

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**  
**MOLECULAR**

**TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIOS SOBRE LA FOSFORILACIÓN Y**  
**AGREGACIÓN DE LA PROTEÍNA TAU**  
**Y SU POSIBLE RELACIÓN CON LA**  
**ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

**Ismael Santa María Pérez**  
**Madrid, 2008**

Memoria de Investigación presentada por  
**Ismael Santa María Pérez**  
Para optar al grado de  
**Doctor en Ciencias**  
por la **Universidad Autónoma de Madrid**

Trabajo dirigido por:

**El Dr. Francisco José Moreno Muñoz**  
Catedrático del Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la  
Universidad Autónoma de Madrid

y por

**El Dr. Félix Hernández Pérez**  
Profesor Titular del Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la  
Universidad Autónoma de Madrid

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





**Francisco J. Moreno Muñoz**, Catedrático del Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid.

y **Félix Hernández Pérez**, Profesor Titular del Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid.

INFORMAN:

Que la presente Tesis Doctoral, titulada “*Estudios sobre la fosforilación y agregación de la proteína tau y su posible relación con la enfermedad de Alzheimer*” ha sido realizada bajo nuestra dirección por Ismael Santa Maria Pérez, estimando que se encuentra concluida y en condiciones de ser presentada y defendida públicamente para optar al grado de Doctor.

Y para que conste a todos los efectos firmamos la presente autorización

en Madrid a 31 de Enero de 2008

Fdo. Francisco J. Moreno

Fdo. Félix Hernández

**Ismael Santa Maria Perez ha recibido financiación del Ministerio de Educación y Ciencia dentro del programa de Formación de Personal Investigador (BES-2004-5505). El trabajo del laboratorio ha sido financiado en parte por el Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2003-02697) y por la Fundación Lilly.**

*A mis Abuelos  
A mis Padres  
A mis hermanos  
A mi Tía Ana  
A Fiti (Yolanda)*

**“Si os apasiona la ciencia, haceos científicos.  
No penséis lo que va a ser de vosotros. Si  
trabajáis firme y con entusiasmo, la ciencia  
llenará vuestra vida.”**

**Severo Ochoa**

# **Agradecimientos**

Quiero agradecer a toda la gente que estos años me ha ayudado y enseñado lo que es la ciencia y lo que significa ser un científico. Espero no olvidarme de alguien....

En primer lugar quiero agradecerle a Francisco J Moreno (Paco) todo lo que se ha molestado en enseñarme y apoyarme constantemente. Además he de agradecerle que me hiciera un hueco en su laboratorio para empezar a realizar mi tesis. Es una de las cosas que no se me olvidan!. Además de enseñarme y estar siempre dispuesto a lo que haga falta, es una persona con la que puedes charlar de cualquier cosa, lo que en mi condición de "maruja" le agradezco. En definitiva gracias Paco, no tengo palabras.

También he tenido mucha suerte de conocer a Félix Hernández, del cual he aprendido infinidad de cosas y siempre ha estado dispuesto a enseñarme y echarme una mano. La de horas que perdimos en el HPLC de Edgardo!!. Muchísimas gracias por todo Félix, que suerte haberte tenido cerca.

Mi mas profundo agradecimiento a Jesús Avila, gracias a el podemos decir que he realizado la tesis, el siempre ha estado ahí, en su condición de súper Jefe. Es una persona de la cual se aprenden muchas cosas. Muchísimas gracias Jesús por apoyarme, enseñarme, aguantarme,.....etc.... MIL GRACIAS!

Por otro lado he de decir que he sido un afortunado al tener la oportunidad de conocer y aprender de personas tan inmensamente valiosas como lo son Javier Diaz Nido y Francisco Wandosell. Son especiales y me han enseñado muchas cosas. Con ellos siempre puedes echarte una charla de ciencia o de cualquier otra índole, son geniales!. Muchísimas gracias por todo.

También tengo que agradecer a José J. Lucas, el cual siempre se ha preocupado de intentar mantener a los laboratorios de neurociencias unidos en los seminarios. En estos seminarios he tenido la suerte de conocer al grupo de Pilar Gómez Ramos. Muchas gracias José, creo que la comunicación científica es fundamental y gracias a ti algo hemos podido aprender a defendernos en publico. Muchas gracias por todo tu apoyo.

