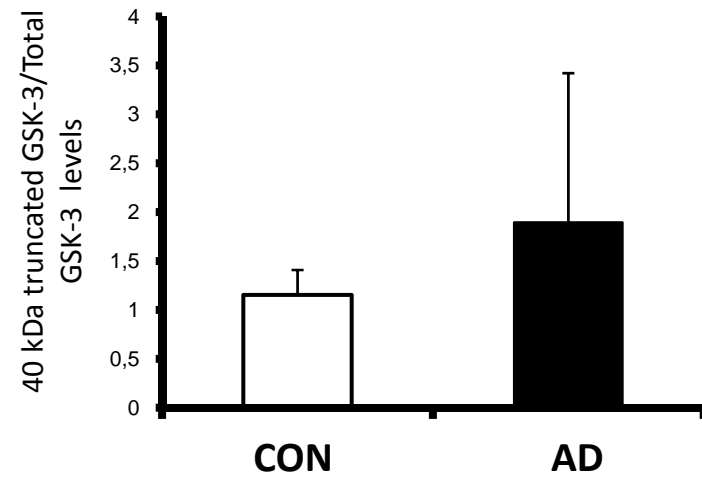
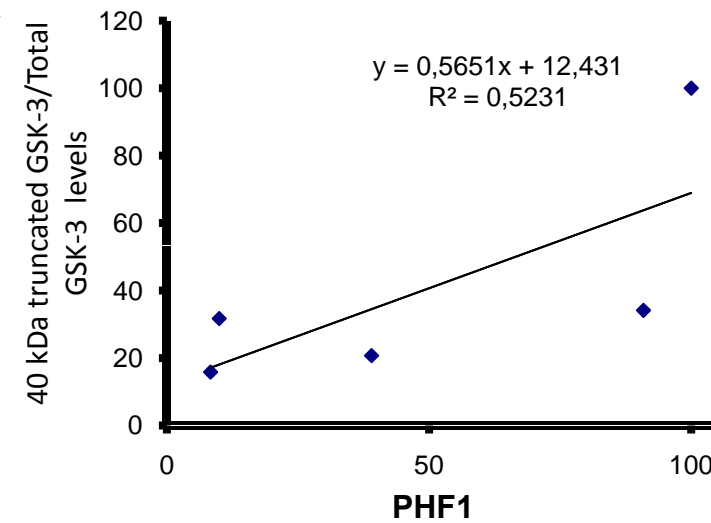
A**B****C**

Figure 2. Goñi-Oliver et al

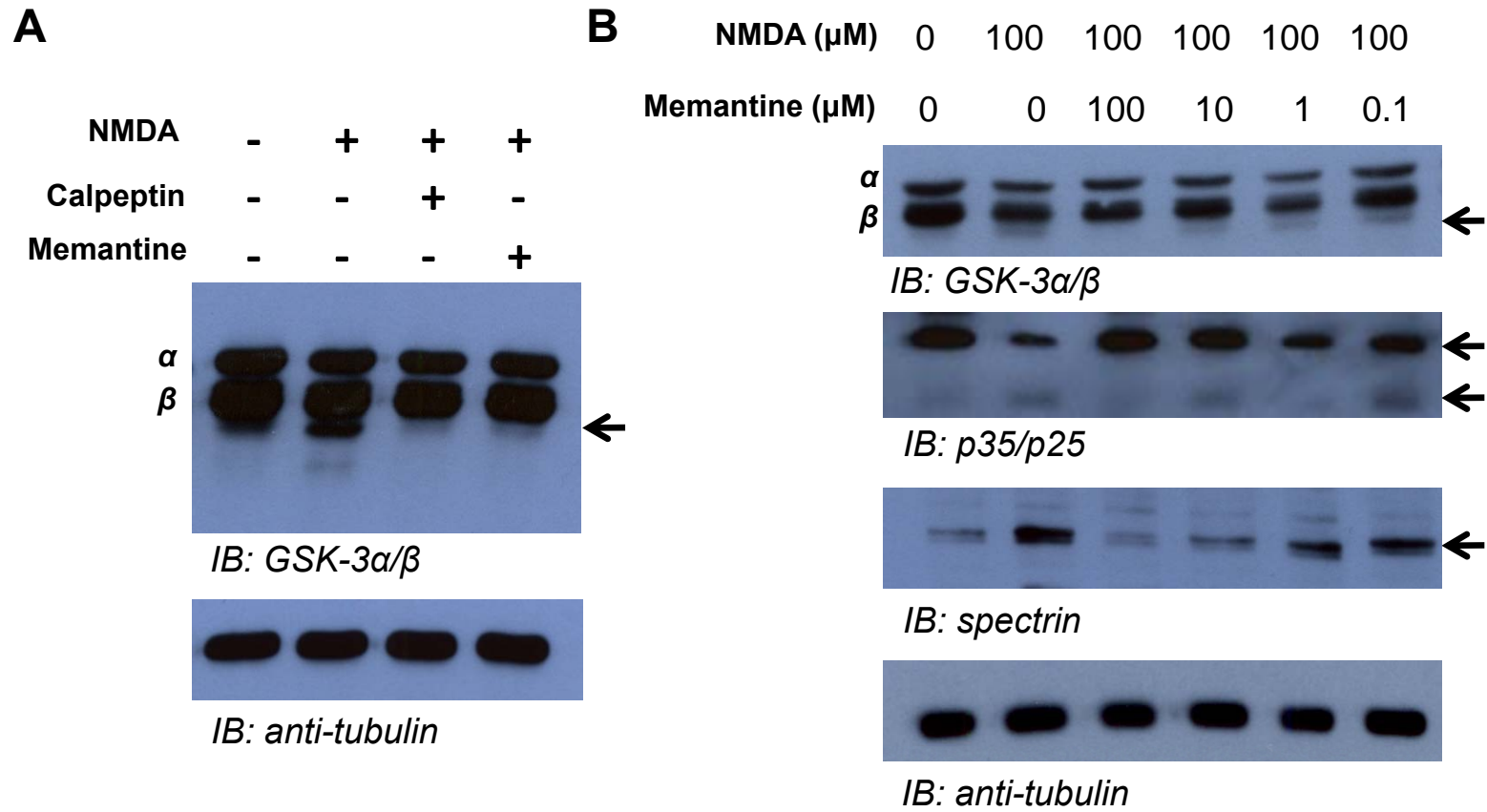


Figure 3. Goñi-Oliver et al.

Chronic lithium administration to FTDP-17 tau and GSK-3 β overexpressing mice prevents tau hyperphosphorylation and neurofibrillary tangle formation, but pre-formed neurofibrillary tangles do not revert

Tobias Engel, Paloma Goñi-Oliver, José J. Lucas, Jesús Avila and Félix Hernández

Centro de Biología Molecular 'Severo Ochoa', Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

Abstract

Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) has been proposed as the main kinase able to aberrantly phosphorylate tau in Alzheimer's disease (AD) and related tauopathies, raising the possibility of designing novel therapeutic interventions for AD based on GSK-3 inhibition. Lithium, a widely used drug for affective disorders, inhibits GSK-3 at therapeutically relevant concentrations. Therefore, it was of great interest to test the possible protective effects of lithium in an AD animal model based on GSK-3 overexpression. We had previously generated a double transgenic model, overexpressing GSK-3 β in a conditional manner, using the Tet-off system and tau protein carrying a triple FTDP-17 (frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17) mutation. This transgenic line shows tau hyperphosphorylation in hippocampal neurones accompanied by neurofibrillary tangles (NFTs). We used this transgenic model to address two issues: first, whe-

ther chronic lithium treatment is able to prevent the formation of aberrant tau aggregates that result from the overexpression of FTDP-17 tau and GSK-3 β ; second, whether lithium is able to change back already formed NFTs in aged animals. Our data suggest that progression of the tauopathy can be prevented by administration of lithium when the first signs of neuropathology appear. Furthermore, it is still possible to partially reverse tau pathology in advanced stages of the disease, although NFT-like structures cannot be changed. The same results were obtained after shut-down of GSK-3 β overexpression, supporting the possibility that GSK-3 inhibition is not sufficient to reverse NFT-like aggregates.

Keywords: Alzheimer's disease, frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17, glycogen synthase kinase-3, lithium, neurofibrillary tangles.

J. Neurochem. (2006) **99**, 1445–1455.

Abnormal aggregation of tau protein into filamentous structures and extensive neuronal loss are found in several neurological disorders, known as tauopathies, that are frequently associated with different forms of dementia (Goedert and Spillantini 2001). Genetic analyses have linked over 30 distinct mutations in the human *tau* gene on chromosome 17 to a disease referred to as 'frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17' (FTDP-17) (Goedert 2005). FTDP-17 is characterized by the accumulation of neurofibrillary tangles (NFT) composed of tau protein filaments within affected neurones. Similar NFTs are also histopathological hallmarks of the other tauopathies (Avila *et al.* 2004). In Alzheimer's disease (AD) and in the other tauopathies, independently of whether these *tau* gene mutations occur or not, tau protein becomes hyperphosphorylated (Grundke-Iqbal *et al.* 1986; Kosik

1992), and it has been hypothesized that hyperphosphorylated tau misfolds, disassembles from microtubules and forms aberrant filamentous aggregates that give rise to NFTs (Kosik 1992; Alonso *et al.* 2001).

Glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) has been proposed as the main kinase able to aberrantly phosphorylate tau

Received April 10, 2006; revised manuscript received July 14, 2006; accepted July 19, 2006.

Address correspondence and reprint requests to Félix Hernández, Centro de Biología Molecular 'Severo Ochoa', CSIC/UAM, Fac. Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain. E-mail: fherandez@cbm.uam.es

Abbreviations used: AD, Alzheimer's disease; FTDP-17, frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17; GSK-3, glycogen synthase kinase-3; NFT, neurofibrillary tangles; TR, Thiazin Red.

in AD. GSK-3 β has been shown to phosphorylate tau in most sites hyperphosphorylated in NFTs, both in transfected cells (Lovestone *et al.* 1996) and *in vivo* (Hong *et al.* 1997; MunozMontano *et al.* 1997). Increased levels of GSK-3 β have been found in AD brains. It also accumulates in the cytoplasm of pre-tangle neurones and can be found associated with NFTs (Yamaguchi *et al.* 1996; Imahori and Uchida 1997; Pei *et al.* 1999). Exposure of cortical and hippocampal primary neuronal cultures to β -amyloid induces activation of GSK-3 β (Takashima *et al.* 1996), tau hyperphosphorylation (Busciglio *et al.* 1995; Ferreira *et al.* 1997) and cell death (Takashima *et al.* 1993; Busciglio *et al.* 1995). Blockade of GSK-3 β expression by antisense oligonucleotides (Takashima *et al.* 1993) or by pharmacological inhibition (Alvarez *et al.* 1999) inhibits β -amyloid-induced neurodegeneration of cortical and hippocampal primary cultures. Furthermore, interaction between GSK-3 β and many of the cellular components related to the neuropathology of AD, such as the β -amyloid peptide and its precursor protein, the metabolic pathway leading to acetylcholine synthesis and the presenilins, which are mutated in many cases of familial AD (for review see Grimes and Jope 2001), have also been described.

All these data raise the possibility of designing novel therapeutic interventions for AD based on the inhibition of GSK-3 (Bhat *et al.* 2004). Lithium, a widely used drug for affective disorders, inhibits GSK-3 at therapeutically relevant concentrations (Klein and Melton 1996). Previous studies have suggested that lithium may be a useful drug for modulating tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in AD (Alvarez *et al.* 1999). First, lithium treatment has been shown to inhibit tau phosphorylation both in cultured neuronal cells and *in vivo* in rat brain (MunozMontano *et al.* 1997, 1999). Second, lithium also blocks cell death in cultured neurones treated with β -amyloid peptide (Alvarez *et al.* 1999). Third, lithium seems to provide neuroprotection against a variety of toxic insults both in cultured neurones and *in vivo* in several animal models (Chen and Chuang 1999; King *et al.* 2001). Finally, some evidence from brain imaging studies is consistent with a neurotrophic/neuroprotective effect of chronic lithium treatment in patients with bipolar mood disorder (Moore *et al.* 2000). In addition, lithium has been demonstrated to have a beneficial effect in two FTDP-17 mouse models (Perez *et al.* 2003; Noble *et al.* 2005), as well as in a mouse model that expresses the shortest human tau isoform (Nakashima *et al.* 2005). Therefore, it was of great interest to test the possible protective effects of lithium in a tauopathy animal model based on GSK-3 overexpression.

We have previously generated a transgenic mouse that overexpresses GSK-3 β and FTDP-17 tau in certain brain regions (Engel *et al.* 2006b). These mice, termed GSK-3/VLW, show tau hyperphosphorylation in CA1 hippocampal neurones, the region where the pattern of expression of both transgenes overlaps. Tau filaments with a paired helical

filaments (PHF)-like structure were found in GSK-3/VLW mice but not in single transgenic mice expressing only GSK-3 β or FTDP-17 tau. PHF-like filament formation in GSK-3/VLW mice was accompanied by thioflavin-S staining. All these data suggest that there is a synergistic contribution of both types of tau modification, hyperphosphorylation and missense mutations to induce aberrant tau aggregation. Here, we have used this animal model to address the following two questions: first, whether chronic lithium treatment is able to prevent the formation of aberrant tau aggregates (formed by overexpression of FTDP-17 tau and of GSK-3 β); and second, whether lithium is able to return already formed tau aggregates and NFTs to their former state in aged animals. Our results indicate that lithium is able to prevent the development of tau pathology when administered early in disease progression. On the other hand, if lithium is administered at late stages of the disease, it is still able to reduce tau hyperphosphorylation but cannot reverse tau aggregation.

Materials and methods

Animals

GSK-3 β mice were generated as previously described (Lucas *et al.* 2001). Briefly, GSK-3 β mice result from the breeding of TetO mice (carrying the bi-directional tet responsive promoter followed by GSK-3 β and β -galactosidase cDNAs, one in each direction) with CamKII β -tTA mice. The double transgenic mice are designated GSK-3 β and overexpress GSK-3 β in cortical and hippocampal neurones. Generation of the mouse line, VLW, which is transgenic for a human 4-repeat tau isoform with two N-terminal exons carrying the FTDP-17 mutations G272V, P301L and R406W (humanTau^{VLW}), has been described previously (Lim *et al.* 2001). Neurone-specific expression of mutant tau protein was achieved by using the neurone-specific mouse Thy1.2 promoter. Mice homozygous for hTauVLW were crossed with doubly-transgenic GSK-3 β mice to generate GSK-3/VLW triple transgenic mice (Engel *et al.* 2006b). Transgenic mice were genotyped by PCR (Lim *et al.* 2001; Lucas *et al.* 2001). Transgenic and wild-type mice (C57BL/6) were bred at the Centro de Biología Molecular 'Severo Ochoa' (Madrid, Spain). Four to five mice were housed per cage with food and water available *ad libitum*. Mice were maintained in a temperature-controlled environment on a 12/12 h light-dark cycle with light onset at 07:00 hours.

Lithium administration

Two protocols were used to analyse the effects of lithium (Perez *et al.* 2003). To study the preventative effects of lithium, 12-month-old mice were fed chow containing 1.7 g LiCl/kg chow for 7.5 months. In order to analyse the reversion effects of lithium, 18-month-old mice were fed chow containing 1.7 g LiCl/kg chow for 4 weeks, followed by a diet containing 2.55 g LiCl/kg chow for 2 weeks. To prevent hyponatremia, water and NaCl solution (450 mM) were available to all animals. Control mice were fed lithium-free chow under parallel conditions. Blood lithium levels were analysed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS).

Doxycycline treatment

VLW and GSK-3/VLW mice were given doxycycline (2 mg/mL; Sigma, St Louis, MO, USA) in drinking water, *ad libitum*, for 12 weeks, starting at 18 months-of-age, as described previously (Engel *et al.* 2006a). We have previously demonstrated that 6 weeks of doxycycline treatment restores normal GSK-3 levels in GSK-3 β mice.

Antibodies

The following anti-tau antibodies were used: PHF-1 was a kind gift of Dr Davies; AT8 was from Innogenetics (Gent, Belgium); 7.51 is a pan-tau antibody that recognizes human and mouse tau (a kind gift of Dr Wischik); T14 was from Zymed Laboratories, Inc. (South San Francisco, CA, USA). According to the residue numbering of the longest human tau isoform of 441 amino acids, antibody PHF-1 recognizes serines 396 and 404 when they are phosphorylated, AT8 recognizes tau when Ser199/202 are phosphorylated (Biernat *et al.* 1992), and T14 recognizes amino acids 141–178 of human tau but fails to recognize murine tau (Merrick *et al.* 1996). Sources of other commercial antibodies were: anti-pSer9/21-GSK-3 α/β (BioSource (Nivelles, Belgium)), anti-GSK-3 α/β (BioSource), anti- β -galactosidase (Promega, Madison, WI, USA), anti-myc (Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA, USA), anti- α -tubulin (Sigma).

Western blot analysis

Extracts for western blot analysis were prepared by homogenizing the tissues in ice-cold extraction buffer consisting of 20 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM NaCl, 10 mM NaF, 1% Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate, 10 mM EDTA and protease inhibitors [2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 μ g/mL aprotinin, 10 μ g/mL leupeptin and 10 μ g/mL pepstatin]. The samples were homogenized at 4°C and the protein content was determined by the Bradford method (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Total protein (10 μ g) was electrophoresed on 10% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) gel and transferred to a nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Dassel, Germany). The experiments were performed using the following primary antibodies: T14 (1/1000), AT8 (1/100), PHF-1 (1/1000), anti- α -tubulin (1/10 000), anti- β -galactosidase (1/5000) and anti-GSK-3 α/β (1/1000). The filters were incubated with the antibody at 4°C overnight in 5% non-fat dried milk. A secondary goat anti-mouse (1/5000; Dako Cytomation (Glostrup, Denmark)) followed by enhanced chemiluminescence (ECL) detection reagents (Amersham, Uppsala, Sweden) were used for immunodetection.

Isolation of sarkosyl-insoluble filaments and immunoelectron microscopy

Preparation of sarkosyl-insoluble extracts from mouse brain and electron microscopy of filaments were carried out as described previously (Perez *et al.* 1998), following the procedure described by Greenberg and Davies (1990). Filaments were visualized by electron microscopy. Immunoelectron microscopy was performed after adsorption of the samples to electron microscopy carbon-coated grids and incubation with the first antibody (1/100) for 1 h at 22°C. After extensive washing, the grids were incubated with the secondary antibody (1/40) conjugated with 10 nm diameter gold particles. Finally, the samples were stained with 2% uranyl acetate for 1 min. Transmission electron microscopy was performed in a

JEOL model 1200EX electron microscope (Akishima, Tokyo, Japan) operated at 100 kV.

Volumetric measurement of dentate gyrus atrophy

To quantify dentate gyrus atrophy mice were anaesthetized and killed by transcardiac perfusion fixation with 4% paraformaldehyde. The brains were removed from the skull and post-fixed in 4% paraformaldehyde. Serial sections (30 μ m) were cut as described previously and thionine stained (Engel *et al.* 2006b). For volumetric measurement, areas of dentate gyrus were delineated and measured by means of the Methamorph image-analysis system (Universal Imaging, West Chester, PA, USA). The total volume (mm³) of each dentate gyrus was calculated by integration of areas (mm²) with the distance between each sagittal plane (mm). The points for integration were 0.12 mm (see Fig. 12 in Paxinos and Franklin 2001) and 3.00 mm (Fig. 126, Paxinos and Franklin 2001) with respect to the midline.

Immunohistochemistry, immunofluorescence and Thiazin Red staining

Mice were anaesthetized with a xylazine/ketamine solution and transcardially perfused with 4% paraformaldehyde (PFA) in Sorensen's buffer for 10 min. Brains were post-fixed in 4% PFA for 2 h at 4°C and cryoprotected in 30% sucrose solution. Sagittal sections (30 μ m) were cut on a freezing microtome (Leica, Wetzlar, Germany) and collected in 0.1% azide-phosphate-buffered saline (PBS) solution. Next, brain sections were pre-treated for 1 h with 1% bovine serum albumin (BSA), 5% fetal bovine serum (FBS) and 0.2% Triton X-100, then incubated with primary antibodies at the following dilutions: T14 (1/100), AT8 (1/250) and PHF-1 (1/200). Finally, brain sections were incubated in avidin–biotin complex using the Elite Vectastain kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Chromogen reactions were performed with diaminobenzidine (DAB; Sigma) and 0.003% H₂O₂ for 10 min. Sections were coverslipped with Fluorosave (Calbiochem; La Jolla, CA, USA).

