

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Departamento de Biología Molecular**



**ESTUDIO DE LAS FUNCIONES  
FISIOLÓGICAS Y PATOLÓGICAS DE  
LA PROTEÍNA TAU MEDIANTE EL  
USO DE MODELOS MURINOS  
DEFICIENTES EN TAU**

**TESIS DOCTORAL**

**Elena Gómez de Barreda Santiago**

Madrid, 2010



Memoria de investigación presentada por  
**Elena Gómez de Barreda Santiago**  
Para optar al grado de  
**Doctor en Ciencias**  
por la **Universidad Autónoma de Madrid**

Trabajo dirigido por:

**Dra. M<sup>a</sup> del Mar Pérez Martínez**

Contratado Doctor del Departamento de Anatomía,  
Histología y Neurociencia de la Facultad de Medicina de la  
Universidad Autónoma de Madrid

y por

**Dr. Jesús Ávila de Grado**

Profesor de Investigación del Consejo Superior de  
Investigaciones Científicas (CSIC)

**La presente tesis ha sido realizada en el Centro  
de Biología Molecular “Severo Ochoa”  
(CSIC-UAM)**







CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR "SEVERO OCHOA"

Madrid, 30 de Septiembre de 2010

**M<sup>a</sup> del Mar Pérez Martínez**, Contratado Doctor del Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid

y **Jesús Ávila de Grado**, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

INFORMAN:

Que la presente tesis doctoral titulada **“Estudio de las funciones fisiológicas y patológicas de la proteína tau mediante el uso de modelos murinos deficientes en tau”** ha sido realizada bajo nuestra dirección por Dña. Elena Gómez de Barreda Santiago. Consideramos que el trabajo reviste las características de originalidad y calidad científica requeridas para ser defendido como Tesis Doctoral para optar al Grado de Doctor.

Los co-directores de la tesis,

M<sup>a</sup> del Mar Pérez Martínez

Jesús Ávila de Grado

C/Nicolás Cabrera 1  
Cantoblanco (Campus UAM)  
28049-Madrid .  
Teléfono: +34-911964401  
Fax: +34-911964420



---

# Indice





<b>Indice</b> .....	<b>I</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>VII</b>
<b>Summary</b> .....	<b>XIII</b>

## **Introducción** ..... **1**

1. Estructura de la proteína tau.....	3
2. El gen de tau.....	4
3. Distribución de tau .....	6
4. Funciones fisiológicas de tau .....	7
4.1. Ensamblaje y estabilización de microtúbulos .....	7
4.2. Transporte axonal .....	8
4.3. Interacción con otras proteínas.....	9
5. Disfunción de tau .....	10
5.1. Tauopatías .....	10
5.2. Enfermedad de Alzheimer.....	11
• Placas seniles .....	12
• Ovillos neurofibrilares.....	13
5.3. Papel de tau en la neurodegeneración .....	14
• Hiperfosforilación de tau .....	14
• Agregación de tau.....	15
5.4. Enzimas responsables de la fosforilación de tau.....	16
5.4.1. Fosforilación por GSK3 .....	16
• Regulación de GSK3 .....	18
• Implicación de GSK3 en la enfermedad de Alzheimer .....	20
6. Modelos animales para el estudio de la función y disfunción de tau.....	21
6.1. Modelos con mutaciones de tau asociadas a FTDP-17 .....	21
6.2. Modelos de ratón deficientes en tau.....	22
6.3. Modelos murinos de fosforilación de tau.....	23

## **Objetivos**..... **25**

## **Materiales y métodos** ..... **29**

1. Materiales.....	31
1.1. Reactivos.....	31
1.2. Anticuerpos .....	31
1.3. Animales .....	32
2. Metodología .....	34
2.1. Técnicas bioquímicas.....	34
2.1.1. Análisis de la expresión génica ( <i>Array</i> genético).....	34
2.1.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	34
2.1.3. Purificación de RNA y PCR cuantitativa .....	35
2.1.4. Preparación de extractos proteicos .....	37
2.1.5. <i>Western blot</i> .....	37

2.1.6. Fraccionamiento subcelular .....	38
2.1.7. Inmunoprecipitación .....	39
2.2. Técnicas histológicas .....	40
2.2.1. Inmunohistoquímica .....	40
2.2.2. Medida del volumen del giro dentado .....	40
2.3. Cultivos celulares .....	41
2.3.1. Cultivo de líneas celulares .....	41
2.3.2. Diferenciación de las células SH-SY5Y .....	41
2.3.3. Cultivos primarios de neuronas .....	42
2.3.4. Inmunofluorescencia de cultivos celulares .....	42
2.3.5. Determinación del fluorimétrica del calcio intracelular con la sonda Fura-2 .....	43
2.4. Pruebas de comportamiento .....	44
2.4.1. Test de reconocimiento del objeto .....	44
2.4.2. Test de Morris .....	45
2.5. Análisis estadístico .....	46

---

## **Resultados ..... 47**

1. Estudio de la función de tau .....	49
1.1. Implicación de tau en el proceso de acetilación de la tubulina .....	49
1.1.1. En ausencia de tau disminuye la acetilación de la tubulina .....	49
1.1.2. Tau interacciona con la histona desacetilasa 6 .....	51
1.2. Estudio de la expresión génica en el ratón Tau <sup>-/-</sup> .....	52
1.2.1. Array genético del modelo de ratón Tau <sup>-/-</sup> .....	52
1.2.2. Validación de los cambios de expresión génica en el ratón Tau <sup>-/-</sup> .....	53
1.2.3. Estudio del gen <i>smarce1</i> .....	55
1.2.3.1. Validación del aumento de <i>smarce1</i> a nivel de proteína .....	55
1.2.3.2. Retraso en la elongación del axón en los ratones Tau <sup>-/-</sup> .....	58
1.2.4. Estudio del gen de la calbindina .....	59
1.2.4.1. Validación de la disminución de <i>calb1</i> a nivel de proteína .....	59
1.2.4.2. El déficit de tau también provoca la disminución de otra proteína de unión a calcio: la calmodulina .....	60
1.2.4.3. Incremento de los niveles de calmodulina nuclear en neuronas deficientes en tau .....	61
1.2.4.4. El aumento de tau provoca un incremento de los niveles de calbindina .....	62
1.2.4.5. El aumento de tau provoca una disminución de los niveles de calmodulina nuclear .....	63
1.2.4.6. Efecto de la presencia de tau en la homeostasis intracelular del calcio .....	64
2. Estudio de la función de tau fosforilado .....	66
2.1. Generación del modelo triple transgénico Tet/GSK3β+Tau <sup>-/-</sup> .....	66
2.2. Caracterización bioquímica y comportamental del modelo Tet/GSK3β+Tau <sup>-/-</sup> .....	67
2.2.1. Caracterización del modelo Tet/GSK3β+Tau <sup>-/-</sup> mediante análisis inmunohistoquímico .....	67

2.2.2. Caracterización del modelo Tet/GSK3 $\beta$ +Tau <sup>-/-</sup> mediante análisis por <i>western blot</i> .....	69
2.2.3. Caracterización a nivel comportamental del modelo Tet/GSK3 $\beta$ +Tau <sup>-/-</sup> .....	70
2.3. Estudio de la neurodegeneración en el modelo Tet/GSK3 $\beta$ +Tau <sup>-/-</sup> .....	73
2.3.1. Disminución de la gliosis reactiva en el hipocampo de los ratones Tet/GSK3 $\beta$ +Tau <sup>-/-</sup> .....	73
2.3.2. Descenso de la muerte neuronal por apoptosis en el hipocampo de los ratones Tet/GSK3 $\beta$ +Tau <sup>-/-</sup> .....	74
2.3.3. Retraso de la atrofia del giro dentado en los ratones Tet/GSK3 $\beta$ +Tau <sup>-/-</sup> .....	75
2.4. Estudio de otra diana de GSK3 $\beta$ : la $\beta$ -catenina.....	77
2.4.1. Los niveles de $\beta$ -catenina nuclear están disminuidos en los ratones Tet/GSK3 $\beta$ +Tau <sup>-/-</sup> .....	77

## **Discusión ..... 79**

1. Consecuencias de la pérdida de función fisiológica de tau.....	81
1.1. Implicación de tau en el transporte axonal.....	81
1.2. Implicación de tau en el desarrollo neuronal.....	84
1.3. Implicación de tau en la homeostasis del calcio intracelular.....	87
2. Función tóxica de tau en estado hiperfosforilado.....	90

## **Conclusiones .....97**

## **Bibliografía .....99**

## **Anexo I .....119**

## **Anexo II.....129**



---

# Abreviaturas



- A $\beta$** : *Amyloid- $\beta$  Peptide* / Péptido  $\beta$ -amiloide
- APC**: *Adenomatous Polyposis coli gene product* / Proteína de la poliposis adenomatosa de colon
- apoE/APOE**: *apolipoprotein E* / apolipoproteína E (gen/proteína)
- app/APP**: *amyloid precursor protein* / proteína precursora del amiloide (gen/proteína)
- ATP**: *adenosine triphosphate* / adenosina trifosfato
- BAF57**: *BRG1 Associated Factor-57* / Factor asociado a BRG1-57
- BDNF**: *Brain-Derived Neurotrophin Factor* / Factor neurotrófico derivado de cerebro
- BRG1**: *Brahma-Related Gene 1* / Gen asociado a Brahma 1
- BSA**: *Bovine Serum Albumin* / Seroalbúmina Bovina
- CA**: *cornu Ammon* / cuerno de Ammon
- calb1**: *calbindin 1* / calbindina 1 (gen)
- CaMKII**: *Calcium/calmodulin-dependent protein Kinase II* / Proteína Quinasa dependiente de Calcio/calmodulina
- Cdc2**: *Cell division cycle 2* / Quinasa del ciclo de división celular 2
- CDK5**: *Cyclin-Dependent Kinase 5* / Quinasa Dependiente de Ciclina 5
- cDNA**: *complementary desoxyribonucleic acid* / ácido desoxirribonucleico complementario
- CKII**: *casein kinase II* / caseína quinasa 2
- CoREST**: *REST corepressor* / corepresor de REST
- CREB**: *cAMP-responsive element binding protein* / Proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP
- C<sub>T</sub>**: *Threshold Cycle* / Ciclo Umbral
- C-terminal**: carboxilo terminal
- dbAMPC**: dibutilil AMP cíclico
- DISC1**: *Disrupted in Schizophrenia 1*; Proteína afectada en Esquizofrenia 1
- DIV**: *Days in vitro* / Días *in vitro*
- DNA**: *Deoxyribonucleic acid* / Ácido desoxirribonucleico
- DTT**: *Dithiothreitol* / Ditiotreitól
- EA**: Enfermedad de Alzheimer
- EDTA**: *Ethylenediaminetetraacetic acid* / Ácido Etildiaminotetraacético
- EGTA**: *Ethylenglycoltetracetic* / Ácido Etilenglicoltetracético
- eIF2B**: *eukaryotic initiation factor 2B* / Factor de Iniciación Eucariótico 2B
- FBS**: *Foetal Bovine Serum* / Suero Fetal Bovino
- FTDP-17**: *Frontotemporal Dementia with Parkinsonism linked to chromosome 17*; demencia frontotemporal con parkinsonismo ligada al cromosoma 17
- GFAP**: *Glial Fibrillary Acidic Protein* / Proteína Ácida Fibrilar de Glía
- GFP**: *Green Fluorescent Protein* / Proteína verde fluorescente
- grn**: *progranulin* / progranulina (gen)
- GSK3**: *glycogen synthase kinase 3* / glucógeno sintasa quinasa 3
- GTP**: *guanosine triphosphate* / guanosina trifosfato
- HDAC**: *Histone Deacetylase* / Histona Desacetilasa
- HEPES**: *N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid* / N-(2-hidroxietil)-piperacina-N'-2-ácido etanolsulfónico

- HRP:** *Horseradish peroxidase*; peroxidasa de rábano
- HSP90:** Heat Shock Protein 90 / Proteína de Choque térmico 90
- Iba-1:** *Ionized Calcium Binding Adapter Molecule-1* / Molécula Adaptadora de Unión a Calcio Ionizado 1
- IRS:** *Insulin Receptor Substrates* / Sustratos del Receptor de Insulina
- JIP1:** *JNK-interacting protein* / Proteína que Interacciona con JNK
- JNK:** *c-Jun NH2-terminal Kinase* / Quinasa c-Jun NH2-terminal
- kDa:** *kilodalton* / kilo Dalton
- MAP:** *Microtubule-associated protein* / Proteína asociada a microtúbulos
- map1lc3a:** *Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha* / Cadena ligera alfa de la proteína asociada a microtúbulos 1
- Mapt:** Microtubule Associated Protein Tau / Proteína Asociada a Microtúbulos Tau (gen)
- MARK:** *MAP/microtubule Affinity-Regulating kinase* / Quinasa reguladora de afinidad entre MAP y microtúbulos
- MCI:** Mild Cognitive Impairment / Deterioro Cognitivo Leve
- MeCP2:** *methyl CpG binding protein 2* / proteína de unión a metil-CpG 2
- mRNA:** messenger RNA / RNA mensajero
- NAT1:** *N-acetyltransferase 1* / N-acetiltransferasa 1
- NFT:** *Neurofibrillary Tangles* / ovillos neurofibrilares
- NMDA:** *N-methyl-D-Aspartate* / N-Metil-D-Aspartato
- N-terminal:** amino terminal
- pb:** pares de bases
- PBS:** *Phosphate-Buffered Saline* / Solución Salina de Fosfato Tamponada
- PCR:** *polymerase Chain Reaction*; reacción en cadena de la polimerasa
- PFA:** paraformaldehído
- PHF:** *Paired Helical Filaments*; filamentos pareados helicoidales
- PKA:** *Protein Kinase A* / Proteína Quinasa A
- PKB:** *Protein Kinase B* / Proteína Quinasa B
- PKC:** *Protein Kinase C* / Proteína Quinasa C
- PMSF:** *Phenylmethylsulfonyl fluoride*; Fenilmetilsulfonyl fluoruro
- PP:** Protein Phosphatase / Proteína Fosfatasa
- RE1:** *repressor element 1*/ elemento represor 1
- REST:** *RE1 Silencing Transcription factor* / Factor de Transcripción Silenciador de RE1
- RNA:** *ribonucleic acid*; ácido ribonucleico
- rpm:** revoluciones por minuto
- SAPK:** Stress Activated Protein Kinase / quinasa activada por estrés
- SDS:** *Sodium Dodecyl Sulphate* / Dodecil Sulfato Sódico
- SNC:** Sistema Nervioso Central
- SF:** Straight Filament / Filamento Recto
- siRNA:** small interfering RNA / RNA de interferencia de pequeño tamaño
- SIRT2:** sirtuin 2 / sirtuina 2



**smarce1:** *SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily e, member 1* / Miembro 1 de la subfamilia e, de reguladores de cromatina dependientes de actina, asociados a matriz, relacionados con SWI/SNF

**tau3R:** tau con 3 repeticiones de unión a tubulina

**tau4R:** tau con 4 repeticiones de unión a tubulina

**TSA:** *Trichostatin A* / Tricostatina A

**VDAC:** *Voltage Dependent Anion Channel* / canal de aniones dependiente de voltaje

**Wt:** *Wild type* / silvestre



---

## *Summary*



*Tau is a major neuronal microtubule-associated protein whose main known biological function is to stimulate microtubule assembly and to stabilize the microtubule network that composes the axon. Tau protein has been primarily studied due to its dysfunction in a subset of neurodegenerative disorders known as tauopathies, the most common of which is Alzheimer's disease. These pathologies are characterized by the accumulation of abnormally hyperphosphorylated tau aggregates in the central nervous system, distributed in a pattern which correlates with the progression of dementia. It remains unclear whether the deleterious effects of tau pathologies result from a toxic gain-of-function by hyperphosphorylated and/or aggregated tau or from critical losses of normal tau function in the disease state.*

*In order to elucidate this controversial issue, we took advantage of a transgenic mouse model in which the tau gene is disrupted. We observed that tau deficiency affected HDAC6-mediated tubulin acetylation, leading to decreased acetylated-tubulin levels. In fact, we demonstrate an interaction between tau and HDAC6 which we propose results in HDAC6 inhibition. To further investigate tau functions, we performed a genetic array to analyze tau deficiency-derived gene expression alterations. The transcriptional analysis revealed that tau deficiency led to upregulation of the *smarce1* gene, which encodes BAF57 protein. BAF57 is involved in the repression of neuron specific genes, which may explain the observed delay in axonal elongation in tau deficient neurons. We also demonstrated decreased calbindin and calmodulin levels in tau deficient mice, which may correlate with reduced calcium-buffering capacity in the absence of tau.*

*To determine the toxic role of hyperphosphorylated tau, we generated a transgenic mouse model lacking tau protein and overexpressing GSK3 $\beta$ . These mice showed a delay in the progression of neurodegeneration, suggesting that tau phosphorylation results in a toxic gain-of-function.*



---

# Introducción





La proteína tau pertenece a la familia de proteínas asociadas a microtúbulos (MAP; *Microtubule-associated proteins*). Se descubrió casi simultáneamente en Estados Unidos y Europa, como una proteína que promovía el ensamblaje de los microtúbulos (Cleveland *et al.*, 1977a; Cleveland *et al.*, 1977b; Fellous *et al.*, 1977; Weingarten *et al.*, 1975). Tau es una proteína neuronal, cuya principal función es la estabilización de los microtúbulos en el axón (Binder *et al.*, 1985; Drubin and Kirschner, 1986; Weingarten *et al.*, 1975). Sin embargo, el interés en tau no se ha debido tanto a su función fisiológica como a su disfunción en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer.

## 1. Estructura de la proteína tau

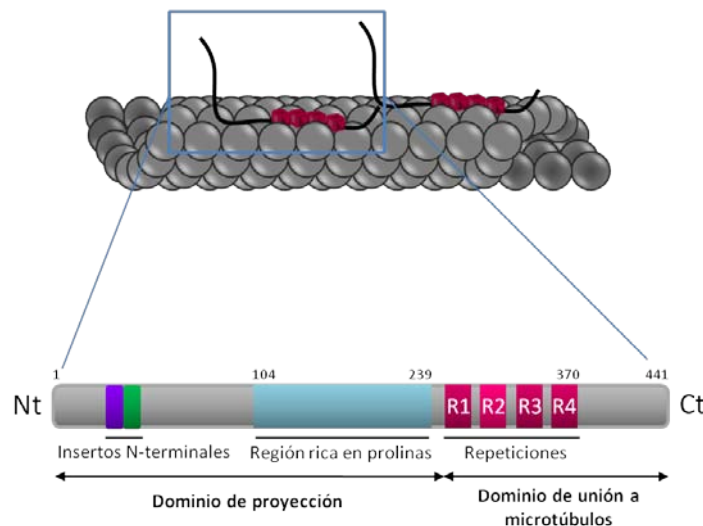
Tau es una molécula hidrofílica que, al ser analizada en disolución, aparece como una proteína con plegamiento al azar, sin estructura secundaria definida (Cleveland *et al.*, 1977a; Mandelkowitz *et al.*, 1995).

Se pueden distinguir dos dominios funcionales en la proteína tau: el dominio de proyección y el dominio de unión a microtúbulos (Figura 1).

El dominio de proyección se denomina así debido a que se proyecta fuera de la superficie del microtúbulo. Comprende dos tercios de la molécula hacia el extremo amino terminal (N-terminal) y se divide, a su vez, en dos regiones: la región N-terminal y la región rica en prolina. La región N-terminal puede contener uno, dos o ninguno de los insertos codificados por los exones 2 y 3 del gen de tau. Esta región es rica en cargas negativas, al igual que la superficie de los microtúbulos, lo que da lugar a repulsiones electrostáticas entre ambos (Amos, 2004; Kar *et al.*, 2003). Por esa razón, se ha sugerido que esta región podría ser responsable de mantener un espaciamiento entre los microtúbulos del axón (Chen *et al.*, 1992; Frappier *et al.*, 1994; Georgieff *et al.*, 1991). De hecho, se ha descrito que el diámetro axonal en el sistema nervioso periférico, en el que se expresa la isoforma “*big tau*”, es mayor que en el sistema nervioso central (Georgieff *et al.*, 1991). La región rica en prolina está localizada inmediatamente antes del dominio de unión a microtúbulos y contiene numerosos residuos de serina/treonina seguidos de prolina. Estas secuencias constituyen sitios de reconocimiento para quinasas dirigidas por prolina. Se ha sugerido que, a través del dominio de proyección, tau puede interactuar con otras proteínas del citoesqueleto (Hirokawa *et al.*, 1988), incluso con la membrana plasmática (Arrasate *et al.*, 2000). Otra función que se le ha atribuido a este dominio es la de unir cationes, debido a la presencia de residuos ácidos. De hecho, se ha propuesto la existencia de un motivo de unión a hierro en la molécula de tau (Arrasate *et al.*, 1997).

El dominio de unión a microtúbulos contiene dos regiones: la región de las repeticiones y la región carboxilo terminal (C-terminal). La región de las repeticiones contiene tres o cuatro

repeticiones, similares pero no idénticas, de 31 ó 32 aminoácidos. Cada una de las repeticiones se divide a su vez en dos partes, una compuesta por 18 residuos, que contiene la secuencia mínima con capacidad de unión a tubulina, y otra, menos conservada, de 13 ó 14 residuos, que se denomina inter-repetición. El dominio de unión a microtúbulos tiene la función de unir tau a la tubulina, lo que promueve el ensamblaje de los microtúbulos (Aizawa *et al.*, 1989). Dentro de este dominio, la secuencia con mayor capacidad de unión a los microtúbulos es la que contiene las dos primeras repeticiones y la inter-repetición que se localiza entre ellas (Goode *et al.*, 1997). La región C-terminal también es rica en prolinas y contiene varios residuos susceptibles de fosforilación. Esta fosforilación podría regular la unión de tau a los microtúbulos (Perez *et al.*, 2000).



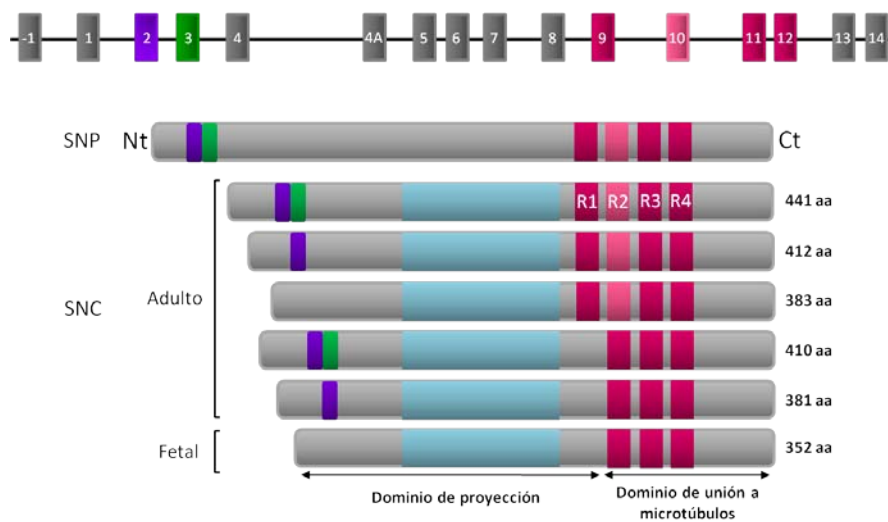
**Figura 1. Estructura de la proteína tau.** En la parte superior de la figura se muestra un esquema de la interacción de tau con los microtúbulos, a través de la región de las repeticiones, quedando el dominio de proyección orientado hacia el exterior. En la parte inferior se indican los principales dominios y regiones de la proteína en la isoforma humana del sistema nervioso central más larga. (Nt, extremo amino terminal; Ct, extremo carboxilo terminal).

## 2. El gen de tau

El gen de tau se aisló por primera vez a partir de una librería de cDNA de cerebro de ratón (Lee *et al.*, 1988). Posteriormente, se ha clonado en muchas otras especies, incluido el ser humano (Goedert *et al.*, 1992; Goedert *et al.*, 1989a; Goedert *et al.*, 1989b; Nelson *et al.*, 1996).

El gen humano de la proteína tau es de una sola copia, se localiza en el cromosoma 17q21 y contiene 16 exones (Figura 2) (Neve *et al.*, 1986). En el sistema nervioso central (SNC) adulto humano se expresan seis isoformas diferentes de tau, debido al procesamiento alternativo del exón 10 (3 ó 4 repeticiones en el dominio de unión a microtúbulos), y de los exones 2 y 3 (presencia o ausencia de uno o dos insertos N-terminales) (Figura 2) (Goedert *et al.*, 1989a;

Goedert *et al.*, 1989b). El exón 2 puede aparecer solo, pero el exón 3 nunca aparece independiente del 2 (Andreadis *et al.*, 1995). Todas estas isoformas se expresan de forma diferencial durante el desarrollo, de tal forma que sólo una, caracterizada por la ausencia de insertos en la región N-terminal y la presencia de tres repeticiones en el extremo C-terminal, está presente en estadios fetales (Brion *et al.*, 1993; Kosik *et al.*, 1989), mientras que las seis isoformas se expresan durante la etapa adulta (Hong *et al.*, 1998). Además, las seis isoformas pueden distribuirse de forma diferencial en subpoblaciones neuronales. Por ejemplo, en las células granulares del giro dentado sólo se encuentran RNA mensajeros (mRNA) de tau sin exón 10 (Goedert *et al.*, 1989a; Goedert *et al.*, 1989b). Debido a que el exón 10 codifica una de las repeticiones de unión a microtúbulos, su procesamiento alternativo produce isoformas de tau con 3 (tau3R, sin exón 10) o 4 (tau 4R, con exón 10) repeticiones de unión a tubulina. Las isoformas tau4R se unen con mayor afinidad a los microtúbulos que las tau3R (Lee *et al.*, 1989) y pueden desplazar al tau3R previamente unido a los microtúbulos (Lu and Kosik, 2001). Por esta razón, se sugiere que la presencia de una única isoforma tau3R, en los estadios tempranos del desarrollo, podría ser necesaria para conferir al citoesqueleto la suficiente plasticidad para la formación de sinapsis y la migración neuronal (Goedert and Jakes, 1990). De hecho, se ha observado que la expresión en ratón únicamente de tau4R, inhibe la proliferación y promueve la diferenciación neuronal y el crecimiento axonal (Sennvik *et al.*, 2007).



**Figura 2. Diagrama esquemático del gen de tau y de las diferentes isoformas de la proteína.** Como consecuencia del procesamiento alternativo del transcrito primario del gen de tau se producen seis isoformas de la proteína en sistema nervioso central (SNC) y una isoforma en sistema nervioso periférico (SNP). En morado (■) y verde (■) se indican los insertos amino-terminales, codificados por los exones 2 y 3, respectivamente. La región en color azul (■) dentro del dominio de proyección corresponde a la región rica en prolina. A la izquierda se muestra el tamaño de cada isoforma en número de aminoácidos (aa). (Nt, extremo amino terminal; Ct, extremo carboxilo terminal).

Además, en el sistema nervioso periférico, existe una isoforma de tau de gran peso molecular (aproximadamente 100 kDa), conocida como tau de gran tamaño o *big tau*, en la que se expresa el exón 4A (Couchie *et al.*, 1992; Goedert *et al.*, 1992; Nunez, 1988).

### 3. Distribución de tau

La proteína tau se detecta en distintas regiones del cerebro humano adulto: la corteza, el hipocampo, el tálamo, el estriado y, en menor medida, el cerebelo (Goedert *et al.*, 1989b; Trojanowski *et al.*, 1989). En la corteza cerebral humana la proteína tau se localiza en las células piramidales, predominantemente en las capas más profundas (Goedert *et al.*, 1989b; Kosik *et al.*, 1989). En el hipocampo, las células granulares del giro dentado sólo expresan isoformas de tau3R, mientras que en las células piramidales de CA (*cornu Ammonis*; cuernos de Ammon) y del subiculum se detectan tanto las isoformas de tau con 3 como con 4 repeticiones (Goedert *et al.*, 1989b).

Tau es una proteína neuronal, aunque se ha descrito su presencia en células no-neuronales como la glía (Lee *et al.*, 2001; LoPresti *et al.*, 1995), los fibroblastos (Ingelson *et al.*, 1996) o los linfocitos (Thurston *et al.*, 1996). En las neuronas, tau se localiza preferentemente en el citoplasma, unida a los microtúbulos del axón (Lindwall and Cole, 1984), aunque recientemente también se ha observado la presencia de una pequeña proporción de tau en las dendritas (Ittner *et al.*, 2010). Asimismo, se ha descrito su asociación con la membrana plasmática (Arrasate *et al.*, 2000; Brandt *et al.*, 1995) y con determinados orgánulos como las mitocondrias (Rendon *et al.*, 1990) o los ribosomas (Papazosomenos and Su, 1991). Incluso se ha detectado tau en el núcleo celular (Brady *et al.*, 1995; Cross *et al.*, 2000; Greenwood and Johnson, 1995; Loomis *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1993).

El estado de fosforilación de tau puede influir en su distribución intracelular. Así, en neuronas en desarrollo, tau fosforilado en la región rica en prolinas se localiza principalmente en el compartimento somatodendrítico, mientras que, cuando esta región se encuentra desfosforilada, se detecta en la porción distal del axón (Dotti *et al.*, 1987; Mandell and Banker, 1996). Tau también se localiza preferentemente en la región distal del axón cuando se encuentra fosforilado en el dominio C-terminal (Dotti *et al.*, 1987). Se ha observado que una proporción de la proteína tau nuclear se encuentra fosforilada, localizándose por todo el núcleo, excepto en los nucléolos, en los que sólo se encuentra tau sin fosforilar (Greenwood and Johnson, 1995; Rossi *et al.*, 2008; Sjoberg *et al.*, 2006).

## 4. Funciones fisiológicas de tau

### Ensamblaje y estabilización de los microtúbulos

Los microtúbulos son estructuras muy dinámicas que, en la mayoría de las células, se encuentran en un constante proceso de polimerización/despolimerización, denominado inestabilidad dinámica. Sin embargo, en las neuronas, los microtúbulos se estabilizan en determinadas direcciones, generando las extensiones citoplasmáticas que darán lugar al axón y las dendritas (Mitchison and Kirschner, 1988). Esta estabilización de la red microtubular es posible gracias a la presencia de proteínas que se asocian a la tubulina, denominadas proteínas asociadas a microtúbulos o MAP, entre las que se encuentra tau.

En 1975, Weingarten y colaboradores describieron la proteína tau, y ya establecieron una función de ésta en el proceso de ensamblaje de los microtúbulos (Weingarten *et al.*, 1975). Hoy en día se sabe que tau se une a la región C-terminal de la  $\beta$ -tubulina (Serrano *et al.*, 1985). Se ha propuesto que la unión de tau favorece la polimerización de la tubulina ya que, al unirse al C-terminal, evita la interacción intramolecular de esta región con una zona próxima al dominio de unión a GTP de la  $\beta$ -tubulina (Avila *et al.*, 2010; Padilla *et al.*, 1993). Esta interacción intramolecular parece dificultar la unión del GTP a la  $\beta$ -tubulina, necesaria para la reacción de polimerización (Ringel and Sternlicht, 1984).

Estudios *in vitro* determinaron que tau actúa tanto iniciando la nucleación de los microtúbulos, como estabilizando los microtúbulos previamente polimerizados (Bre and Karsenti, 1990; Drechsel *et al.*, 1992; Drubin and Kirschner, 1986; Maccioni *et al.*, 1989). Este papel estabilizador de los microtúbulos se ha demostrado en diversos sistemas. En células no-neuronales, se ha descrito que la expresión de tau exógena provoca el ensamblaje y formación de haces de microtúbulos (Knowles *et al.*, 1994; Lee and Rook, 1992), lo que promueve la extensión de largas prolongaciones citoplasmáticas (Baas *et al.*, 1991; Knops *et al.*, 1991). Por otra parte, en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, que expresa niveles bajos de proteína tau, la diferenciación de las células provoca un aumento de 3 veces los niveles de tau total y la adquisición de una morfología más neuronal (Haque *et al.*, 1999). Al suprimir la expresión de tau, con oligonucleótidos antisentido, en cultivos primarios de neuronas, se ha observado que tau afecta a la polarización y la elongación de las neuritas (Caceres and Kosik, 1990; Caceres *et al.*, 1991). Los microtúbulos, una vez estabilizados, podrán sufrir diversas modificaciones postraduccionales, como la acetilación o la destirosinación (Fukushima *et al.*, 2009).

En condiciones fisiológicas, tau se encuentra en constante equilibrio dinámico de unión y desunión a los microtúbulos, equilibrio que está controlado en gran medida por su grado de

fosforilación. La fosforilación afectará de distinta manera a la función de tau dependiendo en la región de la molécula en que se produzca. Cuando tau es fosforilada en el dominio de unión a microtúbulos disminuye enormemente su afinidad por los mismos. En el caso de la región rica en prolinas, su fosforilación también inhibe, aunque en menor medida, la unión a los microtúbulos, al contrario que ocurre cuando se fosforila la región carboxilo terminal, en cuyo caso se potencia esta interacción (Biernat *et al.*, 1993; Biernat and Mandelkow, 1999; Drewes *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007).

Durante el desarrollo, periodo en el que se requiere una gran plasticidad del citoesqueleto, los patrones de expresión y de fosforilación de tau se encuentran altamente regulados. De esta manera, sólo se expresa una isoforma de tau con 3 repeticiones, que se encuentra a su vez fosforilada en múltiples residuos, lo que asegura una menor estabilización de los microtúbulos (Brion *et al.*, 1993; Kosik *et al.*, 1989). Este mismo patrón se ha descrito en las neuronas en proceso de diferenciación en el giro dentado del hipocampo adulto, región en la que existe neurogénesis adulta (Hong *et al.*, 2009).

A pesar de todas las evidencias que apuntan a un papel esencial de tau en la estabilización de los microtúbulos, los diversos modelos murinos deficientes en tau que se han generado, han resultado ser viables y no presentan anomalías importantes del citoesqueleto (Dawson *et al.*, 2001; Harada *et al.*, 1994; Tucker *et al.*, 2001). Probablemente, este fenotipo tan leve se deba a una redundancia funcional de tau y otras MAP (Takei *et al.*, 2000), ya que se ha descrito el aumento de otras MAP, como MAP1A y MAP2C, en estos modelos (Harada *et al.*, 1994; Rapoport *et al.*, 2002).

### **Transporte axonal**

Diversos trabajos sugieren que tau podría tener un implicación en el transporte a lo largo del axón de moléculas de señalización, factores tróficos e incluso orgánulos, como mitocondrias o vesículas (revisado en (Ballatore *et al.*, 2007; Vershinin *et al.*, 2007)). Debido a que la secuencia por la que se une tau a la tubulina solapa con la zona de interacción de la tubulina con la proteína motora quinesina, se ha sugerido que tau podría inhibir el transporte axonal anterógrado, por interferir en la unión de la quinesina a los microtúbulos (Dixit *et al.*, 2008; Ebner *et al.*, 1998; Stamer *et al.*, 2002). Por esta razón, se ha propuesto que los ciclos de unión/desunión de tau a los microtúbulos (regulados mediante su desfosforilación/fosforilación, respectivamente) son necesarios en la célula para permitir un correcto transporte axonal (Ballatore *et al.*, 2007). De hecho, se ha sugerido que, en determinados puntos a lo largo del axón, donde es necesario liberar las moléculas u orgánulos que están siendo transportados, como son los puntos de ramificación o las terminales sinápticas, se da un aumento local de tau

(Black *et al.*, 1996; Dawson *et al.*, 2010; Kempf *et al.*, 1996). En este sentido, un trabajo reciente ha mostrado que la deficiencia en tau provoca la aparición de protuberancias axonales, formadas por acúmulos de orgánulos, como mitocondrias, vesículas o vacuolas (Dawson *et al.*, 2010). A pesar de todas estas evidencias, en un estudio realizado en células ganglionares de retina en ratones in vivo, ni la sobreexpresión de tau ni su deficiencia afectaron a la tasa de transporte axonal (Yuan *et al.*, 2008).

### **Interacción con otras proteínas**

Tau es capaz de interactuar con numerosas proteínas, además de la tubulina. Algunas de esas proteínas que se unen a tau son la presenilina-1 (Takashima *et al.*, 1998), la espectrina (Carrier *et al.*, 1984), la  $\alpha$ -sinucleína (Benussi *et al.*, 2005; Jensen *et al.*, 1999), la calmodulina (Padilla *et al.*, 1990), la ferritina (Perez *et al.*, 1998), la fosfolipasa C- $\gamma$  (Hwang *et al.*, 1996; Jenkins and Johnson, 1998) o hGas7b (Akiyama *et al.*, 2009). Por otro lado, en estado fosforilado, tau es capaz de unirse a otras proteínas como la chaperona Pin1 (Lim *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2000), la proteína 14-3-3 (Hashiguchi *et al.*, 2000; Truong *et al.*, 2002), la proteína JIP1 (*c-Jun N-terminal kinase-interacting protein 1*) (Ittner *et al.*, 2009), o diversas proteínas fosfatasa como PP1, PP2A, PP2B y PP5 (Gong *et al.*, 1994a; Gong *et al.*, 1994b; Gong *et al.*, 2000; Gong *et al.*, 1994c; Liu *et al.*, 2005).

Además, se ha descrito la capacidad de tau para unirse a la actina, tanto a su forma monomérica, promoviendo su polimerización, como a los filamentos de actina ya formados, creando entrecruzamientos para formar haces de filamentos, lo que sugiere una posible función de tau como conexión entre la red microtubular y los filamentos de actina (Correas *et al.*, 1990; Farias *et al.*, 2002; Griffith and Pollard, 1982; He *et al.*, 2009; Henriquez *et al.*, 1995; Moraga *et al.*, 1993).

También se ha descrito que las secuencias PXXP, presentes en la región rica en prolina de tau, podrían estar involucradas en la interacción de tau con dominios SH3 de proteínas como la fosfolipasa C- $\gamma$ , la subunidad p85 $\alpha$  reguladora de la fosfatidilinositol-3 quinasa, o las tirosina-quinasa fyn o src (Jenkins and Johnson, 1998; Lee *et al.*, 1998), por lo que se ha sugerido la implicación de tau en las cascadas de transducción de señales en la célula. De hecho, en un trabajo reciente se ha propuesto que tau, al interactuar con fyn, determina la localización de ésta en las dendritas, donde es responsable de la fosforilación y estabilización de los receptores de NMDA postsinápticos (Ittner *et al.*, 2010).

## 5. Disfunción de tau

Tau es una proteína hidrofílica, altamente soluble. Sin embargo, en situaciones patológicas, tau aparece agregada dentro de las neuronas, constituyendo el principal componente de los filamentos pareados helicoidales (PHF) y de los filamentos rectos (SF) que forman los ovillos neurofibrilares (NFT) (Kosik *et al.*, 1986). Además, dentro de estos agregados, tau se encuentra en estado hiperfosforilado (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986b). Estas estructuras aberrantes son características de un grupo de enfermedades neurodegenerativas denominadas tauopatías, entre las que se encuentra la enfermedad de Alzheimer (EA).

### 5.1. Las tauopatías

Las tauopatías son enfermedades degenerativas del sistema nervioso, caracterizadas por la presencia de agregados intracelulares de la proteína tau hiperfosforilada en neuronas y células gliales. En estas enfermedades se puede observar fosforilación aberrante de tau, niveles anormales de tau, procesamiento alternativo anormal de su pre-mRNA (precursor nuclear del RNA mensajero) o mutaciones en el gen que lo codifica (Avila *et al.*, 2004). Dentro de las tauopatías se incluyen, entre otras, la demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17; *Frontotemporal Dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17*), la enfermedad de Pick, la parálisis supranuclear progresiva (PSP), la degeneración corticobasal (CBD; *Corticobasal Degeneration*), la demencia pugilística, el síndrome de Down y la enfermedad de Alzheimer (Hernandez and Avila, 2007).

Se han descrito numerosas mutaciones en el gen de tau, responsables del desarrollo de algunas de estas tauopatías, como la FTDP-17, la enfermedad de Pick (Murrell *et al.*, 1999; Rizzini *et al.*, 2000), la PSP (Delisle *et al.*, 1999) o la CBD (Bugiani *et al.*, 1999; Poorkaj *et al.*, 2002). La mejor estudiada en este sentido es la FTDP-17, demencia que cursa con atrofia frontotemporal, pérdida neuronal, gliosis y afectación espongiiforme de los lóbulos corticales (Avila *et al.*, 2004). Se caracteriza por la presencia de filamentos formados por la proteína tau hiperfosforilada en neuronas y, en ocasiones, en células de glía (Lee *et al.*, 2001). Análisis ultraestructurales de las inclusiones presentes en FTDP-17 han revelado la presencia tanto de filamentos rectos como de PHF, similares a los que se encuentran en la enfermedad de Alzheimer (Heutink, 2000).

Hasta el momento, se han descrito un total de 33 mutaciones en el gen de tau, responsables del desarrollo de FTDP-17 (<http://www.molgen.ua.ac.be/FTDMutations>) (Rademakers *et al.*, 2004). La mayoría de estas mutaciones se localizan en el dominio de unión a microtúbulos, disminuyendo la capacidad de unión de tau a los microtúbulos (Hasegawa *et al.*, 1998; Hong *et al.*, 1998) o su capacidad para interactuar con otras proteínas (Goedert and



Spillantini, 2000). Por otro lado, algunas de las mutaciones en esta región de la molécula pueden afectar al procesamiento alternativo del gen de tau, forzando la expresión del exón 10 (Hutton *et al.*, 1998; Spillantini *et al.*, 1998; Varani *et al.*, 1999), lo que provoca un aumento de la proporción de tau4R respecto a tau3R. De hecho, en la mayoría de los enfermos de FTDP-17, los agregados que se encuentran sólo contienen tau con cuatro repeticiones de unión a tubulina (Heutink, 2000). Se ha estudiado el efecto de varias de las mutaciones de tau asociadas a FTDP-17 en líneas celulares transfectadas con cDNA del tau mutado (Dayanandan *et al.*, 1999; Hasegawa *et al.*, 1998; Hong *et al.*, 1998; Matsumura *et al.*, 1999; Perez *et al.*, 2000). Se ha comprobado que algunas de las mutaciones que se localizan en la región de unión a microtúbulos provocan una pérdida de función de unión de tau a los microtúbulos, lo que resulta en la acumulación de tau no unido a microtúbulos, que facilitará su agregación (Hasegawa *et al.*, 1998; Hong *et al.*, 1998). Por otra parte, mediante ensayos *in vitro*, se ha observado una mayor tendencia a la agregación de muchas de las formas mutadas de tau respecto a tau silvestre (Arrasate *et al.*, 1999). También se ha descrito que las mutaciones asociadas a FTDP-17: G272V, P301L, V337M y R406W, provocan un cambio conformacional en tau (Jicha *et al.*, 1999), que hace de tau un mejor sustrato de las quinasas (Alonso Adel *et al.*, 2004).

## 5.2. La enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un proceso neurodegenerativo que afecta a personas de edad avanzada, y que constituye, en la actualidad, la causa más común de demencia en los países desarrollados. Estimaciones recientes indican que la prevalencia global de la enfermedad es de unos 35 millones de personas en el mundo y las predicciones apuntan a que ésta se duplicará cada 20 años (Dartigues, 2009).

La EA, que fue descrita por primera vez por Alois Alzheimer en 1906 (Alzheimer, 1907), cursa con pérdida progresiva de la memoria, afasia (pérdida del habla), apraxia (dificultad para realizar movimientos coordinados) y agnosia (pérdida de la facultad de reconocer a personas o cosas) (Cummings, 2004).

La EA se puede clasificar en dos tipos: una forma familiar y una forma esporádica. La EA familiar es de aparición temprana (antes de los 65 años de edad), de herencia autosómica dominante y comprende menos del 5% de los casos de EA. El 95% restante corresponde a EA esporádica, que es de aparición tardía, a partir de los 65 años (Tanzi *et al.*, 1996). Se han descrito mutaciones puntuales en tres genes distintos asociadas a la **EA familiar**. Estos genes son el de la proteína precursora del amiloide (*app*; *amyloid precursor protein*), situado en el cromosoma 21, el de la presenilina-1, en el cromosoma 14, y el de la presenilina-2, localizado en el cromosoma 1 (Rademakers *et al.*, 2003). Sin embargo, no se han encontrado genes

directamente ligados al desarrollo de la **EA esporádica**, pero sí factores de riesgo. Sin duda alguna, el principal factor de riesgo es el envejecimiento, puesto que la incidencia de EA aumenta de manera exponencial a partir de los 65 años (Jicha *et al.*, 1999; Kawas and Corrada, 2006; Kukull *et al.*, 2002). También se han descrito como factores de riesgo, el tabaquismo, la hipertensión, obesidad, aterosclerosis, hipercolesterolemia, lesiones cerebrales previas o diabetes mellitus tipo II (Carlsson, 2010; de Toledo Ferraz Alves *et al.*, 2010; Fotuhi *et al.*, 2009; Schmidt *et al.*, 2001). Pero además existe un gen que confiere susceptibilidad de padecer la enfermedad, el gen de la apolipoproteína E (*apoE*). Este gen presenta un polimorfismo alélico de manera que la presencia del alelo apoE4 supone un factor de riesgo frente a los alelos apoE2 y apoE3 (Coon *et al.*, 2007; Corder *et al.*, 1993; Raber *et al.*, 2004; Strittmatter *et al.*, 1993).

El análisis anatomopatológico de los cerebros de los pacientes de EA revela la presencia de dos tipos de estructuras aberrantes: las placas seniles extracelulares, compuestas mayoritariamente por el péptido  $\beta$ -amiloide, y los ovillos neurofibrilares intracelulares, constituidos por depósitos de la proteína tau en estado hiperfosforilado. La aparición de placas seniles está relacionada con la edad, es decir, con la senilidad, mientras que los ovillos neurofibrilares correlacionan con el grado de demencia (Arriagada *et al.*, 1992a; Arriagada *et al.*, 1992b).

### **Las placas seniles**

Las placas seniles son depósitos extracelulares, compuestos fundamentalmente por el péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), que se encuentran predominantemente en los cerebros con EA pero también en cerebros de edad avanzada (Dickson *et al.*, 1992; Morris *et al.*, 1996; Wolf *et al.*, 1999), sin que haya evidencias de un déficit cognitivo asociado a su presencia (Aizenstein *et al.*, 2008; Katzman *et al.*, 1988; Rowe *et al.*, 2007).

El péptido  $A\beta$  es un fragmento derivado del corte proteolítico secuencial de la proteína precursora del amiloide (APP) (Masters *et al.*, 1985). En el procesamiento proteolítico de la APP participan varias proteasas que se denominan  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -secretasas. El corte secuencial de las secretasas  $\alpha$  y  $\gamma$  genera un pequeño péptido de 3 kDa, no amiloidogénico (Haass *et al.*, 1993; Haass *et al.*, 1992). Los cortes consecutivos de las secretasas  $\beta$  y  $\gamma$  generan un péptido de 40 ó 42 aminoácidos ( $A\beta_{40}$  ó  $A\beta_{42}$ ), que es liberado al espacio extracelular (Selkoe, 2001). El  $A\beta_{42}$  es más hidrofóbico que el  $A\beta_{40}$ , y tiende a agregarse y plegarse en forma de  $\beta$ -lámina, reclutando a otras proteínas extracelulares, lo que podría dar lugar a la formación de placas seniles (Citron *et al.*, 1996; Neve *et al.*, 2000). Las mutaciones asociadas a EA familiar, tanto en el gen *app* como en las presenilinas (involucradas en la actividad de la  $\gamma$ -secretasa), conllevan un aumento del ratio  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$  (Selkoe, 2002).

## Los ovillos neurofibrilares

Los ovillos neurofibrilares (NFT; *Neurofibrillary Tangles*) son agregados filamentosos, compuestos mayoritariamente por la proteína tau hiperfosforilada (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986b). Aparecen en el interior de las neuronas, ocupando gran parte del citoplasma perinuclear y, después de la muerte neuronal, permanecen en el espacio extracelular, donde se les denomina ovillos neurofibrilares extracelulares u ovillos fantasma (Braak and Braak, 1991). Los NFT están compuestos en su mayoría por filamentos apareados helicoidales (PHF; *Paired Helical Filaments*) y, en menor proporción, por filamentos rectos (SF; *Straight Filaments*) (Hirano *et al.*, 1968). En la década de los 80, se describió la composición bioquímica de los PHF, compuestos mayoritariamente por la proteína tau (Goedert *et al.*, 1988; Grundke-Iqbal *et al.*, 1986a; Ihara *et al.*, 1986; Kosik *et al.*, 1986; Wischik *et al.*, 1988; Wood *et al.*, 1986). Estudios posteriores revelaron que, en los PHF, tau se encuentra en estado hiperfosforilado (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986b; Lee *et al.*, 1991; Wolozin *et al.*, 1986).

Como se ha comentado anteriormente, existe una correlación entre el número de NFT en los pacientes de EA y su grado de demencia (Arriagada *et al.*, 1992a; Arriagada *et al.*, 1992b). Además, en 1991, Braak y Braak demostraron que la progresión de la patología neurofibrilar en la EA sigue un patrón característico que, a su vez, correlaciona con el grado de demencia (Braak and Braak, 1991). La acumulación de NFT comienza en la corteza transentorrinal (estadios I y II), progresa hacia la corteza entorrinal, el hipocampo, la amígdala y la corteza temporal adyacente (estadios III y IV) y finaliza, extendiéndose por el resto de la corteza (estadios V y VI). Los estadios I y II son asintomáticos, los III y IV son propios de los pacientes con Deterioro Cognitivo Leve (MCI; *Mild Cognitive Impairment*) y, por último, los enfermos de EA, se encuentran en los estadios V y VI (Lovell and Markesbery, 2007).

Curiosamente, se ha visto que las neuronas que contienen agregados de tau en cerebros de enfermos de EA, muestran un aumento de los niveles de acetilación de la tubulina (Zhu *et al.*, 2007). En la presente tesis doctoral, estudiaremos si existe una asociación entre la acetilación de la tubulina y la proteína tau *in vivo*.

### 5.3. Papel de tau en la neurodegeneración

En condiciones patológicas, la proteína tau se hiperfosforila, perdiendo su afinidad por los microtúbulos, lo que conduce a su acumulación en el citoplasma. Las altas concentraciones de tau en el citoplasma aumentarán las probabilidades de que tau sufra cambios conformacionales que lo hagan más propenso a la agregación en forma de PHF (Bancher *et al.*, 1989; Kopke *et al.*, 1993). Los PHF finalmente se acumularán formando los NFT característicos de las tauopatías.

A día de hoy, se desconoce si el papel de tau en la neurodegeneración se debe a la pérdida de sus funciones fisiológicas, principalmente su acción estabilizadora de los microtúbulos en el axón, o a una ganancia de función tóxica de tau hiperfosforilado y/o agregado.

#### Hiperfosforilación de tau

La isoforma más larga de tau humana en el SNC, de 441 aminoácidos, contiene 85 residuos susceptibles de fosforilación (Hanger *et al.*, 2009; Morishima-Kawashima *et al.*, 1995). Hasta el momento, se han descrito, al menos, 40 residuos fosforilados en cerebros con EA, 28 serinas, 10 treoninas y 2 tirosinas (Hanger *et al.*, 2009). La fosforilación es el principal mecanismo de regulación de tau, generalmente, reduciendo su afinidad por los microtúbulos y su capacidad de promover el ensamblaje de los mismos (Lindwall and Cole, 1984; Lu and Wood, 1993). La mayoría de los residuos susceptibles de fosforilación se sitúan en la región rica en prolinas o en el extremo carboxilo terminal, sin embargo, la desestabilización de los microtúbulos se produce en mayor medida cuando se fosforilan los sitios localizados en el dominio de unión a microtúbulos (Cho and Johnson, 2003; Drewes *et al.*, 1995; Sengupta *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 1996).

En diversos estudios *in vitro*, se ha visto que la proteína tau hiperfosforilada no sólo pierde la capacidad de estimular el ensamblaje de los microtúbulos, sino que, además, secuestra al resto de MAP normales y provoca el desensamblaje de los microtúbulos (Alonso *et al.*, 1996; Alonso *et al.*, 1994; Alonso *et al.*, 1997). Además, esta inestabilidad del sistema de microtúbulos afectará al sistema de transporte a lo largo del axón, así como a la localización y organización de otros orgánulos subcelulares, como las mitocondrias y los lisosomas, provocando efectos patológicos (Avila *et al.*, 2004). Por otra parte, se ha descrito que la hiperfosforilación de tau dificulta su proteólisis mediada por calpaína (Litersky and Johnson, 1992), provocando una acumulación de tau en la célula.

Además de la fosforilación, tau puede sufrir otros tipos de modificaciones postraduccionales como son la glicosilación, ubiquitinación, deaminación o glicación entre otras

(Avila *et al.*, 2004). Un estudio reciente ha demostrado que tau también se puede acetilar, y que la acetilación de tau previene su ubiquitinación, ya que ambas modificaciones se dan en residuos de lisina. Por esta razón, los autores proponen que la acetilación de tau evita su degradación por el proteasoma, lo que resulta en la acumulación de tau fosforilado en la célula (Min *et al.*, 2010).

Todo parece indicar que la hiperfosforilación de tau precede a su agregación y, probablemente, la desencadena (Alonso *et al.*, 2001; Bancher *et al.*, 1989; Gordon-Krajcer *et al.*, 2000), aunque también se ha descrito lo contrario (Schneider *et al.*, 1999). Las regiones amino terminal y carboxilo terminal, que flanquean a las repeticiones de unión a microtúbulos, inhiben la autoagregación de tau, pero cuando son fosforiladas cesa ese efecto inhibitorio y, en contra, promueven la formación de agregados (Alonso *et al.*, 2001; Alonso Adel *et al.*, 2004).

### **Agregación de tau**

En 1986 se describió, por primera vez, que la proteína tau podía formar polímeros fibrilares similares a los PHF encontrados en cerebros de pacientes de EA (Montejo de Garcini *et al.*, 1986). Posteriormente, se ha descrito que la secuencia mínima de la molécula de tau implicada en su autoensamblaje corresponde al dominio de unión a microtúbulos, en concreto a la tercera repetición de unión a tubulina (Perez *et al.*, 1996).

Es posible que el efecto tóxico de los NFT se deba directamente al impedimento físico que suponen los grandes agregados intracelulares para el transporte axonal (Ballatore *et al.*, 2007). Diversos estudios han encontrado una correlación entre los niveles totales de NFT y el grado de demencia (Arriagada *et al.*, 1992a; Braak and Braak, 1991; Delacourte *et al.*, 1999; Gomez-Isla *et al.*, 1997), lo que apoya el efecto tóxico de los NFT. Sin embargo, se ha descrito que neuronas que contienen lesiones neurofibrilares pueden vivir un largo periodo de tiempo (Morsch *et al.*, 1999). Por otro lado, en un modelo de ratón, que expresaba tau humano con la mutación P301L de forma condicional, se vio que la represión del transgén mejoraba funciones como la memoria, a pesar de que se siguiese acumulando tau en forma de NFT (Santacruz *et al.*, 2005). Asimismo, se han encontrado casos de pacientes que manifiestan una FTDP-17 avanzada, con una gran neurodegeneración y altos niveles de proteína tau hiperfosforilada, pero con un bajo número de NFT (Bird *et al.*, 1999), lo que sugiere la posible toxicidad de tau, no en su estado final de agregación, sino en su forma hiperfosforilada.

## 5.4. Enzimas responsables de la fosforilación de tau

Existen dos tipos de quinasas que fosforilan a tau en residuos serina/treonina, las quinasas dirigidas por prolinas y las no dirigidas por prolinas. Entre las dirigidas por prolinas, se encuentran la tau proteína quinasa I o glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3), la tau proteína quinasa II o Cdk5, MAP quinasa (p38), otras quinasas dependientes de ciclina como Cdc2, la JNK y la SAPK (Buee *et al.*, 2000). En el grupo de las no dirigidas por prolinas están la proteína quinasa A (PKA), la proteína quinasa C (PKC), la calcio-calmodulina quinasa II (CaMKII), la MARK quinasa o la caseína quinasa II (CKII) (Baudier and Cole, 1987; Correas *et al.*, 1992; Drewes *et al.*, 1992; Goedert *et al.*, 1997; Hanger *et al.*, 1992; Imahori and Uchida, 1997; Scott *et al.*, 1993). Además de la modificación de residuos serina/treonina, se ha descrito la fosforilación de tirosinas por parte de las quinasas *fyn* (Lee *et al.*, 2004) y *c-abl* (Derkinderen *et al.*, 2005).

Entre las fosfatasas capaces de desfosforilar a tau, se encuentran la PP1 (proteína fosfatasa 1), la PP2A, la PP2B (calcineurina) y la PP2C (Goedert *et al.*, 1992; Szucs *et al.*, 1994; Yamamoto *et al.*, 1995). Se cree que la PP2A es responsable de la desfosforilación en la mayor parte de los sitios fosforilados de tau (Gotz *et al.*, 1995).

La hiperfosforilación de tau se produce como consecuencia del desequilibrio entre la acción de quinasas y fosfatasas, de manera que se favorezca el estado fosforilado. En este sentido, en la EA, se ha descrito tanto una disminución de la actividad fosfatasa, principalmente de la PP2A y PP1 (Gong *et al.*, 1995; Gong *et al.*, 1993), como un aumento de la actividad quinasa, concretamente de GSK3 y Cdk5 (Pei *et al.*, 1999; Pei *et al.*, 1998). Además, en FTDP-17, determinadas mutaciones de tau, principalmente en el dominio de unión a microtúbulos, provocan una menor interacción de tau con PP2A (Goedert *et al.*, 2000), favoreciendo su hiperfosforilación. Por otro lado, otras mutaciones asociadas a FTDP-17 hacen a tau un mejor sustrato para las quinasas (Alonso Adel *et al.*, 2004).

### 5.4.1. Fosforilación de tau por GSK3

De entre todas las quinasas que fosforilan a tau, GSK3 es la que tiene capacidad para fosforilarlo en más residuos, muchos de ellos presentes en los PHF (Hanger *et al.*, 2009; Morishima-Kawashima *et al.*, 1995). De hecho, también se le denomina tau proteína quinasa I (Ishiguro *et al.*, 1993).

En condiciones fisiológicas, GSK3 fosforila a tau, disminuyendo su afinidad por los microtúbulos, lo que es clave para el correcto funcionamiento de procesos celulares tales como la sinaptogénesis (Hanger *et al.*, 2009; Lovestone and Reynolds, 1997) o el transporte axonal (Tatebayashi *et al.*, 2004).

En cerebros de EA, se ha descrito la fosforilación de 17 residuos de serina y 6 de treonina por GSK3, la mayor parte de los cuales se localizan en la región rica en prolinas y en la región carboxilo terminal (Hanger *et al.*, 2009). Además, se ha comprobado que GSK3 es capaz de fosforilar a tau en muchos sitios hiperfosforilados en la EA, tanto en sistemas celulares (Lovestone *et al.*, 1994) como en animales transgénicos para GSK3 (Brownlee *et al.*, 1997; Lucas *et al.*, 2001; Spittaels *et al.*, 2000). Se han encontrado niveles de GSK3 más altos de los normales en los cerebros de enfermos y se ha observado que, en ellos, GSK3 se encuentra asociada a los ovillos neurofibrilares (Pei *et al.*, 1997; Yamaguchi *et al.*, 1996).

En presencia de niveles elevados de GSK3, tau se fosforila y se desprende de los microtúbulos, localizándose de forma difusa en el citoplasma y en muy poca proporción unido a los microtúbulos. Se ha comprobado que esta situación se revierte con litio, un inhibidor clásico de GSK3 (Lovestone *et al.*, 1999; Lovestone *et al.*, 1996; Munoz-Montano *et al.*, 1997; Xie *et al.*, 1998).

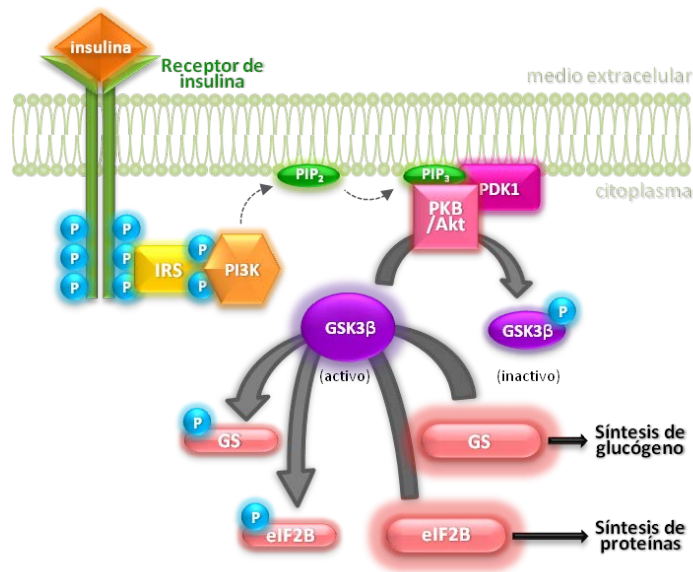
GSK3 es una serina/treonina quinasa, que debe su nombre a la capacidad de fosforilar e inhibir a la glucógeno sintasa (Cohen *et al.*, 1978; Rylatt *et al.*, 1980). GSK3 actúa sobre multitud de sustratos en la célula, constituyendo su sitio de reconocimiento la secuencia Ser/Thr-Pro. Existen dos isoformas de GSK3: GSK3 $\alpha$ , de 51 kDa, y GSK3 $\beta$ , de 48 kDa, codificadas por dos genes distintos (Mukai *et al.*, 2002). La isoforma GSK3 $\beta$  se expresa en todo el reino animal, mientras que GSK3 $\alpha$  se encuentra sólo en vertebrados (Plyte *et al.*, 1992). La secuencia de aminoácidos de los dominios catalíticos de ambas isoformas presenta un grado de homología del 98%, y es en los extremos N- y C-terminal donde más difieren sus secuencias (Woodgett, 1990).

La expresión de GSK3, a pesar de ser ubicua, es mayoritaria en cerebro (Takahashi *et al.*, 1994; Woodgett, 1990). En cerebro de rata, la isoforma GSK3 $\beta$  alcanza un nivel máximo de expresión entre el día embrionario E18 y el día post-natal P10, intervalo que coincide con el periodo de mayor extensión dendrítica y sinaptogénesis. A partir de entonces, los niveles disminuyen durante las cinco semanas siguientes, manteniéndose después en el adulto (Leroy and Brion, 1999; Takahashi *et al.*, 1994). En el caso de GSK3 $\alpha$ , los mayores niveles de expresión se dan durante las tres primeras semanas del periodo post-natal (Takahashi *et al.*, 1994). Estos picos de expresión de GSK3 parecen coincidir con el aumento de la fosforilación de tau en estadios tempranos del desarrollo (Takahashi *et al.*, 1994).

### Regulación de GSK3

GSK3 es una enzima constitutivamente activa, por lo que su regulación se basa principalmente en su inhibición (Jope and Johnson, 2004). Existen diversos mecanismos de regulación de GSK3, como la fosforilación o la formación de complejos proteicos.

La fosforilación en las serinas 21 y 9 de GSK3 $\alpha$  y GSK3 $\beta$ , respectivamente, reduce significativamente su actividad enzimática, ya que el extremo N-terminal se transforma en pseudosustrato ocupando el sitio activo de la enzima (Doble and Woodgett, 2003). Entre las quinasas capaces de fosforilar a GSK3 en Ser21/9, se encuentran diversas formas de la proteína quinasa C (PKC), la proteína quinasa A (PKA) y la proteína quinasa B (PKB), también conocida como Akt (Jope and Johnson, 2004). La vía de señalización mejor caracterizada, en la que GSK3 es regulada por fosforilación en Ser21/9, es la ruta mediada por el receptor de insulina. En esta vía, la insulina, a través de la interacción con su receptor, provoca una cascada de señalización en la que se activan, entre otras, las quinasas PI3K (fosfatidilinositol-3 quinasa) y PKB/Akt. Ésta última fosforila a GSK3 en la Ser21/9, inhibiendo su actividad, lo que promueve el estado desfosforilado y activo de sus sustratos, la glucógeno sintasa y el factor de iniciación eucariótico 2B (eIF2B) (Figura 3) (Jope and Johnson, 2004).



**Figura 3. Regulación de GSK3 $\beta$  por fosforilación de la Ser9 en la vía de señalización mediada por el receptor de insulina.** Cuando la insulina se une a su receptor, éste se activa y se autofosforila en varios residuos de tirosina de su dominio intracelular. Estos residuos fosforilados interaccionan con las proteínas IRS, que son a su vez fosforiladas por el receptor de insulina. Como resultado, los residuos fosforilados en las IRS se unen a los dominios SH2 de la PI3K, reclutándola a la membrana plasmática, donde cataliza la formación de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>) a partir de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>). PIP<sub>3</sub> se une a los dominios homólogos a plekstrina (PH) de PDK1 y PKB/Akt, de manera que ambas quinasas colocalizan en la membrana y PDK1 activa a PKB/Akt. Por último, PKB/Akt fosforila e inhibe a GSK3, lo que resulta en la desfosforilación y activación de la glucógeno sintasa (GS) y el factor de

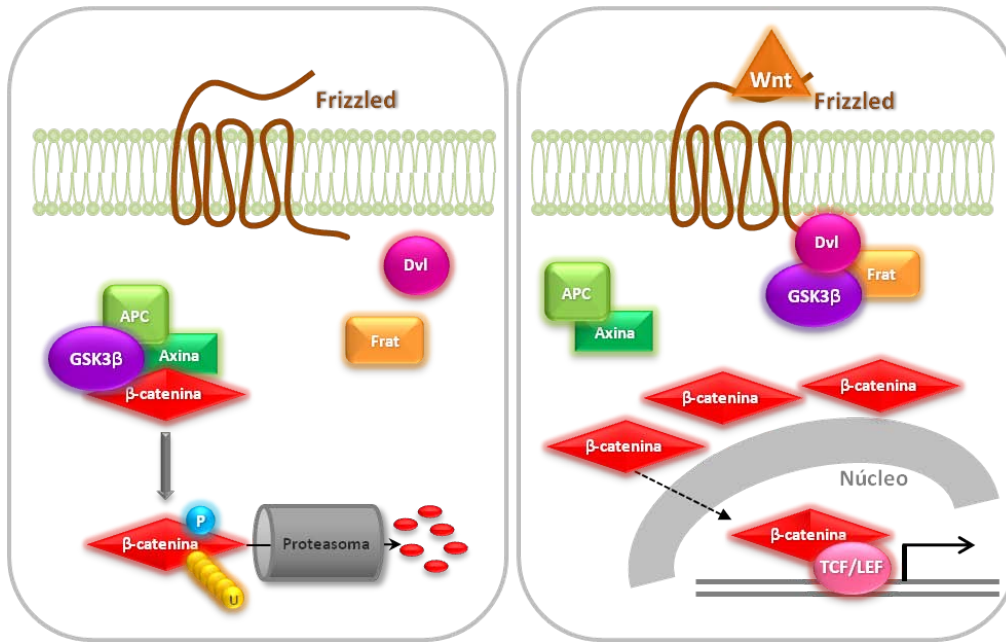


iniciación eucariótico 2B (eIF2B), implicados en la síntesis de glucógeno y proteínas. (IRS, proteínas sustrato del receptor de insulina; PI3K, fosfatidilinositol-3 quinasa; PDK1, proteína quinasa dependiente de fosfoinosítidos 1; PKB/Akt, proteína quinasa B; GSK3, glucógeno sintasa quinasa 3).

Otro mecanismo de regulación de la actividad de GSK3 es la fosforilación previa de los sustratos por otras quinasas. Esta pre-fosforilación se debe localizar a cuatro aminoácidos hacia el extremo C-terminal del sitio diana de GSK3, es decir, en un motivo (S/T)XXX(S/T)[P] (Fiol *et al.*, 1987). Algunas de las quinasas responsables de dicha pre-fosforilación son la caseína quinasa-I, que fosforila a la  $\beta$ -catenina (Rubinfeld *et al.*, 1996) o la caseína quinasa-II, que fosforila a la glucógeno sintasa (DePaoli-Roach, 1984). En el caso de tau, se ha propuesto la fosforilación previa por parte de Dyrk1A (*Dual-specificity Tyrosine-phosphorylation Regulated Kinase 1A*) y Cdk5 (Li *et al.*, 2006; Woods *et al.*, 2001).

En muchos casos, la actividad de GSK3 se regula a través de su interacción con otras proteínas. Una de las vías mejor caracterizadas, en la que GSK3 forma complejos proteicos, es la ruta de señalización de Wnt (Figura 4). En ausencia de Wnt, GSK3 forma un complejo con las proteínas Axina y APC (*adenomatus polyposis coli gene product*), que reclutan a la  $\beta$ -catenina, posibilitando la fosforilación de  $\beta$ -catenina por GSK3. La  $\beta$ -catenina es entonces ubiquitinada, para ser degradada por el proteasoma. Sin embargo, en presencia de Wnt, se activa una cascada de señalización, en la que las proteínas Dvl (*Dishevelled*) y Frat1 secuestran a GSK3, de manera que la  $\beta$ -catenina queda libre y no se fosforila, lo que permite su acumulación citoplasmática y posterior traslocación al núcleo, donde activará factores de transcripción de la familia TCF/LEF (Jope and Johnson, 2004; Zeng *et al.*, 1997). Los genes que responden a la formación del complejo  $\beta$ -catenina/TCF son, entre otros, genes que favorecen la diferenciación de precursores neuronales (neurogenina 1) (Hirabayashi *et al.*, 2004) y la supervivencia celular y proliferación (c-myc) (He *et al.*, 1998; Shtutman *et al.*, 1999). La ruta de Wnt es determinante en el desarrollo embrionario, aunque también está activa en adultos (McMahon and Bradley, 1990; Patapoutian and Reichardt, 2000).

Recientemente, se ha descrito que DISC1 (*Disrupted in Schizophrenia*), cuyo gen se encuentra alterado en la esquizofrenia (Blackwood *et al.*, 2001), interacciona con GSK3 $\beta$  inhibiendo su actividad, lo que lleva a una disminución de la fosforilación de  $\beta$ -catenina y, como consecuencia, su estabilización. En la esquizofrenia y otros desórdenes psiquiátricos, DISC1 pierde su función, de manera que aumenta la actividad de GSK3 $\beta$  y la degradación de la  $\beta$ -catenina, lo que provoca alteraciones en el desarrollo neuronal (Mao *et al.*, 2009).



**Figura 4. Regulación de GSK3β por formación de complejos proteicos en la vía de señalización de Wnt.** *Panel izquierdo.* En ausencia de Wnt, la β-catenina es fosforilada por GSK3β y degradada por el proteasoma. *Panel derecho.* La unión de Wnt al receptor Frizzled promueve la fosforilación de Dishevelled (Dvl) que, junto a Frat secuestra a GSK3β evitando que actúe sobre la β-catenina. La β-catenina sin fosforilar se trasloca al núcleo donde activa la transcripción de genes de la familia TCF/LEF.

### Implicación de GSK3 en la enfermedad de Alzheimer

Una desregulación de GSK3 se ha asociado a patologías como EA, diabetes tipo II, trastornos bipolares, hipertrofia muscular, esquizofrenia, cáncer o enfermedad de Huntington (Jope and Johnson, 2004). En la EA, se ha sugerido que GSK3 podría tener un papel central ya que, además de su acción sobre tau, parece estar implicada en muchos de los demás mecanismos neuropatológicos que acontecen durante la enfermedad (Hooper *et al.*, 2008).

Se ha descrito que el péptido Aβ puede bloquear la vía de señalización del receptor de insulina (Lee *et al.*, 2009; Townsend *et al.*, 2007) y de Wnt (Magdesian *et al.*, 2008), provocando un aumento de la actividad de GSK3. Además, en neuronas primarias de hipocampo, el tratamiento con Aβ provoca la activación de GSK3 (Takashima *et al.*, 1995). Por otra parte, la inhibición de GSK3 tanto por oligonucleótidos antisentido (Takashima *et al.*, 1993), como por litio (Alvarez *et al.*, 1999), reduce la neurotoxicidad inducida por Aβ.

GSK3 también se ha relacionado con la acción de las presenilinas, puesto que se une a la presenilina-1 que, a su vez, interacciona con tau. Se ha observado que mutaciones en *psen1* aumentan la fosforilación de tau por GSK3 (Takashima *et al.*, 1998). Además se ha descrito que las formas mutadas de *psen1* pueden dar lugar a una disminución de la actividad de Akt, lo que conlleva un aumento de la actividad GSK3 (Weihl *et al.*, 1999).

También se ha relacionado a GSK3 con APOE (Cselenyi *et al.*, 2008; Small and Duff, 2008; Tamai *et al.*, 2000; Townsend *et al.*, 2007). Se ha descrito que APOE4 provoca una mayor activación de GSK3 que otras isoformas de APOE (Cedazo-Minguez *et al.*, 2003). Por otro lado, APOE4 interacciona con LRP6, un correceptor de frizzled en la vía de Wnt, inhibiendo esta cascada de señalización (Caruso *et al.*, 2006).

## 6. Modelos animales para el estudio de la función y disfunción de tau

Con el fin de estudiar los mecanismos patológicos moleculares de la EA y otras tauopatías, se han generado numerosos modelos transgénicos para proteínas como APP, tau, presenilina-1 ó GSK3 $\beta$ , tanto en ratones como en invertebrados, fundamentalmente moscas (*Drosophila melanogaster*) y nematodos (*Caenorhabditis elegans*) (ampliamente revisados en (Duyckaerts *et al.*, 2008; Gotz and Ittner, 2008)).

En 1995 se creó el primer modelo de ratón transgénico de tau, que expresaba la isoforma más larga de la proteína tau humana (silvestre) en neuronas (Gotz *et al.*, 1995). Este modelo presentaba hiperfosforilación de tau que, en algunos casos, se acumulaba en los somas neuronales, pero sin llegar a formar filamentos. Posteriormente, se han generado otros modelos murinos con sobreexpresión de la isoforma más larga de tau humano, también bajo el promotor Thy1, que determina una expresión neuronal. En estos modelos se observó una patología axonal en cerebro y médula espinal (Probst *et al.*, 2000; Spittaels *et al.*, 1999).

Con el fin de crear modelos animales que reproduzcan los diversos eventos patológicos que tienen lugar en la EA, se han cruzado entre sí distintos modelos transgénicos. Se han generado, por ejemplo, ratones doble transgénicos para tau mutado (P301L) y APP mutado (Lewis *et al.*, 2001), APP mutado y tau con tres mutaciones (Perez *et al.*, 2005), tau humano y GSK3 $\beta$  (Spittaels *et al.*, 2000). Incluso se han creado ratones triple transgénicos, como el que expresa tres transgenes para APP, presenilina-1 y tau mutado (P301L) (Oddo *et al.*, 2003).

### 6.1. Modelos con mutaciones de tau asociadas a FTDP-17

Con el descubrimiento de mutaciones de tau asociadas a FTDP-17, se crearon diversos ratones que expresaban la proteína mutada en distintos sitios. El primero de ellos fue un modelo con la mutación P301L, en el que ya se observó agregación de tau y formación de NFT (Lewis *et al.*, 2000). Posteriormente, se han generado otros modelos con la mutación P301L (Gotz *et al.*, 2001; Sahara *et al.*, 2002) y con las mutaciones P301S (Allen *et al.*, 2002), V337M (Tanemura *et al.*, 2002) y R406W (Tatebayashi *et al.*, 2002), incluso con tres mutaciones a la vez (G272V, P301L, R406W) (Lim *et al.*, 2001). En todos ellos se encontraron filamentos de tau y disfunción neuronal. Asimismo, se han generado modelos que expresan tau silvestre o

mutado en células de glía como los oligodendrocitos (Higuchi *et al.*, 2005) o los astrocitos (Forman *et al.*, 2005). En ambos modelos se observó disfunción neuronal y degeneración axonal, lo que demuestra que una patología de tau en glía también afecta a las neuronas.

## 6.2. Modelos de ratón deficientes en tau

Para estudiar la posible pérdida de función de tau, se han generado varios modelos deficientes en tau, siguiendo distintas estrategias (Dawson *et al.*, 2001; Harada *et al.*, 1994; Tucker *et al.*, 2001).

El modelo de Harada y colaboradores, sólo mostró alteraciones a nivel de la estabilidad de determinados tipos de axones, los de pequeño calibre, en los que existía una mayor inestabilidad de los microtúbulos. Además, se observó un aumento de la proteína MAP1A que, los autores sugieren, podría estar compensando la deficiencia de tau en los axones de gran calibre (Harada *et al.*, 1994). Mediante diversos test de comportamiento y motores, se determinó que este modelo presentaba debilidad muscular e hiperactividad (Ikegami *et al.*, 2000). Sin embargo, la elongación axonal no se veía afectada en cultivos primarios de neuronas de estos ratones, y sólo se observaron defectos en este proceso cuando se cruzó el modelo con otro deficiente en MAP1B (Takei *et al.*, 2000).

En el modelo de Dawson y colaboradores, el exón 1 del gen de tau, que contiene las señales para el inicio de la traducción de la proteína, fue reemplazado por un casete de resistencia a neomicina. El ratón que se obtuvo presentaba un fenotipo normal, pero se observó un retraso en la extensión de los axones y las dendritas y en el desarrollo de la polaridad neuronal en cultivos primarios de neuronas del hipocampo. El fenotipo silvestre se consiguió rescatar expresando la proteína tau humana en los ratones (Dawson *et al.*, 2001). Este es el modelo de ratón Tau<sup>-/-</sup> que emplearemos en la presente tesis, con el fin de estudiar las posibles funciones de tau, en base a los efectos derivados de su pérdida de función.

Por último, en el modelo de Tucker y colaboradores se reemplazó el exón 1 del gen de tau por un gen que codificaba la proteína fluorescente GFP. La finalidad de este modelo no fue el estudio de la función de tau, sino que se empleó como herramienta para la observación del crecimiento axonal *in vivo* (Tucker *et al.*, 2001). Posteriormente, se ha descrito que la deficiencia de tau en este modelo no afecta a la tasa de transporte axonal en neuronas ganglionares de retina (Yuan *et al.*, 2008).

### 6.3. Modelos murinos de fosforilación de tau

Para el estudio de la posible función tóxica de la proteína tau fosforilada, se han generado modelos de ratón con sobreexpresión de GSK3 $\beta$  (Lucas *et al.*, 2001; Spittaels *et al.*, 2000). En el modelo de Spittaels y colaboradores, se sobreexpresó una forma constitutivamente activa de la GSK3 $\beta$  humana (GSK3 $\beta$ (S9A)), bajo el promotor Thy1. Este ratón mostró un aumento de la fosforilación de tau, aunque sólo a los 6-7 meses de edad, y no presentó deficiencias en la ejecución del test de Morris (Spittaels *et al.*, 2000).

En nuestro laboratorio se generó un modelo de ratón que sobreexpresaba GSK3 $\beta$ , de manera condicional (Lucas *et al.*, 2001). El abordaje condicional permitió evitar la mortalidad embrionaria postulada en otro ratón transgénico de GSK3 $\beta$  (Brownlees *et al.*, 1997). Este modelo presentó altos niveles de GSK3 $\beta$  en zonas afectadas en pacientes de EA, como son el hipocampo y la corteza, y también en el estriado. Se observó un aumento en la fosforilación de tau en epítomos fosforilados en la EA, principalmente en las neuronas granulares del giro dentado del hipocampo. A pesar de una mayor fosforilación de tau no se observó formación de filamentos, aunque sí se comprobó que los niveles de tau unida a los microtúbulos estaban disminuidos. Además, se determinó una disminución de los niveles de  $\beta$ -catenina nuclear en el hipocampo, debido al aumento de GSK3 $\beta$ . En el giro dentado se observó un aumento de muerte neuronal y de gliosis reactiva (Lucas *et al.*, 2001). Además, los ratones Tet/GSK3 $\beta$  mostraron un déficit de aprendizaje espacial cuando realizaron el test de Morris (Hernandez *et al.*, 2002).

Cuando se sometió a los ratones a tratamiento con doxiciclina, un análogo de la tetraciclina, se comprobó que el cese de la expresión del transgén restablecía una actividad GSK3 normal, niveles normales de tau fosforilado, disminución de la muerte neuronal y se suprimía el déficit cognitivo, determinado mediante el test de reconocimiento del objeto (Engel *et al.*, 2006a).