He tenido mucha suerte también de conocer a Inés Antón, una gran científica, una gran persona y una gran compañera de laboratorio. Gracias!.

Para continuar me gustaría agradecer a las personas que me apoyaron en los primeros momentos en los que empezaba en este mundillo de la ciencia. En Japón, gracias al Profesor Susumu Nishimura, y a Vincent P. Kelly. Les agradezco haberme animado a hacer ciencia. De ellos aprendí muchas cosas. Gracias también a mis compañeros del laboratorio Sekine y Arai. En Nueva York, gracias al Dr. Carlos Cordon y a su grupo, en especial al entonces post doctoral Miguel Alaminos.

Mi andadura en el CBM no habría tenido lugar de no ser por el Dr. Gutiérrez Fuentes, quien me recomendó entrevistarme con Jesús y con Paco. Muchísimas gracias!!.

No se por quien empezar, por que es mucha gente a la que tengo que agradecer, pero creo que voy a empezar por la gente del CBM que siempre ha estado ahí durante este tiempo desde el principio. Muchísimas gracias a Raquel Cuadros, Chus, Marta Salcedo, Mar y Elena Langa. Ellas fueron las primeras que me recibieron en el laboratorio. Raquel (la madre de España) es una persona especial, siempre dispuesta a enseñarte y ayudarte. Te transmite muchísima vitalidad y alegría. Es impresionante!. Mil gracias por escucharme y por todo!!.

Aunque le conocí mas tarde quiero agradecer también a su marido, Santi. Es una persona que además de dejarte el ordenador niquelado si tiene que echarte una mano te la echa. Además he de agradecerle los millones de risas que nos hemos echado juntos, ja, ja.. Eres un campeón, un abrazo enorme!!.

Por otro lado, Chus es una persona muy especial, siempre esta ahí ayudando en lo que haga falta y aguantándome con la mejor de sus sonrisas. A Elena Langa la tengo que agradecer, en primer lugar, que me enseñara a manejarme en cultivos y en segundo lugar que sea una persona tan simpática y siempre dispuesta a ayudarte, apoyarte y echarte una mano, que grande eres!. Hablando de cultivos, quiero agradecer a mi compañera de cultivos por excelencia, Marta Salcedo. La de horas que pasamos en cultivos contándonos historias varias. Mil gracias por tu apoyo y por ser como eres!!.

Mar (la "Grison") es una de esas personas de las que uno se alegra de haber conocido, además de ser una persona especial, con ella se aprende muchísimo. Es una verdadera científica, un ejemplo a seguir!!.

Siempre ha estado ahí con su paciencia infinita aguantándome y respondiéndome a todo tipo de preguntas y dudas. Gracias por haberme enseñado la molecular y tantas otras cosas. Que suerte haberte conocido y tenido cerca en el laboratorio. Te estaré siempre agradecido!, un millón de gracias!.

Gracias Alfredo, siempre has estado ahí para lo que necesitara, eres el mejor. Mil millones de gracias por todo y por esos momentos en el birra's place, el Pepe's home, la Coruña, Oxford!!.

Que buenos recuerdos!. Gracias también a Miguel, siempre contagiándote ese entusiasmo por la ciencia y dándote ideas varias. Muchísimas gracias por eso y por todo. Gracias también a Carolina.....que paciencia tienes con nosotros!!, jaja.

Por otro lado, quería agradecer de forma especial a Gloria, por ser una amiga genial, una excelente compañera de laboratorio y estar siempre dispuesta a reírse y hablar de ciencia o de cualquier otra cosa. Que buen rollo haberte conocido!!.

Gracias a Lara Rodenstein por ser una buena amiga y tan buena compañera de laboratorio. Que pena no haberte conocido antes!!.

A Toñi le digo lo mismo, mil gracias. También quiero agradecer a Lara Ordoñez por sus clases de word y por su compañía, que es fenomenal!, así como la de Sara.