We also performed immunofluorescence and Thiazin Red staining in the same sections, as described previously (Mena *et al.* 1995). Sections were rinsed in PBS-0.1% Triton-X100 and incubated in 1% glycine-PBS-Triton X-100 buffer. Then, slices were treated with PBS containing 0.1% Triton X-100 and 1% fetal calf serum for 30 min. After a brief wash with PBS, the slices were incubated for 1 h with the primary antibodies AT8 (1/100). They were then extensively washed and incubated with the appropriate secondary antibody, conjugated with fluorescein isothiocyanate (Jackson Laboratories, West Grove, PA, USA) for 45 min. Thiazin Red (0.01% in PBS) incubation (10 min) was conducted at the end of the protocol and after washing, the sections were immediately mounted with Fluoromount. Immunofluorescence was performed using confocal scanning microscopy (Bio-Rad) coupled to a vertical microscopy Axioskop2 (Zeiss, Oberkochen, Germany).

Results

Lithium treatments; effects on blood levels

An age-dependent tau pathology occurs in GSK-3/VLW mice overexpressing GSK-3 and FTDP-17-tau proteins

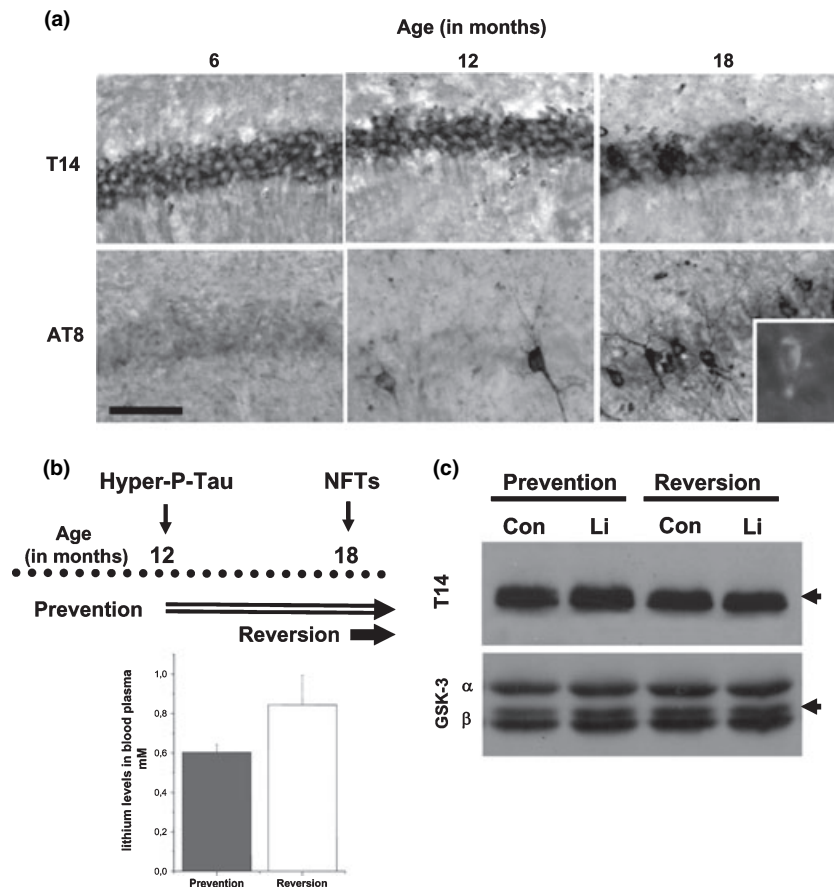


Fig. 1 Tau neuropathology in GSK-3/VLW mice and lithium treatment paradigms to study either prevention or reversion of tau neuropathology. (a) An age-dependent tau pathology occurs in mice overexpressing GSK-3 and FTDP-17 tau. Thus, some phospho-tau-positive pyramidal neurones can be found in the hippocampal CA1 sector at the age of 12 months. In 18-month-old GSK-3/VLW mice, the number of phospho-tau-positive neurones increases and tau filaments 20 nm wide are formed that give rise to NFTs. Immunohistochemistry carried out with T14 (upper panels) and AT8 (lower panels) antibodies is shown for GSK-3/VLW mice at 6, 12 and 18 months. The inset shows a Thiazin Red-positive neurone that was found in pyramidal neurones only at the age of 18 months. Calibration bar corresponds to 100 μ m.

(Engel *et al.* 2006b). In this animal model, tau pathology starts at 12 months and reaches a maximum at 18 months, when NFT-like pathology can be observed (Fig. 1a). In order to analyse the effects of lithium on tau pathology, two protocols were used. To study the preventive potential of lithium, 12-month-old mice were fed with a low lithium dose for 7.5 months. At the beginning of treatment (12 months), these animals showed some diffuse phospho-tau-positive staining in pyramidal neurones of the CA1 hippocampal region (see Engel *et al.* 2006b and Fig. 1a). In this first paradigm (Prevention), lithium levels in the blood were 0.62 ± 0.04 mM at the end of the treatment (Fig. 1b). In order to analyse the reversal potential of lithium, 18 month-

(b) Taking into account this pattern of tau pathology in our transgenic model, we carried out two kinds of experiments. The first type ('prevention') consisted of giving a low dose of lithium (1.7 g LiCl/kg chow) to 12-month-old animals for 7.5 months. The second type (reversion) consisted of giving 18-month-old animals a low dose of lithium for 4 weeks and then a high lithium dose (2.55 g LiCl/kg chow) for 2 additional weeks. Plasma lithium concentration measured by ICP-MS is shown. Error bars indicate SE. (c) Western blot analysis of recombinant proteins from hippocampal extracts. Protein extracts from GSK-3/VLW mice treated with vehicle or both lithium concentrations were probed with anti-tau antibodies, T14, and anti-GSK-3 α/β . Arrows show transgenic proteins.

old-mice were fed with a high lithium dose for 6 weeks. As mentioned above, 18-month-old mice showed a strong tau pathology with detectable NFT pathology and tau filaments (Engel *et al.* 2006b), Fig. 1(a). Blood lithium levels in this second paradigm (reversion) were 0.84 ± 0.15 mM at the end of the treatment (Fig. 1b).

Hippocampal extracts from control and lithium-treated GSK-3/VLW mice were probed with the human-specific T14 antibody that does not recognize murine tau. This antibody revealed that levels of FTDP-17 tau protein were similar in all animals tested (Fig. 1c). In the same way, western blot analysis was used to monitor the levels of GSK-3. By probing extracts from control and treated mice with an

antibody that recognizes both GSK-3 α and β , we observed a similar increase in GSK-3 β levels in the hippocampus of GSK-3/VLW mice, regardless of treatment (Fig. 1c). GSK-3 is inhibited by a direct action of lithium as a competitive inhibitor of magnesium, and indirectly by increased phosphorylation of Ser9/21 (Zhang *et al.* 2003). Quantification of western blots (Ser9 phosphorylated GSK-3 β vs. unphosphorylated GSK-3 β form) in both paradigms showed a slight increase in Ser9 phosphorylation (data not shown), although no statistical differences among untreated and lithium-treated mice were observed. Thus, our results confirm a previous report that Ser9 phosphorylation is evident only after short lithium treatments and not after chronic treatments (Noble *et al.* 2005). From these experiments we therefore conclude that none of the lithium treatments altered FTDP-17 tau or GSK-3 β levels.

Prevention of tau pathology in GSK-3/VLW mice by lithium administration

To determine whether tau hyperphosphorylation was decreased in GSK-3/VLW mice treated with lithium for 7.5 months, we compared tau phosphorylation in GSK-3/VLW mice treated with vehicle or lithium (Fig. 2a). We used antibodies that can recognize tau protein in epitopes phosphorylated in AD by GSK-3. Thus, we used two antibodies

that are able to recognize phospho-tau in epitopes flanking the microtubule binding domain (MBD): AT8 (N-terminal to MBD) and PHF-1 (C-terminal to MBD). An increase in AT8 and PHF-1 immunostaining was evident in the CA1 region of the hippocampus from control GSK-3/VLW mice, while in mice treated with lithium, immunodetection of tau phosphorylation was absent (Fig. 2a). With both antibodies, patches of dark reaction product were observed in the perikaryon of CA1 neurones of GSK-3/VLW untreated mice. High levels of hyperphosphorylated somatodendritic tau in CA1 of GSK-3/VLW control mice is expected to favour the formation of fibrillary deposits. To analyse tau pathology further, we next prepared sarkosyl-insoluble protein from the hippocampus of control and lithium-treated mice. An additional band with a 64 kDa apparent molecular weight was detected by immunoblotting with antibody PHF-1 (Fig. 2b) in vehicle-treated mice, together with lower molecular weight sarkosyl-insoluble material (Engel *et al.* 2006b), Fig. 2(b). In sarkosyl-insoluble samples from lithium-treated GSK-3/VLW mice, the 64 kDa band was absent (Fig. 2b). Interestingly, tau filaments were observed by electron microscopy only in untreated mice (Fig. 2c).

In this animal model overexpressing GSK-3 β and human-Tau^{VLW}, we previously found, by volumetric analysis, a severe atrophy in the dentate gyrus, suggesting that marked

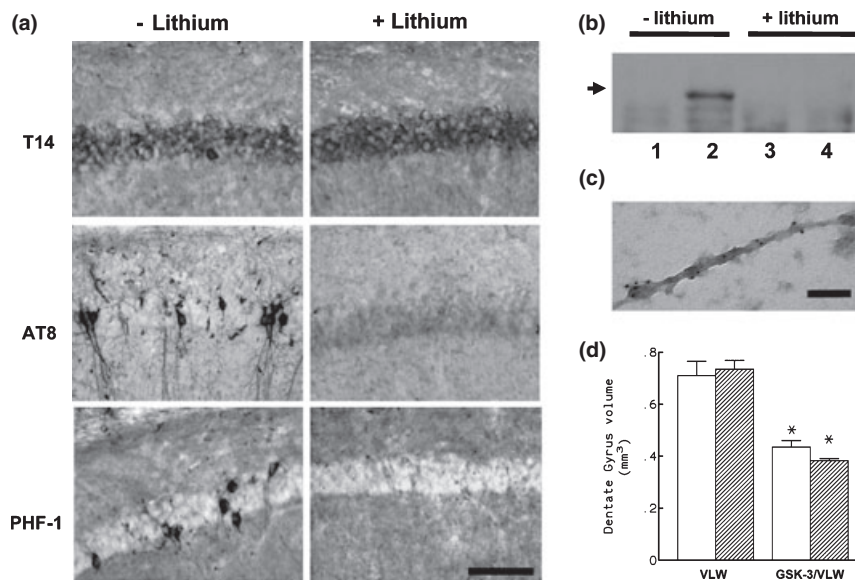


Fig. 2 Phosphorylation state of tau in GSK-3/VLW mice treated with a low dose of LiCl for 7.5 months. (a) Phospho-tau immunoreactivity from the hippocampal CA1 region of 19.5-month-old transgenic mice. Immunohistochemistry was carried out with T14, AT8 and PHF-1 antibodies in hippocampal sagittal sections from GSK-3/VLW mice treated with vehicle or LiCl for 7.5 months. Scale bar = 100 μ m. (b) Immunoblot analysis of sarkosyl-insoluble tau in VLW (1 and 3) and GSK-3/VLW mice (2 and 4) from 19.5-month-old mice using PHF-1 antibody. Mice were treated with vehicle or a low LiCl dose for 7.5 months. A 64 kDa band is indicated by the arrow. (c) Immunogold

electron microscopy of sarkosyl-insoluble fractions from untreated GSK-3/VLW mice with antibody T14. A secondary antibody conjugated with a 10 nm diameter gold particle was used. The calibration bar = 100 nm. (d) Atrophy in the dentate gyrus of the hippocampus in VLW and GSK-3/VLW control mice (open bars) or in mice treated with lithium (shaded bars). Volumetric quantification of the progressive atrophy (six animals/genotype) was determined as described in Materials and methods. * p < 0.02 vs. untreated animals. Error bars indicate SE.

neurodegeneration has taken place (Engel *et al.* 2006b). Accordingly, we performed a volumetric analysis of the dentate gyrus in order to determine whether that neurodegenerative process is susceptible to reversion in lithium-treated mice (Fig. 2d). Quantification of thionine-stained brain sections revealed that, as compared with VLW, GSK-3/VLW mice exhibited a $40.2 \pm 3.3\%$ ($p < 0.02$, $n = 6$) decrease in dentate gyrus volume. However, as shown in Fig. 2(d), that atrophy could not be reversed with lithium treatment.

Dramatic but incomplete reversal of tau pathology after lithium administration in 18-month-old animals.

Irreversible amyloid-like inclusions in the brains of GSK-3/VLW mice

We used the same protocol to analyse reversion of already-formed tau filaments and NFTs in our tauopathy animal model. In this second paradigm (reversion), lithium treatment did not completely reverse tau pathology. A decrease in the number of AT8 and PHF-1 immunopositive pyramidal neurones was evident in the CA1 region of the hippocampus from GSK-3/VLW mice treated with lithium (75.9 and 75.5%, respectively, compared with untreated mice, Figs 3a and b). However, when the same study was performed using western blot, lithium-treated mice no longer showed increased tau phosphorylation at the PHF-1 epitope (Fig. 3c).

This is probably a result of the limited number of hippocampal neurones showing transgenic expression of GSK-3 β (Engel *et al.* 2006b), detected using immunohistochemistry techniques more sensitive than the biochemical methods. In order to determine whether hyperphosphorylated tau adopts a pathogenic structure similar to that found in NFTs, we performed Thiazin Red staining of the samples. Thiazin red can be used to differentiate between fibrillar and non-fibrillar states of aggregation of tau protein (Mena *et al.* 1995). Thiazin Red-positive neurones were found only in the CA1 region of GSK-3/VLW untreated mice (2–5 per slice). Hence, immunoreactive neurones were observed in the CA1 region by double-labelling with AT8 and Thiazin Red (Figs 4a and b). Most of the neurones labelled with the antibody AT8 were not labelled with Thiazin Red, although all the Thiazin Red-positive neurones were also immunolabelled with the phospho-tau antibody, AT8. Interestingly, the number of Thiazin Red-positive neurones did not decrease in lithium-treated mice (Fig. 4c). These data suggest that reversion of hyperphosphorylated tau is possible when it is in a pre-fibrillar form, whereas when tau is aggregated in a fibrillar structure (with affinity by Thiazin Red), reversion no longer takes place. To analyse tau pathology further, we next prepared sarkosyl-insoluble protein from the hippocampus of control and lithium-treated mice. In this case, the 64 kDa tau

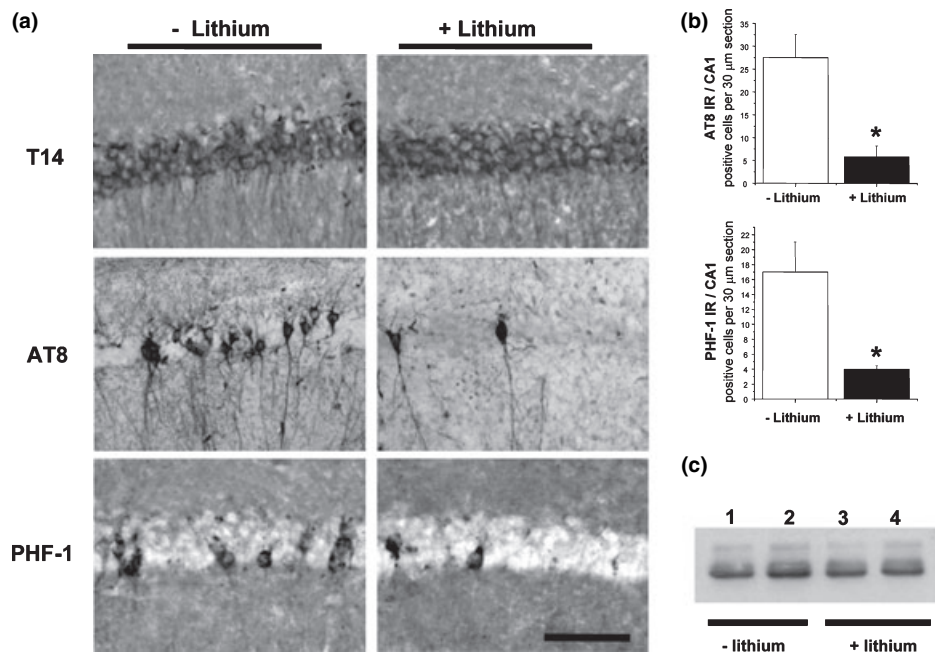


Fig. 3 Phosphorylation state of tau in old GSK-3/VLW mice treated with a high dosis of LiCl for 1.5 months. (a) Phospho-tau immunoreactivity from the hippocampal CA1 region of 19.5-month-old transgenic mice. Immunohistochemistry was carried out with T14, AT8 and PHF-1 antibodies in hippocampal sagittal sections from GSK-3/VLW mice treated with LiCl for 1.5 months. The scale bar = 100 μm. (b) Histogram showing quantification of AT8- and PHF-1-positive pyramidal

CA1 neurones in hippocampus of control (open bar) or LiCl-treated (filled bar) 19.5-month-old GSK-3/VLW mice. Statistical significance was determined by ANOVA; * $p < 0.01$ ($n = 6$). Error bars indicate SE. (c) Western blot analysis of hippocampal protein extracts from 19.5-month-old transgenic mice in VLW (1 and 3) and GSK-3/VLW (2 and 4) mice, either untreated or lithium-treated, probed with the phospho-tau antibody, PHF-1.

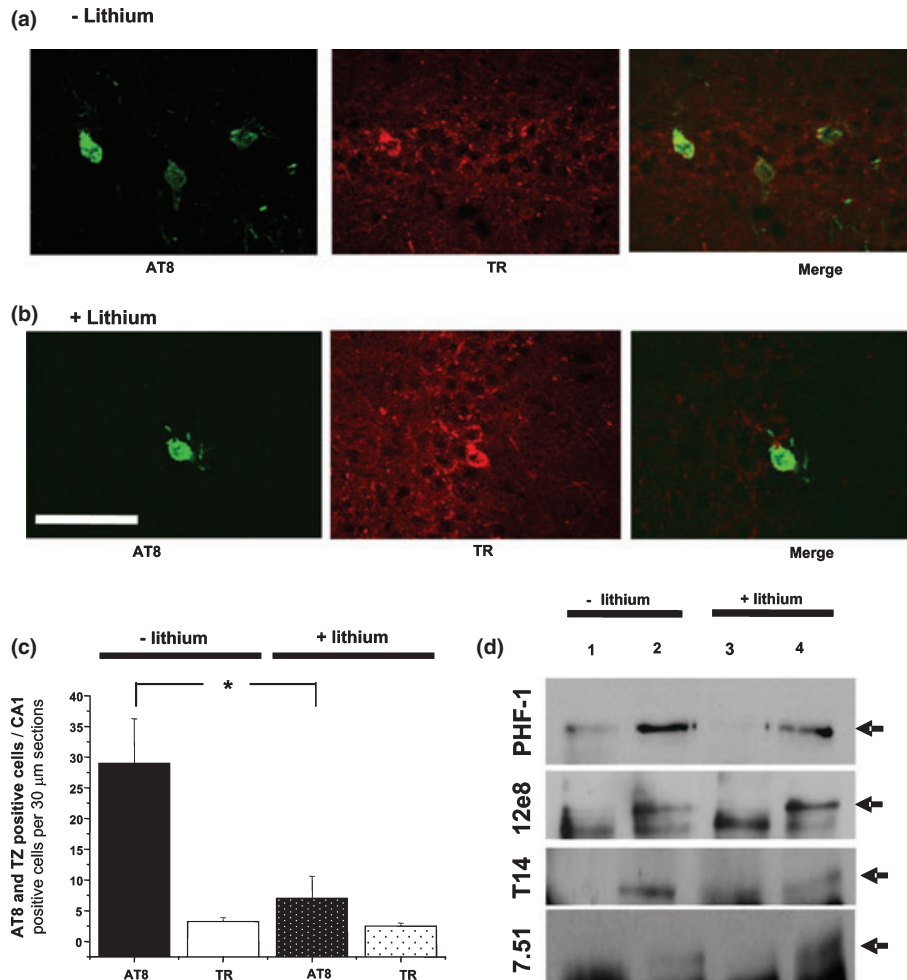


Fig. 4 Tau pathology: reversion. Double-labelling of tau pathology in the hippocampus from control GSK-3/VLW mice (a) and LiCl-treated mice (b) with AT8 antibody (left panels) and Thiazin Red (TR, central panels). Right panel show a merged image of both signals. Calibration bar = 100 μ m. (c) Histogram showing quantification of AT8- and Thiazin Red-positive pyramidal CA1 neurons in hippocampus of control or LiCl-treated 19.5-month-old GSK-3/VLW mice. Statistical

significance was determined by ANOVA; * $p < 0.02$ ($n = 4$). Error bars indicate SE. (d) Immunoblot analysis of sarkosyl-insoluble tau in VLW (1 and 3) and GSK-3/VLW (2 and 4) 19.5-month-old mice using PHF-1, 12e8, T14 and 7.51 antibodies. The 64 kDa band is indicated by an arrow. Mice were treated with vehicle or a high LiCl dose for 1.5 months, as described in Materials and methods.

band was detected by immunoblotting with antibodies 7.51, PHF-1 and 12e8 (Fig. 4d) in control GSK-3/VLW mice, as well as in lithium-treated mice. The 64 kDa band is also recognized by T14 antibody (Fig. 4d and Engel *et al.* 2006b), showing that human Tau^{VLW} is present in that band.