Con el fin de estudiar si las modificaciones de la proteína tau, por mutaciones puntuales o por hiperfosforilación, tienen por sí solas los máximos efectos patológicos o si ambas modificaciones pueden actuar sinérgicamente en la patología, se generó en nuestro laboratorio un ratón triple transgénico denominado Tet/GSK3 $\beta$ +Tau<sup>VLW</sup> (Engel *et al.*, 2006a). Este ratón se obtuvo a partir del cruce de ratones Tet/GSK3 $\beta$  con otra línea transgénica, Tau<sup>VLW</sup>, que sobreexpresa la isoforma más larga de la proteína tau humana con tres mutaciones asociadas a FTDP-17 (G272V, P301L, R406W) (Lim *et al.*, 2001). Los ratones Tet/GSK3 $\beta$ +Tau<sup>VLW</sup> mostraron hiperfosforilación de tau en las neuronas del hipocampo, así como formación de filamentos de tau de diámetro similar a los encontrados en tauopatías (Engel *et al.*, 2006b). Además, la atrofia del giro dentado del hipocampo observada en los ratones Tet/GSK3 $\beta$  (Lucas *et al.*, 2001) aparecía de forma temprana en los ratones Tet/GSK3 $\beta$ +Tau<sup>VLW</sup> (Engel *et al.*,

2006b). En conjunto, estos datos mostraron una contribución sinérgica de los dos tipos de modificaciones de tau en el proceso neurodegenerativo.

---

# Objetivos





En esta tesis nos hemos propuesto estudiar los efectos de la pérdida de función fisiológica de la proteína tau así como su ganancia de función tóxica, cuando se encuentra en estado hiperfosforilado, en dos modelos de ratón modificados genéticamente. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1.** Estudio de las funciones fisiológicas de tau en un modelo de ratón deficiente en la proteína
  - 1.1.** Estudio de la posible implicación de tau en el proceso de acetilación de la tubulina.
  - 1.2.** Análisis de la expresión génica en ausencia de tau. Se estudiarán en profundidad los genes cuya expresión se encuentre alterada y los procesos biológicos a los que pueda estar afectando la pérdida de función de tau.
  
- 2.** Estudio de la función tóxica de la proteína tau hiperfosforilada en un modelo de ratón con sobreexpresión de la enzima GSK3 $\beta$  en un fondo genético deficiente en tau.
  - 2.1.** Generación del modelo y caracterización a nivel bioquímico y comportamental
  - 2.2.** Análisis de la neurodegeneración en este modelo



---

# **Materiales y métodos**



## 1. Materiales

### 1.1. Reactivos

El ácido okadaico (inhibidor de fosfatasas) se obtuvo de LC Laboratories (Woburn, MA). El cóctel de inhibidores de proteasas COMPLETE™ (Roche) contiene 1mM fenilmetilsulfonil fluoruro, aprotinina 10µg/ml, leupeptina 10µg/ml y pepstatina 10µg/ml. El fluoruro de fenilmetilsulfato (PMSF), 2-mercaptoetanol, y reactivos como: Tris, HEPES, EDTA, EGTA, cloruro de magnesio y cloruro de sodio se obtuvieron de Sigma.

El dibutilil-monofosfato de adenosina cíclico (dibutilil AMP cíclico) (Sigma) fue disuelto en tampón fosfato salino 1X (PBS 1X), esterilizado por filtración utilizando filtros de 0,22 µm y conservado a -20°C hasta su uso.

### 1.2. Anticuerpos

Los anticuerpos primarios empleados en la inmunodetección (*western blot*), en la inmunohistoquímica y en la inmunofluorescencia se indican en la Tabla I.

En los ensayos de *western blot* se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios conjugados con HRP (*horseradish peroxidase*; peroxidasa de rábano): anticuerpo de cabra anti-ratón y cabra anti-conejo de Dako y anticuerpo de burro anti-cabra de Santa Cruz Biotechnology, todos ellos a una dilución 1/2000.

En los estudios inmunohistoquímicos se emplearon los anticuerpos secundarios cabra anti-conejo y caballo anti-ratón, conjugados con biotina, a una dilución 1/200 (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories).

En los ensayos de inmunofluorescencia los anticuerpos secundarios fueron Alexa 488 burro anti-ratón y Alexa 555 burro anti-conejo a una dilución 1/200 y 1/400 respectivamente (Invitrogen).

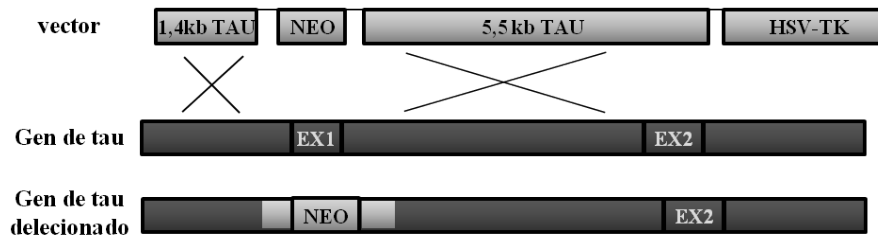
Anticuerpo primario	Proteína	Especie	Casa comercial	Dilución WB	Dilución IHQ/IF
Anti- $\beta$ -actina	$\beta$ -actina	Ratón	Sigma	1/2000	
Anti- $\alpha$ -tubulina	$\alpha$ -tubulina	Ratón	Sigma	1/5000	
Anti- $\beta$ -tubulina	$\beta$ -tubulina	Ratón	Sigma	1/5000	
Anti- $\beta$ III-tubulina	$\beta$ III-tubulina	Conejo	Covance		1/5000
Anti- $\beta$ -galactosidasa	$\beta$ -galactosidasa	Ratón	Promega	1/5000	
Anti- $\beta$ -galactosidasa	$\beta$ -galactosidasa	Conejo	ICN Biomed.-Cappel		1/5000
7.51	Tau (región de unión a microtúbulos)	Ratón	Cedido por C.M. Wischik	1/100	
PHF-1	Fosfo-Tau (S396-S404)	Ratón	Cedido por P. Davies	1/100	1/100
Anti-GSK3 $\alpha/\beta$	GSK3 $\alpha/\beta$	Ratón	Cell Signaling	1/1000	
Anti-GFAP	GFAP	Conejo	Promega		1/1000
Anti-Iba-1	Iba-1	Conejo	Wako Pure Chemicals		1/500
Anti- $\beta$ -catenina	$\beta$ -catenina	Ratón	BD Transduction Laboratories	1/1000	1/200
Anti-lamina B1	Lamina B1	Cabra	Santa Cruz	1/200	
Anti-BAF57	BAF57	Conejo	Sigma	1/1000	
Anti-caspasa3 escindida	Caspasa 3 escindida	Conejo	Cell Signaling		1/50
Anti-calbindina	Calbindina	Conejo	Chemicon	1/1000	
Anti-calmodulina	Calmodulina	Ratón	Millipore	1/1000	1/200
H-300	HDAC6	Conejo	Santa Cruz	1/100	1/10

**Tabla I. Anticuerpos primarios y diluciones a las que se han empleado en ensayos de western blot (WB), inmunohistoquímica (IHQ) e inmunofluorescencia (IF).**

### 1.3. Animales

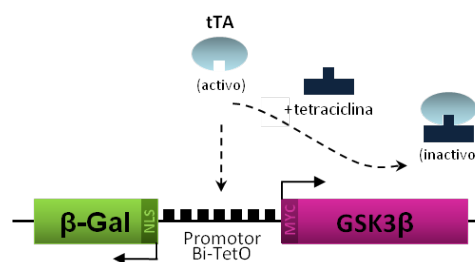
El empleo de animales de experimentación se llevó a cabo siguiendo las directrices establecidas por la Unión Europea (86/609/EEC) y aprobadas por la comisión de Bioética de la Universidad Autónoma de Madrid. Los ratones permanecieron estabulados en el Animalario del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”. Se mantuvieron de cuatro a cinco ratones por jaula, con comida y agua disponibles *ad libitum* y en un ambiente con temperatura controlada y en un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas.

Se emplearon ratones deficientes en la proteína tau ( $\text{Tau}^{-/-}$ ) (Figura 5) (Dawson *et al.*, 2001), que fueron cedidos amablemente por el Dr. M. P. Vitek (Duke University, Durham, USA). La línea se mantuvo en heterocigosis, cruzando ratones heterocigotos ( $\text{Tau}^{+/-}$ ) entre sí para obtener ratones silvestres ( $\text{Tau}^{+/+}$ ) y ratones deficientes en tau ( $\text{Tau}^{-/-}$ ) con similar fondo genético (fondo genético C57BL/6).



**Figura 5. Esquema de la construcción empleada para generar el ratón  $Tau^{-/-}$ .** Se introdujeron dos fragmentos del exón 1 del gen de tau murino en el vector pPNT, un fragmento de 1400 pb entre las dianas para EcoRI y KpnI, y otro fragmento de 5500 pb entre los sitios XhoI y NotI, entre los casetes NEO (neomicina) y HSV-TK. Las cruces indican las zonas de recombinación homóloga entre el gen de tau y el vector construido (Dawson *et al.*, 2001).

Para la generación del modelo triple transgénico se utilizaron, además, la línea de ratones BiTetO, que contiene en una única construcción las secuencias codificantes para la enzima GSK3 $\beta$ , con un epítipo myc, y para la proteína reportera  $\beta$ -galactosidasa, y que se mantiene en homocigosis, y la línea de ratones tTA, que expresa el transactivador tTA reprimible por tetraciclina, y se mantiene en heterocigosis, cruzando ratones heterocigotos con silvestres, por ser la homocigosis de este transgén letal. En los ratones que contienen ambos transgenes, el transactivador tTA se une al promotor BiTetO activando la transcripción de los transgenes GSK3 $\beta$ -myc y  $\beta$ -galactosidasa (Figura 6). La expresión del transactivador tTA está bajo el control del promotor de la calcio/calmodulina quinasa-II $\alpha$  (CaMKII $\alpha$ ), que la restringe al sistema nervioso central, con altos niveles de expresión en cerebro anterior (Mayford *et al.*, 1996). Ambos modelos murinos fueron generados previamente en nuestro laboratorio (Lucas *et al.*, 2001).



**Figura 6. Esquema del sistema de transactivación regulado por tetraciclina (sistema *Tet-Off*).** La administración de tetraciclina, o de su análogo doxiciclina, a los animales doble transgénicos provoca la inactivación del transactivador tTA, evitando su interacción con el promotor BiTetO, de manera que se silencia la expresión de los transgenes GSK3 $\beta$ -myc y  $\beta$ -galactosidasa.

## 2. Metodología

### 2.1. Técnicas bioquímicas

#### 2.1.1. Análisis de la expresión génica (Array genético)

El análisis transcripcional se realizó con el chip *GeneChip® MOE 430A 2.0 Array* de Affymetrix, que analiza más de 14000 genes murinos. Se analizó la expresión génica en el hipocampo de ratones silvestres y Tau<sup>-/-</sup> (n=3 ratones por genotipo). Tanto la extracción del RNA de los tejidos, como la hibridación, tinción y escaneo del chip fueron realizados por Progenika Biopharma (Derio, España). Asimismo, el análisis bioinformático de los resultados se realizó en Progenika Biopharma.

#### 2.1.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para determinar el genotipo de los ratones, se extrajo el DNA genómico de una pequeña porción de cola de los animales. La porción de cola fue digerida con 10mg/ml proteinasa K (Merck) en tampón de lisis (100mM NaCl, 100mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH 8, 1% SDS) a 55°C durante toda la noche. El DNA se precipitó con isopropanol y etanol frío mediante centrifugación, se dejó secar al aire y se resuspendió en agua destilada.

A continuación se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (Mullis and Faloona, 1987), en la que se utilizaron los oligonucleótidos indicados en la Tabla II.

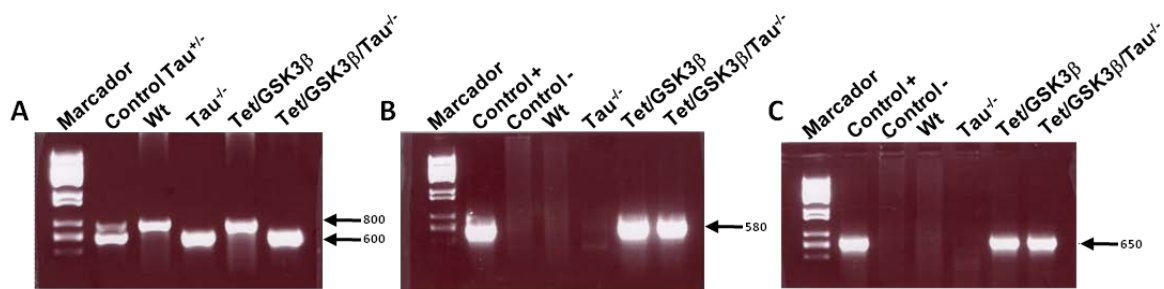
TRANSGÉN		OLIGONUCLEÓTIDOS GENOTIPADO	
		SENTIDO	ANTISENTIDO
TetO β-Gal/GSK-3β		CATGGTCAGGTCATGGATGAGC	TAATCAGCCACTGATCCACCCAG
CamKIIα-tTA		ACTAAGTCATCGCGATGGAGC	CGAAATCGTCTAGCGCGTCCG
Tau <sup>-/-</sup>	Banda WT	TTGAATCTCTCCCTGGACATGG	TTGTGTCAAACCTCTGGCGAG
	Banda NEO	TTGAATCTCTCCCTGGACATGG	CTTCTATCGCCTTCTTGACGAG
GEN		OLIGONUCLEÓTIDOS qRT-PCR	
		SENTIDO	ANTISENTIDO
Mapt		CACTTCTCCCATCTTTTCGCT	GGGACTTAATGGCAGCTGAG
Smarc1		GAGAAGATTGCGGCTGAGAT	GGCCATGCTGCTCTGACT
Calbindina		TCCTTTTCCTCAAGTGATTTGG	AACACATCTTTGTCTTATTCTTTTCA
Map11c3		TGGGAGTTCTGGTCAGGTTTC	CCTAATCCACTGGGGACTGA
Homólogo LSM12		ATGCCCTTCTCAGTCCTCTG	GGAAAGTCACAGGTGGAGGA
β-actina		GGCGCTTTTGACTCAGGATT	GGGATGTTTGCTCCAACCAA

**Tabla II. Secuencias de los oligonucleótidos empleados para amplificar los genes y transgenes indicados.** Todas las secuencias se indican en sentido 5'-3'. Los oligonucleótidos para la banda NEO reconocen el gen de resistencia a neomicina que se ha insertado en el gen de tau.



La PCR para genotipar los ratones  $Tau^{-/-}$  se llevó a cabo en un medio que contenía el tampón de la Taq DNA polimerasa (10X), la mezcla de desoxirribonucleótidos (dNTP) a una concentración 0,25mM, 1,5mM  $MgCl_2$ , los tres oligonucleótidos a una concentración 0,5 $\mu$ M cada uno, 2 $\mu$ l de DNA, 0,5% DMSO y 2U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen), en un volumen final de 20 $\mu$ l. El protocolo de amplificación consistió en 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, seguido de 30 segundos a 60°C y 1 minuto a 72°C. La amplificación dio lugar a un fragmento de 800 pb para el alelo tau silvestre y un fragmento de 600 pb para el alelo tau mutado (*knockout*) (Figura 7).

Para el genotipado de TetO y CaMKII $\alpha$ -tTA, la PCR se realizó en un medio que contenía el tampón de la Taq DNA polimerasa (5X), 0,25mM dNTP, 1,5mM  $MgCl_2$ , 0,5 $\mu$ M oligo sentido, 0,5 $\mu$ M oligo antisentido, 2 $\mu$ l de DNA y 1,25U de TaqDNApolimerasa (Promega), en un volumen final de 50 $\mu$ l. El protocolo de amplificación fue en este caso de 30 ciclos de 40 segundos a 94°C, seguido de 40 segundos a 53°C y 1 minuto a 72°C. Se obtuvo un fragmento de 650 pb en el caso del transgén BiTetO y un fragmento de 570 pb en el del tTA (Figura 7).



**Figura 7. Genotipado del DNA de los ratones Tet/GSK3 $\beta$ /Tau $^{-/-}$  y sus controles mediante PCR. (A)** Amplificación de la secuencia codificante de la proteína tau silvestre (800pb) así como la secuencia codificante del gen de resistencia a neomicina (600pb). **(B)** Amplificación de la secuencia codificante del transactivador CaMKII $\alpha$ -tTA. La banda obtenida fue de 580 pb. **(C)** Amplificación de la secuencia codificante de la enzima  $\beta$ -galactosidasa. Se obtuvo una banda de 650pb.

### 2.1.2. Purificación de RNA y PCR cuantitativa

La extracción del RNA de hipocampo de ratones  $Tau^{-/-}$  y sus controles silvestres de 3 meses de edad (n=9 ratones/genotipo) se realizó con el *Absolutely RNA Miniprep Kit* (Stratagene) según las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza del RNA se comprobaron con ayuda de un espectrofotómetro modelo Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies).

Se llevó a cabo la transcripción reversa del RNA (480ng) a cDNA mediante el *First Strand cDNA Synthesis kit for RT-PCR* (Roche) según el protocolo del fabricante. Además del RNA, la reacción incluía 20 unidades de transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis de

ave (AMV), 0,2µg/µl de *primers* hexanucleótidos y 0,08µg/µl de *primers* oligonucleótidos (dT). En paralelo, se preparó un control negativo para cada muestra de RNA, al que se añadieron todos los reactivos de la reacción a excepción de la transcriptasa inversa (RT-), control que posteriormente se emplearía para comprobar la posible contaminación por DNA genómico de la muestra.

El diseño de los oligonucleótidos específicos para cada secuencia que se pretendía validar se realizó con ayuda del programa Primer-BLAST disponible online (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Este programa permite introducir la secuencia que se desea detectar en la PCR y elabora distintos diseños de oligonucleótidos, realizando además un “blast” para comprobar que la secuencia que se amplificará no se encuentra en ningún otro gen. Las secuencias diana para el diseño de los oligonucleótidos se obtuvieron de la página web de Affymetrix ([www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)), a partir del número de sonda.

Se utilizó el reactivo *SYBR Green* para detectar los niveles de expresión de los siguientes genes murinos: *mapt*, *calb1*, *smarce1*, *map1lc3*,  $\beta$ -actina y el gen homólogo a LSM-12 de *Saccharomyces cerevisiae*. El *SYBR Green* es un agente intercalante que se introduce en la estructura secundaria de la doble hélice del DNA y, al hacerlo, incrementa fuertemente su fluorescencia. Al unirse al DNA de doble cadena, recién sintetizado en cada ciclo, este reactivo emite una fluorescencia proporcional a la concentración de DNA. La reacción de 10µl contenía 1µl de molde (cDNA), 5µl de la mezcla de PCR de *SYBR Green* (Applied Biosystems) y 150nM de cada par de oligonucleótidos, sentido y antisentido (ver Tabla II). Los niveles de expresión de los genes analizados se normalizaron respecto a los de la  $\beta$ -actina murina. Además, se llevó a cabo un control negativo de la reacción al que no se añadió molde (H<sub>2</sub>O en lugar de cDNA), y un control para comprobar la ausencia de DNA genómico en cada muestra (RT- en lugar de cDNA).

El protocolo de amplificación consistió en un paso de 10 minutos a 95°C (activación de la Taq polimerasa) seguido de 50 ciclos de 15 segundos a 95°C y de 1 minuto a 60°C (desnaturalización y anillamiento-extensión). Tras la amplificación, se obtuvo la curva de disociación aumentando progresivamente la temperatura de 60°C a 95°C. La fluorescencia emitida se adquirió en cada fase de anillamiento mediante el sistema de detección de modelo ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems).

Para comprobar la especificidad de la reacción, se analizaron las curvas de disociación correspondientes para cada par de oligonucleótidos. La medida del valor del ciclo umbral ( $C_T$ ; *cycle threshold*) de cada muestra para cada gen, realizada por triplicado, se normalizó con respecto al valor  $C_T$  del gen de la  $\beta$ -actina para esa muestra, obteniendo el valor  $\Delta C_T$ . El valor  $C_T$  es inversamente proporcional a la cantidad inicial de cDNA en la muestra. El aumento de

fluorescencia en cada ciclo es exponencial, por lo que, a la hora de representar los resultados obtenidos, el nivel de expresión (moléculas de cDNA iniciales) se calculó como  $2^{-\Delta CT}$  y se representó en forma de porcentajes, dando el valor 100% al nivel de expresión de cada gen en los ratones silvestres.

### 2.1.3. Preparación de extractos proteicos

Los extractos totales de proteínas procedentes de células en cultivo y de tejido cerebral se obtuvieron mediante la homogenización en un tampón que contenía 50mM HEPES pH [7,4], 10mM EDTA, 0,1% Tritón X-100, mezcla de inhibidores de proteasas COMPLETE™ (Roche), 1mM PMSF e inhibidores de fosfatasa (50mM fluoruro sódico y 1mM ortovanadato sódico). Posteriormente, se determinó la concentración proteica de las muestras mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

### 2.1.4. Western blot

Los extractos proteicos se hirvieron durante 5 minutos en tampón de carga de electroforesis, compuesto por 250mM Tris pH 6.8, 4% SDS, 10% glicerol, 2%  $\beta$ -mercaptoetanol y 0,0006% azul de bromofenol. Las proteínas fueron separadas en geles de poli(acrilamida/bisacrilamida) al 10-12% en presencia de SDS (15 $\mu$ g de proteína total por pocillo) en un sistema Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad). A continuación, las proteínas se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell) o, en el caso de proteínas de muy bajo peso molecular (por ejemplo la calmodulina, de 17kDa), membranas de polivinilideno fluoruro (PVDF; *Immobilon-P Transfer Membrane*; Millipore). La electrotransferencia se realizó a 150mA durante 1 hora. Para comprobar la eficiencia de la transferencia, las membranas se tiñeron con Rojo Ponceau.

A continuación, 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 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios así como las diluciones a las que se emplearon, se especifican en la Tabla I. Las membranas fueron lavadas durante cinco minutos dos veces consecutivas con PBS-0,1% Tween-20. Para la inmunodetección, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios diluidos en medio de bloqueo durante 1 hora. Posteriormente se lavaron (7 lavados x 5 minutos) con PBS-0,1% Tween-20. Las proteínas inmunoreactivas fueron visualizadas mediante un sistema de quimioluminiscencia (*enhanced chemiluminescence detection system, ECL*; Amersham).

La cuantificación de las proteínas se realizó con ayuda del densitómetro GS-710 (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 los anticuerpos anti- $\alpha$ -tubulina, anti- $\beta$ -tubulina o anti- $\beta$ -actina, para corregir cualquier desviación en las cantidades de proteínas cargadas.

### 2.1.5. Fraccionamiento subcelular

Los tejidos se homogeneizaron en un homogeneizador de vidrio con émbolo de teflón, en tampón M-SHE que contenía: 210mM manitol, 70mM sacarosa, 10mM HEPES pH 7,4, 1mM EDTA y 1mM EGTA, suplementado con inhibidores de proteasas (COMPLETE™, Roche), inhibidores de fosfatasas (1mM ortovanadato sódico, 30mM glicerofosfato, 5mM pirofosfato, 1 $\mu$ M ácido okadaico) y 1mM ditiotreitól. El homogenado se dejó 30 minutos en hielo y después se centrifugó 10 minutos a 1200g a 4°C. El precipitado resultante se homogeneizó y se centrifugó de nuevo. Los sobrenadantes obtenidos en ambas centrifugaciones se juntaron en lo que constituyó la fracción citoplasmática. La fracción membranosa (precipitado) se homogeneizó en tampón M-SHE y se centrifugó 10 minutos a 1000g a 4°C. Se descartó tanto el sobrenadante como la capa más superficial del precipitado. El resto del precipitado, en el que se encuentran los núcleos, se resuspendió en tampón TSE que contenía: 10mM Tris pH 7,5; 300mM sacarosa y 1mM EDTA, suplementado con detergente 0,1% Nonidet P-40 (NP-40; Igepal® CA-360, Sigma Aldrich) y se centrifugó 10 minutos a 8500g a 4°C. El precipitado resultante se resuspendió de nuevo en tampón TSE pero esta vez, suplementado con 1% NP-40 y se centrifugó 7 minutos a 1500g a 4°C. Este último paso se repitió para limpiar la fracción nuclear (en el fondo del tubo) de otras membranas (capa superficial del precipitado). Por último, se añadió a las dos fracciones obtenidas tampón de lisis (50mM Tris-HCl pH 6,8; 100mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 2% SDS, 0,1% azul de bromofenol, 10% glicerol) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Las muestras se hirvieron durante 10 minutos y se congelaron hasta su posterior análisis mediante *western blot*.

En el caso del fraccionamiento subcelular a partir de extractos celulares, las células se recogieron directamente en el tampón M-SHE con ayuda de un rascador y el protocolo se llevó a cabo en las mismas condiciones que para los tejidos.

### 2.1.6. Inmunoprecipitación

Para el aislamiento de los complejos tau/HDAC-6 de cerebro de ratón, se incubaron 100µl de extracto de cerebro de ratón con 5µg de anticuerpo primario (mezcla de varios anticuerpos anti-tau: 7.51, Tau-1, Tau-5) durante 1 hora a 4°C. A continuación, se añadieron 40µl de proteína G unida a sefarosa. Tras 1 hora de incubación, la mezcla se centrifugó a 13200rpm durante 10 minutos a 4°C. La proteína G es una proteína que une la fracción constante de las inmunoglobulinas G con gran afinidad. Por otra parte, la sefarosa confiere un carácter insoluble al complejo proteína G/sefarosa, lo que permite separarlos fácilmente por centrifugación. El precipitado obtenido se lavó tres veces con tampón de inmunoprecipitación y, por último, se resuspendió en tampón de carga 2X y se hirvió durante 5 minutos. Las muestras se analizaron mediante *western blot* con anticuerpos frente a tau y HDAC6 (ver tabla I).

La inmunoprecipitación de tau, para comprobar su interacción con la calmodulina, se llevó a cabo con el kit *Exactacruz™ E* (Santa Cruz Biotechnology). Se incubó el anticuerpo primario (5µg) con 50µl de matriz del kit durante 4-5 horas o toda la noche a 4°C en rotación. A continuación, se aislaron los complejos matriz-anticuerpo formados, mediante una centrifugación de 30 segundos a 13200rpm. Tras realizar dos lavados con PBS1X del precipitado, éste se incubó con 100µl (aproximadamente 500µg de proteína total) del extracto de hipocampo de ratón, manteniéndolo en rotación toda la noche a 4°C. En esta fase, el anticuerpo, unido a la matriz, reconoce la proteína correspondiente. Los complejos se precipitaron mediante centrifugación a 13200rpm durante 30 segundos, y se lavaron 4-5 veces con un tampón de lavado (20mM Tris-HCl pH 7,5; 100mM NaCl, 0,05% Tritón X-100). Por último, el precipitado obtenido se resuspendió en tampón de carga 2X y se hirvieron las muestras durante 5 minutos. Las muestras se analizaron mediante *western blot*, en el que se empleó como anticuerpo secundario, el *Exactacruz Western Blot Reagent* que incluye el kit, y que permite detectar el anticuerpo primario empleado en el *western blot*, pero no detecta el anticuerpo primario con el que se realizó la inmunoprecipitación.

## 2.2. Técnicas histológicas

### 2.2.1. Inmunohistoquímica

Los ratones fueron anestesiados intraperitonealmente con una solución de pentobarbital y perfundidos transcárdialmente con 30-50 ml de paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón fosfato 0,2M. Los cerebros se extrajeron, se postfijaron en 4% PFA durante una noche a 4°C y después se crioprotegieron en una solución de sacarosa al 30% en PBS durante 2 días. Los dos hemisferios cerebrales se incluyeron por separado en bloques de Tissue-Tek OCT (Sakura) y se congelaron. Se cortaron secciones sagitales de 30µm en un microtomo de congelación o criostato (Leica) y se recogieron en una solución crioprotectora compuesta por 30% etilenglicol, 26% glicerol en tampón fosfato pH 7,2.

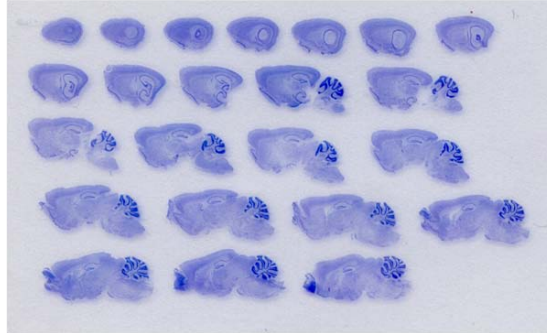
Las secciones se pretrataron durante 45 minutos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1% en PBS para inactivar la peroxidasa endógena. A continuación, se incubaron durante 1h en una solución de bloqueo compuesta por 1% BSA, 5% suero fetal bovino (FBS) y 0,2% Tritón X-100 en PBS. Posteriormente, las secciones se incubaron con el anticuerpo primario preparado en la solución de bloqueo a las diluciones indicadas en la Tabla I. A continuación, se incubaron las secciones con el anticuerpo secundario biotinilado caballo-anti-ratón o cabra-anti-conejo (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories) durante 1h. Por último, se incubaron con un complejo avidina-peroxidasa (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories) durante 1h. La reacción cromógena se llevó a cabo con diaminobenzidina y 0,003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 10 minutos (20 minutos en el caso del anticuerpo anti-caspasa-3). Las muestras se lavaron con agua destilada y se montaron con FluorSave Reagent (Calbiochem). Se tomaron fotografías de las muestras con un microscopio vertical Axioskop2 plus (Zeiss) acoplado a cámara CCD color.

### 2.2.2. Medida del volumen del giro dentado

Los animales se perfundieron con 4% PFA y los cerebros se procesaron como se ha descrito previamente en el apartado Inmunohistoquímica. Se llevó a cabo la tinción con tionina en cortes seriados del cerebro, es decir, cada seis secciones recogidas, se tomó una para su posterior tinción.

Cada serie de secciones se dispuso sobre un portaobjetos de 52 x 75 mm, previamente tratado con gelatina. Los diversos portaobjetos, con las secciones adheridas a su superficie, se incubaron con tionina (Panreac) al 1% en etanol al 90% con ácido acético al 5% hasta conseguir una tinción de intensidad persistente. La tionina tiñe específicamente los ácidos nucleicos. Se deshidrataron y trataron con solución Histo-clear II (National Diagnostics) para clarificar el fondo. Por último, se montaron con medio DePex (SERVA Electrophoresis GmbH) (Figura 8).

Se tomaron fotografías de los cortes en un microscopio vertical Axioskop2 plus (Zeiss) acoplado a cámara CCD color y se midió el área del giro dentado con ayuda del software Metamorph. El volumen del giro dentado se calculó integrando las áreas medidas con la distancia entre cada plano sagital de las secciones.



**Figura 8. Tinción con tionina de cortes sagitales seriados de un hemisferio de cerebro de ratón.** Se midió el área del giro dentado en cada una de las secciones en las que está presente.

## 2.3. Cultivos celulares

Todos los cultivos de la presente tesis se mantuvieron en un incubador a una temperatura de 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa. La manipulación de las líneas celulares y de los cultivos primarios se realizó en condiciones estériles en una campana de flujo laminar.

### 2.3.1. Cultivo de líneas celulares

La línea celular SH-SY5Y (neuroblastoma humano) se creció en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado con suero bovino fetal (FBS; Invitrogen Life Technologies-Gibco) al 10% (v/v), 2mM L-glutamina y mezcla de antibióticos (100U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina).

Para el mantenimiento de la línea, las células se disgregaron con tripsina/EDTA durante 5 minutos a 37°C para volver a plaquearlas a una densidad menor (antes de plaquearlas, se centrifugaron y se recontaron).

### 2.3.2. Diferenciación de las células SH-SY5Y

La diferenciación de la línea celular SH-SY5Y a células similares a neuronas se realizó según lo descrito previamente (García-Pérez *et al.*, 1998). Brevemente, las células SH-SY5Y proliferando se plaquearon y crecieron en medio Neurobasal (Invitrogen Life Technologies-

Gibco), suplementado con B27 al 2% (v/v) (Invitrogen-Gibco), 1mM glutamina y 2mM dibutiril-sódico AMP cíclico (dbAMPc) durante 6 días. A este tiempo, el 90% de las células presentan una morfología similar a neuronas con extensiones semejantes a neuritas. Las células control, sin diferenciar, se mantuvieron el mismo tiempo en este medio pero sin dbAMPc.

La fijación de las células se realizó con PFA al 4% en PBS, al que se añadió 4mM EGTA.

### 2.3.3. Cultivos primarios de neuronas

Las neuronas primarias de hipocampo y corteza se obtuvieron a partir de embriones de ratón, provenientes de hembras Tau<sup>+/-</sup> previamente cruzadas por machos Tau<sup>+/-</sup>. Los cultivos primarios se realizaron siguiendo el protocolo descrito previamente (Banker and Cowan, 1977). Para ello se sacrificó a las ratonas gestantes en el día 17 y los embriones (E17), fueron extraídos mediante cesárea. A continuación, se llevó a cabo la disección del hipocampo o corteza y la retirada de las meninges, en condiciones de esterilidad en disolución salina equilibrada de Hank (HBSS; *Hank's Balanced Salt Solution*; Invitrogen Life Technologies-Gibco) atemperada. Las células se disociaron con papaína siguiendo las instrucciones del fabricante (Worthington Biochemical Corporation) y se sembraron sobre cubres (Menzel-Glaser) cubiertos con 100µg/ml de polilisina (Sigma Aldrich) o sobre las propias placas de polipropileno (Falcon) cuando su finalidad fuesen extractos celulares. Las células se plaquearon en medio Neurobasal (Invitrogen Life Technologies-Gibco) suplementado con suero de caballo al 10% (v/v), 2mM glutamina, 2mM piruvato, 100U/mL de penicilina y 100mg/mL de estreptomina. A las 3 horas se cambió el medio por el de mantenimiento, compuesto por Neurobasal suplementado con B27 al 2% (v/v) (Gibco-BRL), 2mM glutamina, 2mM piruvato, 100U/ml de penicilina y 100mg/ml de estreptomina, en el caso de neuronas corticales. En los cultivos de neuronas de hipocampo el medio se suplementó además con N2 al 1% (v/v) (Invitrogen).

La fijación de las células para su posterior análisis por inmunofluorescencia se realizó incubando las células con 4% paraformaldehído (PFA) suplementado con 4% sacarosa en PBS durante 20 minutos en un incubador humedecido a 37°C y, a continuación, se retiró esta solución y se dejó en PBS.

### 2.3.4. Inmunofluorescencia de cultivos celulares

Las células fijadas se permeabilizaron durante 15 minutos con 0,1% Tritón X-100 en PBS, y se bloquearon con 1% albúmina de suero bovino (BSA) en PBS. Para eliminar la autofluorescencia, fueron incubadas durante 30 minutos con 1mM glicina antes del bloqueo. Los anticuerpos primarios se añadieron en 1% BSA en 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 en PBS. Después, se hicieron 2 lavados con PBS y un lavado de H<sub>2</sub>O, y se montaron con FluorSave Reagent (Calbiochem), para su observación al microscópico. En algunos casos se realizó una tinción nuclear con el reactivo To-Pro-3 (Invitrogen), fluoróforo que tiñe los ácidos nucleicos específicamente.

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.

La medida de la longitud axonal se realizó con ayuda del software ImageJ.

### 2.3.5. Determinación fluorimétrica del calcio intracelular con la sonda Fura-2

Se determinó el calcio citosólico libre en células SH-SY5Y diferenciadas y sin diferenciar (células control) mediante un seguimiento fluorimétrico continuo empleando Fura-2 como indicador fluorescente (Grynkiewicz *et al.*, 1985). Este compuesto se une al Ca<sup>2+</sup> específicamente y, al hacerlo, aumenta su emisión de fluorescencia a 510 nm al mismo tiempo que se desplaza su espectro de excitación, cambiando su máximo de excitación de 380 (sonda libre) a 340 nm (sonda unida a calcio).

Las células se sembraron sobre cubres y, tras 6 días de diferenciación (o incubación en medio NB/B27 en el caso de las células control), se lavaron con medio HCSS, que contenía: 25mM HEPES, 120mM NaCl, 0,7mM MgCl<sub>2</sub>, 5,4mM KCl y 30mM glucosa sin Ca<sup>2+</sup>. A continuación, se incubaron con la sonda Fura-2 acetometil éster (Fura-2 AM) a una concentración 5µM y 0,06% ácido plurónico F.127 (ambos reactivos de Molecular Probes) durante 20 minutos a 37°C. El Fura-2 AM es un compuesto esterificado capaz de atravesar la membrana plasmática. En el interior de las células, este compuesto se hidroliza, liberando Fura-2 que, al no ser liposuble, queda retenido en la célula. Posteriormente, las células se incubaron con medio HCSS 30mM glucosa con 1mM CaCl<sub>2</sub> durante 30 minutos a 37°C. El cubre se montó en una cámara termostatazada a 37°C en medio HCSS con 1mM CaCl<sub>2</sub>. Cuando se estabilizó la señal de fluorescencia basal (aproximadamente 1,5 minutos) se añadió KCl a una concentración 30mM. El KCl provoca la entrada de Ca<sup>2+</sup> en la célula, que se analizó durante los dos minutos siguientes, con un intervalo de 1 segundo. El experimento se realizó en un microscopio invertido de fluorescencia Zeiss Axiovert 35M equipado con una lámpara de xenón, un objetivo 40X y una cámara CCD (Hamamatsu). La sonda se excitó alternativamente a 340 y 380 nm, registrando la fluorescencia emitida a 510nm. El análisis de las imágenes se realizó empleando el programa informático Aquacosmos 2.6 (Hamamatsu), registrando el ratio F340/F380.

## 2.4. Pruebas de comportamiento

### 2.4.1. Test de reconocimiento del objeto

Se analizaron ratones machos de 4 semanas de edad (10-12 ratones de cada genotipo). Se siguió el protocolo del test de reconocimiento del objeto previamente descrito (Engel *et al.*, 2006; Ennaceur *et al.*, 1997). En resumen, los ratones se colocaron en una caja de plástico con muros verticales opacos (73 x 23 x 25 cm) para su habituación. Al día siguiente, se colocaron de nuevo en la misma caja durante 10 minutos. Dos horas después, cada ratón se dejó 4 minutos en la caja sin objetos. Inmediatamente después, se colocó el ratón durante 1 minuto en su jaula, y a continuación se le volvió a situar en la caja durante 5 minutos, esta vez en presencia de dos objetos idénticos (objetos A y B). Esta es la llamada fase de familiarización (ver Figura 9). Los dos objetos se colocaron equidistantes entre sí y con respecto a las paredes de la caja. Dos horas después de la familiarización, se realizó la prueba de reconocimiento: cada ratón se dejó en la caja durante 5 minutos con uno de los objetos antiguos (objeto A) y un objeto nuevo (objeto C). La posición del objeto C era la misma que la del objeto B en la fase de familiarización. Se consideró que los animales reconocían el objeto cuando su cabeza se aproximó a menos de 2 cm del objeto. Se midió el tiempo que el ratón empleaba en explorar cada objeto ( $t_A$  para el objeto A;  $t_C$  para el objeto C). El índice de memoria (MI) se calculó como el ratio entre el tiempo empleado en explorar el objeto nuevo sobre el tiempo empleado en explorar ambos objetos, es decir,  $MI = [t_C / (t_A + t_C)] \times 100$ .

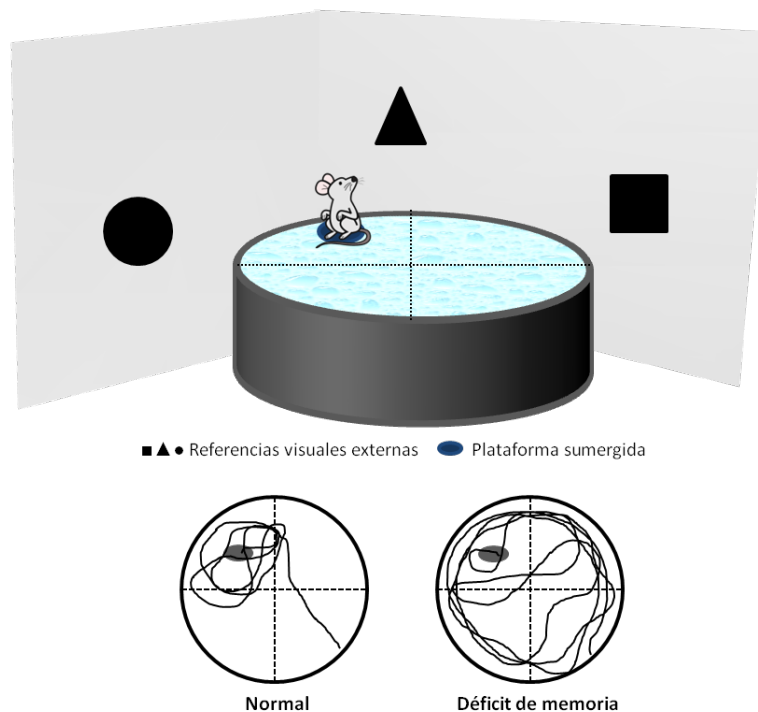


**Figura 9. Test de reconocimiento del objeto.** Disposición de los objetos en las cajas en la fase de familiarización (izquierda) y en la prueba de reconocimiento (derecha).

### 2.4.2. Test de Morris

El Test de Morris o *Morris Water Maze*, fue realizado en las instalaciones de Vivotecnia (Vivotecnia Research, Tres Cantos, Madrid) siguiendo protocolos previamente descritos (Morris, 1984). Brevemente, el test se realiza en una piscina circular (110 cm de diámetro) con una plataforma sumergida 1 cm por debajo de la superficie del agua. La temperatura del agua se mantuvo a  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$  y se le añadió leche desnatada para hacerla opaca y que la plataforma fuese invisible para el animal. Se colocaron referencias visuales (figuras geométricas negras, como por ejemplo triángulos, círculos o cuadrados) en las paredes y/o paneles alrededor de la piscina, a unos 10-15 cm de distancia y 5 cm de altura sobre la piscina.

Cada ratón realizó cuatro pruebas al día durante cuatro días consecutivos. La piscina se dividió virtualmente en cuatro cuadrantes, en el centro de uno de los cuales se situó la plataforma. Se determinaron cuatro posiciones iniciales, una en cada cuadrante, y cada día los ratones comenzaron cada una de las cuatro pruebas desde una posición inicial diferente aleatoria (ver Figura 10). Al principio de cada prueba, el ratón se dejó en el agua durante 100 segundos para que encontrase la plataforma. En el caso de que no la encontrase en ese tiempo, se situaba manualmente al ratón sobre la plataforma durante 5 segundos para que “memorizase” la posición de las referencias visuales respecto a la plataforma. A los 30 minutos se volvía a colocar al ratón en la piscina, desde una posición inicial distinta.



**Figura 10. Test de Morris.** En la parte superior se muestra la disposición de la piscina, la plataforma y las referencias visuales externas durante el test. En la parte inferior se indica un ejemplo del comportamiento de un ratón silvestre una vez que ha sido entrenado y, a la derecha, un ejemplo del comportamiento de un ratón con déficit de memoria.

## 2.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el programa SPSS 17.0. Los gráficos representan los valores medios  $\pm$  S.E.M. (*standard error of the mean*). En primer lugar, se aplicó la prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov. La mayor parte de los datos analizados se ajustaron a una distribución normal, por lo que se aplicaron el test de la *t* de Student, cuando se compararon dos grupos entre sí, o la ANOVA de una vía, seguida del test *post hoc* de Bonferroni, cuando la comparación fue entre más de dos grupos. En el caso de datos no normales, se aplicaron pruebas no paramétricas como la prueba *U* de Mann-Whitney. En todos los casos, el nivel de significancia mínimo aceptado fue  $p < 0,05$ .

---

# Resultados



## 1. Estudio de la función de tau

La principal función de tau en las neuronas es la estabilización de los microtúbulos. En las tauopatías, la hiperfosforilación de tau provoca su liberación de los microtúbulos y su acumulación en el citoplasma neuronal, que finalmente desencadena la formación de agregados. De esta manera, en las tauopatías, tau pierde su función fisiológica. El estudio de un modelo de ratón deficiente en tau nos permitirá profundizar en las funciones en las que puede participar tau.

### 1.1. Implicación de tau en el proceso de acetilación de la tubulina

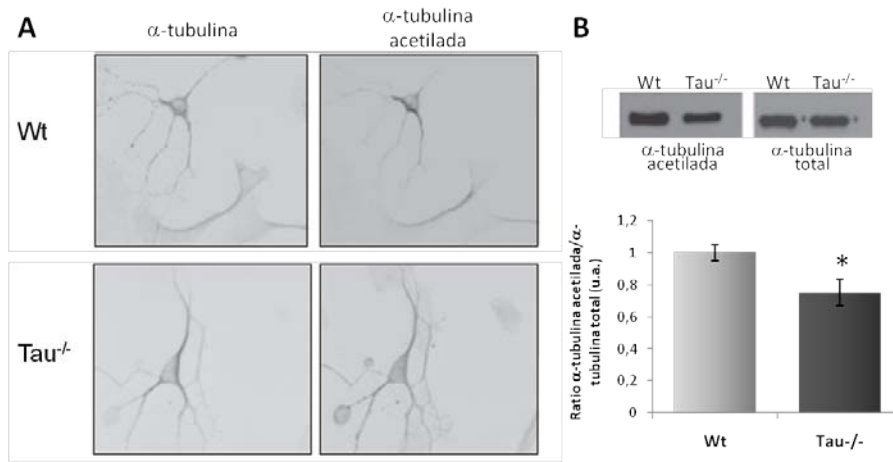
En las neuronas, los microtúbulos se estabilizan para dar lugar al axón y las dendritas, mediante su interacción con las MAP. Una vez estabilizados, los microtúbulos pueden sufrir diversas modificaciones post-traduccionales como son la tirosinación, la acetilación, la poliglutamilación, la poliglicilación, la palmitoilación o la fosforilación (ampliamente revisadas en (Fukushima *et al.*, 2009; Janke and Kneussel, 2010)).

En el estudio de cerebros de enfermos de EA, se ha encontrado un aumento de los niveles de  $\alpha$ -tubulina acetilada que, sorprendentemente, se daba principalmente en los microtúbulos de las neuronas que contenían patología neurofibrilar de tau (Zhu *et al.*, 2007). La  $\alpha$ -tubulina puede ser acetilada en la lisina 40 (LeDizet and Piperno, 1987), y esta modificación se ha encontrado en microtúbulos muy estables (Maruta *et al.*, 1986; Piperno *et al.*, 1987). Estas observaciones nos llevaron a estudiar la relación entre tau y el proceso de acetilación de la tubulina.

#### 1.1.1. En ausencia de tau disminuye la acetilación de la tubulina

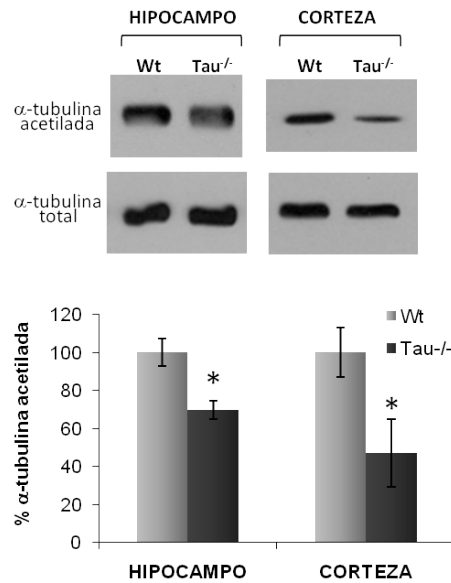
Para determinar la posible implicación de tau en el proceso de acetilación de la tubulina, analizamos los niveles de tubulina acetilada en presencia y en ausencia de tau.

En primer lugar, se realizó una inmunofluorescencia en la que se detectaron la  $\alpha$ -tubulina acetilada y la  $\alpha$ -tubulina total, en neuronas corticales silvestres (Figura 11A) y deficientes en tau (Figura 11B). Las neuronas que no expresaban tau presentaron una menor tinción con el anticuerpo que reconoce la  $\alpha$ -tubulina acetilada. El análisis mediante *western blot* de extractos de estos cultivos primarios mostró una disminución significativa de los niveles de  $\alpha$ -tubulina acetilada en las neuronas que no expresaban tau frente a las silvestres (Figura 11C).



**Figura 11. Disminución de la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina en neuronas primarias corticales deficientes en tau.** (A) Inmunofluorescencia de neuronas primarias de corteza de ratones silvestres y Tau<sup>-/-</sup> con anticuerpos anti- $\alpha$ -tubulina y anti- $\alpha$ -tubulina acetilada. (B) Análisis de los niveles de  $\alpha$ -tubulina acetilada en extractos de neuronas primarias corticales silvestres y deficientes en tau, mediante *western blot*, y cuantificación. Los valores obtenidos se normalizaron frente a los valores de  $\alpha$ -tubulina total. (\*p<0,05; *t*-Student)

Este resultado se confirmó en extractos de corteza e hipocampo de ratones silvestres y Tau<sup>-/-</sup> adultos (3 meses de edad) mediante *western blot*, donde los niveles de acetilación de la tubulina fueron menores en ambos tejidos (Figura 12).



**Figura 12. Disminución de la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina en los ratones Tau<sup>-/-</sup>.** Se determinaron los niveles de  $\alpha$ -tubulina acetilada en extractos de hipocampo y de corteza de ratones silvestres y Tau<sup>-/-</sup> de 3 meses de edad mediante *western blot*. Los valores obtenidos al densitometrar las bandas de  $\alpha$ -tubulina acetilada se normalizaron frente a los valores de  $\alpha$ -tubulina total de cada ratón (n=6 animales/genotipo). (\*p<0,05; *t*-Student)

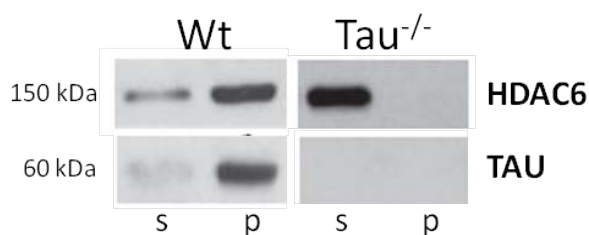


### 1.1.2. Tau interacciona con la histona desacetilasa-6

Una disminución en el grado de acetilación de la tubulina podrá ser consecuencia bien de una mayor actividad de las enzimas acetiltransferasas o bien de una menor actividad de las enzimas desacetilasas. A día de hoy no se conoce con exactitud la enzima acetiltransferasa encargada de acetilar a la  $\alpha$ -tubulina, aunque se ha propuesto la implicación del complejo ARD1/NAT1 (Ohkawa *et al.*, 2008) y de la subunidad catalítica E1p3 del complejo *Elongator* (Creppe *et al.*, 2009), ambos con actividad N-acetiltransferasa. Por otra parte, se han descrito dos enzimas responsables de la desacetilación de la  $\alpha$ -tubulina acetilada, la histona desacetilasa 6 (HDAC6) (Hubbert *et al.*, 2002; Matsuyama *et al.*, 2002) y la sirtuína tipo 2 (SIRT2) (North *et al.*, 2003). Decidimos centrar nuestro estudio en la HDAC6, puesto que es la enzima mejor caracterizada de las anteriormente mencionadas.

La enzima HDAC6 se localiza mayoritariamente en el citoplasma celular (Verdel *et al.*, 2000) y se ha comprobado que es capaz de desacetilar la tubulina polimerizada en los microtúbulos *in vitro* (Hubbert *et al.*, 2002; Matsuyama *et al.*, 2002). En un trabajo publicado durante la elaboración del presente estudio, se demostró la interacción de la proteína tau con la HDAC6 en células humanas (Ding *et al.*, 2008). En el trabajo de Ding y colaboradores, se describió la interacción del dominio SE14 de la HDAC6 humana con la región de unión a tubulina presente en tau. El dominio SE14 está constituido por ocho repeticiones de un tetradecapéptido que contiene el motivo Ser/Glu, y se sitúa a continuación de los dos dominios con actividad desacetilasa presentes en la HDAC6 (Bertos *et al.*, 2004). En la HDAC6 murina no existe el dominio SE14, aunque se expresa una secuencia parcialmente homóloga (Yang and Seto, 2008).

Con el fin de comprobar la interacción de tau con la HDAC6 en ratón, se llevó a cabo la inmunoprecipitación de tau en extractos de cerebro de ratones silvestres y Tau<sup>-/-</sup>. En los cerebros de ratones silvestres, la mayor parte de la enzima HDAC6 se detectó en el precipitado, así como la proteína tau (Figura 13). Sin embargo, la totalidad de la HDAC6 de los cerebros de ratones Tau<sup>-/-</sup> se localizó en el sobrenadante de la inmunoprecipitación (Figura 13). Este resultado demuestra la interacción de la proteína tau con la HDAC6 en el cerebro del ratón, indicándonos que la secuencia parcial del dominio SE14 presente en el ratón es suficiente para la unión con tau. Por otra parte, basándonos en los resultados anteriores en los que se observaba una menor acetilación de la tubulina en ausencia de tau, sugerimos que tau podría estar actuando como inhibidor de la actividad desacetilasa de la HDAC6.



**Figura 13. Co-inmunoprecipitación de HDAC6 con tau.** Inmunoprecipitación con anticuerpos frente a la proteína tau en extractos de cerebro de ratones silvestre (Wt) y Tau<sup>-/-</sup>. El sobrenadante (s) y precipitado (p) obtenidos se analizaron mediante *western blot* con anticuerpos que reconocían tau y HDAC6. Se comprobó la presencia de tau en el precipitado del ratón silvestre pero no en el del Tau<sup>-/-</sup>.

## 1.2. Estudio de la expresión génica en el ratón Tau<sup>-/-</sup>

Los *arrays* genéticos analizan la expresión de miles de genes, aportando información sobre alteraciones en la expresión. La comparación de los niveles de expresión génica en los ratones deficientes en tau (Tau<sup>-/-</sup>) respecto a ratones con genotipo silvestre nos permitirá analizar las respuestas neuronales ante la deficiencia de tau *in vivo*, pudiendo determinar procesos compensatorios a esta deficiencia.

### 1.2.1. Array genético del modelo de ratón Tau<sup>-/-</sup>

Se llevó a cabo un análisis transcripcional del hipocampo de ratones silvestres y ratones Tau<sup>-/-</sup> de 3 meses de edad. Para ello se empleó un chip genético (*GeneChip® MOE 430A 2.0 Array* de Affymetrix), en el que se analizó la expresión de más de 14000 genes murinos, mediante la detección de más de 22600 secuencias. Esto implica que muchos genes se detectaron mediante varias sondas, que reconocen distintas secuencias dentro del gen, lo que confiere una mayor especificidad al *array*.

Los resultados obtenidos mostraron cambios significativos en los niveles de expresión de 265 secuencias, de las cuales 142 se encontraban sobrepresadas y 123 reprimidas en el hipocampo de los ratones Tau<sup>-/-</sup> con respecto a los ratones silvestres (Anexo I). De entre todos estos genes se eligieron cinco para su posterior validación y estudio más exhaustivo, en base a su tasa de cambio (*mapt*, *lsm12*) o a su función biológica (*smarce1*, *calb1*, *map11c3*). Estos genes, junto con la tasa de variación que presentaron en el *array*, se encuentran resumidos en la Tabla III.

Como control positivo del *array*, se tomó la represión observada para el gen de tau, cuya expresión fue 5 veces menor en los ratones Tau<sup>-/-</sup> respecto a los silvestres.

Sonda	Gen	Símbolo gen	P-valor	Tasa de cambio
Reprimidos				
1424719	Tau	mapt	0,0000038	-5,42043
1448738	Calbindina 28k	calb1	0,00196123	-1,26513
Sobrexpresados				
1427998	Homólogo de LSM12	lsm12	0,00126384	2,34947
1422676	SW1/SNF relat., matrix cell, actin	smarce1	0,0170026	1,16013
1451290	Cadena ligera 3 $\alpha$ de MAP1	map1lc3a	0,763173	1,14813

**Tabla III.** Genes seleccionados para su posterior estudio a partir de los resultados del *array* genético realizado en hipocampo de ratones Tau<sup>-/-</sup> respecto a sus controles (silvestres). La tasa de cambio muestra el número de veces que cada gen se encuentra sobreexpresado (positivo) o reprimido (negativo) en el ratón Tau<sup>-/-</sup> respecto al silvestre. El P-valor indica la significancia estadística del cambio de expresión.

### 1.2.2. Validación de los cambios de expresión génica en el ratón Tau<sup>-/-</sup>

Se seleccionaron como posibles candidatos para su estudio, *calb1*, entre los genes reprimidos, y *lsm12* (gen homólogo de LSM12 de *S.cerevisiae*), *smarce1* y *map1lc3* entre los genes sobreexpresados en el ratón Tau<sup>-/-</sup> (Tabla III).

El gen *calb1* codifica la proteína calbindina, proteína que se une a calcio y así regula la homeostasis intracelular del mismo (Hartmann and Konnerth, 2005; Zheng *et al.*, 2004).

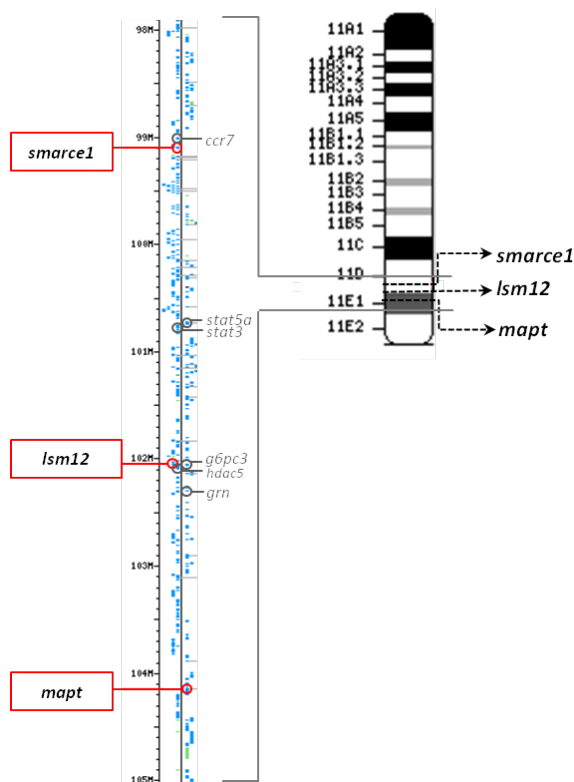
El gen *lsm12*, codifica una proteína de la familia tipo-Sm (Lsm; *Like Sm*), proteínas que se unen al RNA y parecen estar involucradas en el proceso de traducción, aunque se desconoce su posible función en las neuronas (Albrecht and Lengauer, 2004; Fleischer *et al.*, 2006).

El gen *smarce1* (*SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily e, member 1*) codifica la proteína BAF57 (*BRG1-associated factor 57*). Esta proteína forma parte del complejo remodelador de cromatina SWI/SNF (*SWItch/Sucrose NonFermentable*) dependiente de ATP (Wang *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1998), implicado en los procesos de activación y represión de la transcripción génica (Sudarsanam *et al.*, 2000; Varga-Weisz, 2001).

El gen *map1lc3a* codifica la proteína del mismo nombre (MAP1LC3 $\alpha$ ; *Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha*), proteína citoesquelética que se asocia a MAP1A y

MAP1B (Mann and Hammarback, 1994). Cabe señalar que, en estudios previos, se había sugerido un aumento de los niveles de MAP1A en los ratones  $\text{Tau}^{-/-}$  (Dawson *et al.*, 2001).

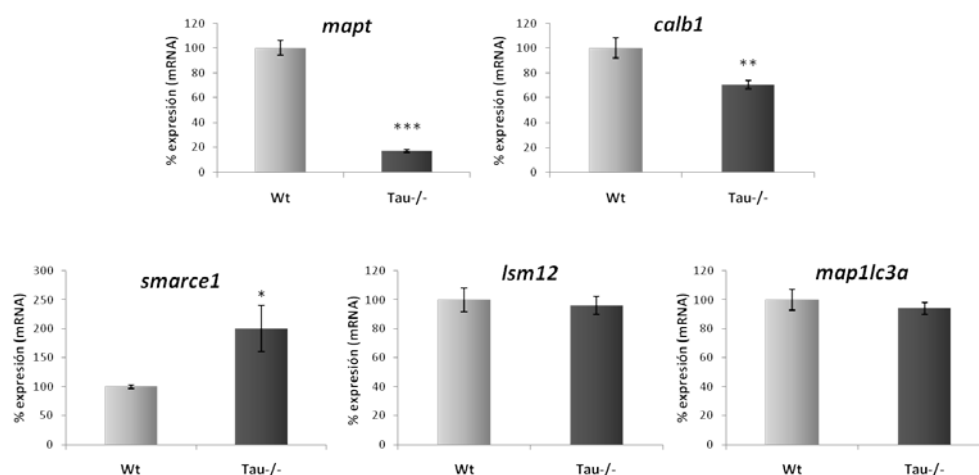
Curiosamente, los genes *smarce1* y *lsm12* se encuentran localizados en el cromosoma 11 del ratón (cromosoma 17 humano), al igual que el gen de tau. Cabría pensar que la alteración en la expresión de estos genes se podría deber a su proximidad con el gen *mapt*, que en el ratón  $\text{Tau}^{-/-}$  ha sido eliminado. Sin embargo, estos genes no son contiguos al gen de tau, sino que se encuentran separados varios millones de pares de bases (Figura 14). Para confirmar que la variación en la expresión de estos genes no se debía a la localización en el mismo cromosoma que el gen de tau, se seleccionaron otros 6 genes (*ccr7*, *stat5a*, *stat3*, *g6pc3*, *hdac5*, *grn*), situados en posiciones intermedias entre los genes *mapt*, *smarce1* y *lsm12* (Figura 14), y se constató en los resultados del *array* que su expresión no variaba en el ratón  $\text{Tau}^{-/-}$  (Anexo I).



**Figura 14. Localización de los genes *mapt*, *smarce1* y *lsm12* en el cromosoma 11 de ratón.** A la derecha se muestra un esquema del cromosoma 11 y la posición en la que se encuentran los tres genes. A la izquierda, se detalla la región del cromosoma donde se localizan los tres genes, y su posición exacta (círculos rojos). La distancia comprendida entre el gen *mapt* y los genes *smarce1* y *lsm12*, es de  $5 \times 10^6$  pb y  $2 \times 10^6$  pb, respectivamente. Con círculos grises se han indicado varios genes localizados en la misma región del cromosoma 11 cuya expresión no varía en el ratón  $\text{Tau}^{-/-}$  según el *array* genético realizado.

Se llevó a cabo la validación del cambio de expresión de los genes seleccionados (Tabla III) mediante PCR cuantitativa a tiempo real (Figura 15). Se comprobó de nuevo que la expresión del gen de tau en los ratones  $\text{Tau}^{-/-}$  disminuía significativamente, hasta en un 80% de la detectada en los ratones silvestres. También se observó una disminución significativa, del 30%, en la expresión del gen de la calbindina en el hipocampo de los ratones  $\text{Tau}^{-/-}$ . En cuanto a los genes sobrexpresados, el único para el que se validó el cambio observado previamente en el

array fue el gen *smarce1*, para el que se detectó el doble de expresión en los ratones  $Tau^{-/-}$  en comparación con los silvestres. Los cambios para el gen homólogo de LSM12 y para el gen de la cadena ligera de MAP1 no fueron significativos.



**Figura 15. Análisis de la expresión de los genes candidatos mediante PCR cuantitativa.** Se extrajo el RNA del hipocampo de ratones silvestres y  $Tau^{-/-}$  y, tras su transcripción reversa a cDNA, se analizaron los niveles de expresión de los genes *mapt*, *calb1*, *smarce1*, *lsm-12* y *map1lc3* mediante PCR cuantitativa (n= 9 ratones/genotipo). Los valores obtenidos se normalizaron respecto a los niveles de expresión del gen de la  $\beta$ -actina en cada ratón. (\*\*p<0,0005; \*\*p<0,01; \*p<0,05; t Student)

### 1.2.3. Estudio del gen *smarce1*

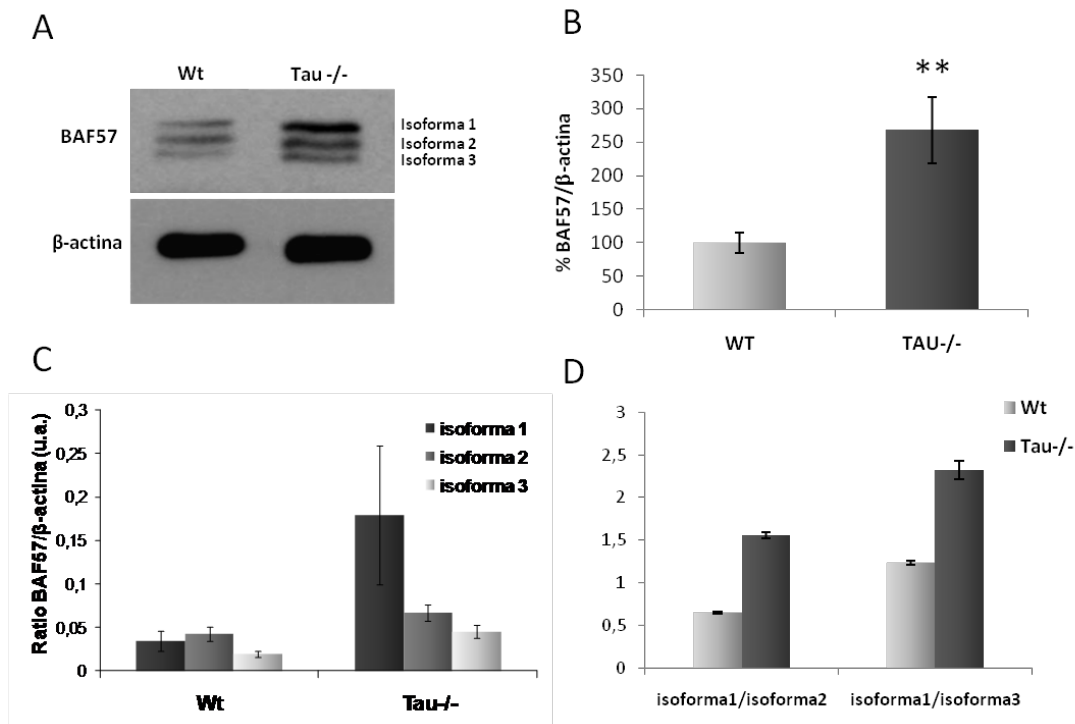
El gen *smarce1* codifica la proteína BAF57. El estudio de BAF57 puede ser interesante, puesto que es una proteína implicada en la regulación de la expresión génica, ya que forma parte de los complejos remodeladores de cromatina SWI/SNF (Wang *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1998).

#### 1.2.3.1. Validación del aumento de *smarce1* a nivel de proteína

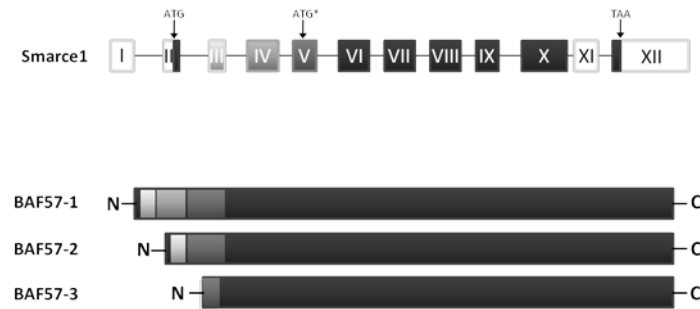
Las variaciones en la tasa de transcripción de un gen no siempre se traducen en variaciones en el nivel de la proteína que éste codifica, ya que existen diversos mecanismos que regulan tanto la traducción del mRNA a proteína (factores activadores de la traducción, degradación del mRNA mediado por miRNA) como la degradación de la propia proteína.

Se analizaron los niveles de BAF57 en extractos de hipocampo de ratones silvestres y  $Tau^{-/-}$ , para comprobar que la variación observada en la tasa de transcripción del gen *smarce1* se correspondía con un cambio en la expresión de la proteína. Se validó el aumento de su

expresión, que fue 2,5 veces mayor en el hipocampo de los ratones  $Tau^{-/-}$  que en el de los ratones silvestres (Figura 16A,B). El anticuerpo anti-BAF57 detectó tres bandas (Figura 16A), que corresponden a tres isoformas de la proteína, producidas por un procesamiento alternativo del transcrito primario (Kazantseva *et al.*, 2009). Observamos que, en el hipocampo de los ratones  $Tau^{-/-}$ , los niveles de las tres isoformas de BAF57 son mayores que en los ratones silvestres (Figura 16C). Sin embargo, las dos isoformas de menor tamaño sólo muestran un ligero aumento, mientras que la isoforma más larga de la proteína (la banda que menos migra), se encuentra aumentada en mayor medida. Esto nos indica que, además de la variación en los niveles de las distintas isoformas de la proteína, existe una diferencia fundamental entre ambos ratones, en cuanto a la proporción de la isoforma más larga respecto a las otras dos isoformas (Figura 16D). A este respecto, es importante señalar que la expresión de la isoforma más larga de BAF57 (BAF57-1) es ubicua, mientras que las otras dos isoformas (BAF57-2, BAF57-3), producidas a partir del procesamiento alternativo de la región amino terminal de la molécula, se expresan específicamente en neuronas (Kazantseva *et al.*, 2009) (Figura 17).

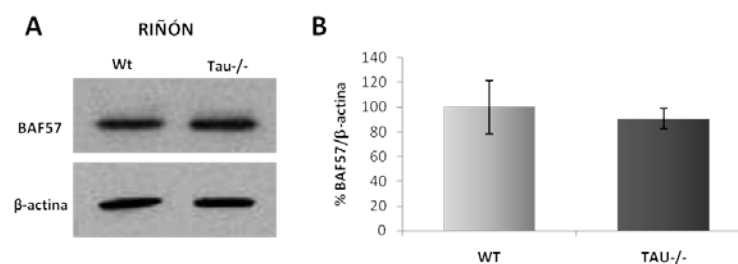


**Figura 16.** Análisis de los niveles de la proteína BAF57 en los ratones  $Tau^{-/-}$ . (A) *Western blot* de extractos de hipocampo de ratones silvestres y  $Tau^{-/-}$  de 3 meses de edad (n=6 animales/genotipo) con anticuerpo anti-BAF57. (B) Cuantificación de los niveles de proteína total (n=6 animales/genotipo). Los niveles de BAF57 en los ratones  $Tau^{-/-}$  estaban significativamente incrementados respecto a los ratones silvestres (\*\* $p < 0,01$ ;  $t$  de Student). (C) Cuantificación de cada una de las isoformas de BAF57. (D) Representación de la proporción de la isoforma 1 de BAF57 respecto a las isoformas 2 y 3.



**Figura 17. Diagrama esquemático del gen *smarce1* y de las tres principales isoformas de la proteína BAF57 en el sistema nervioso murino.** En la parte superior, se muestra un esquema del gen *smarce1*, compuesto por 12 exones, a partir de los que se generan tres isoformas mayoritarias de proteína. La isoforma 1 (411 aa), contiene los exones III-X completos y parte de los exones II y XII, siendo la isoforma más larga. La isoforma 2 (377 aa) se produce a partir del procesamiento del exón IV. Por último, la delección de los exones III y IV determina un inicio de la traducción alternativo, situado en el exón V, a partir del que se genera la isoforma 3 (341 aa). Los exones I, XI, y parte del II y del XII, representados todos ellos con cajas blancas, no se expresan en ninguna de las isoformas. Se indican los codones de inicio de la traducción, ATG (para las isoformas 1 y 2) y ATG\* (para la isoforma 3), así como el codón de final de la traducción TAA.

Con el fin de comprobar que la variación en la expresión de BAF57 estaba directamente relacionada con la presencia o ausencia de tau, y no se debía a la manipulación del gen de tau, situado en el mismo cromosoma que *smarce1*, se analizaron los niveles de BAF57 en riñón, tejido en el no se expresa tau. Se constató que los niveles de BAF57, que en este caso se detectó como una única banda, correspondiente a la isoforma ubicua BAF57-1, no variaban en el ratón  $\text{Tau}^{-/-}$  respecto al silvestre (Figura 18).

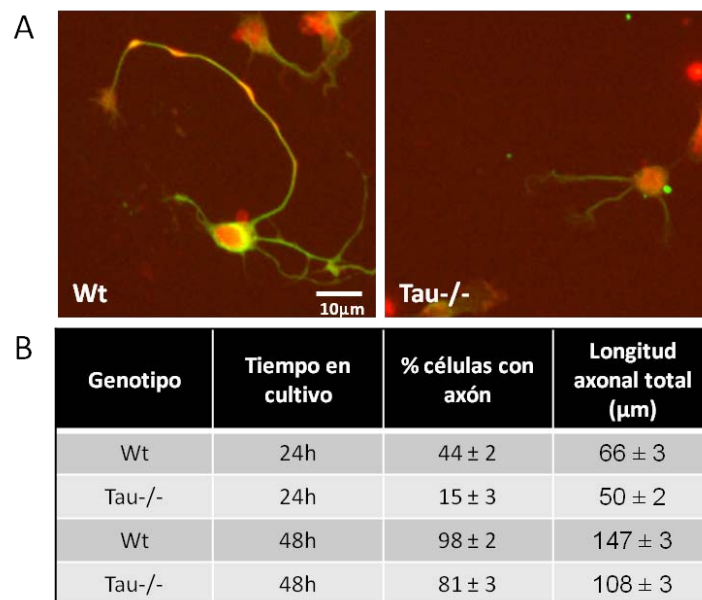


**Figura 18. La expresión de BAF57 no está alterada en riñón.** (A) Análisis de extractos de riñón de ratones silvestres y  $\text{Tau}^{-/-}$  con anticuerpo frente a BAF57. (B) Cuantificación de las bandas mediante densitometrado ( $n=3$  animales/genotipo). Los valores obtenidos se normalizaron frente a la  $\beta$ -actina.

### 1.2.3.2. Retraso en la elongación del axón en los ratones $Tau^{-/-}$

Tras haber demostrado el aumento de expresión de BAF57 en los ratones  $Tau^{-/-}$ , nos planteamos cuáles podrían ser sus consecuencias. Como ya hemos indicado, BAF57 es un componente del complejo remodelador de cromatina dependiente de ATP SWI/SNF (Wang *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1998), implicado en regulación transcripcional. Además, se ha descrito la interacción de BAF57 con CoREST, una proteína que actúa como co-represor del factor de transcripción silenciador de RE1 (REST; *RE1 silencing transcription factor*). Este factor de transcripción es el responsable de la represión de los genes neuronales en las células no neuronales (Battaglioli *et al.*, 2002). En base a estos datos, la sobreexpresión de BAF57, que hemos observado en los ratones  $Tau^{-/-}$ , supondría una mayor represión de genes específicos neuronales en estos ratones. De hecho, en trabajos previos, se ha descrito un retardo en la maduración axonal en neuronas primarias de hipocampo deficientes en tau (Dawson *et al.*, 2001).

Decidimos comprobar el retraso en la maduración axonal en nuestro sistema. Se realizaron cultivos primarios de neuronas de hipocampo de ratones silvestres y  $Tau^{-/-}$ , y se comprobó que las neuronas carentes de tau elongaban el axón de forma tardía (Figura 19). Se observó que, tanto el número de células con axón, como la longitud de los mismos, eran menores a las 24 horas de cultivo en las neuronas deficientes en tau, mientras que a 48 horas las diferencias fueron menores.



**Figura 19. Retraso de la axonogénesis en las neuronas deficientes en tau.** (A) Inmunofluorescencia de neuronas primarias de hipocampo de ratones silvestres y  $Tau^{-/-}$  a las 24 horas de cultivo. Detección con los anticuerpos Smi-31 (verde), marcador axonal, y  $\beta$ III-tubulina (rojo), marcador neuronal. (B) Cuantificación del porcentaje de células con axón y de la longitud axonal a las 24 y 48 horas de cultivo (n=80 células por grupo).

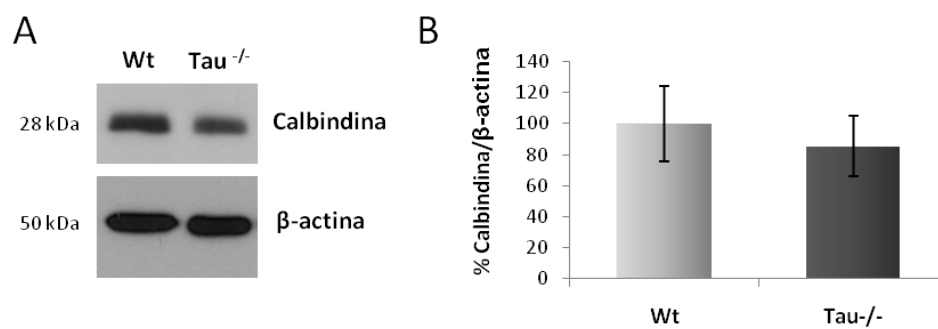


### 1.2.4. Estudio del gen de la calbindina

La calbindina pertenece a la familia de proteínas de unión a calcio, en la que también se encuentran incluidas la parvalbúmina, la calmodulina y la calretinina. La principal función de estas proteínas en la célula es el mantenimiento de la homeostasis del calcio intracelular.

#### 1.2.4.1. Validación de la disminución de *calb1* a nivel de proteína

Se analizaron los niveles de proteína calbindina en extractos de hipocampo de ratones silvestres y  $Tau^{-/-}$ , para comprobar que la disminución de su mRNA se correspondía con un cambio a nivel de proteína. Se observó mediante *western blot* una disminución de la calbindina en el hipocampo de los ratones  $Tau^{-/-}$ , aunque la diferencia no fue significativa (Figura 20).

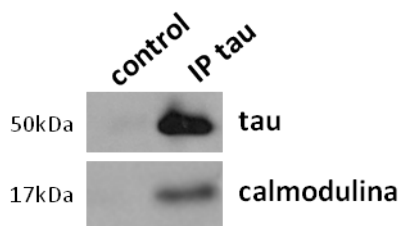


**Figura 20. Análisis de los niveles de la proteína calbindina en los ratones  $Tau^{-/-}$ .** (A) *Western blot* de extractos de hipocampo de ratones silvestres y  $Tau^{-/-}$  con anticuerpo frente a la calbindina. (B) Cuantificación de los niveles de calbindina (n=6 animales/genotipo). Los valores se normalizaron frente a los de la  $\beta$ -actina.

Una vez establecida la disminución de la calbindina en el hipocampo de los ratones  $Tau^{-/-}$ , nos planteamos si la ausencia de tau afectaría a la expresión de alguna otra proteína de unión a calcio.

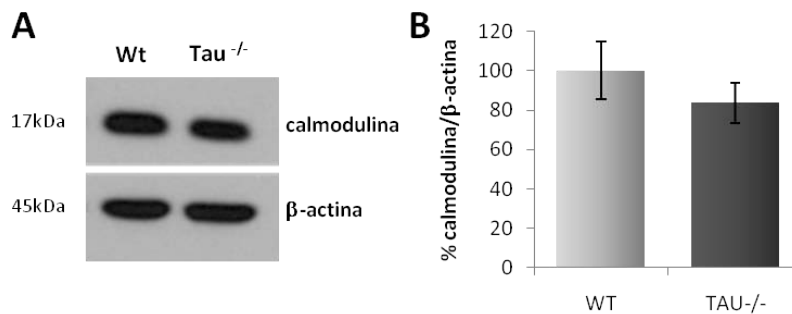
### 1.2.4.2. El déficit de tau también provoca la disminución de otra proteína de unión a calcio: la calmodulina

Entre los miembros de la familia de proteínas de unión a calcio, nos fijamos en la calmodulina, ya que se ha descrito su interacción con tau (Padilla *et al.*, 1990; Yu *et al.*, 2008), por cromatografía de afinidad. Comprobamos que tau interacciona *in vivo* con la calmodulina, llevando a cabo una inmunoprecipitación con una mezcla de anticuerpos contra tau en extractos de hipocampo de ratones silvestres (Figura 21).