Me alegro también de haber conocido a Alberto. Siempre dispuesto a ayudarte y echarte una mano en lo que haga falta. Además de ser una de las personas que mas vale en el laboratorio, es una brillante persona, siempre tan feliz escuchando su death metal. Es el amo. Un abrazo Chustas!!.

Gracias a Tobías aprendí lo que era una inmunohistoquímica, mil gracias a ti y a Eva, por aguantar a este alemán tan pintoresco!!.

La Raquelina siempre esta ahí para escucharte con la mejor de sus sonrisas, mil gracias por todo y por haber ido también a San Diego, menos mal!!.

Mil gracias a ti Rober por cuidarla, que vale un huevo!!.

Paloma y Alicia, siempre tan trabajadoras, dispuestas a hacer un descanso escuchando alguna de mis historietas. Mil gracias, aunque no se me olvida que me disteis calabazas, jaja!!

Les agradezco a las Elenas (Elena G y T) haberme dejado “un hueco” en el nuevo laboratorio y ser tan alegres. Gracias a vosotras el laboratorio siempre esta más animado, junto con Almudena, que cantando alguna melodía ameniza bastante. Gracias a Thorsten por aguantar!!.

Marta, aunque esta siempre muy ocupada, te ayuda en lo que sea y te hace reír. Muchas gracias por todo. Gracias a ti Esther, siempre eres la primera en llegar al laboratorio!

Gracias a Erika, ahora convertida en una verdadera americana, y a la gente del CX470 con las que he compartido tantos buenos momentos, gracias a Diana, Olga, Filip, Mayte (Jefa), Mayte (predoc), Anita, Inma, Ana Franco y Héctor.

Gracias a Ricardo (el introvertido) y Vega, sois geniales y me habéis ayudado un montón, sobre todo tu Ricardo en el clitómetro...esos Martes ROS!!, Muchas gracias!

Quería agradecer también a la gente del laboratorio de Federico Mayor, en especial a Alicia, Carlota, Elena, Sandra, Antonio, Cati, Nila y Maria. Gracias Chirlys por esa compañía en cultivos y por las risas que nos hemos echado!!.

También quiero dar las gracias a toda la gente de los servicios de Microscopía Electrónica, Microscopía Óptica y Confocal, Citometría, Proteómica, Fotografía, Animalario, Compras, Almacén, etc..... por su ayuda durante todo este tiempo.

Agradecer también a gente como Reyes, Belén o Mada que siempre me han ayudado con todo tipo de papeleos y burocracia.

A Isabela le quiero agradecer el haberme enseñado a hacer las líneas estables y haberme hecho compañía en cultivos. Mil gracias.

A Ruth, que siempre has estado ahí, desde que empezamos la carrera, mil gracias.

Por otro lado, quería agradecer de manera muy especial a mis amigas del CNB, Elena, Eva y Beatriz. Ellas siempre están ahí cuando las necesitas. Además todos los días me han tenido que aguantar a la hora de la comida, que no es poco. Un besazo enorme y un millón de gracias por todo. Me alegro muchísimo de haberos conocido!. Muchas gracias también a José Luis, Ivan y Andrea.

Me alegro también de haber conocido a Mónica y Patricia, así como a Raúl. Un abrazo a todos.

No puedo dejar de agradecer a mis amigos que conocí en la carrera, a Edu, Miguel y Maria. Son todos muy especiales para mi, un millón de gracias por estar siempre ahí!!.

Gracias a ti también Libe!.

Gracias a Gustavo por todo el trabajo que realizamos juntos cuando vino a España. Mil gracias por todo.

Ignacio, muchas gracias, fuiste una gran ayuda en el laboratorio.

He de agradecer también a la gente del grupo de Juan S. Jiménez, Mari José y Alejandro, por haberme ayudado a hacer algún experimento, muchas gracias.

Gracias también a gente como Carlos, del laboratorio de Antonio Nieto, por la de veces que me ha dejado los reactivos para hacer las competentes. Muchas gracias!.

Por último, y no por ello menos importante, en primer lugar quería agradecer a la persona que mas me ha apoyado durante esta tesis, Fiti. Sin ella al lado no hubiera sido lo mismo. Muchísimas gracias por todo, eres la mejor!!!!. Siempre has estado ahí para cualquier cosa y he de agradecértelo. Un besazo enorme!!.