Amyloid-like inclusions in the brain of GSK-3/VLW mice do not change back in Gene-OFF 18-month-old animals
Transgene expression in GSK-3/VLW mice is conditional by using the Tet-off system. By making use of the conditional system used to generate GSK-3 β mice, we previously reported that pre-aggregated tau pathology reverts after restoration of normal GSK-3 levels (Engel *et al.* 2006a). Therefore, we tested whether the biochemical and histopathological consequences of pharmacological inhibition of

GSK-3 by lithium in old animals could be confirm after restoration of normal GSK-3 levels achieved by giving the tetracycline analogue, doxycycline, to 18-month-old mice. Twelve weeks of doxycycline treatment restored normal GSK-3 levels without affecting levels of FTDP-17 tau protein (Fig. 5c). We then analysed the effect of full shut-down of transgene expression on tau phosphorylation. Western blotting with PHF-1 and 12E8 demonstrated that human Tau^{VLW} from GSK-3/VLW mice was hyperphosphorylated, with respect to human Tau^{VLW} protein from VLW mice, in aged animals. An extra heavily-labelled band of 64 kDa appeared in these aged animals (Engel *et al.* 2006b), Fig. 5(d). This hyperphosphorylation changed back to basal levels in Gene-OFF GSK-3/VLW mice, as demonstrated by western blotting of hippocampal samples (Fig. 5d). In order

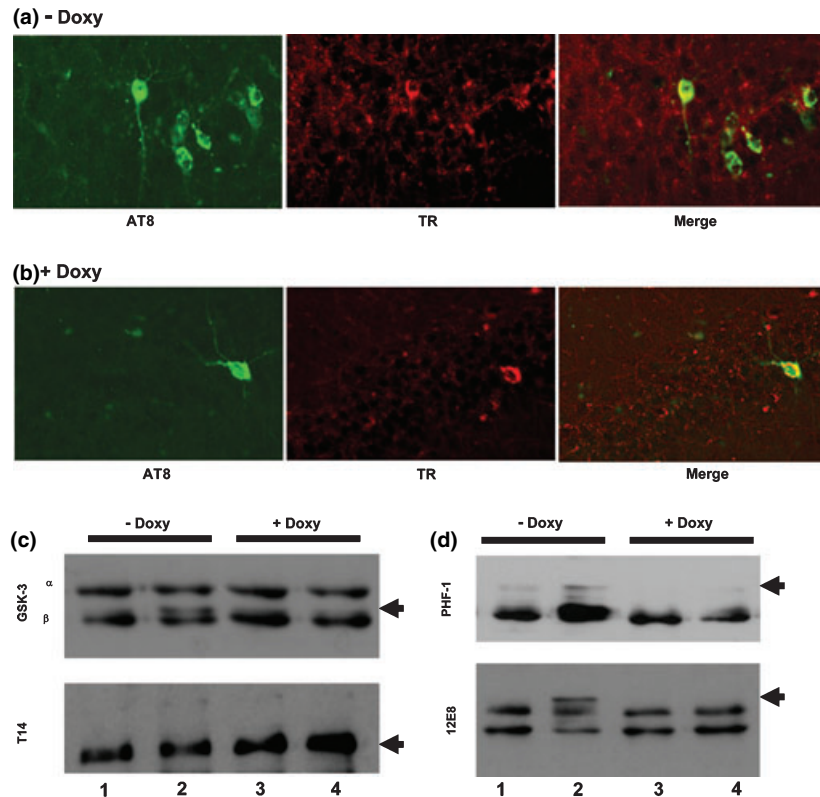


Fig. 5 Transgene shut-down by doxycycline administration to GSK-3/VLW mice. Double-labelling of tau pathology in the hippocampus from control GSK-3/VLW mice (a) and doxycycline-treated mice (b) with AT8 antibody (left panels) and Thiazin Red (TR, central panels). Right panel show a merged image of both signals. Calibration bar = 100 μ m. (c) Western blot analysis with an antibody against human-Tau^{VLW} (T14) and with an antibody against GSK-3, that recognizes the α and the β endogenous isoforms as well as the Myc-tagged trans-

genic GSK-3 β , in VLW mice GSK-3/VLW mice either untreated (-Doxy) or that had received doxycycline. Arrows show transgenic proteins. (d) Western blot analysis of hippocampal protein extracts in VLW (1 and 3) and GSK-3/VLW (2 and 4) mice with the anti-phospho-tau antibodies, PHF-1 and 12e8. Arrows show the 64 kDa band. Mice were treated with water or doxycycline for 12 weeks as described in Materials and methods.

to determine whether the Thiazin Red-positive neurones present in old GSK-3/VLW mice (Figs 4a and 5a) were also present in doxycycline-treated mice, we performed double labelling with AT8 and Thiazin Red. As observed previously with lithium, the number of Thiazin Red-positive neurones did not decrease in doxycycline-treated mice (Fig. 5b).

Discussion

The two main goals of this work were to explore, in a tauopathy mouse model based on overexpression of FTDP-17 mutant tau and GSK-3 β , whether the reversal of tau pathology is still possible in advanced stages of disease once NFTs and tau filaments are formed, and whether chronic lithium treatment is able to prevent that tau pathology. Our study demonstrates that lithium treatment can inhibit the progression of tau pathology is able to partially reverse that pathology in aged mice.

Previous reports have indicated that lithium blocks tau protein hyperphosphorylation in transgenic mice overex-

pressing FTDP-17 tau (Perez *et al.* 2003; Noble *et al.* 2005), as well as in a mouse model overexpressing the shorter human tau isoform (Nakashima *et al.* 2005), presumably through the inhibition of GSK-3. However, these studies were based on tau overexpression without GSK-3 overexpression. Our animal model is unique because it demonstrates the following tau pathology (Engel *et al.* 2006b): (i) an increase in tau phosphorylation in the hippocampus, an AD relevant brain region; (ii) hyperphosphorylated tau with an aberrant high molecular weight (64 kDa); (iii) Thiazin Red-positive neurones (NFTs) in the hippocampus; and (iv) the presence of tau filaments wider than 10 nm. All these markers can be found only in GSK-3/VLW mice, and not in mice expressing only FTDP-17 tau or GSK-3 β .

Our first aim was to determine whether chronic lithium treatment is able to prevent tau pathology in the hippocampal CA1 region of GSK-3/VLW mice. The treatment was initiated at the age of 12 months, when the first signs of tau pathology are observed, and finished 7.5 months later when full tau pathology is found. After 7.5 months of lithium

treatment, it was possible to observe evidence of the prevention of these markers of neuropathology. Compared with control mice, CA1-pyramidal neurones from lithium-treated mice showed no signs of phospho-tau accumulation or aggregation, despite a high level of FTDP-17 tau expression. Furthermore, biochemical studies demonstrated the absence of the extra 64 kDa band in sarkosyl-insoluble extracts prepared from lithium-treated mice. This band correlates with the presence of NFTs and is recognized by phospho-tau antibodies (Engel *et al.* 2006b). Interestingly, all these effects were obtained with plasma lithium levels of 0.62 ± 0.04 mM, a lithium concentration that is in the low range of therapeutic clinical use for bipolar disorder.

Our prevention experiments are consistent with the hypothesis that tau hyperphosphorylation alters the conformation of tau to a state that is more prone to aggregation (Alonso *et al.* 2001). Hence, aggregated tau could not be found in lithium-treated GSK-3/VLW mice, although FTDP-17 tau levels remained unchanged. This fits well with the correlation found between tau hyperphosphorylation and aggregation both in patients and animal models of tauopathies (for a review see Avila *et al.* 2004).

We have previously reported that GSK-3/VLW mice present a severe atrophy of the dentate gyrus, indicating an important neurodegeneration. The hippocampus is one of the few areas of the adult brain that continues to produce neurones post-natally, and contradictory data with respect to the role of lithium in that process have been reported (Chen *et al.* 2000; Yu *et al.* 2003). Here, we show that in our animal model, this process cannot be reversed by lithium treatment. Taking into account that neurogenesis decreases with age (Kempermann *et al.* 1998; Bizon and Gallagher 2003), a likely explanation is that the dentate gyrus is unable to revert to its previous state because neurogenesis and maturation might be substantially diminished in 12-month-old GSK-3/VLW mice.

Our second aim was to investigate whether lithium treatment is able to reverse tau pathology once it is present (at 18 months old) in our animal model. Our data demonstrate that lithium was able to partially reverse pre-existing tau pathology. Thus, in lithium-treated mice, a decrease in the number of AT8 immunoreactive neurones was observed (about 75%). Here, we demonstrate that the remaining AT8-positive neurones are also stained with Thiazin Red, a compound that is able to label fibrillar tau protein and therefore, NFTs. In relation to these immunohistochemistry results, it was possible to detect the 64 kDa band in sarkosyl-insoluble extracts prepared from lithium-treated mice, showing that aggregated tau was present in these mice. We were only able to see the 64 kDa band after lithium treatment in sarkosyl-insoluble samples (Fig. 4d) and not in total hippocampal extracts (Fig. 3c). This is probably a result of the limited number of CA1 pyramidal neurones showing Thiazin Red staining compared with neurones immunostained with

phospho-tau antibodies (Fig. 4c). Thus, the 64 kDa tau isoform is enriched in sarkosyl-insoluble fraction. To determine the selectivity of lithium as a GSK-3 inhibitor, we silenced transgene expression in 18-month-old VLW/GSK-3 mice by giving the tetracycline analogue, doxycycline, to the mice. After restoration of GSK-3 to basal levels, we obtained the same results with doxycycline as with lithium (reversion of phospho-tau but not NFT-like aggregates), supporting the notion that GSK-3 inhibition is not sufficient to reverse NFT-like aggregates. A similar result was obtained by the overexpression of P301L tau in a conditional manner (Santacruz *et al.* 2005), where NFTs did not disappear after suppression of transgenic tau expression.

A first conclusion could be that lithium is able to prevent tau pathology, but that this is not the case when NFTs are already formed. However, there is no direct evidence showing that PHFs are toxic for neurones. In fact, it has been proposed for other neurodegenerative diseases (i.e. Huntington's disease) that the formation of aggregates is a defence mechanism (Arrasate *et al.* 2004).

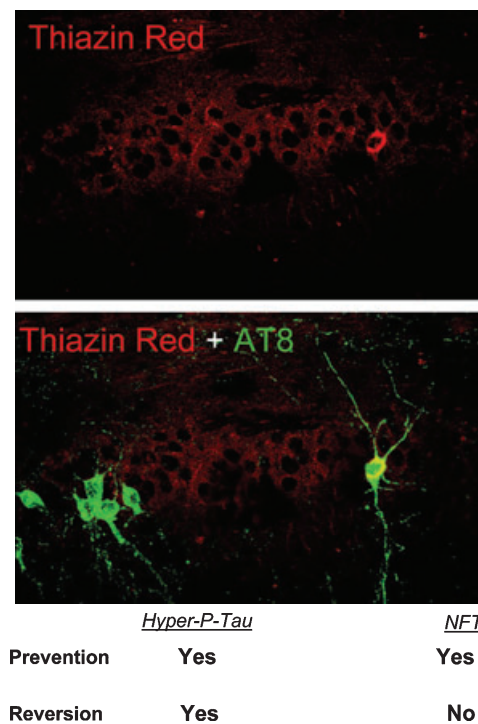


Fig. 6 Lithium effects on tau pathology. 18-month-old GSK-3/VLW mice develop a tau pathology characterized by the presence of hyperphosphorylated tau (stained with AT8 antibody) and NFT-like structures (stained with Thiazin Red). Our data demonstrate that the progression of the tauopathy can be prevented by administration of lithium when the first signs of the process are found. Furthermore, it is still possible to partially reverse tau pathology in advanced stages of the disease. Thus, when lithium is administered to old mice, phosphorylated tau decreases although tau aggregated in NFT-like structures does not revert to its previous state.

Growing evidence suggests that the formation of the aberrant aggregates present in several neurodegenerative diseases may be a way to neutralize aberrant/toxic proteins generated during the process of neurodegeneration. Moreover, learning deficits were present in a GSK-3 β mouse model characterized by the presence of hyperphosphorylated tau in the absence of tau filaments (Hernandez *et al.* 2002). In good agreement with this, a learning deficit in a mouse model of FTDP-17 correlated with hyperphosphorylated tau, but not with the presence of NFTs (Santacruz *et al.* 2005). Thus, it can be proposed that lithium could also be effective even when the disease is in an advanced phase.

In summary, lithium, a drug used for treating affective disorders and with well documented effects in humans, could have a therapeutic benefit in neurodegenerative tauopathies by, in first place, preventing tau hyperphosphorylation and in second place, reversing hyperphosphorylated somatodendritic tau. However, lithium is not able to change back tau filaments already aggregated associated into NFTs (Fig. 6). Our data also support studies based on novel GSK-3 inhibitors as new pharmacological treatments of these kind of neurodegenerative disorders.

Acknowledgements

We thank Dr Francisco García-Sierra for his help with Thiazin Red staining. We thank Drs María A. Moran and Pilar Gómez-Ramos for helpful discussion and comments. We are also grateful to Elena Langa and Raquel Cuadros for technical assistance. This work was supported by grants from Fundación La Caixa, Comunidad de Madrid, Neuropharma, Spanish CICYT, and by institutional grants from Fundación Ramón Areces and from Fondo de Investigaciones Sanitarias.

References

- Alonso A., Zaidi T., Novak M., Grundke-Iqbal I. and Iqbal K. (2001) Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 6923–6928.
- Alvarez G., MunozMontano J. R., Satrustegui J., Avila J., Bogonez E. and DiazNido J. (1999) Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. *FEBS Lett.* **453**, 260–264.
- Arrasate M., Mitra S., Schweitzer E. S., Segal M. R. and Finkbeiner S. (2004) Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* **431**, 805–810.
- Avila J., Lucas J. J., Perez M. and Hernandez F. (2004) Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol. Rev.* **84**, 361–384.
- Bhat R. V., Budd Haeberlein S. L. and Avila J. (2004) Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies. *J. Neurochem.* **89**, 1313–1317.
- Biernat J., Mandelkow E. M., Schroter C. *et al.* (1992) The switch of tau protein to an Alzheimer-like state includes the phosphorylation of two serine-proline motifs upstream of the microtubule binding region. *EMBO J.* **11**, 1593–1597.
- Bizon J. L. and Gallagher M. (2003) Production of new cells in the rat dentate gyrus over the lifespan: relation to cognitive decline. *Eur. J. Neurosci.* **18**, 215–219.
- Busciglio J., Lorenzo A., Yeh J. and Yankner B. A. (1995) beta-Amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron* **14**, 879–888.
- Chen G., Du Rajkowska G. F., Seraji-Bozorgzad N. and Manji H. K. (2000) Enhancement of hippocampal neurogenesis by lithium. *J. Neurochem.* **75**, 1729–1734.
- Chen R. W. and Chuang D. M. (1999) Long term lithium treatment suppresses p53 and Bax expression but increases Bcl-2 expression. A prominent role in neuroprotection against excitotoxicity. *J. Biol. Chem.* **274**, 6039–6042.
- Engel T., Hernandez F., Avila J. and Lucas J. J. (2006a) Full reversal of Alzheimer's disease-like phenotype in a mouse model with conditional overexpression of glycogen synthase kinase-3. *J. Neurosci.* **26**, 5083–5090.
- Engel T., Lucas J. J., Gomez-Ramos P., Moran M. A., Avila J. and Hernandez F. (2006b) Coexpression of FTDP-17 tau and GSK-3 β in transgenic mice induce tau polymerization and neurodegeneration. *Neurobiol. Aging* **27**, 1258–1268.
- Ferreira A., Lu Q., Orecchio L. and Kosik K. S. (1997) Selective phosphorylation of adult tau isoforms in mature hippocampal neurons exposed to fibrillar A beta. *Mol. Cell Neurosci.* **9**, 220–234.
- Goedert M. (2005) Tau gene mutations and their effects. *Mov. Disord.* **20**, S45–S52.
- Goedert M. and Spillantini M. G. (2001) Tau gene mutations and neurodegeneration. *Biochem. Soc. Symp.* **67**, 59–71.
- Greenberg S. G. and Davies P. (1990) A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **87**, 5827–5831.
- Grimes C. A. and Jope R. S. (2001) The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog. Neurobiol.* **65**, 391–426.
- Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Quinlan M., Tung Y. C., Zaidi M. S. and Wisniewski H. M. (1986) Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J. Biol. Chem.* **261**, 6084–6089.
- Hernandez F., Borrell J., Guaza C., Avila J. and Lucas J. J. (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**, 1529–1533.
- Hong M., Chen D. C. R., Klein P. S. and Lee V. M. Y. (1997) Lithium reduces tau phosphorylation by inhibition of glycogen synthase kinase-3. *J. Biol. Chem.* **272**, 25 326–25 332.
- Imahori K. and Uchida T. (1997) Physiology and pathology of tau protein kinases in relation to Alzheimer's disease. *J. Biochem. (Tokyo)* **121**, 179–188.
- Kempermann G., Kuhn H. G. and Gage F. H. (1998) Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J. Neurosci.* **18**, 3206–3212.
- King T. D., Bijur G. N. and Jope R. S. (2001) Caspase-3 activation induced by inhibition of mitochondrial complex I is facilitated by glycogen synthase kinase-3beta and attenuated by lithium. *Brain Res.* **919**, 106–114.
- Klein P. S. and Melton D. A. (1996) A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 8455–8459.
- Kosik K. S. (1992) Alzheimer's disease: a cell biological perspective. *Science* **256**, 780–783.
- Lim F., Hernandez F., Lucas J. J., Gomez-Ramos P., Moran M. A. and Avila J. (2001) FTDP-17 mutations in tau transgenic mice provoke