**Figura 21. Interacción de tau con la calmodulina.** Se llevó a cabo la inmunoprecipitación con una mezcla de anticuerpos frente a tau (7.51, Tau-1 y Tau-5) en extractos de hipocampo de ratones silvestres. Para confirmar que el resultado no se debía a una interacción inespecífica de las proteínas con la matriz, se realizó en paralelo un control negativo al que no se añadió la mezcla de anticuerpos.

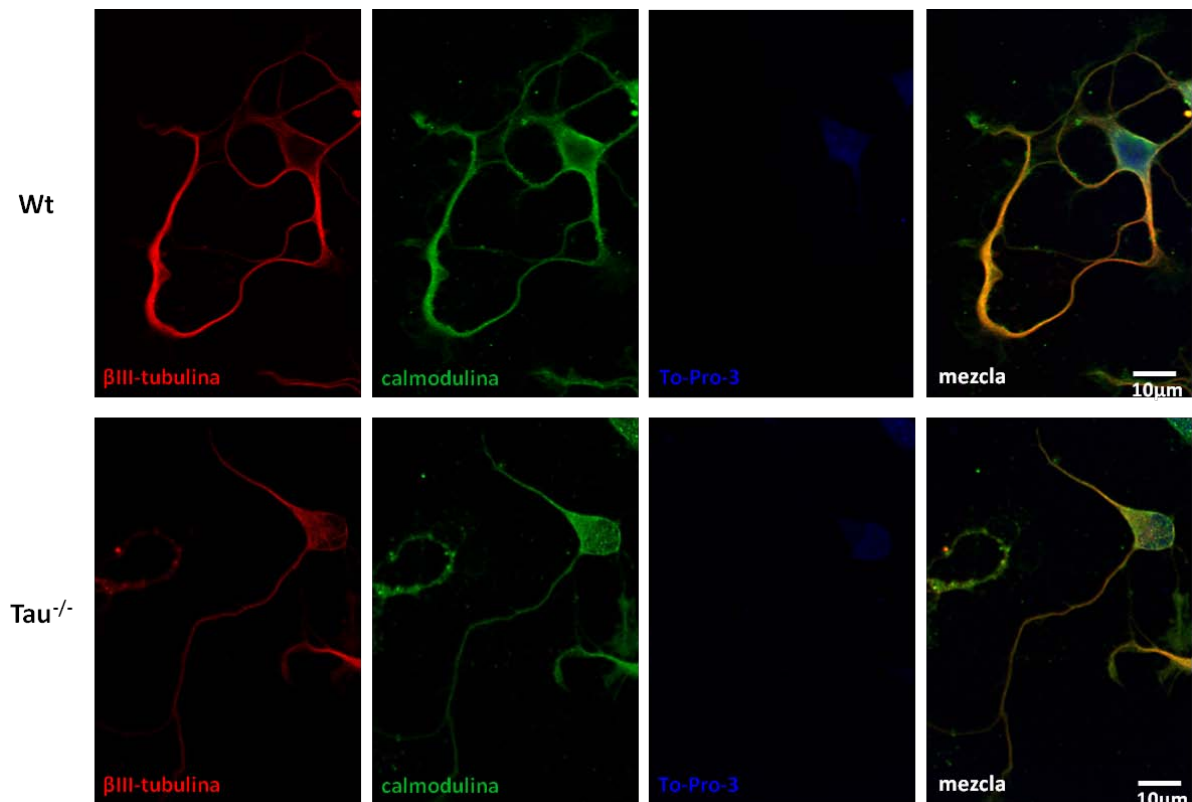
Dada la interacción de tau con la calmodulina, nos preguntamos si los niveles de calmodulina también estarían alterados en ausencia de tau. Analizamos los niveles de calmodulina en extractos de hipocampo de ratones  $Tau^{-/-}$  y silvestres mediante *western blot* (Figura 22). Se observó que los niveles de calmodulina también se encontraban algo disminuidos en los ratones  $Tau^{-/-}$ , aunque de nuevo las diferencias no alcanzaron significancia estadística.



**Figura 22. Disminución de los niveles de calmodulina en los ratones  $Tau^{-/-}$ .** (A) *Western blot* de extractos de hipocampo de ratones silvestres y  $Tau^{-/-}$  con un anticuerpo anti-calmodulina. (B) Cuantificación de los niveles de calmodulina (n=6 animales/genotipo). Los valores se normalizaron frente a los de la  $\beta$ -actina.

### 1.2.4.3. Incremento de los niveles de calmodulina nuclear en neuronas deficientes en tau

La calmodulina es una proteína citoplasmática que, al unirse a calcio, se transloca al núcleo (Deisseroth *et al.*, 1998; Vendrell *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 2000). Nos planteamos si la ausencia de tau afectaría a la localización subcelular de la calmodulina, ya que los niveles de calmodulina total disminuían en el hipocampo de los ratones  $Tau^{-/-}$ . Se llevó a cabo una inmunofluorescencia en neuronas primarias de hipocampo de ratones silvestres y  $Tau^{-/-}$  con anticuerpos para detectar la calmodulina y la  $\beta$ III-tubulina (marcador neuronal). Se observó un aumento de la calmodulina en el núcleo de las neuronas deficientes en tau, respecto a las neuronas silvestres (Figura 23).

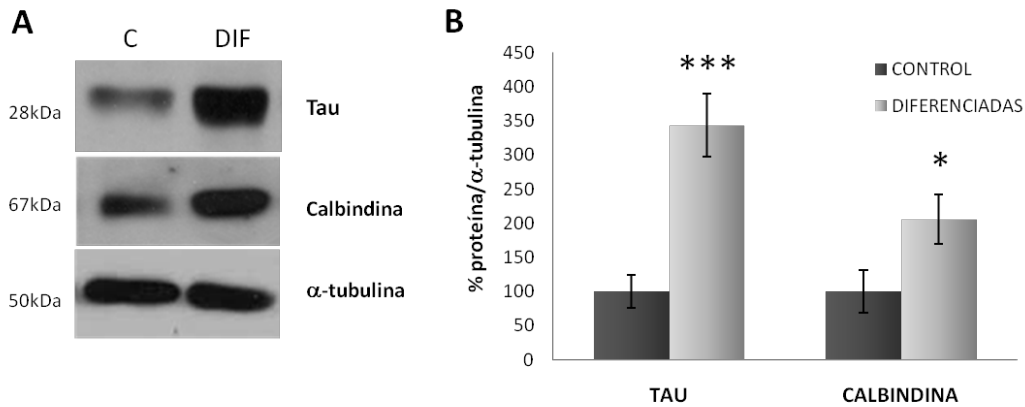


**Figura 23. Aumento de los niveles de calmodulina nuclear en ausencia de tau.** Se analizaron los niveles de calmodulina en neuronas primarias de hipocampo de ratones silvestres y  $Tau^{-/-}$ , mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-calmodulina. La  $\beta$ III-tubulina se empleó como marcador de neuronas maduras y el To-Pro-3 como marcador nuclear.

#### 1.2.4.4. El aumento de tau provoca un incremento de los niveles de calbindina

Para poder estudiar el efecto de tau sobre la calbindina, decidimos emplear la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (Biedler *et al.*, 1978) expresan niveles bajos de tau cuando se encuentran en estado de división. Al añadir a estas células dibutilil AMP cíclico (dbAMPc) sufren un proceso de diferenciación, en el que adquieren una morfología neuronal y aumentan hasta tres veces los niveles de tau (Haque *et al.*, 2004; Haque *et al.*, 1999). Además, está descrito que la línea celular SH-SY5Y expresa calbindina (Morton and Emson, 1990).

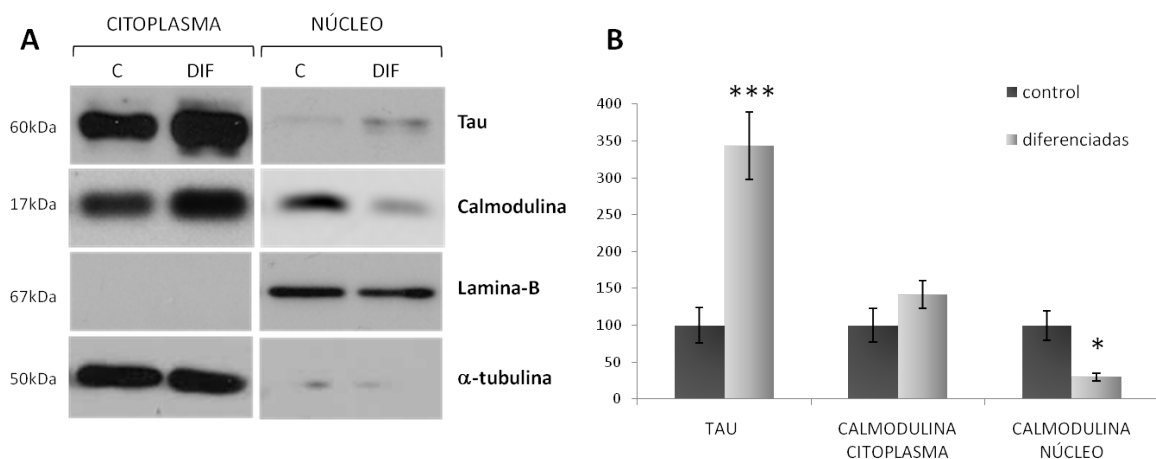
Para analizar el efecto del aumento de tau sobre la calbindina, se llevó a cabo la diferenciación de células SH-SY5Y mediante adición de 2mM dbAMPc. Como era de esperar, tau aumentó enormemente su expresión, alcanzando niveles tres veces superiores tras la diferenciación. Asimismo, los niveles de calbindina aumentaron significativamente en las células diferenciadas, es decir, al aumentar tau (Figura 24). Se empleó como control de carga el  $\alpha$ -tubulina, puesto que se ha descrito que, a pesar de la extensión de prolongaciones durante la diferenciación, los niveles de tubulina en la célula no varían, sino que sólo aumenta su grado de polimerización (Olmsted, 1981).



**Figura 24. Aumento de tau y de la calbindina en las células SH-SY5Y diferenciadas.** (A) Se analizaron mediante *western blot* extractos de células SH-SY5Y diferenciadas (DIF) y control sin diferenciar (C). Para la detección de tau se empleó el anticuerpo 7.51. (B) Cuantificación de los niveles de tau y calbindina normalizados respecto a los de  $\alpha$ -tubulina. Se representa el valor promedio de tres experimentos independientes, en los que se analizaron las muestras por triplicado. (\*\*\*) $p < 0,001$ ; (\*) $p < 0,05$ ; *t* Student)

### 1.2.4.5. El aumento de tau provoca una disminución de los niveles de calmodulina nuclear

Comprobamos, en este mismo sistema, el efecto de tau sobre la localización subcelular de la calmodulina, mediante fraccionamiento subcelular de extractos de células SH-SY5Y diferenciadas durante 6 días y sin diferenciar. Se comprobó por *western blot* el aumento de los niveles de tau en las células diferenciadas (Figura 25). Asimismo, se observó una disminución significativa de la calmodulina nuclear en las células diferenciadas y un aumento de la calmodulina en el citoplasma de las mismas. El aumento de calmodulina citoplasmática no llegó a ser significativo, pero esto probablemente se debe a que la proporción de calmodulina en el núcleo es mucho menor a la del citoplasma (Teruel *et al.*, 2000), por lo que un pequeño aumento de la calmodulina en el núcleo es más significativo que ese mismo aumento en el citoplasma.



**Figura 25. Disminución de la calmodulina nuclear en el proceso de diferenciación de las células SH-SY5Y.** (A) *Western blot* de las fracciones citoplasmática y nuclear de células SH-SY5Y diferenciadas (DIF) durante 6 días y células control sin diferenciar (C), con los anticuerpos 7.51 y anti-calmodulina. Los anticuerpos anti-lamina-B y anti- $\alpha$ -tubulina se emplearon como marcadores nuclear y citoplasmático respectivamente, para comprobar la pureza de ambas fracciones y como controles de carga. (B) Cuantificación de los niveles de tau y calmodulina en citoplasma, normalizados respecto a  $\alpha$ -tubulina, y los niveles de calmodulina en núcleo, normalizados respecto a lamina-B. Se representa el valor promedio obtenido a partir de tres experimentos independientes, en los que se analizaron las muestras por triplicado (\*\*\*) $p < 0,005$ ; \*) $p < 0,05$ ).

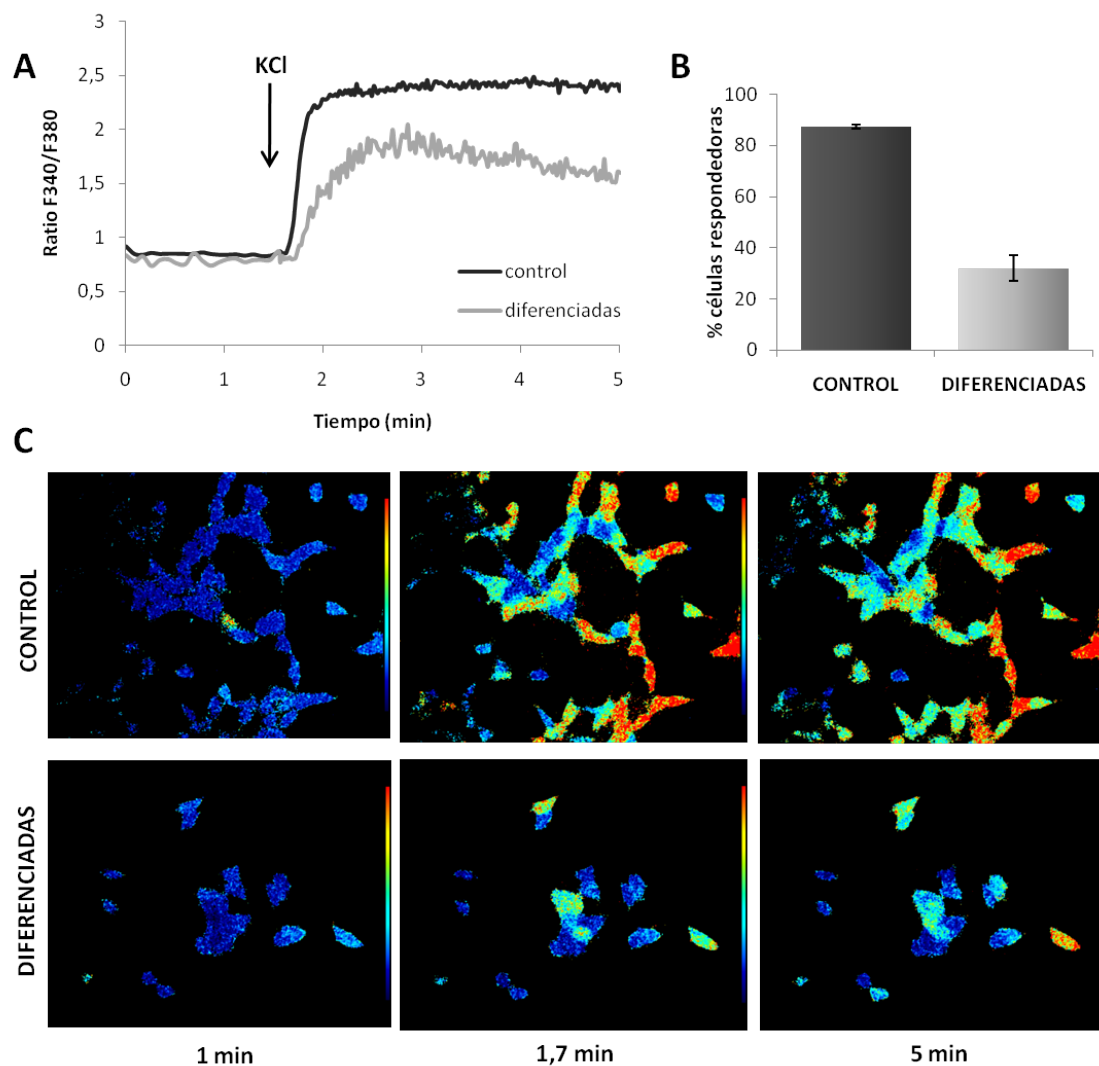
#### 1.2.4.6. Efecto de la presencia de tau en la homeostasis intracelular de calcio

Los resultados obtenidos, tanto en el modelo de ratón deficiente en tau como en el sistema de diferenciación en las células SH-SY5Y, indican que la disminución de tau va acompañada de una disminución de las proteínas de unión a calcio calbindina y calmodulina. Además, tau podría estar regulando la localización subcelular de la calmodulina, mediante la interacción de ambas proteínas en el citoplasma.

Dado que la calbindina y la calmodulina actúan en la célula como moléculas tamponadoras de calcio, nos planteamos si el aumento de estas proteínas en el citoplasma de las células SH-SY5Y diferenciadas afectaría a la homeostasis intracelular del calcio.

Realizamos ensayos de determinación del calcio intracelular mediante el uso de la sonda fluorescente Fura-2 en células SH-SY5Y diferenciadas y sin diferenciar, analizando su respuesta a un estímulo fisiológico como es el  $K^+$ . Observamos que la respuesta a KCl de las células diferenciadas y las células control fue diferente (Figura 26). En primer lugar, el nivel máximo de calcio intracelular que alcanzaron las células diferenciadas fue inferior al que mostraron las células control. Además, en las células diferenciadas se observó que, una vez alcanzado el máximo, el calcio intracelular disminuyó poco a poco, mientras que en las células control el calcio intracelular llegó a un máximo, en el que se mantuvo a lo largo del tiempo, sin disminuir. Sin embargo, el porcentaje de células respondedoras fue mucho menor en las células diferenciadas que en las control, aunque se ajusta a lo descrito (Desai *et al.*, 2006).

Estos resultados parecen indicar que las células SH-SY5Y diferenciadas son capaces de tamponar en mayor medida el aumento del calcio intracelular, lo que podría deberse a la mayor presencia de proteínas de unión a calcio en su citoplasma.



**Figura 26.** En las células SH-SY5Y diferenciadas se da un menor incremento del calcio intracelular en respuesta a KCl que en las células sin diferenciar. Se analizó la respuesta de células SH-SY5Y diferenciadas durante 6 días y células control no diferenciadas, mediante ensayos de determinación del calcio intracelular con la sonda Fura-2. **(A)** Representación de la cantidad de calcio libre en el citoplasma, analizado como el ratio entre la fluorescencia a 340nm (sonda unida a calcio) y la fluorescencia a 380nm (sonda libre). A los 1,5 minutos se añadió KCl 30mM, y se analizó la respuesta cada 1 segundo hasta los 5 minutos, en las células control y diferenciadas. Se ha representado el valor promedio de las células que respondieron a KCl de cada grupo (n= 50 células/grupo). **(B)** Cuantificación de las células que respondieron al estímulo de KCl. **(C)** Imágenes representativas del aumento de calcio detectado en las células control y diferenciadas a 1 minuto (estado basal), 1,7 minutos (respuesta tras la adición de KCl 30mM) y 5 minutos (estado final).

## 2. Estudio de la función de tau fosforilado

Una vez analizado el efecto de la pérdida de función de tau en el modelo de ratón  $Tau^{-/-}$ , decidimos analizar la posible ganancia de función tóxica de tau fosforilado en otro modelo murino.

En base a estudios realizados previamente en nuestro laboratorio con un modelo de ratón que sobrexpresas GSK3 $\beta$ , en el que se observó hiperfosforilación de tau y un alto grado de neurodegeneración (Lucas *et al.*, 2001), nos propusimos comprobar el papel de tau fosforilado en el proceso neurodegenerativo inducido por la sobrexpresión de GSK3 $\beta$ . La estrategia que seguimos fue la de eliminar la expresión de tau en ese modelo, lo que nos permitiría determinar los efectos patológicos de tau fosforilado al compararlo con el modelo que expresa tau.

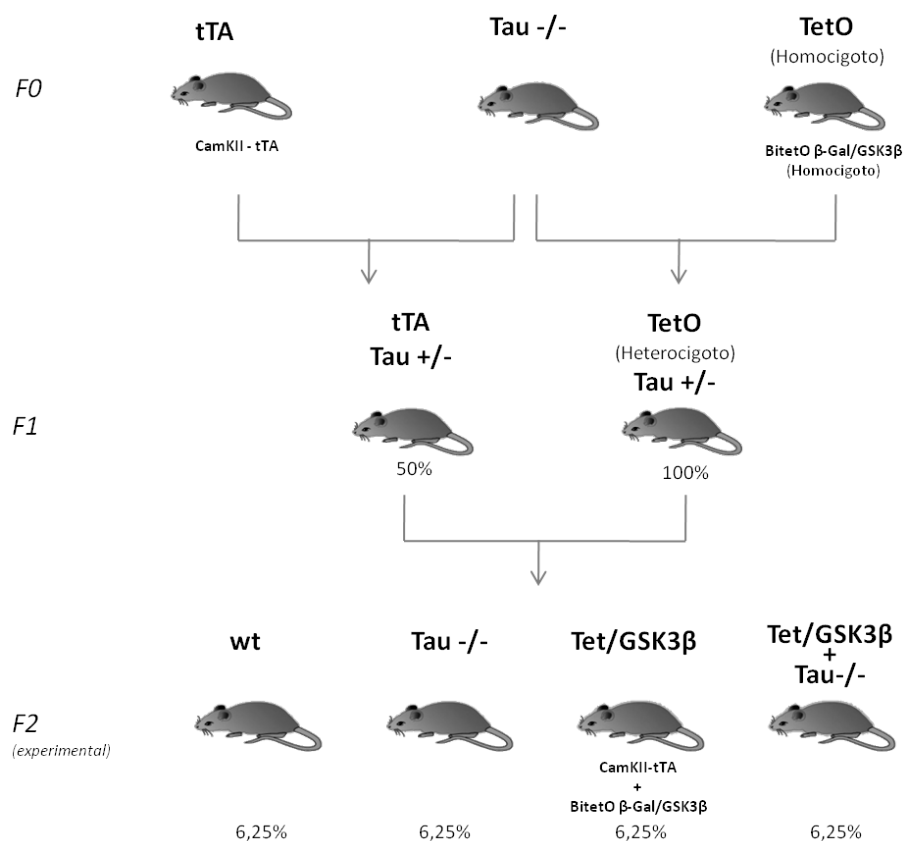
### 2.1. Generación del modelo de ratón triple transgénico Tet/GSK3 $\beta$ +Tau $^{-/-}$

Para obtener este nuevo modelo se emplearon tres líneas de ratones transgénicos, ya disponibles en nuestro laboratorio: la línea  $Tau^{-/-}$ , deficiente en la proteína tau (Dawson *et al.*, 2001); la línea tTA, que expresa el transactivador reprimible por tetraciclina; y la línea BiTetO, que expresa, al unirse el transactivador tTA a su secuencia operadora, la enzima GSK3 $\beta$  con un epítipo myc y la proteína reportera  $\beta$ -galactosidasa (Lucas *et al.*, 2001) (ver Materiales y Métodos).

Por un lado se llevó a cabo el cruce de ratones  $Tau^{-/-}$  con ratones heterocigotos para el transactivador tTA y, por otro lado, se cruzaron ratones  $Tau^{-/-}$  con ratones homocigotos para el transgén de GSK3 $\beta$ . Posteriormente, se cruzaron entre sí los ratones resultantes de los anteriores cruces, Tet+Tau $^{+/-}$  y GSK3 $\beta$ +Tau $^{+/-}$ . La descendencia obtenida a partir de estos cruces presentaba 12 genotipos diferentes, entre los que se encontraba el genotipo buscado, Tet/GSK3 $\beta$ +Tau $^{-/-}$ . Los ratones se cruzaron de la manera indicada previamente para producir, además del triple transgénico, sus correspondientes hermanos controles silvestre (wt),  $Tau^{-/-}$  y Tet/GSK3 $\beta$  (Figura 28).

Los ratones triple transgénicos Tet/GSK3 $\beta$ +Tau $^{-/-}$  resultaron ser viables, no observándose mortalidad embrionaria en ninguno de los genotipos posibles.





**Figura 27. Generación del ratón triple transgénico Tet/GSK3β+Tau<sup>-/-</sup>.** Diagrama de los cruces realizados para obtener el ratón Tet/GSK3β+Tau<sup>-/-</sup> y sus hermanos control: silvestre (Wt), Tau<sup>-/-</sup> y Tet/GSK3β. En la parte inferior se indican los porcentajes mendelianos esperados.

## 2.2. Caracterización bioquímica y comportamental del modelo Tet/GSK3β+Tau<sup>-/-</sup>

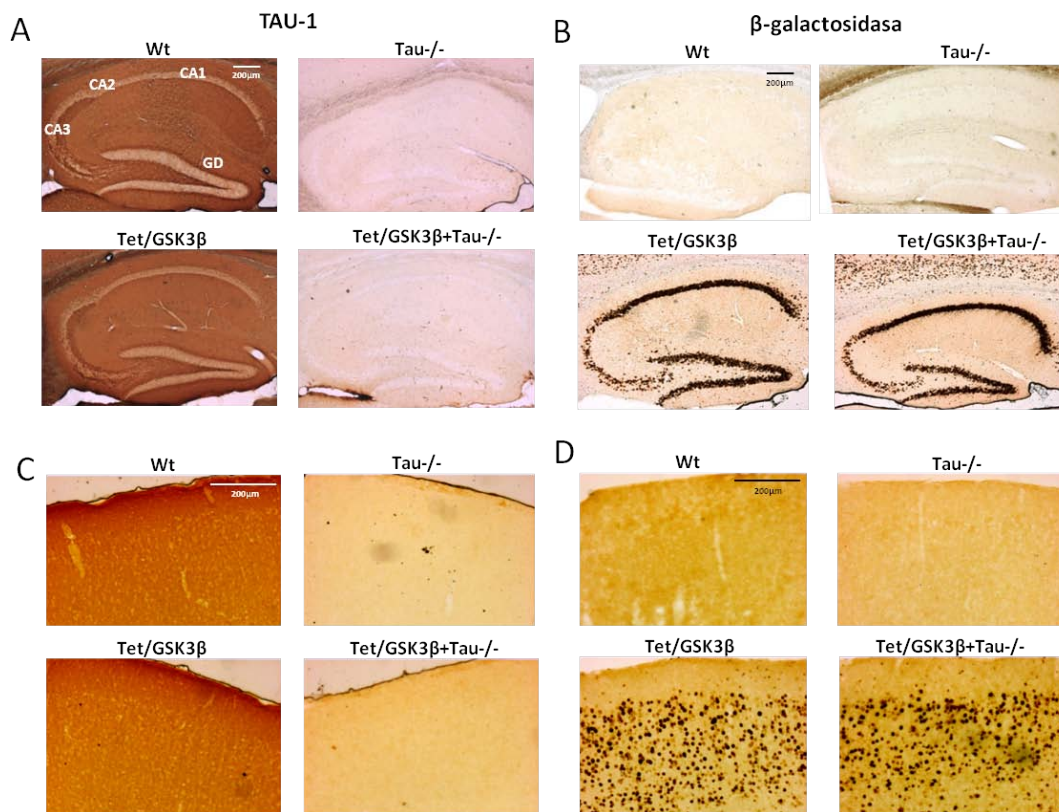
Una vez que se obtuvieron los ratones triple transgénicos Tet/GSK3β+Tau<sup>-/-</sup>, detectados a partir del genotipado de su DNA genómico, se procedió a analizar la sobreexpresión de GSK3β así como la ausencia de proteína tau mediante diversas técnicas.

### 2.2.1. Caracterización del modelo Tet/GSK3β+Tau<sup>-/-</sup> mediante análisis inmunohistoquímico

Para comprobar el genotipo y el patrón de expresión de los transgenes se realizó un análisis inmunohistoquímico de secciones sagitales de cerebros de los ratones silvestres (Wt), Tau<sup>-/-</sup>, Tet/GSK3β y Tet/GSK3β+Tau<sup>-/-</sup>.

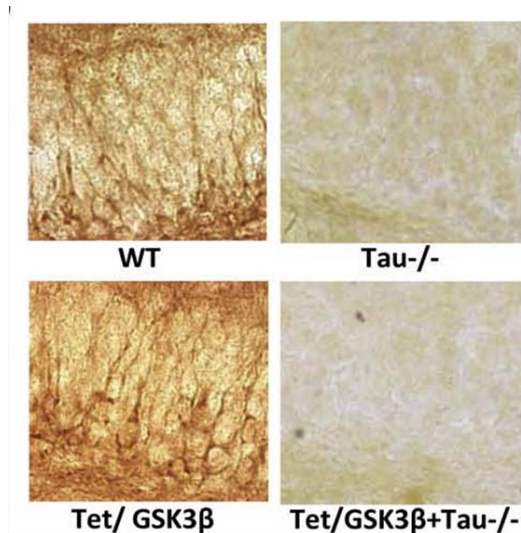
Para analizar la expresión o carencia de la proteína tau se empleó el anticuerpo Tau-1 (Figura 28A, C). En los animales deficientes en tau,  $Tau^{-/-}$  y  $Tet/GSK3\beta+Tau^{-/-}$ , no se observó tinción en hipocampo ni en ninguna otra región del cerebro. Los cerebros de los animales Wt y  $Tet/GSK3\beta$  se tiñeron fuertemente tanto en las diferentes regiones del hipocampo (CA1, CA2, CA3 y giro dentado) (Figura 28A) como en la corteza (Figura 28C).

Cuando se analizó el transgén reportero  $\beta$ -galactosidasa, cuya expresión correlaciona con la de  $GSK3\beta$  exógena, se comprobó su expresión en corteza, estriado e hipocampo de los ratones  $Tet/GSK3\beta$  y  $Tet/GSK3\beta+Tau^{-/-}$  (Figura 28B, D). En el hipocampo, se observó tinción tanto en las neuronas piramidales de CA1, CA2 y CA3 como en las neuronas granulares del giro dentado. Las células de CA1 y las de giro dentado presentaron una tinción más fuerte que CA2 y CA3. El patrón de expresión del transgén en los ratones  $Tet/GSK3\beta$  y  $Tet/GSK3\beta+Tau^{-/-}$  no presentó ninguna diferencia.



**Figura 28. Caracterización del ratón  $Tet/GSK3\beta+Tau^{-/-}$  y sus controles mediante análisis inmunohistoquímico.** Se analizó la expresión de los transgenes en secciones sagitales de animales de 4 semanas de edad. La proteína tau se detectó con el anticuerpo Tau-1 en el hipocampo (A) y la corteza (C). En el caso del transgén  $GSK3\beta$ , se recurrió a la detección de la proteína reportera  $\beta$ -galactosidasa, cuya expresión se localizó en el hipocampo (B), la corteza (D) y el estriado principalmente. La tinción con anti- $\beta$ -galactosidasa es preferentemente nuclear debido a que, en la construcción del transgén, la  $\beta$ -galactosidasa lleva unida una secuencia de localización nuclear (NLS). En la figura A se indican las diferentes regiones del hipocampo: CA1, CA2, CA3 y giro dentado (GD).

Por último, se confirmó la hiperfosforilación de tau en los ratones Tet/GSK3 $\beta$  respecto a los ratones silvestres, previamente descrita (Lucas *et al.*, 2001), mediante inmunohistoquímica con el anticuerpo PHF-1, que reconoce específicamente a tau fosforilado por GSK3 $\beta$  en las serinas 396 y 404 (Vincent *et al.*, 1994) (Figura 29).

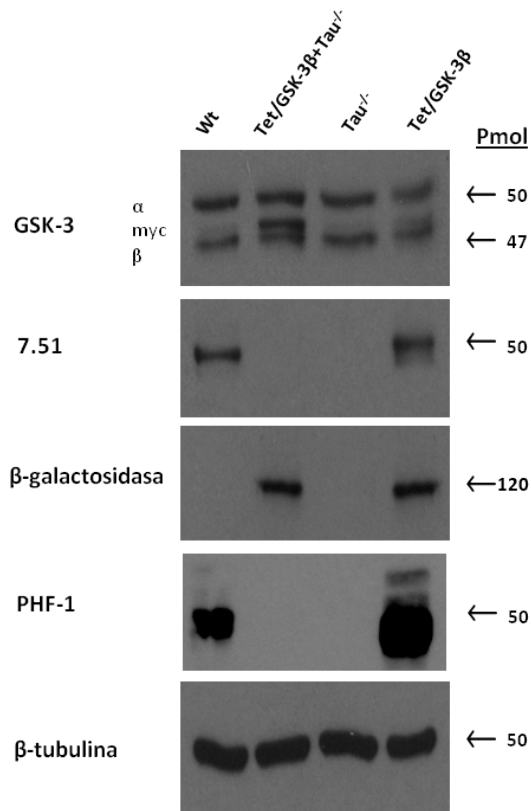


**Figura 29. Aumento de la fosforilación de tau por GSK3 $\beta$  en el giro dentado de los ratones Tet/GSK3 $\beta$ .** Se analizaron mediante inmunohistoquímica secciones sagitales de ratones silvestres, Tau<sup>-/-</sup>, Tet/GSK3 $\beta$  y Tet/GSK3 $\beta$ +Tau<sup>-/-</sup>. La detección de tau fosforilado por GSK3 $\beta$  se llevó a cabo con el anticuerpo PHF-1. No se observó tinción en los ratones deficientes en tau.

### 2.2.2. Caracterización del modelo Tet/GSK3 $\beta$ +Tau<sup>-/-</sup> mediante análisis por *western blot*

Estudios previos mostraron que los ratones Tet/GSK3 $\beta$  presentan niveles elevados de GSK3 $\beta$  en hipocampo y en corteza (Lucas *et al.*, 2001). Sin embargo, cuando se realizaron ensayos enzimáticos de la actividad GSK3, sólo se vio un aumento significativo en extractos de hipocampo (Hernandez *et al.*, 2002). Teniendo en cuenta estas observaciones previas, nuestro análisis se centró en el hipocampo.

El análisis de extractos de hipocampo mediante *western blot* confirmó la sobreexpresión del transgén myc-GSK3 $\beta$  y de su gen reportero  $\beta$ -galactosidasa en los ratones Tet/GSK3 $\beta$  y Tet/GSK3 $\beta$ +Tau<sup>-/-</sup> (Figura 30). Asimismo, se comprobó el aumento de fosforilación de tau por GSK3 $\beta$  con el anticuerpo PHF-1. Esta hiperfosforilación de tau también se vio reflejada en la menor migración de la banda de tau, detectada con el anticuerpo 7.51, en los ratones Tet/GSK3 $\beta$  respecto a la migración de la banda de tau en los ratones silvestres. Como cabía esperar, en los ratones Tet/GSK3 $\beta$ +Tau<sup>-/-</sup> y Tau<sup>-/-</sup> no se detectó expresión de tau.

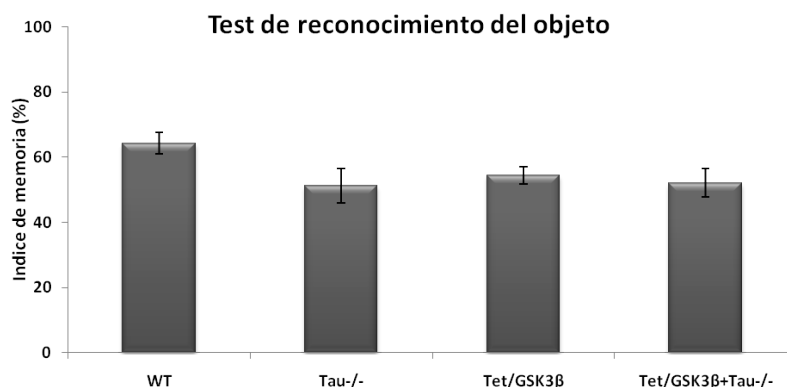


**Figura 30. Caracterización del ratón Tet/GSK3β+Tau<sup>-/-</sup> y sus controles mediante western blot.** Se analizaron extractos de hipocampo de ratones de 4 semanas de edad. La presencia de GSK3β se detectó con un anticuerpo que reconoce tanto la isoforma α como la β de la GSK3 endógena y, entre las dos isoformas, la GSK3β exógena unida al epítipo myc. Asimismo, se analizó la expresión de la proteína reportera β-galactosidasa, que correlaciona con la expresión de GSK3β exógena. Se empleó el anticuerpo 7.51 para detectar la proteína tau y el anticuerpo PHF-1 para detectar la proteína tau fosforilada por GSK3β. Por último, se indican los niveles de β-tubulina como control de carga. A la derecha se muestran los pesos moleculares de las distintas proteínas en kDa.

### 2.2.3. Caracterización a nivel comportamental del modelo Tet/GSK3β+Tau<sup>-/-</sup>

En estudios previos, se había descrito un déficit cognitivo en el ratón Tet/GSK3β, analizado mediante el Test de reconocimiento del objeto (Engel *et al.*, 2006a) y el Test de Morris (Hernandez *et al.*, 2002). Con el fin de determinar la implicación de tau fosforilado en este déficit cognitivo, se llevaron a cabo ambos test en nuestro modelo Tet/GSK3β+Tau<sup>-/-</sup>.

En primer lugar, se realizó el Test de reconocimiento del objeto a los ratones Tet/GSK3β+Tau<sup>-/-</sup> y sus controles, a las 4 semanas de edad. Se observó un déficit de memoria en los tres genotipos transgénicos Tau<sup>-/-</sup>, Tet/GSK3β y Tet/GSK3β+Tau<sup>-/-</sup>, respecto al genotipo silvestre (Figura 31), aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

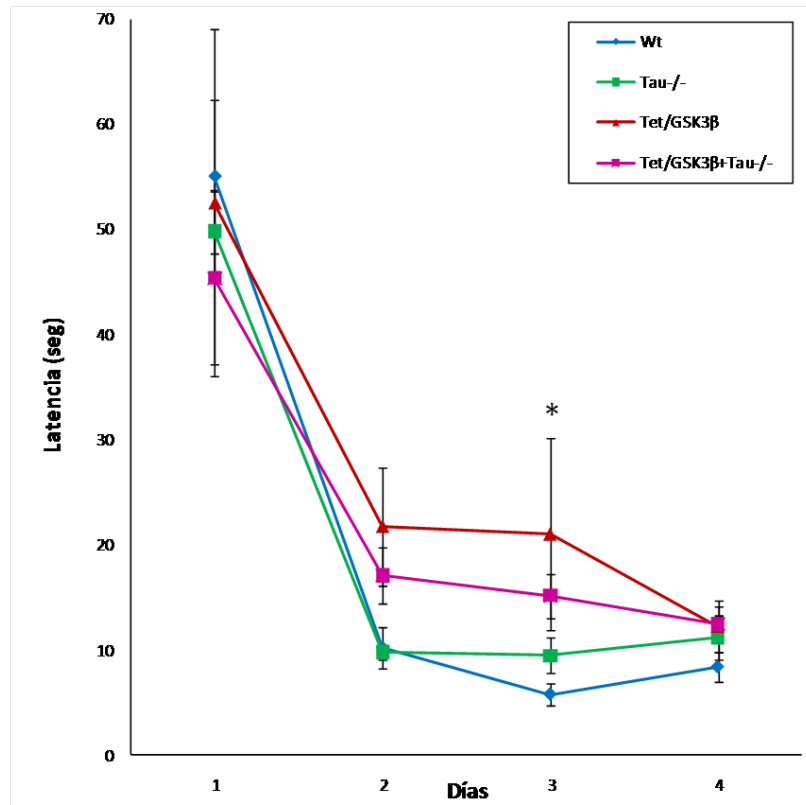


**Figura 31. Déficit de memoria en los ratones Tet/GSK3β+Tau<sup>-/-</sup>, Tet/GSK3β y Tau<sup>-/-</sup> en el Test de reconocimiento del objeto.** Se representa el índice de memoria de los ratones silvestres, Tau<sup>-/-</sup>, Tet/GSK3β y Tet/GSK3β+Tau<sup>-/-</sup> (n=8 animales/genotipo).

Posteriormente, se realizó el Test de Morris, con más relevancia para nuestro estudio, ya que evalúa específicamente la memoria espacial, la cual depende directamente del hipocampo, región en la que se está sobreexpresando la enzima GSK3β. Se testaron animales silvestres, Tau<sup>-/-</sup>, Tet/GSK3β y Tet/GSK3β +Tau<sup>-/-</sup> de 3 meses de edad.

De todos los parámetros obtenidos en el test, nos centramos en la latencia, que es el tiempo que tarda el ratón en encontrar la plataforma. Una mayor latencia implica un retraso en el aprendizaje, es decir, una menor memoria espacial. Los valores de latencia de los ratones Tau<sup>-/-</sup> fueron similares a los de los ratones silvestres (Figura 32), como cabía esperar basándonos en estudios previos (Roberson *et al.*, 2007). Los dos grupos de animales que sobreexpresaban GSK3β mostraron unos valores de latencia mayores, es decir, un déficit cognitivo. Sin embargo, la diferencia observada sólo fue estadísticamente significativa en el caso del grupo Tet/GSK3β con respecto al grupo silvestre al tercer día de test, mientras que nuestro modelo Tet/GSK3β+Tau<sup>-/-</sup> mostró unos valores intermedios entre los obtenidos para los grupos silvestre y Tau<sup>-/-</sup> y el grupo Tet/GSK3β, no siendo significativa la diferencia respecto a ninguno de ellos.

De esta manera, parece que el déficit cognitivo, consecuencia de la sobreexpresión de GSK3β, disminuye en cierta medida en ausencia de tau.



**Figura 32.** El ratón Tet/GSK3β+Tau<sup>-/-</sup> recupera parcialmente el déficit de memoria registrado en los ratones Tet/GSK3β en el Test de Morris. Se indica el tiempo empleado en encontrar la plataforma sumergida (latencia) durante 4 días consecutivos para los animales (♦) silvestres (n=6), (■) Tau<sup>-/-</sup> (n=6), (▲) Tet/GSK3β (n=6) y (■) Tet/GSK3β+Tau<sup>-/-</sup> (n=11). (\*p<0,05 para el grupo Tet/GSK3β respecto al grupo silvestre, analizado mediante un test ANOVA).

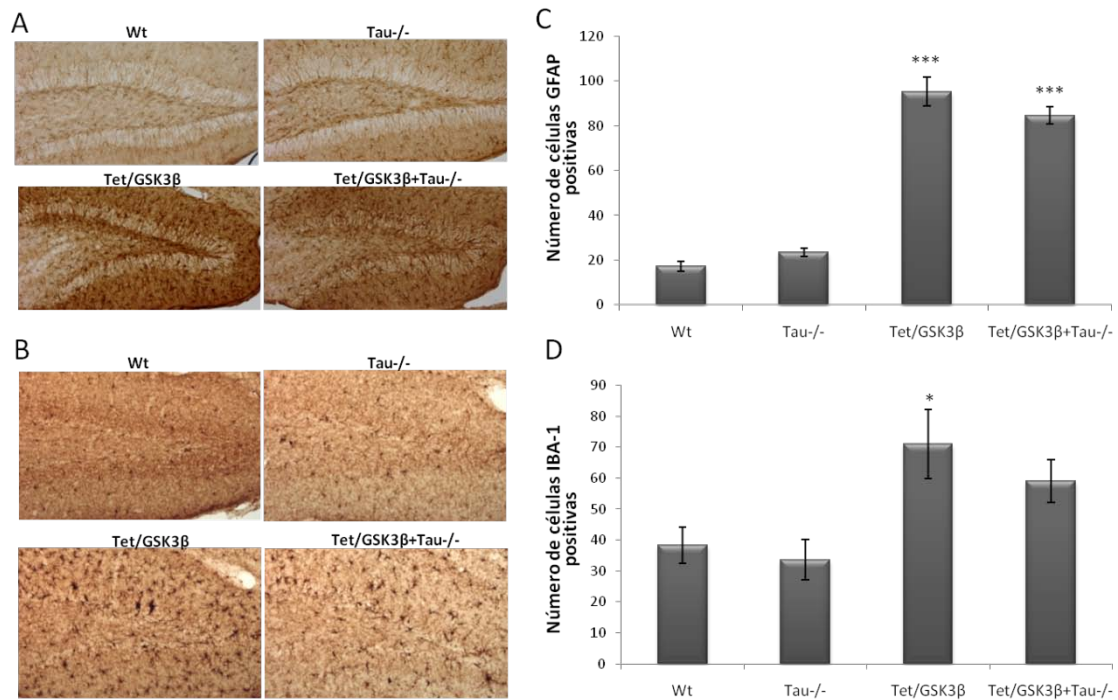
## 2.3. Estudio de la neurodegeneración en el modelo Tet/GSK3 $\beta$ +Tau<sup>-/-</sup>

En estudios previos se comprobó que el déficit cognitivo que mostraba el ratón Tet/GSK3 $\beta$  se encontraba asociado a un aumento de la muerte neuronal por apoptosis en el hipocampo (Engel *et al.*, 2006a; Lucas *et al.*, 2001). Esta muerte celular estaba acompañada de un aumento de la gliosis reactiva y, a edades avanzadas, llegaba a darse atrofia del giro dentado del hipocampo (Engel *et al.*, 2006a). Analizamos la muerte neuronal por apoptosis, la gliosis reactiva y la atrofia del giro dentado en el modelo Tet/GSK3 $\beta$ +Tau<sup>-/-</sup>, para comprobar si en ausencia de tau persistían las alteraciones descritas en el ratón Tet/GSK3 $\beta$ .

### 2.3.1. Disminución de la gliosis reactiva en el hipocampo de los ratones Tet/GSK3 $\beta$ +Tau<sup>-/-</sup>

La gliosis reactiva consiste en una proliferación de las células gliales (astrocitos y microglía), que se hipertrofian y forman fibras gliales, que pueden dar lugar a una cicatriz glial. Esta alteración de la glía suele acompañar a procesos de muerte neuronal. La gliosis reactiva cursa con procesos de astrogliosis (astrocitos reactivos) y microgliosis (microglía reactiva).

Para detectar la gliosis reactiva, se realizó una tinción inmunohistoquímica con anticuerpos frente a las proteínas Iba-1 (*Ionized Calcium Binding Adapter Molecule-1*) y GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*). En cerebro, la proteína Iba-1 se expresa específicamente en microglía y su expresión aumenta cuando la microglía se activa durante procesos inflamatorios. La proteína GFAP se expresa específicamente en los astrocitos y sus niveles aumentan durante el proceso de activación astrocítica. Se observó un aumento de gliosis reactiva, tanto microgliosis (Iba-1) como astrogliosis (GFAP), en los genotipos con sobreexpresión de GSK3 $\beta$ , con respecto a los genotipos silvestre y Tau<sup>-/-</sup>, principalmente en el giro dentado del hipocampo (Figura 33A, B). Sin embargo, los niveles de gliosis en el ratón Tet/GSK3 $\beta$ +Tau<sup>-/-</sup> fueron algo menores que en el Tet/GSK3 $\beta$  (Figura 33C, D), diferencia que resultó más evidente en el caso de la microglía activada, donde el aumento observado para los ratones Tet/GSK3 $\beta$ +Tau<sup>-/-</sup> respecto a los silvestres y Tau<sup>-/-</sup> no fue significativo, pero sí lo fue para los ratones Tet/GSK3 $\beta$  (Figura 33D).

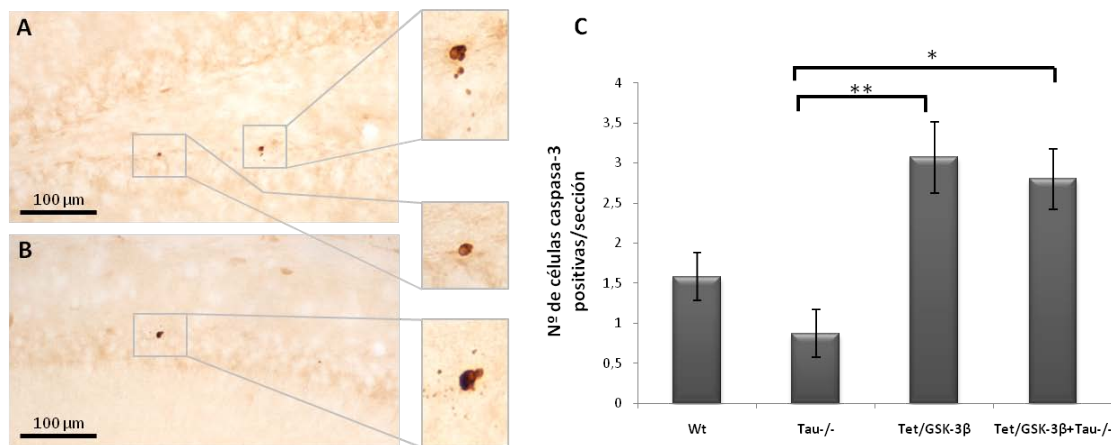


**Figura 33.** Los ratones Tet/GSK3β+Tau<sup>-/-</sup> muestran una ligera disminución de la gliosis reactiva respecto a los ratones Tet/GSK3β. Tinción inmunohistoquímica con los anticuerpos anti-GFAP (A) y anti-Iba1 (B) de secciones sagitales de ratones silvestre, Tau<sup>-/-</sup>, Tet/GSK3β y Tet/GSK3β+Tau<sup>-/-</sup> de 4 semanas de edad. (C) Cuantificación de las células GFAP-positivas (n=8 animales/genotipo). (\*\*\*)*p*<0,005 para los grupos Tet/GSK3β y Tet/GSK3β+Tau<sup>-/-</sup> respecto a los grupos wt y Tau<sup>-/-</sup>, analizados con un test ANOVA). (D) Cuantificación de las células Iba1-positivas (n=8 animales/genotipo). (\**p*<0,05 para el grupo Tet/GSK3β respecto a los grupos wt y Tau<sup>-/-</sup>, analizados con un test ANOVA).

### 2.3.2. Descenso de la muerte neuronal por apoptosis en el hipocampo de los ratones Tet/GSK3β+Tau<sup>-/-</sup>

Dado que en el ratón Tet/GSK3β se ha observado un aumento la muerte por apoptosis en el hipocampo (Lucas *et al.*, 2001), analizamos la muerte neuronal en los ratones Tet/GSK3β+Tau<sup>-/-</sup> y sus controles. Se empleó el anticuerpo que reconoce la caspasa3 escindida para la detección de células apoptóticas mediante inmunohistoquímica (Figura 34A, B). El corte proteolítico de la caspasa-3 es un marcador de muerte celular por apoptosis (Fernandes-Alnemri *et al.*, 1994). El número de células caspasa3-positivas fue algo menor en el hipocampo de los ratones Tet/GSK3β+Tau<sup>-/-</sup>, respecto a los ratones Tet/GSK3β, aunque el aumento de la muerte en ambos fue significativo respecto al grupo Tau<sup>-/-</sup>.





**Figura 34. La muerte neuronal por apoptosis es algo menor en los ratones Tet/GSK3β+Tau<sup>-/-</sup> respecto a los Tet/GSK3β.** Se analizó la muerte neuronal por apoptosis en el hipocampo de los ratones Tet/GSK3β+Tau<sup>-/-</sup> y sus controles, mediante la detección de la caspasa3 escindida, por inmunohistoquímica. (A) Imagen representativa de dos células marcadas con anti-caspasa3 escindida en el giro dentado del hipocampo. (B) Ejemplo de una célula caspasa3 positiva localizada en la región CA1 del hipocampo. (C) Cuantificación de las células positivas para caspasa3 escindida en el hipocampo de los ratones Tet/GSK3β+Tau<sup>-/-</sup> y sus controles. Se realizó el conteo en 3 secciones sagitales de cerebro de cada ratón (n=6 ratones /genotipo). (\*\*p<0,01; \*p<0,05; test ANOVA)

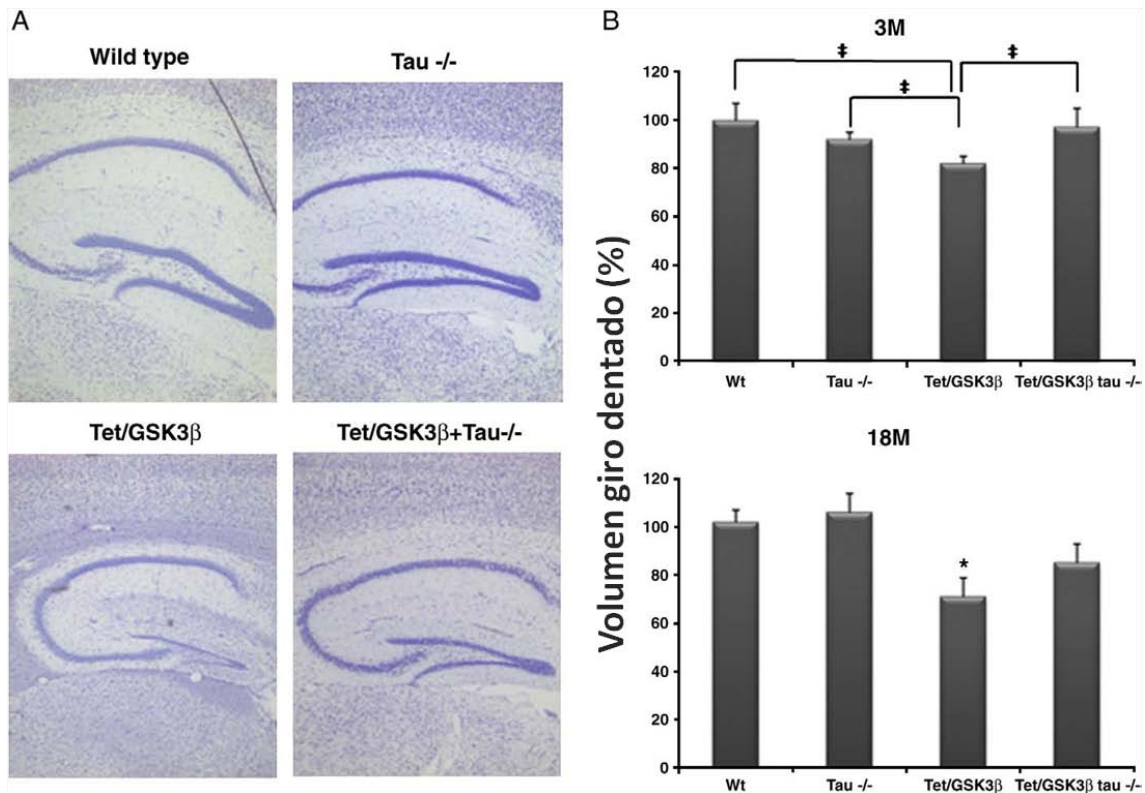
### 2.3.3. Retraso de la atrofia del giro dentado en los ratones Tet/GSK3β+Tau<sup>-/-</sup>

En el modelo de ratón Tet/GSK3β, se encontró una correlación entre el déficit de memoria espacial y una disminución del volumen del giro dentado (Engel *et al.*, 2006a). Para estudiar el proceso de neurodegeneración en el giro dentado de nuestro modelo Tet/GSK3β+Tau<sup>-/-</sup> y compararlo con el modelo Tet/GSK3β, se llevó a cabo la medida del volumen del giro dentado de ratones Tet/GSK3β+Tau<sup>-/-</sup> y de sus hermanos control silvestre, Tau<sup>-/-</sup> y Tet/GSK3β, mediante tinción con tionina de secciones seriadas de cerebro a diferentes edades.

Como se observa en la Figura 35A, a 18 meses de edad los ratones Tet/GSK3β mostraron una atrofia acusada del giro dentado en comparación con los ratones silvestres y Tau<sup>-/-</sup>, siendo la diferencia estadísticamente significativa (Figura 35B). En el caso de los ratones Tet/GSK3β+Tau<sup>-/-</sup>, también se observó una disminución del volumen del giro dentado respecto a los genotipos silvestre y Tau<sup>-/-</sup>, pero de manera menos acusada, sin alcanzar esta diferencia significancia estadística. Asimismo, la diferencia existente entre el genotipo Tet/GSK3β y el Tet/GSK3β+Tau<sup>-/-</sup> no fue estadísticamente significativa ( $p=0,07$ ;  $t$  de Student).

Cuando este mismo estudio se realizó en animales más jóvenes, de 3 meses de edad, sólo se encontró degeneración del giro dentado en los ratones Tet/GSK3β, mientras que los

ratones Tet/GSK3 $\beta$ +Tau $^{-/-}$  mostraron valores similares a los grupos silvestre y Tau $^{-/-}$ . En este caso, la diferencia de volumen del giro dentado de los Tet/GSK3 $\beta$  fue estadísticamente significativa respecto a los otros tres genotipos.



**Figura 35.** La atrofia del giro dentado se encuentra retrasada en los ratones Tet/GSK3 $\beta$ +Tau $^{-/-}$  respecto a los Tet/GSK3 $\beta$ . (A) Secciones sagitales de ratones silvestre, Tau $^{-/-}$ , Tet/GSK3 $\beta$  y Tet/GSK3 $\beta$ +Tau $^{-/-}$  de 18 meses, teñidas con tionina. (B) Cuantificación del volumen del giro dentado de ratones silvestres, Tau $^{-/-}$ , Tet/GSK3 $\beta$  y Tet/GSK3 $\beta$ +Tau $^{-/-}$  de 3 y 18 meses de edad (n=6 animales/genotipo). Se observó una atrofia significativa del giro dentado en los ratones Tet/GSK3 $\beta$  de 18 meses de edad respecto a los ratones silvestres de esa misma edad (\* $p$ <0,05; análisis mediante test ANOVA). A los 3 meses de edad, la disminución del volumen del giro dentado de los ratones Tet/GSK3 $\beta$  fue significativa respecto a los otros tres genotipos ( $\dagger p$ <0,05; comparación de los grupos dos a dos mediante  $t$  de Student).

Este resultado sugiere que la ausencia de tau puede tener un papel parcialmente protector, que podría retrasar el proceso neurodegenerativo inducido por GSK3 $\beta$ , o, lo que es lo mismo, que tau fosforilado por GSK3 $\beta$  tiene un efecto tóxico para las células del giro dentado. De hecho, cuando se empleó la estrategia contraria, y se sobreespresó tau humana con mutaciones asociadas a FTDP-17 en los ratones Tet/GSK3 $\beta$  (modelo Tet/GSK3 $\beta$ +Tau $^{VLW}$ ), el proceso neurodegenerativo se vio acelerado (Engel *et al.*, 2006b), lo que demuestra que tau, en su estado fosforilado, sufre una ganancia de función tóxica, responsable parcialmente de la patología inducida por sobreexpresión de GSK3 $\beta$ .

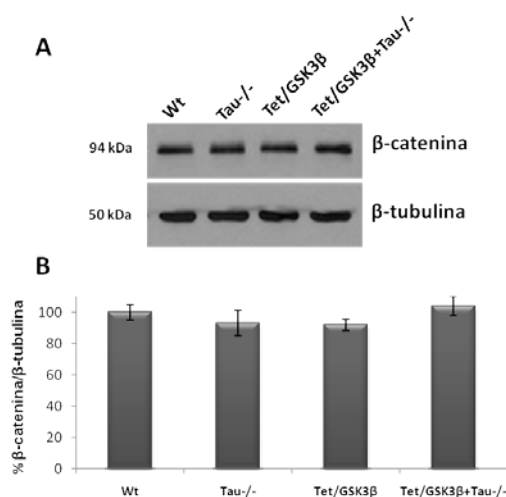
## 2.4. Estudio de otra diana de GSK3 $\beta$ : la $\beta$ -catenina

En los resultados previamente mostrados con el modelo triple transgénico Tet/GSK3 $\beta$ +Tau<sup>-/-</sup>, se ha observado que tau fosforilado parece contribuir parcialmente a la patología debida a la sobreexpresión de GSK3 $\beta$ . Sin embargo, se observó que, en ausencia de tau, la patología persistía en cierto grado. Por ello, decidimos estudiar algún otro sustrato de GSK3 $\beta$  que pudiese estar involucrado en la muerte neuronal.

La  $\beta$ -catenina es una proteína susceptible de ser fosforilada por GSK3 $\beta$ . Esta fosforilación conlleva la ubiquitinación de la  $\beta$ -catenina para ser degradada por el proteasoma. Cuando la célula recibe señales de supervivencia (Wnt), la  $\beta$ -catenina se libera del complejo en el que se encuentra junto con GSK3 $\beta$ , y se transloca al interior del núcleo, donde activa factores de transcripción que promueven la supervivencia celular.

### 2.4.1. Los niveles de $\beta$ -catenina nuclear están disminuidos en los ratones Tet/GSK3 $\beta$ +Tau<sup>-/-</sup>

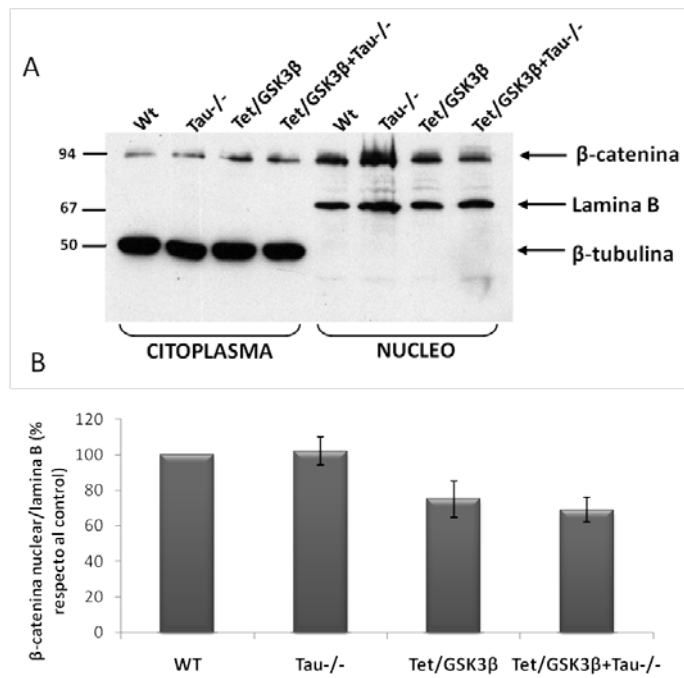
En primer lugar, se analizaron mediante *western blot* los niveles de  $\beta$ -catenina en extractos de hipocampo de ratones Tet/GSK3 $\beta$ +Tau<sup>-/-</sup> y sus controles silvestres, Tau<sup>-/-</sup> y Tet/GSK3 $\beta$ , pero no se encontraron diferencias significativas (Figura 36).



**Figura 36. Análisis de los niveles de  $\beta$ -catenina en los ratones Tet/GSK3 $\beta$ +Tau<sup>-/-</sup> y sus controles. (A)** Se detectó la  $\beta$ -catenina mediante *western blot* en extractos de hipocampo de ratones silvestres (Wt), Tau<sup>-/-</sup>, Tet/GSK3 $\beta$  y Tet/GSK3 $\beta$ +Tau<sup>-/-</sup>. **(B)** Cuantificación de los niveles de  $\beta$ -catenina normalizados frente a los niveles de  $\beta$ -tubulina.

Como ya se ha comentado, la  $\beta$ -catenina se puede translocar al núcleo, donde activa la transcripción de genes que promueven la supervivencia celular. Se quiso estudiar la localización subcelular de la  $\beta$ -catenina, para poder determinar posibles cambios en la proporción de  $\beta$ -catenina núcleo-citoplasma en los ratones Tet/GSK3 $\beta$ +Tau<sup>-/-</sup>. Para ello se llevó a cabo el fraccionamiento subcelular de extractos de hipocampo de las diferentes líneas de ratones. Se analizaron mediante *western blot* los niveles de  $\beta$ -catenina en las fracciones citosólica y nuclear, y se observó una disminución de los niveles de  $\beta$ -catenina en las fracciones nucleares de los ratones Tet/GSK3 $\beta$  y Tet/GSK3 $\beta$ +Tau<sup>-/-</sup> comparadas con sus hermanos silvestres y Tau<sup>-/-</sup> (Figura 37A). De hecho, la disminución fue algo mayor en los ratones Tet/GSK3 $\beta$ +Tau<sup>-/-</sup> que en los ratones Tet/GSK3 $\beta$  (Figura 37B), lo que se podría explicar por una posible competencia entre tau y  $\beta$ -catenina por GSK3 $\beta$  (Li *et al.*, 2007).

Esta disminución de los niveles de  $\beta$ -catenina nuclear en los ratones que sobrepresen GSK3 $\beta$  podría ser responsable de la muerte neuronal que persiste cuando se sobrepresen GSK3 $\beta$  en ausencia de tau.



**Figura 37. Disminución de los niveles de  $\beta$ -catenina nuclear en los ratones Tet/GSK3 $\beta$ +Tau<sup>-/-</sup>.** (A) Análisis mediante *western blot* de las fracciones citosólica y nuclear de extractos de hipocampo de ratones silvestres, Tau<sup>-/-</sup>, Tet/GSK3 $\beta$  y Tet/GSK3 $\beta$ +Tau<sup>-/-</sup>, con un anticuerpo que reconoce la  $\beta$ -catenina. Para comprobar la pureza de ambas fracciones se detectó la  $\beta$ -tubulina (marcador citoplasmático) y la lamina-B (marcador nuclear). (B) Cuantificación de los niveles de  $\beta$ -catenina en los núcleos. Valores normalizados frente a los de lamina-B.

---

# Discusión



En la enfermedad de Alzheimer, el proceso neurodegenerativo progresa en paralelo con la patología neurofibrilar de tau (Braak and Braak, 1991). Esta patología neurofibrilar, caracterizada por la presencia de agregados de tau en estado hiperfosforilado, no sólo se da en la EA sino en otras muchas enfermedades neurodegenerativas, denominadas en su conjunto tauopatías, algunas de las cuales tienen su origen en mutaciones en el gen de tau. Estas observaciones indican que tau podría tener un papel clave en el proceso neurodegenerativo. La cuestión es determinar si el papel de tau en la neurodegeneración se debe a una pérdida de sus funciones fisiológicas o a una ganancia de función tóxica de tau en estado hiperfosforilado y/o agregado.

En esta tesis doctoral hemos analizado estas dos posibilidades. Por una parte, para el estudio de la pérdida de función de tau, hemos utilizado un modelo de ratón deficiente en la proteína, y para el análisis de la toxicidad de tau fosforilado, hemos comparado dos modelos murinos con sobreexpresión de GSK3 $\beta$  en presencia y en ausencia de tau.

## 1. Consecuencias de la pérdida de función fisiológica de tau

El estudio comparativo de un modelo de ratón deficiente en tau y un modelo de ratón silvestre nos ha permitido determinar la implicación de tau en diversos procesos biológicos, así como los efectos que tiene la pérdida de función de tau en un sistema *in vivo*. A continuación discutiremos concretamente los resultados obtenidos en nuestro estudio y los procesos en los que parece estar implicada tau.

### 1.1. Implicación de tau en el transporte axonal

En nuestro estudio hemos demostrado que la acetilación de los microtúbulos es menor en ausencia de tau. Este resultado está de acuerdo con trabajos previos, en los que se observó un aumento de la acetilación de la tubulina en células transfectadas con cDNA de tau (Takemura *et al.*, 1992) y en un modelo transgénico con sobreexpresión de tau (Nuydens *et al.*, 2002).

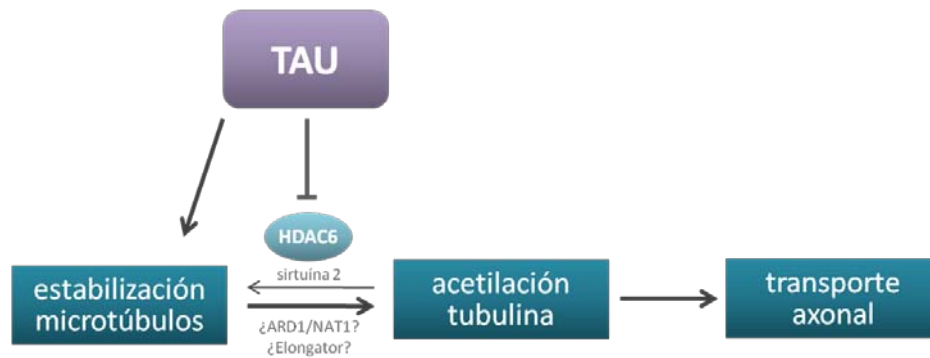
La HDAC6 es una histona-desacetilasa de clase II (Verdin *et al.*, 2003), capaz de actuar sobre la tubulina acetilada (Hubbert *et al.*, 2002; Matsuyama *et al.*, 2002). Se expresa en la mayoría de las neuronas, principalmente en las células de Purkinje (Southwood *et al.*, 2007). En otros experimentos realizados en nuestro laboratorio, publicados junto con los aquí mostrados, se confirmó la función de tau como inhibidor de la HDAC6, mediante ensayos de actividad desacetilasa. En estos ensayos se comprobó que al añadir tau a extractos de células humanas (HeLa), disminuía la actividad desacetilasa específica de la HDAC6 (Perez *et al.*, 2009).

En esta tesis hemos demostrado la interacción de la HDAC6 con tau en el ratón. En paralelo a la realización de este trabajo, se describió la interacción de la HDAC6 humana con tau, a través de la región de las repeticiones de tau y el dominio SE14 de la HDAC6 (Ding *et al.*, 2008). La HDAC6 murina sólo contiene una secuencia parcialmente homóloga al dominio SE14 (Yang and Seto, 2008), que demostramos que es suficiente para la interacción con tau murino.

La acetilación de la tubulina se propuso en un principio como un mecanismo que aumentaba la estabilidad de los microtúbulos (Cambray-Deakin and Burgoyne, 1987; LeDizet and Piperno, 1987; Piperno *et al.*, 1987). Sin embargo, posteriormente, se ha visto que la acetilación no causa una mayor estabilidad de los microtúbulos, sino que es consecuencia de ella (Palazzo *et al.*, 2003). La  $\alpha$ -tubulina sólo se acetila una vez que se encuentra polimerizada en los microtúbulos (Fukushima *et al.*, 2009), lo que implica que la tubulina acetilada sólo se podrá acumular en microtúbulos estables. Una de las estructuras celulares que se caracteriza por la alta estabilidad de los microtúbulos que la conforman es el axón neuronal que, a su vez se ha observado, está enriquecido en microtúbulos acetilados (Witte *et al.*, 2008). Además, diversos trabajos han demostrado que la acetilación de los microtúbulos favorece el transporte a lo largo del axón, ya que las proteínas motoras quinesina 1 (Dompierre *et al.*, 2007; Reed *et al.*, 2006) y el complejo dineína/dinactina (Dompierre *et al.*, 2007) se unen con mayor afinidad a los microtúbulos acetilados. En este sentido, se ha descrito que la inhibición de la HDAC6 mejora el transporte axonal de orgánulos como las mitocondrias (Chen *et al.*, 2010) o las vesículas de BDNF (Dompierre *et al.*, 2007) y de JIP (Reed *et al.*, 2006).

Estos datos sugieren que tau podría favorecer el transporte axonal por facilitar la acetilación de los microtúbulos, de forma directa, a través de la inhibición de la HDAC6, e indirectamente, debido a su efecto estabilizador de los microtúbulos del axón (Figura 38). De hecho, en un modelo murino de tauopatía, que presentaba acumulación de tau hiperfosforilado y de inclusiones filamentosas de tau, se rescató el defecto en el transporte axonal mediante administración de un compuesto estabilizador de los microtúbulos (Zhang *et al.*, 2005). En este sentido, las alteraciones en el transporte axonal observadas en la EA (Stokin *et al.*, 2005), se podrán deber a la pérdida de función de tau. Aunque, por otra parte, diversos trabajos han mostrado que el péptido  $\beta$ -amiloide provoca defectos en el transporte axonal (Decker *et al.*, 2010; Pigino *et al.*, 2009; Rui *et al.*, 2006). Sin embargo, un estudio reciente ha demostrado que estos defectos provocados por el A $\beta$  están mediados por tau (Vossel *et al.*, 2010), lo que apoya la implicación de tau en el transporte axonal.





**Figura 38. Diagrama esquemático del papel propuesto para tau en el transporte axonal.** Proponemos la implicación de tau en el proceso de acetilación de la tubulina por dos mecanismos: por la inhibición directa de la HDAC6 y por su función estabilizadora de los microtúbulos, que indirectamente favorece la acetilación de los mismos.

Además de su función como desacetilasa de la tubulina, la HDAC6 también está implicada en el proceso de autofagia, ya que forma parte del agresoma (Kawaguchi *et al.*, 2003). Las proteínas poliubiquitiladas se unen a la HDAC6 (Boyault *et al.*, 2006; Hook *et al.*, 2002; Seigneurin-Berny *et al.*, 2001), que a su vez interacciona con la proteína motora dineína, facilitando el transporte y la concentración de agregados en el agresoma (Kawaguchi *et al.*, 2003). Se ha observado que células deficientes en HDAC6 acumulan agregados de proteínas citoplasmáticas mal plegadas, por no poder formar el agresoma (Kawaguchi *et al.*, 2003). Además, se ha descrito que la supresión de la autofagia en modelos animales provoca neurodegeneración (Hara *et al.*, 2006; Komatsu *et al.*, 2006). En nuestro laboratorio se comprobó que tau también inhibe la función de la HDAC6 en la formación del agresoma (Perez *et al.*, 2009). En células HEK293 transfectadas con tau, la inhibición del proteasoma indujo en menor medida la autofagia que en células HEK293 que no expresaban tau. Una disminución de la autofagia desencadena la acumulación de agregados proteicos. En la EA, el aumento de tau libre en el citoplasma (Kopke *et al.*, 1993) facilitará su agregación en forma de PHF. A su vez, el incremento de tau podrá provocar la inhibición de la HDAC6, con la consiguiente inhibición del agresoma y la acumulación de agregados de tau.

## 1.2. Implicación de tau en el desarrollo neuronal

Con el fin de seguir profundizando en el estudio de las funciones de tau, realizamos un estudio comparativo de la expresión génica en el modelo de ratón deficiente en tau y ratones silvestres. La tecnología de los arrays de DNA permitió un análisis global de las respuestas neuronales a la deficiencia de tau *in vivo* y nos dio idea de alteraciones en la expresión génica que podrían ser compensatorias de la deficiencia de tau.

Se seleccionaron cuatro genes que variaban su expresión en el array para su posterior estudio. En los arrays genéticos se pueden dar falsos positivos, ya que tienen cierto grado de inespecificidad. La especificidad es mayor en el caso de aquellos genes para los que existen varias sondas de distintas secuencias en el chip, pero no será tan alta para genes que se detectan únicamente por una secuencia. Por esta razón, es necesario validar los resultados obtenidos en el array mediante técnicas más sensibles y específicas, como es la PCR cuantitativa. Además, en nuestro caso, la muestra que se analizó en el array fue pequeña (n=3 ratones por genotipo), por lo en la validación por PCR cuantitativa optamos por aumentar la muestra (n=9 ratones por genotipo) para disminuir el error de los resultados. De esta manera, mediante PCR cuantitativa sólo se validó el cambio de expresión en dos de los cuatro genes seleccionados (*smarce1* y *calb1*), lo que probablemente significa que los cambios registrados en el array para los otros dos genes (*lsm12* y *map1lc3*) eran falsos positivos.

A partir de este análisis determinamos que los ratones deficientes en tau sobreexpresan el gen *smarce1* en hipocampo. El gen *smarce1* codifica la proteína BAF57. En su estructura, BAF57 posee un dominio HMG (*high mobility group*; grupo de alta movilidad) que le permite interactuar con el DNA (Wang *et al.*, 1998). BAF57 está implicada en la regulación transcripcional, ya que forma parte del complejo remodelador de cromatina dependiente de ATP denominado SWI/SNF (*switch/sucrose non fermentable*) en mamíferos (Wang *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1998). Este complejo contiene una ATPasa central (BRG1 o BRM) y una serie variable de subunidades denominadas factores asociados a BRG-1 (BAF; *BRG-1 Associated Factors*). La remodelación de la cromatina mediada por los complejos SWI/SNF puede provocar tanto la represión como la activación de los genes (Liu *et al.*, 2001; Sudarsanam *et al.*, 2000), mediante la introducción de modificaciones no-covalentes en la cromatina.

Los complejos remodeladores de cromatina SWI/SNF están involucrados en el silenciamiento de genes neuronales por su asociación con el factor de transcripción REST (Battaglioli *et al.*, 2002; Ooi *et al.*, 2006). REST se une a una secuencia conservada de 23 pb en el DNA denominada RE1 (*repressor element 1*; elemento represor 1), bloqueando la expresión de genes específicos neuronales en las células no-neuronales (Ballas *et al.*, 2001; Chen *et al.*,

1998; Chong *et al.*, 1995; Schoenherr and Anderson, 1995). REST es una proteína modular que contiene dos dominios represores, a través de los que se asocia con sus co-represores mSin3A y CoREST, que a su vez reclutan desacetilasas de histonas para inhibir la expresión génica (Ballas *et al.*, 2001).

Se ha descrito la implicación de BAF57 en el silenciamiento de genes neuronales a través de su interacción con CoREST (Battaglioli *et al.*, 2002). En concreto, BAF57 se ha encontrado directamente asociada con el elemento RE1 del gen de canal de sodio Nav1.2 *in vivo*, y esta asociación sólo se da en presencia de REST (Battaglioli *et al.*, 2002). Este papel fundamental de BAF57 en la represión de genes neuronales coincide con lo observado en nuestro modelo de ratón Tau<sup>-/-</sup>, en el que se da un aumento de los niveles de BAF57 y un retraso en la adquisición del fenotipo neuronal (en cuanto a la elongación del axón) en cultivos de neuronas primarias. De hecho, se ha descrito que la sobreexpresión de REST en la médula espinal de embriones de pollo provoca errores en el avance de los axones para establecer las conexiones neuronales (Paquette *et al.*, 2000) y, en líneas celulares neuronales, bloquea el desarrollo de la adquisición de excitabilidad de los canales de sodio en respuesta a factores de crecimiento (Ballas *et al.*, 2001).

El silenciamiento de los genes neuronales mediado por REST parece ser fundamental en el proceso de neurogénesis, siendo los niveles de REST máximos en las células madre embrionarias (*stem cells*), y no expresándose REST en las neuronas maduras (Ballas *et al.*, 2005). En ausencia de REST, algunos genes con secuencia RE1 en su promotor se expresan a niveles máximos, como es el caso de la  $\beta$ III-tubulina. Otros genes, sin embargo, sólo se expresan a niveles bajos porque los co-represores CoREST y MeCP2 permanecen asociados a regiones mCpG de su promotor, inhibiendo en cierto grado su expresión. Dentro de estos genes se encuentra el gen de la calbindina, a cuyo promotor permanece unido CoREST, probablemente asociado a BAF57. De esta manera, la disminución de la calbindina observada en los ratones Tau<sup>-/-</sup> podría deberse al aumento de BAF57, que a través de su interacción con CoREST, lo reprimirá en mayor medida.

Existen varias posibilidades para explicar cómo la ausencia de tau podría afectar a la expresión del gen *smarce1*. La manipulación genética del ratón Tau<sup>-/-</sup> no parece ser responsable de esta alteración por varias razones. En primer lugar, a pesar de localizarse en la misma región del cromosoma 11, los genes *mapt* y *smarce1* se encuentran separados varios millones de pares de bases. Además, hemos comprobado que la expresión de otros genes, situados entre *mapt* y *smarce1*, no presenta alteraciones en el array genético. Por otra parte, no se observaron alteraciones en los niveles de proteína BAF57 en tejidos que no expresan tau.

Una posibilidad sería que tau interaccionase con algún factor de transcripción, de manera que la ausencia de tau alterase la expresión génica. Hasta el momento, entre las proteínas capaces de interaccionar con tau no se ha descrito ninguna que actúe como factor de transcripción. Sin embargo, hemos comprobado la interacción de tau con la calmodulina, proteína citoplasmática que, al unirse a calcio, se transloca al núcleo (Deisseroth *et al.*, 1996; Vendrell *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 2000), donde desencadena la fosforilación del factor de transcripción CREB (*cAMP-responsive element binding protein*) (Dash *et al.*, 1991; Sheng *et al.*, 1991). A través de este mecanismo, la ausencia de tau podría estar afectando a la expresión de *smarcel*.