En segundo lugar un agradecimiento muy especial a mi familia. En especial a mis padres Ismael y Josefa, quienes he tenido la suerte de tener como ejemplo y me han dado todo su apoyo de manera constante. Gracias a mis hermanos trillizos, Jaime y Luis. Son los mejores!!.

Y gracias a todo el resto de la familia por su apoyo.

A todos vosotros muchísimas gracias!!



# Índice

<b>Dedicación</b>	i
<b>Agradecimientos</b>	iii
<b>Índice</b>	vii
<b>Listado de figuras</b>	xii
<b>Abreviaturas</b>	xv
<b>Summary</b>	xix
<b>Introducción</b>	1
<b>1. La enfermedad de Alzheimer</b>	3
1.1. Descubrimiento de la Enfermedad de Alzheimer	3
1.2. Marcas histopatológicas y características clínicas de la enfermedad de Alzheimer	4
<b>2. Ovillos neurofibrilares, filamentos apareados helicoidales y la proteína tau</b>	7
2.1. Ovillos neurofibrilares y filamentos apareados helicoidales	7
2.2. La proteína tau y las tauopatías	8
2.2.1. Síntesis y degradación de la proteína tau. Implicación en tauopatías	9
2.2.1.1. Síntesis de la proteína tau	9
2.2.1.2. Degradación de la proteína tau	12
2.2.2. Modificaciones post-traduccionales de la proteína tau	13
2.2.2.1. Fosforilación	13
2.2.2.2. Otras modificaciones de tau	16
2.2.3. Polimerización y agregación de la proteína tau	17
2.2.3.1. Estudios <i>in vitro</i>	17
2.2.3.2. Estudios <i>in vivo</i>	21
2.2.4. Toxicidad y neurodegeneración mediada por tau	22
<b>3. Las placas seniles</b>	24
3.1. La proteína precursora del amiloide y su derivado, el péptido A $\beta$	24
3.2. Las presenilinas 1 y 2	25
<b>4. Estrés oxidativo en la enfermedad de Alzheimer</b>	26
4.1. Formación de agregados de tau y su relación con el estrés oxidativo	28
<b>5. Nuevas terapias en la enfermedad de Alzheimer</b>	30
5.1. Terapias dirigidas contra el péptido A $\beta$	30
5.2. Terapias dirigidas contra la proteína tau	31
<b>Objetivos</b>	33
<b>Materiales y Métodos</b>	37
<b>1. Materiales y reactivos</b>	39
<b>2. Anticuerpos</b>	39
<b>3. Purificación de la proteína tau</b>	41
3.1 Purificación de tau 42 y tau 2R	41
3.2 Obtención y purificación de otras proteínas o péptidos utilizados	41
<b>4. Purificación de filamentos helicoidales apareados (PHFs) de cerebro humano de enfermos de Alzheimer</b>	42
<b>5. Fosforilación de tau <i>in vitro</i></b>	42
5.1. Fosforilación de tau por proteína quinasa A y glucógeno sintasa quinasa-3 $\beta$	42
<b>6. Ensamblaje y agregación de tau recombinante <i>in vitro</i></b>	43
6.1. Polimerización de tau, péptidos y variantes relacionadas	43
6.2. Medidas de polimerización y agregación de tau, péptidos y variantes relacionadas.	43
6.2.1. Análisis por sedimentación	44
6.2.2. Análisis por microscopía e inmunomicroscopía electrónica de transmisión	44
<b>7. Polimerización y purificación de tubulina</b>	45
<b>8. Inmunohistoquímica</b>	45
<b>9. Cultivos celulares</b>	45
9.1. Cultivo de líneas celulares	46
9.1.1. Diferenciación del neuroblastoma humano SH-SY5Y	46
9.1.2. Aislamiento de filamentos de tau de células SH-SY5Y diferenciadas	46
9.2. Cultivos primarios	47