- lysosomal abnormalities and Tau filaments in forebrain. *Mol. Cell Neurosci.* **18**, 702–714.
- Lovestone S., Hartley C. L., Pearce J. and Anderton B. H. (1996) Phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase-3 beta in intact mammalian cells: the effects on the organization and stability of microtubules. *Neuroscience* **73**, 1145–1157.
- Lucas J. J., Hernandez F., Gomez-Ramos P., Moran M. A., Hen R. and Avila J. (2001) Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *EMBO J.* **20**, 27–39.
- Mena R., Edwards P., Perez-Olvera O. and Wischik C. M. (1995) Monitoring pathological assembly of tau and beta-amyloid proteins in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **89**, 50–56.
- Merrick S. E., Demoise D. C. and Lee V. M. Y. (1996) Site-specific dephosphorylation of tau protein at Ser(202)/Thr(205) in response to microtubule depolymerization in cultured human neurons involves protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.* **271**, 5589–5594.
- Moore G. J., Bebchuk J. M., Wilds I. B., Chen G. and Manji H. K. (2000) Lithium-induced increase in human brain grey matter. *Lancet* **356**, 1241–1242.
- MunozMontano J. R., Moreno F. J., Avila J. and DiazNido J. (1997) Lithium inhibits Alzheimer's disease-like tau protein phosphorylation in neurons. *FEBS Lett.* **411**, 183–188.
- MunozMontano J. R., Moreno F. J., Avila J. and DiazNido J. (1999) Downregulation of glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3 beta) protein expression during neuroblastoma IMR-32 cell differentiation. *J. Neurosci. Res.* **55**, 278–285.
- Nakashima H., Ishihara T., Suguimoto P. *et al.* (2005) Chronic lithium treatment decreases tau lesions by promoting ubiquitination in a mouse model of tauopathies. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **110**, 547–556.
- Noble W., Planel E., Zehr C. *et al.* (2005) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration *in vivo*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 6990–6995.
- Paxinos G. and Franklin K. B. J. (2001) *The Mouse Brain*, 2nd edn. Academic Press, San Diego.
- Pei J. J., Braak E., Braak H., Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Winblad B. and Cowburn R. F. (1999) Distribution of active glycogen synthase kinase 3beta (GSK-3beta) in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **58**, 1010–1019.
- Perez M., Valpuesta J. M., Montejo de Garcini E., Quintana C., Arrasate M., LopezCarrascosa J. L., Rabano A., deYebenes J. G. and Avila J. (1998) Ferritin is associated with the aberrant tau filaments present in progressive supranuclear palsy. *Am. J. Pathol.* **152**, 1531–1539.
- Perez M., Hernandez F., Lim F., Diaz-Nido J. and Avila J. (2003) Chronic lithium treatment decreases mutant tau protein aggregation in a transgenic mouse model. *J. Alzheimers Dis.* **5**, 301–308.
- Santacruz K., Lewis J., Spires T. *et al.* (2005) Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* **309**, 476–481.
- Takashima A., Noguchi K., Sato K., Hoshino T. and Imahori K. (1993) Tau protein kinase I is essential for amyloid beta-protein-induced neurotoxicity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **90**, 7789–7793.
- Takashima A., Noguchi K., Michel G., Mercken M., Hoshi M., Ishiguro K. and Imahori K. (1996) Exposure of rat hippocampal neurons to amyloid beta peptide (25–35) induces the inactivation of phosphatidylinositol-3 kinase and the activation of tau protein kinase I glycogen synthase kinase-3 beta. *Neurosci. Lett.* **203**, 33–36.
- Yamaguchi H., Ishiguro K., Uchida T., Takashima A., Lemere C. A. and Imahori K. (1996) Preferential labeling of Alzheimer neurofibrillary tangles with antisera for tau protein kinase (TPK) I/glycogen synthase kinase-3 beta and cyclin-dependent kinase 5, a component of TPK II. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **92**, 232–241.
- Yu I. T., Kim J. S., Lee S. H., Lee Y. S. and Son H. (2003) Chronic lithium enhances hippocampal long-term potentiation, but not neurogenesis, in the aged rat dentate gyrus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **303**, 1193–1198.
- Zhang F., Phiel C. J., Spece L., Gurchich N. and Klein P. S. (2003) Inhibitory phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) in response to lithium. Evidence for autoregulation of GSK-3. *J. Biol. Chem.* **278**, 33 067–33 077.

Tau as a Molecular Marker of Development, Aging and Neurodegenerative Disorders

Félix Hernández, Mar Pérez, Elena Gómez de Barreda, Paloma Goñi-Oliver and Jesús Avila*

Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", CSIC-UAM, Fac. Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

Abstract: The purpose of this work is to review the changes that take place in the microtubule associated protein tau during neuronal development, aging and neurodegeneration. Human tau protein is expressed from a single gene located on chromosome 17. The DNA is transcribed into nuclear RNA and this RNA, by alternative splicing, yields different mRNA species which are developmentally regulated. In aging, or in neurodegenerative disorders, post translational modifications of tau, such as phosphorylation, could take place, and new tau isoforms may appear. Thus, tau isoforms can be used as markers to follow neuronal development, aging or neurodegeneration.

INTRODUCTION

It has been widely commented the relatively small number of genes that are present in the human genome and how such few genes can regulate all cellular functions taking place in the human being. However, this is an incomplete view because a single nuclear RNA can yield, by alternative splicing, different mRNA species. The translation of these distinct spliced mRNAs results in the production of different isoforms. In addition to these isoforms, different post translational modifications can also yield additional protein isoforms. Thus, during the life of an organism, including aging, the product of a single gene could result in the expression of different protein isoforms. In this review we discuss the changes in tau protein during the life of an organism as well as how different tau protein isoforms could be used as markers for different developmental stages. In addition, the presence of specific tau isoforms in some pathological processes will be discussed.

TAU PROTEIN

A single human tau gene can be transcribed into nuclear RNA. This nuclear RNA yields different mRNA species by alternative splicing. The translation of these distinct spliced mRNAs results in the production of the different tau isoforms with different numbers of exons [1].

Goedert *et al* described the presence of six different tau isoforms in the human central nervous system (CNS) [2] (Fig. (1)). However, the pioneer work in this field was carried out on bovine tau where at least 14 tau exons are expressed [1]. We now know that the human tau gene contains 16 exons [3] and is present on chromosome 17. However, not all of these exons are commonly expressed in the human tau protein.

Tau protein is enriched in four amino acids: proline, glycine, lysine and serine, which account for 40% of the total residues of the protein (in the largest CNS tau isoform). The high proline and glycine content suggests the existence of a

random-coil conformation and, indeed, tau adopts this conformation allowing it to be a very soluble protein in different buffer conditions. The abundance of lysine residues indicates the presence of basic regions and, indeed, there is a basic region in the tau molecule which contains some repeated sequences that are involved in the binding of tau to microtubules via the acidic C-terminus of tubulin [4]. Finally, the presence of many serine residues suggests that the protein can be extensively modified by phosphorylation, at these residues [5].

Tau protein can be divided into four regions: 1) residues 1-103, the acidic amino terminal region with a variable number of exons. There are three types of isoforms, those containing only exon 1 (first type), those with exon 1 and 2 (second type), and those with exon 1, 2 and 3 (third type); 2) residues 104-239, the second region, rich in proline; 3) amino acids 240-370, the third region, is a basic region, rich in lysine residues (and arginine residues too) that contains the repeated sequences involved in microtubule binding. Some of the tau isoforms lack exon 10, corresponding to the second repeated sequence; 4) residues 371-441, the last region, is the acidic carboxy terminal region rich in serines.

The expression of some of these tau isoforms is developmentally regulated. Thus, isoforms lacking exon 10 (Tau 3R) are found at early developmental stages whereas tau isoforms containing exon 10 (Tau 4R) are mainly found in neurons at mature developmental stages. However, in human adult brain Tau 3R can be also found [2] in new-born neurons such as those in the hippocampal dentate gyrus.

Alternative splicing of nuclear tau RNA, occurs during brain development but this point will be only briefly commented, since an excellent review on tau RNA splicing has been already published [6]. The expression of tau isoforms derived from different numbers of exons is characteristic during brain development: those isoforms lacking exon 10 being expressed at early developmental stages [5, 6]. Human tau isoforms contain some exons present in every tau isoform. These exons (with reference to those first described in bovine tau) are exons 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 and 13. In human tau, there is a little (if any) expression of exons 6 and 8. On the other hand exons 2, 3 and 10 are present in some isoforms and absent in others. In the peripheral nervous system (PNS), there is a high molecular weight tau isoform derived

*Address correspondence to this author at the Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", CSIC-UAM, Fac. Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain; E-mail: javila@cbm.uam.es

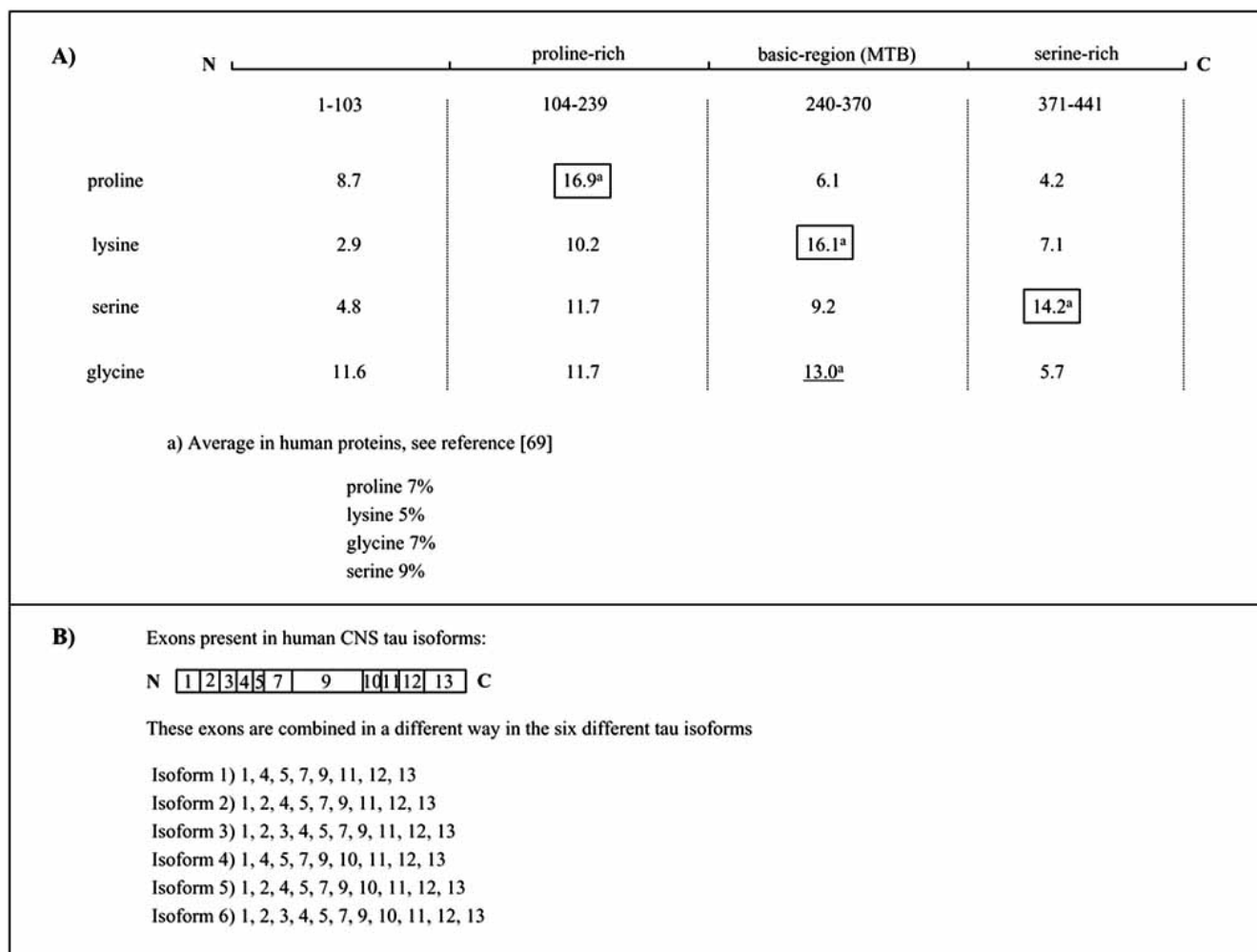


Fig. (1). A. Percentage of proline, lysine, serine and glycine residues respect to the total residues present in different tau regions (N-terminal, proline rich, basic and serine-rich regions). As a comparison (a), the average proportion of these aminoacids present in human proteins is also shown [69].

B. Exon number present in each of the six tau isoforms found in human brain.

from the expression of exon 4A. This exon is not expressed in CNS tau isoforms [7].

On the other hand, the inclusion of exons 2/3, in the tau molecule, is higher in those individuals showing the tau H1 haplotype [8] and it is not related to brain development. Splicing factors like CELF and MBNL appear to regulate the inclusion of exons 2/3 in tau protein [9]. The lack of exon 6 in human tau protein is probably due to the difficult and intricate interplay of trans factors and cis elements required for its expression [10]. The absence of exon 8 in human tau has also been reported [11, 12].

Since, the presence or absence of exon 10, in tau protein, could be used as a developmental marker (and also as a marker for some neurodegenerative disorders [5, 12-14]), the determinants of exon 10 splicing have been studied in detail [13, 15, 16].

Some splicing regulators like TRA2-BETA 1 and CLK2 [17], RBM4 [18] or SFRS11 [19] have been involved in tau exon 10 alternative splicing. Other serine-arginine rich pro-

teins [20, 21] have also been implicated. In addition, mutations in the tau gene could interfere with the presence of tau exon 10 [20, 22, 23].

Little is known about the relation between the previously indicated factors and the developmental regulation of tau isoforms containing or lacking exon 10. It has been shown that the phosphorylation of splicing factors like SC35-like protein [21] can be implicated and it has been suggested that such phosphorylation could be developmentally regulated by kinases such as GSK3β [24]. However, more work is needed to analyze this possible connection. Finally, a specific post-translational modification -phosphorylation- has been described in fetal tau [25]. Phosphorylation decreases with progressive developmental stages (Fig. (2)).

In summary, the presence of tau protein, lacking exon 10, could be suggested as a marker of young neurons. The presence of tau having exon 10 results in a possible increase in the binding of tau protein to microtubules, since exon 10 contains one of the repeated sequences involved in the binding of tau protein to microtubules. Thus, tau isoforms, pre-

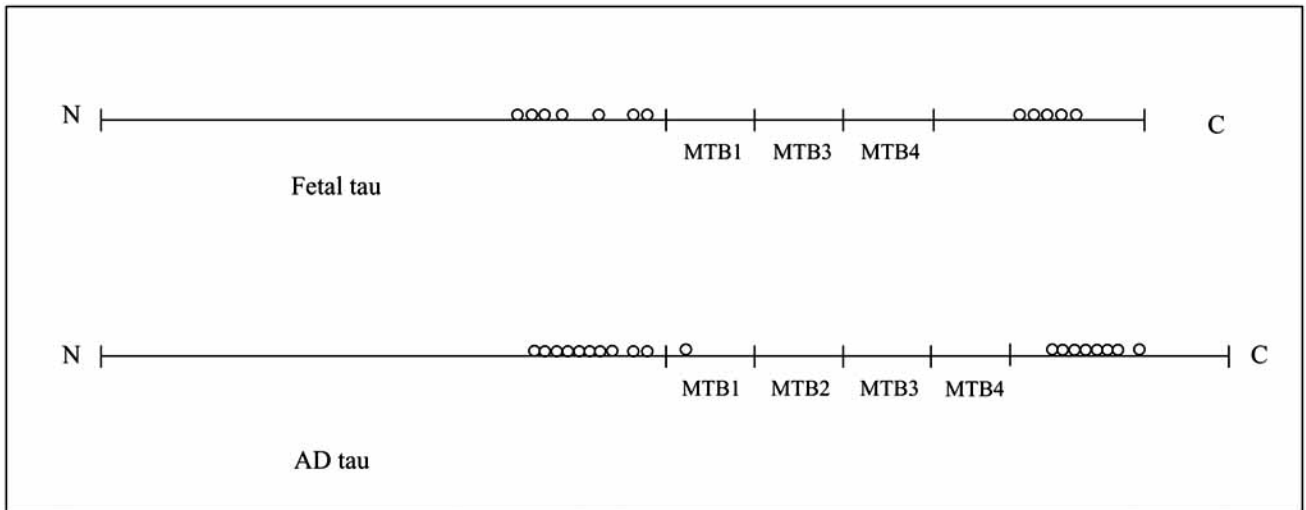


Fig. (2). Phosphorylated residues (circles) present in fetal tau and tau protein from Alzheimer disease patients (AD). Although both tau isoforms are highly phosphorylated, there are some modified residues in AD that are not present in fetal tau. The repeated sequences containing the microtubule binding motifs (MTB) in tau molecule are shown.

sent in mature neurons, are probably bound with a higher affinity to microtubules than in fetal neurons and this stronger binding may facilitate the stabilization of these cytoskeletal polymers.

AGING AND TAU ISOFORMS

Aging, and longevity, have been studied at genetic and epigenetic levels. At the genetic level the study has been performed in simple models such as yeast or worms [26]. It has been found that when yeast is grown in low glucose medium, an increase in life-span is observed [27]. Analysis carried out in *Caenorhabditis elegans* has shown that the deficient functioning of the insulin-like pathway results in an extremely long life of the worm [28].

Activation of the insulin transduction pathway results in the inhibition of GSK3 and reduction in the phosphorylation of its substrates, like tau protein. Additionally, activation of the pathway results in a decrease of the activity of the transcription factor FoxO which regulates cellular oxidative stress resistance [29], since it up-regulates several antioxidant enzymes like catalase [30] or manganese superoxide dismutase. It has been suggested that the sporadic activation of FoxO could favor longevity [31]. However, prolonged activation results in apoptosis in cultured neuronal cells [32].

It has been proposed that cell vulnerability to different forms of chronic stress increases with age. This has been part of the study at the epigenetic level. In this way, an increased vulnerability of aged neurons to oxidative damage has been proposed [33], suggesting that dysfunction in aged neurons is a result of deregulation of the removal of the toxic products arising from oxygen metabolism.

Oxygen is needed for cell viability, and, significantly, oxygen consumption is much higher in brain than in other tissues. Some of the metabolic products are toxic compounds, like the reactive species (ROS). If these toxic compounds are not removed, there is a lack of balance between

the generation and removal of ROS (oxidative stress) that may promote neuronal degeneration, and this degeneration will increase with aging.

Oxidative damage could also result in the appearance of lipid peroxidation products like 4-hydroxy-2-nonenal [34], acrolein or malondialdehyde [35]. On the other hand, oxidation of sugars could yield the formation of compounds like methylglyoxal. These products could react with proteins, like tau protein, [35, 36] to form advanced glycation-end products. Thus, proteins could be modified by these products, by ROS, (free radicals like the anion superoxide, the hydroxyl radical or nitric oxide), or by oxidative products like hydrogen peroxide. Modifications present in tau protein could also appear as a consequence of oxidative damage. In this way, mitochondrial oxidative stress may cause tau hyperphosphorylation [37].

Other consequences, at the protein level, promoted by oxidative damage are the formation of disulfide bridges, that favour tau aggregation [38], and tau glycation [35, 36], that also may result in the formation of large tau aggregates [39]. The reaction of tau with acrolein may favor tau phosphorylation [24]. Also, the reaction with acrolein, or other carbonyl compounds, could facilitate tau aggregation [40]. 4-hydroxy 2 nonenal facilitates tau assembly into fibrillar polymers [41] and it has been reported that peroxy-nitrite-mediated tau modifications facilitate tau assembly and destabilize microtubules [42]. In addition, the site for tau nitration, has already been identified [43].

One compound that could facilitate tau assembly in a more efficient way is the oxidized form of coenzyme Q₀ (CoQ₀). Coenzyme Q₀ could bind to tau protein in a non-covalent or covalent form and favor the assembly of unmodified tau as well as the phosphorylated form [44]. It should be indicated that quinones represent a class of toxicological intermediates which can create a variety of hazardous effects *in vivo*. Indeed, quinones are highly redox active molecules which can redox cycle with their semiquinone radicals, lead-

ing to formation of reactive ROS, including superoxide, hydrogen peroxide and the hydroxyl radical.

In addition to oxidative damage, other types of stress could also result in modifications of tau protein. These take place mainly by activation of stress kinases or by inhibition of specific phosphatases, which results in hyperphosphorylation of tau protein. Thus, exposure to a range of environmental insults, or stress, may result in induction of tau phosphorylation. Among these environmental changes are hibernation, cold water stress, anesthesia, alterations in glucose metabolism or electric-shock [45-52].