Por otra parte, diversos trabajos muestran la presencia de una pequeña cantidad de tau en el núcleo celular (Brady *et al.*, 1995; Greenwood and Johnson, 1995; Loomis *et al.*, 1990; Rossi *et al.*, 2008; Sjoberg *et al.*, 2006; Thurston *et al.*, 1997) y se ha descrito la interacción de tau con el DNA *in vitro* (Hua and He, 2003; Hua *et al.*, 2003; Krylova *et al.*, 2005; Qu *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2008). Sin embargo, existe una gran controversia en cuanto a la función que podría estar realizando tau en el núcleo. Se ha sugerido que tau, durante la mitosis, podría estar implicada en la organización de los nucléolos (Sjoberg *et al.*, 2006) y en la estabilización de la cromatina para la correcta segregación génica (Rossi *et al.*, 2008). También se ha descrito que, al unirse al DNA, tau podría afectar a la organización nucleosomal, lo que daría lugar a alteraciones en la regulación de la transcripción y provocaría cambios en la expresión génica (Padmaraju *et al.*, 2010). En base a estas observaciones, cabría la posibilidad de que tau estuviese regulando la expresión del gen *smarcel* en el núcleo, bien directamente, mediante su unión al DNA, o indirectamente, a través de la interacción con otras proteínas.

### 1.3. Implicación de tau en la homeostasis del calcio intracelular

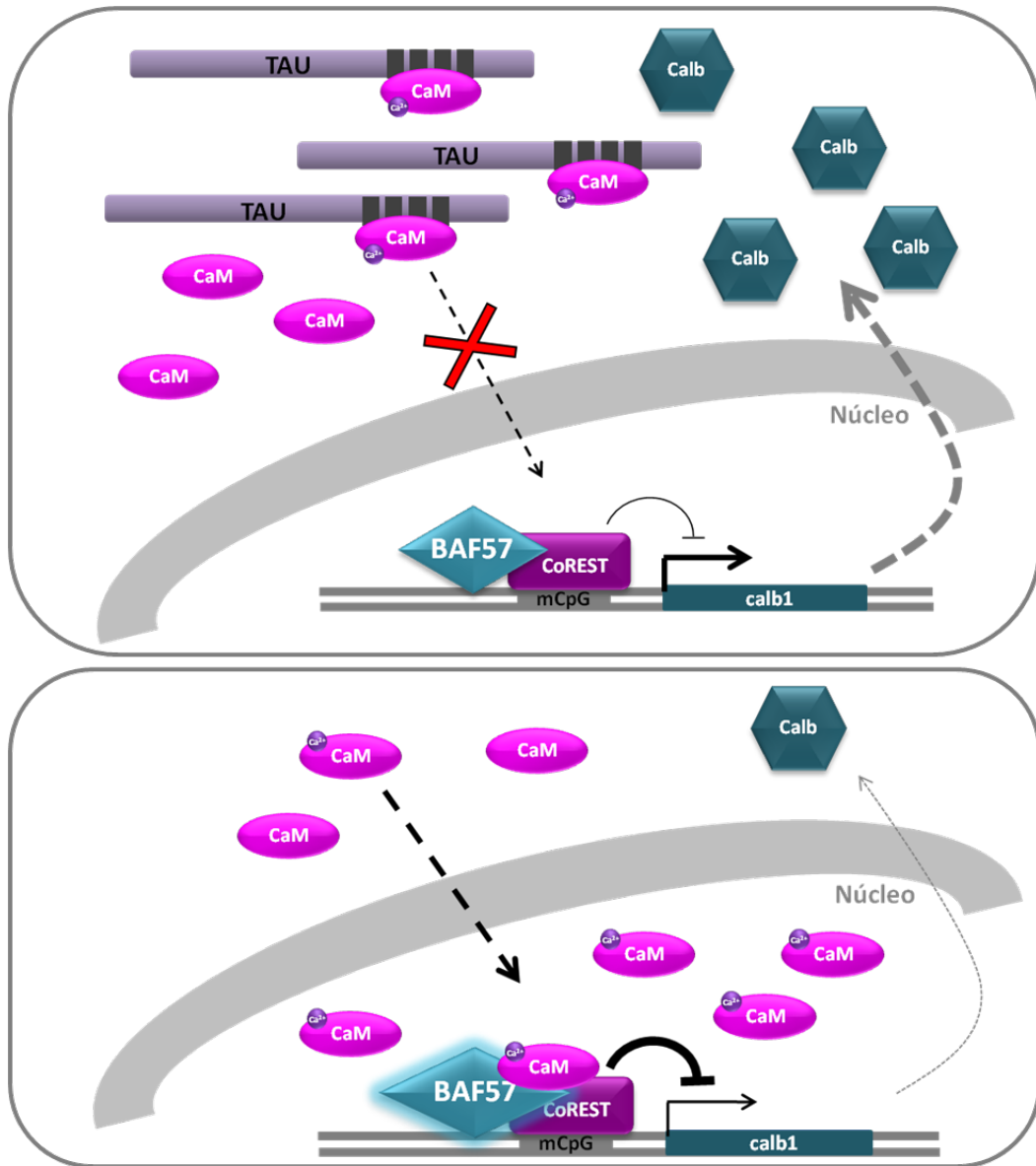
La calbindina y la calmodulina forman parte de la familia de proteínas de unión a calcio. Estas proteínas unen calcio con gran afinidad, regulando sus niveles intracelulares (Iacopino and Christakos, 1990), por lo que juegan un papel importante en la homeostasis del calcio en la célula. Los resultados obtenidos en nuestro estudio del ratón Tau<sup>-/-</sup> sugieren que la ausencia de tau podría alterar los niveles y/o la localización de estas proteínas.

Por un lado, el análisis transcripcional realizado reveló una menor expresión del gen de la calbindina en el hipocampo de los ratones Tau<sup>-/-</sup>. Este efecto de tau sobre la calbindina se corroboró en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, las cuales, tras su diferenciación, mostraron un incremento de tau (Haque *et al.*, 1999), acompañado de un aumento de los niveles de calbindina. Con respecto a la calmodulina, se constató su interacción con tau *in vivo* mediante inmunoprecipitación, previamente descrita *in vitro* mediante cromatografía de afinidad (Padilla *et al.*, 1990). Dado que la calmodulina se encuentra tanto en el núcleo como en el citoplasma, estudiamos si tau puede influir en su localización subcelular. Se observó que los niveles de calmodulina nuclear eran mayores en neuronas deficientes en tau respecto a neuronas silvestres. Además, el incremento de tau provocado por la diferenciación de las células SH-SY5Y, iba acompañado de una disminución de la calmodulina nuclear y un aumento de calmodulina en el citoplasma. Estos resultados sugieren un posible papel de tau secuestrando a la calmodulina en el citoplasma, lo que evitará la translocación de ésta al núcleo.

Recientemente, se ha descrito la interacción de la calmodulina con BAF57 en el núcleo celular, lo que produce la activación de BAF57 (Lai *et al.*, 2009). Como ya hemos comentado, la expresión del gen de la calbindina está regulada por CoREST, que a su vez interacciona con BAF57 (Ballas *et al.*, 2005). Estas observaciones podrían explicar lo observado en el proceso de diferenciación de las células SH-SY5Y, donde la disminución de la calmodulina nuclear provocaría una menor activación de BAF57, que resultaría en una menor represión del gen de la calbindina.

Teniendo en cuenta los datos anteriores, proponemos un mecanismo por el que parte de la calmodulina citoplasmática se encuentra interaccionando con tau, de manera que queda retenida en el citoplasma, y no se transloca al núcleo, a pesar de su unión a calcio. Dado que la calmodulina nuclear activa a BAF57, ésta se encontrará menos activa y, por tanto, reprimirá en menor medida al gen de la calbindina. En ausencia de tau, una mayor proporción de calmodulina se translocará al núcleo, lo que en último término dará lugar a una menor expresión del gen de la calbindina (Figura 39).

La calbindina y la calmodulina actúan como moléculas tamponadoras del calcio citoplasmático, uniendo seis y cuatro moléculas de calcio, respectivamente. En un array genético de otro modelo de ratón deficiente en tau, también se observó una disminución de la expresión de una proteína de unión a calcio, la hipocalcina, específica de neuronas (Oyama *et al.*, 2004). Un aumento excesivo del calcio citoplasmático puede desencadenar la degeneración y la muerte celular (Mattson and Barger, 1993; Orrenius and Nicotera, 1994; Trump and Berezsky, 1995), debido a la activación de numerosas proteasas, como la calpaína (Goll *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2007). Se ha descrito que las neuronas calbindina-positivas son resistentes a la adición de glutamato y a la degeneración inducida por hipoxia, eventos que provocan una subida del calcio intracelular (Mattson *et al.*, 1991; Phillips *et al.*, 1999), lo que confiere un papel protector a la calbindina (Geula *et al.*, 2003; Mattson *et al.*, 1991; Rintoul *et al.*, 2001; Scharfman and Schwartzkroin, 1989). En esta tesis hemos comprobado que las células con mayores niveles de calbindina y calmodulina, es decir, las SH-SY5Y diferenciadas, presentaban un menor aumento del calcio intracelular ante una señal despolarizante como es el KCl. Una posible explicación a esta diferencia en los niveles de calcio intracelular podría ser la mayor concentración de proteínas de unión a calcio en el citoplasma de las células diferenciadas, que tamponase rápidamente el calcio que entra en la célula, de manera que el nivel máximo de calcio intracelular no alcanzase los niveles que presentan las células con menor cantidad de estas proteínas. Este menor aumento del calcio intracelular tras la diferenciación de las células SH-SY5Y también se ha observado cuando se induce la entrada de calcio mediante la adición de péptido A $\beta$  (Cecchi *et al.*, 2008).



**Figura 39.** Esquema del mecanismo propuesto que relaciona a tau con las proteínas de unión a calcio: calbindina y calmodulina. *Panel superior:* la interacción de la calmodulina con tau evita su translocación al núcleo, lo que conlleva una menor activación de BAF57 y, en consecuencia, una menor represión del gen de la calbindina. *Panel inferior:* en ausencia de tau, una mayor proporción de calmodulina se transloca al núcleo, donde activa a BAF57 y aumenta la represión del gen de la calbindina, disminuyendo, por tanto, los niveles de la proteína. El círculo morado representa el calcio. (CaM: calmodulina; Calb: calbindina)

## 2. Función tóxica de tau en estado hiperfosforilado

En las tauopatías, la proteína tau aparece formando polímeros fibrilares denominados PHF (Kidd, 1963) los cuales, cuando agregan, constituyen los NFT (Alzheimer, 1907; Alzheimer *et al.*, 1995). En estos agregados, tau se encuentra en estado hiperfosforilado (Goedert *et al.*, 1992; Grundke-Iqbal *et al.*, 1986a; Grundke-Iqbal *et al.*, 1986b). Existe una enorme controversia en cuanto a la posible ganancia de función tóxica de tau en estado hiperfosforilado o en estado agregado. Varios trabajos han mostrado una asociación entre neurotoxicidad e hiperfosforilación de tau, en ausencia de polimerización de tau (Fath *et al.*, 2002; Wittmann *et al.*, 2001). Esta toxicidad de tau fosforilado frente a los NFT se comprobó en un modelo transgénico que sobreexpresaba tau con una mutación descrita en FTDP-17 (P301L) bajo un promotor condicional regulado por el sistema *tet-off* (Santacruz *et al.*, 2005). Cuando se suprimió la expresión del transgén en este modelo, cesaron los déficits cognitivos y la muerte neuronal, a pesar de que se seguían acumulando NFT, lo que implica un papel tóxico de tau soluble o de estadios intermedios de agregación, pero no de los NFT.

Para estudiar la posible toxicidad de tau en estado hiperfosforilado, generamos un modelo de ratón que sobreexpresaba GSK3 $\beta$  en un fondo genético deficiente en tau. Nuestro estudio se basó en la comparación de dos modelos de ratón que sobreexpresaban GSK3 $\beta$ , en presencia (Tet/GSK3 $\beta$ ) y en ausencia de tau (Tet/GSK3 $\beta$ +Tau<sup>-/-</sup>), que a su vez se refirieron a un control con genotipo silvestre, y a un control Tau<sup>-/-</sup> que determinase si los cambios observados se debían meramente a la deficiencia de tau, independientemente de su estado de fosforilación. Se comprobó que en el hipocampo del ratón Tet/GSK3 $\beta$  aumentaba notoriamente la fosforilación de tau por GSK3 $\beta$ , en el epítipo reconocido por el anticuerpo PHF1. De esta manera, el ratón Tet/GSK3 $\beta$  se diferencia del Tet/GSK3 $\beta$ +Tau<sup>-/-</sup> fundamentalmente en la gran cantidad de tau en estado fosforilado que presenta.

Para estudiar las posibles deficiencias cognitivas debidas a la eliminación de tau, se realizaron dos tests de comportamiento en los ratones. En el Test de Morris, los ratones Tet/GSK3 $\beta$  presentaron un déficit de memoria estadísticamente significativo al tercer día de test, comparados con el control silvestre, lo que se ajusta a resultados previamente descritos (Hernandez *et al.*, 2002). Sin embargo, los ratones Tet/GSK3 $\beta$ +Tau<sup>-/-</sup> presentaron una situación intermedia entre los Tet/GSK3 $\beta$  y los silvestres, que no llegó a ser significativa. En cuanto a los ratones Tau<sup>-/-</sup>, realizaron el test con normalidad, como ya se ha descrito (Roberson *et al.*, 2007). Estos resultados parecen indicar que la ausencia de tau mejora a nivel cognitivo el fenotipo patológico derivado de la sobreexpresión de GSK3 $\beta$ , o lo que es lo mismo, que tau fosforilado es



responsable en parte del déficit cognitivo que presentan los ratones Tet/GSK3 $\beta$ . Este resultado está de acuerdo con un trabajo en el que se describió que la ausencia de tau en un modelo de ratón que sobreexpresa APP mutado, mejoraba el déficit de memoria espacial evaluado mediante el test de Morris (Roberson *et al.*, 2007).

No obstante, en el test de reconocimiento del objeto los tres grupos de animales transgénicos (Tau<sup>-/-</sup>, Tet/GSK3 $\beta$  y Tet/GSK3 $\beta$ +Tau<sup>-/-</sup>) presentaron un menor índice de memoria respecto a los ratones silvestres. El déficit cognitivo de los ratones Tet/GSK3 $\beta$  había sido descrito previamente (Engel *et al.*, 2006a). Sin embargo, el resultado obtenido para los ratones Tau<sup>-/-</sup> no coincide con el obtenido en el test de Morris. En este sentido, cabe señalar que estos dos test evalúan distintos tipos de memoria. El test de reconocimiento del objeto evalúa memoria a corto plazo, puesto que el intervalo entre la fase de familiarización y la prueba de reconocimiento es de tan sólo 2 horas. De hecho, se ha descrito que el test de reconocimiento del objeto no se puede llevar a cabo con un intervalo superior a 4 horas (Bertaina-Anglade *et al.*, 2006; Sik *et al.*, 2003). Sin embargo, el test de Morris evalúa la memoria espacial a las 24 horas, durante cuatro días consecutivos, lo que supone memoria a más largo plazo.

El análisis de la muerte neuronal y la gliosis reactiva asociada a ella reveló, en términos globales, una mayor muerte y gliosis en el hipocampo de los ratones que sobreexpresaban GSK3 $\beta$ , tanto en presencia como en ausencia de tau, respecto a los ratones silvestres y Tau<sup>-/-</sup>. Sin embargo, centrándonos en los ratones Tet/GSK3 $\beta$  y Tet/GSK3 $\beta$ +Tau<sup>-/-</sup>, observamos que, tanto la muerte por apoptosis como la gliosis reactiva, fueron algo mayores en los ratones Tet/GSK3 $\beta$ . Esta diferencia, a pesar de no ser estadísticamente significativa, parece indicar que, en ausencia de tau, disminuía en cierto grado la muerte neuronal y la gliosis derivadas de la sobreexpresión de GSK3 $\beta$ . Dado que el modelo Tau<sup>-/-</sup> mostró niveles de muerte y gliosis similares a los de los ratones silvestres, las diferencias observadas entre los ratones Tet/GSK3 $\beta$ +Tau<sup>-/-</sup> y Tet/GSK3 $\beta$  se deberán a la presencia de tau hiperfosforilado. Este resultado coincide con lo observado en varios modelos celulares en los que la ausencia de tau atenúa la muerte celular inducida por condiciones de estrés, tales como el choque térmico o la adición de A $\beta$  extracelular (Miao *et al.*, 2010; Rapoport *et al.*, 2002).

Se ha descrito que los ratones Tet/GSK3 $\beta$  con la edad desarrollan atrofia del giro dentado del hipocampo (Engel *et al.*, 2006b). Cuando se analizó el volumen del giro dentado en animales envejecidos, los ratones Tau<sup>-/-</sup> presentaron un volumen del giro dentado similar al de los ratones silvestres, mientras que se observó atrofia en el giro dentado tanto de los ratones Tet/GSK3 $\beta$  como de los Tet/GSK3 $\beta$ +Tau<sup>-/-</sup>, aunque en estos últimos no fue tan acusada. Sin embargo, en el caso de animales adultos jóvenes, los ratones Tet/GSK3 $\beta$ +Tau<sup>-/-</sup> presentaron un

volumen del giro dentado similar al de los ratones silvestres y  $\text{Tau}^{-/-}$ , mientras que los  $\text{Tet/GSK3}\beta$  mostraron un volumen disminuido respecto a los demás genotipos. Este resultado sugiere que la ausencia de tau fosforilado está retrasando la atrofia del giro dentado debida a la sobreexpresión de  $\text{GSK3}\beta$ .

En conjunto, los datos obtenidos en el estudio del modelo de ratón  $\text{Tet/GSK3}\beta+\text{Tau}^{-/-}$  parecen indicar que la causa de la neurodegeneración en el giro dentado del hipocampo es la sobreexpresión de  $\text{GSK3}\beta$ , y que tau fosforilado participa en el proceso acelerando su progresión. Esto está de acuerdo con lo descrito en otro modelo transgénico desarrollado en nuestro laboratorio, en el que se sobreexpresó tau con tres mutaciones asociadas a FTDP-17 (G272V, P301L, R406W) en el modelo  $\text{Tet/GSK3}\beta$ , y en el que se vio que la atrofia del giro dentado estaba acelerada con respecto al modelo  $\text{Tet/GSK3}\beta$  (Engel *et al.*, 2006b). Además, en un modelo de mosca, en el que se sobreexpresaron la proteína tau humana silvestre y *shaggy/zeste white-3* (homólogo de  $\text{GSK3}\beta$  en mosca), también se observó neurodegeneración e hiperfosforilación de tau sin formación de agregados (Jackson *et al.*, 2002).

En base a estas observaciones, proponemos que la hiperfosforilación de tau resulta en una ganancia de función tóxica, que acelera el proceso neurodegenerativo inducido por la sobreexpresión de  $\text{GSK3}\beta$  (Figura 40). En la enfermedad de Alzheimer, en la que se ha descrito una mayor actividad de  $\text{GSK3}\beta$  (Pei *et al.*, 1997; Yamaguchi *et al.*, 1996) y una menor actividad de diversas fosfatasas (Gong *et al.*, 1995; Liang *et al.*, 2008), la hiperfosforilación de tau podría actuar acelerando la progresión de la enfermedad. Esta función tóxica de tau hiperfosforilado podrá ser consecuencia de su interacción con otras MAP (Alonso *et al.*, 1996; Alonso *et al.*, 1994; Alonso *et al.*, 1997), que provoca el desensamblaje de los microtúbulos (Alonso *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2007a).

Dado que en ausencia de tau persistían en cierto grado tanto la atrofia del giro dentado en ratones adultos, como la muerte neuronal por apoptosis y la gliosis reactiva en animales jóvenes, decidimos buscar otras dianas de  $\text{GSK3}\beta$  que pudiesen estar implicadas en muerte neuronal. Este es el caso de la  $\beta$ -catenina, proteína capaz de promover la supervivencia celular mediante la activación de determinados factores de transcripción en el núcleo celular.  $\text{GSK3}\beta$  fosforila a la  $\beta$ -catenina provocando su degradación, lo que evita su translocación al núcleo.



**Figura 40. Diagrama esquemático que muestra la relación entre la cantidad de tau fosforilado y la degeneración del giro dentado.** En los ratones Tet/GSK3 $\beta$  y Tet/GSK3 $\beta$ +Tau<sup>VLW</sup>, el volumen del giro dentado es inversamente proporcional a la cantidad de tau fosforilado (P-tau) presente. Nuestro modelo Tet/GSK3 $\beta$ +Tau<sup>-/-</sup> demuestra que, en ausencia de tau fosforilado, la atrofia del giro dentado inducida por la sobreexpresión de GSK3 $\beta$  se reduce.

Comprobamos que la  $\beta$ -catenina nuclear se encontraba disminuida en los ratones que sobreexpresaban GSK3 $\beta$ , tanto en presencia como en ausencia de tau. De hecho, los niveles de  $\beta$ -catenina en el núcleo de los ratones Tet/GSK3 $\beta$ +Tau<sup>-/-</sup> parecieron algo menores que en los ratones Tet/GSK3 $\beta$ , lo que se podría explicar por un efecto competitivo entre tau y la  $\beta$ -catenina por GSK3 $\beta$  (Li *et al.*, 2007b). Esta disminución de los niveles de  $\beta$ -catenina nuclear cuando se sobreexpresa GSK3 $\beta$  confirma lo observado en estudios realizados en el tálamo de ratones adultos, donde se da localización nuclear de la  $\beta$ -catenina, coincidiendo con una menor expresión de GSK3 $\beta$  en esta región (Lucas *et al.*, 2001). Sin embargo, en otro modelo de ratón con una menor actividad de GSK3 $\beta$ , no se encontró acumulación de  $\beta$ -catenina nuclear, lo que los autores explicaron por un reemplazamiento de la actividad de GSK3 $\beta$  por GSK3 $\alpha$  (Doble and Woodgett, 2003). La disminución de la  $\beta$ -catenina en el núcleo resultará en una menor activación de la transcripción de genes necesarios para la supervivencia celular lo que, en último término, podrá conducir a la muerte de la célula. De esta manera, sugerimos que la fosforilación de la  $\beta$ -catenina es uno de los mecanismos responsables de la muerte neuronal inducida por la sobreexpresión de GSK3 $\beta$ , sin descartar que existan otros sustratos de GSK3 $\beta$  implicados en el proceso.

En base a los resultados obtenidos en esta tesis, proponemos que, en las tauopatías, tanto la pérdida de la función fisiológica de tau como su ganancia de función tóxica contribuirán a la patología. El estudio del modelo de ratón deficiente en tau nos ha permitido establecer la implicación de tau en diversos procesos celulares como el transporte axonal, el desarrollo neuronal o la homeostasis del calcio intracelular, que se verán afectados ante la pérdida de función de la proteína. Por otra parte, la ausencia de tau en un modelo con sobreexpresión de GSK3 $\beta$  parece haber retrasado la progresión de la neurodegeneración inducida por la sobreexpresión de GSK3 $\beta$ , lo que sugiere una ganancia de función tóxica de tau en su estado hiperfosforilado.

---

# Conclusiones



1. La proteína tau interacciona con la histona desacetilasa 6 en el ratón, observándose en los ratones deficientes en tau una disminución de los niveles de tubulina acetilada. En base a estos resultados, proponemos una nueva función de tau como inhibidor de la HDAC6.
2. El análisis transcripcional de extractos de hipocampo de los ratones Tau<sup>-/-</sup> revela un aumento de la expresión génica de *smarce1* que se traduce en un incremento de los niveles de la proteína que codifica, BAF57. Al ser una proteína implicada en represión de genes neuronales, el aumento de BAF57 podría explicar el retraso en el desarrollo neuronal observado en el modelo de ratón deficiente en tau.
3. Los ratones Tau<sup>-/-</sup> presentan una disminución de la expresión de calbindina. Esta disminución puede ser debida a la mayor represión del gen de la calbindina como consecuencia del aumento de BAF57.
4. En células SH-SY5Y diferenciadas, el incremento de los niveles de tau fue acompañado del aumento de calbindina y calmodulina, lo que sugiere un mejor tamponamiento del calcio intracelular.
5. Las células SH-SY5Y diferenciadas muestran una disminución de la calmodulina nuclear. Proponemos que, en este modelo, la calmodulina está siendo secuestrada en el citoplasma debido a su interacción con tau.
6. En ausencia de tau fosforilado disminuye la gliosis reactiva, la muerte neuronal y las alteraciones cognitivas inducidas por la sobreexpresión de GSK3 $\beta$ . El inicio retardado de la neurodegeneración en ausencia de tau sugiere un efecto tóxico de tau en estado hiperfosforilado, que acelera el proceso neurodegenerativo derivado de la sobreexpresión de GSK3 $\beta$ .
7. La disminución de la  $\beta$ -catenina nuclear en los modelos de ratón que sobreexpresan GSK3 $\beta$  podría ser responsable de la neurodegeneración remanente en ausencia de tau.





---

# Bibliografía



- Aizawa, H., Kawasaki, H., Murofushi, H., Kotani, S., Suzuki, K., Sakai, H., 1989. A common amino acid sequence in 190-kDa microtubule-associated protein and tau for the promotion of microtubule assembly. *J Biol Chem.* 264, 5885-90.
- Aizenstein, H. J., Nebes, R. D., Saxton, J. A., Price, J. C., Mathis, C. A., Tsopelas, N. D., Ziolkowski, S. K., James, J. A., Snitz, B. E., Houck, P. R., Bi, W., Cohen, A. D., Lopresti, B. J., DeKosky, S. T., Halligan, E. M., Klunk, W. E., 2008. Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly. *Arch Neurol.* 65, 1509-17.
- Akiyama, H., Gotoh, A., Shin, R. W., Koga, T., Ohashi, T., Sakamoto, W., Harada, A., Arai, H., Sawa, A., Uchida, C., Uchida, T., 2009. A novel role for hGas7b in microtubular maintenance: possible implication in tau-associated pathology in Alzheimer disease. *J Biol Chem.* 284, 32695-9.
- Albrecht, M., Lengauer, T., 2004. Novel Sm-like proteins with long C-terminal tails and associated methyltransferases. *FEBS Lett.* 569, 18-26.
- 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, 6923-8.
- Alonso, A. C., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 1996. Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat Med.* 2, 783-7.
- Alonso, A. C., Zaidi, T., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 1994. Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 5562-6.
- Alonso, A. D., Grundke-Iqbal, I., Barra, H. S., Iqbal, K., 1997. Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 298-303.
- Alonso Adel, C., Mederlyova, A., Novak, M., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 2004. Promotion of hyperphosphorylation by frontotemporal dementia tau mutations. *J Biol Chem.* 279, 34873-81.
- Alvarez, G., Munoz-Montano, J. R., Satrustegui, J., Avila, J., Bogonez, E., Diaz-Nido, J., 1999. Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. *FEBS Lett.* 453, 260-4.
- Alzheimer, A., 1907. Uber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Z Psychiat.* 64, 146-148.
- Alzheimer, A., Stelzmann, R. A., Schnitzlein, H. N., Murtagh, F. R., 1995. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Uber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin Anat.* 8, 429-31.
- Allen, B., Ingram, E., Takao, M., Smith, M. J., Jakes, R., Virdee, K., Yoshida, H., Holzer, M., Craxton, M., Emson, P. C., Atzori, C., Migheli, A., Crowther, R. A., Ghetti, B., Spillantini, M. G., Goedert, M., 2002. Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein. *J Neurosci.* 22, 9340-51.
- Amos, L. A., 2004. Microtubule structure and its stabilisation. *Org Biomol Chem.* 2, 2153-60.
- Andreadis, A., Broderick, J. A., Kosik, K. S., 1995. Relative exon affinities and suboptimal splice site signals lead to non-equivalence of two cassette exons. *Nucleic Acids Res.* 23, 3585-93.
- Arrasate, M., Perez, M., Armas-Portela, R., Avila, J., 1999. Polymerization of tau peptides into fibrillar structures. The effect of FTDP-17 mutations. *FEBS Lett.* 446, 199-202.
- Arrasate, M., Perez, M., Avila, J., 2000. Tau dephosphorylation at tau-1 site correlates with its association to cell membrane. *Neurochem Res.* 25, 43-50.
- Arrasate, M., Perez, M., Valpuesta, J. M., Avila, J., 1997. Role of glycosaminoglycans in determining the helicity of paired helical filaments. *Am J Pathol.* 151, 1115-22.
- Arriagada, P. V., Growdon, J. H., Hedley-Whyte, E. T., Hyman, B. T., 1992a. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology.* 42, 631-9.
- Arriagada, P. V., Marzloff, K., Hyman, B. T., 1992b. Distribution of Alzheimer-type pathologic changes in nondemented elderly individuals matches the pattern in Alzheimer's disease. *Neurology.* 42, 1681-8.
- Avila, J., Gomez de Barreda, E., Engel, T., Lucas, J. J., Hernandez, F., 2010. Tau phosphorylation in hippocampus results in toxic gain-of-function. *Biochem Soc Trans.* 38, 977-80.
- Avila, J., Lucas, J. J., Perez, M., Hernandez, F., 2004. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev.* 84, 361-84.
- Baas, P. W., Pienkowski, T. P., Kosik, K. S., 1991. Processes induced by tau expression in Sf9 cells have an axon-like microtubule organization. *J Cell Biol.* 115, 1333-44.
- Ballas, N., Battaglioli, E., Atouf, F., Andres, M. E., Chenoweth, J., Anderson, M. E., Burger, C., Moniwa, M., Davie, J. R., Bowers, W. J., Federoff, H. J., Rose, D. W., Rosenfeld, M. G., Brehm, P., Mandel, G., 2001. Regulation of neuronal traits by a novel transcriptional complex. *Neuron.* 31, 353-65.

- Ballas, N., Grunseich, C., Lu, D. D., Speh, J. C., Mandel, G., 2005. REST and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogenesis. *Cell*. 121, 645-57.
- Ballatore, C., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., 2007. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci*. 8, 663-72.
- Bancher, C., Brunner, C., Lassmann, H., Budka, H., Jellinger, K., Wiche, G., Seitelberger, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Wisniewski, H. M., 1989. Accumulation of abnormally phosphorylated tau precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain Res*. 477, 90-9.
- Banker, G. A., Cowan, W. M., 1977. Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res*. 126, 397-42.
- Battaglioli, E., Andres, M. E., Rose, D. W., Chenoweth, J. G., Rosenfeld, M. G., Anderson, M. E., Mandel, G., 2002. REST repression of neuronal genes requires components of the hSWI.SNF complex. *J Biol Chem*. 277, 41038-45.
- Baudier, J., Cole, R. D., 1987. Phosphorylation of tau proteins to a state like that in Alzheimer's brain is catalyzed by a calcium/calmodulin-dependent kinase and modulated by phospholipids. *J Biol Chem*. 262, 17577-83.
- Benussi, L., Ghidoni, R., Paterlini, A., Nicosia, F., Alberici, A. C., Signorini, S., Barbiero, L., Binetti, G., 2005. Interaction between tau and alpha-synuclein proteins is impaired in the presence of P301L tau mutation. *Exp Cell Res*. 308, 78-84.
- Bertaina-Anglade, V., Enjuanes, E., Morillon, D., Drieu la Rochelle, C., 2006. The object recognition task in rats and mice: a simple and rapid model in safety pharmacology to detect amnesic properties of a new chemical entity. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 54, 99-105.
- Bertos, N. R., Gilquin, B., Chan, G. K., Yen, T. J., Khochbin, S., Yang, X. J., 2004. Role of the tetradecapeptide repeat domain of human histone deacetylase 6 in cytoplasmic retention. *J Biol Chem*. 279, 48246-54.
- Biedler, J. L., Roffler-Tarlov, S., Schachner, M., Freedman, L. S., 1978. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res*. 38, 3751-7.
- Biernat, J., Gustke, N., Drewes, G., Mandelkow, E. M., Mandelkow, E., 1993. Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron*. 11, 153-63.
- Biernat, J., Mandelkow, E. M., 1999. The development of cell processes induced by tau protein requires phosphorylation of serine 262 and 356 in the repeat domain and is inhibited by phosphorylation in the proline-rich domains. *Mol Biol Cell*. 10, 727-40.
- Binder, L. I., Frankfurter, A., Rebhun, L. I., 1985. The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol*. 101, 1371-8.
- Bird, T. D., Nochlin, D., Poorkaj, P., Cherrier, M., Kaye, J., Payami, H., Peskind, E., Lampe, T. H., Nemens, E., Boyer, P. J., Schellenberg, G. D., 1999. A clinical pathological comparison of three families with frontotemporal dementia and identical mutations in the tau gene (P301L). *Brain*. 122 ( Pt 4), 741-56.
- Black, M. M., Slaughter, T., Moshiach, S., Obrocka, M., Fischer, I., 1996. Tau is enriched on dynamic microtubules in the distal region of growing axons. *J Neurosci*. 16, 3601-19.
- Blackwood, D. H., Fordyce, A., Walker, M. T., St Clair, D. M., Porteous, D. J., Muir, W. J., 2001. Schizophrenia and affective disorders-- cosegregation with a translocation at chromosome 1q42 that directly disrupts brain-expressed genes: clinical and P300 findings in a family. *Am J Hum Genet*. 69, 428-33.
- Boyault, C., Gilquin, B., Zhang, Y., Rybin, V., Garman, E., Meyer-Klaucke, W., Matthias, P., Muller, C. W., Khochbin, S., 2006. HDAC6-p97/VCP controlled polyubiquitin chain turnover. *Embo J*. 25, 3357-66.
- Braak, H., Braak, E., 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*. 82, 239-59.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72, 248-54.
- Brady, R. M., Zinkowski, R. P., Binder, L. I., 1995. Presence of tau in isolated nuclei from human brain. *Neurobiol Aging*. 16, 479-86.
- Brandt, R., Leger, J., Lee, G., 1995. Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol*. 131, 1327-40.
- Bre, M. H., Karsenti, E., 1990. Effects of brain microtubule-associated proteins on microtubule dynamics and the nucleating activity of centrosomes. *Cell Motil Cytoskeleton*. 15, 88-98.

- Brion, J. P., Smith, C., Couck, A. M., Gallo, J. M., Anderton, B. H., 1993. Developmental changes in tau phosphorylation: fetal tau is transiently phosphorylated in a manner similar to paired helical filament-tau characteristic of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 61, 2071-80.
- Brownlees, J., Irving, N. G., Brion, J. P., Gibb, B. J., Wagner, U., Woodgett, J., Miller, C. C., 1997. Tau phosphorylation in transgenic mice expressing glycogen synthase kinase-3beta transgenes. *Neuroreport.* 8, 3251-5.
- Buee, L., Bussiere, T., Buee-Scherrer, V., Delacourte, A., Hof, P. R., 2000. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev.* 33, 95-130.
- Bugiani, O., Murrell, J. R., Giaccone, G., Hasegawa, M., Ghigo, G., Tabaton, M., Morbin, M., Primavera, A., Carella, F., Solaro, C., Grisoli, M., Savoirdo, M., Spillantini, M. G., Tagliavini, F., Goedert, M., Ghetti, B., 1999. Frontotemporal dementia and corticobasal degeneration in a family with a P301S mutation in tau. *J Neuropathol Exp Neurol.* 58, 667-77.
- Caceres, A., Kosik, K. S., 1990. Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature.* 343, 461-3.
- Caceres, A., Potrebic, S., Kosik, K. S., 1991. The effect of tau antisense oligonucleotides on neurite formation of cultured cerebellar macroneurons. *J Neurosci.* 11, 1515-23.
- Cambray-Deakin, M. A., Burgoyne, R. D., 1987. Acetylated and detyrosinated alpha-tubulins are co-localized in stable microtubules in rat meningeal fibroblasts. *Cell Motil Cytoskeleton.* 8, 284-91.
- Carlier, M. F., Simon, C., Cassoly, R., Pradel, L. A., 1984. Interaction between microtubule-associated protein tau and spectrin. *Biochimie.* 66, 305-11.
- Carlsson, C. M., 2010. Type 2 diabetes mellitus, dyslipidemia, and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 20, 711-22.
- Caruso, A., Motolese, M., Iacovelli, L., Caraci, F., Copani, A., Nicoletti, F., Terstappen, G. C., Gaviraghi, G., Caricasole, A., 2006. Inhibition of the canonical Wnt signaling pathway by apolipoprotein E4 in PC12 cells. *J Neurochem.* 98, 364-71.
- Cecchi, C., Pensalfini, A., Liguri, G., Baglioni, S., Fiorillo, C., Guadagna, S., Zampagni, M., Formigli, L., Nosi, D., Stefani, M., 2008. Differentiation increases the resistance of neuronal cells to amyloid toxicity. *Neurochem Res.* 33, 2516-31.
- Cedazo-Minguez, A., Popescu, B. O., Blanco-Millan, J. M., Akterin, S., Pei, J. J., Winblad, B., Cowburn, R. F., 2003. Apolipoprotein E and beta-amyloid (1-42) regulation of glycogen synthase kinase-3beta. *J Neurochem.* 87, 1152-64.
- Citron, M., Diehl, T. S., Gordon, G., Biere, A. L., Seubert, P., Selkoe, D. J., 1996. Evidence that the 42- and 40-amino acid forms of amyloid beta protein are generated from the beta-amyloid precursor protein by different protease activities. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 13170-5.
- Cleveland, D. W., Hwo, S. Y., Kirschner, M. W., 1977a. Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J Mol Biol.* 116, 227-47.
- Cleveland, D. W., Hwo, S. Y., Kirschner, M. W., 1977b. Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol.* 116, 207-25.
- Cohen, P., Nimmo, H. G., Proud, C. G., 1978. How does insulin stimulate glycogen synthesis? *Biochem Soc Symp.* 69-95.
- Coon, K. D., Myers, A. J., Craig, D. W., Webster, J. A., Pearson, J. V., Lince, D. H., Zismann, V. L., Beach, T. G., Leung, D., Bryden, L., Halperin, R. F., Marlowe, L., Kaleem, M., Walker, D. G., Ravid, R., Heward, C. B., Rogers, J., Papassotiropoulos, A., Reiman, E. M., Hardy, J., Stephan, D. A., 2007. A high-density whole-genome association study reveals that APOE is the major susceptibility gene for sporadic late-onset Alzheimer's disease. *J Clin Psychiatry.* 68, 613-8.
- Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., Roses, A. D., Haines, J. L., Pericak-Vance, M. A., 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science.* 261, 921-3.
- Correas, I., Diaz-Nido, J., Avila, J., 1992. Microtubule-associated protein tau is phosphorylated by protein kinase C on its tubulin binding domain. *J Biol Chem.* 267, 15721-8.
- Correas, I., Padilla, R., Avila, J., 1990. The tubulin-binding sequence of brain microtubule-associated proteins, tau and MAP-2, is also involved in actin binding. *Biochem J.* 269, 61-4.
- Couchie, D., Mavilia, C., Georgieff, I. S., Liem, R. K., Shelanski, M. L., Nunez, J., 1992. Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 4378-81.
- Creppe, C., Malinouskaya, L., Volvert, M. L., Gillard, M., Close, P., Malaise, O., Laguesse, S., Cornez, I., Rahmouni, S., Ormenese, S., Belachew, S., Malgrange, B., Chapelle, J. P., Siebenlist, U., Moonen, G., Chariot, A., Nguyen, L., 2009. Elongator controls the migration and differentiation of cortical neurons through acetylation of alpha-tubulin. *Cell.* 136, 551-64.

- Cross, D. C., Munoz, J. P., Hernandez, P., Maccioni, R. B., 2000. Nuclear and cytoplasmic tau proteins from human nonneuronal cells share common structural and functional features with brain tau. *J Cell Biochem.* 78, 305-17.
- Cselenyi, C. S., Jernigan, K. K., Tahinci, E., Thorne, C. A., Lee, L. A., Lee, E., 2008. LRP6 transduces a canonical Wnt signal independently of Axin degradation by inhibiting GSK3's phosphorylation of beta-catenin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 8032-7.
- Cummings, J. L., 2004. Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 351, 56-67.
- Chen, J., Kanai, Y., Cowan, N. J., Hirokawa, N., 1992. Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature.* 360, 674-7.
- Chen, S., Owens, G. C., Makarenkova, H., Edelman, D. B., 2010. HDAC6 regulates mitochondrial transport in hippocampal neurons. *PLoS One.* 5, e10848.
- Chen, Z. F., Paquette, A. J., Anderson, D. J., 1998. NRSF/REST is required in vivo for repression of multiple neuronal target genes during embryogenesis. *Nat Genet.* 20, 136-42.
- Cho, J. H., Johnson, G. V., 2003. Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylates tau at both primed and unprimed sites. Differential impact on microtubule binding. *J Biol Chem.* 278, 187-93.
- Chong, J. A., Tapia-Ramirez, J., Kim, S., Toledo-Aral, J. J., Zheng, Y., Boutros, M. C., Altshuler, Y. M., Frohman, M. A., Kraner, S. D., Mandel, G., 1995. REST: a mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons. *Cell.* 80, 949-57.
- Dartigues, J. F., 2009. Alzheimer's disease: a global challenge for the 21st century. *Lancet Neurol.* 8, 1082-3.
- Dash, P. K., Karl, K. A., Colicos, M. A., Prywes, R., Kandel, E. R., 1991. cAMP response element-binding protein is activated by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin- as well as cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88, 5061-5.
- Dawson, H. N., Cantillana, V., Jansen, M., Wang, H., Vitek, M. P., Wilcock, D. M., Lynch, J. R., Laskowitz, D. T., 2010. Loss of tau elicits axonal degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 169, 516-31.
- Dawson, H. N., Ferreira, A., Eyster, M. V., Ghoshal, N., Binder, L. I., Vitek, M. P., 2001. Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice. *J Cell Sci.* 114, 1179-87.
- Dayanandan, R., Van Slegtenhorst, M., Mack, T. G., Ko, L., Yen, S. H., Leroy, K., Brion, J. P., Anderton, B. H., Hutton, M., Lovestone, S., 1999. Mutations in tau reduce its microtubule binding properties in intact cells and affect its phosphorylation. *FEBS Lett.* 446, 228-32.
- de Toledo Ferraz Alves, T. C., Ferreira, L. K., Wajngarten, M., Busatto, G. F., 2010. Cardiac disorders as risk factors for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 20, 749-63.
- Decker, H., Lo, K. Y., Unger, S. M., Ferreira, S. T., Silverman, M. A., 2010. Amyloid-beta peptide oligomers disrupt axonal transport through an NMDA receptor-dependent mechanism that is mediated by glycogen synthase kinase 3beta in primary cultured hippocampal neurons. *J Neurosci.* 30, 9166-71.
- Deisseroth, K., Bito, H., Tsien, R. W., 1996. Signaling from synapse to nucleus: postsynaptic CREB phosphorylation during multiple forms of hippocampal synaptic plasticity. *Neuron.* 16, 89-101.
- Deisseroth, K., Heist, E. K., Tsien, R. W., 1998. Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons. *Nature.* 392, 198-202.
- Delacourte, A., David, J. P., Sergeant, N., Buee, L., Wattez, A., Vermersch, P., Ghzali, F., Fallet-Bianco, C., Pasquier, F., Lebert, F., Petit, H., Di Menza, C., 1999. The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology.* 52, 1158-65.
- Delisle, M. B., Murrell, J. R., Richardson, R., Trofatter, J. A., Rascol, O., Soulages, X., Mohr, M., Calvas, P., Ghetti, B., 1999. A mutation at codon 279 (N279K) in exon 10 of the Tau gene causes a tauopathy with dementia and supranuclear palsy. *Acta Neuropathol.* 98, 62-77.
- DePaoli-Roach, A. A., 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, 12144-52.
- Derkinderen, P., Scales, T. M., Hanger, D. P., Leung, K. Y., Byers, H. L., Ward, M. A., Lenz, C., Price, C., Bird, I. N., Perera, T., Kellie, S., Williamson, R., Noble, W., Van Etten, R. A., Leroy, K., Brion, J. P., Reynolds, C. H., Anderton, B. H., 2005. Tyrosine 394 is phosphorylated in Alzheimer's paired helical filament tau and in fetal tau with c-Abl as the candidate tyrosine kinase. *J Neurosci.* 25, 6584-93.
- Desai, A., Kisaalita, W. S., Keith, C., Wu, Z. Z., 2006. Human neuroblastoma (SH-SY5Y) cell culture and differentiation in 3-D collagen hydrogels for cell-based biosensing. *Biosens Bioelectron.* 21, 1483-92.

- Dickson, D. W., Crystal, H. A., Mattiace, L. A., Masur, D. M., Blau, A. D., Davies, P., Yen, S. H., Aronson, M. K., 1992. Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans. *Neurobiol Aging*. 13, 179-89.
- Ding, H., Dolan, P. J., Johnson, G. V., 2008. Histone deacetylase 6 interacts with the microtubule-associated protein tau. *J Neurochem*. 106, 2119-30.
- Dixit, R., Ross, J. L., Goldman, Y. E., Holzbaur, E. L., 2008. Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science*. 319, 1086-9.
- Doble, B. W., Woodgett, J. R., 2003. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci*. 116, 1175-86.
- Dompierre, J. P., Godin, J. D., Charrin, B. C., Cordelieres, F. P., King, S. J., Humbert, S., Saudou, F., 2007. Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation. *J Neurosci*. 27, 3571-83.
- Dotti, C. G., Banker, G. A., Binder, L. I., 1987. The expression and distribution of the microtubule-associated proteins tau and microtubule-associated protein 2 in hippocampal neurons in the rat in situ and in cell culture. *Neuroscience*. 23, 121-30.
- Drechsel, D. N., Hyman, A. A., Cobb, M. H., Kirschner, M. W., 1992. Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell*. 3, 1141-54.
- Drewes, G., Lichtenberg-Kraag, B., Doring, F., Mandelkow, E. M., Biernat, J., Goris, J., Doree, M., Mandelkow, E., 1992. Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. *Embo J*. 11, 2131-8.
- Drewes, G., Trinczek, B., Illenberger, S., Biernat, J., Schmitt-Ulms, G., Meyer, H. E., Mandelkow, E. M., Mandelkow, E., 1995. Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase (p110mark). A novel protein kinase that regulates tau-microtubule interactions and dynamic instability by phosphorylation at the Alzheimer-specific site serine 262. *J Biol Chem*. 270, 7679-88.
- Drubin, D. G., Kirschner, M. W., 1986. Tau protein function in living cells. *J Cell Biol*. 103, 2739-46.
- Duyckaerts, C., Potier, M. C., Delatour, B., 2008. Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol*. 115, 5-38.
- Ebneth, A., Godemann, R., Stamer, K., Illenberger, S., Trinczek, B., Mandelkow, E., 1998. Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease. *J Cell Biol*. 143, 777-94.
- Engel, T., Hernandez, F., Avila, J., 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, 5083-90.
- Engel, T., Lucas, J. J., Gomez-Ramos, P., Moran, M. A., Avila, J., Hernandez, F., 2006b. Coexpression of FTDP-17 tau and GSK-3beta in transgenic mice induce tau polymerization and neurodegeneration. *Neurobiol Aging*. 27, 1258-68.
- Ennaceur, A., Neave, N., Aggleton, J. P., 1997. Spontaneous object recognition and object location memory in rats: the effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. *Exp Brain Res*. 113, 509-19.
- Farias, G. A., Munoz, J. P., Garrido, J., Maccioni, R. B., 2002. Tubulin, actin, and tau protein interactions and the study of their macromolecular assemblies. *J Cell Biochem*. 85, 315-24.
- Fath, T., Eidenmuller, J., Brandt, R., 2002. Tau-mediated cytotoxicity in a pseudohyperphosphorylation model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 22, 9733-41.
- Fellous, A., Francon, J., Lennon, A. M., Nunez, J., 1977. Microtubule assembly in vitro. Purification of assembly-promoting factors. *Eur J Biochem*. 78, 167-74.
- Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., Alnemri, E. S., 1994. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Biol Chem*. 269, 30761-4.
- Fiol, C. J., Mahrenholz, A. M., Wang, Y., Roeske, R. W., Roach, P. J., 1987. Formation of protein kinase recognition sites by covalent modification of the substrate. Molecular mechanism for the synergistic action of casein kinase II and glycogen synthase kinase 3. *J Biol Chem*. 262, 14042-8.
- Fleischer, T. C., Weaver, C. M., McAfee, K. J., Jennings, J. L., Link, A. J., 2006. Systematic identification and functional screens of uncharacterized proteins associated with eukaryotic ribosomal complexes. *Genes Dev*. 20, 1294-307.

- Forman, M. S., Lal, D., Zhang, B., Dabir, D. V., Swanson, E., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., 2005. Transgenic mouse model of tau pathology in astrocytes leading to nervous system degeneration. *J Neurosci.* 25, 3539-50.
- Fotuhi, M., Hachinski, V., Whitehouse, P. J., 2009. Changing perspectives regarding late-life dementia. *Nat Rev Neurol.* 5, 649-58.
- Frappier, T. F., Georgieff, I. S., Brown, K., Shelanski, M. L., 1994. tau Regulation of microtubule-microtubule spacing and bundling. *J Neurochem.* 63, 2288-94.
- Fukushima, N., Furuta, D., Hidaka, Y., Moriyama, R., Tsujiuchi, T., 2009. Post-translational modifications of tubulin in the nervous system. *J Neurochem.* 109, 683-93.
- Garcia-Perez, J., Avila, J., Diaz-Nido, J., 1998. Implication of cyclin-dependent kinases and glycogen synthase kinase 3 in the phosphorylation of microtubule-associated protein 1B in developing neuronal cells. *J Neurosci Res.* 52, 445-52.
- Georgieff, I. S., Liem, R. K., Mellado, W., Nunez, J., Shelanski, M. L., 1991. High molecular weight tau: preferential localization in the peripheral nervous system. *J Cell Sci.* 100 ( Pt 1), 55-60.
- Geula, C., Bu, J., Nagykerly, N., Scinto, L. F., Chan, J., Joseph, J., Parker, R., Wu, C. K., 2003. Loss of calbindin-D28k from aging human cholinergic basal forebrain: relation to neuronal loss. *J Comp Neurol.* 455, 249-59.
- Goedert, M., Cohen, E. S., Jakes, R., Cohen, P., 1992a. p42 MAP kinase phosphorylation sites in microtubule-associated protein tau are dephosphorylated by protein phosphatase 2A1. Implications for Alzheimer's disease [corrected]. *FEBS Lett.* 312, 95-9.
- Goedert, M., Hasegawa, M., Jakes, R., Lawler, S., Cuenda, A., Cohen, P., 1997. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases. *FEBS Lett.* 409, 57-62.
- Goedert, M., Jakes, R., 1990. Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *Embo J.* 9, 4225-30.
- Goedert, M., Satumira, S., Jakes, R., Smith, M. J., Kamibayashi, C., White, C. L., 3rd, Sontag, E., 2000. Reduced binding of protein phosphatase 2A to tau protein with frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 mutations. *J Neurochem.* 75, 2155-62.
- Goedert, M., Spillantini, M. G., 2000. Tau mutations in frontotemporal dementia FTDP-17 and their relevance for Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 1502, 110-21.
- Goedert, M., Spillantini, M. G., Cairns, N. J., Crowther, R. A., 1992b. Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron.* 8, 159-68.
- Goedert, M., Spillantini, M. G., Jakes, R., Rutherford, D., Crowther, R. A., 1989a. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron.* 3, 519-26.
- Goedert, M., Spillantini, M. G., Potier, M. C., Ulrich, J., Crowther, R. A., 1989b. 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.
- Goedert, M., Wischik, C. M., Crowther, R. A., Walker, J. E., Klug, A., 1988. Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85, 4051-5.
- Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W., Cong, J., 2003. The calpain system. *Physiol Rev.* 83, 731-801.
- Gomez-Isla, T., Hollister, R., West, H., Mui, S., Growdon, J. H., Petersen, R. C., Parisi, J. E., Hyman, B. T., 1997. Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 41, 17-24.
- Gong, C. X., Grundke-Iqbal, I., Damuni, Z., Iqbal, K., 1994a. Dephosphorylation of microtubule-associated protein tau by protein phosphatase-1 and -2C and its implication in Alzheimer disease. *FEBS Lett.* 341, 94-8.
- Gong, C. X., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 1994b. Dephosphorylation of Alzheimer's disease abnormally phosphorylated tau by protein phosphatase-2A. *Neuroscience.* 61, 765-72.
- Gong, C. X., Lidsky, T., Wegiel, J., Zuck, L., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 2000. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau is regulated by protein phosphatase 2A in mammalian brain. Implications for neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 275, 5535-44.
- Gong, C. X., Shaikh, S., Wang, J. Z., Zaidi, T., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 1995. Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer disease brain. *J Neurochem.* 65, 732-8.
- Gong, C. X., Singh, T. J., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 1993. Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain. *J Neurochem.* 61, 921-7.



- Gong, C. X., Singh, T. J., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 1994c. Alzheimer's disease abnormally phosphorylated tau is dephosphorylated by protein phosphatase-2B (calcineurin). *J Neurochem.* 62, 803-6.
- Goode, B. L., Denis, P. E., Panda, D., Radeke, M. J., Miller, H. P., Wilson, L., Feinstein, S. C., 1997. Functional interactions between the proline-rich and repeat regions of tau enhance microtubule binding and assembly. *Mol Biol Cell.* 8, 353-65.
- Gordon-Krajcer, W., Yang, L., Ksiezak-Reding, H., 2000. Conformation of paired helical filaments blocks dephosphorylation of epitopes shared with fetal tau except Ser199/202 and Ser202/Thr205. *Brain Res.* 856, 163-75.
- Gotz, J., Ittner, L. M., 2008. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurosci.* 9, 532-44.
- Gotz, J., Probst, A., Spillantini, M. G., Schafer, T., Jakes, R., Burki, K., Goedert, M., 1995. Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform. *Embo J.* 14, 1304-13.
- Gotz, J., Tolnay, M., Barmettler, R., Ferrari, A., Burki, K., Goedert, M., Probst, A., Nitsch, R. M., 2001. Human tau transgenic mice. Towards an animal model for neuro- and glialfibrillary lesion formation. *Adv Exp Med Biol.* 487, 71-83.
- Greenwood, J. A., Johnson, G. V., 1995. Localization and in situ phosphorylation state of nuclear tau. *Exp Cell Res.* 220, 332-7.
- Griffith, L. M., Pollard, T. D., 1982. The interaction of actin filaments with microtubules and microtubule-associated proteins. *J Biol Chem.* 257, 9143-51.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y. C., Zaidi, M. S., Wisniewski, H. M., 1986a. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem.* 261, 6084-9.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M., Binder, L. I., 1986b. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83, 4913-7.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R. Y., 1985. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 260, 3440-50.
- Haass, C., Hung, A. Y., Schlossmacher, M. G., Teplow, D. B., Selkoe, D. J., 1993. beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J Biol Chem.* 268, 3021-4.
- Haass, C., Schlossmacher, M. G., Hung, A. Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B. L., Lieberburg, I., Koo, E. H., Schenk, D., Teplow, D. B., et al., 1992. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature.* 359, 322-5.
- Hanger, D. P., Anderton, B. H., Noble, W., 2009. Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med.* 15, 112-9.
- Hanger, D. P., Hughes, K., Woodgett, J. R., Brion, J. P., Anderton, B. H., 1992. Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci Lett.* 147, 58-62.
- Haque, N., Gong, C. X., Sengupta, A., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., 2004. Regulation of microtubule-associated proteins, protein kinases and protein phosphatases during differentiation of SY5Y cells. *Brain Res Mol Brain Res.* 129, 163-70.
- Haque, N., Tanaka, T., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., 1999. Regulation of expression, phosphorylation and biological activity of tau during differentiation in SY5Y cells. *Brain Res.* 838, 69-77.
- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., Mizushima, N., 2006. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature.* 441, 885-9.
- Harada, A., Oguchi, K., Okabe, S., Kuno, J., Terada, S., Ohshima, T., Sato-Yoshitake, R., Takei, Y., Noda, T., Hirokawa, N., 1994. Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature.* 369, 488-91.
- Hartmann, J., Konnerth, A., 2005. Determinants of postsynaptic Ca<sup>2+</sup> signaling in Purkinje neurons. *Cell Calcium.* 37, 459-66.
- Hasegawa, M., Smith, M. J., Goedert, M., 1998. Tau proteins with FTDP-17 mutations have a reduced ability to promote microtubule assembly. *FEBS Lett.* 437, 207-10.
- Hashiguchi, M., Sobue, K., Paudel, H. K., 2000. 14-3-3zeta is an effector of tau protein phosphorylation. *J Biol Chem.* 275, 25247-54.
- He, H. J., Wang, X. S., Pan, R., Wang, D. L., Liu, M. N., He, R. Q., 2009. The proline-rich domain of tau plays a role in interactions with actin. *BMC Cell Biol.* 10, 81.

- He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L. T., Morin, P. J., Vogelstein, B., Kinzler, K. W., 1998. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*. 281, 1509-12.
- Henriquez, J. P., Cross, D., Vial, C., Maccioni, R. B., 1995. Subpopulations of tau interact with microtubules and actin filaments in various cell types. *Cell Biochem Funct*. 13, 239-50.
- Hernandez, F., Avila, J., 2007. Tauopathies. *Cell Mol Life Sci*. 64, 2219-33.
- Hernandez, F., Borrell, J., Guaza, C., Avila, J., 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, 1529-33.
- Heutink, P., 2000. Untangling tau-related dementia. *Hum Mol Genet*. 9, 979-86.
- Higuchi, M., Zhang, B., Forman, M. S., Yoshiyama, Y., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., 2005. Axonal degeneration induced by targeted expression of mutant human tau in oligodendrocytes of transgenic mice that model glial tauopathies. *J Neurosci*. 25, 9434-43.
- Hirabayashi, Y., Itoh, Y., Tabata, H., Nakajima, K., Akiyama, T., Masuyama, N., Gotoh, Y., 2004. The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. *Development*. 131, 2791-801.
- Hirano, A., Dembitzer, H. M., Kurland, L. T., Zimmerman, H. M., 1968. The fine structure of some intraganglionic alterations. Neurofibrillary tangles, granulovacuolar bodies and "rod-like" structures as seen in Guam amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex. *J Neuropathol Exp Neurol*. 27, 167-82.
- Hirokawa, N., Shiomura, Y., Okabe, S., 1988. Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J Cell Biol*. 107, 1449-59.
- Hong, M., Zhukareva, V., Vogelsberg-Ragaglia, V., Wszolek, Z., Reed, L., Miller, B. I., Geschwind, D. H., Bird, T. D., McKeel, D., Goate, A., Morris, J. C., Wilhelmsen, K. C., Schellenberg, G. D., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., 1998. Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17. *Science*. 282, 1914-7.
- Hong, X. P., Peng, C. X., Wei, W., Tian, Q., Liu, Y. H., Yao, X. Q., Zhang, Y., Cao, F. Y., Wang, Q., Wang, J. Z., 2009. Essential role of tau phosphorylation in adult hippocampal neurogenesis. *Hippocampus*.
- Hook, S. S., Orian, A., Cowley, S. M., Eisenman, R. N., 2002. Histone deacetylase 6 binds polyubiquitin through its zinc finger (PAZ domain) and copurifies with deubiquitinating enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99, 13425-30.
- Hooper, C., Killick, R., Lovestone, S., 2008. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 104, 1433-9.
- Hua, Q., He, R. Q., 2003. Tau could protect DNA double helix structure. *Biochim Biophys Acta*. 1645, 205-11.
- Hua, Q., He, R. Q., Haque, N., Qu, M. H., del Carmen Alonso, A., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 2003. Microtubule associated protein tau binds to double-stranded but not single-stranded DNA. *Cell Mol Life Sci*. 60, 413-21.
- Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X. F., Yao, T. P., 2002. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*. 417, 455-8.
- Hutton, M., Lendon, C. L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., Hackett, J., Adamson, J., Lincoln, S., Dickson, D., Davies, P., Petersen, R. C., Stevens, M., de Graaff, E., Wauters, E., van Baren, J., Hillebrand, M., Joosse, M., Kwon, J. M., Nowotny, P., Che, L. K., Norton, J., Morris, J. C., Reed, L. A., Trojanowski, J., Basun, H., Lannfelt, L., Neystat, M., Fahn, S., Dark, F., Tannenberg, T., Dodd, P. R., Hayward, N., Kwok, J. B., Schofield, P. R., Andreadis, A., Snowden, J., Craufurd, D., Neary, D., Owen, F., Oostra, B. A., Hardy, J., Goate, A., van Swieten, J., Mann, D., Lynch, T., Heutink, P., 1998. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature*. 393, 702-5.
- Hwang, S. C., Jhon, D. Y., Bae, Y. S., Kim, J. H., Rhee, S. G., 1996. Activation of phospholipase C-gamma by the concerted action of tau proteins and arachidonic acid. *J Biol Chem*. 271, 18342-9.
- Iacopino, A. M., Christakos, S., 1990. Corticosterone regulates calbindin-D28k mRNA and protein levels in rat hippocampus. *J Biol Chem*. 265, 10177-80.
- Ihara, Y., Nukina, N., Miura, R., Ogawara, M., 1986. Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J Biochem*. 99, 1807-10.
- Ikegami, S., Harada, A., Hirokawa, N., 2000. Muscle weakness, hyperactivity, and impairment in fear conditioning in tau-deficient mice. *Neurosci Lett*. 279, 129-32.

- Imahori, K., Uchida, T., 1997. Physiology and pathology of tau protein kinases in relation to Alzheimer's disease. *J Biochem.* 121, 179-88.
- Ingelsson, M., Vanmechelen, E., Lannfelt, L., 1996. Microtubule-associated protein tau in human fibroblasts with the Swedish Alzheimer mutation. *Neurosci Lett.* 220, 9-12.
- Ishiguro, K., Shiratsuchi, A., Sato, S., Omori, A., Arioka, M., Kobayashi, S., Uchida, T., Imahori, K., 1993. Glycogen synthase kinase 3 beta is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments. *FEBS Lett.* 325, 167-72.
- Ittner, L. M., Ke, Y. D., Delerue, F., Bi, M., Gladbach, A., van Eersel, J., Wolfing, H., Chieng, B. C., Christie, M. J., Napier, I. A., Eckert, A., Staufenbiel, M., Hardeman, E., Gotz, J., 2010. Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell.* 142, 387-97.
- Ittner, L. M., Ke, Y. D., Gotz, J., 2009. Phosphorylated Tau interacts with c-Jun N-terminal kinase-interacting protein 1 (JIP1) in Alzheimer disease. *J Biol Chem.* 284, 20909-16.
- Jackson, G. R., Wiedau-Pazos, M., Sang, T. K., Wagle, N., Brown, C. A., Massachi, S., Geschwind, D. H., 2002. Human wild-type tau interacts with wingless pathway components and produces neurofibrillary pathology in *Drosophila*. *Neuron.* 34, 509-19.
- Janke, C., Kneussel, M., 2010. Tubulin post-translational modifications: encoding functions on the neuronal microtubule cytoskeleton. *Trends Neurosci.* 33, 362-72.
- Jenkins, S. M., Johnson, G. V., 1998. Tau complexes with phospholipase C-gamma in situ. *Neuroreport.* 9, 67-71.
- Jensen, P. H., Hager, H., Nielsen, M. S., Hojrup, P., Gliemann, J., Jakes, R., 1999. alpha-synuclein binds to Tau and stimulates the protein kinase A-catalyzed tau phosphorylation of serine residues 262 and 356. *J Biol Chem.* 274, 25481-9.
- Jicha, G. A., Rockwood, J. M., Berenfeld, B., Hutton, M., Davies, P., 1999. Altered conformation of recombinant frontotemporal dementia-17 mutant tau proteins. *Neurosci Lett.* 260, 153-6.
- Jope, R. S., Johnson, G. V., 2004. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci.* 29, 95-102.
- Kar, S., Fan, J., Smith, M. J., Goedert, M., Amos, L. A., 2003. Repeat motifs of tau bind to the insides of microtubules in the absence of taxol. *Embo J.* 22, 70-7.
- Katzman, R., Terry, R., DeTeresa, R., Brown, T., Davies, P., Fuld, P., Renbing, X., Peck, A., 1988. Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques. *Ann Neurol.* 23, 138-44.
- Kawaguchi, Y., Kovacs, J. J., McLaurin, A., Vance, J. M., Ito, A., Yao, T. P., 2003. The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell.* 115, 727-38.
- Kawas, C. H., Corrada, M. M., 2006. Alzheimer's and dementia in the oldest-old: a century of challenges. *Curr Alzheimer Res.* 3, 411-9.
- Kazantseva, A., Sepp, M., Kazantseva, J., Sadam, H., Pruunsild, P., Timmusk, T., Neuman, T., Palm, K., 2009. N-terminally truncated BAF57 isoforms contribute to the diversity of SWI/SNF complexes in neurons. *J Neurochem.* 109, 807-18.
- Kempf, M., Clement, A., Faissner, A., Lee, G., Brandt, R., 1996. Tau binds to the distal axon early in development of polarity in a microtubule- and microfilament-dependent manner. *J Neurosci.* 16, 5583-92.
- Kidd, M., 1963. Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature.* 197, 192-3.
- Knops, J., Kosik, K. S., Lee, G., Pardee, J. D., Cohen-Gould, L., McConlogue, L., 1991. Overexpression of tau in a nonneuronal cell induces long cellular processes. *J Cell Biol.* 114, 725-33.
- Knowles, R., LeClerc, N., Kosik, K. S., 1994. Organization of actin and microtubules during process formation in tau-expressing Sf9 cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* 28, 256-64.
- Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., Tanaka, K., 2006. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature.* 441, 880-4.
- Kopke, E., Tung, Y. C., Shaikh, S., Alonso, A. C., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., 1993. Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J Biol Chem.* 268, 24374-84.
- Kosik, K. S., Joachim, C. L., Selkoe, D. J., 1986. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83, 4044-8.

- Kosik, K. S., Orecchio, L. D., Bakalis, S., Neve, R. L., 1989. Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron*. 2, 1389-97.
- Krylova, S. M., Musheev, M., Nutiu, R., Li, Y., Lee, G., Krylov, S. N., 2005. Tau protein binds single-stranded DNA sequence specifically--the proof obtained in vitro with non-equilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures. *FEBS Lett*. 579, 1371-5.
- Kukull, W. A., Higdon, R., Bowen, J. D., McCormick, W. C., Teri, L., Schellenberg, G. D., van Belle, G., Jolley, L., Larson, E. B., 2002. Dementia and Alzheimer disease incidence: a prospective cohort study. *Arch Neurol*. 59, 1737-46.
- Lai, D., Wan, M., Wu, J., Preston-Hurlburt, P., Kushwaha, R., Grundstrom, T., Imbalzano, A. N., Chi, T., 2009. Induction of TLR4-target genes entails calcium/calmodulin-dependent regulation of chromatin remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106, 1169-74.
- LeDizet, M., Piperno, G., 1987. Identification of an acetylation site of *Chlamydomonas* alpha-tubulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84, 5720-4.
- Lee, G., Cowan, N., Kirschner, M., 1988. The primary structure and heterogeneity of tau protein from mouse brain. *Science*. 239, 285-8.
- Lee, G., Neve, R. L., Kosik, K. S., 1989. The microtubule binding domain of tau protein. *Neuron*. 2, 1615-24.
- Lee, G., Newman, S. T., Gard, D. L., Band, H., Panchamoorthy, G., 1998. Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *J Cell Sci*. 111 ( Pt 21), 3167-77.
- Lee, G., Rook, S. L., 1992. Expression of tau protein in non-neuronal cells: microtubule binding and stabilization. *J Cell Sci*. 102 ( Pt 2), 227-37.
- Lee, G., Thangavel, R., Sharma, V. M., Litersky, J. M., Bhaskar, K., Fang, S. M., Do, L. H., Andreadis, A., Van Hoesen, G., Ksiezak-Reding, H., 2004. Phosphorylation of tau by fyn: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 24, 2304-12.
- Lee, H. K., Kumar, P., Fu, Q., Rosen, K. M., Querfurth, H. W., 2009. The insulin/Akt signaling pathway is targeted by intracellular beta-amyloid. *Mol Biol Cell*. 20, 1533-44.
- Lee, V. M., Balin, B. J., Otvos, L., Jr., Trojanowski, J. Q., 1991. A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau. *Science*. 251, 675-8.
- Lee, V. M., Goedert, M., Trojanowski, J. Q., 2001. Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci*. 24, 1121-59.
- Leroy, K., Brion, J. P., 1999. Developmental expression and localization of glycogen synthase kinase-3beta in rat brain. *J Chem Neuroanat*. 16, 279-93.
- Lewis, J., Dickson, D. W., Lin, W. L., Chisholm, L., Corral, A., Jones, G., Yen, S. H., Sahara, N., Skipper, L., Yager, D., Eckman, C., Hardy, J., Hutton, M., McGowan, E., 2001. Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science*. 293, 1487-91.
- Lewis, J., McGowan, E., Rockwood, J., Melrose, H., Nacharaju, P., Van Slegtenhorst, M., Gwinn-Hardy, K., Paul Murphy, M., Baker, M., Yu, X., Duff, K., Hardy, J., Corral, A., Lin, W. L., Yen, S. H., Dickson, D. W., Davies, P., Hutton, M., 2000. Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat Genet*. 25, 402-5.
- Li, B., Chohan, M. O., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 2007a. Disruption of microtubule network by Alzheimer abnormally hyperphosphorylated tau. *Acta Neuropathol*. 113, 501-11.
- Li, H. L., Wang, H. H., Liu, S. J., Deng, Y. Q., Zhang, Y. J., Tian, Q., Wang, X. C., Chen, X. Q., Yang, Y., Zhang, J. Y., Wang, Q., Xu, H., Liao, F. F., Wang, J. Z., 2007b. Phosphorylation of tau antagonizes apoptosis by stabilizing beta-catenin, a mechanism involved in Alzheimer's neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104, 3591-6.
- Li, T., Hawkes, C., Qureshi, H. Y., Kar, S., Paudel, H. K., 2006. Cyclin-dependent protein kinase 5 primes microtubule-associated protein tau site-specifically for glycogen synthase kinase 3beta. *Biochemistry*. 45, 3134-45.
- Liang, Z., Liu, F., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Wegiel, J., Gong, C. X., 2008. Decrease of protein phosphatase 2A and its association with accumulation and hyperphosphorylation of tau in Down syndrome. *J Alzheimers Dis*. 13, 295-302.
- Lim, F., Hernandez, F., Lucas, J. J., Gomez-Ramos, P., Moran, M. A., Avila, J., 2001. FTDP-17 mutations in tau transgenic mice provoke lysosomal abnormalities and Tau filaments in forebrain. *Mol Cell Neurosci*. 18, 702-14.
- Lim, J., Balastik, M., Lee, T. H., Nakamura, K., Liou, Y. C., Sun, A., Finn, G., Pastorino, L., Lee, V. M., Lu, K. P., 2008. Pin1 has opposite effects on wild-type and P301L tau stability and tauopathy. *J Clin Invest*. 118, 1877-89.

- Lindwall, G., Cole, R. D., 1984. Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J Biol Chem.* 259, 5301-5.
- Litersky, J. M., Johnson, G. V., 1992. Phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase inhibits the degradation of tau by calpain. *J Biol Chem.* 267, 1563-8.
- Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Gong, C. X., 2005. Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur J Neurosci.* 22, 1942-50.
- Liu, F., Li, B., Tung, E. J., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Gong, C. X., 2007. Site-specific effects of tau phosphorylation on its microtubule assembly activity and self-aggregation. *Eur J Neurosci.* 26, 3429-36.
- Liu, R., Liu, H., Chen, X., Kirby, M., Brown, P. O., Zhao, K., 2001. Regulation of CSF1 promoter by the SWI/SNF-like BAF complex. *Cell.* 106, 309-18.
- Loomis, P. A., Howard, T. H., Castleberry, R. P., Binder, L. I., 1990. Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87, 8422-6.
- LoPresti, P., Szuchet, S., Pappasozomenos, S. C., Zinkowski, R. P., Binder, L. I., 1995. Functional implications for the microtubule-associated protein tau: localization in oligodendrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 10369-73.
- Lovell, M. A., Markesbery, W. R., 2007. Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease. *Nucleic Acids Res.* 35, 7497-504.
- Lovestone, S., Davis, D. R., Webster, M. T., Kaech, S., Brion, J. P., Matus, A., Anderton, B. H., 1999. Lithium reduces tau phosphorylation: effects in living cells and in neurons at therapeutic concentrations. *Biol Psychiatry.* 45, 995-1003.
- Lovestone, S., Hartley, C. L., Pearce, J., 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, 1145-57.
- Lovestone, S., Reynolds, C. H., 1997. The phosphorylation of tau: a critical stage in neurodevelopment and neurodegenerative processes. *Neuroscience.* 78, 309-24.
- Lovestone, S., Reynolds, C. H., Latimer, D., Davis, D. R., Anderton, B. H., Gallo, J. M., 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, 1077-86.
- Lu, M., Kosik, K. S., 2001. Competition for microtubule-binding with dual expression of tau missense and splice isoforms. *Mol Biol Cell.* 12, 171-84.
- Lu, P. J., Wulf, G., Zhou, X. Z., Davies, P., Lu, K. P., 1999. The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature.* 399, 784-8.
- Lu, Q., Wood, J. G., 1993. Characterization of fluorescently derivatized bovine tau protein and its localization and functions in cultured Chinese hamster ovary cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* 25, 190-200.
- Lucas, J. J., Hernandez, F., Gomez-Ramos, P., Moran, M. A., Hen, R., Avila, J., 2001. Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *Embo J.* 20, 27-39.
- Maccioni, R. B., Vera, J. C., Dominguez, J., Avila, J., 1989. A discrete repeated sequence defines a tubulin binding domain on microtubule-associated protein tau. *Arch Biochem Biophys.* 275, 568-79.
- Magdesian, M. H., Carvalho, M. M., Mendes, F. A., Saraiva, L. M., Juliano, M. A., Juliano, L., Garcia-Abreu, J., Ferreira, S. T., 2008. Amyloid-beta binds to the extracellular cysteine-rich domain of Frizzled and inhibits Wnt/beta-catenin signaling. *J Biol Chem.* 283, 9359-68.
- Mandelkow, E., Song, Y. H., Schweers, O., Marx, A., Mandelkow, E. M., 1995. On the structure of microtubules, tau, and paired helical filaments. *Neurobiol Aging.* 16, 347-54.
- Mandell, J. W., Banker, G. A., 1996. A spatial gradient of tau protein phosphorylation in nascent axons. *J Neurosci.* 16, 5727-40.
- Mann, S. S., Hammarback, J. A., 1994. Molecular characterization of light chain 3. A microtubule binding subunit of MAP1A and MAP1B. *J Biol Chem.* 269, 11492-7.
- Mao, Y., Ge, X., Frank, C. L., Madison, J. M., Koehler, A. N., Doud, M. K., Tassa, C., Berry, E. M., Soda, T., Singh, K. K., Biechele, T., Petryshen, T. L., Moon, R. T., Haggarty, S. J., Tsai, L. H., 2009. Disrupted in schizophrenia 1 regulates neuronal progenitor proliferation via modulation of GSK3beta/beta-catenin signaling. *Cell.* 136, 1017-31.
- Maruta, H., Greer, K., Rosenbaum, J. L., 1986. The acetylation of alpha-tubulin and its relationship to the assembly and disassembly of microtubules. *J Cell Biol.* 103, 571-9.

- Masters, C. L., Multhaup, G., Simms, G., Pottgiesser, J., Martins, R. N., Beyreuther, K., 1985. Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *Embo J.* 4, 2757-63.
- Matsumura, N., Yamazaki, T., Ihara, Y., 1999. Stable expression in Chinese hamster ovary cells of mutated tau genes causing frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17). *Am J Pathol.* 154, 1649-56.
- Matsuyama, A., Shimazu, T., Sumida, Y., Saito, A., Yoshimatsu, Y., Seigneurin-Berny, D., Osada, H., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., Horinouchi, S., Yoshida, M., 2002. In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *Embo J.* 21, 6820-31.
- Mattson, M. P., Barger, S. W., 1993. Roles for calcium signaling in structural plasticity and pathology in the hippocampal system. *Hippocampus.* 3 Spec No, 73-87.
- Mattson, M. P., Rychlik, B., Chu, C., Christakos, S., 1991. Evidence for calcium-reducing and excitoprotective roles for the calcium-binding protein calbindin-D28k in cultured hippocampal neurons. *Neuron.* 6, 41-51.
- Mayford, M., Bach, M. E., Huang, Y. Y., Wang, L., Hawkins, R. D., Kandel, E. R., 1996. Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science.* 274, 1678-83.
- McMahon, A. P., Bradley, A., 1990. The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell.* 62, 1073-85.
- Miao, Y., Chen, J., Zhang, Q., Sun, A., 2010. Deletion of tau attenuates heat shock-induced injury in cultured cortical neurons. *J Neurosci Res.* 88, 102-10.
- Min, S. W., Cho, S. H., Zhou, Y., Schroeder, S., Haroutunian, V., Seeley, W. W., Huang, E. J., Shen, Y., Masliah, E., Mukherjee, C., Meyers, D., Cole, P. A., Ott, M., Gan, L., 2010. Acetylation of tau inhibits its degradation and contributes to tauopathy. *Neuron.* 67, 953-66.
- Mitchison, T., Kirschner, M., 1988. Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron.* 1, 761-72.
- Montejo de Garcini, E., Serrano, L., Avila, J., 1986. Self assembly of microtubule associated protein tau into filaments resembling those found in Alzheimer disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 141, 790-6.
- Moraga, D. M., Nunez, P., Garrido, J., Maccioni, R. B., 1993. A tau fragment containing a repetitive sequence induces bundling of actin filaments. *J Neurochem.* 61, 979-86.
- Morishima-Kawashima, M., Hasegawa, M., Takio, K., Suzuki, M., Yoshida, H., Titani, K., Ihara, Y., 1995. Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau. *J Biol Chem.* 270, 823-9.
- Morris, J. C., Storandt, M., McKeel, D. W., Jr., Rubin, E. H., Price, J. L., Grant, E. A., Berg, L., 1996. Cerebral amyloid deposition and diffuse plaques in "normal" aging: Evidence for presymptomatic and very mild Alzheimer's disease. *Neurology.* 46, 707-19.
- Morris, R., 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods.* 11, 47-60.
- Morsch, R., Simon, W., Coleman, P. D., 1999. Neurons may live for decades with neurofibrillary tangles. *J Neuropathol Exp Neurol.* 58, 188-97.
- Morton, A. J., Emson, P. C., 1990. Expression of calbindin D-28K-like immunoreactivity in human SK-N-SH and SH-SY-5Y neuroblastoma cells. *Brain Res.* 533, 161-4.
- Mukai, F., Ishiguro, K., Sano, Y., Fujita, S. C., 2002. Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta. *J Neurochem.* 81, 1073-83.
- Mullis, K. B., Faloona, F. A., 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335-50.
- Munoz-Montano, J. R., Moreno, F. J., Avila, J., Diaz-Nido, J., 1997. Lithium inhibits Alzheimer's disease-like tau protein phosphorylation in neurons. *FEBS Lett.* 411, 183-8.
- Murrell, J. R., Spillantini, M. G., Zolo, P., Guazzelli, M., Smith, M. J., Hasegawa, M., Redi, F., Crowther, R. A., Pietrini, P., Ghetti, B., Goedert, M., 1999. Tau gene mutation G389R causes a tauopathy with abundant pick body-like inclusions and axonal deposits. *J Neuropathol Exp Neurol.* 58, 1207-26.
- Nelson, P. T., Stefansson, K., Gulcher, J., Saper, C. B., 1996. Molecular evolution of tau protein: implications for Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 67, 1622-32.
- Neve, R. L., Harris, P., Kosik, K. S., Kurnit, D. M., Donlon, T. A., 1986. Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res.* 387, 271-80.
- Neve, R. L., McPhie, D. L., Chen, Y., 2000. Alzheimer's disease: a dysfunction of the amyloid precursor protein(1). *Brain Res.* 886, 54-66.