9.2.1. Neuronas de hipocampo de ratón	47
<b>10. Análisis de proteínas por electrotransferencia e inmunodetección (Western Blot)</b>	48
10.1. Electrotransferencia e inmunodetección de extractos celulares	48
10.2. Análisis por electrotransferencia e inmunodetección de la proteína tau presente en tejido	48
10.3. Análisis por electrotransferencia e inmunodetección de la proteína tau polimerizada	49
<b>11. Análisis de proteínas por inmovilización mediante microfiltración e inmunodetección (Dot-Blot)</b>	49
<b>12. Tinción inmunocitoquímica</b>	49
12.1. Tinción inmunocitoquímica de líneas celulares	49
12.2. Tinción inmunocitoquímica de cultivos primarios de neuronas	50
12.3. Análisis por inmunofluorescencia de filamentos de tau y PHFs	50
<b>13. Ensayos de viabilidad celular</b>	50
13.1. Incorporación de calceína y yoduro de propidio	50
13.2. Cuantificación celular mediante el uso del colorante azul de Coomassie R-250	51
13.3. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo y tinción de núcleos con DAPI	51
<b>14. Extracción de ácido ribonucleico (RNA)</b>	52
<b>15. Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)</b>	52
<b>16. Lentivirus</b>	53
16.1. Construcciones lentivirales	53
16.2. Producción de partículas lentivirales	55
16.3. Titulación del sobrenadante lentiviral	56
<b>17. Tratamiento estadístico de datos</b>	57
<b>Resultados</b>	59
<b>1. Identificación de quinonas en PHFs y cuerpos de Hirano</b>	61
1.1. Presencia de quinonas en PHFs aislados <i>ex vivo</i> de cerebros de enfermos de Alzheimer	61
1.2. Presencia de quinonas en cuerpos de Hirano presentes en cerebros post-mortem de enfermos de Alzheimer	62
<b>2. Estudio de la fosforilación, polimerización y agregación de la proteína tau <i>in vitro</i></b>	64
2.1. Caracterización del efecto de las quinonas como inductoras de la polimerización de la proteína tau	64
2.1.1. Efecto de quinonas sobre la polimerización de tau	65
2.1.2. Efecto de la dopamina quinona sobre la polimerización de tau	71
2.2. Mapeo de las regiones críticas de tau en la polimerización inducida por quinonas y estudio del papel de la fosforilación de estas regiones sobre la agregación	74
2.2.1. Mapeo de las regiones críticas en la polimerización de tau en presencia de quinonas	74
2.2.2. Papel del péptido VQIVYK en la fosforilación de tau. Relación entre fosforilación y agregación	79
<b>3. Mecanismos de ensamblaje de los PHFs y cuerpos de Hirano</b>	88
3.1. Caracterización de la estructura de los PHFs mediante una técnica nueva	88
3.2. Análisis de la elongación de los polímeros fibrilares de tau. Unión de tau en los extremos de los PHFs	92
3.3. Mecanismos de ensamblaje de los cuerpos de Hirano	95
<b>4. Estudio del efecto de quinonas sobre la agregación de tau en cultivos celulares</b>	96
4.1. Estudios de agregación de tau en cultivos de células similares a neuronas humanas obtenidos mediante la diferenciación del neuroblastoma SH-SY5Y	96
4.2. Estudios de agregación de tau en cultivos de células SH-SY5Y infectadas con el lentivirus GFP-Tau 42	100
<b>5. Estudio del efecto de las quinonas sobre la polimerización de los microtúbulos</b>	102
5.1. Efecto de las quinonas sobre la red de microtúbulos de células no neuronales	102
5.2. La adición de quinonas impide la polimerización de los microtúbulos <i>in vitro</i>	104
5.3. La adición de quinonas a neuronas en cultivo produce una reducción en la longitud de sus neuritas	106
<b>6. Estudio del efecto de compuestos que mimetizan el efecto de los glicosaminoglicanos sulfatados sobre la agregación de tau. Repercusión en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer</b>	107
6.1. Estudio del efecto del 3-APS sobre la agregación de tau	108
6.1.1. Efecto del 3-APS en células HEK293 que sobreexpresan tau de forma estable	108
6.1.2. Efecto del 3-APS sobre la polimerización de tau <i>in vitro</i>	111
6.1.3. Efecto del 3-APS en células de origen neuronal	112