Nevertheless, oxidative damage appears to be one of the main causes related to neuron aging. This damage could be originated from a situation like activation of growth factor receptors which result in the appearance of toxic compounds like H₂O₂. If there is a deregulation in the pathways used to remove those toxic products, oxidative damage could take place. Also, the period of calcium entry in neurons, upon activation of some receptors, is generally brief, but unrelenting calcium entry constitutes a stress that makes neurons particularly susceptible to oxidative damage [53]. An excess of calcium can be absorbed by mitochondria, but a continuous calcium entry would produce mitochondrial stress. In fact, mitochondria house the oxidative phosphorylation machine and many metabolic pathways. Essentially, all the production of cellular energy takes place in mitochondria, where most of the reactive oxygen species (ROS) are generated. Thus, chronic mitochondria stress results in increased ROS production and oxidative damage. Also, calcium entry could activate proteases like calpain that could activate GSK3 [54] and this, in turn, may increase tau phosphorylation. Finally, it should be also noted that an increase in ROS levels could take place during hypoxia [55].

To generalize, cell vulnerability to different forms of chronic stress could increase with age and the aging process could be associated with major stress response systems. It has been suggested that the ability to cope with stress in adulthood is an predictive indicator of life expectancy and quality of life at senescence [56], since higher vulnerability to stress is associated with accelerated senescence.

As indicated, stress conditions could result in tau modifications like glycation, nitration, oxidation or phosphorylation by stress kinases [35, 36, 40, 42, 57, 58].

TAU ISOFORMS AND SENILE NEURODEGENERATIVE DISORDERS

There are some neurodegenerative disorders which involve changes in tau phosphorylation or aggregation. These disorders are known as tauopathies [23], Alzheimer’s disease being the most prevalent. Alzheimer’s disease is a senile dementia characterized by the presence of two histopathological hallmarks: senile plaques composed of a peptide called beta amyloid (a fragment of the amyloid precursor protein [59]), and neurofibrillary tangles composed essentially of the microtubule associated protein tau in a hyperphosphorylated form [60]. This tau phosphorylation takes place mainly by tau kinase I (GSK3) and tau kinase II (cdk5) [61, 62]. Beta-amyloid peptide (the main component of senile plaques) has been implicated in the activation of GSK3 [63, 64] which facilitates tau phosphorylation [65]. The localization of phosphorylation sites on tau protein from Alzheimer’s disease patients has been analyzed [25] and is shown in Fig. (2).

As indicated above, another feature of tau protein in neurodegenerative disorders is its aberrant aggregation into different types of polymers; paired helical and straight filaments in Alzheimer’s disease, globular aggregates like Hirano bodies (also present in Alzheimer’s disease cases) or in the formation of Pick bodies in Pick Disease. Other types of fibrillar tau polymers are present in other tauopathies like Corticobasal Degeneration or Progressive Supranuclear Palsy [5]. Thus, highly soluble tau protein becomes insoluble, forming tau aggregates in these neurodegenerative disorders. Truncation is another tau posttranslational modification that has been suggested to take place during tau aggregation [66]. The analysis of all these modified tau isoforms could yield markers of the indicated tauopathies. In addition, the presence of a higher proportion of modified tau 3R respect to tau 4R, or viceversa, in different tauopathies has been used to classify different tauopathies such as Corticoba-

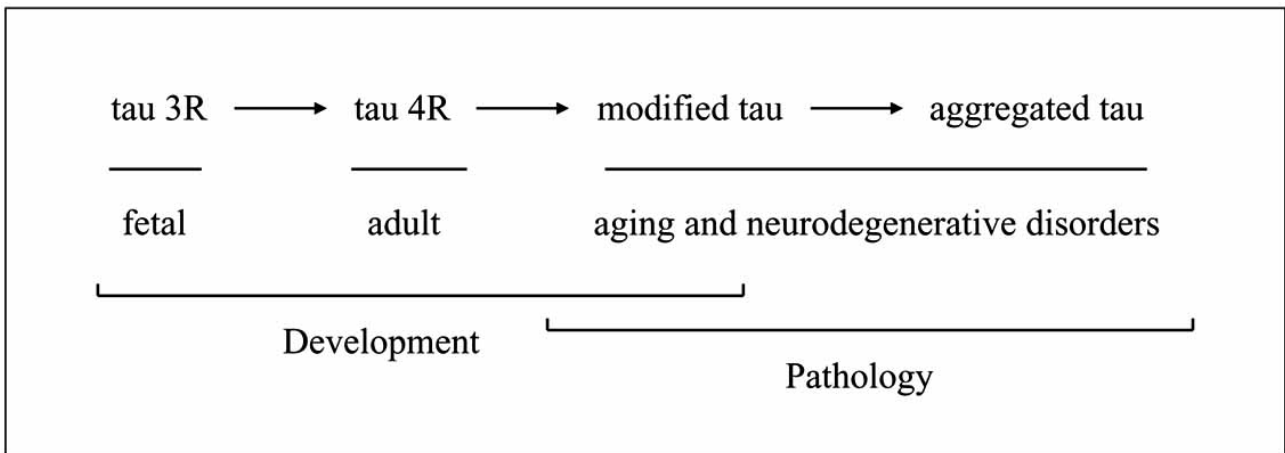


Fig. (3). Tau isoforms present in Central Nervous System during brain development and in neurodegenerative disorders with tau pathology. At fetal stage, tau 3R, with three microtubule binding motifs, is expressed. In the adult organism tau 4R, with four microtubule binding motifs, is present. This tau 4R can be modified by phosphorylation in neurodegenerative disorders like AD.

sal degeneration, Progressive Supranuclear Palsy or Pick disease [67]. The proportion of different tau isoforms in these tauopathies could be due to the fact that the affected neurons mainly express tau 4R or tau 3R isoforms in these different proportions [67, 68].

In summary, tau protein could be used as a marker to indicate the different brain stages during the life of a human being (Fig. (3)). In fetal stage, it is mainly composed of a short isoform which shows lower affinity for microtubules compared to mature brain tau isoforms. This decrease in microtubule binding capacity could be due to the absence of one of the sequences involved in microtubule binding as well as to the higher phosphorylation found in fetal tau compared with that present in mature brain tau isoforms. In mature brain, new tau isoforms are expressed and the whole tau protein shows a higher microtubule binding capacity than of that of fetal stages. However, in neurodegenerative processes, like AD, in which the main risk factor is aging, there is a dramatic decrease in the capacity of tau protein to bind to microtubules, mainly due to its hyperphosphorylated status, although other modifications could be also important. In consequence, tau protein changes its solubility characteristics and forms different types of aggregates in these neurodegenerative disorders.

REFERENCES

- [1] Himmler A. Structure of the bovine tau gene: alternatively spliced transcripts generate a protein family. *Mol Cell Biol* 4: 1389-96 (1989).
- [2] Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, Ulrich J and Crowther RA. Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J* 8: 393-9 (1989).
- [3] Andreadis A, Brown WM and Kosik KS. Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry* 31: 10626-33 (1992).
- [4] Serrano L, de la Torre J, Maccioni RB and Avila J. Involvement of the carboxyl-terminal domain of tubulin in the regulation of its assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 5989-93 (1984).
- [5] Avila J, Lucas JJ, Perez M and Hernandez F. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev* 84: 361-84 (2004).
- [6] Gallo JM, Noble W and Martin TR. RNA and protein-dependent mechanisms in tauopathies: consequences for therapeutic strategies. *Cell Mol Life Sci* 64: 1701-14 (2007).
- [7] Couchie D, Mavilia C, Georgieff IS, Liem RK, Shelanski ML and Nunez J. Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4378-81 (1992).
- [8] Caffrey TM, Joachim C and Wade-Martins R. Haplotype-specific expression of the N-terminal exons 2 and 3 at the human MAPT locus. *Neurobiol Aging*: (2007) [Epub ahead of print].
- [9] Leroy O, Dhaenens CM, Schraen-Maschke S, Belarbi K, Delacourte A, Andreadis A, *et al.* ETR-3 represses Tau exons 2/3 inclusion, a splicing event abnormally enhanced in myotonic dystrophy type I. *J Neurosci Res* 84: 852-9 (2006).
- [10] Wang J, Tse SW and Andreadis A. Tau exon 6 is regulated by an intricate interplay of trans factors and cis elements, including multiple branch points. *J Neurochem* 100: 437-45 (2007).
- [11] Nelson PT, Stefansson K, Gulcher J and Saper CB. Molecular evolution of tau protein: implications for Alzheimer's disease. *J Neurochem* 67: 1622-32 (1996).
- [12] Chen WT, Liu WK and Yen SH. Expression of tau exon 8 in different species. *Neurosci Lett* 172: 167-70 (1994).
- [13] Gallo JM, Jin P, Thornton CA, Lin H, Robertson J, D'Souza I, *et al.* The role of RNA and RNA processing in neurodegeneration. *J Neurosci* 25: 10372-5 (2005).
- [14] Andreadis A. Misregulation of tau alternative splicing in neurodegeneration and dementia. *Prog Mol Subcell Biol* 44: 89-107 (2006).
- [15] D'Souza I and Schellenberg GD. Determinants of 4-repeat tau expression. Coordination between enhancing and inhibitory splicing sequences for exon 10 inclusion. *J Biol Chem* 275: 17700-9 (2000).
- [16] D'Souza I and Schellenberg GD. tau Exon 10 expression involves a bipartite intron 10 regulatory sequence and weak 5' and 3' splice sites. *J Biol Chem* 277: 26587-99 (2002).
- [17] Glatz DC, Rujescu D, Tang Y, Berendt FJ, Hartmann AM, Faltraco F, *et al.* The alternative splicing of tau exon 10 and its regulatory proteins CLK2 and TRA2-BETA1 changes in sporadic Alzheimer's disease. *J Neurochem* 96: 635-44 (2006).
- [18] Kar A, Havlioglu N, Tarn WY and Wu JY. RBM4 interacts with an intronic element and stimulates tau exon 10 inclusion. *J Biol Chem* 281: 24479-88 (2006).
- [19] Wu JY, Kar A, Kuo D, Yu B and Havlioglu N. SRP54 (SFRS11), a regulator for tau exon 10 alternative splicing identified by an expression cloning strategy. *Mol Cell Biol* 26: 6739-47 (2006).
- [20] D'Souza I and Schellenberg GD. Arginine/serine-rich protein interaction domain-dependent modulation of a tau exon 10 splicing enhancer: altered interactions and mechanisms for functionally antagonistic FTDP-17 mutations Delta280K AND N279K. *J Biol Chem* 281: 2460-9 (2006).
- [21] Hernandez F, Perez M, Lucas JJ, Mata AM, Bhat R and Avila J. Glycogen synthase kinase-3 plays a crucial role in tau exon 10 splicing and intranuclear distribution of SC35. Implications for Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 279: 3801-6 (2004).
- [22] van Swieten JC, Bronner IF, Azmani A, Severijnen LA, Kamphorst W, Ravid R, *et al.* The DeltaK280 mutation in MAP tau favors exon 10 skipping *in vivo*. *J Neuropathol Exp Neurol* 66: 17-25 (2007).
- [23] Lee VM, Goedert M and Trojanowski JQ. Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci* 24: 1121-59 (2001).
- [24] Bhat RV, Budd Haeblerlein SL and Avila J. Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies. *J Neurochem* 89: 1313-7 (2004).
- [25] Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, Suzuki M, Yoshida H, Titani K, *et al.* Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau. *J Biol Chem* 270: 823-9 (1995).
- [26] Kenyon C. A conserved regulatory system for aging. *Cell* 105: 165-8 (2001).
- [27] Lin SJ, Defossez PA and Guarente L. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 289: 2126-8 (2000).
- [28] Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A and Tabtiang R. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366: 461-4 (1993).
- [29] van der Horst A and Burgering BM. Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 440-50 (2007).
- [30] Nemoto S and Finkel T. Redox regulation of forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway. *Science* 295: 2450-2 (2002).
- [31] Kops GJ, Dansen TB, Polderman PE, Saarloos I, Wirtz KW, Coffey PJ, *et al.* Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* 419: 316-21 (2002).
- [32] Nakae J, Biggs WH, 3rd, Kitamura T, Cavenee WK, Wright CV, Arden KC, *et al.* Regulation of insulin action and pancreatic beta-cell function by mutated alleles of the gene encoding forkhead transcription factor Foxo1. *Nat Genet* 32: 245-53 (2002).
- [33] Zhu X, Raina AK, Perry G and Smith MA. Alzheimer's disease: the two-hit hypothesis. *Lancet Neurol* 3: 219-26 (2004).
- [34] Sayre LM, Zelasko DA, Harris PL, Perry G, Salomon RG and Smith MA. 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 68: 2092-7 (1997).
- [35] Yan SD, Chen X, Schmidt AM, Brett J, Godman G, Zou YS, *et al.* Glycated tau protein in Alzheimer's disease: a mechanism for induction of oxidant stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7787-91 (1994).

- [36] Ledesma MD, Bonay P, Colaco C and Avila J. Analysis of microtubule-associated protein tau glycation in paired helical filaments. *J Biol Chem* 269: 21614-9 (1994).
- [37] Melov S, Adlard PA, Morten K, Johnson F, Golden TR, Hinerfeld D, *et al.* Mitochondrial oxidative stress causes hyperphosphorylation of tau. *PLoS ONE* 2: e536 (2007).
- [38] Schweers O, Mandelkow EM, Biernat J and Mandelkow E. Oxidation of cysteine-322 in the repeat domain of microtubule-associated protein tau controls the *in vitro* assembly of paired helical filaments. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8463-7 (1995).
- [39] Ledesma MD, Medina M and Avila J. The *in vitro* formation of recombinant tau polymers: effect of phosphorylation and glycation. *Mol Chem Neurobiol* 27: 249-58 (1996).
- [40] Gomez-Ramos A, Diaz-Nido J, Smith MA, Perry G and Avila J. Effect of the lipid peroxidation product acrolein on tau phosphorylation in neural cells. *J Neurosci Res* 71: 863-70 (2003).
- [41] Perez M, Cuadros R, Smith MA, Perry G and Avila J. Phosphorylated, but not native, tau protein assembles following reaction with the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal. *FEBS Lett* 486: 270-4 (2000).
- [42] Reynolds MR, Lukas TJ, Berry RW and Binder LI. Peroxynitrite-mediated tau modifications stabilize preformed filaments and destabilize microtubules through distinct mechanisms. *Biochemistry* 45: 4314-26 (2006).
- [43] Reynolds MR, Reyes JF, Fu Y, Bigio EH, Guillozet-Bongaarts AL, Berry RW, *et al.* Tau nitration occurs at tyrosine 29 in the fibrillar lesions of Alzheimer's disease and other tauopathies. *J Neurosci* 26: 10636-45 (2006).
- [44] Santa-Maria I, Hernandez F, Martin CP, Avila J and Moreno FJ. Quinones facilitate the self-assembly of the phosphorylated tubulin binding region of tau into fibrillar polymers. *Biochemistry* 43: 2888-97 (2004).
- [45] Arendt T, Stieler J, Strijkstra AM, Hut RA, Rudiger J, Van der Zee EA, *et al.* Reversible paired helical filament-like phosphorylation of tau is an adaptive process associated with neuronal plasticity in hibernating animals. *J Neurosci* 23: 6972-81 (2003).
- [46] Feng Q, Cheng B, Yang R, Sun FY and Zhu CQ. Dynamic changes of phosphorylated tau in mouse hippocampus after cold water stress. *Neurosci Lett* 388: 13-6 (2005).
- [47] Ikeda Y, Ishiguro K and Fujita SC. Ether stress-induced Alzheimer-like tau phosphorylation in the normal mouse brain. *FEBS Lett* 581: 891-7 (2007).
- [48] Planel E, Miyasaka T, Launey T, Chui DH, Tanemura K, Sato S, *et al.* Alterations in glucose metabolism induce hypothermia leading to tau hyperphosphorylation through differential inhibition of kinase and phosphatase activities: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci* 24: 2401-11 (2004).
- [49] Planel E, Richter KE, Nolan CE, Finley JE, Liu L, Wen Y, *et al.* Anesthesia leads to tau hyperphosphorylation through inhibition of phosphatase activity by hypothermia. *J Neurosci* 27: 3090-7 (2007).
- [50] Rissman RA, Lee KF, Vale W and Sawchenko PE. Corticotropin-releasing factor receptors differentially regulate stress-induced tau phosphorylation. *J Neurosci* 27: 6552-62 (2007).
- [51] Yoshida S, Maeda M, Kaku S, Ikeya H, Yamada K and Nakaike S. Lithium inhibits stress-induced changes in tau phosphorylation in the mouse hippocampus. *J Neural Transm* 113: 1803-14 (2006).
- [52] Fujio J, Hosono H, Ishiguro K, Ikegami S and Fujita SC. Tau phosphorylation in the mouse brain during aversive conditioning. *Neurochem Int* 51: 200-8 (2007).
- [53] Chan CS, Guzman JN, Ilijic E, Mercer JN, Rick C, Tkatch T, *et al.* 'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease. *Nature* 447: 1081-6 (2007).
- [54] Goni-Oliver P, Lucas JJ, Avila J and Hernandez F. N-terminal cleavage of GSK-3 by calpain: a new form of GSK-3 regulation. *J Biol Chem* 282: 22406-13 (2007).
- [55] Bell EL, Klimova TA, Eisenbart J, Moraes CT, Murphy MP, Budinger GR, *et al.* The Qo site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production. *J Cell Biol* 177: 1029-36 (2007).
- [56] Pardon MC. Stress and ageing interactions: a paradox in the context of shared etiological and pathophysiological processes. *Brain Res Rev* 54: 251-73 (2007).
- [57] Kuhla B, Haase C, Flach K, Luth HJ, Arendt T and Munch G. Effect of pseudophosphorylation and cross-linking by lipid peroxidation and advanced glycation end product precursors on tau aggregation and filament formation. *J Biol Chem* 282: 6984-91 (2007).
- [58] Hensley K, Floyd RA, Zheng NY, Nael R, Robinson KA, Nguyen X, *et al.* p38 kinase is activated in the Alzheimer's disease brain. *J Neurochem* 72: 2053-8 (1999).
- [59] Price DL and Sisodia SS. Mutant genes in familial Alzheimer's disease and transgenic models. *Annu Rev Neurosci* 21: 479-505 (1998).
- [60] Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM and Binder LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 4913-7 (1986).
- [61] Ishiguro K, Shiratsuchi A, Sato S, Omori A, Arioka M, Kobayashi S, *et al.* Glycogen synthase kinase 3 beta is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments. *FEBS Lett* 325: 167-72 (1993).
- [62] Imahori K and Uchida T. Physiology and pathology of tau protein kinases in relation to Alzheimer's disease. *J Biochem (Tokyo)* 121: 179-88 (1997).
- [63] Xie L, Helmerhorst E, Taddei K, Plewright B, Van Bronswijk W and Martins R. Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor. *J Neurosci* 22: RC221 (2002).
- [64] Yankner BA. New clues to Alzheimer's disease: unraveling the roles of amyloid and tau. *Nat Med* 2: 850-2 (1996).
- [65] Alvarez G, Munoz-Montano JR, Satrustegui J, Avila J, Bogonez E and Diaz-Nido J. Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. *FEBS Lett* 453: 260-4 (1999).
- [66] Wischik CM, Lai RYK and Harrington CR. Modelling prion-like processing of tau protein in Alzheimer's disease for pharmaceutical development. In: Avila J, Brandt R, Kosik KS Eds. *Brain Microtubule Associated Proteins. Modifications in Disease*: Switzerland: Harwood Academic 185-241 (1997).
- [67] Sergeant N, Delacourte A and Buee L. Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 1739: 179-97 (2005).
- [68] Ballatore C, Lee VM and Trojanowski JQ. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci* 8: 663-72 (2007).
- [69] Echols N, Harrison P, Balasubramanian S, Luscombe NM, Bertone P, Zhang Z, *et al.* Comprehensive analysis of amino acid and nucleotide composition in eukaryotic genomes, comparing genes and pseudogenes. *Nucleic Acids Res* 30: 2515-23 (2002).