- North, B. J., Marshall, B. L., Borra, M. T., Denu, J. M., Verdin, E., 2003. The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD<sup>+</sup>-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell*. 11, 437-44.
- Nunez, J., 1988. Immature and mature variants of MAP2 and tau proteins and neuronal plasticity. *Trends Neurosci*. 11, 477-9.
- Nuydens, R., Van Den Kieboom, G., Nolten, C., Verhulst, C., Van Osta, P., Spittaels, K., Van den Haute, C., De Feyter, E., Geerts, H., Van Leuven, F., 2002. Coexpression of GSK-3beta corrects phenotypic aberrations of dorsal root ganglion cells, cultured from adult transgenic mice overexpressing human protein tau. *Neurobiol Dis*. 9, 38-48.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M. P., Akbari, Y., LaFerla, F. M., 2003. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron*. 39, 409-21.
- Ohkawa, N., Sugisaki, S., Tokunaga, E., Fujitani, K., Hayasaka, T., Setou, M., Inokuchi, K., 2008. N-acetyltransferase ARD1-NAT1 regulates neuronal dendritic development. *Genes Cells*. 13, 1171-83.
- Olmsted, J. B., 1981. Tubulin pools in differentiating neuroblastoma cells. *J Cell Biol*. 89, 418-23.
- Ooi, L., Belyaev, N. D., Miyake, K., Wood, I. C., Buckley, N. J., 2006. BRG1 chromatin remodeling activity is required for efficient chromatin binding by repressor element 1-silencing transcription factor (REST) and facilitates REST-mediated repression. *J Biol Chem*. 281, 38974-80.
- Orrenius, S., Nicotera, P., 1994. The calcium ion and cell death. *J Neural Transm Suppl*. 43, 1-11.
- Oyama, F., Kotliarova, S., Harada, A., Ito, M., Miyazaki, H., Ueyama, Y., Hirokawa, N., Nukina, N., Ihara, Y., 2004. Gem GTPase and tau: morphological changes induced by gem GTPase in cho cells are antagonized by tau. *J Biol Chem*. 279, 27272-7.
- Padilla, R., Lopez Otin, C., Serrano, L., Avila, J., 1993. Role of the carboxy terminal region of beta tubulin on microtubule dynamics through its interaction with the GTP phosphate binding region. *FEBS Lett*. 325, 173-6.
- Padilla, R., Maccioni, R. B., Avila, J., 1990. Calmodulin binds to a tubulin binding site of the microtubule-associated protein tau. *Mol Cell Biochem*. 97, 35-41.
- Padmaraju, V., Indi, S. S., Rao, K. S., 2010. New evidences on Tau-DNA interactions and relevance to neurodegeneration. *Neurochem Int*. 57, 51-7.
- Palazzo, A., Ackerman, B., Gundersen, G. G., 2003. Cell biology: Tubulin acetylation and cell motility. *Nature*. 421, 230.
- Papasozomenos, S. C., Su, Y., 1991. Altered phosphorylation of tau protein in heat-shocked rats and patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88, 4543-7.
- Paquette, A. J., Perez, S. E., Anderson, D. J., 2000. Constitutive expression of the neuron-restrictive silencer factor (NRSF)/REST in differentiating neurons disrupts neuronal gene expression and causes axon pathfinding errors in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97, 12318-23.
- Patapoutian, A., Reichardt, L. F., 2000. Roles of Wnt proteins in neural development and maintenance. *Curr Opin Neurobiol*. 10, 392-9.
- Pei, J. J., Braak, E., Braak, H., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Winblad, B., 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, 1010-9.
- Pei, J. J., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Bogdanovic, N., Winblad, B., Cowburn, R. F., 1998. Accumulation of cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) in neurons with early stages of Alzheimer's disease neurofibrillary degeneration. *Brain Res*. 797, 267-77.
- Pei, J. J., Tanaka, T., Tung, Y. C., Braak, E., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., 1997. Distribution, levels, and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol*. 56, 70-8.
- Perez, M., Lim, F., Arrasate, M., Avila, J., 2000. The FTDP-17-linked mutation R406W abolishes the interaction of phosphorylated tau with microtubules. *J Neurochem*. 74, 2583-9.
- Perez, M., Ribe, E., Rubio, A., Lim, F., Moran, M. A., Ramos, P. G., Ferrer, I., Isla, M. T., Avila, J., 2005. Characterization of a double (amyloid precursor protein-tau) transgenic: tau phosphorylation and aggregation. *Neuroscience*. 130, 339-47.
- Perez, M., Santa-Maria, I., Gomez de Barreda, E., Zhu, X., Cuadros, R., Cabrero, J. R., Sanchez-Madrid, F., Dawson, H. N., Vitek, M. P., Perry, G., Smith, M. A., Avila, J., 2009. Tau--an inhibitor of deacetylase HDAC6 function. *J Neurochem*. 109, 1756-66.
- Perez, M., Valpuesta, J. M., de Garcini, E. M., Quintana, C., Arrasate, M., Lopez Carrascosa, J. L., Rabano, A., Garcia de Yebenes, J., Avila, J., 1998. Ferritin is associated with the aberrant tau filaments present in progressive supranuclear palsy. *Am J Pathol*. 152, 1531-9.

- Perez, M., Valpuesta, J. M., Medina, M., Montejo de Garcini, E., Avila, J., 1996. Polymerization of tau into filaments in the presence of heparin: the minimal sequence required for tau-tau interaction. *J Neurochem.* 67, 1183-90.
- Phillips, R. G., Meier, T. J., Giuli, L. C., McLaughlin, J. R., Ho, D. Y., Sapolsky, R. M., 1999. Calbindin D28K gene transfer via herpes simplex virus amplicon vector decreases hippocampal damage in vivo following neurotoxic insults. *J Neurochem.* 73, 1200-5.
- Pigino, G., Morfini, G., Atagi, Y., Deshpande, A., Yu, C., Jungbauer, L., LaDu, M., Busciglio, J., Brady, S., 2009. Disruption of fast axonal transport is a pathogenic mechanism for intraneuronal amyloid beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 5907-12.
- Piperno, G., LeDizet, M., Chang, X. J., 1987. Microtubules containing acetylated alpha-tubulin in mammalian cells in culture. *J Cell Biol.* 104, 289-302.
- Plyte, S. E., Hughes, K., Nikolakaki, E., Pulverer, B. J., Woodgett, J. R., 1992. Glycogen synthase kinase-3: functions in oncogenesis and development. *Biochim Biophys Acta.* 1114, 147-62.
- Poorkaj, P., Muma, N. A., Zhukareva, V., Cochran, E. J., Shannon, K. M., Hurtig, H., Koller, W. C., Bird, T. D., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., Schellenberg, G. D., 2002. An R5L tau mutation in a subject with a progressive supranuclear palsy phenotype. *Ann Neurol.* 52, 511-6.
- Probst, A., Gotz, J., Wiederhold, K. H., Tolnay, M., Mistl, C., Jaton, A. L., Hong, M., Ishihara, T., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., Crowther, R. A., Spillantini, M. G., Burki, K., Goedert, M., 2000. Axonopathy and amyotrophy in mice transgenic for human four-repeat tau protein. *Acta Neuropathol.* 99, 469-81.
- Qu, M. H., Li, H., Tian, R., Nie, C. L., Liu, Y., Han, B. S., He, R. Q., 2004. Neuronal tau induces DNA conformational changes observed by atomic force microscopy. *Neuroreport.* 15, 2723-7.
- Raber, J., Huang, Y., Ashford, J. W., 2004. ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology. *Neurobiol Aging.* 25, 641-50.
- Rademakers, R., Cruts, M., Van Broeckhoven, C., 2003. Genetics of early-onset Alzheimer dementia. *ScientificWorldJournal.* 3, 497-519.
- Rademakers, R., Cruts, M., van Broeckhoven, C., 2004. The role of tau (MAPT) in frontotemporal dementia and related tauopathies. *Hum Mutat.* 24, 277-95.
- Rapoport, M., Dawson, H. N., Binder, L. I., Vitek, M. P., Ferreira, A., 2002. Tau is essential to beta - amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 6364-9.
- Reed, N. A., Cai, D., Blasius, T. L., Jih, G. T., Meyhofer, E., Gaertig, J., Verhey, K. J., 2006. Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr Biol.* 16, 2166-72.
- Rendon, A., Jung, D., Jancsik, V., 1990. Interaction of microtubules and microtubule-associated proteins (MAPs) with rat brain mitochondria. *Biochem J.* 269, 555-6.
- Ringel, I., Sternlicht, H., 1984. Carbon-13 nuclear magnetic resonance study of microtubule protein: evidence for a second colchicine site involved in the inhibition of microtubule assembly. *Biochemistry.* 23, 5644-53.
- Rintoul, G. L., Raymond, L. A., Baimbridge, K. G., 2001. Calcium buffering and protection from excitotoxic cell death by exogenous calbindin-D28k in HEK 293 cells. *Cell Calcium.* 29, 277-87.
- Rizzini, C., Goedert, M., Hodges, J. R., Smith, M. J., Jakes, R., Hills, R., Xuereb, J. H., Crowther, R. A., Spillantini, M. G., 2000. Tau gene mutation K257T causes a tauopathy similar to Pick's disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 59, 990-1001.
- Roberson, E. D., Scarce-Levie, K., Palop, J. J., Yan, F., Cheng, I. H., Wu, T., Gerstein, H., Yu, G. Q., Mucke, L., 2007. Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science.* 316, 750-4.
- Rossi, G., Dalpra, L., Crosti, F., Lissoni, S., Sciacca, F. L., Catania, M., Di Fede, G., Mangieri, M., Giaccone, G., Croci, D., Tagliavini, F., 2008. A new function of microtubule-associated protein tau: involvement in chromosome stability. *Cell Cycle.* 7, 1788-94.
- Rowe, C. C., Ng, S., Ackermann, U., Gong, S. J., Pike, K., Savage, G., Cowie, T. F., Dickinson, K. L., Maruff, P., Darby, D., Smith, C., Woodward, M., Merory, J., Tochon-Danguy, H., O'Keefe, G., Klunk, W. E., Mathis, C. A., Price, J. C., Masters, C. L., Villemagne, V. L., 2007. Imaging beta-amyloid burden in aging and dementia. *Neurology.* 68, 1718-25.
- 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, 1023-6.
- Rui, Y., Tiwari, P., Xie, Z., Zheng, J. Q., 2006. Acute impairment of mitochondrial trafficking by beta-amyloid peptides in hippocampal neurons. *J Neurosci.* 26, 10480-7.
- Rylatt, D. B., Aitken, A., Bilham, T., Condon, G. D., Embi, N., Cohen, P., 1980. Glycogen synthase from rabbit skeletal muscle. Amino acid sequence at the sites phosphorylated by glycogen synthase



- kinase-3, and extension of the N-terminal sequence containing the site phosphorylated by phosphorylase kinase. *Eur J Biochem.* 107, 529-37.
- Sahara, N., Lewis, J., DeTure, M., McGowan, E., Dickson, D. W., Hutton, M., Yen, S. H., 2002. Assembly of tau in transgenic animals expressing P301L tau: alteration of phosphorylation and solubility. *J Neurochem.* 83, 1498-508.
- Santacruz, K., Lewis, J., Spire, 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, K. H., 2005. Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science.* 309, 476-81.
- Scott, C. W., Spreen, R. C., Herman, J. L., Chow, F. P., Davison, M. D., Young, J., Caputo, C. B., 1993. Phosphorylation of recombinant tau by cAMP-dependent protein kinase. Identification of phosphorylation sites and effect on microtubule assembly. *J Biol Chem.* 268, 1166-73.
- Scharfman, H. E., Schwartzkroin, P. A., 1989. Protection of dentate hilar cells from prolonged stimulation by intracellular calcium chelation. *Science.* 246, 257-60.
- Schmidt, M. L., Zhukareva, V., Newell, K. L., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., 2001. Tau isoform profile and phosphorylation state in dementia pugilistica recapitulate Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 101, 518-24.
- Schneider, A., Biernat, J., von Bergen, M., Mandelkow, E., Mandelkow, E. M., 1999. Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (Ser262, Ser214) also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry.* 38, 3549-58.
- Schoenherr, C. J., Anderson, D. J., 1995. The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes. *Science.* 267, 1360-3.
- Seigneurin-Berny, D., Verdel, A., Curtet, S., Lemerrier, C., Garin, J., Rousseaux, S., Khochbin, S., 2001. Identification of components of the murine histone deacetylase 6 complex: link between acetylation and ubiquitination signaling pathways. *Mol Cell Biol.* 21, 8035-44.
- Selkoe, D. J., 2001. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.* 81, 741-66.
- Selkoe, D. J., 2002. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science.* 298, 789-91.
- Sengupta, A., Kabat, J., Novak, M., Wu, Q., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 1998. Phosphorylation of tau at both Thr 231 and Ser 262 is required for maximal inhibition of its binding to microtubules. *Arch Biochem Biophys.* 357, 299-309.
- Sennvik, K., Boekhoorn, K., Lasrado, R., Terwel, D., Verhaeghe, S., Korr, H., Schmitz, C., Tomiyama, T., Mori, H., Krugers, H., Joels, M., Ramakers, G. J., Lucassen, P. J., Van Leuven, F., 2007. Tau-4R suppresses proliferation and promotes neuronal differentiation in the hippocampus of tau knockin/knockout mice. *Faseb J.* 21, 2149-61.
- Serrano, L., Montejo de Garcini, E., Hernandez, M. A., Avila, J., 1985. Localization of the tubulin binding site for tau protein. *Eur J Biochem.* 153, 595-600.
- Sheng, M., Thompson, M. A., Greenberg, M. E., 1991. CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science.* 252, 1427-30.
- Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R., Ben-Ze'ev, A., 1999. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 5522-7.
- Sik, A., van Nieuwehuyzen, P., Prickaerts, J., Blokland, A., 2003. Performance of different mouse strains in an object recognition task. *Behav Brain Res.* 147, 49-54.
- Singh, T. J., Wang, J. Z., Novak, M., Kontzekova, E., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 1996. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylates tau at Ser-262 but only partially inhibits its binding to microtubules. *FEBS Lett.* 387, 145-8.
- Sjoberg, M. K., Shestakova, E., Mansuroglu, Z., Maccioni, R. B., Bonnefoy, E., 2006. Tau protein binds to pericentromeric DNA: a putative role for nuclear tau in nucleolar organization. *J Cell Sci.* 119, 2025-34.
- Small, S. A., Duff, K., 2008. Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis. *Neuron.* 60, 534-42.
- Southwood, C. M., Peppi, M., Dryden, S., Tainsky, M. A., Gow, A., 2007. Microtubule deacetylases, SirT2 and HDAC6, in the nervous system. *Neurochem Res.* 32, 187-95.
- Spillantini, M. G., Murrell, J. R., Goedert, M., Farlow, M. R., Klug, A., Ghetti, B., 1998. Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 7737-41.
- Spittaels, K., Van den Haute, C., Van Dorpe, J., Bruynseels, K., Vandezande, K., Laenen, I., Geerts, H., Mercken, M., Sciot, R., Van Lommel, A., Loos, R., Van Leuven, F., 1999. Prominent

- axonopathy in the brain and spinal cord of transgenic mice overexpressing four-repeat human tau protein. *Am J Pathol.* 155, 2153-65.
- 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., Van Leuven, F., 2000. Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylates protein tau and rescues the axonopathy in the central nervous system of human four-repeat tau transgenic mice. *J Biol Chem.* 275, 41340-9.
- Stamer, K., Vogel, R., Thies, E., Mandelkow, E., Mandelkow, E. M., 2002. Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J Cell Biol.* 156, 1051-63.
- Stokin, G. B., Lillo, C., Falzone, T. L., Brusch, R. G., Rockenstein, E., Mount, S. L., Raman, R., Davies, P., Masliah, E., Williams, D. S., Goldstein, L. S., 2005. Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science.* 307, 1282-8.
- Strittmatter, W. J., Saunders, A. M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G. S., Roses, A. D., 1993. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90, 1977-81.
- Sudarsanam, P., Iyer, V. R., Brown, P. O., Winston, F., 2000. Whole-genome expression analysis of snf/swi mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 3364-9.
- Szucs, K., Ledesma, M. D., Dombradi, V., Gergely, P., Avila, J., Friedrich, P., 1994. Dephosphorylation of tau protein from Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett.* 165, 175-8.
- Takahashi, M., Tomizawa, K., Kato, R., Sato, K., Uchida, T., Fujita, S. C., Imahori, K., 1994. Localization and developmental changes of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta in rat brain. *J Neurochem.* 63, 245-55.
- Takashima, A., Murayama, M., Murayama, O., Kohno, T., Honda, T., Yasutake, K., Nihonmatsu, N., Mercken, M., Yamaguchi, H., Sugihara, S., Wolozin, B., 1998. Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3beta and its substrate tau. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 9637-41.
- 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, 7789-93.
- Takashima, A., Yamaguchi, H., Noguchi, K., Michel, G., Ishiguro, K., Sato, K., Hoshino, T., Hoshi, M., Imahori, K., 1995. Amyloid beta peptide induces cytoplasmic accumulation of amyloid protein precursor via tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta in rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett.* 198, 83-6.
- Takei, Y., Teng, J., Harada, A., Hirokawa, N., 2000. Defects in axonal elongation and neuronal migration in mice with disrupted tau and map1b genes. *J Cell Biol.* 150, 989-1000.
- Takemura, R., Okabe, S., Umeyama, T., Kanai, Y., Cowan, N. J., Hirokawa, N., 1992. Increased microtubule stability and alpha tubulin acetylation in cells transfected with microtubule-associated proteins MAP1B, MAP2 or tau. *J Cell Sci.* 103 ( Pt 4), 953-64.
- Tamai, K., Semenov, M., Kato, Y., Spokony, R., Liu, C., Katsuyama, Y., Hess, F., Saint-Jeannet, J. P., He, X., 2000. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature.* 407, 530-5.
- Tanemura, K., Murayama, M., Akagi, T., Hashikawa, T., Tominaga, T., Ichikawa, M., Yamaguchi, H., Takashima, A., 2002. Neurodegeneration with tau accumulation in a transgenic mouse expressing V337M human tau. *J Neurosci.* 22, 133-41.
- Tanzi, R. E., Kovacs, D. M., Kim, T. W., Moir, R. D., Guenette, S. Y., Wasco, W., 1996. The gene defects responsible for familial Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 3, 159-68.
- Tatebayashi, Y., Haque, N., Tung, Y. C., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., 2004. Role of tau phosphorylation by glycogen synthase kinase-3beta in the regulation of organelle transport. *J Cell Sci.* 117, 1653-63.
- Tatebayashi, Y., Miyasaka, T., Chui, D. H., Akagi, T., Mishima, K., Iwasaki, K., Fujiwara, M., Tanemura, K., Murayama, M., Ishiguro, K., Planel, E., Sato, S., Hashikawa, T., Takashima, A., 2002. Tau filament formation and associative memory deficit in aged mice expressing mutant (R406W) human tau. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 13896-901.
- Teruel, M. N., Chen, W., Persechini, A., Meyer, T., 2000. Differential codes for free Ca(2+)-calmodulin signals in nucleus and cytosol. *Curr Biol.* 10, 86-94.
- Thurston, V. C., Pena, P., Pestell, R., Binder, L. I., 1997. Nucleolar localization of the microtubule-associated protein tau in neuroblastomas using sense and anti-sense transfection strategies. *Cell Motil Cytoskeleton.* 38, 100-10.
- Thurston, V. C., Zinkowski, R. P., Binder, L. I., 1996. Tau as a nucleolar protein in human nonneural cells in vitro and in vivo. *Chromosoma.* 105, 20-30.

- Townsend, M., Mehta, T., Selkoe, D. J., 2007. Soluble Abeta inhibits specific signal transduction cascades common to the insulin receptor pathway. *J Biol Chem.* 282, 33305-12.
- Trojanowski, J. Q., Schuck, T., Schmidt, M. L., Lee, V. M., 1989. Distribution of tau proteins in the normal human central and peripheral nervous system. *J Histochem Cytochem.* 37, 209-15.
- Trump, B. F., Berezesky, I. K., 1995. Calcium-mediated cell injury and cell death. *Faseb J.* 9, 219-28.
- Truong, A. B., Masters, S. C., Yang, H., Fu, H., 2002. Role of the 14-3-3 C-terminal loop in ligand interaction. *Proteins.* 49, 321-5.
- Tucker, K. L., Meyer, M., Barde, Y. A., 2001. Neurotrophins are required for nerve growth during development. *Nat Neurosci.* 4, 29-37.
- Varani, L., Hasegawa, M., Spillantini, M. G., Smith, M. J., Murrell, J. R., Ghetti, B., Klug, A., Goedert, M., Varani, G., 1999. Structure of tau exon 10 splicing regulatory element RNA and destabilization by mutations of frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 8229-34.
- Varga-Weisz, P., 2001. ATP-dependent chromatin remodeling factors: nucleosome shufflers with many missions. *Oncogene.* 20, 3076-85.
- Vendrell, M., Pujol, M. J., Tusell, J. M., Serratos, J., 1992. Effect of different convulsants on calmodulin levels and proto-oncogene c-fos expression in the central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res.* 14, 285-92.
- Verdel, A., Curtet, S., Brocard, M. P., Rousseaux, S., Lemerrier, C., Yoshida, M., Khochbin, S., 2000. Active maintenance of mHDA2/mHDAC6 histone-deacetylase in the cytoplasm. *Curr Biol.* 10, 747-9.
- Verdin, E., Dequiedt, F., Kasler, H. G., 2003. Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet.* 19, 286-93.
- Vershinin, M., Carter, B. C., Razafsky, D. S., King, S. J., Gross, S. P., 2007. Multiple-motor based transport and its regulation by Tau. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 87-92.
- Vincent, I., Rosado, M., Kim, E., Davies, P., 1994. Increased production of paired helical filament epitopes in a cell culture system reduces the turnover of tau. *J Neurochem.* 62, 715-23.
- Vossel, K. A., Zhang, K., Brodbeck, J., Daub, A. C., Sharma, P., Finkbeiner, S., Cui, B., Mucke, L., 2010. Tau Reduction Prevents A $\beta$ -Induced Defects in Axonal Transport. *Science.* 330, 198.
- Wang, D., Tolbert, L. M., Carlson, K. W., Sadee, W., 2000. Nuclear Ca<sup>2+</sup>/calmodulin translocation activated by mu-opioid (OP3) receptor. *J Neurochem.* 74, 1418-25.
- Wang, J. Z., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 2007. Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *Eur J Neurosci.* 25, 59-68.
- Wang, W., Cote, J., Xue, Y., Zhou, S., Khavari, P. A., Biggar, S. R., Muchardt, C., Kalpana, G. V., Goff, S. P., Yaniv, M., Workman, J. L., Crabtree, G. R., 1996. Purification and biochemical heterogeneity of the mammalian SWI-SNF complex. *Embo J.* 15, 5370-82.
- Wang, W., Chi, T., Xue, Y., Zhou, S., Kuo, A., Crabtree, G. R., 1998. Architectural DNA binding by a high-mobility-group/kinesin-like subunit in mammalian SWI/SNF-related complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 492-8.
- Wang, Y., Loomis, P. A., Zinkowski, R. P., Binder, L. I., 1993. A novel tau transcript in cultured human neuroblastoma cells expressing nuclear tau. *J Cell Biol.* 121, 257-67.
- Wei, Y., Qu, M. H., Wang, X. S., Chen, L., Wang, D. L., Liu, Y., Hua, Q., He, R. Q., 2008. Binding to the minor groove of the double-strand, tau protein prevents DNA from damage by peroxidation. *PLoS One.* 3, e2600.
- Weihl, C. C., Ghadge, G. D., Kennedy, S. G., Hay, N., Miller, R. J., Roos, R. P., 1999. Mutant presenilin-1 induces apoptosis and downregulates Akt/PKB. *J Neurosci.* 19, 5360-9.
- Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. Y., Kirschner, M. W., 1975. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72, 1858-62.
- Wischik, C. M., Novak, M., Edwards, P. C., Klug, A., Tichelaar, W., Crowther, R. A., 1988. Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85, 4884-8.
- Witte, H., Neukirchen, D., Bradke, F., 2008. Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *J Cell Biol.* 180, 619-32.
- Wittmann, C. W., Wszolek, M. F., Shulman, J. M., Salvaterra, P. M., Lewis, J., Hutton, M., Feany, M. B., 2001. Tauopathy in *Drosophila*: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science.* 293, 711-4.
- Wolf, D. S., Gearing, M., Snowdon, D. A., Mori, H., Markesbery, W. R., Mirra, S. S., 1999. Progression of regional neuropathology in Alzheimer disease and normal elderly: findings from the Nun study. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 13, 226-31.

- Wolozin, B. L., Pruchnicki, A., Dickson, D. W., Davies, P., 1986. A neuronal antigen in the brains of Alzheimer patients. *Science*. 232, 648-50.
- Wood, J. G., Mirra, S. S., Pollock, N. J., Binder, L. I., 1986. Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83, 4040-3.
- Woodgett, J. R., 1990. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *Embo J*. 9, 2431-8.
- Woods, Y. L., Cohen, P., Becker, W., Jakes, R., Goedert, M., Wang, X., Proud, C. G., 2001. The kinase DYRK phosphorylates protein-synthesis initiation factor eIF2Bepsilon at Ser539 and the microtubule-associated protein tau at Thr212: potential role for DYRK as a glycogen synthase kinase 3-priming kinase. *Biochem J*. 355, 609-15.
- Wu, H. Y., Tomizawa, K., Matsui, H., 2007. Calpain-calcineurin signaling in the pathogenesis of calcium-dependent disorder. *Acta Med Okayama*. 61, 123-37.
- Xie, H., Litsersky, J. M., Hartigan, J. A., Jope, R. S., Johnson, G. V., 1998. The interrelationship between selective tau phosphorylation and microtubule association. *Brain Res*. 798, 173-83.
- Yamaguchi, H., Ishiguro, K., Uchida, T., Takashima, A., Lemere, C. A., 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*. 92, 232-41.
- Yamamoto, H., Hasegawa, M., Ono, T., Tashima, K., Ihara, Y., Miyamoto, E., 1995. Dephosphorylation of fetal-tau and paired helical filaments-tau by protein phosphatases 1 and 2A and calcineurin. *J Biochem*. 118, 1224-31.
- Yang, X. J., Seto, E., 2008. The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9, 206-18.
- Yu, D. Y., Tong, L., Song, G. J., Lin, W. L., Zhang, L. Q., Bai, W., Gong, H., Yin, Y. X., Wei, Q., 2008. Tau binds both subunits of calcineurin, and binding is impaired by calmodulin. *Biochim Biophys Acta*. 1783, 2255-61.
- Yuan, A., Kumar, A., Peterhoff, C., Duff, K., Nixon, R. A., 2008. Axonal transport rates in vivo are unaffected by tau deletion or overexpression in mice. *J Neurosci*. 28, 1682-7.
- Zeng, L., Fagotto, F., Zhang, T., Hsu, W., Vasicek, T. J., Perry, W. L., 3rd, Lee, J. J., Tilghman, S. M., Gumbiner, B. M., Costantini, F., 1997. The mouse Fused locus encodes Axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation. *Cell*. 90, 181-92.
- Zhang, B., Maiti, A., Shively, S., Lakhani, F., McDonald-Jones, G., Bruce, J., Lee, E. B., Xie, S. X., Joyce, S., Li, C., Toleikis, P. M., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., 2005. Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102, 227-31.
- Zheng, W., Xie, Y., Li, G., Kong, J., Feng, J. Q., Li, Y. C., 2004. Critical role of calbindin-D28k in calcium homeostasis revealed by mice lacking both vitamin D receptor and calbindin-D28k. *J Biol Chem*. 279, 52406-13.
- Zhou, X. Z., Kops, O., Werner, A., Lu, P. J., Shen, M., Stoller, G., Kullertz, G., Stark, M., Fischer, G., Lu, K. P., 2000. Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins. *Mol Cell*. 6, 873-83.
- Zhu, X., Su, B., Wang, Y., Mondragon-Rodriguez, S., Cash, A., Avila, J., Perry, G., Smith, M. A., 2007. Increased tubulin acetylation in Alzheimer disease. *J Neurochem*. 102.

---

# Anexo I



## GENES SOBREPRESADOS EN LOS RATONES TAU<sup>-/-</sup> RESPECTO A LOS SILVESTRES

Sonda	Gen	Símbolo gen	P-valor	Tasa de cambio	Cromosoma
1427998_at	LSM12 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	Lsm12	0,00126384	2,34947	chr11 D
1419077_at	membrane protein, palmitoylated 3 (MAGUK p55 subfamily member 3)	Mpp3	0,0118612	1,40568	chr11 D
1417241_at	archaelysin family metallopeptidase 2	Amz2	0,00271008	1,34422	chr11 E1
1417963_at	phospholipid transfer protein	Pltp	0,0446236	1,33538	chr2 H3
1426366_at	eukaryotic translation initiation factor 2C, 2	Eif2c2	0,0307494	1,32994	chr15 D3
1421992_a_at	insulin-like growth factor binding protein 4	Igfbp4	0,00306406	1,32381	chr11 D
1452913_at	Purkinje cell protein 4-like 1	Pcp4l1	0,0456292	1,31653	chr1 H3
1417928_at	PDZ and LIM domain 4	Pdlim4	0,0494942	1,29987	chr11 B1
1423756_s_at	insulin-like growth factor binding protein 4	Igfbp4	0,00731678	1,24126	chr11 D
1449173_at	membrane protein, palmitoylated 2 (MAGUK p55 subfamily member 2)	Mpp2	0,00918144	1,23668	chr11 D
1459890_s_at	RIKEN cDNA 1110008P14 gene	1110008P14Rik	0,0105532	1,23359	chr2 B
1418445_at	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 2	Slc16a2	0,0342684	1,22757	chrX D
1451332_at	zinc finger protein 521	Zfp521	0,00246464	1,22574	chr18 A1
1449379_at	kinase insert domain protein receptor	Kdr	0,0488604	1,22125	chr5 C3.3
1434930_at	two pore channel 1	Tpcn1	0,0313175	1,21492	chr5 F
1426677_at	filamin, alpha	Flna	0,027981	1,21359	chrX A7.3
1432083_a_at	leucine rich repeat containing 23	Lrrc23	0,0401	1,21307	chr6 F2
1434768_at	tripeptidyl peptidase I	Tpp1	0,0186211	1,21206	chr7 E3
1424726_at	transmembrane protein 150	Tmem150	0,0065779	1,20783	chr6 C1
1422731_at	LIM domains containing 1	Limd1	0,0359613	1,20618	chr9 F
1423947_at	RIKEN cDNA 1110008P14 gene	1110008P14Rik	0,0161916	1,20611	chr2 B
1417513_at	ecotropic viral integration site 5	Evi5	0,0231672	1,20294	chr5 F
1423872_a_at	dystroglycan 1	Dag1	0,00596887	1,20073	chr9 F2
1437405_a_at	insulin-like growth factor binding protein 4	Igfbp4	0,00817167	1,19913	chr11 D
1416766_at	MOCO sulphurase C-terminal domain containing 2	Mosc2	0,0490828	1,19833	chr1 H4
1419686_at	testis specific gene A14	Tsga14	0,0426881	1,19383	chr6 A3.3
1438559_x_at	solute carrier family 44, member 2	Slc44a2	0,0109497	1,19342	chr9 A3
1421089_a_at	RIKEN cDNA 2610028A01 gene	2610028A01Rik	0,0300926	1,18935	chr14 C3
1426044_a_at	protein kinase C, theta	Prkcq	0,029802	1,18859	chr2 A1
1424817_at	sperm flagellar 1	Spfl1	0,030221	1,18557	chr2 F3
1450945_at	protein kinase C, alpha	Prkca	0,0121143	1,18375	chr11 E1
1419283_s_at	tensin 1	Tns1	0,043208	1,18149	chr1 C3
1437406_x_at	insulin-like growth factor binding protein 4	Igfbp4	0,0182796	1,18109	chr11 D
1418865_at	zinc finger protein 385A	Zfp385a	0,0213475	1,17724	chr15 F3
1424922_a_at	bromodomain containing 4	Brd4	0,00498934	1,17527	chr17 B2
1448907_at	thimet oligopeptidase 1	Thop1	0,0409045	1,17424	chr10 C1

Sonda	Gen	Símbolo gen	P-valor	Tasa de cambio	Cromosoma
1448124_at	glucuronidase, beta	Gusb	0,00130588	1,17417	chr5 G1.3
1460406_at	expressed sequence AI427122	AI427122	0,0465071	1,17313	chr9 E3.3
1423221_at	tubulin, beta 4	Tubb4	0,0308807	1,17164	chr17 D
1450410_a_at	RIKEN cDNA 4930570C03 gene	4930570C03Rik	0,0257269	1,17156	chr15 F2
1425036_a_at	trinucleotide repeat containing 6a	Tnrc6a	0,0254318	1,17112	chr7 F3
1417843_s_at	EPS8-like 2	Eps8l2	0,0458061	1,1709	chr7 F5
1453111_a_at	solute carrier family 25, member 39	Slc25a39	0,0381235	1,16936	chr11 D 11
1426715_s_at	solute carrier family 46, member 1	Slc46a1	0,0423401	1,16935	chr11 B5 11
1426805_at	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subf	Smarca4	0,0340318	1,16641	chr9 A3
1416511_a_at	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 4	Cdc42ep4	0,0171462	1,16581	chr11 E2
1429246_a_at	annexin A6	Anxa6	0,0336909	1,1651	chr11 B1.3
1419414_at	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 13	Gng13	0,0475751	1,1643	chr17 A3.3
1420171_s_at	myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle	Myh9	0,0129809	1,16408	chr15 E1
1451298_at	pleckstrin homology domain containing, family H (with MYTH4 domain) member 3	Plekhh3	0,0208011	1,16347	chr11 D
1431394_a_at	leucine-rich repeat kinase 2	Lrrk2	0,0213193	1,16259	chr15 F1
1417212_at	RIKEN cDNA 9530058B02 gene	9530058B02Rik	0,0241661	1,16091	chr17 B1
1422676_at	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subf	Smarce1	0,0170026	1,16013	chr11 D
1438627_x_at	phosphogluconate dehydrogenase	Pgd	0,0277935	1,15847	chr4 E2
1436050_x_at	hairy and enhancer of split 6 (Drosophila)	Hes6	0,0419087	1,15799	chr1 D
1455288_at	RIKEN cDNA 1110036O03 gene	1110036O03Rik	0,0476128	1,15759	chr11 D
1434206_s_at	protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), gamma isoform	Ppp2r5c	0,00035309	1,15707	chr12 F2
1423757_x_at	insulin-like growth factor binding protein 4	Igfbp4	0,00026296	1,15668	chr11 D
1422670_at	Rho family GTPase 2	Rnd2	0,0160502	1,15604	chr11 C-D
1418252_at	peptidyl arginine deiminase, type II	Padi2	0,033869	1,15525	chr4 E1
1416903_at	nucleobindin 1	Nucb1	0,0426612	1,15497	chr7 B4
1454656_at	spermatogenesis associated 13	Spata13	0,0446044	1,15477	chr14 D1
1450899_at	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 1	Nedd1	0,0376153	1,15321	chr10 C2
1425548_a_at	leukocyte specific transcript 1	Lst1	0,0162159	1,15198	chr17 B1
1453164_a_at	phosphatidylserine synthase 2	Ptdss2	0,0303195	1,15175	chr7 F5
1435527_at	nuclear factor I/C	Nfic	0,0343063	1,15084	chr10 C1
1425805_a_at	ubiquitin specific peptidase 12	Usp12	0,0208298	1,15009	chr5 G2
1434020_at	PDGFA associated protein 1	Pdap1	0,0174794	1,14979	chr5 G2
1428850_x_at	CD99 antigen	Cd99	0,0149755	1,14948	---
1451290_at	microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha	Map1lc3a	0,00753632	1,14813	chr2 H2
1417886_at	RIKEN cDNA 1810009A15 gene /// hypothetical protein LOC100048454	1810009A15Rik /// LOC100048454	0,0277053	1,14787	chr19 A



Sonda	Gen	Símbolo gen	P-valor	Tasa de cambio	Cromosoma
1416528_at	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein-like 3	Sh3bgrl3	0,00094176	1,14748	chr4 D3
1415903_at	solute carrier family 38, member 1	Slc38a1	0,0101318	1,14702	chr15 F1
1456131_x_at	dystroglycan 1	Dag1	0,0109319	1,14657	chr9 F2
1415760_s_at	ATX1 (antioxidant protein 1) homolog 1 (yeast)	Atox1	0,0338307	1,14616	chr11 B1.3
1426397_at	transforming growth factor, beta receptor II	Tgfbr2	0,0443486	1,1457	chr9 F3
1424369_at	proteasome (prosome, macropain) inhibitor subunit 1	Psmf1	0,0401485	1,14553	chr2 G3
1415818_at	annexin A6	Anxa6	0,0372156	1,14448	chr11 B1.3
1421991_a_at	insulin-like growth factor binding protein 4	Igfbp4	0,00880931	1,14409	chr11 D
1449183_at	catechol-O-methyltransferase	Comt	0,0347318	1,14388	chr16 A3
1451435_at	cut-like homeobox 1	Cux1	0,0400842	1,14349	chr5 G2
1417385_at	aminopeptidase puromycin sensitive	Npepps	0,0292669	1,14346	chr11 D
1448583_at	expressed sequence AA960436	AA960436	0,025903	1,14326	chr8 D1
1421948_a_at	coiled-coil domain containing 123	Ccdc123	0,0172683	1,1424	chr7 B2
1423695_at	ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 2	Edem2	0,0114497	1,14205	chr2 H1
1428494_a_at	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide I /// similar to RNA Polymerase I	LOC100048301 /// Polr2i	0,00334929	1,14204	chr7 B1
1416924_at	brain protein I3	Bri3	0,00095098	1,14197	chr5 G2
1452467_at	methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) type B homolog (human)	Mmab	0,0248844	1,14152	chr5 F
1451569_at	nuclear receptor subfamily 2, group C, member 2	Nr2c2	0,0334229	1,14136	chr6 D1
1423403_at	mitogen-activated protein kinase binding protein 1	Mapkbp1	0,0321994	1,1409	chr2 E5
1417133_at	peripheral myelin protein	Pmp22	0,046255	1,13748	chr11 B3
1417176_at	casein kinase 1, epsilon	Csnk1e	0,0336321	1,13724	chr15 E1
1427156_s_at	activating signal cointegrator 1 complex subunit 2	Ascc2	0,00721057	1,13718	chr11 A1
1427737_a_at	RIKEN cDNA 1200011M11 gene	1200011M11Rik	0,0293286	1,13631	chr11 C
1428116_a_at	dynein light chain Tctex-type 1 /// similar to tctex-1 protein	Dynlt1	0,0405562	1,13579	chr17 A1
1417329_at	solute carrier family 23 (nucleobase transporters), member 2	Slc23a2	0,0368202	1,13482	chr2 G2
1456009_x_at	topoisomerase (DNA) III beta	Top3b	0,0121953	1,1346	chr16 B1
1448942_at	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 11	Gng11	0,0324023	1,13445	chr6 A1
1450057_at	SYS1 Golgi-localized integral membrane protein homolog (S. cerevisiae)	Sys1	0,0467962	1,13403	chr2 H3
1455129_at	Metadherin	Mtdh	0,0282461	1,13347	chr15 B3.3
1427240_at	dedicator of cytokinesis 6	Dock6	0,0318148	1,1329	chr9 A3
1436703_x_at	small nuclear RNA activating complex, polypeptide 2	Snpsc2	0,0498688	1,13134	chr8 A1.1
1437491_at	bicaudal D homolog 2 (Drosophila)	Bicd2	0,0313509	1,13127	chr13 A5
1417665_a_at	cleavage and polyadenylation specific factor 1	Cpsf1	0,0316012	1,13106	chr15 D3
1428612_at	autophagy-related 7 (yeast)	Atg7	0,0455144	1,13089	chr6 E3
1428351_at	protein phosphatase 1M	Ppm1m	0,0122075	1,13081	chr9 F1

Sonda	Gen	Símbolo gen	P-valor	Tasa de cambio	Cromosoma
1424424_at	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 1 /// similar to Zinc transp	LOC635418 /// Slc39a1	0,0183305	1,12957	chr3 F1
1418784_at	glutamate receptor, ionotropic, kainate 5 (gamma 2)	Grik5	0,00929218	1,12951	chr7 A3
1424169_at	Tax1 (human T-cell leukemia virus type I) binding protein 3 /// similar to Tax1	LOC100045937 /// Tax1bp3	0,0252546	1,12919	chr11 B4
1454865_at	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 8	Slc9a8	0,0104383	1,12851	chr2 H3
1423101_at	progesterin and adipoQ receptor family member IV	Paqr4	0,0263351	1,12808	chr17 A3.3
1456005_a_at	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	Bcl2l11	0,0329588	1,12657	chr2 F3-G1
1424051_at	collagen, type IV, alpha 2	Col4a2	0,0447729	1,12569	chr8 A1.1
1448292_at	ubiquinol-cytochrome c reductase (6.4kD) subunit	Uqcr	0,0256485	1,12533	chr10 C1
1418528_a_at	defender against cell death 1 /// hypothetical protein LOC100044173	Dad1 /// LOC100044173	0,0469105	1,12487	chr14 C2
1415912_a_at	ribosomal protein S13 /// predicted gene, EG625298 /// similar to ribosomal prot	EG625298 /// Rp	0,0185155	1,12466	chr7 E1
1433720_s_at	Nur77 downstream gene 2	Ndg2	0,0255479	1,12381	chr10 C1
1450466_at	cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 2 (p39)	Cdk5r2	0,0379451	1,12381	chr1 C3
1421738_at	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit alpha 2	Gabra2 /// LOC100047443	0,0483068	1,12357	chr5 C3.1
1450435_at	L1 cell adhesion molecule	L1cam	0,0298138	1,12312	chrX A6-B
1424656_s_at	ubiquitin specific peptidase 19	Usp19	0,0139693	1,12261	chr9 F2
1436896_at	integrator complex subunit 9	Ints9	0,0320469	1,12201	chr14 D1
1423694_at	potassium channel tetramerisation domain containing 10	Kctd10	0,0384057	1,12176	chr5 F
1427020_at	scavenger receptor class A, member 3	Scara3	0,0266009	1,12134	chr14 D1
1418627_at	glutamate-cysteine ligase , modifier subunit	Gclm	0,0138488	1,12111	chr3 H1-3
1455204_at	phosphatidylinositol transfer protein, cytoplasmic 1	Pitpnc1	0,0309801	1,12051	chr11 E1
1428296_at	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide L /// ubiquitin specific peptidas	LOC100048680 /// Polr21 /// Usp50	0,0495208	1,11988	chr2 F2
1418154_at	NEDD4 binding protein 1	N4bp1	0,0386313	1,11974	chr8 C3
1428465_at	transmembrane protein 147	Tmem147	0,0430904	1,11972	chr7 B1
1422506_a_at	cystatin B	Cstb	0,029677	1,1191	chr10 C1
1426464_at	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1	Nr1d1	0,0441451	1,11815	chr11 D
1425523_at	RNA binding motif protein 25	Rbm25	0,0259756	1,11743	chr12 D1
1454636_at	chromobox homolog 5 (Drosophila HP1a)	Cbx5	0,0479068	1,11655	chr15 F3
1418401_a_at	dual specificity phosphatase 16	Dusp16	0,040238	1,1165	chr6 G1
1424383_at	transmembrane protein 51	Tmem51	0,0405745	1,11543	chr4 E1
1433628_at	coenzyme Q10 homolog A (yeast)	Coq10a	0,0374442	1,11532	chr10 D3
1451255_at	lipolysis stimulated lipoprotein receptor	Lsr	0,0383904	1,11451	chr7 B1
1439240_x_at	lin-7 homolog B (C. elegans)	Lin7b	0,0313203	1,11404	chr7 B2
1451174_at	leucine rich repeat containing 33	Lrrc33	0,0416572	1,11381	chr16 B2

## GENES REPRIMIDOS EN LOS RATONES TAU<sup>-/-</sup> RESPECTO A LOS SILVESTRES

Sonda	Gen	Símbolo gen	P-valor	Tasa de cambio	Cromosoma
1424719_a_at	microtubule-associated protein tau	Mapt	3,80E-06	-5,42043	chr11 E1
1424718_at	microtubule-associated protein tau	Mapt	2,08E-06	-5,29799	chr11 E1
1417885_at	microtubule-associated protein tau	Mapt	0,00056197	-3,80336	chr11 E1
1422675_at	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subf	Smarce1	0,00708337	-1,46711	chr11 D
1418820_s_at	zinc finger, CCHC domain containing 10	Zcchc10	0,00745799	-1,38419	chr11 B1.3
1436761_s_at	RIKEN cDNA 1200015N20 gene	1200015N20Rik	0,00999605	-1,3299	chr10 B5.2
1424573_at	transmembrane emp24 protein transport domain containing 5 /// similar to Transme	LOC100046567 /// Tmed5	0,0273447	-1,31951	chr5 E5
1448235_s_at	high mobility group box 1 /// RIKEN cDNA 4932431P20 gene /// high mobility group	2810416G20Rik /// 4932431P20Rik /// EG432959 /// EG545555 /// Hmg111 /// Hmgbl /	0,00455442	-1,31261	chr11 E2 /// chr12 C1 /// chr15 D1 /// chr15 D3 /// chr2 E3 /// chr3 A3 /// chr3 F2.2 /// chr5 G3 /// chr6 B2.3 /// chr6 F3 /// chr6 F3 /// chr7 B1 /// chr7 B3 /// chr7 C /// chr7 E1 /// chrX A7.3
1429956_at	RIKEN cDNA 1700021K02 gene	1700021K02Rik	0,0160393	-1,27071	chr10 B4
1448738_at	calbindin-28K	Calb1	0,00196123	-1,26513	chr4 A2
1438506_s_at	abl-interactor 1	Abi1	0,0421411	-1,25419	chr2 A3
1434751_at	iduronate 2-sulfatase	Ids	0,00364413	-1,25243	chrX A7.1
1418691_at	regulator of G-protein signaling 9	Rgs9	0,00771629	-1,24382	chr11 E1
1417661_at	RAD52 motif 1	Rdm1	0,0136615	-1,23296	chr11 D
1436684_a_at	RIO kinase 2 (yeast)	Riok2	0,0139267	-1,22522	chr17 A3.1
1430982_at	splicing factor, arginine/serine-rich 1 (ASF/SF2) /// similar to splicing factor	LOC100048559 /// Sfrs1	0,00285494	-1,21252	chr11 C
1421137_a_at	protein kinase inhibitor beta, cAMP dependent, testis specific	Pkib	0,036526	-1,21173	chr10 B4
1416422_a_at	Sjogren syndrome antigen B	Ssb	0,00729833	-1,21074	chr2 C2
1427042_at	mal, T-cell differentiation protein 2	Mal2	0,0410508	-1,2023	chr15 D1
1456379_x_at	delta/notch-like EGF-related receptor	Dner	0,0110938	-1,19896	chr1 C5
1451313_a_at	RIKEN cDNA 1110067D22 gene	1110067D22Rik	0,0196822	-1,19594	chr11 A3
1427469_at	helicase with zinc finger domain	Helz	0,00319015	-1,19583	chr11 E1
1456064_at	expressed sequence AI504432	AI504432	0,0250391	-1,19567	chr3 F2.3
1426395_s_at	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit J	Eif3j	0,0111195	-1,1952	chr2 E5
1416075_at	salvador homolog 1 (Drosophila) /// similar to WW45 protein	LOC100048168 /// Sav1	0,00112398	-1,1915	chr12 C3

1417069_a_at	glia maturation factor, beta	Gmfb	0,0246661	-1,19098	chr14 C1
1426593_a_at	F-box protein 22	Fbxo22	0,0015031	-1,19012	chr9 C
1423427_at	adenylate cyclase activating polypeptide 1	Adcyap1	0,00248834	-1,18417	chr17 E5
1448665_at	dystrophin, muscular dystrophy	Dmd	0,0206658	-1,18256	chrX C
1435747_at	fibroblast growth factor 14	Fgf14	0,0126557	-1,18055	chr14 E5
1429776_a_at	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 6	Dnajb6	0,0240112	-1,17783	chr5 B1
1456700_x_at	myristoylated alanine rich protein kinase C substrate	Marcks	0,0216242	-1,17594	chr10 B1
1456244_x_at	glutaredoxin 3	Glr3	0,0356115	-1,17542	chr7 F5
1453589_a_at	RIKEN cDNA 6820431F20 gene	6820431F20Rik	0,0398036	-1,17378	chr8 A1.3
1423531_a_at	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	Hnrnpa1	0,0229746	-1,17359	chr15 F3
1424602_s_at	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4	Xrcc4	0,0315369	-1,17355	chr13 C3
1428871_at	RIKEN cDNA 4121402D02 gene	4121402D02Rik	0,012567	-1,17347	chr11 D
1420091_s_at	microorchidia 3	Morc3	0,0274561	-1,17344	chr16 C4
1455433_at	RIKEN cDNA 3110048L19 gene	3110048L19Rik	0,00384025	-1,17317	chr17 A3.2
1448505_at	nuclear DNA binding protein	C1d	0,00194552	-1,17242	chr11 A2
1434940_x_at	regulator of G-protein signaling 19	Rgs19	0,00573852	-1,17062	chr2 H4
1451454_at	protocadherin 20	Pcdh20	0,0311943	-1,17034	chr14 E1
1453198_at	similar to Zinc finger protein 422, related sequence 1	LOC100043468	0,0195428	-1,16984	chr17 B1
1425485_at	myotubularin related protein 6	Mtmr6	0,0428883	-1,16732	chr14 D1
1423112_at	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3 (UBC4/5 homolog, yeast)	Ube2d3	0,0110994	-1,16472	chr3 G3
1427186_a_at	myocyte enhancer factor 2A	Mef2a	0,0229412	-1,16416	chr7 C
1427231_at	roundabout homolog 1 (Drosophila)	Robo1	0,0139008	-1,16273	chr16 C3.1
1428137_at	ADP-ribosylation factor-like 8B	Arl8b	0,00021417	-1,16174	chr6 E2
1417489_at	neuropeptide Y receptor Y2	Npy2r	0,00151067	-1,1609	chr3 E3
1433534_a_at	chaperonin subunit 2 (beta)	Cct2	0,0221982	-1,16085	chr10 D2
1422199_at	olfactory marker protein	Omp	0,0170138	-1,15942	chr7 E2
1426558_x_at	similar to zinc finger protein 14 /// similar to zinc finger protein 91	0610010B08Rik /// LOC100039017 /// LOC100043764	0,00592466	-1,15895	chr2 H4
1435368_a_at	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1	Parp1	0,0143153	-1,15825	chr1 H5
1450084_s_at	influenza virus NS1A binding protein	Ivns1abp	0,0132023	-1,15758	chr1 G2
1455981_at	ribosomal protein S6 /// similar to Ribosomal protein S6	LOC100043734 /// LOC216036 /// LOC236932 /// LOC545640 /// LOC623245	0,0379824	-1,15728	chr10 B5.1 /// chr11 B1.3 /// chr14 D3 /// chr17 E2 /// chr2 C3 /// chr2 E5
1427898_at	ring finger protein (C3H2C3 type) 6	Rnf6	0,0206987	-1,1558	chr5 G3
1424880_at	tribbles homolog 1 (Drosophila)	Trib1	0,0041646	-1,15442	chr15 D1
1437009_a_at	zinc finger protein 364	Zfp364	0,047153	-1,15359	chr3 F2.1
1422555_s_at	guanine nucleotide binding protein, alpha 13	Gna13	0,0190591	-1,15287	chr11 E1
1454725_at	transformer 2 alpha homolog (Drosophila)	Tra2a	0,0145057	-1,15207	chr6 B2.3

1420840_at	pleckstrin homology domain-containing, family A (phosphoinositide binding specif	Plekha3	0,0144901	-1,15065	chr2 D
1451998_at	taspase, threonine aspartase 1	Tasp1	0,0134777	-1,15009	chr2 F3
1424752_x_at	zinc finger protein 71, related sequence	Zfp71-rs1	0,0448328	-1,14946	chr13
1456088_at	X-linked inhibitor of apoptosis	Xiap	0,0270988	-1,14931	chrX A3-A5
1451620_at	C1q-like 3	C1ql3	0,0177615	-1,14882	chr2 A1
1416499_a_at	dynactin 6	Dctn6	0,0042628	-1,14797	chr8 A4
1426215_at	dopa decarboxylase	Ddc	0,0318077	-1,14766	chr11 A1-A4
1418304_at	protocadherin 21	Pcdh21	0,0200538	-1,14722	chr14 B
1451266_at	mitochondrial ribosomal protein L50	Mrpl50	0,00785368	-1,14695	chr4 B1
1428333_at	RIKEN cDNA 6530401D17 gene /// RIKEN cDNA 2900062L11 gene	2900062L11Rik /// 6530401D17Rik	0,0284009	-1,14639	chrX F1
1437195_x_at	mitogen-activated protein kinase 10	Mapk10	0,0252131	-1,14501	chr5 E5
1415941_s_at	zinc finger, AN1-type domain 2A	Zfand2a	0,0164232	-1,14496	chr5 G2
1419101_at	transcriptional regulator, SIN3A (yeast)	Sin3a	0,0296637	-1,14479	chr9 B
1454897_at	RIKEN cDNA 6330509M05 gene	6330509M05Rik	0,00713253	-1,1445	---
1424121_at	COMM domain containing 1	Comm1	0,0266682	-1,14449	chr11 A3.2
1452254_at	myotubularin related protein 9	Mtmr9	0,00670232	-1,14345	chr14 D1
1419821_s_at	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble	Idh1	0,0443534	-1,14232	chr1 C2
1449080_at	histone deacetylase 2	Hdac2	0,0352755	-1,14194	chr10 B1
1417188_s_at	ubiquitin-conjugating enzyme E2K (UBC1 homolog, yeast)	Ube2k	0,0308418	-1,14184	chr5 C3.1
1422936_at	MAS1 oncogene /// similar to MAS1 oncogene	LOC100048871 /// Mas1	0,00029737	-1,1417	chr17 A1
1436737_a_at	sorbin and SH3 domain containing 1	Sorbs1	0,046496	-1,13994	chr19 C3
1453175_at	zinc finger and BTB domain containing 25	Zbtb25	0,0255145	-1,13987	chr12
1428699_at	spermine synthase /// similar to spermine synthase	LOC671878 /// Sms	0,0158008	-1,13985	chrX A6 /// chrX F4
1455978_a_at	matrilin 2	Matn2	0,00908718	-1,13914	chr15 B3.3
1435494_s_at	desmoplakin	Dsp	0,0159192	-1,1387	chr13 A3.3
1434964_at	archaelysin family metallopeptidase 2	Amz2	0,00088472	-1,138	chr11 E1
1418029_at	Fas apoptotic inhibitory molecule	Faim	0,0360795	-1,13798	chr9 E3.3
1437565_a_at	guanine nucleotide binding protein-like 2 (nucleolar) /// similar to guanine nuc	Gnl2 /// LOC633966	0,0129841	-1,13773	chr4 D2.2
1453208_at	RIKEN cDNA 2700089E24 gene	2700089E24Rik	0,024601	-1,137	chr6 G1
1422713_a_at	ubiquitin-conjugating enzyme E2I /// similar to Chain A, Crystal Structure Of Hu	LOC100044900 /// Ube2i	0,0362413	-1,13677	chr17 A3.3
1422414_a_at	calmodulin 1 /// calmodulin 2 /// calmodulin 3	Calm1 /// Calm2 /// Calm3	0,0261629	-1,13641	chr12 E /// chr17 E4 /// chr7 A2
1426671_a_at	RNA binding motif protein 39	Rbm39	0,0127846	-1,13446	chr2 H1
1416152_a_at	splicing factor, arginine/serine-rich 3 (SRp20)	Sfrs3	0,00672928	-1,13312	chr17 A3.3
1417372_a_at	pellino 1	Peli1	0,0339672	-1,1324	chr11 A3.2
1449322_at	protein tyrosine phosphatase 4a1 /// protein tyrosine phosphatase 4a1-like	EG667723 /// LOC100044642 /// LOC100044742	0,0219722	-1,13206	chr1 B /// chr10 C1 /// chr19 C3 /// chr2 A3

1450874_at	matrin 3	Matr3	0,0380956	-1,13158	chr18 C
1451360_at	ERGIC and golgi 2	Ergic2	0,0358955	-1,131	chr6 G3
1460038_at	POU domain, class 3, transcription factor 1 /// similar to long overlapping ORF;	LOC100045707 /// Pou3f1	0,020756	-1,13035	chr4 D2.2
1450928_at	similar to Id4	LOC100045546	0,0391338	-1,12952	---
1427937_at	RIKEN cDNA 2610030H06 gene	2610030H06Rik	0,0241629	-1,1292	---
1416705_at	ribulose-5-phosphate-3-epimerase	Rpe	0,0369145	-1,12764	chr1 C3
1421052_a_at	spermine synthase /// similar to spermine synthase	LOC671878 /// Sms	0,0120586	-1,12685	chrX A6 /// chrX F4
1454984_at	leukemia inhibitory factor receptor	Lifr	0,0126294	-1,12675	chr15 A1
1450861_at	Fanconi anemia, complementation group C	Fancc	0,0497686	-1,12674	chr13 B3
1454993_a_at	splicing factor, arginine/serine-rich 3 (SRp20)	Sfrs3	0,00776696	-1,12594	chr17 A3.3
1421017_at	neuregulin 3	Nrg3	0,0147343	-1,12582	chr14 B
1425094_a_at	LIM homeobox protein 6	Lhx6	0,0461821	-1,12477	chr2 B
1418429_at	kinesin family member 5B	Kif5b	0,0108239	-1,12394	chr18
1425749_at	syntaxin binding protein 6 (amisyn)	Stxbp6	0,0260389	-1,12374	chr12 B3
1425562_s_at	tRNA nucleotidyl transferase, CCA-adding, 1	Trnt1	0,023232	-1,12332	chr6 E2
1455054_a_at	DCUN1D1 DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 1	Dcun1d1	0,0254214	-1,12192	chr3 B
1448248_at	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)	Crk	0,0235471	-1,12066	chr11 A-D
1418011_a_at	SH3-domain GRB2-like B1 (endophilin)	Sh3glb1	0,0480946	-1,11979	chr3 H2
1438045_at	early endosome antigen 1	Eea1	0,027056	-1,11894	chr10 C3
1415773_at	nucleolin	Ncl	0,0342846	-1,11893	chr1 D
1450757_at	cadherin 11	Cdh11	0,0391346	-1,11823	chr8 D2
1435089_at	RIKEN cDNA 2010111I01 gene	2010111I01Rik	0,0307064	-1,1177	chr13 B3
1424803_at	cDNA sequence BC020002	BC020002	0,0396636	-1,11669	chr6 A1
1423039_a_at	basic leucine zipper and W2 domains 1 /// similar to hCG2022736 /// similar to b	Bzw1 /// LOC382722 /// LOC667737	0,0423126	-1,11657	chr1 C2 /// chr11 E1 /// chr13 A1
1417340_at	glutaredoxin 3	Glxr3	0,0381876	-1,1155	chr7 F5
1448760_at	zinc finger protein 68	Zfp68	0,0289143	-1,11476	chr5 G2
1418326_at	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5 /	LOC100047619 /// Slc7a5	0,0395248	-1,11303	chr8 E1
1416426_at	RAB5A, member RAS oncogene family	Rab5a	0,046423	-1,11298	chr17 C
1426676_s_at	translocase of outer mitochondrial membrane 70 homolog A (yeast)	Tomm70a	0,0443669	-1,11216	chr16 C1.1

---

## **Anexo II**





## Tau – an inhibitor of deacetylase HDAC6 function

Mar Perez,<sup>\*,†††1</sup> Ismael Santa-Maria,<sup>\*,\*\*†1</sup> Elena Gomez de Barreda,<sup>\*</sup> Xiongwei Zhu,<sup>†</sup> Raquel Cuadros,<sup>\*</sup> Jose Roman Cabrero,<sup>‡,‡‡</sup> Francisco Sanchez-Madrid,<sup>‡,‡‡</sup> Hana N. Dawson,<sup>§</sup> Michael P. Vitek,<sup>§</sup> George Perry,<sup>†,¶¶</sup> Mark A. Smith<sup>†</sup> and Jesus Avila<sup>\*,\*\*</sup>

<sup>\*</sup>Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM), Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

<sup>†</sup>Department of pathology, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, USA

<sup>‡</sup>Departamento de Biología Vasculare e Inflamación, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid, Spain

<sup>§</sup>Division of Neurology, Duke University, Durham, North Carolina, USA

<sup>¶¶</sup>College of Science, University of Texas at San Antonio, Texas, USA

<sup>\*\*</sup>CIBERNED, Madrid, Spain

<sup>††</sup>Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid, Spain

<sup>‡‡</sup>Servicio de Inmunología, Hospital de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, 28006 Madrid, Spain

### Abstract

Analysis of brain microtubule protein from patients with Alzheimer's disease showed decreased alpha tubulin levels along with increased acetylation of the alpha tubulin subunit, mainly in those microtubules from neurons containing neurofibrillary tau pathology. To determine the relationship of tau protein and increased tubulin acetylation, we studied the effect of tau on the acetylation-deacetylation of tubulin. Our results indicate that tau binds to the tubulin-deacetylase, histone deacetylase 6 (HDAC6), decreasing its activity with a conse-

quent increase in tubulin acetylation. As expected, increased acetylation was also found in tubulin from wild-type mice compared with tubulin from mice lacking tau because of the tau-mediated inhibition of the deacetylase. In addition, we found that an excess of tau protein, as a HDAC6 inhibitor, prevents induction of autophagy by inhibiting proteasome function.

**Keywords:** Alzheimer's disease, histone deacetylase, tau, tubulin acetylation.

*J. Neurochem.* (2009) **109**, 1756–1766.

Neurons are highly polarized cells with a clear asymmetric morphology that is needed for their function. A major determinant of neuronal morphology is the cytoskeleton composed of microfilaments, neurofilaments, and microtubules. Microtubules, polymers of the protein tubulin, are especially abundant in neurons and they have a direct participation in the maintenance of neuronal polarity, through the stabilization of the microtubule structure (Avila 1990). That stabilization takes place, in part, by the presence of a group of proteins that co-purify with tubulin, the microtubule-associated proteins (MAPs) (Caceres and Kosik 1990). One of these MAPs, the tau protein (Kanai *et al.* 1992), is a major microtubule-stabilizing factor (Drubin and Kirschner 1986; Caceres and Kosik 1990; Kanai *et al.* 1992; Takemura *et al.* 1992); although its function can be complemented by other MAPs as mice lacking tau are viable (Harada *et al.* 1994; Dawson *et al.* 2001). In addition to MAPs, microtubule stabilization is correlated with the presence of post-translational modifications of tubulin, one of them being

tubulin acetylation at residue 21 of the alpha subunit of tubulin (LeDizet and Piperno 1987). Acetylated tubulin has been found in very stable microtubules (Maruta *et al.* 1986; Piperno *et al.* 1987); however, acetylation, *in vitro* nor *in vivo*, does not seem to be the cause of microtubule stabilization, but rather a consequence of this process (Schulze *et al.* 1987). Analysis of tubulin acetylation *in vitro*

Received January 27, 2009; revised manuscript received March 31, 2009; accepted April 1, 2009.

Address correspondence and reprint requests to Jesus Avila, Facultad de Ciencias, Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Universidad Autónoma de Madrid, Campus de Cantoblanco, Madrid 28049, Spain. E-mail: javila@cbm.uam.es

<sup>1</sup>These two authors contributed equally to this work.

**Abbreviations used:** AD, Alzheimer's disease; AL, acetylated lysine; BSA, bovine serum albumin; GFP, Green Fluorescent Protein; HDAC, histone deacetylase 6; HEK, human embryonic kidney cells; MAPs, microtubule-associated proteins; NFTs, neurofibrillary tangles; PHFs, paired helical filaments.

showed that the specific enzyme that acetylates tubulin has a greater affinity for the polymeric form of tubulin than for the monomeric form (Maruta *et al.* 1986). More recently, it has been indicated that this enzyme could be a component of the histone acetyltransferase elongator complex (Creppe *et al.* 2009). On the other hand, the level of tubulin acetylation is the consequence of the equilibrium between acetylases and deacetylases. At least two types of deacetylases act on acetylated tubulin (North *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2003), the most studied being histone deacetylase 6 (HDAC6) (Zhang *et al.* 2003). HDAC6 is expressed in most neurons, but mainly in Purkinje cells (Southwood *et al.* 2007). Tubulin acetylation, regulated by HDAC6, enhances recruitment of kinesin 1 to microtubules and leads to an increased vesicle transport and subsequent release of brain-derived neurotrophic factor (Reed *et al.* 2006; Kazantsev and Thompson 2008). However, while HDAC6 knockout mice have hyperacetylated tubulin, they are viable and develop normally, without neurological abnormalities (Zhang *et al.* 2008). Another function of HDAC6 is as a component of the aggresome (Kawaguchi *et al.* 2003); cells deficient in HDAC6 fail to clear misfolded protein aggregates from the cytoplasm as they cannot form functional aggresomes.

In some neurodegenerative disorders, known as tauopathies [i.e., Alzheimer's disease (AD)], there are changes in neuronal morphology. In these disorders, hyperphosphorylated tau no longer binds with the same affinity to tubulin, and instead aggregates into filaments (Avila *et al.* 2004). Recently, increased tubulin acetylation has been demonstrated in neurons containing neurofibrillary (tau) pathology in cases of AD (Zhu *et al.* 2007). Increased tubulin acetylation, which could stabilize microtubules, may reflect a compensatory response to the reduced tau binding to microtubules. Alternatively, another mechanism could be responsible for tau acetylation that is related to the impairment in tau function. In the latter case, it would be of interest to know what the consequence of tubulin acetylation in the absence of tau protein.

In the present study, we compared the level of tubulin acetylation in mice lacking tau protein with wild-type mice. Our results suggest that tau protein can act as a deacetylase inhibitor by directly interacting with HDAC6. At the time of preparation, a report indicating a direct interaction of tau with HDAC6 in human cells was published (Ding *et al.* 2008). HDAC6 has two main functions, both as a deacetylase and as a component of the aggresome (Yang and Seto 2008). In this study, we found that tau protein can interfere with both HDAC6 activities.

## Materials and methods

### Antibodies

The antibodies used in this study were the phosphorylation-independent 7.51 monoclonal antibody (1 : 100; kindly provided

by Dr. C. M. Wischik, Aberdeen, UK); Tau-5, a monoclonal antibody against the non-phosphorylated form of tau (1 : 1000; Calbiochem, San Diego, CA, USA); Tau-1, a monoclonal antibody against unphosphorylated tau (1 : 1000; Chemicon, Temecula, CA, USA); the monoclonal antibodies directed against  $\alpha$ -tubulin and acetylated  $\alpha$ -tubulin from Sigma (St Louis, MO, USA); anti-HDAC6 (H-300; rabbit polyclonal, 1 : 10, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); LC3 antibody (Sigma) and rabbit polyclonal directed against acetylated lysine (AL, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA) residues.

### Human brains

#### Tissue section preparation

CNS tissue samples were obtained from postmortem of patients ( $n = 8$ , age: 72–83 years) with histopathologically confirmed AD as well as from non-AD young and aged-matched controls ( $n = 7$ , age: 69–85 years), both groups with comparable postmortem intervals. Tissue was fixed in methacarn (methanol : chloroform : acetic acid in a 6 : 3 : 1 ratio) by immersion for 24 h at 4°C. Tissue was subsequently dehydrated through graded ethanol and xylene solutions and embedded in paraffin. Six  $\mu\text{m}$  thick microtome sections were prepared and placed on silane-coated slides.

#### Immunocytochemistry

Following hydration, sections were immunostained by the peroxidase–antiperoxidase procedure (Zhu *et al.* 2000) using affinity-purified rabbit polyclonal antibody to AL residues (Upstate Biotechnology). Immunoreactivity was enhanced by formic acid (70%, 5 min) pre-treatment, presumably because of the unmasking of a previously occult epitope. Adjacent sections were also immunostained with a tau antibody to locate the neurofibrillary tangles (NFTs). To verify the specificity of immunolabeling, adsorption experiments were performed by pre-incubating the antibody with 1 mg/mL of acetylated bovine serum albumin (BSA) protein. Furthermore, in order to assess the specificity of the adsorption, AT8 antisera was also incubated with the acetylated BSA protein and then applied to the section. Double immunolabeling with AL and AT8 was performed to resolve the temporal and spatial nature of the acetylation modifications. A mouse monoclonal antibody to alpha tubulin (Sigma) was also used in adjacent sections along with anti-AL double staining to confirm the specificity of the AL antibody for tubulin.

### Animals

Generation of the mouse line tau<sup>-/-</sup> was previously described (Dawson *et al.* 2001). Transgenic mice were genotyped by PCR. Transgenic animals as well as wild-type mice (C57BL/6) were bred at the Centro de Biología Molecular ‘Severo Ochoa’ (Madrid, Spain) and maintained following the institutional guidelines. 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 7:00 AM.

### Cell cultures

Primary cultures of hippocampal neurons were prepared according to established procedures with slight modifications (Hernandez *et al.* 2004). Briefly, hippocampal tissue was obtained from E18 mouse embryos, dissected, and dissociated with the Papain

Dissociation System (PDS; Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA). Neurons were maintained in Neurobasal medium (Gibco, Grand Island, NY, USA) supplemented with 1% B-27, 1% N2, 0.5 mM glutamine, 100 units/mL penicillin, and 100 mg/mL streptomycin, and grown on poly-L-lysine (100 mg/mL) plus laminin (10 µg/mL) coated plastic dishes. The cells were incubated in 95% air/5% CO<sub>2</sub> in a humidified incubator at 37°C. Human embryonic kidney (HEK293) and tau-expressing HEK293 cells were cultured as previously described (Santa-Maria *et al.* 2007). To induce autophagy, cells were incubated with 25 µM MG262 (Biomol International, Plymouth Meeting, PA, USA). The induction was assessed by measuring LC3 levels (Iwata *et al.* 2005). For cultured cells and neurons Tubacin was added to a final concentration of 2 µM (Cabrero *et al.* 2006).

#### Staining of autophagosomes

Human embryonic kidney cells and HEK293 tau cells were transfected with a Green Fluorescent Protein (GFP)-LC3 expression plasmid (Garcia-Escudero *et al.* 2008). After 24 h, the cells were treated with MG262, a proteasome inhibitor, and the GFP-LC3 pattern was observed under an LSM510 confocal microscope (Carl Zeiss S.A., Madrid, Spain).

#### Lentiviral vector and virus preparation

The lentiviral vector was constructed on the backbone of pLVFrat (Fleming *et al.* 2005). The Frataxin cDNA was removed from this vector using *XhoI* and *SalI* restriction enzymes. The cDNA encoding the tau isoform 4R2N (Spillantini and Goedert 1998) was excised from plasmid pLVGFPtau (previously constructed) as an *XhoI-SalI* fragment. This fragment was then subcloned into the *XhoI-SalI* sites of the pLVFrat vector. The correct orientation and integrity of the tau open reading frame in the final construct was confirmed by restriction fragment analysis and sequencing. The resultant lentiviral vector was designated pLVtau. The viral particles were produced as described previously for both pLVGFP and pLVtau (Deglon *et al.* 2000).

#### HDAC activity assay

Histone deacetylase activity was measured using a fluorimetric HDAC assay kit (ab1438; Abcam, Cambridge, United Kingdom) according to manufacturer's instructions. Depletion of HDAC6 activity in the cell extract was carried out by incubation of the extract with an HDAC6 antibody (Santa Cruz Biotechnology) absorbed on nitrocellulose, overnight at 4°C. In parallel, the same treatment was carried out by incubating the extract with albumin absorbed into nitrocellulose. After incubation, HDAC activity in the extract was measured by fluorimetry. In addition, HDAC activity *in vitro* was measured in the absence or presence of 1 µM tubacin, a specific HDAC6 inhibitor (Estiu *et al.* 2008; Cabrero *et al.* 2006). Purified human HDAC6 (Gu and Roeder 1997; Ito *et al.* 2002) was obtained from Biomol International and assayed with the kit of the same company.

#### Protein extraction and western blotting

One half of the mouse hippocampus was disrupted in a Dounce homogenizer in 3 mL of buffer H (Tris-HCl 10 mM, EGTA 1 mM, NaCl 0.8 M, 10% sucrose, pH 7.4) containing a protease inhibitor cocktail, orthovanadate, NaF, and okadaic acid. This homogenate was stored frozen at -70°C and used for immunoblot

analysis. Samples were run on 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and electrophoretically transferred to a nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Germany). The membrane was blocked by incubation with 5% semi-fat dried milk in phosphate-buffered saline and 0.1% Tween 20, followed by incubation for 1 h at 20–22°C with the primary antibody in phosphate-buffered saline and 0.1% Tween 20. The dilutions of the primary antibodies are as follows: α-tubulin, 1 : 1000, and acetylated α-tubulin, 1 : 1000. After three washes, the membranes were incubated with a horseradish peroxidase anti-rabbit or anti-mouse Ig conjugate (DAKO, Barcelona, Spain), followed by several washes in phosphate-buffered saline and Tween 20. The membranes were then incubated for 1 min in Western Lightning reagents (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA, USA).

#### Isolation of PHFs

Paired helical filaments (PHF) were isolated by preparation of sarkosyl-insoluble extracts and the isolated PHF were characterized by electron microscopy as previously indicated (Greenberg and Davies 1990; Hernandez *et al.* 2002).

#### Immunoprecipitation

For isolation of the tau/HDAC6 complexes from mouse brain tissue, 100 µL of brain extract plus 40 µL of Protein G Sepharose beads were incubated at 4°C. After 1 h, the mixture was centrifuged for 10 min at 4°C. For immunoprecipitation, the supernatant was incubated overnight with the following tau antibodies: 7.51, Tau-1, and Tau-5. Protein G-Sepharose-isolated immune complexes were washed three times with assay buffer, boiled in 2× sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer for 5 min, and further analyzed by western blot with either 7.51, tau-1, or HDAC6 antibodies.

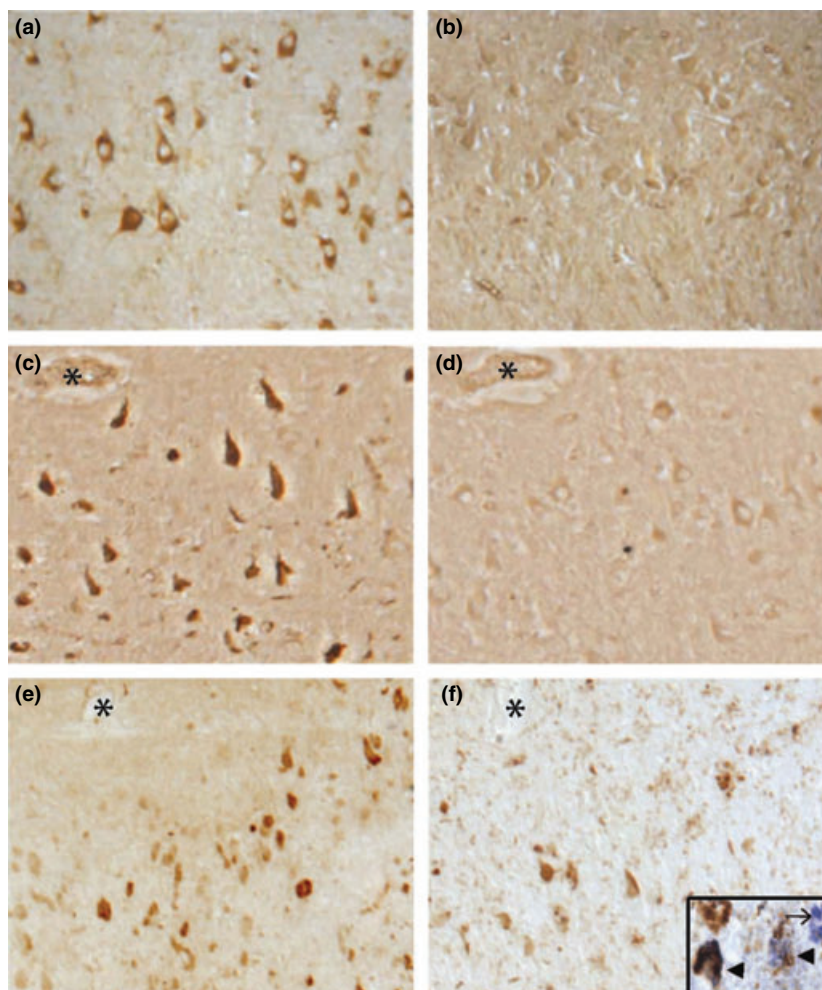
#### Statistical analysis

Comparisons were performed using Student's *t*-test, and values were considered significant at *p* < 0.05.

## Results

### Increased tubulin acetylation in the brain of Alzheimer's disease patients

The mechanism underlying tau pathology in neurons from AD patients is not fully understood. It has been proposed that tau pathology involves tau phosphorylation and the subsequent formation of tau aggregates. This may result in microtubule destabilization, and presumably, a decrease in the number of acetylated microtubules. However, as indicated in Fig. 1, the opposite was found; tubulin acetylation was increased in AD. Acetyl lysine (AL) immunolabeling in AD was present in two distinct forms, first, within intracellular NFTs (Fig. 1c), and second, as homogenous cytoplasmic staining in hippocampal pyramidal neurons (Fig. 1a). The cytoplasmic phenotype was more prominent in the CA3/4 region while the neurofibrillary pathology predominated in



**Fig. 1** Presence of acetylated lysine in neurons from patients with Alzheimer disease (AD). (a and b) Representative cytoplasmic anti-AL staining in AD (a) and control (b). In addition to the cytoplasmic labeling, all cases of AD showed distinct staining of neurofibrillary tangles (NFTs) (c), which is completely abolished following adsorption with antigen (d, \*marks the same vessel in adjacent sections). Serial sections stained with AL (e) and AT8 (f) show that AL is present in greater numbers of NFT (\*marks the same vessel in adjacent sections). In the inset of (f) double-immunostaining shows that AL (blue) is present alone in some NFT (arrow) while other NFT display both AT8 (brown) and AL (arrowheads).

the CA1 region. In the age-matched control cases, only two cases displayed AL immunoreactivity. Both cases contained mild cytoplasmic staining in neuronal cell bodies but lacked NFTs and NFT-associated staining with double-label immunocytochemistry (Fig. 1b).

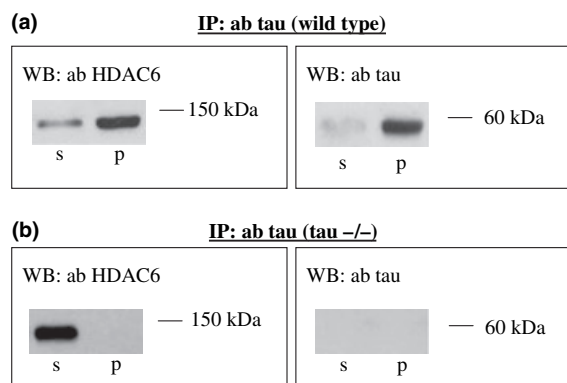
Absorption using acetylated BSA protein completely abolished the AL immunoreactivity (Fig. 1d). Double immunolabeling with AT8 and AL showed the presence of AL immunoreactivity alone in some neurons, and the colocalization of AL and AT8 in some neurons containing neurofibrillary pathology (Fig. 1f, inset). The presence of AT8 immunoreactivity alone was seen in some neurons, but AL was found in greater numbers of neurons than AT8 as shown in adjacent sections stained with AL and AT8 (Fig. 1e and f).

One possible explanation for this result is that the tau protein participates in the regulation of tubulin acetylation, which is the consequence of equilibrium between acetylases and deacetylases. Tubulin deacetylases have been well characterized, so we determined whether tau could bind to any of the tubulin deacetylases, as recently reported (Ding *et al.* 2008).

#### Histone deacetylase 6 co-immunoprecipitates with tau protein in a mouse brain extract

There are several deacetylases, but HDAC6 is one of the few that deacetylates acetylated alpha-tubulin and is present in the cytoplasm of neurons (Hubbert *et al.* 2002). In a recent study using human cells, an interaction between tau and HDAC6 was reported (Ding *et al.* 2008). In that work, the interaction of tau and HDAC6 was shown to take place through the SE14 domain present in HDAC6, which binds to the tubulin binding domain present in the tau protein. The SE14 domain is located in the HDAC6 molecule between the catalytic moiety involved in deacetylation (Yang and Seto 2008) and the region involved in the binding to polyubiquitin that has been related to aggresome formation (Hook *et al.* 2002). Although the whole SE14-repeat domain was described in human HDAC6, a partially homologous sequence is present in mice (Yang and Seto 2008).