Lithium, a Potential Protective Drug in Alzheimer's Disease

T. Engel P. Goñi-Oliver E. Gómez de Barreda J.J. Lucas F. Hernández J. Avila

Centro de Biología Molecular 'Severo Ochoa', CSIC-UAM, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

Key Words

Alzheimer's disease · Tau phosphorylation · Glycogen synthase kinase 3 · Lithium

Abstract

Alzheimer's disease is characterized by the presence of two histopathological aberrant structures, the senile plaques and the neurofibrillary tangles. The main component of these tangles is the cytoskeletal protein tau in hyperphosphorylated form. Since a main tau kinase is glycogen synthase kinase 3 (GSK-3), the use of specific GSK-3 inhibitors, like lithium, could be a potential therapy in Alzheimer's disease. In this short article, we have done a review on tau phosphorylation in Alzheimer's disease and other tauopathies, and on the inhibition of kinases like GSK-3, involved in tau modification.

Copyright © 2008 S. Karger AG, Basel

Alzheimer's disease is the most prevalent cause of dementia in old age. This disease is characterized by the presence of two types of abnormal protein deposits: amyloid – or senile – plaques and neurofibrillary tangles. Senile plaques are extracellular deposits containing β -amyloid peptides as the major components [1], whereas neurofibrillary tangles are intracellular aggregates of fibrils,

constituted by the microtubule-associated protein tau, in hyperphosphorylated form [2].

The presence of large numbers of neurofibrillary tangles in the cerebral cortex has been correlated with the severity of dementia in Alzheimer's disease [3]. It has become apparent that the morphological lesions used by pathologists to confirm a clinical diagnosis after death might provide an experimentally tractable means to understand causative pathways. Related to tau pathology, those lesions involve tau phosphorylation and aggregation. Thus, it has been suggested that the study of phosphorylation and aggregation of tau protein could facilitate the analysis of the mechanism of tau pathology in Alzheimer's disease. In addition, aberrant phospho-tau polymers have also been found in other dementias and neurological disorders (tauopathies) like Pick's disease, frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17), corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy [4].

It has been suggested that in a pathological situation hyperphosphorylated tau misfolds, disassembles from microtubules and forms aberrant filamentous polymers that, in aggregated form, give rise to the neurofibrillary tangles. The toxicity of phosphorylated tau is well documented. Thus, phosphorylated tau has a reduced affinity for microtubules [5], and affects the axonal transport [6]. In addition, in tauopathies, tau-induced neurotoxicity

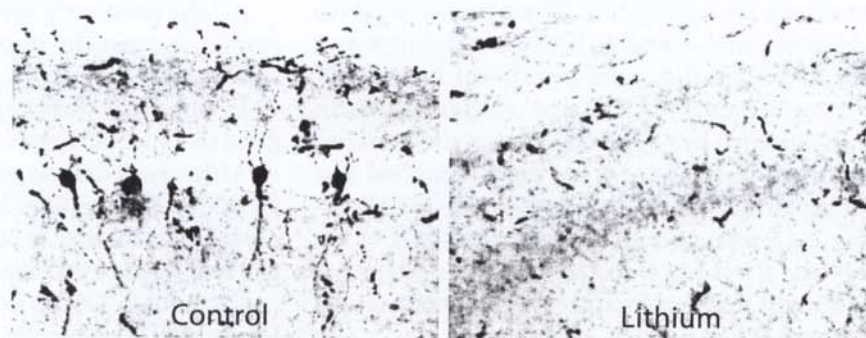


Fig. 1. The development of tau pathology is characterized by an increase in phospho-tau. Here tau pathology is shown in a transgenic mouse overexpressing GSK-3 β and FTDP-17 tau [16]. Transgenic tau accumulates in the somatodendritic compartment but only in old mice does the number of phospho-tau-positive neurons increase (control panel, immunofluorescence was carried out with the phospho-tau antibody AT8). The right panel shows

hippocampal pyramidal neurons found in this animal model when lithium (a GSK-3 inhibitor) is administered to these mice. Phosphorylated tau decreases although tau aggregated in neurofibrillary tangle-like structures does not revert to its previous state [18] showing that neurofibrillary tangles are very stable structures. Thus, lithium reverts soluble hyperphosphorylated tau, but does not change back already formed tau aggregates.

has been related to the association of tau protein, mainly in its phosphorylated form, with actin, resulting in the onset of alterations in the actin cytoskeleton. By using *Drosophila* and mice as models, a direct interaction was found between phospho-tau, modified at some sites that could be phosphorylated by glycogen synthase kinase 3 (GSK-3), and actin, an interaction that might be related to tau-induced neurotoxicity observed in Alzheimer's disease [7]. Thus, it seems important to know how tau hyperphosphorylation occurs.

Although several protein kinases could modify tau protein, GSK-3 has been proposed as a main kinase able to aberrantly phosphorylate tau in Alzheimer's disease and, probably, in other tauopathies (for a review see Avila et al. [8]). Two GSK-3 isoforms (α and β) are present in vertebrates [9] that show similar functional characteristics.

Thus, if GSK-3 is involved in tau pathology, it could be a good target for possible therapeutic interventions for Alzheimer's disease. Different GSK-3 inhibitors have already been described [10], such as lithium, one of the first indicated [11] specific inhibitors of GSK-3, that has previously been used as a drug for affective disorders [12]. Lithium inhibits both GSK-3 isoforms (α and β).

In addition, lithium has been demonstrated to have a beneficial effect in two FTDP-17 mouse models [13, 14]. Therefore, it was of great interest to test the possible protective effects of lithium in a tauopathy animal model based on GSK-3 overexpression. We have previously generated a transgenic mouse that overexpresses GSK-3 β

and FTDP-17 tau in certain brain regions [15]. These mice, termed GSK-3/VLW, show tau hyperphosphorylation in CA1 hippocampal neurons, the region where the pattern of expression of both transgenes overlaps. Tau filaments with a paired helical filament-like structure were found in GSK-3/VLW mice but not in single transgenic mice expressing only GSK-3 β or FTDP-17 tau. Paired helical filament-like filament formation in GSK-3/VLW mice was accompanied by thioflavin-S staining. All these data suggest that there is a synergistic contribution from both types of tau modification, hyperphosphorylation and missense mutations to induce aberrant tau aggregation. We have used this animal model to address the following two questions: first, whether chronic lithium treatment is able to prevent the formation of aberrant tau aggregates (formed by overexpression of FTDP-17 tau and GSK-3 β), and second, whether lithium is able to revert already formed tau aggregates and neurofibrillary tangles to their former state in aged animals [16].

In previous studies based on animal models overexpressing mutated tau polymers [13, 14, 17], it was found that upon inhibition of GSK-3, both tau phosphorylation and tau aggregation were prevented. In our model using the double-transgenic mouse that overexpresses GSK-3 β and FTDP-17 human tau, we have also found that lithium is able to prevent the development of tau phosphorylation and aggregation when the inhibitor is administered early in disease progression, but if lithium is administered at late stages of the disease (trying to mimic the human disease), it only reduces tau hyperphosphorylation and is

unable to reverse tau aggregation. These results suggest a link, in different animal models, between tau phosphorylation (the first event that takes place), which is mainly detected using the antibody AT8 that recognizes a site in tau protein modified by GSK-3 (fig. 1), and the posterior tau aggregation. In this way, it has been described that cognitive impairment found in transgenic animals overexpressing tau protein correlates with the onset of tau phosphorylation, but not with the onset of tau aggregation [18], a result that is consistent with previous results of other groups [19].

All the previously reviewed data, together with other studies, suggest the importance of GSK-3 inhibition to correct tau pathology.

In summary, we may propose that GSK-3 β could be a good therapeutic target in the tau pathology taking place in Alzheimer's disease and other tauopathies. Lithium is an example of the GSK-3 inhibitors that could be tested, although its toxicity at concentrations close to the therapeutically relevant concentrations suggests that alternative, less toxic, GSK-3 inhibitors might be more suitable for potential therapeutic use in tauopathies.

References

- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K: Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:4245-4249.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI: Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:4913-4917.
- Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT: Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 1992;42:631-639.
- Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR: Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 2000; 33:95-130.
- Lindwall G, Cole RD: Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J Biol Chem* 1984;259: 5301-5305.
- Vershinin M, Carter BC, Razafsky DS, King SJ, Gross SP: Multiple-motor based transport and its regulation by tau. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:87-92.
- Fulga TA, Elson-Schwab I, Khurana V, Steinhilb ML, Spires TL, Hyman BT, Feany MB: Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo. *Nat Cell Biol* 2007;9:139-148.
- Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F: Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev* 2004; 84:361-384.
- Woodgett JR: Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J* 1990;9:2431-2438.
- Bhat RV, Budd Haeberlein SL, Avila J: Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies. *J Neurochem* 2004;89:1313-1317.
- Klein PS, Melton DA: A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93: 8455-8459.
- Moore GJ, Bebchuk JM, Wilds IB, Chen G, Manji HK: Lithium-induced increase in human brain grey matter. *Lancet* 2000;356: 1241-1242. Erratum in: *Lancet* 2000;356: 2104.
- Perez M, Hernandez F, Lim F, Diaz-Nido J, Avila J: Chronic lithium treatment decreases mutant tau protein aggregation in a transgenic mouse model. *J Alzheimers Dis* 2003; 5:301-308.
- Noble W, Planel E, Zehr C, Olm V, Meyerson J, Suleman F, Gaynor K, Wang L, LaFrancois J, Feinstein B, Burns M, Krishnamurthy P, Wen Y, Bhat R, Lewis J, Dickson D, Duff K: Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:6990-6995.
- Caccamo A, Oddo S, Tran LX, LaFerla FM: Lithium reduces tau phosphorylation but not A β or working memory deficits in a transgenic model with both plaques and tangles. *Am J Pathol* 2007;170:1669-1675.
- Engel T, Goni-Oliver P, Lucas JJ, Avila J, Hernandez F: Chronic lithium administration to FTDP-17 tau and GSK-3beta overexpressing mice prevents tau hyperphosphorylation and neurofibrillary tangle formation, but pre-formed neurofibrillary tangles do not revert. *J Neurochem* 2006;99:1445-1455.
- Engel T, Lucas JJ, Gomez-Ramos P, Moran MA, Avila J, Hernandez F: Coexpression of FTDP-17 tau and GSK-3beta in transgenic mice induce tau polymerization and neurodegeneration. *Neurobiol Aging* 2006;27: 1258-1268.
- Engel T, Hernandez F, Avila J, Lucas JJ: Full reversal of Alzheimer's disease-like phenotype in a mouse model with conditional overexpression of glycogen synthase kinase-3. *J Neurosci* 2006;26:5083-5090.
- Santacruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, Guimaraes A, DeTure M, Ramsden M, McGowan E, Forster C, Yue M, Orne J, Janus C, Mariash A, Kuskowski M, Hyman B, Hutton M, Ashe KH: Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 2005;309:476-481.

HIPPOCAMPAL NEURONAL SUBPOPULATIONS ARE DIFFERENTIALLY AFFECTED IN DOUBLE TRANSGENIC MICE OVEREXPRESSING FRONTOTEMPORAL DEMENTIA AND PARKINSONISM LINKED TO CHROMOSOME 17 TAU AND GLYCOGEN SYNTHASE KINASE-3 β

T. ENGEL,^{a1} P. GOÑI-OLIVER,^a P. GOMEZ-RAMOS,^b
M. A. MORÁN,^b J. J. LUCAS,^{a,c} J. AVILA^{a,c} AND
F. HERNÁNDEZ^{a,c*}

^aCentro de Biología Molecular “Severo Ochoa,” CSIC/UAM, Fac. Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

^bDepartamento de Anatomía, Histología y Neurociencia, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

^cCIBERNED, Spain

Abstract—Glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) has been proposed as the main kinase able to phosphorylate tau aberrantly in Alzheimer’s disease and in related tauopathies. We have previously generated a double transgenic mouse line overexpressing the enzyme GSK-3 β and tau protein carrying a triple frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 mutation whose expression patterns overlap in CA1 (pyramidal neurons) and dentate gyrus (granular neurons). Here, we have used this transgenic model to analyze how axonal and somatodendritic neuronal compartments are affected in the hippocampus. Our data demonstrate that neuronal subpopulations respond differentially to increased GSK-3 activity. Thus, dentate gyrus granular neurons undergo apoptotic death with subsequent degeneration of the mossy fibers, while CA1 pyramidal neurons accumulate hyperphosphorylated tau both in the axonal and in the somatodendritic compartments. These studies also allow us to propose a model of spreading of pathology through the hippocampus as a consequence of GSK-3 and tau dysregulation. © 2008 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: Alzheimer’s disease, FTDP-17, GSK-3, tau, transgenic mice.

Abnormal tau protein aggregation into filamentous structures and extensive neuronal loss are found in several neurological disorders known as tauopathies which are frequently associated with different forms of dementia (Goedert and Spillantini, 2001). Genetic analyses have

linked over 30 distinct mutations in the human tau gene on chromosome 17 to a disease referred to as “frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17” (FTDP-17) (Goedert, 2005). FTDP-17 is characterized by the accumulation of neurofibrillary tangles (NFT) composed of tau protein filaments within affected neurons. Similar NFT are also histopathological hallmarks of other tauopathies (for a review see (Avila et al., 2004)). In Alzheimer’s disease (AD) and in other tauopathies, independently of whether these tau gene mutations occur or not, tau protein becomes hyperphosphorylated (Grundke-Iqbal et al., 1986; Kosik, 1992) and it has been hypothesized that hyperphosphorylated tau misfolds, disassembles microtubules and forms aberrant filamentous aggregates that give rise to NFT (Kosik, 1992; Alonso et al., 2001).

Glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) has been proposed as the main kinase able to phosphorylate tau aberrantly in AD. GSK-3 β has been shown to phosphorylate tau in most sites hyperphosphorylated in NFT both in transfected cells (Lovestone et al., 1996) and *in vivo* (Hong et al., 1997; MunozMontano et al., 1997). Increased levels of GSK-3 β have been found in AD brains and GSK-3 β accumulates in the cytoplasm of pre-tangle neurons and can be also found associated to NFT (Yamaguchi et al., 1996; Imahori and Uchida, 1997; Pei et al., 1999). Exposure of cortical and hippocampal primary neuronal cultures to β -amyloid induces activation of GSK-3 β (Takashima et al., 1996), tau hyperphosphorylation (Busciglio et al., 1995; Ferreira et al., 1997), and cell death (Takashima et al., 1993; Busciglio et al., 1995). Blockade of GSK-3 β expression by antisense oligonucleotides (Takashima et al., 1993) or its activity by lithium addition (Alvarez et al., 1999) inhibits β -amyloid-induced neurodegeneration of cortical and hippocampal primary cultures. Furthermore, an interaction of GSK-3 β isoform with many of the cellular components related to the neuropathology of AD, such as the amyloid precursor protein, the β -amyloid peptide, the metabolic pathway leading to acetylcholine synthesis, the presenilins, which are mutated in many cases of familial AD, and tau protein (see (Grimes and Jope, 2001) for a review) has been described.

We have previously generated a transgenic mouse which overexpresses GSK-3 β and FTDP-17 tau in the same brain area (Engel et al., 2006b). Analysis of generated transgenic mice revealed that tau hyperphosphorylation was mainly present in hippocampal CA1 neurons, the region where both transgenic proteins are overexpressed.

¹ Present address: Department of Physiology and Medical Physics, Royal College of Surgeons in Ireland, 123 St. Stephen’s Green, Dublin 2, Ireland.

*Correspondence to: F. Hernández, Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa,” CSIC/UAM, Fac. Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain. Tel: +34-91-497-8443; fax: +34-91-497-4799.

E-mail address: fherandez@cblm.uam.es (F. Hernández).

Abbreviations: AD, Alzheimer’s disease; EtOH, ethanol; FTDP-17, frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GSK-3 β , glycogen synthase kinase-3 β ; NFT, neurofibrillary tangles; PFA, paraformaldehyde; PHF, paired helical filaments; wt, wild type.

Tau filaments with a paired helical filament (PHF)-like structure were only found in mice expressing both transgenic proteins which was accompanied by Thioflavine-S staining. Now, we have used this animal model to answer two questions. First, how tau and GSK-3 dysregulation affect different hippocampal neurons and, secondly how the axonal compartments are affected. Our studies demonstrate that granular neurons in response to increased GSK-3 β levels degenerate while pyramidal neurons survive and accumulate hyperphosphorylated tau both in the somatodendritic and axonal compartment.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

GSK-3 β mice were generated as previously described (Lucas et al., 2001). Briefly, GSK-3 β mice result from the breeding of TetO mice (carrying the bi-directional tet responsive promoter followed by GSK-3 β and β -galactosidase cDNAs, one in each direction) with CamKII β -tTA mice. The double transgenic mice are designated GSK-3. Generation of the mouse line VLW which is transgenic for a human 4-repeat tau isoform with two N-terminal exons carrying the FTDP-17 mutations G272V, P301L and R406W (hTauVLW) has been previously described (Lim et al., 2001). Neuron specific expression of mutant tau protein was achieved by using the neuron-specific mouse Thy1.2 promoter. Mice homozygous for hTauVLW were crossed with doubly transgenic mice GSK-3 β to generate GSK-3 β /VLW triple transgenic mice. Transgenic mice were genotyped by PCR (Lim et al., 2001; Lucas et al., 2001). Transgenic animals as well as wild-type (wt) mice (C57BL/6) were bred at the Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (Madrid, Spain). Four to five mice were housed per cage with food and water available *ad libitum*. Mice were maintained in a temperature-controlled environment on a 12-h light/dark cycle with light onset at 07:00 h. All experiments conformed to local and international guidelines on the ethical use of animals. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Antibodies

The following anti-tau antibodies were used: PHF-1 (a kind gift of Dr. Davies), AT-8 was from Innogenetics (Gent, Belgium), T14 was from Zymed Laboratories, Inc., 12E8 was a kind gift of Dr. P. Seubert (Athena, San Francisco, CA, USA). According to the residue numbering of the longest human tau isoform of 441 amino acids, antibody PHF-1 recognizes serines 396 and 404 when they are phosphorylated. AT-8 recognizes tau when Ser-199/202 are phosphorylated (Biernat et al., 1992). 12E8 recognizes tau when Ser-262 is phosphorylated (Seubert et al., 1995). T14 recognizes amino acids 141–178 of human tau but fails to recognize murine tau (Merrick et al., 1996). Anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) was from PharMingen (San Diego, CA, USA). Cleaved caspase-3 antibody was from (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA).

Immunohistochemistry and DAPI staining

Mice were anesthetized with a xylazine/ketamine solution, and transcardially perfused with 4% paraformaldehyde (PFA) in Sorensen's buffer for 10 min. Brains were postfixed in 4% PFA for 2 h at 4 °C and cryoprotected in 30% sucrose solution. Thirty micrometer sagittal sections were cut on a freezing microtome (Leica) and collected in 0.1% azide–PBS solution. Next, brain sections were pretreated for 1 h with 1% BSA, 5% FBS and 0.2% Triton X-100 and then incubated with primary antibodies at the following dilutions: T14 (1/100), AT8 (1/250), PHF-1 (1/200), 12E8 (1/500), GFAP (1/1000), caspase-3 (1/50). Finally, brain sections were

incubated in avidin–biotin complex using the Elite Vectastain kit (Vector Laboratories). Chromogen reactions were performed with diaminobenzidine (DAB, Sigma) and 0.003% H₂O₂ for 10 min. Sections were coverslipped with Fluorosave. Results correspond to three mice per group except for caspase-3 ($n=6$) and were expressed as mean \pm S.E. of the number of immunopositive neurons in dentate gyrus of 30 μ m hippocampal sagittal sections [matching Fig. 114 of Paxinos and Franklin (2001)] at 1.56 mm with respect to the midline. Statistical analysis was determined by ANOVA followed by a post hoc test.

To visualize nuclei, sagittal sections were incubated with DAPI (DAKO) and observed in a confocal scanning microscopy (Bio-Rad) coupled to a vertical microscopy Axioskop2 (Zeiss).

Timm staining

Samples were processed for Timm staining as previously described (Wenzel et al., 1997). Sections were placed in a desiccation chamber with a beaker with 100 ml of a 0.1% Na₂S (pH 7.3). After 24 h sections were rinsed in 95% ethanol (EtOH), then in 70% EtOH, 50% EtOH, and water. Sections were placed in the developer solution for 3 h and then rinsed in running tap water for 10 min. Sections were placed in a 5% sodium thiosulfate solution and rinsed with water.

Tissue processing for electron microscopy

Immunostained vibratome sections were processed for electron microscopy as previously described (Lucas et al., 2001). Briefly, the sections were postfixed in 2% OsO₄ for 1 h, dehydrated, embedded in Araldite, and flat-mounted in Formvar-coated slides, using plastic coverslips. After polymerization, selected areas were photographed, trimmed, reembedded in Araldite, and resectioned at 1 μ m. These semithin sections were rephotographed and resectioned in ultrathin sections. The ultrathin sections were observed in a JEOL electron microscope, without heavy metal staining to avoid artifactual precipitates.

RESULTS

A double transgenic mouse (called GSK-3 β /VLW) overexpressing GSK-3 β , the main tau kinase (Lucas et al., 2001), and human tau with FTDP-17 mutations (hTauVLW) which facilitates its assembly into polymers (Lim et al., 2001), was used to study the different susceptibilities of different hippocampal neurons to the overexpression of both proteins. Immunohistochemistry with T14 and anti-myc antibodies (human transgenic tau is recognized by T14 and transgenic GSK-3 β has a myc epitope at its N-terminal end) of sagittal brain sections from GSK-3 β /VLW mice revealed that pyramidal neurons in CA1 (Fig. 1A, C), but not CA2, contained the highest amounts of hTauVLW. In granule cells of the dentate gyrus, hTauVLW expression was revealed by T14 antibody staining in mossy fibers projecting to CA3 (see arrow in Fig. 1A). Overexpression of myc-GSK-3 β was most evident in CA2 neurons (Fig. 1B), although CA1 (Fig. 1D) and dentate gyrus were also stained (Engel et al., 2006b). These data show that the expression patterns of both transgenes overlap in CA1 (pyramidal neurons) and dentate gyrus (granular neurons).

We have previously reported that GSK-3 β overexpressing mice showed tau hyperphosphorylation at GSK-3 β phosphoepitopes in the dentate gyrus (Lucas et al., 2001). GSK-3 β /VLW mice show a similar increase in tau phosphorylation. Tau was hyperphosphorylated in

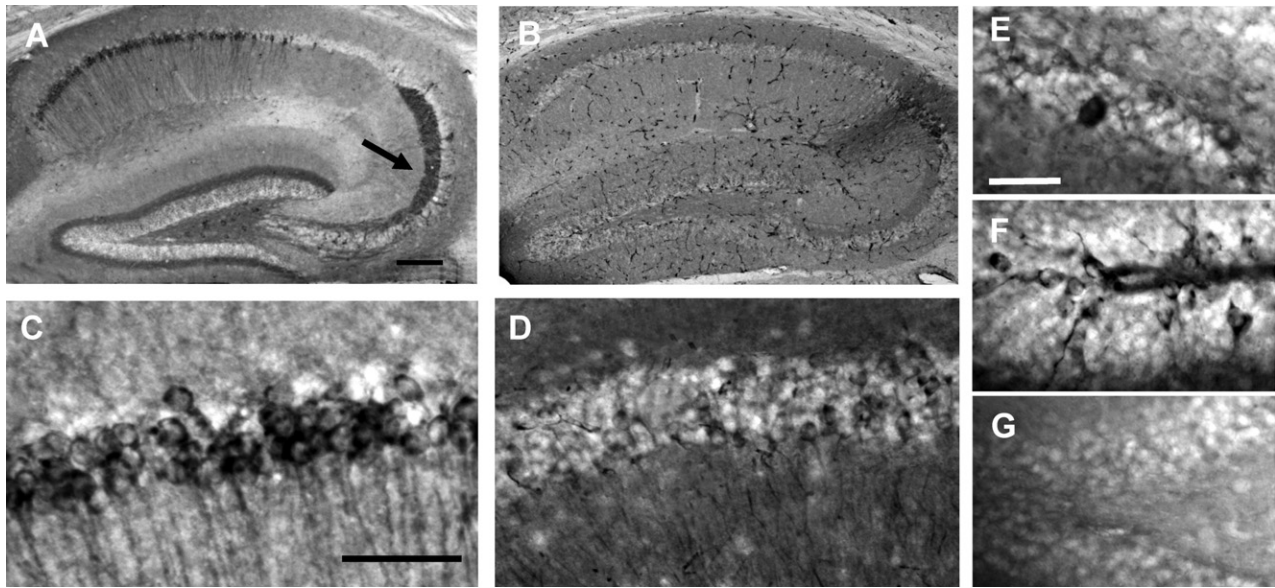


Fig. 1. Pattern of transgene expression in GSK-3 β /VLW mice and phospho-tau immunoreactivity from hippocampal dentate gyrus of 3-month-old GSK-3 β /VLW mice. Immunohistochemistry in hippocampal sections of GSK-3 β /VLW mice performed with an antibody against hTauVLW (T14, A, C) or myc epitope (B, D). High power magnification of the CA1 (C, D) of the hippocampus. Arrow in A shows mossy fibers stained with T14 antibody. The scale bars=200 μ m (A, B); 100 μ m (C, D). Immunohistochemistry performed with AT-8 (E), PHF-1 (F) and 12E8 (G) antibodies in hippocampal sagittal sections of GSK-3 β /VLW animals. The scale bar=60 μ m.

AT-8 and PHF-1 epitopes (epitopes located N-terminal and C-terminal to microtubule binding domains respectively; Fig. 1E–F) in the dentate gyrus. Interestingly, no 12E8 immunostaining was observed (Fig. 1G). However, AT-8 and PHF-1 immunostaining was only observed in young animals (3 months). On the contrary, degeneration of the dentate gyrus is observed in old animal without phospho-tau accumulation. Thus, a substantial decrease of the dentate gyrus of aged (18 months) GSK-3 β and GSK-3 β /VLW mice is observed (reference (Engel et al., 2006a) and Fig. 2). Both GSK-3 β -overexpressing animal models showed a similar level of dentate gyrus atrophy while no decrease in pyramidal layers was observed.

Reactive astrogliosis often accompanies neuronal loss and serves as a hallmark lesion for neurodegeneration. Accordingly, the reactive astrogliosis observed in GSK-3 β and GSK-3 β /VLW mice, as shown by immunohistochemistry performed with an antibody raised against GFAP (Fig. 3), showed a remarkable increase in GFAP-immunoreactivity which is quite evident throughout the hippocampal dentate gyrus ($P < 0.005$; GSK-3 β overexpressing lines versus wt mice) at all the ages analyzed. On the other hand, it was not possible to observe differences between both GSK-3 transgenic lines (Fig. 3). The wt animals as well as mice overexpressing hTauVLW (VLW mice) showed a similar number of GFAP positive cells at 2, 5 and

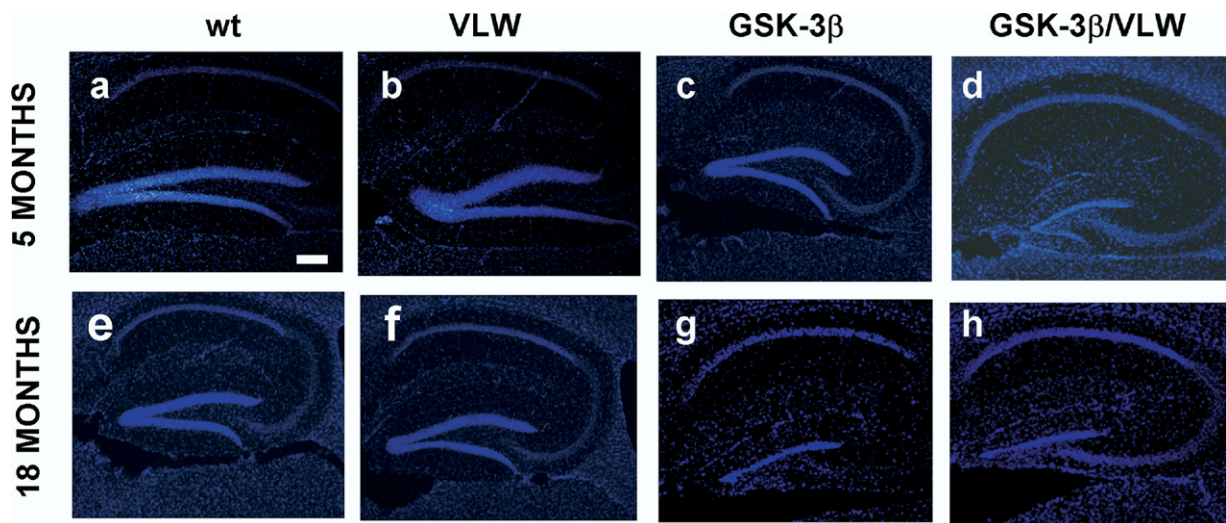
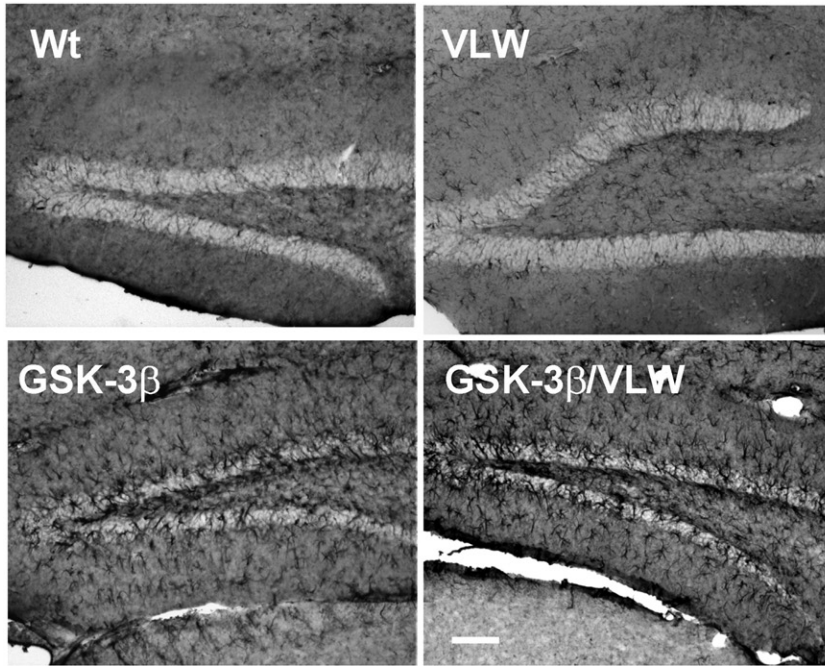


Fig. 2. Atrophy in the dentate gyrus of the hippocampus in GSK-3 β and GSK-3 β /VLW mice. Representative sagittal sections from 5- (a–d) and 18-month-old (e–h) wt (a, e), VLW (b, f), GSK-3 β (c, g) and GSK-3 β /VLW (d, h) mice DAPI stained are shown. The scale bar=200 μ m.

A.



B.

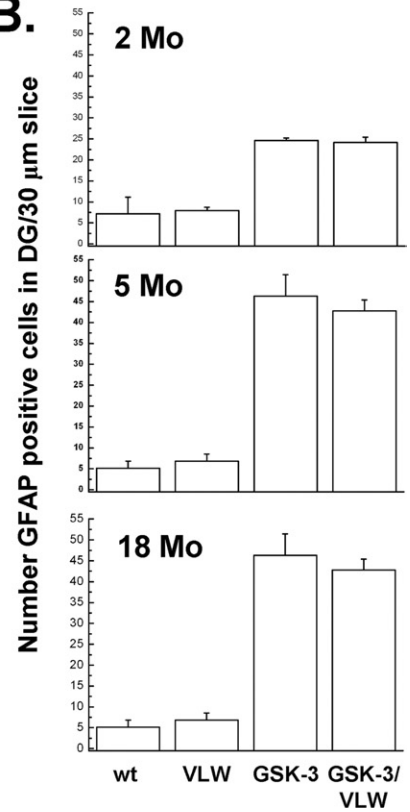


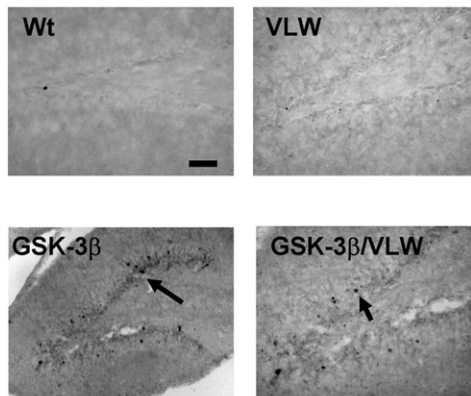
Fig. 3. Reactive astrocytosis in GSK-3β overexpressing mice. (A) Immunohistochemistry analysis of hippocampal brain sections from different mice lines was performed with the GFAP antibody. Scale bar=50 μm. (B) Quantification of the number of reactive astrocytes in 2, 5 and 18-month-old wt, VLW, GSK-3β and GSK-3β/VLW mice. Data are presented as number of immunopositive cells per 30 μm section as described in Experimental Procedures. Error bars indicate S.E. * $P < 0.005$ versus wt mice. Mo: months.

18 months suggesting that the neurodegenerative process is mainly due to GSK-3β overexpression (Fig. 3B).

The initial characterization of GSK-3β mice (Lucas et al., 2001) showed that the overexpression of GSK-3β results in apoptotic neuronal death in the dentate gyrus.

Interestingly, the same neuronal apoptotic phenotype was observed in GSK-3β/VLW mice as evidenced by immunohistochemical detection of cleaved caspase-3 (Fig. 4). In consequence, dentate gyrus granule cells of GSK-3β and GSK-3β/VLW mice presented a marked and significant

A.



B.

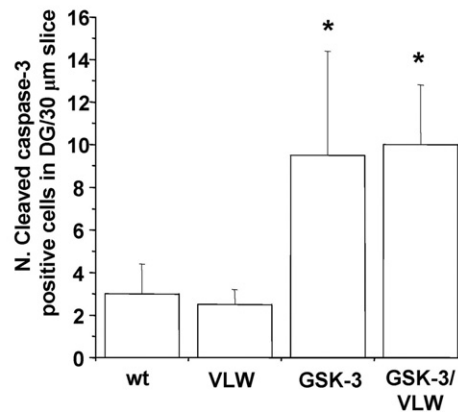


Fig. 4. Apoptosis in transgenic mice. (A) Immunohistochemistry analysis of hippocampal brain sections from the four genotypes analyzed was performed with the caspase-3 antibody. Scale bar=50 μm. (B) Quantification of the number of cleaved caspase-3-positive neurons in 10-week-old wt, VLW, GSK-3β and GSK-3β/VLW mice. Data are presented as number of immunopositive cells per 30 μm section as described in Experimental Procedures. Error bars indicate S.E. * $P < 0.005$ versus wt mice.

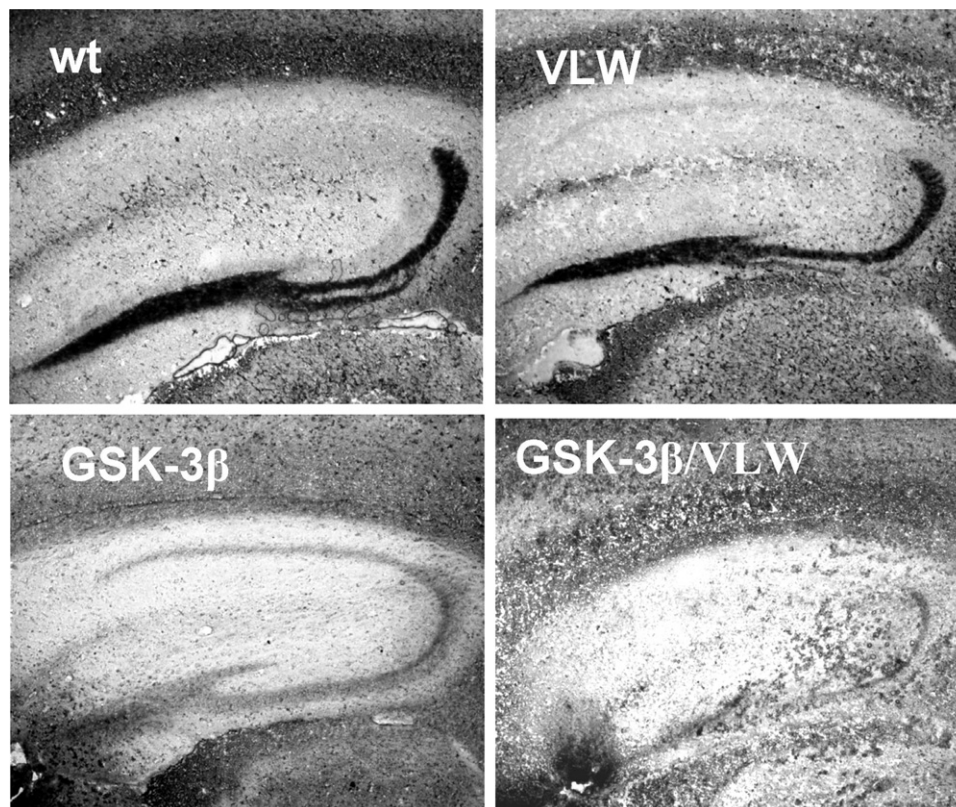


Fig. 5. Timm's staining in the dentate gyrus. Cryostat section (30 μ m) of 18-month-old wt, VLW, GSK-3 β and GSK-3 β /VLW mice were processed for Timm's staining. The reaction takes place in mossy fibers through the polymorphic layer of the dentate gyrus and in the stratum lucidum of CA3. No reaction was observed in GSK-3 β and GSK-3 β /VLW mice.

($P < 0.005$) increase in cleaved caspase-3 staining as shown in Fig. 4. Again, no differences among both GSK-3 β transgenic lines could be observed. As a consequence of neurodegeneration Timm's staining, which detects mossy fibers, is absent in 18 months GSK-3 β as well as GSK-3 β /VLW mice (Fig. 5). These data suggest that granule neurons in the dentate gyrus in response to an increase in GSK-3 activity do not accumulate hyperphosphorylated tau but induce apoptosis. Interestingly, although GSK-3 β overexpression is also found in CA1 and CA2 areas, caspase-3 staining is not detected neither in pyramidal neurons from GSK-3 β /VLW mice (data not shown) nor single GSK-3 β transgenic mice (Lucas et al., 2001).

The other hippocampal area affected in GSK-3 β /VLW mice is the CA1 region (see (Engel et al., 2006b) and Figs. 1 and 6A–F). An age-dependent pathology occurs in GSK-3 β /VLW mice overexpressing GSK-3 β and hTauVLW proteins. Here, CA1 tau pathology starts at 12 months and reaches a maximum at 18 months, when NFT-like pathology can be observed. Interestingly, this pathology is only observed in mice overexpressing both transgenes. As previously reported tau proteins aggregated into filaments with a PHF-like morphology can only be purified from GSK-3 β /VLW mice, and not from control mice (Engel et al., 2006b). In good agreement with these previous biochemical studies, ultrastructural analysis of GSK-3 β /VLW brain sections immunostained with T14 revealed dark reaction

product labeling fibrillar structures present in the somatodendritic compartment of most CA1 pyramidal neurons (Fig. 6G–H).

During the study of hippocampal tau pathology we observed tau immunostaining with different antibodies in the subiculum, an area which communicates the hippocampus with the entorhinal cortex. Here we observed axonal spheroids which were stained with T14 (Fig. 7A). These spheroids were present in GSK-3 β /VLW and absent in single transgenic lines (Fig. 7B). When we analyzed the phosphorylation status of that human tau protein we observed a hyperphosphorylation in the AT-8 and PHF-1 epitopes. Interestingly no 12E8 immunostaining was observed (Fig. 7C). In order to know if tau protein was aggregated into filamentous structures, electron microscopy studies were performed (Fig. 7D). Under this magnification no filaments were seen, suggesting that these spheroids are not formed by aberrant tau aggregated into filaments as it was previously seen in the somatodendritic compartment (Fig. 6G–H).