Consequently, we determined whether tau co-immunoprecipitates with the major tubulin deacetylase (HDAC6) (Hubbert *et al.* 2002; Zhang *et al.* 2003) in a mouse brain extract. HDAC6 co-immunoprecipitated with tau from a cellular wild-type mouse brain extract (Fig. 2a). In contrast,



**Fig. 2** Co-immunoprecipitation (IP) of HDAC6 and tau protein. A brain cell extract from wild-type tau (a) or from tau<sup>-/-</sup> (b) mice was immunoprecipitated with tau antibodies (ab). After IP, the immunoprecipitate was isolated by centrifugation (pelleted fraction) and the presence of HDAC6 and tau protein in the non-pelleted (s) and pelleted (p) fractions was determined by western blotting (WB).

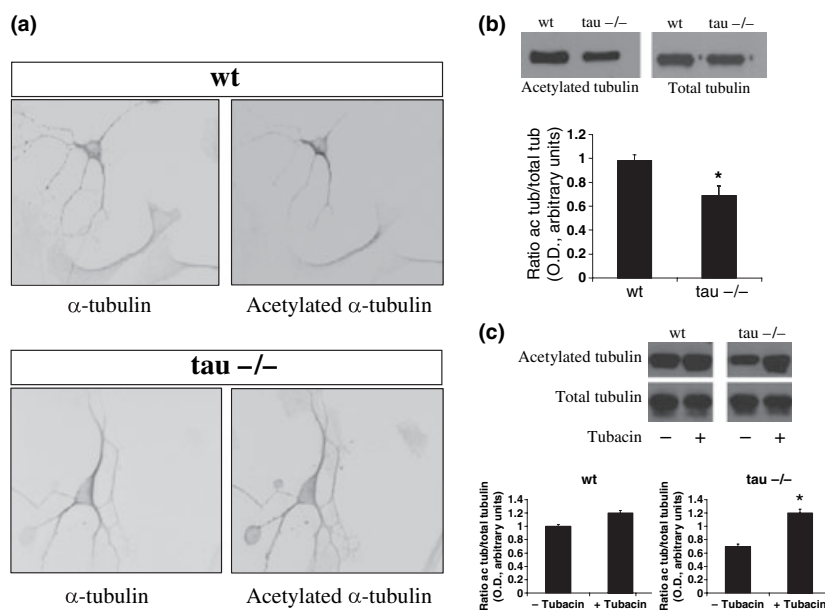
HDAC6 remained in the soluble fraction when the immunoprecipitation analysis was performed with tau antibody but using a brain extract from tau<sup>-/-</sup> mice (Fig. 2b). This result suggests that there is an interaction between tau and HDAC6, as previously suggested using human cells (Ding *et al.*

2008). In addition, our results suggest that the partial SE14 sequence domain present in mice may be sufficient for tau binding.

Next we tested whether the binding of tau to HDAC6 results in the modification of either of the two HDAC6 functions, its deacetylase activity or its role in aggresome formation. To that end, we used two model systems, mouse neuronal cells lacking or containing tau, and for biochemical studies that require a higher amount of cells, a non-neuronal human cell line lacking or expressing human tau protein. These studies were complemented with some *in vitro* analysis.

### Decrease in tubulin acetylation in mice lacking tau protein neurons

Primary cultures of hippocampal neurons from mice lacking or containing tau protein were obtained and the level of tubulin acetylation was determined by immunofluorescence. Figure 3a shows a decrease in acetylated tubulin in the cells obtained from tau-deficient mice compared with those from wild type. If the tau protein inhibits tubulin deacetylation, tubulin will be more acetylated in the presence of tau protein. This result was confirmed by western blot analysis as shown in Fig. 3b. There was a higher level of tubulin acetylation in cell extracts from tau containing mice compared with those



**Fig. 3** Decreased level of tubulin acetylation in neurons from tau-deficient mice. (a) Cortical neurons from wt and tau<sup>-/-</sup> mice were immunostained with an antibody against tubulin that recognizes the whole  $\alpha$ -tubulin subunit (left panel) or with an antibody that only reacts with acetylated  $\alpha$ -tubulin (right panel). (b) Western blot (WB) and quantitation for acetylated and total tubulin from wild-type (wt) and tau-deficient mice (tau<sup>-/-</sup>). The average of at least three separate

experiments are indicated. \**p* < 0.05 compared with wt neurons. (c) The levels of acetylated tubulin in neurons from wt and tau<sup>-/-</sup> mice in the absence or presence of 2  $\mu$ M tubacin are shown. Quantitation of (c) is indicated. The average of at least three separate determinations is indicated. \**p* < 0.05 compared with control neurons without tubacin treatment.

lacking tau protein; quantitation of total tubulin and tau protein for wild-type and tau<sup>-/-</sup> mice is shown (Fig. 3b and c) (Matsuyama *et al.* 2002; Tran *et al.* 2007).

In addition, cortical neurons from wild-type and tau<sup>-/-</sup> mice were infected with lentivirus expressing GFP protein or tau protein. Only when the tau protein was expressed through lentivirus transduction was an increase in tubulin acetylation observed (Fig. S1). This result agrees well with the previous data.

On the other hand, the effect of tau on tubulin acetylation could be mimicked by the addition of tubacin, a specific HDAC6 inhibitor. Figure 3c shows this effect of treatment with tubacin, which suggests that tau can act as a HDAC inhibitor (see below).

### Increase in tubulin acetylation in human cells over-expressing tau protein

To determine whether an increase in tau expression can cause the opposite effect of tau depletion on tubulin acetylation, we have compared the levels of tubulin acetylation in HEK293 cells, which do not express tau, with those of tau-expressing HEK293 cells. We tested human cells as the binding of human tau to human HDAC6 may be stronger than that of the mouse homologue (Ding *et al.* 2008) (Yang and Seto 2008).

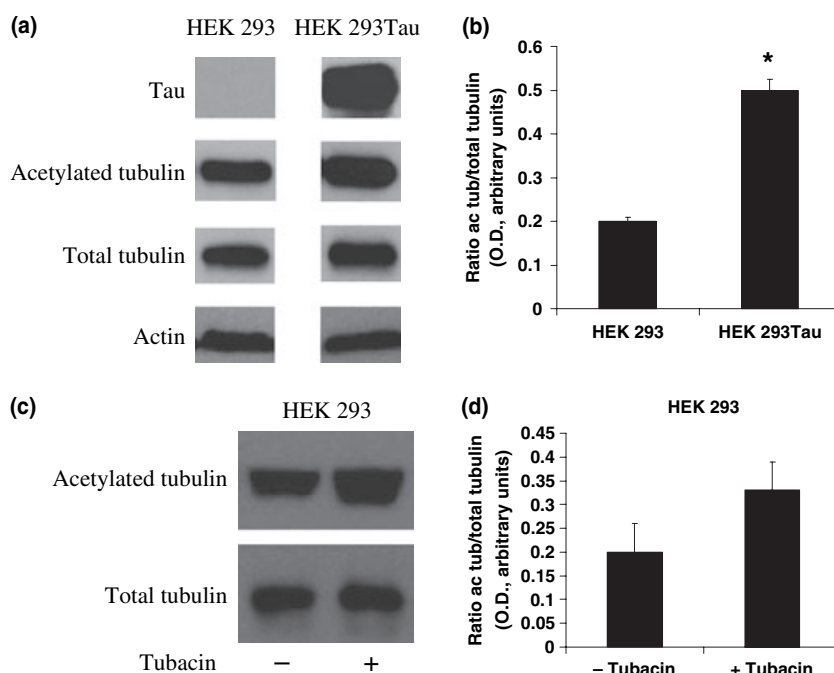
Figure 4 shows a clear increase in the level of tubulin acetylation in tau-expressing HEK293 cells compared with the level of tubulin acetylation in tau lacking cells. Again, addition of tubacin to HEK293 cells mimics the effect of tau expression (Fig. 4c).

### Tau is a deacetylase inhibitor

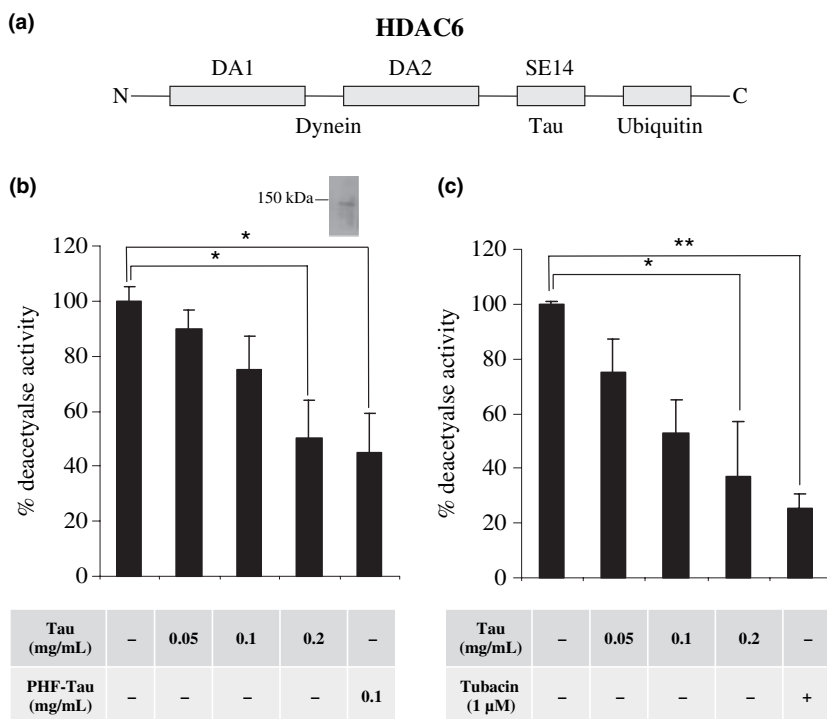
A consequence of the tau–HDAC6 interaction could be the direct inhibition of the deacetylase activity of HDAC6. To test this possibility, we produced a human cell extract (HeLa) that contains HDAC6 (Fig. 5b, inset) and mixed it with human tau. Then we have determined whether tau has an inhibitory effect on deacetylase activity (Fig. 5). To determine whether tau action on HDAC activity was mainly through HDAC6, this enzyme was immunodepleted from the extract. Figure S2 shows that after incubation with HDAC6 antibody (see Materials and methods), a decrease in total HDAC activity to around 52% of the initial activity was found. When tau was added to the HDAC6 depleted fraction, an additional inhibition of HDAC activity was observed (Fig. S2).

Histone deacetylase 6 has two catalytically active deacetylase domains (Fig. 5a), DAC1 and DAC2, which both have HDAC activity. However, only DAC2 is responsible for alpha-tubulin deacetylase activity, the activity that is specifically inhibited by tubacin (Haggarty *et al.* 2003).

Tau protein decreased deacetylase activity in a concentration-dependent manner (Fig. 5). A maximum inhibition of 65% of total HDAC6 was found at 0.2 mg/mL of tau protein. At higher concentrations the effect was partially reversed and less HDAC inhibition was found (not shown). As mentioned in Fig. 1, intracellular NFTs composed of tau and an increase in the level of protein acetylation in AD neurons was found. Therefore, we determined whether aggregated tau (from PHF) had an effect on HDAC activity. Figure 5b indicates that PHF-tau inhibits HDAC activity with a slighter higher



**Fig. 4** Increased level of tubulin acetylation in cells over-expressing tau protein. (a) The levels of acetylated tubulin in human HEK293 or tau-expressing HEK293 cells were measured by WB together with those of tau protein, total tubulin or actin. (b) The quantitation of the results in Panel a are shown. (c) The levels of acetylated tubulin in human HEK293 cells in the absence or presence of 2 μM tubacin are also shown. (d) Quantitation of (c) is indicated. The average of at least three separate determinations is indicated. \* $p < 0.01$  compared with HEK293 cells.



**Fig. 5** Tau inhibits HDAC activity. (a) Scheme of human HDAC6 molecule showing its different domains and protein binding sites. (b) HeLa cell extract, showing a high HDAC activity, was incubated with increasing amounts of monomeric tau protein or tau assembled into PHFs. Inset shows the presence of HDAC6 in the HeLa cell extract. (c) Effect of increasing amounts of tau or tubacin addition on purified HDAC6 (0.1 mg/mL). The average of at least three separate experiments is indicated. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared with control.

efficiency that monomeric tau. Although, the HDAC6 interaction with monomeric tau takes place through the microtubule binding region of tau protein (Ding *et al.* 2008) which is partially masked in tau aggregates (Perez *et al.* 1996), we suggest that an alternate interaction of PHF-tau with HDAC6, because of the presence of ubiquitinated tau in PHF protein, may result from the interaction of ubiquitinated residues with the HDAC6 C-terminal region.

All these data suggest that tau behaves as an HDAC6 inhibitor, although we have ruled out the possibility that tau inhibits other HDACs. Finally, we tested the action of purified tau on purified HDAC6. Figure 5c shows that HDAC6 deacetylase activity decreases in the presence of tau protein as well as in tubacin (positive control).

#### Tau inhibits HDAC6 function in aggresome formation

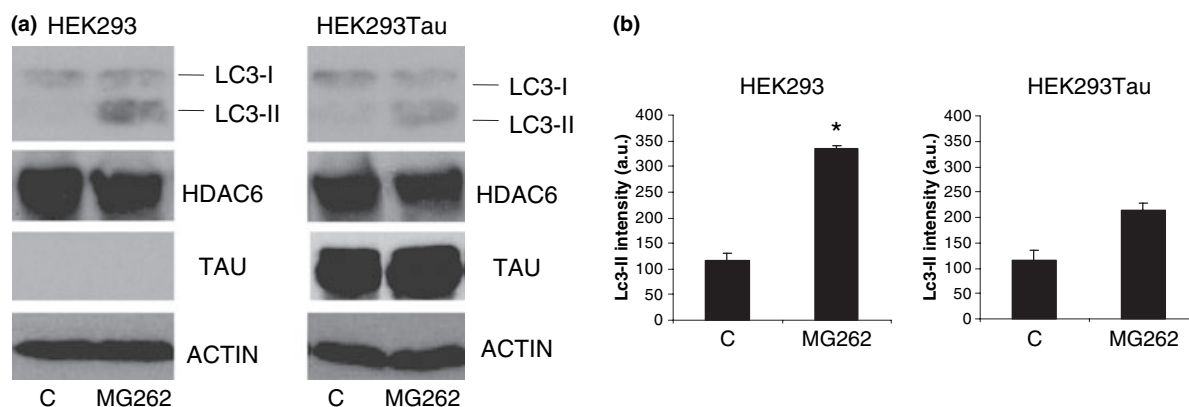
Histone deacetylase 6 has two functions: a deacetylase activity and a role as a component of the aggresome complex (Kawaguchi *et al.* 2003). It has been suggested that the two functions are coupled (Caron *et al.* 2005). It is known that polyubiquitinated proteins, together with a dynein complex, bind to HDAC6 prior to aggresome formation (Kawaguchi *et al.* 2003), a process that may be required for autophagic degradation of aberrant aggregated proteins like huntingtin (Iwata *et al.* 2005). Indeed, when the proteasome, a complex that degrades cytosolic proteins, was inhibited, undegraded proteins could interact with other proteins, leading to the formation of a complex of protein aggregates, aggregates that can be destroyed via the aggresome (autophagic) pathway

(Pandey *et al.* 2007). After formation, the pre-aggresomal particles were transported close to the nuclear membrane, forming a cellular garbage bin-like structure known as the aggresome; one component of this pathway is HDAC6 (Kawaguchi *et al.* 2003). Thus, inhibition of the proteasome may induce autophagy if HDAC6 is not inhibited. Formation of protein aggregates that will be located close to the nuclear membrane (aggresomes) can be induced by proteasome inhibition resulting in autophagy.

In HEK cells we followed autophagy induction by proteasome inhibition (Rubinsztein 2007) using LC3II, an established indicator of autophagy activation (Kabeya *et al.* 2000). Thus, LC3II levels were assessed in HEK cells (in the presence or absence of tau expression), exposed to the proteasome inhibitor MG262. Figure 6 shows an increase in the level of LC3II in those cells treated with the proteasome inhibitor not expressing the tau protein. In contrast, LC3II was not increased in tau-expressing cells, suggesting that the effect of tau on HDAC6 prevents autophagy induction. Also, the formation of protein aggregates located close to the nuclear membrane (aggresome) was reduced in cells over-expressing the tau protein, as determined by the localization of LC3II in the presence of MG 262 (Fig. S3).

#### Discussion

In the present study, we described a novel function for the tau protein through its interaction with HDAC6. Tau acts as both a deacetylase inhibitor and as an inhibitor of the aggresome



**Fig. 6** Differences in LC3II levels between cells lacking or over-expressing tau protein, upon proteasome inhibition. (a) Autophagy was induced by proteasome inhibition after addition of MG262 to HEK293 or tau-expressing HEK293 expressing cells. After incubation for 8 h in the presence of the inhibitor, the cells were disrupted

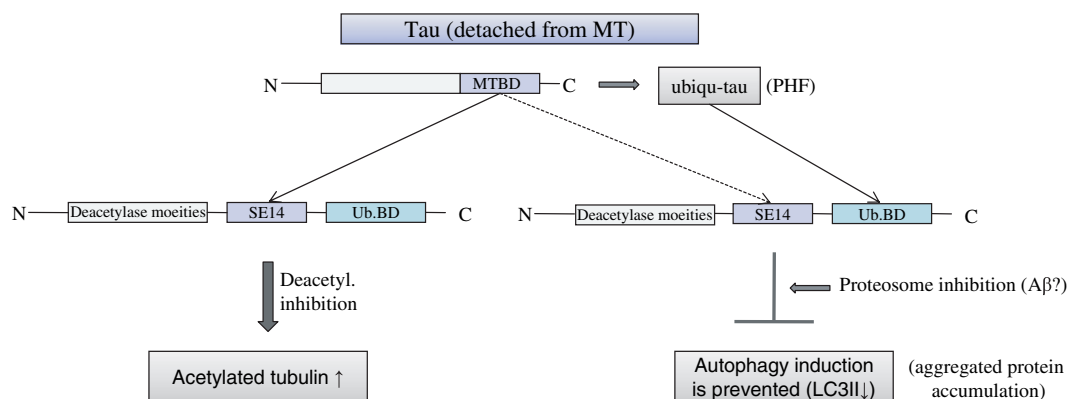
and the levels of LC3II were measured by western blot. The levels of HDAC6, tau, and actin were measured in parallel. (b) Quantitation of the data for LC3II in HEK293 and HEK293 tau-expressing cells is shown. \* $p < 0.05$  compared with control cells without MG262 treatment.

pathway. Using *in vitro* assays of deacetylase activity or by measurement, from the amount of acetylated tubulin by immunofluorescence and western blot in cells from mouse lacking tau protein or in human cells over-expressing tau protein, we observed that tau inhibits the deacetylase activity of HDAC6. These results are consistent with previous observations (Takemura *et al.* 1992), indicating increased tubulin acetylation in cells transfected with tau cDNA and with those demonstrating that over-expression of tau in transgenic mice dramatically increases the level of acetylated microtubules, especially in neuronal cell bodies (Nuydens *et al.* 2002). These results may explain the increase of acetylated tubulin in the brain of AD patients, where an increase of total tau was observed (Kopke *et al.* 1993). However, they disagree with the observation that in AD brains, tubulin acetylation is reduced in neurons containing

NFTs (Hempfen and Brion 1996). However, that study did not investigate acetylated tubulin in non-AD age-matched controls.

As our marker to follow acetylation and deacetylation has been tubulin, and one of the main deacetylases described for acetylated tubulin is HDAC 6 (Zhang *et al.* 2003), we determined whether deacetylase interacts with the tau protein. Our results indicate an interaction between tau and HDAC6 proteins in mouse cells. This observation supports a recent report indicating a similar interaction in human cells (Ding *et al.* 2008).

Nevertheless, the consequences of that interaction were more evident in human than in mouse cells. This may be because of a weaker binding of tau to mouse HDAC6 than to human HDAC6 as the tau binding region in human HDAC6 is only partially present in the mouse (Yang and Seto 2008).



**Fig. 7** Tau inhibition of HDAC6. Tau inhibition of HDAC6 will result in an increase in the level of acetylated tubulin and in a decrease in proteasome-induced autophagy, measured by LC3II levels, both features could take place in AD. It should be noted that among the

compounds that could inhibit the proteasome, to induce autophagy, is beta amyloid peptide (Tseng *et al.* 2008). MT, Microtubule; MTBD, Microtubule Binding Domain.



Four classes of HDAC have been identified (Gregoret *et al.* 2004), HDAC6 is in class II, although the key catalytic residues have been conserved in class I, class II, and class IV of HDAC (Fantin and Richon 2007). Class III consists of homologues of yeast Sir 2, which is also a tubulin deacetylase (North *et al.* 2003; Southwood *et al.* 2007); however only HDAC6 is expressed in most neurons whereas the Sir 2 homologue is targeted to myelin sheaths (Southwood *et al.* 2007). Thus, HDAC6 is likely to be the tubulin deacetylase inhibited by the tau protein. This interaction, HDAC6 with tubulin, has been reported to be in a region located between two HDAC6 functional domains, those involved in tubulin deacetylase activity and in the binding to ubiquitinated proteins (Ding *et al.* 2008).

One of the consequences of the binding of tau to HDAC6 is a decrease in HDAC6 activity. As HDAC6 is the main tubulin deacetylase (Hubbert *et al.* 2002), in the presence of tau which inhibits the deacetylation of tubulin, the level of tubulin acetylation should increase as we observed. In a tauopathy like AD in which the level of total cytoplasmic tau increases (Kopke *et al.* 1993), an increase in tubulin acetylation should be expected as we found in this work. In addition, the binding of tau to HDAC6 will also impair autophagy of protein aggregates, measured by the level of LC3II (see model in Fig. 7). This, in turn, would result in the accumulation of tau aggregates as shown in Fig. 1.

Thus, we propose a novel function for the tau protein as an inhibitor of HDAC6. Interestingly, the consequences of increased tau on HDAC6 activity would not be expected to directly affect neuronal viability as HDAC6 knock-out mice are viable and develop without neurological abnormalities (Zhang *et al.* 2008). However, HDAC 6 inhibition may result in a toxic gain of function, for example, through the formation of aberrant protein aggregates that will accumulate when HDAC6 is inhibited (Iwata *et al.* 2005). Thus, we can hypothesize that the tau pathology found in AD results first in an increase in the amount of tau protein that is not bound to microtubules (Kopke *et al.* 1993). This increase in free cytoplasmic tau protein could facilitate its aggregation into PHF and, in addition, tau could inhibit HDAC6 resulting in an increase in tubulin acetylation and a decrease in autophagy that will result in the accumulation of tau aggregates. The tau aggregates will remain in those neurons, neurons that are characterized by the presence of acetylated tubulin and tau aggregates. Thus, we found that the presence of tau could regulate the different HDAC6 functions, resulting in an increase in tubulin acetylation and in a decrease in degradation of aggregated protein.

## Acknowledgments

This work was supported by grants from Spanish Plan Nacional, Comunidad de Madrid, Fundación Botín, CIBERNED, and an institutional grant Fundación Areces.

## Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Figure S1.** (a) Characterization of protein expression in wild-type and tau<sup>-/-</sup> neurons by using antibodies against tubulin, total tubulin and tau protein (ab Tau-5). (b) Lentivirus mediated expression of tau and GFP (used as control) in hippocampal cultured neurons from wild-type and tau<sup>-/-</sup> mice. – Indicates the control in the absence of lentivirus infection. (c) Effect of tau expression on acetylated tubulin levels of cultured hippocampal neurons from wild-type (upper panel) and tau<sup>-/-</sup> (lower panel) mice. (d) Quantitation of (c) is shown. An increase, compared with control, in Ac-tubulin level, was found after infection of the cultures with lentivirus containing tau cDNA.

**Figure S2.** HeLa cell extract immunodepleted of HDAC6 by incubation overnight at 4°C, in the absence or the presence of a nitrocellulose paper containing an antibody raised against HDAC6.

**Figure S3.** Effect of proteasome inhibition by MG262 on the formation of aggresomes (followed by GFP-LC3 fluorescence analysis) in HEK293 cells in the absence or the presence of tau expression.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

## References

- Avila J. (1990) Microtubule dynamics. *FASEB J.* **4**, 3284–3290.
- 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.
- Cabrero J. R., Serrador J. M., Barreiro O. *et al.* (2006) Lymphocyte chemotaxis is regulated by histone deacetylase 6, independently of its deacetylase activity. *Mol. Biol. Cell* **17**, 3435–3445.
- Caceres A. and Kosik K. S. (1990) Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* **343**, 461–463.
- Caron C., Boyault C. and Khochbin S. (2005) Regulatory cross-talk between lysine acetylation and ubiquitination: role in the control of protein stability. *BioEssays* **27**, 408–415.
- Creppe C., Malinouskaya L., Volvert M. L. *et al.* (2009) Elongator controls the migration and differentiation of cortical neurons through acetylation of alpha-tubulin. *Cell* **136**, 551–564.
- Dawson H. N., Ferreira A., Eyster M. V., Ghoshal N., Binder L. I. and Vitek M. P. (2001) Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice. *J. Cell Sci.* **114**, 1179–1187.
- Deglon N., Tseng J. L., Bensadoun J. C., Zurn A. D., Arsenijevic Y., Pereira de Almeida L., Zufferey R., Trono D. and Aebischer P. (2000) Self-inactivating lentiviral vectors with enhanced transgene expression as potential gene transfer system in Parkinson's disease. *Hum. Gene Ther.* **11**, 179–190.
- Ding H., Dolan P. J. and Johnson G. V. (2008) Histone deacetylase 6 interacts with the microtubule-associated protein tau. *J. Neurochem.* **106**, 2119–2130.
- Drubin D. G. and Kirschner M. W. (1986) Tau protein function in living cells. *J. Cell Biol.* **103**, 2739–2746.
- Estiu G., Greenberg E., Harrison C. B., Kwiatkowski N. P., Mazitschek R., Bradner J. E. and Wiest O. (2008) Structural origin of selec-

- tivity in class II-selective histone deacetylase inhibitors. *J. Med. Chem.* **51**, 2898–2906.
- Fantin V. R. and Richon V. M. (2007) Mechanisms of resistance to histone deacetylase inhibitors and their therapeutic implications. *Clin. Cancer Res.* **13**, 7237–7242.
- Fleming J., Spinoulas A., Zheng M., Cunningham S. C., Ginn S. L., McQuilty R. C., Rowe P. B. and Alexander I. E. (2005) Partial correction of sensitivity to oxidant stress in Friedreich ataxia patient fibroblasts by frataxin-encoding adeno-associated virus and lentivirus vectors. *Hum. Gene Ther.* **16**, 947–956.
- Garcia-Escudero V., Gargini R. and Izquierdo M. (2008) Glioma regression in vitro and in vivo by a suicide combined treatment. *Mol. Cancer Res.* **6**, 407–417.
- 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.
- Gregoret I. V., Lee Y. M. and Goodson H. V. (2004) Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J. Mol. Biol.* **338**, 17–31.
- Gu W. and Roeder R. G. (1997) Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* **90**, 595–606.
- Haggarty S. J., Koeller K. M., Wong J. C., Grozinger C. M. and Schreiber S. L. (2003) Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**, 4389–4394.
- Harada A., Oguchi K., Okabe S., Kuno J., Terada S., Ohshima T., Sato-Yoshitake R., Takei Y., Noda T. and Hirokawa N. (1994) Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature* **369**, 488–491.
- Hempfen B. and Brion J. P. (1996) Reduction of acetylated alpha-tubulin immunoreactivity in neurofibrillary tangle-bearing neurons in Alzheimer's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **55**, 964–972.
- Hernandez F., Perez M., Lucas J. J. and Avila J. (2002) Sulfo-glycosaminoglycan content affects PHF-tau solubility and allows the identification of different types of PHFs. *Brain Res.* **935**, 65–72.
- Hernandez F., Perez M., Lucas J. J., Mata A. M., Bhat R. and 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.
- Hook S. S., Orian A., Cowley S. M. and Eisenman R. N. (2002) Histone deacetylase 6 binds polyubiquitin through its zinc finger (PAZ domain) and copurifies with deubiquitinating enzymes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 13425–13430.
- Hubbert C., Guardiola A., Shao R., Kawaguchi Y., Ito A., Nixon A., Yoshida M., Wang X. F. and Yao T. P. (2002) HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* **417**, 455–458.
- Ito A., Kawaguchi Y., Lai C. H., Kovacs J. J., Higashimoto Y., Appella E. and Yao T. P. (2002) MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation. *EMBO J.* **21**, 6236–6245.
- Iwata A., Riley B. E., Johnston J. A. and Kopito R. R. (2005) HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin. *J. Biol. Chem.* **280**, 40282–40292.
- Kabeya Y., Mizushima N., Ueno T., Yamamoto A., Kirisako T., Noda T., Kominami E., Ohsumi Y. and Yoshimori T. (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *EMBO J.* **19**, 5720–5728.
- Kanai Y., Chen J. and Hirokawa N. (1992) Microtubule bundling by tau proteins in vivo: analysis of functional domains. *EMBO J.* **11**, 3953–3961.
- Kawaguchi Y., Kovacs J. J., McLaurin A., Vance J. M., Ito A. and Yao T. P. (2003) The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell* **115**, 727–738.
- Kazantsev A. G. and Thompson L. M. (2008) Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 854–868.
- Kopke E., Tung Y. C., Shaikh S., Alonso A. C., Iqbal K. and Grundke-Iqbal I. (1993) Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **268**, 24374–24384.
- LeDizet M. and Piperno G. (1987) Identification of an acetylation site of Chlamydomonas alpha-tubulin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **84**, 5720–5724.
- Maruta H., Greer K. and Rosenbaum J. L. (1986) The acetylation of alpha-tubulin and its relationship to the assembly and disassembly of microtubules. *J. Cell Biol.* **103**, 571–579.
- Matsuyama A., Shimazu T., Sumida Y. et al. (2002) In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *EMBO J.* **21**, 6820–6831.
- North B. J., Marshall B. L., Borra M. T., Denu J. M. and Verdin E. (2003) The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD<sup>+</sup>-dependent tubulin deacetylase. *Mol. Cell* **11**, 437–444.
- Nuydens R., Van Den Kieboom G., Nolten C., Verhulst C., Van Osta P., Spittaels K., Van den Haute C., De Feyter E., Geerts H. and Van Leuven F. (2002) Coexpression of GSK-3beta corrects phenotypic aberrations of dorsal root ganglion cells, cultured from adult transgenic mice overexpressing human protein tau. *Neurobiol. Dis.* **9**, 38–48.
- Pandey U. B., Nie Z., Batlevi Y. et al. (2007) HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature* **447**, 859–863.
- Perez M., Valpuesta J. M., Medina M., Montejo de Garcini E. and Avila J. (1996) Polymerization of tau into filaments in the presence of heparin: the minimal sequence required for tau-tau interaction. *J. Neurochem.* **67**, 1183–1190.
- Piperno G., LeDizet M. and Chang X. J. (1987) Microtubules containing acetylated alpha-tubulin in mammalian cells in culture. *J. Cell Biol.* **104**, 289–302.
- Reed N. A., Cai D., Blasius T. L., Jih G. T., Meyhofer E., Gaertig J. and Verhey K. J. (2006) Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr. Biol.* **16**, 2166–2172.
- Rubinsztein D. C. (2007) Autophagy induction rescues toxicity mediated by proteasome inhibition. *Neuron* **54**, 854–856.
- Santa-Maria I., Hernandez F., Del Rio J., Moreno F. J. and 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.
- Schulze E., Asai D. J., Bulinski J. C. and Kirschner M. (1987) Post-translational modification and microtubule stability. *J. Cell Biol.* **105**, 2167–2177.
- Southwood C. M., Peppi M., Dryden S., Tainsky M. A. and Gow A. (2007) Microtubule deacetylases, SirT2 and HDAC6, in the nervous system. *Neurochem. Res.* **32**, 187–195.
- Spillantini M. G. and Goedert M. (1998) Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* **21**, 428–433.
- Takemura R., Okabe S., Umeyama T., Kanai Y., Cowan N. J. and Hirokawa N. (1992) Increased microtubule stability and alpha tubulin acetylation in cells transfected with microtubule-associated proteins MAP1B, MAP2 or tau. *J. Cell Sci.* **103**, 953–964.
- Tran A. D., Marmo T. P., Salam A. A. et al. (2007) HDAC6 deacetylation of tubulin modulates dynamics of cellular adhesions. *J. Cell Sci.* **120**, 1469–1479.
- Tseng B. P., Green K. N., Chan J. L., Blurton-Jones M. and LaFerla F. M. (2008) Abeta inhibits the proteasome and enhances amyloid and tau accumulation. *Neurobiol. Aging* **29**, 1607–1618.
- Yang X. J. and Seto E. (2008) The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 206–218.

- Zhang Y., Li N., Caron C., Matthias G., Hess D., Khochbin S. and Matthias P. (2003) HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *EMBO J.* **22**, 1168–1179.
- Zhang Y., Kwon S., Yamaguchi T. *et al.* (2008) Mice lacking histone deacetylase 6 have hyperacetylated tubulin but are viable and develop normally. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 1688–1701.
- Zhu X., Rottkamp C. A., Boux H., Takeda A., Perry G. and Smith M. A. (2000) Activation of p38 kinase links tau phosphorylation, oxidative stress, and cell cycle-related events in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **59**, 880–888.
- Zhu X., Su B., Wang Y., Mondragon-Rodriguez S., Cash A., Avila J., Perry G. and Smith M. A. (2007) Increased tubulin acetylation in Alzheimer disease. *J. Neurochem.* **102**, 75.





## Tau deficiency leads to the upregulation of BAF-57, a protein involved in neuron-specific gene repression

Elena Gómez de Barreda<sup>a</sup>, Hana N. Dawson<sup>b</sup>, Michel P. Vitek<sup>b</sup>, Jesús Avila<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM), C/Nicolás Cabrera 1, Universidad Autónoma de Madrid, Campus Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Division of Neurology, Duke University, Durham, NC 27710, USA

<sup>c</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), 28031 Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 5 March 2010

Revised 17 March 2010

Accepted 19 March 2010

Available online 23 March 2010

Edited by Maurice Montal

#### Keywords:

Neuron maturation

Tau k.o.

Nuclear tau

BAF-57

Gene expression

Axonogenesis

### ABSTRACT

**Although tau is mainly located in the cell cytoplasm, mostly bound to tubulin, it may also be found in the nucleus of neurons. Hence, we tested whether tau might play a role in regulating the expression of certain genes by comparing gene expression in mice containing or lacking the tau protein. Our results identified a significant difference in the expression of the *smarce1* gene, which codes for the BAF-57 protein, a protein involved in the repression of neuron specific genes. These data suggest a role for tau in neuron maturation.**

© 2010 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Tau is a microtubule associated protein that promotes tubulin assembly *in vitro* [1], as well as stabilizing assembled microtubules in cultured cells [2] by suppressing microtubule dynamics [3]. Tau deficiency delays neurite extension in cultured neurons [4,5], although the tau deficient mice produced by gene-targeting are viable and they do not show important cytoskeletal abnormalities [5,6]. The mild phenotype of these mice could be due to functional redundancy between tau and other microtubule-associated proteins [7]. Nevertheless, delayed axonogenesis was observed in tau deficient neurons [6], a feature that has yet to be fully explained.

Tau can also bind to nucleic acids [8–11] and it has been observed in the nucleus of neuronal cells [12–14]. We confirmed that tau is indeed present in the nucleus of cells and hence, we tested the possible influence of the tau protein on gene expression showing that it can modify the expression of certain genes. We observed differences in the level of *smarce1* [15], which codes for BAF-57

[16], a protein involved in the repression of neuronal specific genes [17] and whose expression is stimulated in tau deficient mice.

### 2. Materials and methods

#### 2.1. Animals

*Tau*<sup>-/-</sup> mice were generated as described previously [6], crossing heterozygous (*Tau*<sup>+/-</sup>) mice to obtain homozygous tau knockout mice (*Tau*<sup>-/-</sup>) and control littermates (*Tau*<sup>+/+</sup>). 3 month-old male mice were used in the experiments carried out here. The animals were bred at the Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (Madrid, Spain) and they were maintained in accordance with the institutional guidelines. Four to five mice were housed per cage in a temperature controlled environment on a 12/12 h light-dark cycle, with food and water available *ad libitum*.

#### 2.2. Primary hippocampal cultures

Hippocampal cell cultures were prepared from 17-day-old mouse fetuses according to modified versions of established procedures [18]. Briefly, the hippocampus was dissected out from each pup and dissociated individually with the papain dissociation system (Worthington Biochemical Corp.; Lakewood, NJ). The cells recovered were plated on poly lysine-coated (1 mg/ml) coverslips

\* Corresponding author at: Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM), C/Nicolás Cabrera 1, Universidad Autónoma de Madrid, Campus Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain. Fax: +34 911964420.

E-mail address: [javila@cbm.uam.es](mailto:javila@cbm.uam.es) (J. Avila).

at low density in 86% DMEM containing 10% horse serum, 0.5 mM Glutamine, 1% penicillin/streptomycin. After 4 h, the medium was replaced by the maintenance medium: Neurobasal medium (Invitrogen) supplemented with 2% B-27, 1% N2, 0.5 mM Glutamine, 1 mM pyruvate, 1% penicillin/streptomycin.

### 2.3. Immunofluorescence

After 24 and 48 h in culture, the hippocampal cells were fixed for 20 min with warm 4% paraformaldehyde in PBS containing 4% sucrose. After several washes with PBS, the cells were permeabilized in 0.1% Triton X-100 for 15 min and they were then treated with 1 M glycine for 30 min to eliminate any autofluorescence. After a brief wash with PBS, the cells were blocked with 1% BSA/PBS for 1 h and then they were exposed to the primary antibodies diluted in 1% BSA/PBS for 1 h: an antibody against Smi-31 (1:1000; Sternberger) as an axonal marker and anti- $\beta$ -III-tubulin (1:2000; Covance) as a neuronal marker. Subsequently, the cultures were washed extensively and then incubated for 45 min with the appropriate secondary antibody conjugated with either fluorescein isothiocyanate or with TexasRed (Jackson Laboratories, West Grove, PA). After washing, the cells were mounted immediately with Fluoromount Reagent (Calbiochem) and the coverslips were analyzed on an Axioskop2 plus microscope (Zeiss) using an Image J Software to determine the axon length.

### 2.4. Western blotting

Hippocampal and kidney extracts from 3 month-old mice were prepared 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 (10  $\mu$ g/ml aprotinin, 10  $\mu$ g/ml leupeptin and 10  $\mu$ g/ml pepstatin). The tissue samples were homogenized at 4 °C and the protein content was determined by the Bradford method (Biorad). Subsequently, protein extracts and the subcellular fractions samples were resolved on 10% SDS polyacrylamide gels and transferred to a nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell). The membranes were probed with the following primary antibodies: anti-BAF57 (1:1000; Sigma); 7.51 (1:1000; from Dr. Claude Wischik, UK) that reacts with phosphorylated as well as non-phosphorylated forms of tau within the tubulin binding region; Tau-1 (1:1000; Chemicon) that detects dephosphorylated tau; Tau-5 (1:1000; Calbiochem) that recognizes the central region of tau in both the phosphorylated and the non-phosphorylated forms; AT100 (1:500; Innogenetics) to detect phosphorylated tau; anti  $\alpha$ -tubulin (1:1000; Sigma) as a cytoplasmic marker; and anti-laminB1 (1:200; Santa Cruz) as a nuclear marker. The membranes were incubated with the antibodies at 4 °C overnight in 5% non-fat dried milk, and the immunoreactive bands were detected with the corresponding secondary antibodies (1/5000; GIBCO) and visualized by ECL (Amersham Biosciences). The quantification of BAF57 was performed by densitometric scanning and the values were normalized to those obtained with an anti- $\beta$ -actin antibody (1:5000; Sigma) to correct for deviations in protein loading.

### 2.5. Subcellular fractionation

To prepare nuclear and cytosolic extracts, tissues were disrupted with 15 strokes of an ice Dounce-homogenizer in M-SHE buffer (210 mM manitol, 70 mM sucrose, 10 mM HEPES [pH 7.4], 1 mM EDTA, 1 mM EGTA) supplemented with protease inhibitors (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10  $\mu$ g/ml aprotinin, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 10  $\mu$ g/ml pepstatin), phosphatase inhibitors (1 mM sodium orthovanadate, 30 mM glycerophosphate, 5 mM pyrophosphate, 1  $\mu$ M okadaic acid) and 1 mM dithiothreitol. The

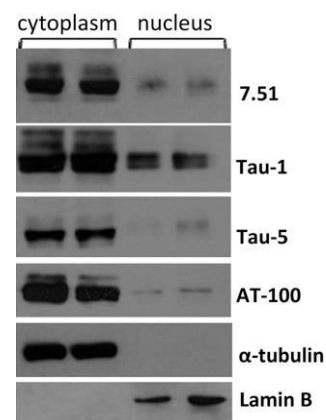
homogenate was placed on ice for 30 min and then centrifuged at 1200 $\times$ g for 10 min at 4 °C. The resulting pellet was homogenized and centrifuged again as above, and the supernatant was added to that obtained in the first step to constitute the cytosolic fraction. The membrane fraction (pellet) was homogenized in M-SHE buffer and centrifuged at 1000 $\times$ g for 10 min at 4 °C. Both the supernatant and the pellet's upper layer were discarded and the remaining pellet, which contained the nuclei, was resuspended in TSE buffer (10 mM Tris [pH 7.5], 300 mM sucrose, 1 mM EDTA) supplemented with 0.1% NP-40. This suspension was centrifuged at 8500 $\times$ g for 10 min at 4 °C, and the resulting pellet was resuspended in TSE buffer supplemented with 1% NP-40 and centrifuged at 1500 $\times$ g for 7 min at 4 °C. This last step was repeated to clean the nuclear fraction (the opaque layer at the bottom of the tube) of any other membranes (yellow layer). Finally, lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 6.8], 100 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol) supplemented with protease and phosphatase inhibitors, was added to cytosolic and nuclear fractions, and the samples were boiled for 10 min before they were analyzed by SDS-PAGE.

### 2.6. Gene expression analysis

For transcriptional analysis, hippocampal tissue from *Tau*<sup>-/-</sup> mice and control littermates ( $n = 3$  per group) was analyzed on an Affymetrix MOE 430A 2.0 GeneChip<sup>®</sup>, which analyzes 14,000 annotated mouse genes. The preparation of RNA, hybridization, staining, and scanning of the GeneChip<sup>®</sup> MOE 430A 2.0 was carried out by Progenika Biopharma (Derio, Spain).

### 2.7. RNA isolation and quantitative real-time PCR

RNA was isolated from the hippocampus of *Tau*<sup>-/-</sup> mice and control littermates ( $n = 6$  animals per genotype) using the Absolutely RNA MiniPrep Kit (Stratagene). This RNA was used as a template for the first strand cDNA synthesis (Roche), which was then analyzed by quantitative real-time PCR with an applied biosystems ABI PRISM 7900HT real-time detection system with the SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems), interpreting the results with the SDS 2.1 software. The primers used to amplify each gene were: 5'-CACTTCTCCCATCTTTCGCT-3' and 5'-GGGACTTAATGGCAGCTGAG-3' for *mapt*; 5'-TCCTTTCTCAAGTGATTGG-3' and 5'-AACA



**Fig. 1.** Tau protein is not only present in the cytoplasm but also in the nucleus of cells. Western blot of the cytoplasmic and nuclear fractions from the hippocampus of two wild-type mice. The 7.51 antibody detected tau, both in the cytoplasm and in the nucleus, whereas tubulin was only present in the cytoplasmic fraction and laminB only in the nucleus. The interaction with other tau antibodies (Tau-1, Tau-5 and AT100) was also done, with similar result.

CATCTTTGTCTTATTCTTTTCA-3' for *calbindin*; 5'-ATGCCCTTCT CAGTCTCTG-3' and 5'-GGAAAGTCACAGGTGGAGGA-3' for *lsm12/homolog*; 5'-TGGCTTTCCAAAGACACGAT-3' and 5'-TCCATTA TAAGAATTCCATTCT-3' for *smarce1*; 5'-TGGGAGTTCTGGT CAGGTTC-3' and 5'-CCTAATCCACTGGGGACTGA-3' for *map1lc3a*. Mean Ct values of gene expression were normalized to the mean expression of  $\beta$ -actin in each sample.

### 3. Results

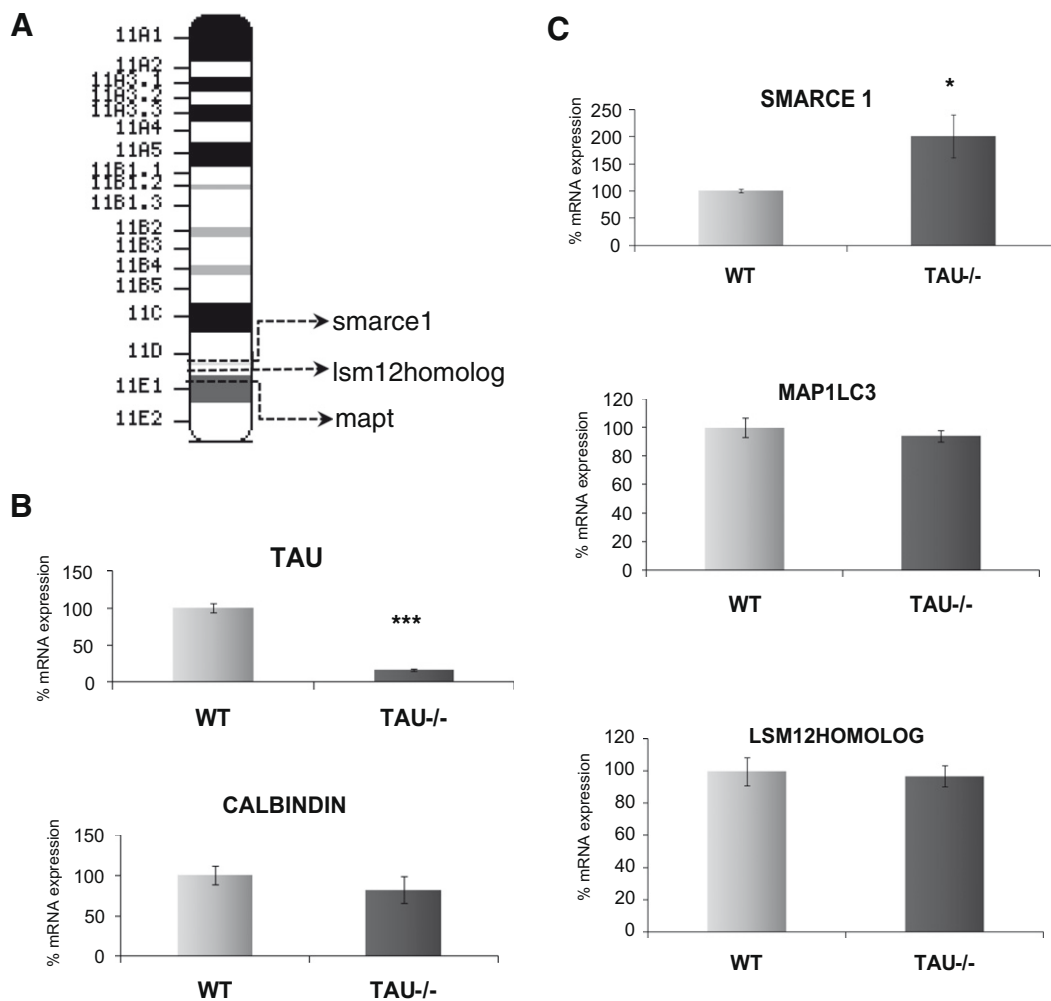
#### 3.1. Tau is located in the nucleus of neuronal cells

Tau protein was first discovered as a microtubule-associated protein [1] and as a result, it has been considered as a cytoplasmic protein like tubulin, the main component of microtubules. However,

**Table 1**

Overexpressed and downregulated genes detected in the Affymetrix Mouse GeneChip. These five genes were selected from 265 genes whose expression was significantly different in the hippocampus of *tau*<sup>-/-</sup> mice when compared to the wt mice (three animals per genotype).

Probeset ID	Gene title	Gene symbol	P-value	Fold change
<i>Down regulated</i>				
1424719	Microt. prot. tau	<i>mapt</i>	0.0000038	-5.42043
1448738	Calbindin 28 k	<i>calb1</i>	0.00196123	-1.26513
<i>Overexpressed</i>				
1427998	LSM12 homolog	<i>lsm12</i>	0.00126384	2.34947
1422676	SW1/SNF relat., matrix cell, actin (BAF57)	<i>smarce1</i>	0.0170026	1.16013
1451290	Microtubule assoc. prot. 1 light ch.3	<i>map1lc3a</i>	0.763173	1.14813



**Fig. 2.** Microarray validation by quantitative real-time PCR. (A) Mouse chromosome 11 ideogram showing the locations of *mapt*, *smarce1* and *lsm12 homologue*. Although these three genes are located in the same region, they are not contiguous. (B) Quantitative real-time PCR for downregulated genes. As expected, tau gene expression decreased significantly in tau deficient mice when compared to wt mice (fivefold; \*\*\*  $p < 0.001$ , Student's *t*-test). Calbindin mRNA levels were slightly lower in *Tau*<sup>-/-</sup> mice but the difference was not statistically significant. (C) Quantitative real-time PCR for upregulated genes. We confirmed *smarce1* gene was overexpressed (twofold; \*  $p < 0.05$ , Student's *t*-test) in *Tau*<sup>-/-</sup> mice when compared to wt mice. The expression of *map1lc3a* and the *lsm12 homologue* did not change significantly between *Tau*<sup>-/-</sup> and wt mice. Results are expressed as percentage of control. Data shown are the mean  $\pm$  S.E. of six animals per genotype.

tau does not appear to be exclusively found in the cytoplasm and there are different reports indicating that a small proportion of tau is also present in the nucleus of cells [12–14]. We performed subcellular fractionation to confirm the presence of tau in the cell nucleus, as well as in the cytoplasm [19], using  $\alpha$ -tubulin as a cytoplasmic marker and laminB as a marker of the nuclear fraction. Tau protein was clearly present in both cellular compartments, although there was less in the nuclear fraction. By contrast, tubulin was only present in the cytoplasmic fraction and laminB was only found in the nuclear fraction (Fig. 1).

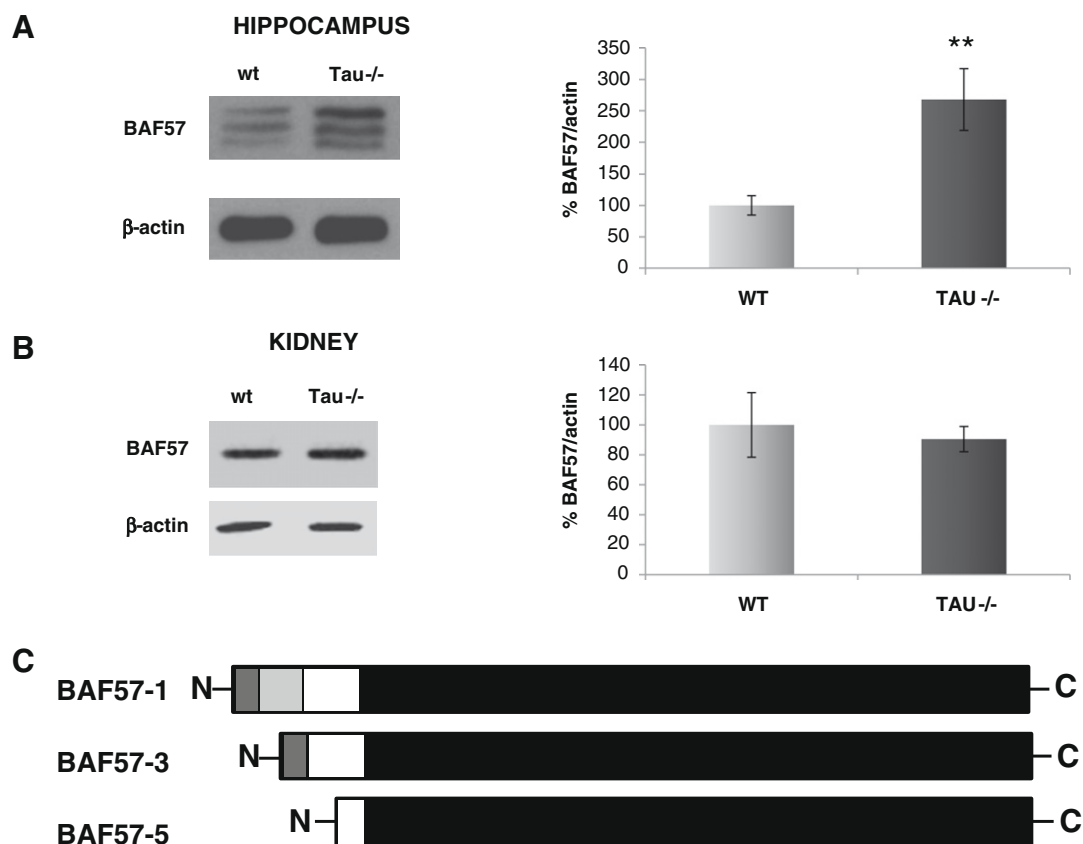
Little is known about the possible function of tau in the nucleus [9], although it is known to be able to interact with chromatin and nucleic acids [10–14,20]. This nuclear localization may be compatible with a possible influence of the tau protein on gene expression. Thus, we studied whether tau might regulate the expression of specific genes.

### 3.2. Changes in gene expression in tau deficient mice

We set out to look for possible differences in gene expression between mice expressing or lacking the tau protein by using a mouse GeneChip platform (Affymetrix) as a high throughput technique to analyze gene expression. When RNA pools from *Tau*<sup>-/-</sup> and *Tau*<sup>+/+</sup> mice were compared (Table 1) there was a dramatic decrease in tau gene expression in *Tau*<sup>-/-</sup> mice, as expected (which served as a positive control for the analysis). In addition, slight changes in the expression of other genes were found, including: *smarce1* (coding for the BAF57 protein), *calbindin*, the *lsm12* homologue, or *map1lc3a*. Curiously, some of these genes

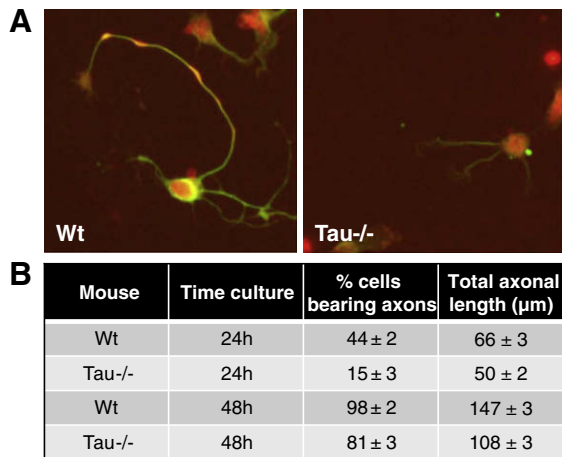
are located on chromosome 11 like the *tau* gene, although they are not contiguous (Fig. 2A). Real-time PCR analysis was performed on these transcripts to validate the data obtained from the microarrays (Fig. 2B and C). No significant differences were found in the expression of each of these different genes, except for the *tau* gene and *smarcel*. When the accumulation of the corresponding proteins was assessed in western blots, clear differences were only found in the *tau* protein, as well as slight differences in *smarce1* expression. When the presence of the BAF57 protein (the product of *smarce1* gene) was further investigated, there was a difference in the expression of the isoform with lower electrophoretic mobility (Fig. 3A). This difference was only found in the brain but not in the kidney of *Tau*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 3B) and indeed, the three main BAF57 isoforms found in adult mouse brain were evident (Fig. 3C). These isoforms contain some exons similar to those found for human BAF57 isoforms whereas in other tissues, like the kidney, only the slower migrating isoform was found in mice [21]. However, when we tested whether there were changes in this isoform in the kidney of *Tau*<sup>-/-</sup> mice, no differences were found in the only isoform present (the longest one, Fig. 3B).

All three mouse BAF57 isoforms were expressed in the brain of wild type and tau deficient mice (Fig. 3A) and there was an increase in the total amount of the three BAF57 isoforms in *Tau*<sup>-/-</sup> when compared to wild type mice. In addition, a decrease in the proportion of the two isoforms of higher electrophoretic mobility was observed, isoforms mainly present in neuronal tissue, when compared to the slower migrating ubiquitously expressed BAF57 isoform.



**Fig. 3.** The BAF57 protein is overexpressed in the hippocampus but not in the kidney of tau deficient mice. (A) Hippocampal extracts from *Tau*<sup>-/-</sup> and *wt* mice were analyzed by western blotting ( $n = 6$  animals per genotype). Immunodetection with an anti-BAF57 antibody revealed three bands that corresponded to the three main BAF57 isoforms expressed in the mouse nervous system (see C). Total BAF57 was significantly increased in *Tau*<sup>-/-</sup> mice when compared to the *wt* mice (\*\* $p < 0.01$ , Student's  $t$  test). (B) The antibody against BAF57 only detected one protein isoform in kidney extracts and the levels of BAF57 were similar in *Tau*<sup>-/-</sup> and *wt* mice. (C) Schematic structure of the three main BAF57 isoforms expressed in the mouse nervous system. The longest BAF57-1 isoform is ubiquitous, whereas BAF57-2 and BAF57-3 are specific to neural tissues [21].





**Fig. 4.** Axonogenesis is delayed in tau deficient neurons. (A) Immunofluorescence of 1DIV primary hippocampal neurons from *Tau*<sup>-/-</sup> mice and control littermates labeled with the Smi-31 (green) and  $\beta$ -III-tubulin (red) antibodies. (B) The percentage of cells bearing axons and the axon length were measured in *Tau*<sup>-/-</sup> and control neurons at 24 and 48 h ( $n = 80$  cells per group).

### 3.3. Delayed axonogenesis in tau deficient neurons

BAF57 (BRG1-associated factor 57) is a component of the mammalian SWI/SNF ATP-dependent chromatin remodelling complex [16,22], which is involved in transcriptional regulation. Moreover, BAF57 interacts with CoREST, a protein that acts as a co-repressor of REST (RE1 silencing transcription factor), a transcription factor which represses neuronal genes in non-neuronal cells [17]. We have just indicated that an increase in BAF57 could produce a decrease (or delay) in the appearance of a neuronal morphology in tau deficient cells. Indeed, a delay in axon extension was reported earlier in primary cultures of tau deficient neurons [6]. These results have been now confirmed in similar experiments (Fig. 4), where a decrease in the proportion of cells bearing axons at stage III [23] was observed in primary hippocampal cultures of *Tau*<sup>-/-</sup> mice, although more than 80% of neurons from either source had extended neurites after 48 h in culture.

## 4. Discussion

We have shown here that the tau protein may be found in the cytoplasm or in the nucleus of a cell and that it may be capable of regulating gene expression. Thus, we tested the changes in gene expression in the *wt* and *Tau*<sup>-/-</sup> mice brain. In the absence of tau, changes in the expression of some genes were observed. As expected a dramatic decrease in *mapt* expression was seen, but also we detected changes in *smarcel1*, *calbindin*, the *homologue of the lsm12'* yeast gene and in the *map1'* light chain 3a were also observed.

*Smarcel1* encodes the BAF-57 protein, which interacts with coREST, a protein that forms a complex with the class I HDAC. The interaction of BAF-57 with coREST facilitates the activity of the transcriptional repressor REST, which blocks the expression of neuronal specific genes in non-neuronal cells [17]. Calbindin is a calcium binding protein that appears to buffer the excess of that cation [24]. Curiously, calbindin gene is one of the genes repressed by REST complex [25]. Thus, an increase in *smarcel1* gene expression is compatible with a decrease in calbindin gene expression, as found in Table 1. The homologue of the *Lsm-12* yeast gene appears to play a role in protein translation, although little is known about its possible function in neurons [26,27]. Finally, MAP1-light chain 3a is a cytoskeletal protein [28] and it has previously been suggested that the amount of MAP1A increases in tau deficient mice [5].

Here, we focused our analysis on the differential expression of *smarcel1* since, unlike the other genes, the genechip data for this gene was validated by RT-PCR and in Western blots. Since the *smarcel1* gene is located on mouse chromosome 11, like the *tau* gene, the differences in its expression may be due to an artifact produced when generating the *Tau*<sup>-/-</sup> mice [6]. However, the fact that these genes do not lie close together on chromosome 11 and that the differences for BAF57 (*smarcel1* product) are specific to the brain and they are not found in the kidney, suggest that the changes in the level of *smarcel1* gene expression in the brain could be produced specifically by the absence of tau.

In addition, the delay in axonogenesis observed in hippocampal neurons from *Tau*<sup>-/-</sup> mice suggests that the absence of tau protein facilitates a non-neuronal phenotype. This observation agrees well with previous findings indicating a delayed maturation of neuronal precursors in *Tau*<sup>-/-</sup> mice [29]. Tau is not essential for the non-neuronal phenotype, probably because REST expression might be important for the correct temporal execution of neuronal differentiation programs, although it is not required for neuronal commitment per se [30].

## Acknowledgements

This study was funded by grants from the Spanish Ministry of Health (SAF 200602424), CibERNed (CB06/05/0035), Noscira (2008/285), Comunidad de Madrid (SAL/0202/2006), Fundación Marcelino Botín, Fundación CIEN (PI 008/09) and an institutional grant from Fundación Ramon Areces. None of the funding organizations had any further role in the study design; in the collection, analysis or interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the paper for publication.

## References

- Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo, S.Y. and Kirschner, M.W. (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 1858–1862.
- Drubin, D.G. and Kirschner, M.W. (1986) Tau protein function in living cells. *J. Cell Biol.* 103, 2739–2746.
- Panda, D., Goode, B.L., Feinstein, S.C. and Wilson, L. (1995) Kinetic stabilization of microtubule dynamics at steady state by tau and microtubule-binding domains of tau. *Biochemistry* 34, 11117–11127.
- Caceres, A. and Kosik, K.S. (1990) Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* 343, 461–463.
- Harada, A. et al. (1994) Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature* 369, 488–491.
- Dawson, H.N., Ferreira, A., Eyster, M.V., Ghoshal, N., Binder, L.I. and Vitek, M.P. (2001) Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice. *J. Cell Sci.* 114, 1179–1187.
- Takei, Y., Teng, J., Harada, A. and Hirokawa, N. (2000) Defects in axonal elongation and neuronal migration in mice with disrupted tau and map1b genes. *J. Cell Biol.* 150, 989–1000.
- Hua, Q., He, R.Q., Haque, N., Qu, M.H., del Carmen Alonso, A., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K. (2003) Microtubule associated protein tau binds to double-stranded but not single-stranded DNA. *Cell Mol. Life Sci.* 60, 413–421.
- Sjoberg, M.K., Shestakova, E., Mansuroglu, Z., Maccioni, R.B. and Bonnefoy, E. (2006) Tau protein binds to pericentromeric DNA: a putative role for nuclear tau in nucleolar organization. *J. Cell Sci.* 119, 2025–2034.
- Villasante, A., Corces, V.G., Manso-Martinez, R. and Avila, J. (1981) Binding of microtubule protein to DNA and chromatin: possibility of simultaneous linkage of microtubule to nucleic acid and assembly of the microtubule structure. *Nucleic Acids Res.* 9, 895–908.
- Wei, Y., Qu, M.H., Wang, X.S., Chen, L., Wang, D.L., Liu, Y., Hua, Q. and He, R.Q. (2008) Binding to the minor groove of the double-strand, tau protein prevents DNA from damage by peroxidation. *PLoS One* 3, e2600.
- Greenwood, J.A. and Johnson, G.V. (1995) Localization and in situ phosphorylation state of nuclear tau. *Exp. Cell Res.* 220, 332–337.
- Loomis, P.A., Howard, T.H., Castleberry, R.P. and Binder, L.I. (1990) Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 8422–8426.
- Thurston, V.C., Pena, P., Pestell, R. and Binder, L.I. (1997) Nucleolar localization of the microtubule-associated protein tau in neuroblastomas using sense and anti-sense transfection strategies. *Cell Motil. Cytoskeleton* 38, 100–110.
- Wattler, F., Wattler, S., Kelly, M., Skinner, H.B. and Nehls, M. (1999) Cloning, chromosomal location, and expression analysis of murine *smarcel1*-related, a

- new member of the high-mobility 365 group gene family. *Genomics* 60, 172–178.
- [16] Wang, W., Chi, T., Xue, Y., Zhou, S., Kuo, A. and Crabtree, G.R. (1998) Architectural DNA binding by a high-mobility-group/kinesin-like subunit in mammalian SWI/SNF-related complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 492–498.
- [17] Battaglioli, E., Andres, M.E., Rose, D.W., Chenoweth, J.G., Rosenfeld, M.G., Anderson, M.E. and Mandel, G. (2002) REST repression of neuronal genes requires components of the hSWI/SNF complex. *J. Biol. Chem.* 277, 41038–41045.
- [18] Banker, G.A. and Cowan, W.M. (1977) Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res.* 126, 397–342.
- [19] Gómez de Barreda, E. et al. (2010) Tau-knockout mice show reduced GSK3-induced hippocampal degeneration and learning deficits. *Neurobiol. Dis.* 37, 622–629.
- [20] Rossi, G. et al. (2008) A new function of microtubule-associated protein tau: involvement in chromosome stability. *Cell Cycle* 7, 1788–1794.
- [21] Kazantseva, A., Sepp, M., Kazantseva, J., Sadam, H., Pruunsild, P., Timmusk, T., Neuman, T. and Palm, K. (2009) N-Terminally truncated Baf57 isoforms contribute to the diversity of Swi/Snf complexes in neurons. *J. Neurochem.* 109, 807–818.
- [22] Wang, W. et al. (1996) Purification and biochemical heterogeneity of the mammalian SWI-SNF complex. *EMBO J.* 15, 5370–5382.
- [23] Dotti, C.G., Banker, G.A. and Binder, L.I. (1987) The expression and distribution of the microtubule-associated proteins tau and microtubule-associated protein 2 in hippocampal neurons in the rat in situ and in cell culture. *Neuroscience* 23, 121–130.
- [24] Hartmann, J. and Konnerth, A. (2005) Determinants of postsynaptic Ca<sup>2+</sup> signaling in Purkinje neurons. *Cell Calcium* 37, 459–466.
- [25] Ballas, N., Grunseich, C., Lu, D.D., Speh, J.C. and Mandel, G. (2005) REST and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogenesis. *Cell* 121, 645–657.
- [26] Albrecht, M. and Lengauer, T. (2004) Novel Sm-like proteins with long C-terminal tails and associated methyltransferases. *FEBS Lett.* 569, 18–26.
- [27] Fleischer, T.C., Weaver, C.M., McAfee, K.J., Jennings, J.L. and Link, A.J. (2006) Systematic identification and functional screens of uncharacterized proteins associated with eukaryotic ribosomal complexes. *Genes Dev.* 20, 1294–1307.
- [28] Mann, S.S. and Hammarback, J.A. (1994) Molecular characterization of light chain 3. A microtubule binding subunit of MAP1A and MAP1B. *J. Biol. Chem.* 269, 11492–11497.
- [29] Fuster-Matanzo, A., Gómez de Barreda, E., Dawson, H.N., Vitek, M.P., Avila, J. and Hernandez, F. (2009) Function of tau protein in adult newborn neurons. *FEBS Lett.* 583, 3063–3068.
- [30] Jorgensen, H.F. et al. (2009) REST selectively represses a subset of RE1-containing neuronal genes in mouse embryonic stem cells. *Development* 136, 715–721.



Contents lists available at ScienceDirect

## Neurobiology of Disease

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ynbdi](http://www.elsevier.com/locate/ynbdi)

## Tau-knockout mice show reduced GSK3-induced hippocampal degeneration and learning deficits

Elena Gómez de Barreda<sup>a</sup>, Mar Pérez<sup>a,b</sup>, Pilar Gómez Ramos<sup>b</sup>, Javier de Cristobal<sup>c</sup>, Patricia Martín-Maestro<sup>a</sup>, Asunción Morán<sup>b</sup>, Hana N. Dawson<sup>d</sup>, Michael P. Vitek<sup>d</sup>, José J. Lucas<sup>a,e</sup>, Félix Hernández<sup>a,e</sup>, Jesús Avila<sup>a,e,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa". C/Nicolás Cabrera, 1. Universidad Autónoma de Madrid, Campus Cantoblanco. 28049 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, 28029 Madrid, Spain

<sup>c</sup> Noscira S.A., Tres Cantos, 28760 Madrid, Spain

<sup>d</sup> Division of Neurology, Duke University, Durham, NC 27710, USA

<sup>e</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), 28031 Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 July 2009

Revised 23 October 2009

Accepted 23 November 2009

Available online 11 December 2009

#### Keywords:

Alzheimer disease

Dentate gyrus

GSK-3

tau

### ABSTRACT

It has been proposed that deregulation of neuronal glycogen synthase kinase 3 (GSK3) activity may be a key feature in Alzheimer disease pathogenesis. We have previously generated transgenic mice that overexpress GSK3 $\beta$  in forebrain regions including dentate gyrus (DG), a region involved in learning and memory acquisition. We have found that GSK3 overexpression results in DG degeneration. To test whether tau protein modified by GSK3 plays a role in that neurodegeneration, we have brought GSK3 overexpressing mice to a tau knockout background. Our results indicate that the toxic effect of GSK3 overexpression is milder and slower in the absence of tau. Thus, we suggest that the hyperphosphorylated tau mediates, at least in part, the pathology observed in the brain of GSK3 overexpressing mice.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) is a protein kinase that appears as two forms, GSK3 $\alpha$  and GSK3 $\beta$  (Woodgett, 1990). Deregulation of neuronal GSK3 activity has been postulated as a key feature in Alzheimer disease (AD) pathogenesis because GSK3 (mainly GSK3 $\beta$ ) interacts with many of the cellular components of AD neuropathology, such as the amyloid precursor protein, the presenilins and tau protein, the main component of the neurofibrillary tangles (NFT) (for a review, see Grimes and Jope, 2001).

Familial Alzheimer disease (FAD) is a consequence of mutations in any of three genes that affect APP processing (Goate et al., 1991, Price and Sisodia, 1998). Mutated APP itself is more susceptible to be cleaved by secretases to yield A $\beta$ , a peptide that inhibits signal transduction cascades common to the insulin receptor or wnt pathway. In both cases, this results in an increase of GSK3 $\beta$  activity (Busciglio et al., 1995, Ferreira et al., 1997, Takashima et al., 1998, Townsend et al., 2007, Magdesian et al., 2008). Addition of A $\beta$  to cortical or hippocampal primary neuronal cultures promotes tau

phosphorylation by GSK3 (Busciglio et al., 1995, Ferreira et al., 1997, Alvarez et al., 1999). The other two FAD genes encode PS-1 and PS-2. Mutations in these genes may also result in an increase of GSK3 activity (Baki et al., 2004, Avila, 2006, Kimura et al., 2007). Thus, a common downstream consequence of these mutations is an increase in GSK3 activity.

Similarly, in sporadic Alzheimer disease, a possible increase in GSK3 activity through the presence of different Apolipoprotein variants has been suggested (Hernandez and Avila, 2008, Small and Duff, 2008).

GSK3 $\beta$  has been found to be identical to tau protein kinase I (Ishiguro et al., 1993), an enzyme that modifies many sites in tau protein found associated to NFT (Morishima-Kawashima et al., 1995). Interestingly, tau protein has been shown to mediate  $\beta$ amyloid-induced neurotoxicity (Gotz et al., 2001, Rapoport et al., 2002, Liu et al., 2004, Roberson et al., 2007), and reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer disease mouse (Roberson et al., 2007). Also, GSK3 accumulates in the cytoplasm of pretangle neurons found in AD (Shiurba et al., 1996, Pei et al., 1999). Thus, GSK3 could play an important role in neurodegenerative disorders like AD, or other taupathies in which tau is modified by that kinase.

We have previously generated transgenic mice that conditionally overexpress GSK3 $\beta$  in hippocampal and cortical neurons (Lucas et al., 2001). These mice, designated Tet/GSK3 $\beta$ , show some of the biochemical and cellular aspects found in AD pathology such as tau

\* Corresponding author. Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa". C/Nicolás Cabrera, 1. Universidad Autónoma de Madrid, Campus Cantoblanco. 28049 Madrid, Spain. Fax: +34 911964420.

E-mail address: [javila@cbm.uam.es](mailto:javila@cbm.uam.es) (J. Avila).

Available online on ScienceDirect ([www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)).

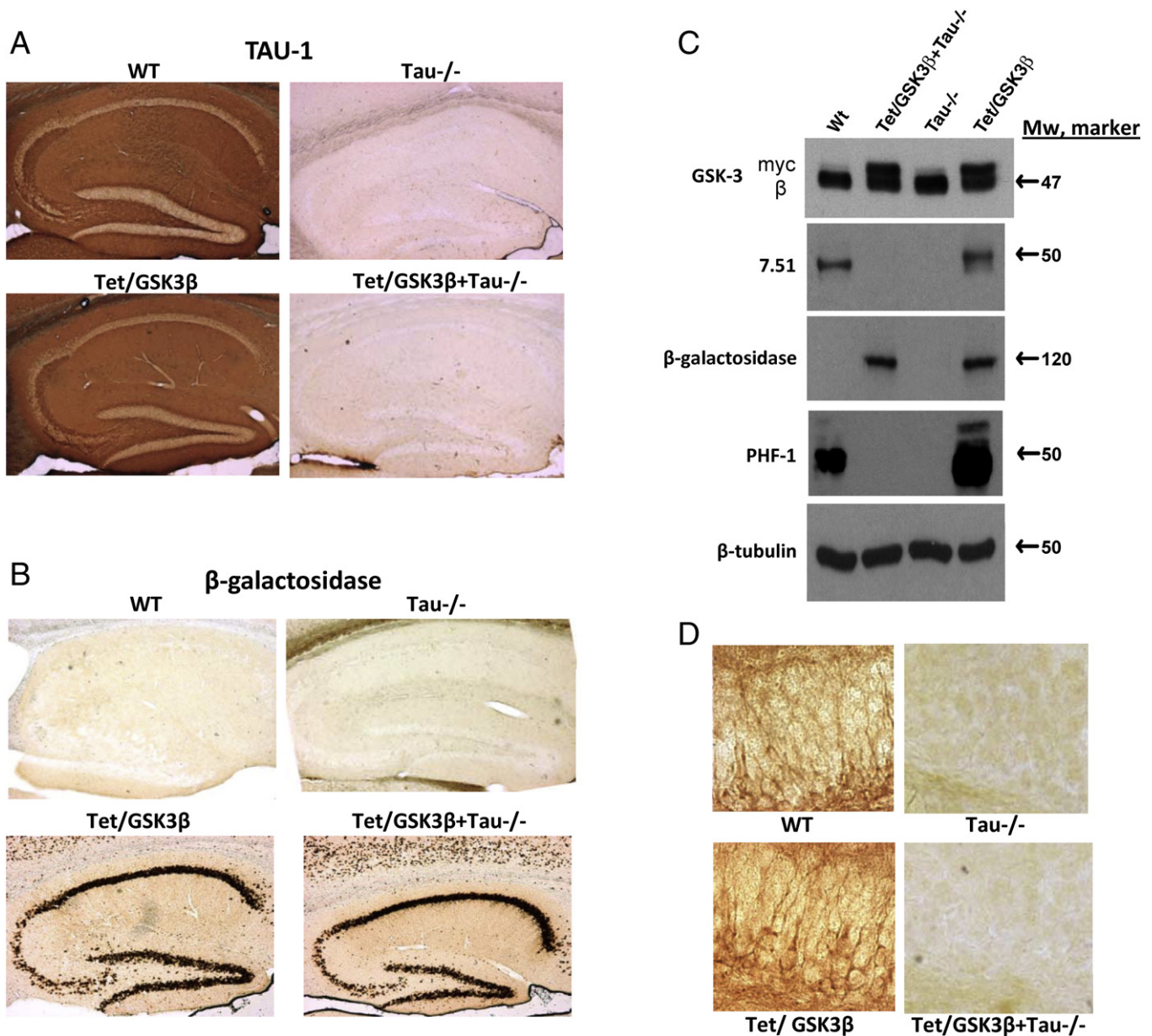
hyperphosphorylation, decreased nuclear  $\beta$ -catenin, neuronal death, reactive gliosis and spatial learning deficit (Hernandez et al., 2002, Engel et al., 2006a).

However, we do not know how much of the pathology induced by GSK3 $\beta$  overexpression could be the consequence of the appearance of hyperphosphorylated tau, or if the modification of other GSK3 substrates may play a more important role in that pathology. To answer this question, we have generated a modified mice lacking tau protein (Dawson et al., 2001) and overexpressing GSK3 $\beta$  (Lucas et al., 2001). Our results indicate that tau partially contributes to the pathology observed by overexpression of GSK3 $\beta$  in mouse brain.

## Materials and methods

### Animals

Tet/GSK3 $\beta$  mice were generated as previously described (Lucas et al., 2001). Briefly, Tet/GSK3 $\beta$  mice results from the breeding of TetO mice (carrying the bidirectional tet responsive promoter followed by GSK3 $\beta$  and  $\beta$ -galactosidase cDNAs, one in each direction) with CamKII $\alpha$ -tTA mice. These mice are designated Tet/GSK3 $\beta$  and overexpress GSK3 $\beta$  in cortical and hippocampal neurons in a conditional manner repressible by tetracycline administration. Generation of the mouse line Tau $^{-/-}$  has been previously described



**Fig. 1.** Characterization of mouse lines. (A) The presence of tau protein in wild-type mice (wt), mice lacking tau (Tau $^{-/-}$ ), transgenic mice overexpressing GSK3 $\beta$  (Tet/GSK3 $\beta$ ) and transgenic mice overexpressing GSK3 $\beta$  but lacking tau protein (Tet/GSK3 $\beta$ +Tau $^{-/-}$ ) was tested at the hippocampal region by using tau antibody, Tau-1. (B) Since GSK3 $\beta$  expression correlates, in transgenic mice, with that of the reporter gene ( $\beta$ -galactosidase), the analysis of  $\beta$ -galactosidase expression was done in wild-type mice (wt), mice lacking tau (Tau $^{-/-}$ ), transgenic mice overexpressing GSK3 $\beta$  (Tet/GSK3 $\beta$ ) and transgenic mice overexpressing GSK3 $\beta$  but lacking tau protein (Tet/GSK3 $\beta$ +Tau $^{-/-}$ ). (C) Western blot analysis to characterize the different mouse lines. This figure shows the expression of exogenous GSK3 $\beta$ , containing a myc epitope and analyzed by reaction of an antibody against GSK3 $\beta$ . Tau protein expression determined by the reaction with tau antibody 7.51. The expression of the reporter gene ( $\beta$  galactosidase) that correlates with that of exogenous GSK3 $\beta$ . The presence of tau modified by GSK3 was determined by its interaction with antibody PHF-1. Finally, as a protein loading control, expression of  $\beta$  tubulin is indicated. (D) Immunohistochemical staining of the dentate gyrus from wt, Tau $^{-/-}$ , Tet/GSK-3 $\beta$  and Tet/GSK3 $\beta$ +Tau $^{-/-}$  mice with PHF-1 antibody. No reaction was found for mice lacking tau.

(Dawson et al., 2001). Mice lacking tau protein were crossed with Tet/GSK3 $\beta$  mice to generate the triple transgenic mice (Fig 1). Transgenic mice were genotyped by PCR. Transgenic animals as well as wild-type mice also isolated after crossing Tau $^{-/-}$  and Tet/GSK3 $\beta$  (Fig. 1) 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 h. All experiments were carried out with males.