DISCUSSION

The main goal of the present work was to explore in a tauopathy mouse model based on overexpression of human FTDP-17 tau and of GSK-3 β , how axonal and somatodendritic neuronal compartments are affected in the hip-

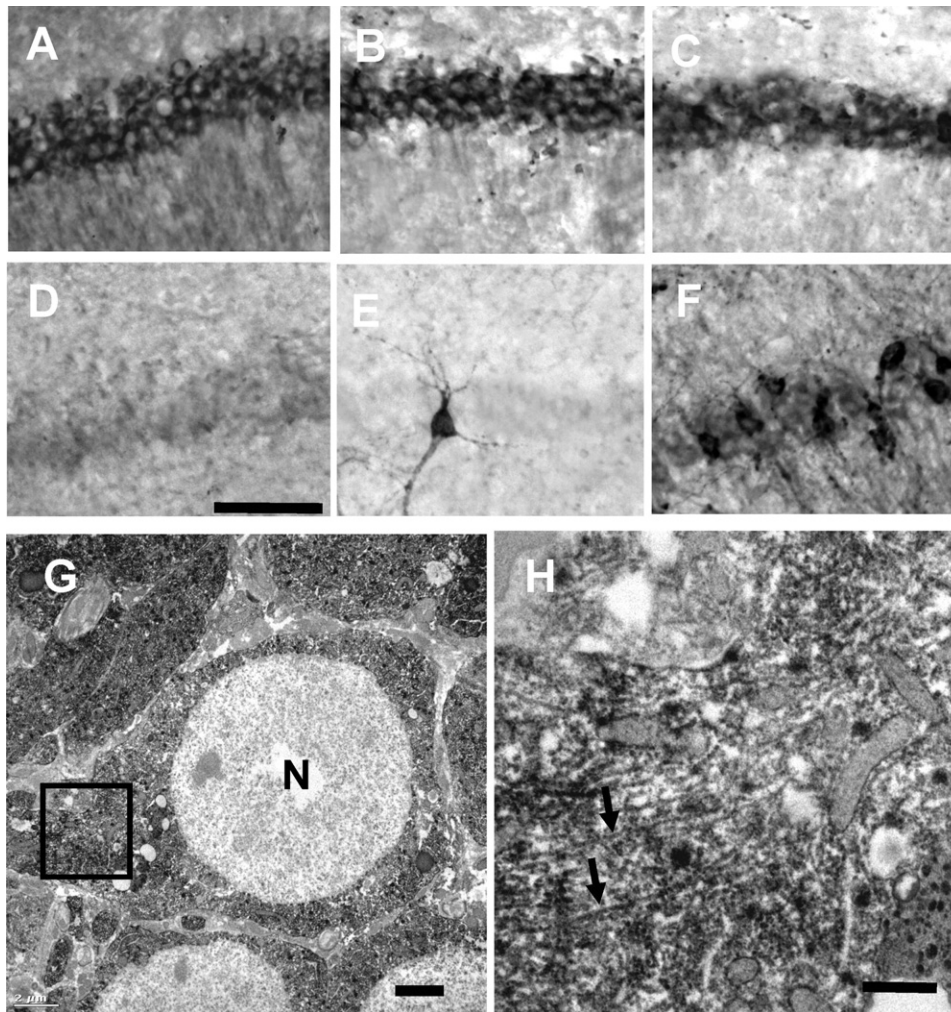


Fig. 6. Tau pathology presents in the hippocampal CA1 region of GSK-3 β /VLW mice. An age-dependent tau pathology occurs in mice overexpressing GSK-3 and FTDP-17 tau. Thus, some phospho-tau-positive pyramidal neurons can be found in the hippocampal CA1 sector at the age of 12 months. In 18-month-old GSK-3/VLW mice, the number of phospho-tau-positive neurons increases. Immunohistochemistry carried out with T14 (upper panels, A–C) and AT8 (lower panels, D–F) antibodies is shown for GSK-3/VLW mice at 6- (A, D), 12 (B, E) and 18-month-old (C, F) animals. Scale bar=100 μ m. (G, H) Immuno-electron microscopy analysis of GSK-3/VLW brain tissue (CA1 hippocampal region) showing the filamentous ultrastructure of a pyramidal neuron stained with the T14 antibody. N, unlabeled nucleus. (H) High magnification of the framed portion in (G), showing filaments (arrows) stained with the T14 antibody. Scale bars=2 μ m (G); 0.5 μ m (H).

pocampus. Our data demonstrate that neuronal subpopulations respond differentially to increased GSK-3 activity. Thus, dentate gyrus granular neurons undergo apoptotic death with subsequent degeneration of the mossy fibers, while CA1 pyramidal neurons do not suffer such neurodegenerative process. This is demonstrated by the presence of cleaved caspase-3 only in the dentate gyrus and not in CA1 region. The second main conclusion is that granular neurons are not able to induce tau aggregation, although tau phosphorylated in PHF-1 and AT-8 epitopes is found, while CA1 pyramidal neurons accumulate aggregates of abnormally hyperphosphorylated tau in the somatodendritic compartments, suggesting that those neurons that are able to induce tau aggregation are less vulnerable to neuronal death as has been previously shown (Morsch et al., 1999; Santacruz et al., 2005).

Axonopathy present in the subiculum of GSK-3/VLW mice has been also observed in other transgenic mice overexpressing human tau (Spittaels et al., 1999; Leroy et al., 2007). However, we found that somatodendritic tau present in pyramidal neurons is forming tau filaments, which is not the case for the one found in the axonal dilations from the subiculum. Interestingly no 12E8 immunostaining is found in the subiculum, suggesting that this epitope is important to tau aggregation into filaments. This is in good agreement with the fact that 12E8 labeling of AD brains is sparse in pre-tangles, while it predominates in tangles when compared with other phosphoepitopes (Lauckner et al., 2003). Phosphorylation in this site by GSK-3 has been reported (Hanger et al., 2007). Thus, it can be speculated that hTauVLW when phosphorylated by GSK-3 at AT-8 and PHF-1 epitopes, has less affinity for

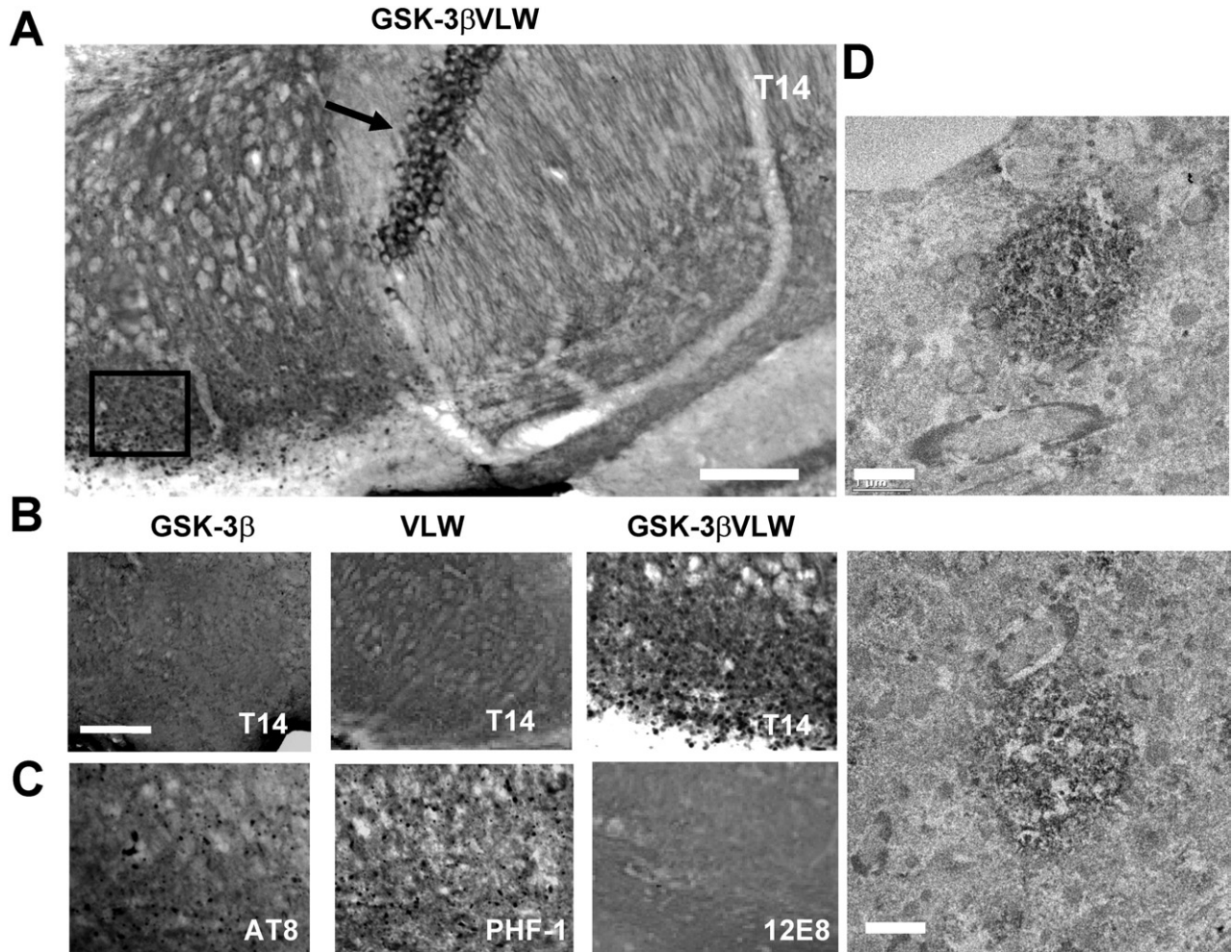


Fig. 7. Tau pathology presents in the subiculum of GSK-3 β /VLW mice. (A) Immunohistochemistry carried out with the antibody T14 showing the presence of tau reaction in CA1 region (arrow) of the hippocampus as well as in the subiculum of GSK-3 β /VLW mice. (B) The reaction present in the subiculum is only observed in the transgenic line that overexpresses both transgenes while GSK-3 β mice and VLW mice do not show that reaction. (C) AT-8 and PHF-1 antibodies stain the spheroids present in the subiculum of GSK-3 β /VLW mice while 12E8 does not give a positive reaction. (B, C) Pictures have been taken in an area equivalent to the one shown by the box in (A). (D) Immuno-electron microscopy analysis of GSK-3 β /VLW brain tissue (subiculum region) with the antibody T14 shows the absence of any filamentous ultrastructure in spheroids present in the subiculum. Two spheroids are shown. The scale bar=60 μ m (A); 1 μ m (D).

microtubules and therefore accumulates in axonal dilations as well as in the neuronal soma. Only in that neuronal compartment it is phosphorylated by GSK-3 β or other Ser-262 kinases, thus generating filaments and Thioflavine-S positive aggregates.

Taking into account data previously published as well as data shown here we propose a model of spreading of tau pathology throughout the hippocampus as a consequence of GSK-3 and FTDP-17 tau overexpression. Thus, our experiments indicate that at an early age in the dentate gyrus tau phosphorylation takes place and induces an apoptosis process with a reduction of its volume. On the contrary, CA1 pyramidal neurons are resistant to tau hyperphosphorylation up to the age of 12 months when tau begins to be hyperphosphorylated and accumulates in the somatodendritic compartment as well as in axons reaching the subiculum. At a later age (18 months), tau assembles into fibrillary polymers in the somatodendritic compartment.

The GSK-3 animal model exhibits severe spatial learning deficits in the Morris water maze (Hernandez et al., 2002) as well as impaired LTP (Hooper et al., 2007). Taking into account Timm's staining (Fig. 5), it can be suggested that the anatomical basis of these learning deficits is the absence of mossy fibers in GSK-3 β overexpressing mice.

CONCLUSION

In summary, our results show that increased GSK-3 activity induces a severe pathology in the hippocampus thus strengthening the hypothesis that GSK-3 dysregulation may contribute to AD. However, and taking into account our data, important differences seem to exist among neurons. More precisely, some neurons induce an apoptotic program while others seem to survive by inducing a tau aggregation strategy. In good agreement, it has been re-

cently published (Gomez-Sintes et al., 2007) that not all neurons respond in a similar way to decreased GSK-3 activity.

Acknowledgments—This work was supported by grants from Comunidad de Madrid (Neurodeg-Models), Spanish CICYT and by institutional grants from Fundación Ramón Areces. We are also grateful to Elena Langa and Raquel Cuadros for technical assistance.

REFERENCES

- Alonso A, Zaidi T, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2001) Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6923–6928.
- Alvarez G, MunozMontano JR, Satrustegui J, Avila J, Bogonez E, DiazNido J (1999) Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. *FEBS Lett* 453:260–264.
- Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F (2004) Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev* 84:361–384.
- Biernat J, Mandelkow EM, Schroter C, Lichtenberg-Kraag B, Steiner B, Berling B, Meyer H, Mercken M, Vandermeeren A, Goedert M, et al. (1992) The switch of tau protein to an Alzheimer-like state includes the phosphorylation of two serine-proline motifs upstream of the microtubule binding region. *EMBO J* 11:1593–1597.
- Busciglio J, Lorenzo A, Yeh J, Yankner BA (1995) beta-Amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron* 14:879–888.
- Engel T, Goni-Oliver P, Lucas JJ, Avila J, Hernandez F (2006a) Chronic lithium administration to FTDP-17 tau and GSK-3beta overexpressing mice prevents tau hyperphosphorylation and neurofibrillary tangle formation, but pre-formed neurofibrillary tangles do not revert. *J Neurochem* 99:1445–1455.
- Engel T, Lucas JJ, Gomez-Ramos P, Moran MA, Avila J, Hernandez F (2006b) Coexpression of FTDP-17 tau and GSK-3β in transgenic mice induce tau polymerization and neurodegeneration. *Neurobiol Aging* 27:1258–1268.
- Ferreira A, Lu Q, Orecchio L, Kosik KS (1997) Selective phosphorylation of adult tau isoforms in mature hippocampal neurons exposed to fibrillar A beta. *Mol Cell Neurosci* 9:220–234.
- Goedert M (2005) Tau gene mutations and their effects. *Mov Disord* 20(Suppl 12):S45–S52.
- Goedert M, Spillantini MG (2001) Tau gene mutations and neurodegeneration. *Biochem Soc Symp* (67):59–71.
- Gomez-Sintes R, Hernandez F, Bortolozzi A, Artigas F, Avila J, Zaratini P, Gotteland JP, Lucas JJ (2007) Neuronal apoptosis and reversible motor deficit in dominant-negative GSK-3 conditional transgenic mice. *EMBO J* 26:2743–2754.
- Grimes CA, Jope RS (2001) The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog Neurobiol* 65:391–426.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM (1986) Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 261:6084–6089.
- Hanger DP, Byers HL, Wray S, Leung KY, Saxton MJ, Seereeram A, Reynolds CH, Ward MA, Anderton BH (2007) Novel phosphorylation sites in tau from Alzheimer brain support a role for casein kinase 1 in disease pathogenesis. *J Biol Chem* 282:23645–23654.
- Hernandez 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* 83:1529–1533.
- Hong M, Chen DCR, Klein PS, Lee VMY (1997) Lithium reduces tau phosphorylation by inhibition of glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem* 272:25326–25332.
- Hooper C, Markevich V, Plattner F, Killick R, Schofield E, Engel T, Hernandez F, Anderton B, Rosenblum K, Bliss T, Cooke SF, Avila J, Lucas JJ, Giese KP, Stephenson J, Lovestone S (2007) Glycogen synthase kinase-3 inhibition is integral to long-term potentiation. *Eur J Neurosci* 25:81–86.
- Imahori K, Uchida T (1997) Physiology and pathology of tau protein kinases in relation to Alzheimer's disease. *J Biochem (Tokyo)* 121:179–188.
- Kosik KS (1992) Alzheimer's disease: a cell biological perspective. *Science* 256:780–783.
- Lauckner J, Frey P, Geula C (2003) Comparative distribution of tau phosphorylated at Ser262 in pre-tangles and tangles. *Neurobiol Aging* 24:767–776.
- Leroy K, Bretteville A, Schindowski K, Gilissen E, Authalet M, De Decker R, Yilmaz Z, Buee L, Brion JP (2007) Early axonopathy preceding neurofibrillary tangles in mutant tau transgenic mice. *Am J Pathol* 171:976–992.
- Lim F, Hernandez F, Lucas JJ, Gomez-Ramos P, Moran MA, Avila J (2001) FTDP-17 mutations in tau transgenic mice provoke lysosomal abnormalities and tau filaments in forebrain. *Mol Cell Neurosci* 18:702–714.
- Lovestone S, Hartley CL, Pearce J, Anderton BH (1996) Phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase-3 beta in intact mammalian cells: the effects on the organization and stability of microtubules. *Neuroscience* 73:1145–1157.
- Lucas JJ, Hernandez F, Gomez-Ramos P, Moran MA, Hen R, Avila J (2001) Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *EMBO J* 20:27–39.
- Merrick SE, Demoise DC, Lee VMY (1996) Site-specific dephosphorylation of tau protein at Ser(202)/Thr(205) in response to microtubule depolymerization in cultured human neurons involves protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* 271:5589–5594.
- Morsch R, Simon W, Coleman PD (1999) Neurons may live for decades with neurofibrillary tangles. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:188–197.
- MunozMontano JR, Moreno FJ, Avila J, DiazNido J (1997) Lithium inhibits Alzheimer's disease-like tau protein phosphorylation in neurons. *FEBS Lett* 411:183–188.
- Paxinos G, Franklin KBJ (2001) The mouse brain. Oxford, UK: Academic Press.
- Pei JJ, Braak E, Braak H, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Winblad B, Cowburn RF (1999) Distribution of active glycogen synthase kinase 3beta (GSK-3beta) in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:1010–1019.
- Santacruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, Guimaraes A, DeTure M, Ramsden M, McGowan E, Forster C, Yue M, Orne J, Janus C, Mariash A, Kuskowski M, Hyman B, Hutton M, Ashe KH (2005) Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 309:476–481.
- Seubert P, Mawal-Dewan M, Barbour R, Jakes R, Goedert M, Johnson GV, Litsky JM, Schenk D, Lieberburg I, Trojanowski JQ, et al. (1995) Detection of phosphorylated Ser262 in fetal tau, adult tau, and paired helical filament tau. *J Biol Chem* 270:18917–18922.
- Spittaels K, VandenHaute C, VanDorpe J, Bruynseels K, Vandezande K, Laenen I, Geerts H, Mercken M, Sciot R, VanLommel A, Loos R, VanLeuven F (1999) Prominent axonopathy in the brain and spinal cord of transgenic mice overexpressing four-repeat human tau protein. *Am J Pathol* 155:2153–2165.
- Takashima A, Noguchi K, Michel G, Mercken M, Hoshi M, Ishiguro K, Imahori K (1996) Exposure of rat hippocampal neurons to amyloid beta peptide (25–35) induces the inactivation of phosphatidylinositol-3 kinase and the activation of tau protein kinase I glycogen synthase kinase-3 beta. *Neurosci Lett* 203:33–36.
- Takashima A, Noguchi K, Sato K, Hoshino T, Imahori K (1993) Tau protein kinase I is essential for amyloid beta-protein-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:7789–7793.

Wenzel HJ, Cole TB, Born DE, Schwartzkroin PA, Palmiter RD (1997) Ultrastructural localization of zinc transporter-3 (ZnT-3) to synaptic vesicle membranes within mossy fiber boutons in the hippocampus of mouse and monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12676–12681.

Yamaguchi H, Ishiguro K, Uchida T, Takashima A, Lemere CA, Imahori K (1996) Preferential labeling of Alzheimer neurofibrillary tangles with antisera for tau protein kinase (TPK) I/glycogen synthase kinase-3 beta and cyclin-dependent kinase 5, a component of TPK II. *Acta Neuropathol (Berl)* 92:232–241.

(Accepted 16 September 2008)
(Available online 4 October 2008)