#### Antibodies

The following antibodies were used: anti- $\beta$ -galactosidase (Promega); anti- $\beta$ -tubulin (Sigma, St. Louis Mo. USA); anti-gial fibrillary acidic protein (GFAP) (PharMingen, San Diego, CA); and anti-GSK-3 $\beta$  (BD Transduction Laboratories, Lexington, KY). The 7.51 antibody (from Dr. Claude Wischik, UK) recognizes segments of the last two repeats within the microtubule binding domain of tau in a phosphorylation-independent manner (Novak et al., 1991) and detects all soluble tau isoform in Western blot analysis. Tau-1 recognizes tau when Ser-199/202 is in unphosphorylated form (Chemicon, USA). PHF-1 was a kind gift from Dr. Peter Davies (NY, USA), it recognizes serine residues modified by GSK3 at the C-terminal region of tau molecule. Antibodies against ionized calcium binding adapter molecule-1 (Iba-1) (Wako Pure Chemicals) were used to determine microgliosis.

#### Morris water maze

The water maze apparatus consisted of a circular pool (1.2 m diameter and 40 cm high) made of white plastic. It was located in the centre of attesting room (3 $\times$ 4 m). The pool was filled to the depth of 20 cm with water (24–25 °C) and divided into four quadrants of equal size. An invisible escape platform (10 cm diameter) made of transparent plastic was placed in the middle of one of the quadrants (0.5 cm below the water level). During a probe trial, the platform was removed from the pool. In the cued learning test, the platform position was marked with a grey plastic cube (9 cm). The position of a mouse in tank was recorded by a video camera suspended 2.5 m above the centre of the tank and connected to a video tracking system (Ethovision1.50; Noldus IT) and a PC running HVS software.

Procedure: Four different starting positions were equally spaced around the perimeter of the pool. On each day, all four start position were used once in a random sequence. During the acquisition or training phase, each mouse was given 20 trials in blocks of four trials for four consecutive days. During training, the time taken to locate the escape platform (escape latency) was recorded.

#### Volumetric measurement of dentate gyrus atrophy

To quantitate dentate gyrus atrophy among the different transgenic lines, mice were anaesthetized and sacrificed by transcardiac perfusion fixation with 4% paraformaldehyde. The brains from 3- and 18-month mice were removed from skull and post-fixed in 4% paraformaldehyde. Serial sections (30  $\mu$ m) were cut, as described previously (Engel et al., 2006a), and thionine stained. For volumetric measurement, areas of dentate gyrus were delineated and measured by means of Methamorph image-analysis system. The total volume (mm<sup>3</sup>) of each dentate gyrus was achieved by integration of areas (mm<sup>2</sup>) with the distance between each sagittal plane (mm). The points for integration were 0.12 mm (Fig 102 of the atlas of Paxinos and Franklin (Paxinos, 2001) and 3.00 mm (Fig 126 of the same atlas) with respect to the midline.

#### Subcellular fractionation

To prepare nuclear and cytosolic extracts, tissues were disrupted in an ice Dounce-homogenizer with 15 strokes in M-SHE buffer (210 mM manitol, 70 mM sucrose, 10 mM HEPES pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA) supplemented with protease inhibitors (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10  $\mu$ g/ml aprotinin, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 10  $\mu$ g/ml pepstatin), phosphatase inhibitors (1 mM sodium orthovanadate, 30 mM glycerophosphate, 5 mM pyrophosphate, 1  $\mu$ M okadaic acid) and 1 mM dithiothreitol. The homogenate was placed into ice for 30 min and then centrifugated at 1200 $\times$ g for 10 min at 4 °C. The resulting pellet was homogenized and centrifugated again as above. The resulting supernatant was added to that obtained in the first step, constituting the cytosolic fraction. The membrane fraction (pellet) was homogenized in M-SHE buffer and centrifugated at 1000 $\times$ g for 10 min at 4 °C. Both the supernatant and the pellet's upper layer were discarded and the remaining pellet, which contained the nuclei, was resuspended in TSE buffer (10 mM Tris pH 7.5, 300 mM sucrose, 1 mM EDTA) supplemented with 0.1% NP-40 and was centrifugated at 8500 $\times$ g for 10 min at 4 °C. The resulting pellet was resuspended in TSE buffer supplemented with 1% NP-40 and centrifugated at 1500 $\times$ g for 7 min at 4 °C. This last step was repeated to clean the nuclear fraction (opaque layer at the bottom of the tube) of any other membranes (yellow layer). The purity of the brain nuclei was tested by light microscopy after crystal violet staining. Lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 100 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 2% SDS, 0.1% bromofenol blue, 10% glycerol) was added to cytosolic and nuclear fractions. Samples were boiled for 10 min and then analyzed by SDS-PAGE.

#### Western blot analysis

Brains were quickly dissected on an ice-cold plate. Extracts for Western blot analysis were prepared by homogenizing the brain areas

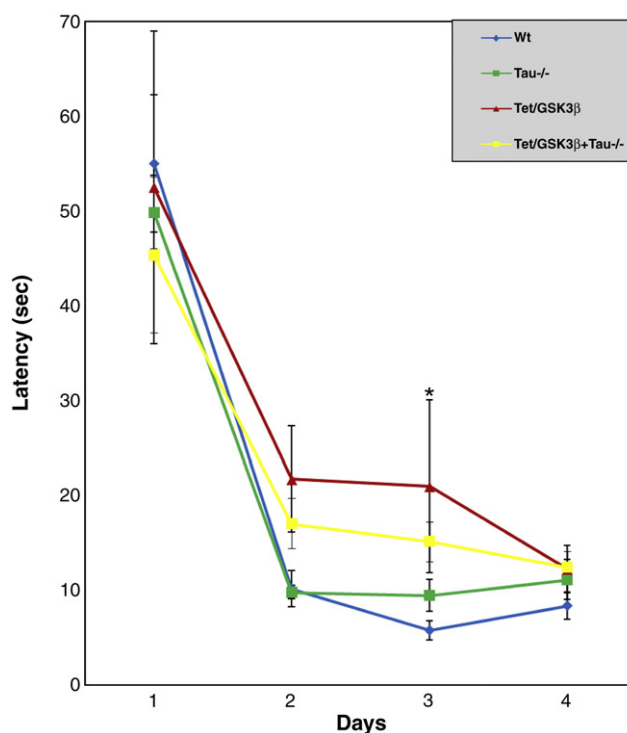


Fig. 2. Morris water maze performance of mouse lines. Time spent (latency) swimming to find the hidden platform over the 4 days of the training phase is indicated for (♦) wild-type mice ( $n=6$ ), (■) Tau $^{-/-}$  ( $n=6$ ), (▲) Tet/GSK3 $\beta$  ( $n=6$ ) and (×) Tet/GSK3 $\beta$ +Tau $^{-/-}$  ( $n=11$ ). \* $p<0.05$  for Tet/GSK3 $\beta$  mice compared to wt mice.

in ice-cold extraction buffer consisting of 20 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, 20 mM NaF, 1% Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate, 5 mM EDTA and 2 mM PMSF and a protease inhibitor cocktail (Roche). The samples were homogenized and centrifuged at 15,000×g for 20 min at 4°C. The resulting supernatant was collected, and protein content was determined by Bradford assay. Thirty micrograms of total protein was electrophoresed on 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred to a nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell, Keene, NH). The experiments were performed using the following primary monoclonal antibodies: anti-GSK-3β (1/1000), anti-β-galactosidase (1/1000), 7.51 (1/100); and anti-β-tubulin (1/5000). The filters were incubated with the antibody at 4 °C overnight in 5% non-fat dried milk. A secondary goat anti-mouse antibody (1/1000) (Dako) and ECL detection reagents (Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL) were used for immunodetection.

**Immunohistochemistry**

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, Nussloch, Germany) and collected in 0.1% azide-PBS solution. Next, brain sections were pre-treated for 1 h with 1% BSA, 5% FBS and 0.2% Triton X-100 and then incubated with primary antibodies at the following dilutions:

Tau-1 (1/500), anti-β-galactosidase (1/5000), PHF-1 (1/150), anti-IBA-1 (1/500) and anti-GFAP (1/100). Finally, brain sections were incubated in avidin-biotin complex using the Elite Vectastin kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Chromogen reactions were performed with diaminobenzidine (Sigma) and 0.003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 min. Sections were coverslipped with Fluorosave. Results correspond to sagittal sections [matching Fig. 114 of Paxinos and Franklin (2001)] at 1.56 mm with respect to the midline.

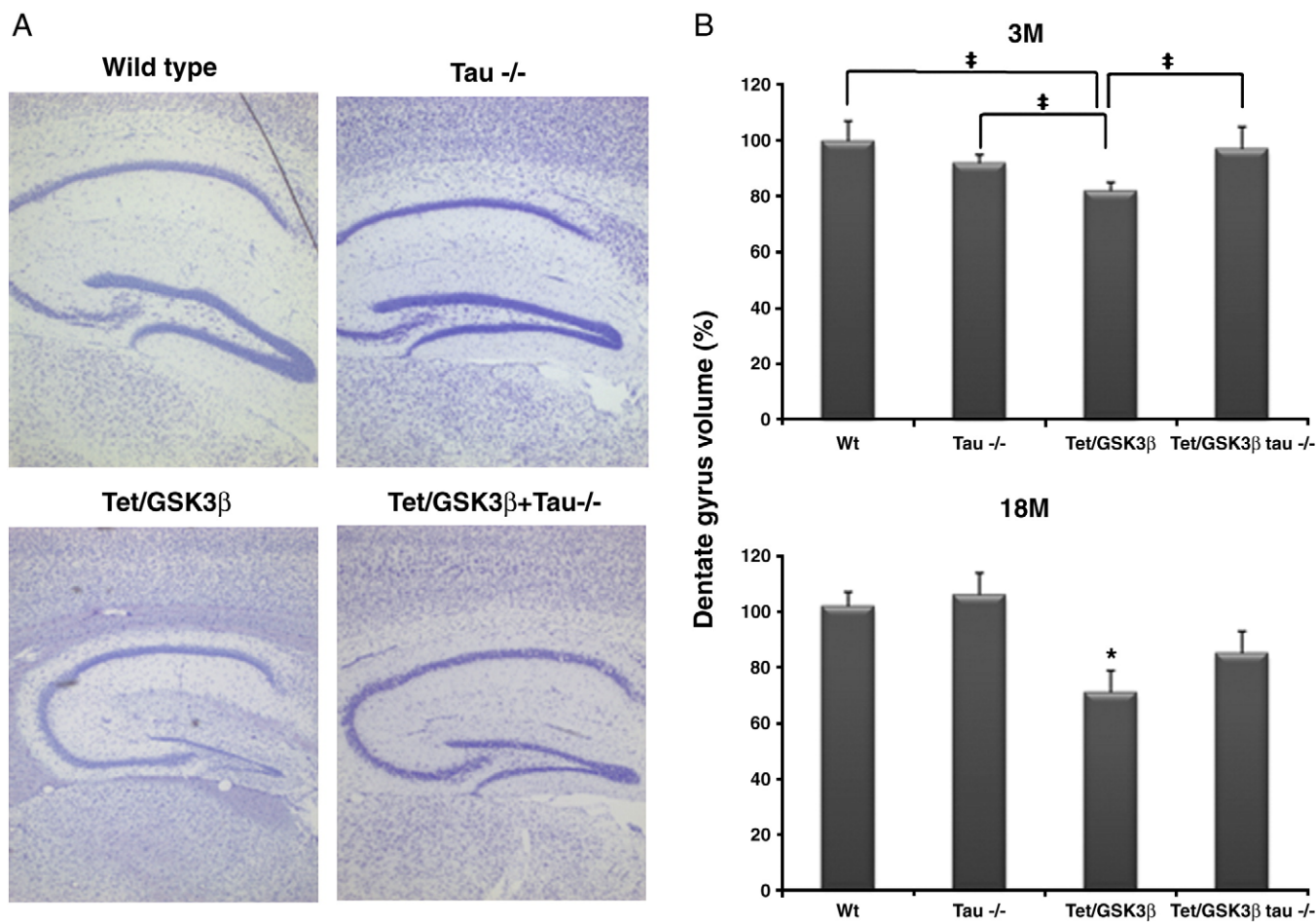
**Statistical analysis**

Statistical analysis was performed with SPSS 17.0. Data are presented as mean values ± SEM. Data were analyzed by Kolmogorov-Smirnov test, followed by Shapiro-Wilk test. If not indicated otherwise, as most of the analyses were parametric a one way-ANOVA followed by a post hoc Bonferroni test was applied. In addition, Student *t*-test was used to compare two different groups. The level of significance accepted was *p*<0.05.

**Results**

*Generation of the genetic modified mice Tet/GSK3β+Tau-/-*

Here, we have brought Tet/GSK3β mice to a tau knockout background (Fig. S1). The breeding protocol yielded experimental mice of the four following genotypes: (a) wild-type, (b) Tau-/-, (c)



**Fig. 3.** Atrophy in the dentate gyrus of the hippocampus in the different mouse lines. (A) Thionine-stained sagittal sections from wild-type, Tau-/-, Tet/GSK3β and Tet/GSK3β+Tau-/- mice. (B) Volumetric quantitation (n = 6) of the atrophy of dentate gyrus, determined as described in the Materials and methods section in 3-month old (filled bars) and 18-month-old (opened bars) mice. \**p*<0.05 for Tet/GSK3β mice (18M) compared to wt mice, when ANOVA was used. In addition, when Tet/GSK3β and Tet/GSK3β+Tau-/- mice were compared, using Student *t*-test analysis, a significant difference (*p*<0.05) was found between both groups at 3 M (‡). Also, differences (*p*<0.05) between wild-type and Tet/GSK3β or between tau-/- and Tet/GSK3β mice were found (‡).

Tet/GSK3 $\beta$  and (d) Tet/GSK3 $\beta$  in a Tau $^{-/-}$  background (Tet/GSK3 $\beta$ +Tau $^{-/-}$ ). Although some slight differences between wild-type and tau $^{-/-}$  mice have been reported (Dawson et al., 2001, Perez et al., 2009), in most aspects the behavior of tau $^{-/-}$  is similar to that of wt mice (Harada et al., 1994, Dawson et al., 2001).

Fig. 1 shows the characterization of the four experimental genotypes. Wild-type and Tet/GSK3 $\beta$  transgenic mice express tau protein, whereas tau is absent in tau knockout (Tau $^{-/-}$ ) and in Tet/GSK3 $\beta$  transgenic mice lacking tau (Fig. 1A). Beta galactosidase, whose expression correlates with that of GSK3 $\beta$ , is present only in those mice that should overexpress GSK3 $\beta$  (Fig. 1B). Data from Figs. 1A and B were confirmed by Western blot analysis (Fig. 1C), indicating the expression of exogenous GSK3 $\beta$  and  $\beta$ -galactosidase in Tet/GSK3 $\beta$ +Tau $^{-/-}$  and in Tet/GSK3 $\beta$  but not in the other control mice, whereas no tau expression was found, as expected, in mice lacking tau gene. Finally, a difference for tau protein from Tet/GSK3 $\beta$  and wild-type mice (Figs. 1C and D) was their reaction with PHF-1 antibody (Vincent et al., 1994), which recognizes tau modified by GSK3. Thus, tau present in Tet/GSK3 $\beta$  is hyperphosphorylated compared to tau protein from wild-type mice. These results agree with those indicating that tau from Tet/GSK3 $\beta$ , and recognized by tau antibody 7.51, show a slower electrophoretic mobility than that from wild-type mice (Fig. 1C).

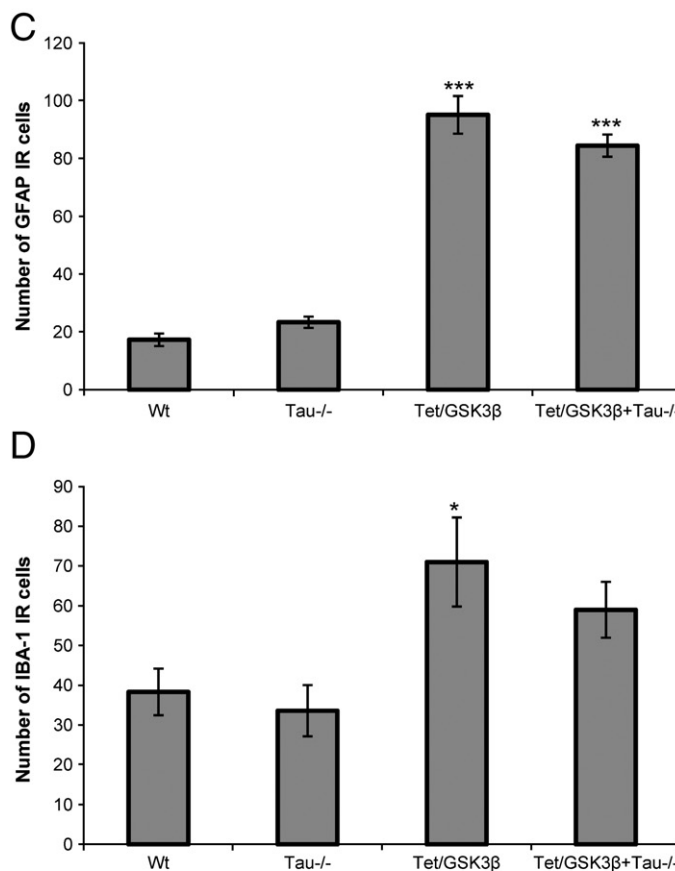
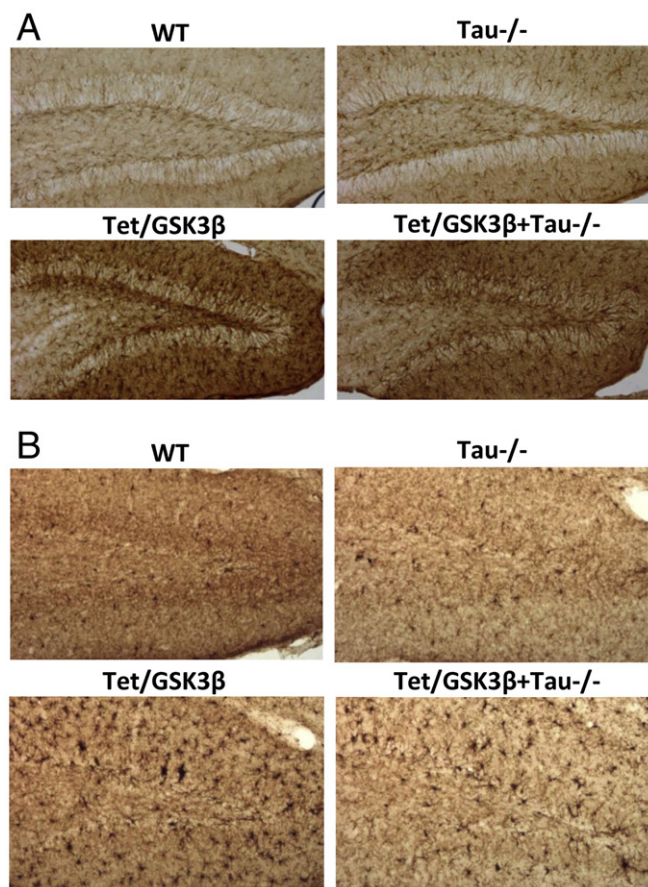
*Morris water maze performance of Tet/GSK3 $\beta$ +Tau $^{-/-}$*

Tet/GSK3 $\beta$  transgenic mice show a spatial learning deficit as determined by the Morris water maze (Hernandez et al., 2002). To

explore whether GSK3-modified tau contributes to this deficit we tested the behavior of Tet/GSK3 $\beta$  transgenic mice lacking tau protein (Tet/GSK3 $\beta$ +Tau $^{-/-}$ ) in parallel with wild-type (wt), tau knockout (Tau $^{-/-}$ ) and Tet/GSK3 $\beta$  transgenic mice (Fig. 2). As previously reported (Roberson et al., 2007), wt and Tau $^{-/-}$  mice behaved similarly in the hidden platform test. As also previously reported (Hernandez et al., 2002, Roberson et al., 2007), Tet/GSK3 $\beta$  mice performed significantly worse in terms of their latency to find the platform. Interestingly, an intermediate situation was observed for Tet/GSK3 $\beta$ +Tau $^{-/-}$  mice that despite overexpressing GSK3 $\beta$  were not significantly different from their wt and tau $^{-/-}$  littermates, thus suggesting that tau modification by excess GSK-3 contributes to the learning deficit observed in Tet/GSK3 $\beta$  mice.

*Neurodegeneration in Tet/GSK3 $\beta$ +Tau $^{-/-}$*

A correlation between spatial learning deficit and a decrease in dentate gyrus volume was suggested for transgenic Tet/GSK3 $\beta$  mice (Engel et al., 2006a). In order to further analyze the observed atrophy described for Tet/GSK3 $\beta$  mice and compare it with that of Tet/GSK3 $\beta$ +Tau $^{-/-}$  mice, thionine-stained brain sections from each type of transgenic mice together with those from wt and Tau $^{-/-}$  mice were analyzed. As shown in Fig. 3A, 18-month-old Tet/GSK3 $\beta$  mice show a higher decrease in the size of dentate gyrus when compared with the other three groups. Fig. 3B shows the volumetric quantification of the atrophy in both 3- and 18-month-old mice. No decrease in dentate gyrus volume was observed for wt and tau knockout mice. The difference was significant for Tet/GSK3 mice



**Fig. 4.** Reactive glia in the different mouse lines analyzed. (A) GFAP immunohistochemistry in the dentate gyrus of wt, Tau $^{-/-}$ , Tet/GSK3 $\beta$  and Tet/GSK3 $\beta$ +Tau $^{-/-}$  is indicated. (B) Iba-1 staining to detect microglia in the different mouse lines. Heavily stained cells were observed only in Tet/GSK3 $\beta$  samples. (C) Quantitation of GFAP-stained cells. \*\*\* $p$ <0.005 for Tet/GSK3 $\beta$  and Tet/GSK3 $\beta$ +Tau $^{-/-}$  mice compared to wild-type and Tau $^{-/-}$  groups. (D) Quantitation of Iba-1-stained cells (independent of level of staining) in the different mouse lines. \* $p$ <0.05 for Tet/GSK3 $\beta$  mice compared to wild-type and Tau $^{-/-}$  (E).

(18M) when ANOVA test (see Materials and methods section) was used. Higher neurodegeneration was found for Tet/GSK3 $\beta$  compared to Tet/GSK3 $\beta$ +Tau $^{-/-}$  mice. When Tet/GSK3 $\beta$  and Tet/GSK3 $\beta$  + tau $^{-/-}$  mice were compared using Student *t*-test analysis, a significant difference ( $p > 0.05$ ) was found between them at 3M (Fig. 3B). At 18 M, a  $p = 0.07$  was observed. These results suggest a partial protective role of tau absence that retards GSK3-induced neurodegeneration.

*Reactive gliosis in the hippocampus of Tet/GSK3 $\beta$ +Tau $^{-/-}$  mice*

Previous studies have indicated reactive gliosis in the hippocampus of Tet/GSK3 $\beta$  mice (Lucas et al., 2001, Engel et al., 2006a). To test whether reactive gliosis was also taking place in the hippocampus of Tet/GSK3 $\beta$ +Tau $^{-/-}$  mice, we performed immunohistochemistry with GFAP antibodies (Lucas et al., 2001). Our results (Fig. 4A) indicate an increase in the fine astrocytic glial processes in the dentate gyrus of Tet/GSK3 $\beta$ +Tau $^{-/-}$  compared to wild-type and tau knockout mice. However, it suggested a decrease in reactive gliosis compared to that of Tet/GSK3 $\beta$  mice. In a further step, the appearance of reactive microglia was analyzed at the dentate gyrus. Fig. 4B suggests a higher increase in microgliosis in Tet/GSK3 $\beta$  mice compared with the rest of their counterparts, although in Tet/GSK3 +Tau $^{-/-}$  mice, some microgliosis was also observed. Figs. 4C and D show the quantization of the data indicated in Figs. 4A and B.

*Nuclear  $\beta$ catenin destabilization in Tet/GSK3 $\beta$ +Tau $^{-/-}$  mice*

The effect of GSK3 $\beta$  overexpression in Tet/GSK3 $\beta$  mice that may result in DG degeneration was probably due to the modification of substrates like  $\beta$ -catenin or tau protein. Our previous results, in this work, suggest a partial contribution of tau to the toxic effect of GSK3 $\beta$  overexpression. Thus, we have looked for nuclear  $\beta$ -catenin destabi-

lization in Tet/GSK3 $\beta$ +Tau $^{-/-}$  mice that could result in an additional effect on neuron degeneration. Indeed, GSK3 activity is key in regulating  $\beta$ -catenin stabilization and subsequent nuclear translocation (Barth et al., 1997, Anderton, 1999). Then, we have tested, by Western blot, the level of total  $\beta$ -catenin in hippocampal extracts. No differences were found when the four mouse groups (wt, Tau $^{-/-}$ , Tet/GSK3 $\beta$ , Tet/GSK3 $\beta$ +Tau $^{-/-}$ ) were tested. However, when we analyzed  $\beta$ -catenin levels in two different cellular compartments (nucleus and cytoplasm) of hippocampal neurons, we observed a reduction in  $\beta$ -catenin level in the nuclear fraction of Tet/GSK3 $\beta$  and Tet/GSK3 $\beta$ +Tau $^{-/-}$  compared to wild-type or tau knockout littermates (Fig. 5), although the nuclear  $\beta$ -catenin level for Tet/GSK3 $\beta$ +Tau $^{-/-}$  was even slightly lower than that of Tet/GSK3 $\beta$  mice. It could be explained by the possible competition of tau and  $\beta$ -catenin for GSK3 (Li et al., 2007). Thus, these results suggest the possible toxic consequences of having phosphorylated  $\beta$ -catenin in those mice that are overexpressing GSK3 $\beta$ .

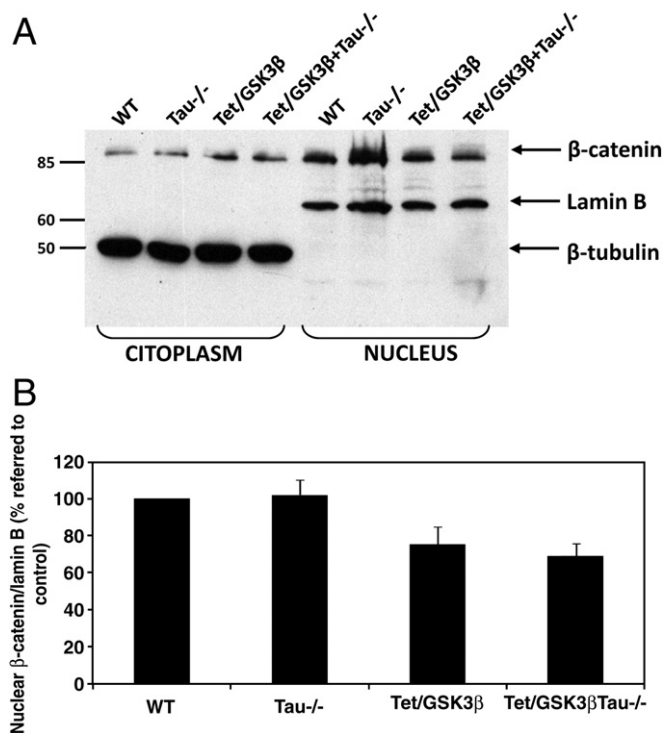
**Discussion**

It has been suggested that GSK3 could play an important role in the neurodegeneration observed in disorders like AD, a disorder in which GSK3 $\beta$  levels are altered (Shiurba et al., 1996, Pei et al., 1999). To determine the mechanism for this GSK3-induced neurodegeneration is an important issue. GSK3 activation results as a consequence of FAD. Similarly, GSK3 activation could occur in sporadic Alzheimer disease and this active GSK3 could increase tau phosphorylation (Hernandez and Avila, 2008, Small and Duff, 2008). This tau hyperphosphorylation could simply be a hallmark of increased GSK3 activity but it could also be an important mediator of the toxic effect of excess GSK3 activity.

To address the possible contribution of tau modifications to the effect of GSK-3 overexpression, we have compared mice with four different genotypes: wild-type, tau $^{-/-}$ , Tet/GSK3 $\beta$  and Tet/GSK3/tau $^{-/-}$ , using five different tests. In line with previous reports (Harada et al., 1994, Dawson et al., 2001), no differences between wild-type and tau $^{-/-}$  mice were found in these analyses.

One of the consequences of GSK-3 overexpression is a severe atrophy in the dentate gyrus, thus indicating an important neurodegeneration in this brain region (Lucas et al., 2001). It is not known if tau protein, in phosphorylated form, may play a role in the neurodegeneration process. There are some indications about that possible role. Previously, we have described that neurodegeneration can be accelerated in the GSK3 transgenic mouse by over expressing tau protein (Engel et al., 2006b) and now, in this work, we have indicated that, in the absence of tau protein, neuron degeneration is partially delayed. In other model, the fruit fly, overexpression of wild-type human tau and GSK3 $\beta$  (shaggy/zeste white-3) results in neurodegeneration (Jackson et al., 2002) and, in that neurodegeneration process, tau phosphorylation but not tau aggregation may be involved. On the other hand, it has been suggested that phosphotau could be toxic for neurons (Santacruz et al., 2005), perhaps by sequestering other microtubule associated proteins, what will result in a disorganization of microtubule network that is required for normal cell function (Alonso et al., 1997). More recently, it has also been indicated that upon neuron death, monomeric tau becomes an extracellular protein that could be toxic for the surrounding neurons (Gomez-Ramos et al., 2006). Curiously, tau from dentate gyrus is enriched in the isoform containing three tubulin binding regions (Goedert et al., 1989), which shows a lower self assembly capacity and, therefore, it may remain in monomeric form. Also, microtubule associated protein MAP1B, one of the proteins that can be sequestered by phosphotau (Alonso et al., 1997) is present in the dentate gyrus (Ramon-Cueto and Avila, 1997).

Indeed, these results may explain a toxic function for phosphotau. Thus, the absence of tau protein expression will result in a partial



**Fig. 5.**  $\beta$ -Catenin levels in the different mouse lines. (A) Representative Western blot of cytoplasm and nuclear fractions from the hippocampus of wt, Tau $^{-/-}$ , Tet/GSK3 $\beta$  and Tet/GSK3 $\beta$ +Tau $^{-/-}$  mice. The presence of cytoplasm (tubulin) or nuclear (Lamin B) markers in each subcellular fraction is indicated. (B) Quantitation of the data shown in panel A.



protective effect of GSK3-induced neurodegeneration. It will be only partial protection because there are other proteins, like  $\beta$ -catenin, that could be involved, too, in that GSK3-induced neurodegeneration process. In this way, the neuroprotective effects of the GSK3 inhibitor, lithium, has been related to its ability to inhibit GSK3 (Alvarez et al., 1999, Hetman et al., 2000) and to upregulate Bcl-2 and down-regulate Bax protein in neurons (Manji et al., 1999). Also, it has been indicated that phosphorylation (and activation) of proapoptotic protein Bax by GSK3 results in cell apoptosis (Linseman et al., 2004). In addition, there is a GSK3 substrate that could play an important role in this neurodegeneration process. This protein could be  $\beta$ -catenin that, upon GSK3 phosphorylation, is degraded and a decrease in  $\beta$ -catenin-mediated transcription has been shown to potentiate neuronal apoptosis (Zhang et al., 1998). In this work, we have demonstrated that nuclear beta catenin degradation occurs in Tet/GSK3+Tau-/- mice and that it is slightly higher than in Tet/GSK3 $\beta$  mice. This can be explained, in part, by a possible competition between two substrates (tau and  $\beta$ -catenin) for the same kinase (GSK3), as previously suggested (Li et al., 2007). Also, it could explain, in part, the observed neurodegeneration found in Tet/GSK3+Tau-/- mouse. In summary, GSK3-induced neurodegeneration that could take place in FAD, as a consequence of mutations in APP or presenilin proteins, may result in an increase in tau phosphorylation that could facilitate, in part, that neurodegeneration. Thus, in the absence of tau a partial protection was found, or in other words, GSK3-induced neurodegeneration is slightly attenuated by loss of tau.

## Acknowledgments

This work was supported by grants from Spanish Plan Nacional, Comunidad de Madrid, Fundación Botín, CIBERNED, and an institutional grant from Fundación Ramón Areces.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.nbd.2009.11.017.

## References

- Alonso, A.D., Grundke-Iqbal, I., Barra, H.S., Iqbal, K., 1997. Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 298–303.
- Alvarez, G., Munoz-Montano, J.R., Satrustegui, J., Avila, J., Bogonez, E., Diaz-Nido, J., 1999. Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. *FEBS Lett.* 453, 260–264.
- Anderton, B.H., 1999. Alzheimer's disease: clues from flies and worms. *Curr. Biol.* 9, R106–109.
- Avila, J., 2006. Tau phosphorylation and aggregation in Alzheimer's disease pathology. *FEBS Lett.* 580, 2922–2927.
- Baki, L., Shioi, J., Wen, P., Shao, Z., Schwarzman, A., Gama-Sosa, M., Neve, R., Robakis, N.K., 2004. PS1 activates PI3K thus inhibiting GSK-3 activity and tau overphosphorylation: effects of FAD mutations. *EMBO J.* 23, 2586–2596.
- Barth, A.I., Nathke, I.S., Nelson, W.J., 1997. Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 683–690.
- Busciglio, J., Lorenzo, A., Yeh, J., Yankner, B.A., 1995. beta-amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron* 14, 879–888.
- Dawson, H.N., Ferreira, A., Eyster, M.V., Ghoshal, N., Binder, L.I., Vittek, M.P., 2001. Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice. *J. Cell Sci.* 114, 1179–1187.
- Engel, T., Hernandez, F., Avila, J., 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., Hernandez, F., 2006b. Coexpression of FTDP-17 tau and GSK-3beta in transgenic mice induce tau polymerization and neurodegeneration. *Neurobiol. Aging* 27, 1258–1268.
- Ferreira, A., Lu, Q., Orecchio, L., 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.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M.C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., et al., 1991. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704–706.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Potier, M.C., Ulrich, J., Crowther, R.A., 1989. 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, 393–399.
- Gomez-Ramos, A., Diaz-Hernandez, M., Cuadros, R., Hernandez, F., Avila, J., 2006. Extracellular tau is toxic to neuronal cells. *FEBS Lett.* 580, 4842–4850.
- Gotz, J., Chen, F., van Dorpe, J., Nitsch, R.M., 2001. Formation of neurofibrillary tangles in P301 tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science* 293, 1491–1495.
- Grimes, C.A., Jope, R.S., 2001. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog. Neurobiol.* 65, 391–426.
- Harada, A., Oguchi, K., Okabe, S., Kuno, J., Terada, S., Ohshima, T., Sato-Yoshitake, R., Takei, Y., Noda, T., Hirokawa, N., 1994. Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature* 369, 488–491.
- 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, 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.
- Hetman, M., Cavanaugh, J.E., Kimelman, D., Xia, Z., 2000. Role of glycogen synthase kinase-3beta in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal. *J. Neurosci.* 20, 2567–2574.
- Ishiguro, K., Shiratsuchi, A., Sato, S., Omori, A., Arioka, M., Kobayashi, S., Uchida, T., Imahori, K., 1993. Glycogen synthase kinase 3 beta is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments. *FEBS Lett.* 325, 167–172.
- Jackson, G.R., Wiedau-Pazos, M., Sang, T.K., Wagle, N., Brown, C.A., Massachi, S., Geschwind, D.H., 2002. Human wild-type tau interacts with wingless pathway components and produces neurofibrillary pathology in *Drosophila*. *Neuron* 34, 509–519.
- Kimura, T., Yamashita, S., Fukuda, T., Park, J.M., Murayama, M., Mizoroki, T., Yoshiike, Y., Sahara, N., Takashima, A., 2007. Hyperphosphorylated tau in parahippocampal cortex impairs place learning in aged mice expressing wild-type human tau. *EMBO J.* 26, 5143–5152.
- Li, H.L., Wang, H.H., Liu, S.J., Deng, Y.Q., Zhang, Y.J., Tian, Q., Wang, X.C., Chen, X.Q., Yang, Y., Zhang, J.Y., Wang, Q., Xu, H., Liao, F.F., Wang, J.Z., 2007. Phosphorylation of tau antagonizes apoptosis by stabilizing beta-catenin, a mechanism involved in Alzheimer's neurodegeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 3591–3596.
- Linseman, D.A., Butts, B.D., Precht, T.A., Phelps, R.A., Le, S.S., Laessig, T.A., Bouchard, R.J., Florez-McClure, M.L., Heidenreich, K.A., 2004. Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylates Bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis. *J. Neurosci.* 24, 9993–10002.
- Liu, T., Perry, G., Chan, H.W., Verdile, G., Martins, R.N., Smith, M.A., Atwood, C.S., 2004. Amyloid-beta-induced toxicity of primary neurons is dependent upon differentiation-associated increases in tau and cyclin-dependent kinase 5 expression. *J. Neurochem.* 88, 554–563.
- Lucas, J.J., Hernandez, F., Gomez-Ramos, P., Moran, M.A., Hen, R., Avila, J., 2001. Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *EMBO J.* 20, 27–39.
- Magdesian, M.H., Carvalho, M.M., Mendes, F.A., Saraiva, L.M., Juliano, M.A., Juliano, L., Garcia-Abreu, J., Ferreira, S.T., 2008. Amyloid-beta binds to the extracellular cysteine-rich domain of Frizzled and inhibits Wnt/beta-catenin signaling. *J. Biol. Chem.* 283, 9359–9368.
- Manji, H.K., Moore, G.J., Chen, G., 1999. Lithium at 50: have the neuroprotective effects of this unique cation been overlooked? *Biol. Psychiatry* 46, 929–940.
- Morishima-Kawashima, M., Hasegawa, M., Takio, K., Suzuki, M., Yoshida, H., Titani, K., Ihara, Y., 1995. Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau. *J. Biol. Chem.* 270, 823–829.
- Novak, M., Jakes, R., Edwards, P.C., Milstein, C., Wischik, C.M., 1991. Difference between the tau protein of Alzheimer paired helical filament core and normal tau revealed by epitope analysis of monoclonal antibodies 423 and 751. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 5837–5841.
- Paxinos, G.F.K., 2001. *The Mouse Brain*. Academic Press.
- Pei, J.J., Braak, E., Braak, H., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Winblad, B., 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., Santa-Maria, I., Gomez de Barreda, E., Zhu, X., Cuadros, R., Cabrero, J.R., Sanchez-Madrid, F., Dawson, H.N., Vittek, M.P., Perry, G., Smith, M.A., Avila, J., 2009. Tau—an inhibitor of deacetylase HDAC6 function. *J. Neurochem.* 109, 1756–1766.
- Price, D.L., Sisodia, S.S., 1998. Mutant genes in familial Alzheimer's disease and transgenic models. *Annu. Rev. Neurosci.* 21, 479–505.
- Ramon-Cueto, A., Avila, J., 1997. Differential expression of microtubule-associated protein 1B phosphorylated isoforms in the adult rat nervous system. *Neuroscience* 77, 485–501.
- Rapoport, M., Dawson, H.N., Binder, L.I., Vittek, M.P., Ferreira, A., 2002. Tau is essential to beta-amyloid-induced neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 6364–6369.
- Roberson, E.D., Scearce-Lavie, K., Palop, J.J., Yan, F., Cheng, I.H., Wu, T., Gerstein, H., Yu, G.Q., Mucke, L., 2007. Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* 316, 750–754.
- Santacruz, K., Lewis, J., Spire, 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, K.H., 2005. Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 309, 476–481.
- Shiurba, R.A., Ishiguro, K., Takahashi, M., Sato, K., Spooner, E.T., Mercken, M., Yoshida, R., Wheelock, T.R., Yanagawa, H., Imahori, K., Nixon, R.A., 1996. Immunocytochemistry for tau phosphoserine 413 and tau protein kinase I in Alzheimer pathology. *Brain Res.* 737, 119–132.

- Small, S.A., Duff, K., 2008. Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis. *Neuron* 60, 534–542.
- Takashima, A., Murayama, M., Murayama, O., Kohno, T., Honda, T., Yasutake, K., Nihonmatsu, N., Mercken, M., Yamaguchi, H., Sugihara, S., Wolozin, B., 1998. Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3beta and its substrate tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 9637–9641.
- Townsend, M., Mehta, T., Selkoe, D.J., 2007. Soluble Abeta inhibits specific signal transduction cascades common to the insulin receptor pathway. *J. Biol. Chem.* 282, 33305–33312.
- Vincent, I., Rosado, M., Kim, E., Davies, P., 1994. Increased production of paired helical filament epitopes in a cell culture system reduces the turnover of tau. *J. Neurochem.* 62, 715–723.
- Woodgett, J.R., 1990. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/ factor A. *EMBO J.* 9, 2431–2438.
- Zhang, Z., Hartmann, H., Do, V.M., Abramowski, D., Sturchler-Pierrat, C., Staufienbiel, M., Sommer, B., van de Wetering, M., Clevers, H., Saftig, P., De Strooper, B., He, X., Yankner, B.A., 1998. Destabilization of beta-catenin by mutations in presenilin-1 potentiates neuronal apoptosis. *Nature* 395, 698–702.



## Function of tau protein in adult newborn neurons

Almudena Fuster-Matanzo<sup>a</sup>, Elena Gómez de Barreda<sup>a</sup>, Hana N. Dawson<sup>b</sup>, Michael P. Vitek<sup>b</sup>,  
Jesús Avila<sup>a,c</sup>, Félix Hernández<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, CSIC/UAM, Fac. Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

<sup>b</sup>Division of Neurology, Duke University, Durham, NC 27710, USA

<sup>c</sup>Centro de Enfermedades Neurodegenerativas, 28031 Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 23 June 2009

Revised 10 August 2009

Accepted 11 August 2009

Available online 18 August 2009

Edited by Ned Mantei

#### Keywords:

Neurogenesis

Tau

Doublecortin

### ABSTRACT

**Levels of tau phosphorylation are high during the developmental period of intense neurite outgrowth, but decrease later. We here investigated whether tau protein plays a role in adult neurogenesis. First we demonstrate that new neurons generated in the subgranular zone express tau in a hyperphosphorylated form. Phospho-tau expression colocalized with doublecortin but not with glial fibrillary acidic protein, Ki67 or calbindin. The same was observed in the subventricular zone. Tau knockout mice did not show a significant decrease in the number of doublecortin-positive cells, although a deficit in migration was observed. These findings suggest that basal tau phosphorylation present in adult animals is in part due to neurogenesis, and from Tau knockout mice it seems that tau is involved in normal migration of new neurons.**

© 2009 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The subventricular zone (SVZ) bordering the lateral ventricles, and the subgranular zone (SGZ) of the hippocampal formation are two brain regions where neurogenesis takes place in adult mammals. In the hippocampus, newly differentiated granule cells grow dendrites into the molecular layer, and send axons into the CA3 region. Major glutamatergic synaptic activation from perforant path afferents does not occur until new neurons are two or more weeks old. It coincides with appearance of spines on dendrites of newly born neurons [1]. Within 4–6 weeks after birth these neurons become fully integrated into the circuit [2].

Tau is a neuronal microtubule-associated protein that stabilizes neuronal microtubules under normal physiological conditions. Tau plays a key role in the morphogenesis of neurons. The human tau gene contains 16 exons, from which different tau isoforms are generated by alternative splicing [3,4]. Some of these isoforms are selectively expressed during embryonic and early postnatal development [4–6], whereas in the adult central nervous system six different tau isoforms are expressed that differ in the presence or absence of exons 2, 3, and 10 [7]. Exon 10 encodes one of the four repeat sequences [7,8] that form the microtubule-binding domain [9]. The presence of exon 10 results in tau with four repeat micro-

tubule-binding sequences (4R), whereas the alternatively spliced isoforms without exon 10 have only three of these sequences (3R). 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 [10]. In adult human brain both Tau 3R and Tau 4R are present, although in newborn neurons such as those in the hippocampal dentate gyrus Tau 3R is the main isoform [11]. In addition to the presence or absence of exon 10, the phosphorylation of tau is developmentally regulated: it is higher in fetal neurons and decreases with age during development [12–14]. Furthermore, a huge increase in the phosphorylation of tau arises in pathological situations (tauopathies such as Alzheimer's disease) [5,15]. However, fetal-tau phosphorylation can also be observed in the adult. In this work, we have studied the presence of tau phosphorylated in the fetal epitope PHF-1 in adult mice. Our results indicate that phosphorylated tau is mainly localized in newborn neurons. In addition, the analysis of Tau knockout mice (Tau-KO) suggests that tau protein is involved in normal migration of new neurons generated from the subgranular zone.

### 2. Materials and methods

#### 2.1. Animals

Generation of the mouse line Tau-KO has been previously described [16]. Tau-KO as well as wild-type mice (C57BL/6) were

Abbreviations: SGZ, subgranular zone; SVZ, subventricular zone; DCX, doublecortin; GFAP, glial fibrillary acidic protein

\* Corresponding author. Fax: +34 911964420.

E-mail address: [fhernandez@cbm.uam.es](mailto:fhernandez@cbm.uam.es) (F. Hernández).

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 h. One month-old mice were used in this study. All animal care was in accordance with institutional guidelines.

## 2.2. Antibodies

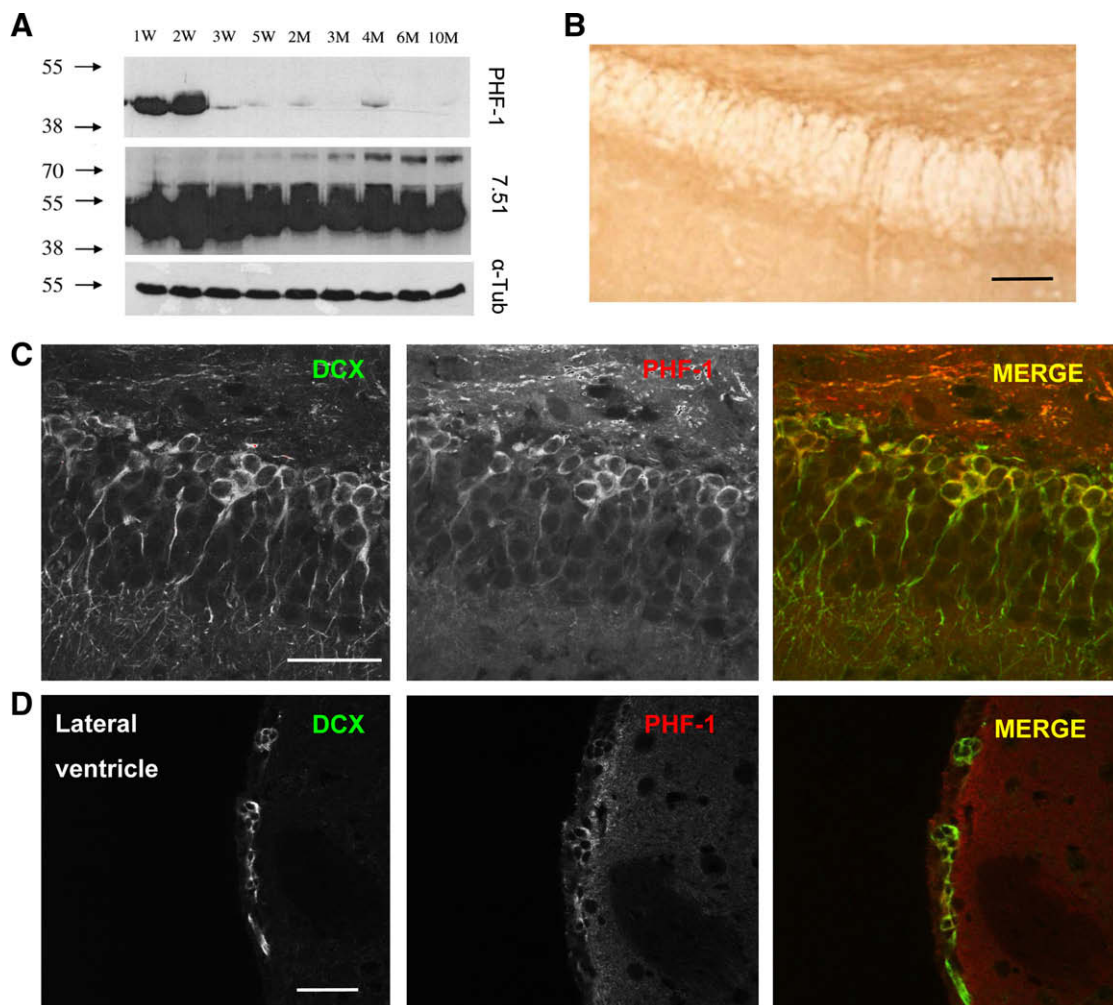
The following anti-tau antibodies were used: PHF-1 (from Dr. Peter Davies, NY, USA) recognizes serines 396 and 404 when they are phosphorylated, AT-8 (from 2 Innogenetics, Gent, Belgium) and 12e8 (a kind gift of Dr. P. Seubert, Athena, San Francisco, CA, USA) antibodies recognize serines 202 and 262, respectively, when they are phosphorylated, and 7.51 antibody (from Dr. Claude Wischik, UK) recognizes segments of the last two repeats within the microtubule-binding domain of tau in a phosphorylation-independent manner [17] and detects all soluble tau isoform in Western blot analysis. Sources of other commercial antibodies were: a polyclonal goat anti-DCX (1:500, C-18, Santa Cruz Laboratories), polyclonal anti-GFAP (PharMingen), polyclonal rabbit anti-calbindin (Millipore), polyclonal rabbit anti-nuclear Ki-67 (Novocastra) and monoclonal anti- $\alpha$ -tubulin (Sigma).

## 2.3. Western blot analysis

Forebrain extracts for Western blot analysis were prepared from mice at various ages 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 PMSF, 10  $\mu$ g/ml aprotinin, 10  $\mu$ g/ml leupeptin and 10  $\mu$ g/ml pepstatin). The samples were homogenized at 4 °C and protein content determined by the Bradford method (Bio-Rad). Total protein (10  $\mu$ g) was electrophoresed on 10% SDS-PAGE gel and transferred to a nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell). After blocking, blots were incubated with primary antibodies PHF-1 (1/200), 7.51 (1/500) and  $\alpha$ -tubulin (1/2000) at 4 °C overnight in 5% nonfat dried milk. A secondary goat anti-mouse (1/5000; GIBCO) followed by ECL detection reagents (Amersham) was used for immunodetection.

## 2.4. Immunohistochemistry and immunofluorescence

Mice were anaesthetized 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



**Fig. 1.** Phosphorylated tau is present in DCX-positive cells in the SGZ of the hippocampus and in the SVZ. (A) Extracts were prepared from mouse brains at various developmental stages as described in Section 2. Samples were electrophoresed, blotted, and probed with antibodies PHF-1, 7.51 and  $\alpha$ -tubulin. (B) PHF-1 immunostaining of the dentate gyrus. Positive cells are found in the SGZ. (C and D) Hippocampal sections double-labeled with anti-DCX (green) and PHF-1 (red) show colocalization of both in the SGZ (C) and SVZ (D). Scale bar = 50  $\mu$ m in (C) and 75  $\mu$ m in (B and D).

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 PHF-1 (1/100) for 1 h. 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% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 min. Sections were coverslipped with Fluorosave (Calbiochem; La Jolla, CA, USA).

Immunofluorescence analysis was performed with sagittal mouse brain sections pretreated with NH<sub>4</sub>Cl 50 mM, glycine 1 M, BSA 1%, and Triton X-100 1% in PBS buffer, and incubated with primary antibodies. For colocalization studies, sections were simultaneously labeled with goat anti-DCX (1/150) and PHF-1 (1/100), AT-8 (1/100), or 12e8 (1/100) for 1 h. Tissue was washed and placed in secondary antibody solution: 1:1000 biotinylated anti-goat IgG (Vectastain Elite ABC Kit Goat IgG, Vector Laboratories), in 0.1 M PBS for 1 h at room temperature. Tissue was washed and placed in 1:500 streptavidin–Alexa Fluor 488 conjugate (Molecular Probes) for 45 min at room temperature and secondary antibody goat anti-mouse IgG labeled with Texas Red or donkey anti-mouse IgG labeled with Alexa 555. Colocalization studies were performed with PHF-1 antibody and anti-GFAP (1:400), anti-Ki67 (1:500), or anti-calbindin (1/500). In this case, secondary antibodies were goat anti-mouse Texas Red and anti-rabbit Oregon green. Colocalization of two markers was analyzed by taking successive Oregon green 488 and Texas Red fluorescent images using an Axioskop 2 plus microscope and a CCD camera (Coolsnap FX color).

### 2.5. Quantification of migration of doublecortin-positive cells

Confocal sections of individual DCX-positive cells (wild-type = 61, Tau-KO = 83) were reconstructed from confocal z stacks

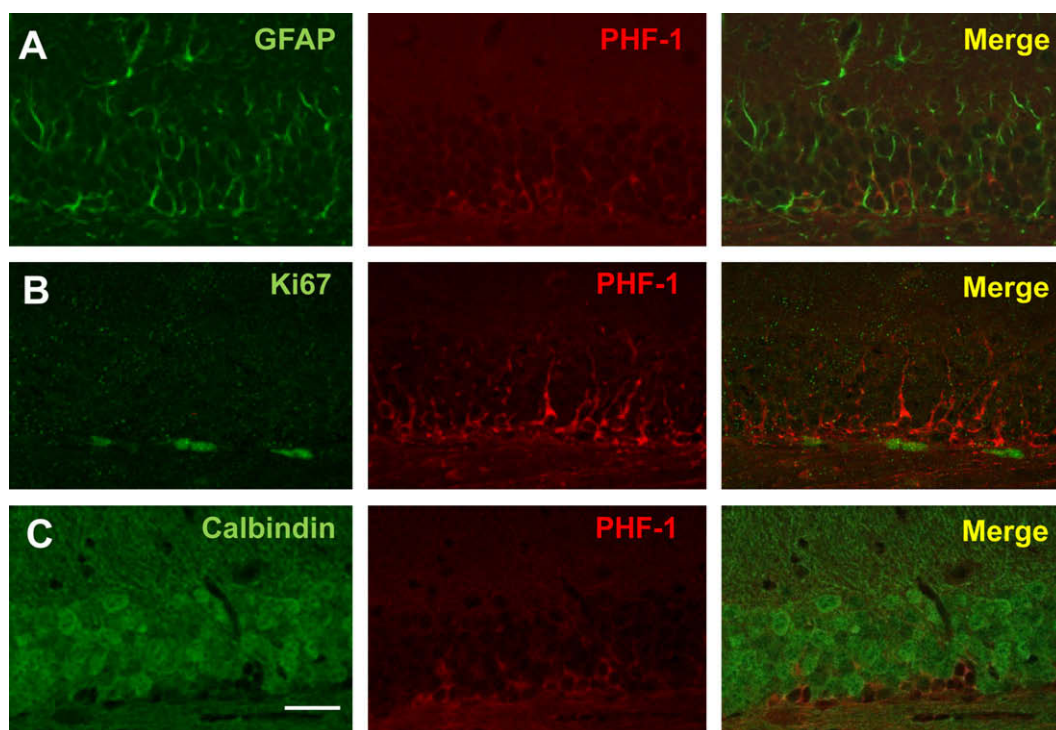
by using the program ImageJ. Cells migrating more than 13.38  $\mu$ m from the SGZ were quantified. The results were divided among the number of total DCX-positive cells present in the section.

## 3. Results

### 3.1. Phosphorylated tau colocalizes with markers of neuronal differentiation in the dentate gyrus and subventricular zone

Phosphorylated forms of tau protein recognized by antibody PHF-1 are at their highest levels around the second postnatal week and then decline [13,14]. However, reactivity with PHF-1 was still detectable by Western blotting in adult mice (Fig. 1A). When we tried to identify the brain area where the phosphorylated protein was localized, we observed immunoreactivity with antibody PHF-1 in cells of the subgranular zone of the hippocampal dentate gyrus (Fig. 1B). Taking into account that the SGZ is an area where neurogenesis takes place in adult animals, we stained hippocampal sections with antibodies recognizing antigens used as markers of neurogenesis. We first found colocalization with doublecortin (DCX), a marker of early neuronal differentiation (Fig. 1C). PHF-1 staining was mainly concentrated in the somatic compartment, while the DCX signal was also found in the apical dendrite. The same was observed in the other brain area with active neurogenesis, the SVZ (Fig. 1D).

On the other hand, we found no colocalization of staining for the PHF-1 epitope and the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) (Fig. 2A). Fig. 2B shows that the lack of colocalization of PHF-1 staining with Ki-67, a nuclear marker of proliferating cells. In addition, we observed no colocalization of PHF-1 staining with that for calbindin (Fig. 2C), a protein expressed in mature neurons. Thus, in the SGZ the pattern of colocalization detected in SGZ between phosphorylated tau and other markers of neuronal



**Fig. 2.** Phospho-tau protein does not colocalize with GFAP, Ki-67 or calbindin-positive cells. Representative colabeling of PHF1-positive cells with cell type markers in the SGZ of the dentate gyrus. Hippocampal sections double-labeled with PHF-1 (red) and GFAP (A, Green), Ki-67 (B, green) or calbindin (C, green) show no colocalization. Scale bar = 50  $\mu$ m.

differentiation suggests that phosphorylated tau is present in immature neurons.

Phosphorylation of tau decreases the affinity of tau protein for microtubules [18]. This may explain the somatic staining found with the PHF-1 antibody. To test this, we performed immunofluorescence with 7.51, an antibody raised against the tubulin-binding domain of tau, and that therefore recognizes tau only when it is not bound to microtubules. Interestingly, the 7.51 antibody stained somas of DCX-positive cells, but not dentate gyrus granule cells. The distribution of 7.51 signal was very similar to that observed with PHF-1 antibody (Fig. 3). PHF-1 recognizes a phospho-epitope present C-terminal from the microtubule-binding domain (MBD). We next studied another two phosphorylation sites with phospho-specific antibodies which recognize serine 202 (AT-8 antibody, N-terminal from MBD) and serine 262 (12e8, in the MBD). With these antibodies a similar pattern was obtained, suggesting that tau protein in DCX-positive cells is hyperphosphorylated in different domains throughout the protein.

### 3.2. Neurogenesis in Tau-Ko mice

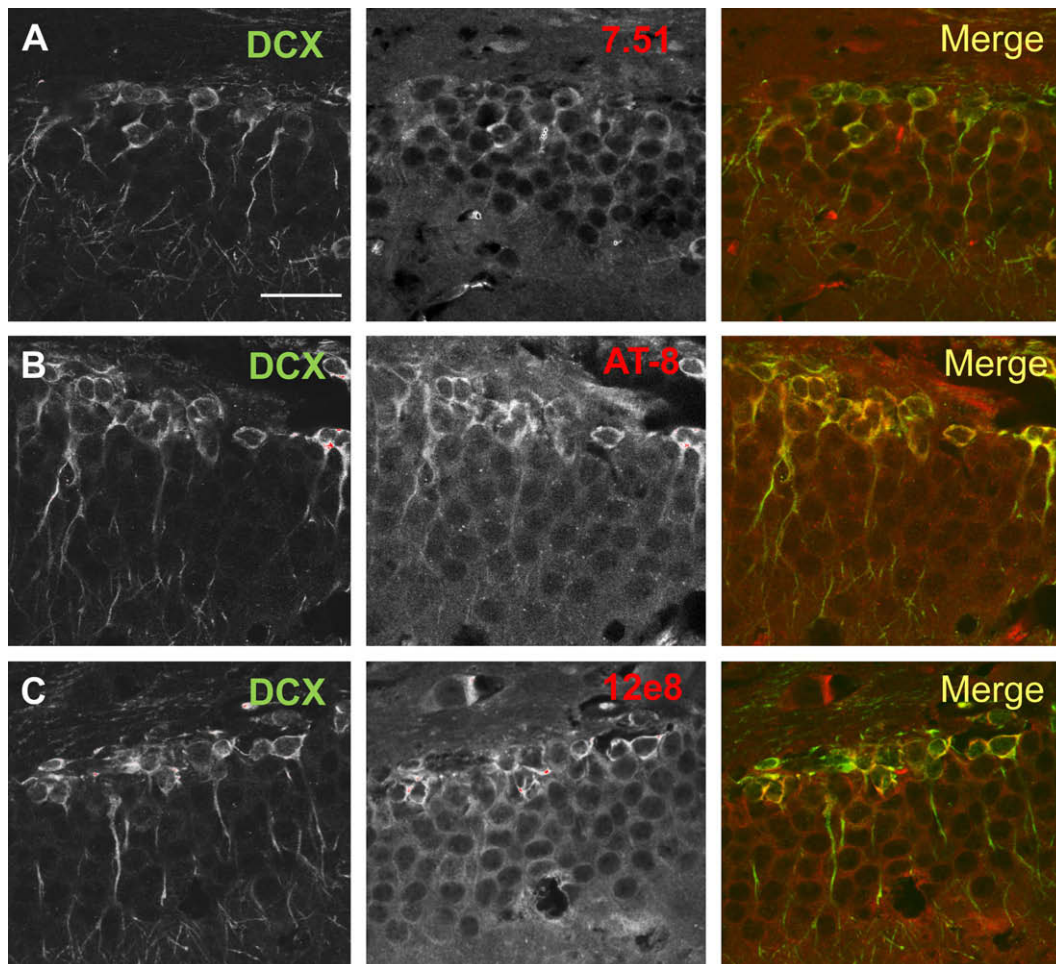
To determine the role of tau protein in neurogenesis, we studied that process in Tau-KO mice. We first demonstrated that PHF-1 antibody gave no signal in hippocampal slices from Tau-KO mice (Fig. 4B). When Tau-KO and wild-type mice were compared, we observed that the number of DCX-positive cells was similar in both

mice (Fig. 4C). However, some DCX cells in wild-type mice could be found in the granular cell layer, whereas in Tau-KO mice the layer of DCX-positive cells was uniformly aligned with the SGZ. Quantification of DCX-positive migrating cells demonstrated that Tau-KO mice show a decrease in migration compared with wild-type animals (Fig. 4D).

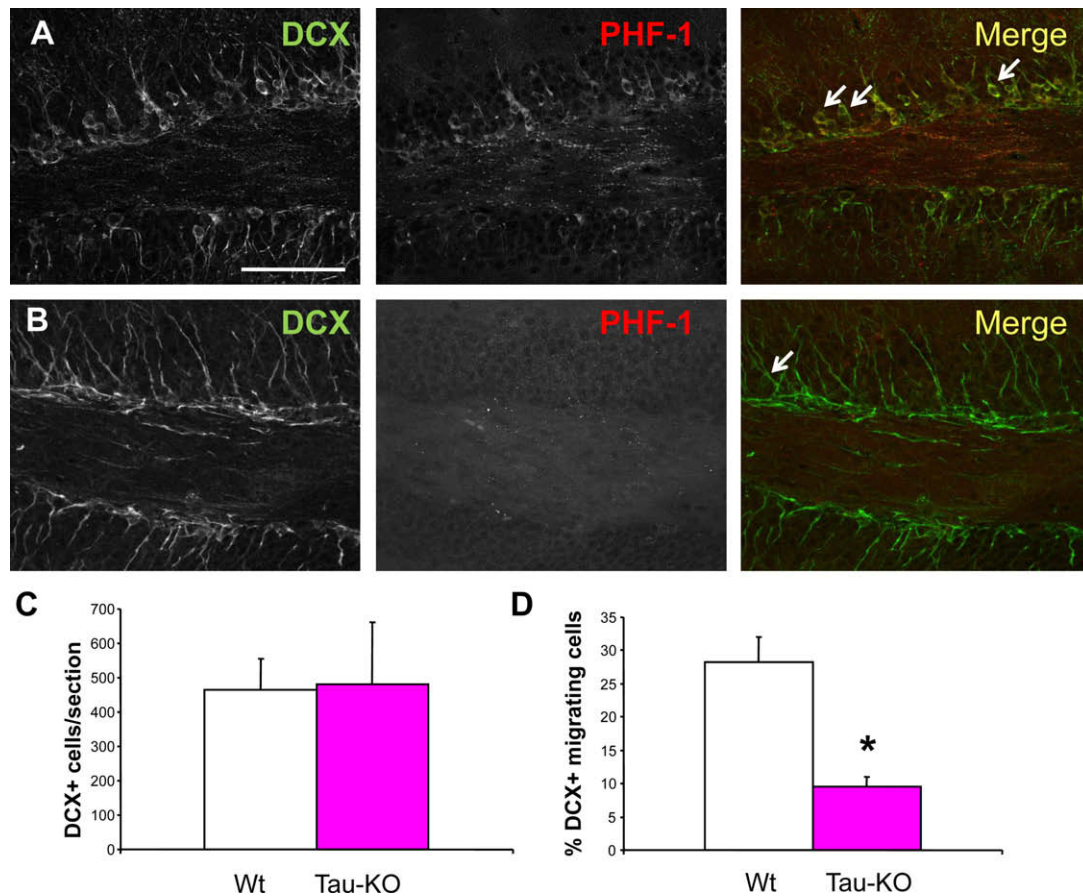
## 4. Discussion

Adult-generated hippocampal neurons originate from precursor cells in the dentate gyrus, and as new granule cell neurons become integrated into the dentate gyrus. That process takes place throughout adult mammalian life. Adult neurogenesis at the dentate gyrus seems to be responsible for encoding new memories [19]. Here, we demonstrate that, at least in part, fetal phosphorylation (serines 396/404, 262 and 202) is related with adult neurogenesis in the SVZ and SGZ, although fetal-tau phosphorylation can be found in adult not only in these areas [14]. Thus, DCX-positive cells from SGZ and SVZ are colabeled with the antibody PHF-1, which recognizes tau phosphorylated in a fetal form. In addition, Tau-KO mice showed a significant decrease in the number of DCX-migrating cells compared with control.

In the hippocampus, the astrocytes from the SGZ (GFAP-positive) divide to generate intermediate precursors which are organized around the astrocytes. We here demonstrate that PHF-1 labeling is not found in GFAP- or Ki-67-positive cells, suggesting



**Fig. 3.** Tau protein is not bound to microtubules and is phosphorylated on serine 202 and 262. (A) Representative colabeling of DCX-positive cells (green) with 7.51 antibody (red) in the SGZ of the dentate gyrus. (B) Hippocampal sections double-labeled with anti-DCX (green) and AT-8 (red) show colocalization of both. (C) The same result was obtained with 12e8 (red). Scale bar = 25  $\mu$ m.



**Fig. 4.** Neurogenesis in Tau-KO mice. (A and B) Hippocampal wild-type sections double-labeled with anti-DCX (green) and PHF-1 (red) show colocalization of both in wild-type mice (A) but no PHF-1 signal could be observed in Tau-Ko mice (B). (C) Quantification of the number of DCX-positive cells in wild-type (open bar) and Tau-KO (filled bar) mice. There is no significant differences between samples. However, when migration of DCX-positive cells was analyzed (D), a decrease in migration was observed in Tau-Ko mice compared to wild-type mice.  $^*P < 0.001$ . Arrows in (A and B) show migrating cells that have been quantified as described in Section 2. Scale bar = 50  $\mu$ m.

that phosphorylated tau in DCX-positive cells is present during neuritic outgrowth in SGZ, a pattern similar to that observed during development [13]. Also, we demonstrate that phosphorylated tau recognized by PHF-1 disappears in differentiated granular neurons (calbindin-positive). Our results also suggest that tau protein facilitates DCX-positive cells migration. This is supported by the observation of a decrease in migration of DCX-positive cells in Tau-KO mice. DCX-positive cells have to migrate from the SGZ to upper layers and send axons into the CA3 region. This process requires a dynamic microtubule network. Keeping this in mind, it is not strange to find phosphorylation of tau, as the phosphorylation decreases the affinity of tau protein for microtubules [18]. Interestingly, phosphorylated tau is accumulated in the somatic compartment, something that is also observed in developing neurons [13]. Altogether these results suggest that phosphorylation of tau during neurogenesis gives DCX-positive cells a less stable and more dynamic microtubule network. The need for a dynamic cytoskeleton is also supported by the observation that DCX-positive cells expresses tau isoform with three repeats, an isoform which shows lower affinity for microtubules compared to mature brain tau isoforms [11]. 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. Although this study has been mainly carried out in hippocampus, the same seems to occur in the SVZ, as we also demonstrate the presence of phosphorylated tau in DCX-positive cells from SVZ.

In conclusion, the observations summarized here favor the suggestion that tau provide a dynamic microtubule network which al-

low a proper migration of new generating neurons in adult neurogenesis. In addition, phosphorylated tau is a marker of neurogenesis in the SGZ and SVZ that colocalizes with DCX.

#### Acknowledgements

The authors thank Dr. J.J. Lucas for helpful discussion and comments. 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] Zhao, C., Teng, E.M., Summers Jr., R.G., Ming, G.L. and Gage, F.H. (2006) Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J. Neurosci.* 26, 3–11.
- [2] Jones, S.P., Rahimi, O., O'Boyle, M.P., Diaz, D.L. and Claiborne, B.J. (2003) Maturation of granule cell dendrites after mossy fiber arrival in hippocampal field CA3. *Hippocampus* 13, 413–427.
- [3] Andreadis, A., Brown, W.M. and Kosik, K.S. (1992) Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry* 31, 10626–10633.
- [4] Goedert, M., Spillantini, M.G., Jakes, R., Rutherford, D. and Crowther, R.A. (1989) Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3, 519–526.
- [5] Lovestone, S. and Reynolds, C.H. (1997) The phosphorylation of tau: A critical stage in neurodevelopment and neurodegenerative processes. *Neuroscience* 78, 309–324.
- [6] Goedert, M., Spillantini, M.G., Hasegawa, M., Jakes, R., Crowther, R.A. and Klug, A. (1996) Molecular dissection of the neurofibrillary lesions of Alzheimer's disease. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 61, 565–573.

- [7] Goedert, M. and Spillantini, M.G. (2001) Tau gene mutations and neurodegeneration. *Biochem. Soc. Symp.*, 59–71.
- [8] Goedert, M., Spillantini, M.G., Potier, M.C., Ulrich, J. and Crowther, R.A. (1989) 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, 393–399.
- [9] Lee, V.M., Goedert, M. and Trojanowski, J.Q. (2001) Neurodegenerative tauopathies. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 1121–1159.
- [10] 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.
- [11] Bullmann, T., de Silva, R., Holzer, M., Mori, H. and Arendt, T. (2007) Expression of embryonic tau protein isoforms persist during adult neurogenesis in the hippocampus. *Hippocampus* 17, 98–102.
- [12] Brion, J.P., Smith, C., Couck, A.M., Gallo, J.M. and Anderton, B.H. (1993) Developmental changes in tau phosphorylation: fetal tau is transiently phosphorylated in a manner similar to paired helical filament-tau characteristic of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 61, 2071–2080.
- [13] Brion, J.P., Octave, J.N. and Couck, A.M. (1994) Distribution of the phosphorylated microtubule-associated protein tau in developing cortical neurons. *Neuroscience* 63, 895–909.
- [14] Yu, Y., Run, X., Liang, Z., Li, Y., Liu, F., Liu, Y., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I. and Gong, C.X. (2009) Developmental regulation of tau phosphorylation, tau kinases, and tau phosphatases. *J. Neurochem.* 108, 1480–1494.
- [15] Grundke, I.I., Iqbal, K., Tung, Y.C., Quinlan, M., Wisniewski, H.M. and Binder, L.I. (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4913–4917.
- [16] Dawson, H.N., Ferreira, A., Eyster, M.V., Ghoshal, N., Binder, L.I. and Vitek, M.P. (2001) Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice. *J. Cell Sci.* 114, 1179–1187.
- [17] Novak, M., Jakes, R., Edwards, P.C., Milstein, C. and Wischik, C.M. (1991) Difference between the tau protein of Alzheimer paired helical filament core and normal tau revealed by epitope analysis of monoclonal antibodies 423 and 751. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 5837–5841.
- [18] 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.
- [19] Aimone, J.B., Wiles, J. and Gage, F.H. (2006) Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. *Nat. Neurosci.* 9, 723–727.



## Is tau a suitable therapeutical target in tauopathies?

Elena Gomez de Barreda, Jesús Avila

Elena Gomez de Barreda, Jesús Avila, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Spanish Network of Excellence on Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

Author contributions: Both authors wrote the paper.

Correspondence to: Jesús Avila, Professor, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Spanish Network of Excellence on Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid,

Spain. javila@cbm.uam.es

Telephone: +34-91-1964564 Fax: +34-91-1964420

Received: May 7, 2010 Revised: May 14, 2010

Accepted: May 21, 2010

Published online: May 26, 2010

### Abstract

Tau is an intracellular protein, found mainly in neurons, but it can also be found in the extracellular space in pathological situations. Here we discuss whether intracellular tau, in aggregated form or modified by phosphorylation, could be toxic inside a neuron. On the other hand, it has been proposed that extracellular tau could be toxic. In this review, we address the question if the elimination of tau would be a possible therapeutic method to avoid tauopathy disorder and we suggest ways to eliminate intracellular and extracellular tau as treatment.

© 2010 Baishideng. All rights reserved.

**Key words:** Tau; Tauopathy; Alzheimer disease; Therapy; Phosphorylation

**Peer reviewer:** Hiroshi Takahashi, MD, PhD, Director, Department of Neurology, National Hospital Organization, Tottori Medical Center, 876 Mitsu, Tottori, 689-0203, Japan

Gomez de Barreda E, Avila J. Is tau a suitable therapeutical target in tauopathies? *World J Biol Chem* 2010; 1(5): 1-000 Available from: URL: <http://www.wjgnet.com/1949-8454/full/v1/i5/1.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.4331/wjbc.v1.i5.1>

### INTRODUCTION

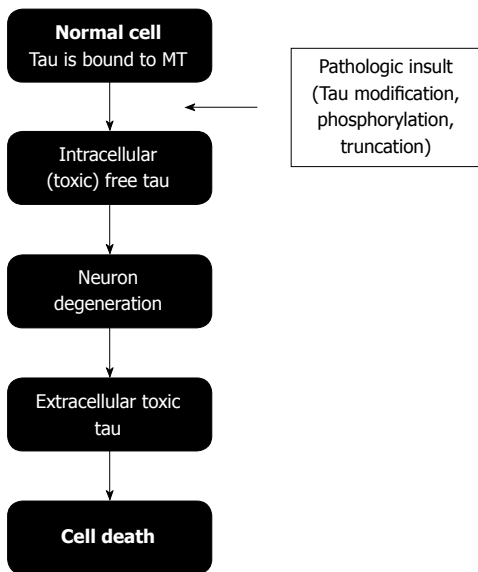
Neuron morphology is determined by its cytoskeleton. Microtubules, one of the cytoskeleton components, are particularly abundant in neurons<sup>[1]</sup>. Neuron microtubules are less dynamic than other cell microtubules due to the presence of some microtubule associated proteins (MAPs)<sup>[2]</sup> that copolymerize with tubulin and that stabilize microtubule polymers<sup>[3]</sup>. One of these MAPs is tau protein, which has a function as a microtubule stabilizer<sup>[4,5]</sup>, a role that can be complemented, in its absence, by the presence of other neuronal MAPs<sup>[2]</sup>. However, in some neurodegenerative disorders known as tauopathies<sup>[6]</sup>, tau can be modified by post translational modifications. This modified tau can be toxic.

### TAU TOXICITY AND TAUOPATHIES

In the tauopathies, tau can be found in an aggregated form. A clear example is the most predominant tauopathy, Alzheimer disease (AD), in which tau protein polymerizes into filaments (paired helical filaments)<sup>[7,8]</sup> that are the components of neurofibrillary tangles, one of the hallmarks of AD<sup>[9]</sup>. In paired helical filaments, tau is present in an abnormally hyperphosphorylated form<sup>[10]</sup>.

#### Tau phosphorylation

Tau phosphorylation can be performed by different protein kinases, with glycogen synthase kinase-3 (GSK3) phosphorylating more phosphorytable sites in the tau molecule<sup>[11]</sup>. It is not clear if GSK3 dependent phosphorylation of tau could be toxic for a neuron. A GSK3 $\beta$  transgenic mouse model showed tau hyperphosphorylation and increased neuronal death in the hippocampus<sup>[12]</sup>. Moreover, in double transgenic mice which overexpressed GSK3 $\beta$  and mutated tau (human tau with three mutations associated with frontotemporal dementia FTDP-17), neurodegeneration appeared to be accelerated<sup>[13]</sup>. Recently, a new transgenic mouse model has been described that overexpresses GSK3 $\beta$  in a tau knockout background<sup>[14]</sup>. These mice show a slower progression of the degenerative process induced by GSK3 $\beta$



**Figure 1** A possible mechanism for tau toxicity in neuronal cells. Upon modification by extracellular signals, tau is no longer bound to microtubules. Free modified tau could be toxic for a neuron and degeneration could take place. It may result in the presence of extracellular tau that could be toxic for neighboring cells promoting their death.

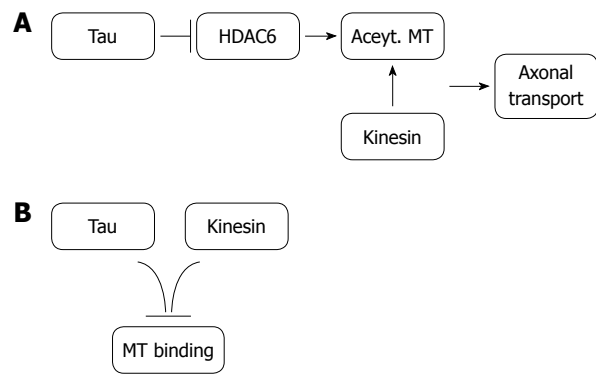
overexpression and attenuated learning deficits. This evidence supports the suggested toxicity of phosphorylated tau. Due to GSK3 induced neurodegeneration, this enzyme has been proposed as a therapeutic target to avoid neurodegeneration in tauopathies<sup>[15,16]</sup>.

Also, it has been suggested that tau aggregation could induce neuron death in tauopathies, like AD, although this point is under discussion<sup>[17]</sup>. In addition, it has been shown that tau overexpression could be toxic for neurons<sup>[18]</sup>. Thus, an increase in tau, or in phosphotau or aggregated tau, might have pathological consequences.

On the other hand, two different tau-deficient mice models, isolated by gene-targeting, were viable and only some slight differences (muscle weakness and behavioral deficits) were observed in the preliminary analysis<sup>[19,20]</sup>. Taking into account all the previous observations, it can be suggested that tau depletion might be a way to prevent the development of tauopathies.

### Intracellular and extracellular tau

Previously, it was indicated that tau protein is associated with microtubules mainly in the cytoplasm. This association could be decreased when tau protein was phosphorylated<sup>[6]</sup>. Intracellular phosphotau could be toxic for a neuron and it could result in neuronal death. After neuronal death, cytoplasmic proteins are in the extracellular space. Some of these proteins could be toxic agents. Recently, it was shown that tau could be one of these toxic extracellular proteins<sup>[21-25]</sup> (Figure 1). Extracellular tau can bind to neuron receptors<sup>[25]</sup>, promoting neuron degeneration and the formation of new extracellular (and toxic) tau. If this process is repeated, it could explain how tau pathology could spread through the brain, promoting the development of tauopathies such as AD.



**Figure 2** Tau could have two opposite effects on axonal transport. A: It could facilitate the presence of acetylated microtubules and, therefore, the binding of kinesin to them. It would facilitate axonal transport; B: However, tau and kinesin may compete for the same binding site in microtubules. It could decrease axonal transport. Probably, an optimal amount of tau is needed for an optimal axonal transport. HDAC6: Histone deacetylase 6.

### Strategy for tau depletion

If the origin of tauopathies is related to an excess of intracellular tau, phosphotau or aggregated tau, it would be of interest to know the main localizations of tau protein in the brain. It has been proposed that tau RNA and tau protein are mainly present in the temporal and frontal lobes<sup>[26,27]</sup>, which are the lobes that are close to the nose in a mammal. A possible way to deplete intracellular tau *in vivo* could be the delivery of interference RNA (against tau) intranasally. Previous reports have described intranasal delivery of molecules to the central nervous system in rodents, primates and humans<sup>[28-31]</sup>. As an AD treatment, it has been proposed that the intranasal administration of insulin might improve memory in AD patients<sup>[32,33]</sup>. Preliminary data with intranasal siRNA (small interfering RNA) tau treatment in mice suggests that it can reach the brain, mainly the temporal and frontal lobes (Gomez de Barreda *et al.*, unpublished data). In the case of extracellular tau, a possible way to deplete it would be the use of a tau vaccine<sup>[34]</sup>.

### CONSEQUENCES OF TAU DEPLETION

All previous observations support the notion that tau depletion could be beneficial to avoid the development of tauopathies. However, it would be important to know the consequences of the lack of tau. Depletion of tau protein would obviously affect the different functions of tau. Some of those functions could be complemented by other proteins, but it is not clear if it would occur with all tau functions.

In fact, tau protein is a sticky protein that not only binds to tubulin but also to actin<sup>[35-37]</sup>, presenilin-1<sup>[38]</sup>,  $\alpha$ -synuclein<sup>[39,40]</sup>, calmodulin<sup>[41]</sup>, phospholipaseC- $\gamma$ <sup>[42-44]</sup>, ferritin<sup>[45]</sup>, hGas7b<sup>[46]</sup> or even itself<sup>[47-49]</sup>. Moreover, in its phosphorylated state, it can also bind other proteins such as the chaperone protein Pin-1<sup>[50-52]</sup>, 14-3-3 protein<sup>[53,54]</sup>, c-Jun N-terminal kinase-interacting protein 1 (JIP1)<sup>[55]</sup>, and many protein phosphatases (i.e. PP1, PP2A, PP2B and PP5)<sup>[56-60]</sup>.

Recently, it has been found that tau protein binds to histone deacetylase 6 (HDAC6), and the consequence of that binding is an inhibition of HDAC6<sup>[61]</sup>. This protein deacetylates tubulin assembled in microtubules, which favors axonal vesicle transport<sup>[62]</sup>. Thus, the presence of tau protein would induce microtubule acetylation and, consequently, axonal transport. On the other hand, since tau competes with microtubule motors (involved in axonal transport) for the same tubulin binding site, an excess of tau protein may impair axonal transport. Thus, it would be an optimal amount of tau, neither too much nor too little, that would favor axonal transport (Figure 2). This optimal amount of tau could be right for other tau functions.

## CONCLUSION

Modification of tau protein by phosphorylation or aggregation could result in a gain of toxic function in different tauopathies. It suggests that tau depletion could be beneficial in avoiding the development of those tauopathies. However, the absence of tau could promote other dysfunctions in a neuron.

## REFERENCES

- 1 Avila J. Microtubule dynamics. *FASEB J* 1990; **4**: 3284-3290
- 2 Matus A. Microtubule-associated proteins: their potential role in determining neuronal morphology. *Annu Rev Neurosci* 1988; **11**: 29-44
- 3 Panda D, Goode BL, Feinstein SC, Wilson L. Kinetic stabilization of microtubule dynamics at steady state by tau and microtubule-binding domains of tau. *Biochemistry* 1995; **34**: 11117-11127
- 4 Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW. Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol* 1977; **116**: 207-225
- 5 Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; **72**: 1858-1862
- 6 Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev* 2004; **84**: 361-384
- 7 Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 1986; **261**: 6084-6089
- 8 Kidd M. Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* 1963; **197**: 192-193
- 9 Alzheimer A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Z Psychiat* 1907; **64**: 146-148
- 10 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
- 11 Hanger DP, Anderton BH, Noble W. Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med* 2009; **15**: 112-119
- 12 Lucas JJ, Hernández F, Gómez-Ramos P, Morán MA, Hen R, Avila J. Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *EMBO J* 2001; **20**: 27-39
- 13 Engel T, Lucas JJ, Gómez-Ramos P, Moran MA, Avila J, Hernández F. Coexpression of FTDP-17 tau and GSK-3beta in transgenic mice induce tau polymerization and neurodegeneration. *Neurobiol Aging* 2006; **27**: 1258-1268
- 14 Gómez de Barreda E, Pérez M, Gómez Ramos P, de Cristobal J, Martín-Maestro P, Morán A, Dawson HN, Vitek MP, Lucas JJ, Hernández F, Avila J. Tau-knockout mice show reduced GSK3-induced hippocampal degeneration and learning deficits. *Neurobiol Dis* 2010; **37**: 622-629
- 15 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
- 16 Pérez M, Hernández F, Lim F, Díaz-Nido J, Avila J. Chronic lithium treatment decreases mutant tau protein aggregation in a transgenic mouse model. *J Alzheimers Dis* 2003; **5**: 301-308
- 17 Hernández F, Avila J. Tauopathies. *Cell Mol Life Sci* 2007; **64**: 2219-2233
- 18 Andorfer C, Acker CM, Kress Y, Hof PR, Duff K, Davies P. Cell-cycle reentry and cell death in transgenic mice expressing nonmutant human tau isoforms. *J Neurosci* 2005; **25**: 5446-5454
- 19 Dawson HN, Ferreira A, Eyster MV, Ghoshal N, Binder LI, Vitek MP. Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice. *J Cell Sci* 2001; **114**: 1179-1187
- 20 Harada A, Oguchi K, Okabe S, Kuno J, Terada S, Ohshima T, Sato-Yoshitake R, Takei Y, Noda T, Hirokawa N. Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature* 1994; **369**: 488-491
- 21 Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D, Frank S, Probst A, Fraser G, Stalder AK, Beibel M, Staufenbiel M, Jucker M, Goedert M, Tolnay M. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol* 2009; **11**: 909-913
- 22 Frost B, Jacks RL, Diamond MI. Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J Biol Chem* 2009; **284**: 12845-12852
- 23 Gómez-Ramos A, Díaz-Hernández M, Cuadros R, Hernández F, Avila J. Extracellular tau is toxic to neuronal cells. *FEBS Lett* 2006; **580**: 4842-4850
- 24 Gómez-Ramos A, Díaz-Hernández M, Rubio A, Díaz-Hernández JI, Miras-Portugal MT, Avila J. Characteristics and consequences of muscarinic receptor activation by tau protein. *Eur Neuropsychopharmacol* 2009; **19**: 708-717
- 25 Gómez-Ramos A, Díaz-Hernández M, Rubio A, Miras-Portugal MT, Avila J. Extracellular tau promotes intracellular calcium increase through M1 and M3 muscarinic receptors in neuronal cells. *Mol Cell Neurosci* 2008; **37**: 673-681
- 26 Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, Bernard A, Boe AF, Boguski MS, Brockway KS, Byrnes EJ, Chen L, Chen L, Chen TM, Chin MC, Chong J, Crook BE, Czaplinska A, Dang CN, Datta S, Dee NR, Desaki AL, Desta T, Diep E, Dolbeare TA, Donelan MJ, Dong HW, Dougherty JG, Duncan BJ, Ebbert AJ, Eichele G, Estin LK, Faber C, Facer BA, Fields R, Fischer SR, Fliess TP, Frensley C, Gates SN, Glattfelder KJ, Halverson KR, Hart MR, Hohmann JG, Howell MP, Jeung DP, Johnson RA, Karr PT, Kawal R, Kidney JM, Knapik RH, Kuan CL, Lake JH, Laramée AR, Larsen KD, Lau C, Lemon TA, Liang AJ, Liu Y, Luong LT, Michaels J, Morgan JJ, Morgan RJ, Mortrud MT, Mosqueda NF, Ng LL, Ng R, Orta GJ, Overly CC, Pak TH, Parry SE, Pathak SD, Pearson OC, Puchalski RB, Riley ZL, Rockett HR, Rowland SA, Royall JJ, Ruiz MJ, Sarno NR, Schaffnit K, Shapovalova NV, Svisay T, Slaughterbeck CR, Smith SC, Smith KA, Smith BI, Sodt AJ, Stewart NN, Stumpf KR, Sunkin SM, Sutram M, Tam A, Teemer CD, Thaller C, Thompson CL, Varnam LR, Visel A, Whitlock RM, Wornoutka PE, Wolkey CK, Wong VY, Wood M, Yaylaoglu MB, Young RC, Youngstrom BL, Yuan XF, Zhang B, Zhang B, Zwillingman TA, Jones AR. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 2007; **445**: 168-176

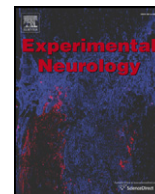
- 27 **Santa-María I**, Hernández F, Smith MA, Perry G, Avila J, Moreno FJ. Neurotoxic dopamine quinone facilitates the assembly of tau into fibrillar polymers. *Mol Cell Biochem* 2005; **278**: 203-212
- 28 **Alcalá-Barraza SR**, Lee MS, Hanson LR, McDonald AA, Frey WH 2nd, McLoon LK. Intranasal delivery of neurotrophic factors BDNF, CNTF, EPO, and NT-4 to the CNS. *J Drug Target* 2010; **18**: 179-190
- 29 **Born J**, Lange T, Kern W, McGregor GP, Bickel U, Fehm HL. Sniffing neuropeptides: a transnasal approach to the human brain. *Nat Neurosci* 2002; **5**: 514-516
- 30 **Hanson LR**, Frey WH 2nd. Intranasal delivery bypasses the blood-brain barrier to target therapeutic agents to the central nervous system and treat neurodegenerative disease. *BMC Neurosci* 2008; **9** Suppl 3: S5
- 31 **Thorne RG**, Frey WH 2nd. Delivery of neurotrophic factors to the central nervous system: pharmacokinetic considerations. *Clin Pharmacokinet* 2001; **40**: 907-946
- 32 **Reger MA**, Watson GS, Frey WH 2nd, Baker LD, Cholerton B, Keeling ML, Belongia DA, Fishel MA, Plymate SR, Schellenberg GD, Cherrier MM, Craft S. Effects of intranasal insulin on cognition in memory-impaired older adults: modulation by APOE genotype. *Neurobiol Aging* 2006; **27**: 451-458
- 33 **Reger MA**, Watson GS, Green PS, Wilkinson CW, Baker LD, Cholerton B, Fishel MA, Plymate SR, Breitner JC, DeGroot W, Mehta P, Craft S. Intranasal insulin improves cognition and modulates beta-amyloid in early AD. *Neurology* 2008; **70**: 440-448
- 34 **Kayed R**, Jackson GR. Prefilament tau species as potential targets for immunotherapy for Alzheimer disease and related disorders. *Curr Opin Immunol* 2009; **21**: 359-363
- 35 **Correas I**, Padilla R, Avila J. The tubulin-binding sequence of brain microtubule-associated proteins, tau and MAP-2, is also involved in actin binding. *Biochem J* 1990; **269**: 61-64
- 36 **Farias GA**, Muñoz JP, Garrido J, Maccioni RB. Tubulin, actin, and tau protein interactions and the study of their macromolecular assemblies. *J Cell Biochem* 2002; **85**: 315-324
- 37 **Griffith LM**, Pollard TD. The interaction of actin filaments with microtubules and microtubule-associated proteins. *J Biol Chem* 1982; **257**: 9143-9151
- 38 **Takashima A**, Murayama M, Murayama O, Kohno T, Honda T, Yasutake K, Nihonmatsu N, Mercken M, Yamaguchi H, Sugihara S, Wolozin B. Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3beta and its substrate tau. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 9637-9641
- 39 **Benussi L**, Ghidoni R, Paterlini A, Nicosia F, Alberici AC, Signorini S, Barbiero L, Binetti G. Interaction between tau and alpha-synuclein proteins is impaired in the presence of P301L tau mutation. *Exp Cell Res* 2005; **308**: 78-84
- 40 **Jensen PH**, Hager H, Nielsen MS, Hojrup P, Gliemann J, Jakes R. alpha-synuclein binds to Tau and stimulates the protein kinase A-catalyzed tau phosphorylation of serine residues 262 and 356. *J Biol Chem* 1999; **274**: 25481-25489
- 41 **Padilla R**, Maccioni RB, Avila J. Calmodulin binds to a tubulin binding site of the microtubule-associated protein tau. *Mol Cell Biochem* 1990; **97**: 35-41
- 42 **Hwang SC**, Jhon DY, Bae YS, Kim JH, Rhee SG. Activation of phospholipase C-gamma by the concerted action of tau proteins and arachidonic acid. *J Biol Chem* 1996; **271**: 18342-18349
- 43 **Jenkins SM**, Johnson GV. Tau complexes with phospholipase C-gamma in situ. *Neuroreport* 1998; **9**: 67-71
- 44 **Reynolds CH**, Garwood CJ, Wray S, Price C, Kellie S, Perera T, Zvelebil M, Yang A, Sheppard PW, Varndell IM, Hanger DP, Anderton BH. Phosphorylation regulates tau interactions with Src homology 3 domains of phosphatidylinositol 3-kinase, phospholipase Cgamma1, Grb2, and Src family kinases. *J Biol Chem* 2008; **283**: 18177-18186
- 45 **Pérez M**, Valpuesta JM, de Garcini EM, Quintana C, Arrasate M, López Carrascosa JL, Rábano A, García de Yébenes J, Avila J. Ferritin is associated with the aberrant tau filaments present in progressive supranuclear palsy. *Am J Pathol* 1998; **152**: 1531-1539
- 46 **Akiyama H**, Gotoh A, Shin RW, Koga T, Ohashi T, Sakamoto W, Harada A, Arai H, Sawa A, Uchida C, Uchida T. A novel role for hGas7b in microtubular maintenance: possible implication in tau-associated pathology in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 2009; **284**: 32695-32699
- 47 **Montejo de Garcini E**, Avila J. In vitro conditions for the self-polymerization of the microtubule-associated protein, tau factor. *J Biochem* 1987; **102**: 1415-1421
- 48 **Montejo de Garcini E**, Carrascosa JL, Correas I, Nieto A, Avila J. Tau factor polymers are similar to paired helical filaments of Alzheimer's disease. *FEBS Lett* 1988; **236**: 150-154
- 49 **Montejo de Garcini E**, Serrano L, Avila J. Self assembly of microtubule associated protein tau into filaments resembling those found in Alzheimer disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; **141**: 790-796
- 50 **Lim J**, Balastik M, Lee TH, Nakamura K, Liou YC, Sun A, Finn G, Pastorino L, Lee VM, Lu KP. Pin1 has opposite effects on wild-type and P301L tau stability and tauopathy. *J Clin Invest* 2008; **118**: 1877-1889
- 51 **Lu PJ**, Wulf G, Zhou XZ, Davies P, Lu KP. The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature* 1999; **399**: 784-788
- 52 **Zhou XZ**, Kops O, Werner A, Lu PJ, Shen M, Stoller G, Küllertz G, Stark M, Fischer G, Lu KP. Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins. *Mol Cell* 2000; **6**: 873-883
- 53 **Hashiguchi M**, Sobue K, Paudel HK. 14-3-3zeta is an effector of tau protein phosphorylation. *J Biol Chem* 2000; **275**: 25247-25254
- 54 **Truong AB**, Masters SC, Yang H, Fu H. Role of the 14-3-3 C-terminal loop in ligand interaction. *Proteins* 2002; **49**: 321-325
- 55 **Ittner LM**, Ke YD, Götz J. Phosphorylated Tau interacts with c-Jun N-terminal kinase-interacting protein 1 (JIP1) in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 2009; **284**: 20909-20916
- 56 **Gong CX**, Grundke-Iqbal I, Damuni Z, Iqbal K. Dephosphorylation of microtubule-associated protein tau by protein phosphatase-1 and -2C and its implication in Alzheimer disease. *FEBS Lett* 1994; **341**: 94-98
- 57 **Gong CX**, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Dephosphorylation of Alzheimer's disease abnormally phosphorylated tau by protein phosphatase-2A. *Neuroscience* 1994; **61**: 765-772
- 58 **Gong CX**, Lidsky T, Wegiel J, Zuck L, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau is regulated by protein phosphatase 2A in mammalian brain. Implications for neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 2000; **275**: 5535-5544
- 59 **Gong CX**, Singh TJ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Alzheimer's disease abnormally phosphorylated tau is dephosphorylated by protein phosphatase-2B (calcineurin). *J Neurochem* 1994; **62**: 803-806
- 60 **Liu F**, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX. Contributions of protein phosphatases PPI, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur J Neurosci* 2005; **22**: 1942-1950
- 61 **Perez M**, Santa-Maria I, Gomez de Barreda E, Zhu X, Cuadros R, Cabrero JR, Sanchez-Madrid F, Dawson HN, Vitek MP, Perry G, Smith MA, Avila J. Tau—an inhibitor of deacetylase HDAC6 function. *J Neurochem* 2009; **109**: 1756-1766
- 62 **Kazantsev AG**, Thompson LM. Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. *Nat Rev Drug Discov* 2008; **7**: 854-868

S- Editor Cheng JX L- Editor Lutze M E- Editor Zheng XM



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Neurology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yexnr](http://www.elsevier.com/locate/yexnr)

## Review

## GSK3: A possible link between beta amyloid peptide and tau protein

Félix Hernández<sup>a</sup>, Elena Gómez de Barreda<sup>a</sup>, Almudena Fuster-Matanzo<sup>a</sup>, José J. Lucas<sup>a,b</sup>, Jesús Avila<sup>a,b,\*</sup><sup>a</sup> Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), C/Nicolás Cabrera, 1 Campus Cantoblanco, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain<sup>b</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red sobre enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 17 March 2009

Revised 4 September 2009

Accepted 17 September 2009

Available online 24 September 2009

## Keywords:

Alzheimer disease

Beta-amyloid peptide

ApoE4

GSK3

Presenilin

Tau

## ABSTRACT

Tau is a neuronal microtubule-associated phosphoprotein that is highly phosphorylated by glycogen synthase kinase 3 (GSK3). Tau phosphorylation by GSK3 regulates tau binding to microtubules, tau degradation and tau aggregation. Tau phosphorylation is important in Alzheimer disease pathology and in other tauopathies. In Alzheimer disease, it has been proposed that the peptide beta amyloid promotes GSK3 activation, resulting in tau phosphorylation. In this work, we review the links between beta amyloid peptide, tau protein and GSK3 that occur in familial Alzheimer disease. We also discuss the possible links between GSK3 and sporadic Alzheimer disease. Finally, we include a brief review of the pathology of animal models overexpressing GSK3.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

## Contents

Introduction . . . . .	322
Tau phosphorylation and GSK3 . . . . .	323
Consequences of tau phosphorylation by GSK3 . . . . .	323
Phosphorylated tau and degradation . . . . .	323
How beta amyloid peptide activates GSK3 . . . . .	323
Activation of GSK3 in sporadic Alzheimer disease . . . . .	323
Tau toxicity; phosphorylation and aggregation . . . . .	324
Acknowledgments . . . . .	324
References . . . . .	324

## Introduction

Alzheimer disease (AD) is characterized by the presence of two aberrant structures in patients' brains: senile plaques and neurofibrillary tangles (Alzheimer, 1911). Senile plaques are composed of beta amyloid peptide, a fragment of the amyloid peptide precursor protein (APP) (Glenner and Wong, 1984; Masters et al., 1985), whereas the main component of neurofibrillary tangles is the cytoskeleton protein known as the tau protein, in hyperphosphorylated form (Grundke-Iqbal et al., 1986a,b). Onset of familial Alzheimer disease (FAD) may be attributed to accumulation of amyloid peptide

due to one of two factors: (1) mutations in APP that facilitate its cleavage to generate amyloid peptide or (2) mutations in presenilin-1 (PS-1) or presenilin (PS-2) that promote amyloid peptide formation (Price and Sisodia, 1998). Beta amyloid peptide aggregates to form oligomers and other high-order polymerized structures that may be toxic to neurons. The presence of tau protein (probably, in phosphorylated form) also appears to be involved in this toxic process (Rapoport et al., 2002; Roberson et al., 2007). Thus, it has been suggested that amyloid peptide may favor tau phosphorylation by activation of GSK3 (Alvarez et al., 1999; Busciglio et al., 1995).

Amyloid peptide targets the insulin (Townsend et al., 2007) or wnt (Magdesian et al., 2008) signaling pathways resulting in the increased activation state of GSK3 $\beta$  (also known as tau kinase I) (Ishiguro et al., 1993) and subsequent phosphorylation of tau protein (Alvarez et al., 1999). Thus, it can be hypothesized that the link between beta amyloid peptide and tau protein may be protein kinase GSK3. In light

\* Corresponding author. Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", C/Nicolás Cabrera, 1 Universidad Autónoma de Madrid, Campus Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain. Fax: +34 91 196 4420.

E-mail address: [javila@cbm.uam.es](mailto:javila@cbm.uam.es) (J. Avila).

of this hypothesis, several GSK3 inhibitors are currently being studied as a treatment strategy for AD. These inhibitors range from cations like lithium to small compounds developed by different pharmaceutical companies (see Hernández et al., 2009; Martínez and Perez, 2008). In this minireview, we will discuss phosphorylation of tau protein by GSK3 and the consequences of that phosphorylation with regard to Alzheimer disease.

#### *Tau phosphorylation and GSK3*

Tau is a neuronal microtubule-associated protein that facilitates tau assembly in vitro and is involved in microtubule stabilization (Weingarten et al., 1975), playing an important role in microtubule dynamics (Drubin and Kirschner, 1986) and also in axonal transport (Ebner et al., 1998). Tau functions can be regulated by its phosphorylation by different kinases. There are 85 phosphorylatable amino acid residues in tau, including 45 serines, 35 threonines and 5 tyrosines (Hanger et al., 2009; Morishima-Kawashima et al., 1995). Some of these residues are modified during early (fetal) stages of development (Morishima-Kawashima et al., 1995), but the overall tau phosphorylation decreases in the mature brain (Hanger et al., 2009). However, tau is abnormally hyperphosphorylated in the brain of patients with AD (Avila et al., 2004).

Tau obtained from the brain of Alzheimer patients has 40 phosphorylation sites, 28 serines, 10 threonines and 2 tyrosines, the majority of which can be modified by GSK3. This kinase can phosphorylate 17 of the serine and 6 of the threonine residues (Hanger et al., 2009).

GSK3 is a constitutively active protein kinase that is present in two highly homologous forms in mammals, GSK3 $\alpha$  and GSK3 $\beta$  (Jope and Johnson, 2004; Woodgett, 1990). Because GSK3 is constitutively active, its regulation is primarily based on inhibition of its activity (Jope and Johnson, 2004) through different signaling mechanisms such as the insulin or wnt pathways. GSK3 is inactivated by phosphorylation of Ser21 in GSK3 $\alpha$  or Ser9 in GSK3 $\beta$  (Jope and Johnson, 2004). GSK3 typically phosphorylates “primed” substrates (substrates pre-phosphorylated by a priming kinase), including tau; however, phosphorylation of GSK at Ser21 or Ser9 inhibits its primed substrate phosphorylation activity. GSK3 can occasionally act as its own priming kinase, modifying closed sites in the molecule in a hierarchical manner (the recognition motif of the kinase is S-X-X-X-S (P)) (Jope and Johnson, 2004).

#### *Consequences of tau phosphorylation by GSK3*

Phosphorylation of tau by GSK3 takes place in the regions surrounding the microtubule binding domain, and the kinase can also modify four residues inside this domain (Hanger et al., 2009). Phosphorylation of tau at these sites, primarily in the microtubule binding domain, can be crucial for preventing the interaction of tau protein with microtubules and therefore it may affect microtubule stabilization and dynamics. Thus, a possible consequence of tau phosphorylation by GSK3 may be a decrease in the interaction between tau and microtubules. Because tau–tau interaction occurs through the tubulin binding domain (Perez et al., 1996), tau detachment from microtubules may favor self-aggregation. Studies using GSK3-overexpressing transgenic mice suggest that inhibition of the kinase may prevent the formation of tau aggregates (Noble et al., 2005; Perez et al., 2003a, b). Overexpression of GSK3 in a transgenic *Drosophila* model revealed that tau phosphorylation correlates with tau aggregation (Jackson et al., 2002). The use of cell culture models or in vitro assays has yielded similar results (Perez et al., 2002). In addition, tau microtubule binding domain is involved in tau–tau interaction (Perez et al., 2007; Santa-Maria et al., 2004; von Bergen et al., 2000) and partial deletion of this region results in a conformational change that facilitates tau phosphorylation by GSK3 (Perez et al.,

2007). This conformational change is also present in aggregated forms of tau (Jicha et al., 1999).

#### *Phosphorylated tau and degradation*

Degradation of tau occurs via pathways that involve the proteasome complex (Petrucci et al., 2004) or through proteases such as caspase (Ding et al., 2006; Petrucci et al., 2004) and the lysosomal enzyme calpain (Johnson et al., 1989). Phosphorylated tau is more resistant to proteolysis by calpain degradation than unmodified tau (Wang et al., 1995). Tau can be ubiquitinated for proteasome degradation (Morishima-Kawashima et al., 1993) but ubiquitin-independent degradation has also been reported (Baki et al., 2004; Cardozo and Michaud, 2002). In ubiquitin-independent degradation, tau is modified at a site phosphorylated by GSK3, resulting in binding of the co-chaperone BAG2/Hsp70 complex and subsequent delivery to the proteasome for ubiquitin-independent degradation (Carrettero et al., 2009). This mechanism is probably the most efficient pathway for tau degradation.

#### *How beta amyloid peptide activates GSK3*

Beta amyloid peptide can form oligomers that bind to certain cell receptors. The peptide behaves like an antagonist of insulin, preventing the activation of PI3 kinase, and subsequently that of Akt (which phosphorylates GSK3 $\alpha$  (Ser21) or GSK3 $\beta$  (Ser9)). Thus, GSK3 increases its activity in the absence of activated Akt (Townsend et al., 2007). Also, amyloid peptide appears to interfere with the canonical wnt pathway, a pathway that results in the inactivation of GSK3. When the wnt pathway is impaired due to the presence of amyloid peptide, GSK3 is no longer inactivated (Magdesian et al., 2008).

More recently, it has been shown that prion protein acts as a beta amyloid oligomer receptor (Lauren et al., 2009). Although a prion protein peptide can activate GSK3 (Perez et al., 2003a,b), researchers have not established, at the present, whether an interaction between beta amyloid and prion protein results in activation of GSK3.

In addition, beta amyloid peptide activates GSK3 resulting in phosphorylation of tau protein. Thus, GSK3 may be the link between amyloid peptide and tau protein. Recently, it was reported that the insulin/Akt signaling pathway is also targeted by intracellular beta amyloid peptide (Lee et al., 2009). On the other hand, presenilin 1 may also regulate GSK3 in a beta amyloid-independent manner (Baki et al., 2004; Takashima et al., 1998).

#### *Activation of GSK3 in sporadic Alzheimer disease*

The elderly population is at a greater risk for developing AD and insulin-dependent glucose metabolism has an important role in the regulation of longevity (Gems and Partridge, 2001; Guarente and Kenyon, 2000). Partial impairment of this pathway may result in a longer life for an organism. However, defects in the insulin-dependent pathway may increase the activation of GSK3, although the result of that activation could be counteracted by changes in phosphatase activity that may also result from these defects in the insulin-dependent pathway (Planel et al., 2004).

The apolipoprotein E (ApoE) genotype has been implicated in sporadic Alzheimer disease (SAD), individuals with the ApoE4 genotype have an increased risk for developing SAD (Strittmatter et al., 1993). A link between ApoE and GSK3 has been indicated (Cselenyi et al., 2008; Small and Duff, 2008; Tamai et al., 2000; Townsend et al., 2007). Also, it has been reported that ApoE4 has a higher effect in activating GSK3 than other ApoE isoforms (Cedazo-Minguez et al., 2003). Also, the wnt signaling pathway regulates GSK3 activity; and it is suggested that ApoE inhibits this pathway through its interaction with LRP6, a co-receptor of frizzled (wnt receptor) (Caruso et al., 2006). Finally, a GSK3 polymorphism has been linked to SAD. Indeed,

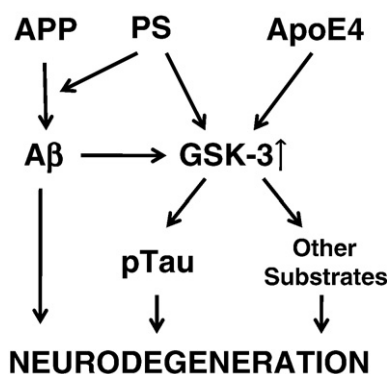
an association between GSK3 $\beta$  and AD has been reported (Schaffer et al., 2008).

#### Tau toxicity; phosphorylation and aggregation

Using different pseudo-phosphorylated tau variants, it has been found that phospho-tau is toxic to cultured cells (Brandt et al., 2005). In vitro experiments have suggested a possible mechanism for that toxicity. That mechanism indicates that phospho-tau sequesters other microtubule-associated proteins, promoting a dramatic change in microtubule stabilization and dynamics that may be toxic for the cell (Alonso et al., 1997). In other models, like *Drosophila melanogaster*, phospho-tau toxicity has been confirmed (Jackson et al., 2002). In mice overexpressing GSK3, phospho-tau appears to be toxic in the absence of tau aggregation (Lucas et al., 2001), which correlates well with observations in another mouse model for tauopathy (Lim et al., 2001) suggesting that phospho-tau, but not aggregated tau, is the primary factor for cellular toxicity. In fact, neurons containing aggregated tau show a prolonged longevity (Morsch et al., 1999) suggesting a neuroprotective role for neurofibrillary tangles (Lee et al., 2005).

There are various mouse models in which GSK3 is overexpressed in the absence or presence of tau, or in the presence of overexpressed human tau bearing fronto temporal dementia (FTDP-17) mutations that favor phosphorylation by GSK3 (Lim et al., 2001). In the first of these models, overexpression of GSK3 (Engel et al., 2006a,b; Lucas et al., 2001) results in a decrease in the size of dentate gyrus (DG) (Engel et al., 2006a,b), which may be due, in part (Linseman et al., 2004, Lucas et al., 2001), to the toxicity of phospho-tau, because in the absence of tau, a lower degeneration was found (Gómez de Barreda, unpublished data). On the other hand, DG degeneration increases in the presence of increasing amounts of overexpressed-tau bearing FTDP-17 mutations (Engel et al., 2006a,b). In this model, where simultaneous overexpression of GSK3 and tau protein take place, tau aggregates are found (Engel et al., 2006a,b), but the presence of these aggregates does not correlate with behavioral impairments and DG degeneration found in the mouse (Engel et al., 2006a,b), whereas the presence of phospho-tau does (Engel et al., 2006a,b). All the previous data indicate that phosphotau could be toxic, for DG neurons.

In summary, Fig. 1 shows some evidence indicating that, in both FAD and SAD, upregulation of GSK3 potentially modifies substrates such as tau protein that may contribute to the pathology of neurodegeneration (Fig. 1).



**Fig. 1.** Relationships among the major pathways involved in Alzheimer disease. Mutations in amyloid precursor protein (APP) and presenilins (PS) may result in the presence of an increased amount of amyloid peptide (A $\beta$ ) or in the lack of interaction between PS and cadherin. The consequence, in each case, is an increase in GSK3 activity. On the other hand, the presence of different ApoE isoforms may differentially regulate GSK3 activity. Activated GSK3 subsequently modifies tau protein (PTau) and other substrates. All of these changes may be toxic for a neuron and facilitate cell death.

#### Acknowledgments

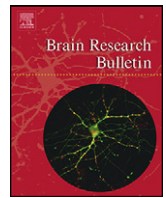
This work was supported by grants from the Comunidad de Madrid (NEURODEGMODELS-CM), the Spanish Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología and the CIBER on Neurodegeneration and by institutional grants from the Fundación Ramón Areces.

#### References

- Alonso, A.D., Grundke-Iqbal, I., Barra, H.S., Iqbal, K., 1997. Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 298–303.
- Alvarez, G., Munoz-Montano, J.R., Satrustegui, J., Avila, J., Bogonez, E., Diaz-Nido, J., 1999. Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. *FEBS Lett.* 453, 260–264.
- Alzheimer, A., 1911. Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. *Zbl. ges. Neurof. Psych.* 4, 356–385.
- Avila, J., Lucas, J.J., Perez, M., Hernandez, F., 2004. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol. Rev.* 84, 361–384.
- Baki, L., Shioi, J., Wen, P., Shao, Z., Schwarzman, A., Gama-Sosa, M., Neve, R., Robakis, N.K., 2004. PS1 activates PI3K thus inhibiting GSK-3 activity and tau overphosphorylation: effects of FAD mutations. *EMBO J.* 23, 2586–2596.
- Brandt, R., Hundelt, M., Shahani, N., 2005. Tau alteration and neuronal degeneration in tauopathies: mechanisms and models. *Biochim. Biophys. Acta* 1739, 331–354.
- Busciglio, J., Lorenzo, A., Yeh, J., Yankner, B.A., 1995. beta-amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron* 14, 879–888.
- Cardozo, C., Michaud, C., 2002. Proteasome-mediated degradation of tau proteins occurs independently of the chymotrypsin-like activity by a nonprocessive pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* 408, 103–110.
- Carrettero, D.C., Hernandez, I., Neveu, P., Papagiannakopoulos, T., Kosik, K.S., 2009. The cochaperone BAG2 sweeps paired helical filament-insoluble tau from the microtubule. *J. Neurosci.* 29, 2151–2161.
- Caruso, A., Motolese, M., Iacovelli, L., Caraci, F., Copani, A., Nicoletti, F., Terstappen, G.C., Gaviarighi, G., Caricasole, A., 2006. Inhibition of the canonical Wnt signaling pathway by apolipoprotein E4 in PC12 cells. *J. Neurochem.* 98, 364–371.
- Cedazo-Minguez, A., Popescu, B.O., Blanco-Millan, J.M., Akterin, S., Pei, J.J., Winblad, B., Cowburn, R.F., 2003. Apolipoprotein E and beta-amyloid (1–42) regulation of glycogen synthase kinase-3beta. *J. Neurochem.* 87, 1152–1164.
- Cselenyi, C.S., Jernigan, K.K., Tahinci, E., Thorne, C.A., Lee, L.A., Lee, E., 2008. LRP6 transduces a canonical Wnt signal independently of Axin degradation by inhibiting GSK3's phosphorylation of beta-catenin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 8032–8037.
- Ding, H., Matthews, T.A., Johnson, G.V., 2006. Site-specific phosphorylation and caspase cleavage differentially impact tau-microtubule interactions and tau aggregation. *J. Biol. Chem.* 281, 19107–19114.
- Drubin, D.G., Kirschner, M.W., 1986. Tau protein function in living cells. *J. Cell Biol.* 103, 2739–2746.
- Ebneth, A., Godemann, R., Stamer, K., Illenberger, S., Trinczek, B., Mandelkow, E., 1998. Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease. *J. Cell Biol.* 143, 777–794.
- Engel, T., Hernandez, F., Avila, J., Lucas, J.J., 2006. 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., Hernandez, F., 2006. Coexpression of FTDP-17 tau and GSK-3beta in transgenic mice induce tau polymerization and neurodegeneration. *Neurobiol. Aging* 27, 1258–1268.
- Gems, D., Partridge, L., 2001. Insulin/IGF signalling and ageing: seeing the bigger picture. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11, 287–292.
- Glenner, G.G., Wong, C.W., 1984. Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122, 1131–1135.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y.C., Zaidi, M.S., Wisniewski, H.M., 1986. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J. Biol. Chem.* 261, 6084–6089.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y.C., Quinlan, M., Wisniewski, H.M., Binder, L.I., 1986. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 4913–4917.
- Guarente, L., Kenyon, C., 2000. Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature* 408, 255–262.
- Hanger, D.P., Anderton, B.H., Noble, W., 2009. Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol. Med.* 15, 112–119.
- Hernandez, F., Nido, J.D., Avila, J., Villanueva, N., 2009. GSK3 Inhibitors and Disease. *Mini Rev. Med. Chem.* 9, 1024–1029.
- Ishiguro, K., Shiratsuchi, A., Sato, S., Omori, A., Arioka, M., Kobayashi, S., Uchida, T., Imahori, K., 1993. Glycogen synthase kinase 3 beta is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments. *FEBS Lett.* 325, 167–172.
- Jackson, G.R., Wiedau-Pazos, M., Sang, T.K., Wagle, N., Brown, C.A., Massachi, S., Geschwind, D.H., 2002. Human wild-type tau interacts with wingless pathway components and produces neurofibrillary pathology in *Drosophila*. *Neuron* 34, 509–519.

- Jicha, G.A., Berenfeld, B., Davies, P., 1999. Sequence requirements for formation of conformational variants of tau similar to those found in Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* 55, 713–723.
- Johnson, G.V., Jope, R.S., Binder, L.L., 1989. Proteolysis of tau by calpain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163, 1505–1511.
- Jope, R.S., Johnson, G.V., 2004. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem. Sci.* 29, 95–102.
- Lauren, J., Gimbel, D.A., Nygaard, H.B., Gilbert, J.W., Strittmatter, S.M., 2009. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* 457, 1128–1132.
- Lee, H.G., Perry, G., Moreira, P.I., Garrett, M.R., Liu, Q., Zhu, X., Takeda, A., Nunomura, A., Smith, M.A., 2005. Tau phosphorylation in Alzheimer's disease: pathogen or protector? *Trends Mol. Med.* 11, 164–169.
- Lee, H.K., Kumar, P., Fu, Q., Rosen, K.M., Querfurth, H.W., 2009. The insulin/Akt signaling pathway is targeted by intracellular beta-amyloid. *Mol. Biol. Cell* 20, 1533–1544.
- Lim, F., Hernandez, F., Lucas, J.J., Gomez-Ramos, P., Moran, M.A., Avila, J., 2001. FTDP-17 mutations in tau transgenic mice provoke lysosomal abnormalities and Tau filaments in forebrain. *Mol. Cell Neurosci.* 18, 702–714.
- Linseman, D.A., Butts, B.D., Precht, T.A., Phelps, R.A., Le, S.S., Laessig, T.A., Bouchard, R.J., Florez-McClure, M.L., Heidenreich, K.A., 2004. Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylates Bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis. *J. Neurosci.* 24, 9993–10002.
- Lucas, J.J., Hernandez, F., Gomez-Ramos, P., Moran, M.A., Hen, R., Avila, J., 2001. Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *EMBO J.* 20, 27–39.
- Magdesian, M.H., Carvalho, M.M., Mendes, F.A., Saraiva, L.M., Juliano, M.A., Juliano, L., Garcia-Abreu, J., Ferreira, S.T., 2008. Amyloid-beta binds to the extracellular cysteine-rich domain of Frizzled and inhibits Wnt/beta-catenin signaling. *J. Biol. Chem.* 283, 9359–9368.
- Martinez, A., Perez, D.I., 2008. GSK-3 inhibitors: a ray of hope for the treatment of Alzheimer's disease? *J. Alzheimers Dis.* 15, 181–191.
- Masters, C.L., Simms, G., Weinman, N.A., Multhaup, G., McDonald, B.L., Beyreuther, K., 1985. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 4245–4249.
- Morishima-Kawashima, M., Hasegawa, M., Takio, K., Suzuki, M., Titani, K., Ihara, Y., 1993. Ubiquitin is conjugated with amino-terminally processed tau in paired helical filaments. *Neuron* 10, 1151–1160.
- Morishima-Kawashima, M., Hasegawa, M., Takio, K., Suzuki, M., Yoshida, H., Titani, K., Ihara, Y., 1995. Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau. *J. Biol. Chem.* 270, 823–829.
- Morsch, R., Simon, W., Coleman, P.D., 1999. Neurons may live for decades with neurofibrillary tangles. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58, 188–197.
- 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., 2005. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 6990–6995.
- Perez, M., Hernandez, F., Gomez-Ramos, A., Smith, M., Perry, G., Avila, J., 2002. Formation of aberrant phosphotau fibrillar polymers in neural cultured cells. *Eur. J. Biochem.* 269, 1484–1489.
- Perez, M., Hernandez, F., Lim, F., Diaz-Nido, J., Avila, J., 2003. Chronic lithium treatment decreases mutant tau protein aggregation in a transgenic mouse model. *J. Alzheimers Dis.* 5, 301–308.
- Perez, M., Rojo, A.I., 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.
- Perez, M., Santa-Maria, I., Tortosa, E., Cuadros, R., Del Valle, M., Hernandez, F., Moreno, F.J., Avila, J., 2007. The role of the VQIVYK peptide in tau protein phosphorylation. *J. Neurochem.* 103, 1447–1460.
- Perez, M., Valpuesta, J.M., Medina, M., Montejo de Garcini, E., Avila, J., 1996. Polymerization of tau into filaments in the presence of heparin: the minimal sequence required for tau-tau interaction. *J. Neurochem.* 67, 1183–1190.
- Petruccioli, L., Dickson, D., Kehoe, K., Taylor, J., Snyder, H., Grover, A., De Lucia, M., McGowan, E., Lewis, J., Prihar, G., Kim, J., Dillmann, W.H., Browne, S.E., Hall, A., Voellmy, R., Tsuboi, Y., Dawson, T.M., Wolozin, B., Hardy, J., Hutton, M., 2004. CHIP and Hsp70 regulate tau ubiquitination, degradation and aggregation. *Hum. Mol. Genet.* 13, 703–714.
- Planel, E., Miyasaka, T., Launey, T., Chui, D.H., Tanemura, K., Sato, S., Murayama, O., Ishiguro, K., Tatebayashi, Y., Takashima, A., 2004. 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, 2401–2411.
- Price, D.L., Sisodia, S.S., 1998. Mutant genes in familial Alzheimer's disease and transgenic models. *Annu. Rev. Neurosci.* 21, 479–505.
- Rapoport, M., Dawson, H.N., Binder, L.I., Vitek, M.P., Ferreira, A., 2002. Tau is essential to beta-amyloid-induced neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 6364–6369.
- Roberson, E.D., Scearce-Levie, K., Palop, J.J., Yan, F., Cheng, I.H., Wu, T., Gerstein, H., Yu, G.Q., Mucke, L., 2007. Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* 316, 750–754.
- Santa-Maria, I., Hernandez, F., Martin, C.P., Avila, J., Moreno, F.J., 2004. Quinones facilitate the self-assembly of the phosphorylated tubulin binding region of tau into fibrillar polymers. *Biochemistry* 43, 2888–2897.
- Schaffer, B.A., Bertram, L., Miller, B.L., Mullin, K., Weintraub, S., Johnson, N., Bigio, E.H., Mesulam, M., Wiedau-Pazos, M., Jackson, G.R., Cummings, J.L., Cantor, R.M., Levey, A.I., Tanzi, R.E., Geschwind, D.H., 2008. Association of GSK3B with Alzheimer disease and frontotemporal dementia. *Arch. Neurol.* 65, 1368–1374.
- Small, S.A., Duff, K., 2008. Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis. *Neuron* 60, 534–542.
- Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S., Roses, A.D., 1993. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 1977–1981.
- Takashima, A., Murayama, M., Murayama, O., Kohno, T., Honda, T., Yasutake, K., Nihonmatsu, N., Mercken, M., Yamaguchi, H., Sugihara, S., Wolozin, B., 1998. Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3beta and its substrate tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 9637–9641.
- Tamai, K., Semenov, M., Kato, Y., Spokony, R., Liu, C., Katsuyama, Y., Hess, F., Saint-Jeannet, J.P., He, X., 2000. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 407, 530–535.
- Townsend, M., Mehta, T., Selkoe, D.J., 2007. Soluble Abeta inhibits specific signal transduction cascades common to the insulin receptor pathway. *J. Biol. Chem.* 282, 33305–33312.
- von Bergen, M., Friedhoff, P., Biernat, J., Heberle, J., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E., 2000. Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 5129–5134.
- Wang, J.Z., Gong, C.X., Zaidi, T., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 1995. Dephosphorylation of Alzheimer paired helical filaments by protein phosphatase-2A and-2B. *J. Biol. Chem.* 270, 4854–4860.
- Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo, S.Y., Kirschner, M.W., 1975. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 1858–1862.
- Woodgett, J.R., 1990. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/ factor A. *EMBO J.* 9, 2431–2438.





## Review

## The role of GSK3 in Alzheimer disease

Félix Hernández, Elena Gómez de Barreda, Almudena Fuster-Matanzo, Paloma Goñi-Oliver, José J. Lucas, Jesús Avila\*

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), C/Nicolás Cabrera, 1, Universidad Autónoma de Madrid, Campus Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 10 March 2009

Received in revised form 14 May 2009

Accepted 18 May 2009

Available online 27 May 2009

## Keywords:

GSK3

Alzheimer disease

Tau protein

Dentate gyrus

## ABSTRACT

Mutations in *app*, *ps-1* and *ps-2* genes result in the appearance of Familial Alzheimer disease (FAD). Although, in many cases, those mutations result in an increase of the amount of beta amyloid peptide, there is not a clear correlation between that amount and the time of the onset of the disease. Thus, other factors may explain how mutations in those genes result in the appearance of neurodegeneration. In this minireview we propose that GSK3 could be one of those factors.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

## Contents

1. Introduction .....	248
2. FAD mutations may increase GSK3 activity .....	248
3. An animal model to study the consequences of GSK3 overexpression.....	249
4. Propagation of the disease.....	249
5. GSK3 and amyloid pathology .....	249
References .....	250

## 1. Introduction

The final picture of Alzheimer disease (AD) is observed in the brain of a death patient [3]. In that brain presence of two aberrant structures, the senile plaques (whose main component is the beta amyloid peptide), and the neurofibrillary tangles (composed of paired helical filaments that are polymers of phosphorylated tau protein) are found [18]. The end of the disease is well known, but not the origin. Only, the origin of the disease is known in the cases of Familial Alzheimer disease (FAD). It has been described that less than 1% of total AD cases have a monogenic familial origin. FAD, mutations in three genes: *app*, *ps-1* and *ps-2* result in the onset of neurodegeneration [26]. Since these genes codify for proteins related with the generation of beta amyloid peptide, it was sug-

gested that the origin of FAD is the accumulation of that peptide [17]. However, when pathological analysis where done to study the development of the disease [6], it was found that senile plaques do not correlate with duration and severity of Alzheimer disease [4]. In the hippocampal region is present the dentate gyrus (DG), a place where neurogenesis takes place [28], a process that in that region has been related with learning and short-memory acquisition [33]. The dentate gyrus is degenerated in AD and it may explain the memory impairment found in the first stage of the disease. Several possibilities have been suggested to explain how occurs DG degeneration, but one possibility, that could explain how the presence of *app*, *ps-1* and *ps-2* mutations found in FAD plays a role in that degeneration, is the activation, in every cases of protein kinase GSK3 [18].

## 2. FAD mutations may increase GSK3 activity

In FAD, mutations in *app* or in the presenilin genes facilitate the production of beta amyloid peptide that could interfere with insulin or Wnt pathways [23,29,31] and, therefore, will promote an

\* Corresponding author. Tel.: +34 91 196 45 64; fax: +34 91 196 44 20.

E-mail addresses: [fhernandez@cbm.uam.es](mailto:fhernandez@cbm.uam.es) (F. Hernández), [egdebarreda@cbm.uam.es](mailto:egdebarreda@cbm.uam.es) (E.G.d. Barreda), [afuster@cbm.uam.es](mailto:afuster@cbm.uam.es) (A. Fuster-Matanzo), [pgoni@cbm.uam.es](mailto:pgoni@cbm.uam.es) (P. Goñi-Oliver), [jjlucas@cbm.uam.es](mailto:jjlucas@cbm.uam.es) (J.J. Lucas), [javila@cbm.uam.es](mailto:javila@cbm.uam.es) (J. Avila).

increase of GSK3 activity [1,8]. On the other hand, mutations in ps-1 may affect to the interaction of this protein with the regulatory subunit of PI3K, decreasing the activity of this kinase and the activation of GSK3 [5]. In sporadic Alzheimer disease (SAD), the presence of different ApoE isoforms could interfere, in a different way, with a co-receptor of Wnt [7,9,30] and it could affect to GSK3 activity. Also, a common genetic variation within LRP6 has been correlated with late onset AD [10]. Finally, also a GSK3 polymorphism has been associated with Alzheimer disease [27]. Thus, there is a convergence of the role of different proteins related with FAD and SAD with an increase of GSK3 activity.

### 3. An animal model to study the consequences of GSK3 overexpression

In this way, a transgenic mouse overexpressing GSK3 $\beta$  in those regions like hippocampus and cortex, damaged in Alzheimer disease, was generated [22]. In this mouse, GSK3 modifies some substrates that could affect neuron survival, like beta catenin, or tau protein [22]. Indeed, preliminary results suggest a toxic effect of phosphotau (modified by GSK3) in neurons (Gómez Barreda E et al., unpublished data). An effect that could be due to the sequestration by phosphotau of other microtubule associated proteins involved in microtubule stabilization [2]. On the other hand, the main feature in the GSK3 transgenic mouse model is a clear degeneration of neurons from dentate gyrus [13]. This degeneration results in memory impairment as determined by tests like Morris water maze [19], or object recognition [12] and, again, preliminary results suggest that dentate gyrus degeneration, that is more evident in a double transgenic mouse overexpressing tau and GSK3 $\beta$  [13], is not only due to an increase in neuron death [22], but also due to a decrease in the neurogenesis that occurs in the subgranular region of the dentate gyrus (Sirerol MS et al., unpublished data). In humans this DG neurogenesis has been related with learning and short-memory acquisition [33]. In Alzheimer disease patients'

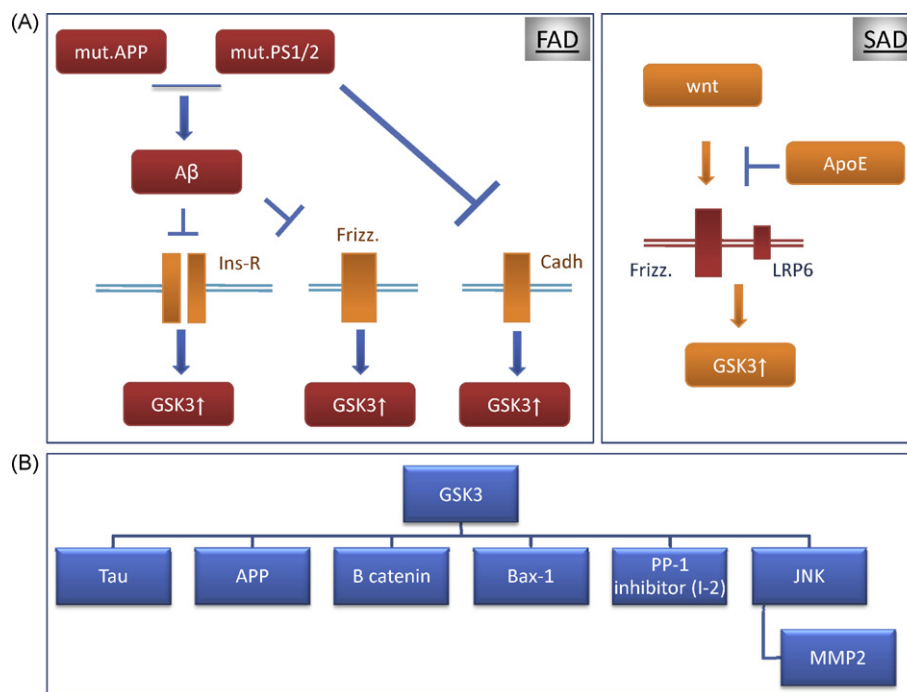
neurogenesis is altered [20] and it could be related to the cognitive impairment and memory loss, found in the patients at early stages of the disease.

### 4. Propagation of the disease

After that stage of memory impairment related to the pathology observed in hippocampal region [6,11]; other behavioural changes occur in the patients at further stages. The patients lose their intellectual abilities, needed for social or occupational functioning, in a process known as dementia. At these stages, neuropathological studies have described different damages at the cortex of the patients, where senile plaques were found [6]. Although is not clear how the pathology associated with the disease propagates from the hippocampal region to the cortex, it has been suggested that upon degeneration, intracellular proteins are expelled to the extracellular space and these expelled proteins can be toxic to the surrounding neurons [14], being extracellular tau one of these possible toxic proteins [14,15].

### 5. GSK3 and amyloid pathology

The main component of senile plaques is beta amyloid peptide and, recently, it has been shown that proteases like MMP2 degrade that peptide, in a process that can be regulated by GSK3 [32]. In this way, beta amyloid peptide can regulate GSK3 activity [31], but also the kinase may regulate beta amyloid degradation [32]. This degradation could be done by other proteases like neprelysin, or IDE [21], although in these cases there are not any descriptions for a possible role of GSK3 in the process. Also, GSK3 could modify the amyloid peptide precursor protein, promoting the appearance of beta amyloid peptide [25]. Nevertheless, an increase in GSK3 activity that will result in the phosphorylation of other substrates can be toxic for cortical neurons that will degenerate as found in the cortex of AD patients at later stages of the disease and that could be related



**Fig. 1.** (A) Left panel (FAD) indicates that mutations in APP, ps-1 or ps-2 may result in the presence of an increased amount of A $\beta$  or in the lack of interaction of ps-1 with cadherin. The consequences in every case will be an increase in GSK3 activity. Also, in SAD (right panel), the presence of different ApoE isoforms may play a role in a different regulation of GSK3 activity. (B) Activated GSK3 could modify different substrates, like those indicated in figure. These modified substrates may be toxic for a neuron, and facilitate cell death. (JNK means Jun N-terminal kinase and MMP2 means matrix metalloproteinase 2). The other substrates have been indicated in the text.

with the onset of dementia, after affecting frontal and parietal lobes. In summary (Fig. 1), we suggest that GSK3 may play an important role in Alzheimer disease. In Fig. 1, it is shown that GSK3 can be activated by the presence of beta amyloid, that can interfere with insulin [31] or Wnt [23] pathways; or could be activated by the presence of ps-1 mutations that alter the cadherin-PI-3 kinase pathway yielding an increase in GSK3 kinase activity [7,9]. Also, as previously indicated, it can be activated in SAD. Moreover, glutamate binding to of NMDA receptors could increase intracellular calcium that may result in calpain activation. This protease cleaves GSK3 at its N-terminal regulatory region promoting its temporal activation [16], a process that could be prevented by the use of NMDA antagonist like memantine [24]. A result of that GSK3 activation could be the modification of substrates like Bax-1, beta catenin or tau [22] (Fig. 1B), modifications that could be toxic for the neurons, promoting their degeneration, a degeneration that could have behavioural consequences like memory impairment, first, and disorientation (dementia) in further stages.

## References

- [1] H. Aberle, A. Bauer, J. Stappert, A. Kispert, R. Kemler, beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway, *EMBO J.* 16 (1997) 3797–3804.
- [2] A.D. Alonso, I. Grundke-Iqbal, H.S. Barra, K. Iqbal, Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (1997) 298–303.
- [3] A. Alzheimer, Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde, *Allg Z Psychiatrie Psychiatrisch-Gerichtz Med.* 64 (1907) 146–148.
- [4] P.V. Arriagada, J.H. Growdon, E.T. Hedley-Whyte, B.T. Hyman, Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease, *Neurology* 42 (1992) 631–639.
- [5] L. Baki, J. Shioi, P. Wen, Z. Shao, A. Schwarzman, M. Gama-Sosa, R. Neve, N.K. Robakis, PS1 activates PI3K thus inhibiting GSK-3 activity and tau overphosphorylation: effects of FAD mutations, *EMBO J.* 23 (2004) 2586–2596.
- [6] H. Braak, E. Braak, Neuropathological staging of Alzheimer-related changes, *Acta Neuropathol.* 82 (1991) 239–259.
- [7] V. Bryja, et al., The extracellular domain of Lrp5/6 inhibits noncanonical Wnt signaling in vivo, *Mol. Biol. Cell* 20 (2009) 924–936.
- [8] D.A. Cross, D.R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich, B.A. Hemmings, Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B, *Nature* 378 (1995) 785–789.
- [9] C.S. Cselenyi, K.K. Jernigan, E. Tahinci, C.A. Thorne, L.A. Lee, E. Lee, LRP6 transduces a canonical Wnt signal independently of Axin degradation by inhibiting GSK3's phosphorylation of beta-catenin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (2008) 8032–8037.
- [10] G.V. De Ferrari, et al., Common genetic variation within the low-density lipoprotein receptor-related protein 6 and late-onset Alzheimer's disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (2007) 9434–9439.
- [11] A. Delacourte, et al., The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease, *Neurology* 52 (1999) 1158–1165.
- [12] T. Engel, F. Hernandez, J. Avila, J.J. Lucas, Full reversal of Alzheimer's disease-like phenotype in a mouse model with conditional overexpression of glycogen synthase kinase-3, *J. Neurosci.* 26 (2006) 5083–5090.
- [13] T. Engel, J.J. Lucas, P. Gomez-Ramos, M.A. Moran, J. Avila, F. Hernandez, Coexpression of FTDP-17 tau and GSK-3beta in transgenic mice induce tau polymerization and neurodegeneration, *Neurobiol. Aging* 27 (2006) 1258–1268.
- [14] A. Gomez-Ramos, M. Diaz-Hernandez, R. Cuadros, F. Hernandez, J. Avila, Extracellular tau is toxic to neuronal cells, *FEBS Lett.* 580 (2006) 4842–4850.
- [15] A. Gomez-Ramos, M. Diaz-Hernandez, A. Rubio, M.T. Miras-Portugal, J. Avila, Extracellular tau promotes intracellular calcium increase through M1 and M3 muscarinic receptors in neuronal cells, *Mol. Cell. Neurosci.* 37 (2008) 673–681.
- [16] P. Goni-Oliver, J.J. Lucas, J. Avila, F. Hernandez, N-terminal cleavage of GSK-3 by calpain: a new form of GSK-3 regulation, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 22406–22413.
- [17] J. Hardy, D.J. Selkoe, The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics, *Science* 297 (2002) 353–356.
- [18] F. Hernandez, J. Avila, The role of glycogen synthase kinase 3 in the early stages of Alzheimer's disease, *FEBS Lett.* 582 (2008) 3848–3854.
- [19] F. Hernandez, J. Borrell, C. Guaza, J. Avila, J.J. Lucas, Spatial learning deficit in transgenic mice that conditionally over-express GSK-3beta in the brain but do not form tau filaments, *J. Neurochem.* 83 (2002) 1529–1533.
- [20] K. Jin, A.L. Peel, X.O. Mao, L. Xie, B.A. Cottrell, D.C. Henshall, D.A. Greenberg, Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (2004) 343–347.
- [21] M.A. Leissring, The AbetaCs of Abeta-cleaving proteases, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 29645–29649.
- [22] J.J. Lucas, F. Hernandez, P. Gomez-Ramos, M.A. Moran, R. Hen, J. Avila, Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice, *EMBO J.* 20 (2001) 27–39.
- [23] M.H. Magdesian, M.M. Carvalho, F.A. Mendes, L.M. Saraiva, M.A. Juliano, L. Juliano, J. Garcia-Abreu, S.T. Ferreira, Amyloid-beta binds to the extracellular cysteine-rich domain of Frizzled and inhibits Wnt/beta-catenin signaling, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 9359–9368.
- [24] C.G. Parsons, A. Stoffler, W. Danysz, Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system—too little activation is bad, too much is even worse, *Neuropharmacology* 53 (2007) 699–723.
- [25] C.J. Phiel, C.A. Wilson, V.M. Lee, P.S. Klein, GSK-3alpha regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides, *Nature* 423 (2003) 435–439.
- [26] D.L. Price, S.S. Sisodia, Mutant genes in familial Alzheimer's disease and transgenic models, *Annu. Rev. Neurosci.* 21 (1998) 479–505.
- [27] B.A. Schaffer, et al., Association of GSK3B with Alzheimer disease and frontotemporal dementia, *Arch. Neurol.* 65 (2008) 1368–1374.
- [28] B. Seri, J.M. Garcia-Verdugo, L. Collado-Morente, B.S. McEwen, A. Alvarez-Buylla, Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus, *J. Comp. Neurol.* 478 (2004) 359–378.
- [29] A. Takashima, et al., Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3beta and its substrate tau, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1998) 9637–9641.
- [30] K. Tamai, et al., LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction, *Nature* 407 (2000) 530–535.
- [31] M. Townsend, T. Mehta, D.J. Selkoe, Soluble Abeta inhibits specific signal transduction cascades common to the insulin receptor pathway, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 33305–33312.
- [32] A.R. White, et al., Degradation of the Alzheimer disease amyloid beta-peptide by metal-dependent up-regulation of metalloprotease activity, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 17670–17680.
- [33] C. Zhao, W. Deng, F.H. Gage, Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis, *Cell* 132 (2008) 645–660.



# Tau phosphorylation in hippocampus results in toxic gain-of-function

Jesús Avila\*†<sup>1</sup>, Elena Gómez de Barreda\*, Tobias Engel‡, Jose J. Lucas\*† and Félix Hernández\*

\*Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), C/Nicolás Cabrera 1 Campus de la Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain, †Centro de Investigación en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain, and ‡Department of Physiology and Medical Physics, Royal College of Surgeons in Ireland, Dublin, Ireland

## Abstract

The MAP (microtubule-associated protein) tau binds to tubulin, the main component of MTs (microtubules), which results in the stabilization of MT polymers. Tau binds to the C-terminal of tubulin, like other MAPs (including motor proteins such as kinesin) and it therefore may compete with these proteins for the same binding site in the tubulin molecule. In pathological conditions, tau is the main component of aberrant protein aggregates found in neurodegenerative disorders known as tauopathies where tau is present in its hyperphosphorylated form. GSK3 (glycogen synthase kinase 3, also known as tau kinase 1) has been described as one of the main kinases involved in tau modifications. We have analysed the role of phospho-tau as a neurotoxic agent. We have analysed a transgenic mouse model which overexpresses GSK3 $\beta$ . In this transgenic mouse, a clear degeneration of the dentate gyrus, which increases with age, was found. In a double transgenic mouse, which overexpresses GSK3 and tau at the same time, dentate gyrus degeneration was dramatically increased. This result may suggest that phospho-tau may be toxic inside neurons of the dentate gyrus. Once neuronal degeneration takes place, intracellular tau is secreted to the extracellular space. The present review discusses the toxicity of this extracellular tau for surrounding neurons.

## Introduction

Neuronal morphology is determined by its cytoskeleton which is composed of three components: MTs (microtubules), microfilaments and intermediate filaments. Tubulin, the main component of the MTs, is the most abundant protein in the cytoplasm of neurons. Usually, MTs are very dynamic polymers in the cells, but, in neurons, MTs become stabilized in specific directions generating the cytoplasmic extensions which will become the axons and dendrites [1]. Among the MT-stabilizing proteins are the MAPs (MT-associated proteins) [2], of which the protein tau is one [3]. Additionally, tau has also been shown to facilitate MT assembly *in vitro* [4].

Tau has no recognizable secondary structure in its native state [5], thus all of its residues can be accessible to interact with other proteins, including itself. The majority of tau residues are conserved across mammalian species and, since they do not contribute to the formation of any ternary structure, they may be involved in some conserved protein-protein interactions [6]. In fact, tau can bind to tubulin, actin, presenilin-1,  $\alpha$ -synuclein, phospholipase C $\gamma$ , PP (protein phosphatase) 1, ferritin or itself [7,8]. In some cases, tau protein interactions with other proteins can play a role in MT dynamics, such as the interaction of tau with hGas7b [9]. Also, some of these interactions can be regulated by tau phos-

phorylation (see below). Almost 20 % of the total amino acids from the longest tau isoform of the central nervous system are phosphorylatable residues. It is known that tau can bind (being modified), by several protein kinases such as GSK3 (glycogen synthase kinase 3), Cdk5 (cyclin-dependent kinase 5), MARK (MAP-regulating kinase), JNK (c-Jun N-terminal kinase), PKA (protein kinase A), protein kinase CK2, CaMKII (Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II) and PKC (protein kinase C) [7]. Hence tau is usually found as a phosphoprotein. Thus phospho-tau can also bind to other proteins such as 14-3-3 protein, JIP-1 (JNK-interacting protein 1), Pin-1 or phosphatases such as PP1, PP2A, PP2B or PPJ [7,10].

Tau binds to the C-terminal region of tubulin [11], whereas tubulin binds to tau at a region containing three (tau 3R) or four (tau 4R) similar, but not identical, repetitive sequences of 31 or 32 residues [12]. Inside the primary structure of tubulin, close to the GTP-binding region, a sequence similar to these repetitive tau sequences [13] is located, which might play a role in MAP-induced tubulin assembly [13,14].

The function of tau inside the cell can probably be replaced by the presence of other MAPs, since mice lacking tau survive and show a similar phenotype to that of their wild-type counterparts [15]. However, overexpressing tau seems to be toxic [15]. This tau overexpression may also result in increased levels of phospho-tau [16].

Aberrant tau structures in AD (Alzheimer's disease) and other tauopathies present in the brains of patients are known as neurofibrillary tangles [17]. These structures are aggregates of filamentous polymers called PHFs (paired helical filaments) [18], where the main component is tau in

**Key words:** dentate gyrus, glycogen synthase kinase 3 (GSK3), microtubule, neurodegeneration, phosphorylation, tau.

**Abbreviations used:** AD, Alzheimer's disease; GSK3, glycogen synthase kinase 3; JNK, c-Jun N-terminal kinase; MAP, microtubule-associated protein; MT, microtubule; PHF, paired helical filament; PP, protein phosphatase.

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed (email javila@cbm.uam.es).

its phosphorylated form [19,20], although phosphorylation of tau is not essential for its assembly *in vitro* [21].

In the present article, we review some of the functions and dysfunctions of tau.

### Tau binding to MTs and the consequences for MT dynamics

Tubulin (composed of two subunits,  $\alpha$  and  $\beta$ ) requires the presence of GTP for its *in vitro* assembly into MTs. Tubulin binds to GTP and polymerizes to form MTs in its GTP-bound form. After polymerization, tubulin subunits hydrolyse GTP to GDP. The resultant GDP-bound polymer is weaker than the GTP-bound polymer and depolymerizes. Tubulin has two binding sites (one for each subunit). One in the  $\alpha$  subunit that is not exchangeable with exogenous GTP and the other one (exchangeable) in the  $\beta$  subunit. Close to the exchangeable GTP-binding site ( $\beta$ -tubulin), we find the sequence QLTHSLGGG, which is similar to the motif NITHVPPGG present in the first tubulin-binding repeat on the tau molecule. It has been suggested that the C-terminal region of the  $\beta$ -tubulin subunit interferes with the GTP binding to this subunit, preventing, in part, MT polymerization. MT-associated proteins, such as tau, bind to the C-terminal region of the tubulin subunits [22] which may facilitate binding of tubulin to GTP [23].

For the assembly of MTs, GTP has to bind to the  $\beta$ -tubulin subunit. MTs are dynamic polymers which polymerize and depolymerize by adding and removing subunits at the end of the polymers. In neurons, MTs are less dynamic (or more stable) than in other cells owing to the presence of MAPs. Tau plays an important role in MT dynamics and a mechanism has been proposed for this role. Tau binds (through four repeated sequences) to the C-terminal region of the  $\beta$ -tubulin subunit [11]. Also, it has been described that the C-terminal region of  $\beta$ -tubulin (a relatively mobile region [24]) could bind, in an intracellular interaction, to the region containing the sequence QLTHSLGGG, indicated previously [13], and that this may prevent GTP binding to  $\beta$ -tubulin [23] (Figure 1). Thus the interaction of tau with the C-terminal region of  $\beta$ -tubulin will prevent the previously described intramolecular interaction of  $\beta$ -tubulin, facilitating the binding of GTP to the protein and MT assembly. There are other MAPs, such as MAP2, which contain similar tubulin-binding regions to those found in tau and this could also facilitate MT assembly [2]. This similar function present in different MAPs could explain the fact that the absence of tau *in vivo* could be complemented by the presence of other proteins [7]. Tau interaction with MTs appears to be regulated through phosphorylation. Broadly, phosphorylation reduces the affinity between tau and MT.

### Tau is the main component of protein aggregates present in tauopathies

In AD, the most common and best-studied tauopathy, tau forms fibrillar polymers known as PHFs [18]. These filaments, in their aggregated form, are the neurofibrillary tangles observed in the brains of AD patients [17].

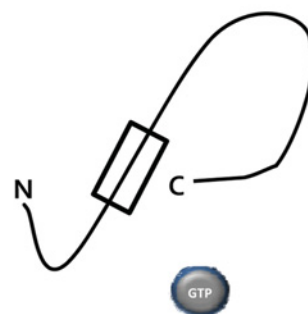
### Figure 1 | Possible mechanism to facilitate GTP binding to the $\beta$ -tubulin subunit

It has been postulated that the C-terminal region of  $\beta$ -tubulin can form an intramolecular interaction with a region located close to the GTP-binding region in the same molecule (B). Tau, containing a similar sequence (A) can compete with this intramolecular interaction by binding to the C-terminal region of  $\beta$ -tubulin. In consequence, this facilitates GTP binding to  $\beta$ -tubulin (C).

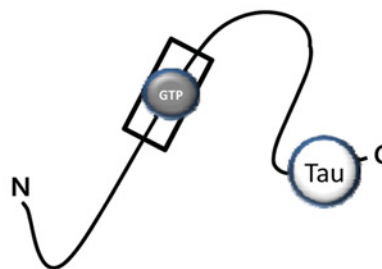
A

Tau-2	296 NIKHVPGGG <sub>304</sub>
$\beta$ Tub.	130 QLTHSLGGG <sub>142</sub>

B



C



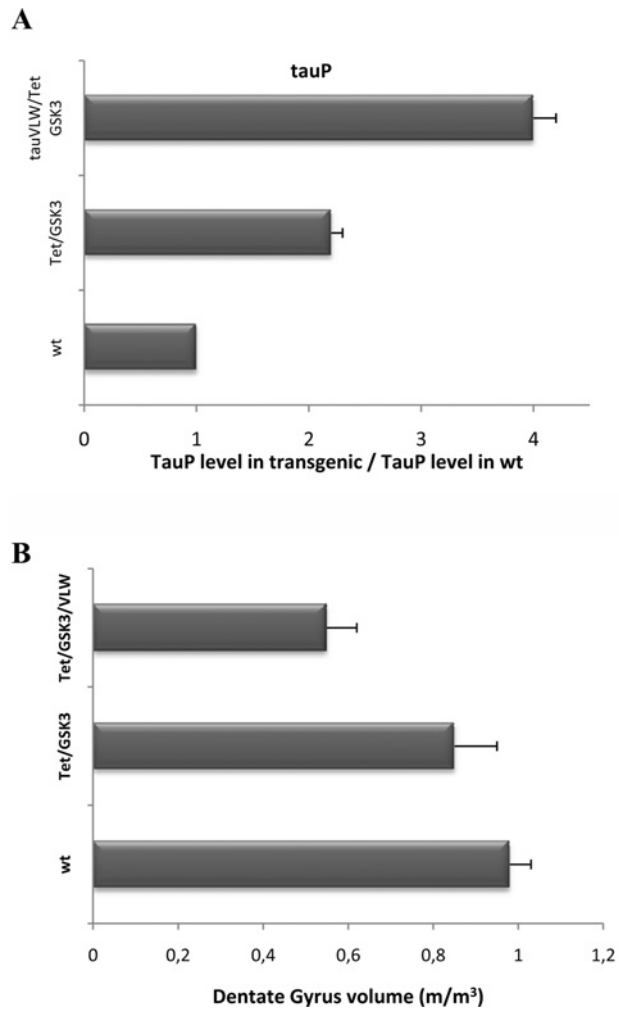
COLOUR

Historically, the presence of tau in PHFs was described in 1986 [19]. In the same year, it was also described that tau was found to be hyperphosphorylated in these aggregates [20], and that pure homogenous tau can be assembled into PHF-like polymers in the absence of other proteins [21]. The region of tau-tau interaction was located at the tubulin-binding region of the tau molecule [25].

Since tau is present in its hyperphosphorylated form in AD, this modification was studied by analysing the action of different kinases and phosphatases on tau [7]. GSK3 (or tau kinase I) is one of the main tau kinases [26] and several of the sites modified by this kinase on the tau molecule are also found in its phosphorylated form in AD [27]. Consequently, a GSK3 transgenic mouse model was designed, overexpressing the kinase in those brain regions damaged in AD, such as the hippocampus and the cortex [28].

**Figure 2 | Correlation of phospho-tau to dentate gyrus volume**

(A) Phospho-tau levels [measured by using an antibody which recognizes phospho-tau (abAT8)] in Tet GSK3 and in tau<sup>V<sup>LW</sup></sup>/Tet GSK3 mice compared with phospho-tau levels in wild-type mice. (B) Dentate gyrus volume of wt, Tet GSK3 and in tau<sup>V<sup>LW</sup></sup>/Tet GSK3 mice. There is a correlation between an increase in tau phosphorylation and a decrease in dentate gyrus volume.



Characterizations of this transgenic mouse model have shown increased phosphorylation of tau in regions such as the dentate gyrus [28,29].

### Tau phosphorylation by GSK3 correlates with neuronal degeneration in the dentate gyrus

A main feature of GSK3 transgenic mice is memory impairment [30] which could be the consequence of progressive dentate gyrus degeneration [29,31]. To test whether the presence of tau (or phospho-tau) could regulate dentate gyrus degeneration, mice overexpressing GSK3 and lacking the tau gene were cross-bred, and preliminary experiments suggest decreased dentate gyrus degeneration

when tau is lacking (E. Gomez de Barreda et al., unpublished work). This observation agrees with the finding that in mice overexpressing GSK3 and a variant of tau (a better substrate than normal tau for GSK3), a more dramatic increase in tau phosphorylation and a faster dentate gyrus degeneration has been observed than in mice which also overexpressed GSK3 but lacked the tau gene [31] (Figure 2).

In conclusion, the previous observations suggest a toxic role for phospho-tau and this toxic function could result in neurodegeneration. When neurons die, tau can reach the extracellular space and, consequently, this extracellular tau might be toxic for the surrounding neurons spreading tau toxicity [32–34].

### Extracellular tau

Extracellular tau in its monomeric [34] or aggregated form [35,36] might be toxic for neurons. In its monomeric form, it has been shown to interact with muscarinic cell receptors, raising intracellular Ca<sup>2+</sup> to toxic levels in neurons [32,34].

On the other hand, it has been suggested that extracellular tau aggregates induce the formation of new intracellular tau aggregates in the surrounding neurons in a prion-like fashion [35]. Future studies should reveal whether the spreading of tau pathology through the brain is due to the presence of tau in monomeric or in its aggregated form.

### References

- Mitchison, T. and Kirschner, M. (1988) Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron*, **1**, 761–772
- Matus, A. (1988) Microtubule-associated proteins: their potential role in determining neuronal morphology. *Annu. Rev. Neurosci.* **11**, 29–44
- Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo, S.Y. and Kirschner, M.W. (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 1858–1862
- Cleveland, D.W., Hwo, S.Y. and Kirschner, M.W. (1977) Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J. Mol. Biol.* **116**, 207–225
- Mandelkow, E., Song, Y.H., Schweers, O., Marx, A. and Mandelkow, E.M. (1995) On the structure of microtubules, tau, and paired helical filaments. *Neurobiol. Aging* **16**, 347–354
- Gibson, T.J. (2009) Cell regulation: determined to signal discrete cooperation. *Trends Biochem. Sci.* **34**, 471–482
- 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
- LaPointe, N.E., Morfini, G., Pigino, G., Gaisina, I.N., Kozikowski, A.P., Binder, L.I. and Brady, S.T. (2009) The amino terminus of tau inhibits kinesin-dependent axonal transport: implications for filament toxicity. *J. Neurosci. Res.* **87**, 440–451
- Akiyama, H., Gotoh, A., Shin, R.W., Koga, T., Ohashi, T., Sakamoto, W., Harada, A., Arai, H., Sawa, A., Uchida, C. and Uchida, T. (2009) A novel role for hGas7b in microtubular maintenance: possible implication in tau-associated pathology in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **284**, 32695–32699
- Ittner, L.M., Ke, Y.D. and Gotz, J. (2009) Phosphorylated Tau interacts with c-Jun N-terminal kinase-interacting protein 1 (JIP1) in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **284**, 20909–20916
- Serrano, L., Montejó de Garcini, E., Hernandez, M.A. and Avila, J. (1985) Localization of the tubulin binding site for tau protein. *Eur. J. Biochem.* **153**, 595–600
- Lee, G., Cowan, N. and Kirschner, M. (1988) The primary structure and heterogeneity of tau protein from mouse brain. *Science* **239**, 285–288

- 13 Ponstingl, H., Krauhs, E., Little, M., Kempf, T., Hofer-Warbinek, R. and Ade, W. (1982) Amino acid sequence of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulins from pig brain: heterogeneity and regional similarity to muscle proteins. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **46**, 191–197
- 14 Nogales, E., Wolf, S.G. and Downing, K.H. (1998) Structure of the  $\alpha\beta$  tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* **391**, 199–203
- 15 Harada, A., Oguchi, K., Okabe, S., Kuno, J., Terada, S., Ohshima, T., Sato-Yoshitake, R., Takei, Y., Noda, T. and Hirokawa, N. (1994) Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature* **369**, 488–491
- 16 Stys, P.K., Ransom, B.R., Waxman, S.G. and Davis, P.K. (1990) Role of extracellular calcium in anoxic injury of mammalian central white matter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 4212–4216
- 17 Alzheimer, A. (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Z. Psychiatr. Psych. Gerichtl. Med.* **64**, 146–148
- 18 Kidd, M. (1963) Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* **197**, 192–193
- 19 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
- 20 Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y.C., Quinlan, M., Wisniewski, H.M. and Binder, L.I. (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 4913–4917
- 21 Montejo de Garcini, E., Serrano, L. and Avila, J. (1986) Self assembly of microtubule associated protein tau into filaments resembling those found in Alzheimer disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **141**, 790–796
- 22 Serrano, L., de la Torre, J., Maccioni, R.B. and Avila, J. (1984) Involvement of the carboxyl-terminal domain of tubulin in the regulation of its assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 5989–5993
- 23 Padilla, R., Lopez Otin, C., Serrano, L. and Avila, J. (1993) Role of the carboxy terminal region of  $\beta$  tubulin on microtubule dynamics through its interaction with the GTP phosphate binding region. *FEBS Lett.* **325**, 173–176
- 24 Ringel, I. and Sternlicht, H. (1984) Carbon-13 nuclear magnetic resonance study of microtubule protein: evidence for a second colchicine site involved in the inhibition of microtubule assembly. *Biochemistry* **23**, 5644–5653
- 25 Perez, M., Valpuesta, J.M., Medina, M., Montejo de Garcini, E. and Avila, J. (1996) Polymerization of tau into filaments in the presence of heparin: the minimal sequence required for tau-tau interaction. *J. Neurochem.* **67**, 1183–1190
- 26 Ishiguro, K., Shiratsuchi, A., Sato, S., Omori, A., Arioka, M., Kobayashi, S., Uchida, T. and Imahori, K. (1993) Glycogen synthase kinase  $3\beta$  is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments. *FEBS Lett.* **325**, 167–172
- 27 Hanger, D.P., Anderton, B.H. and Noble, W. (2009) Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol. Med.* **15**, 112–119
- 28 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-3 $\beta$  conditional transgenic mice. *EMBO J.* **20**, 27–39
- 29 Engel, T., Hernandez, F., Avila, J. and Lucas, J.J. (2006) 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
- 30 Hernandez, F., Borrell, J., Guaza, C., Avila, J. and Lucas, J.J. (2002) Spatial learning deficit in transgenic mice that conditionally over-express GSK-3 $\beta$  in the brain but do not form tau filaments. *J. Neurochem.* **83**, 1529–1533
- 31 Engel, T., Lucas, J.J., Gomez-Ramos, P., Moran, M.A., Avila, J. and Hernandez, F. (2006) Coexpression of FTDP-17 tau and GSK-3 $\beta$  in transgenic mice induce tau polymerization and neurodegeneration. *Neurobiol. Aging* **27**, 1258–1268
- 32 Gomez-Ramos, A., Diaz-Hernandez, M., Cuadros, R., Hernandez, F. and Avila, J. (2006) Extracellular tau is toxic to neuronal cells. *FEBS Lett.* **580**, 4842–4850
- 33 Gomez-Ramos, A., Diaz-Hernandez, M., Rubio, A., Diaz-Hernandez, J.I., Miras-Portugal, M.T. and Avila, J. (2009) Characteristics and consequences of muscarinic receptor activation by tau protein. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **19**, 708–717
- 34 Gomez-Ramos, A., Diaz-Hernandez, M., Rubio, A., Miras-Portugal, M.T. and Avila, J. (2008) Extracellular tau promotes intracellular calcium increase through M<sub>1</sub> and M<sub>3</sub> muscarinic receptors in neuronal cells. *Mol. Cell. Neurosci.* **37**, 673–681
- 35 Clavaguera, F., Bolmont, T., Crowther, R.A., Abramowski, D., Frank, S., Probst, A., Fraser, G., Stalder, A.K., Beibel, M., Staufenbiel, M. et al. (2009) Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat. Cell Biol.* **11**, 909–913
- 36 Frost, B., Jacks, R.L. and Diamond, M.I. (2009) Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J. Biol. Chem.* **284**, 12845–12852