---

6.2. Estudio del efecto de la taurina como inductor de la polimerización de tau	113
<b>Discusión</b>	117
<b>Presencia de quinonas en PHFs y cuerpos de Hirano</b>	120
<b>Polimerización y agregación de la proteína tau <i>in vitro</i>. Secuencias críticas</b>	120
<b>Fosforilación de la proteína tau</b>	123
<b>Ensamblaje de los PHFs y los cuerpos de Hirano</b>	124
<b>Estudios de agregación de tau en cultivos celulares. Efecto de las quinonas</b>	125
<b>Microtúbulos, quinonas y estrés oxidativo en la enfermedad de Alzheimer</b>	126
<b>Efecto de compuestos que impiden la agregación del péptido A<math>\beta</math> sobre la agregación y polimerización de la proteína tau</b>	129
<b>Conclusiones</b>	131
<b>Bibliografía</b>	135
<b>Anexo</b>	169

## LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Secciones de tejido teñidas mediante la técnica de impregnación argéntica descrita por MaxBielschowsky	3
Figura 2. Ovillos neurofibrilares, PHFs y SFs	7
Figura 3. Representación esquemática de los dominios funcionales de la isoforma de la proteína tau de mayor tamaño, presente en el SNC	9
Figura 4. Expresión de las diferentes isoformas de la proteína tau	11
Figura 5. Representación esquemática de los principales sitios de hiperfosforilación de la isoforma de mayor tamaño de la proteína tau y sus anticuerpos específicos correspondientes	14
Figura 6. Principales reacciones llevadas a cabo por las quinonas, cuyo efecto resulta toxico para la célula	19
Figura 7. Diagrama de secuencia de los principales mecanismos moleculares que producen toxicidad neuronal y disfunción sináptica en la enfermedad de Alzheimer	23
Figura 8. Procesamiento proteolítico de la APP y posible mecanismo de formación de fibrillas del péptido beta-amiloide	25
Figura 9. Mecanismos citotóxicos de las quinonas	30
Figura 10. Principales terapias en uso y en desarrollo, hoy en día, para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer	31
Figura 11. Purificación de tau 42 y del péptido tau 2R	41
Figura 12. Disección de cerebro de embrión de ratón	47
Figura 13. Esquema del vector pCMVdR8.74	53
Figura 14. Esquema del vector pMD2G	53
Figura 15. Esquema del vector pLV	54
Figura 16. Obtención de los productos de PCR necesarios para la obtención del fragmento GFPTau42	54
Figura 17. Obtención del vector pLVGFPTau42	55
Figura 18. Infección de células NIH-3T3 con el lentivirus GFP-Tau42	57
Figura 19. Detección de tau y coenzima Q <sub>0</sub> en PHFs de enfermos de Alzheimer	61
Figura 20. La quinona coenzima Q <sub>0</sub> está presente en los cuerpos de Hirano	62
Figura 21. Colocalización de actina y CoQ <sub>0</sub> en los cuerpos de Hirano	63
Figura 22. Colocalización parcial de tau y CoQ <sub>0</sub> en los cuerpos de Hirano	64
Figura 23. Agregación de tau en presencia de juglona	66
Figura 24. Agregación de tau en presencia de <i>p</i> -benzoquinona	67
Figura 25. La hidroquinona impide la agregación de tau provocada por la <i>p</i> -benzoquinona	68
Figura 26. Agregación de tau en presencia del coenzima Q <sub>0</sub>	69
Figura 27. Caracterización de los agregados de tau formados por unión covalente con el coenzima Q <sub>0</sub>	70
Figura 28. Localización de los sitios de unión de CoQ <sub>0</sub> en la molécula de tau	71
Figura 29. Polimerización de tau favorecida por la oxidación de la dopamina en presencia de hierro	73
Figura 30. Expresión de tau en diferentes áreas del cerebro	73
Figura 31. Polimerización de los tres péptidos que componen la tercera repetición de tau, en presencia de quinonas	75
Figura 32. Polimerización de las variantes de tau que pierden algunos residuos de la tercera repetición	76
Figura 33. Ensamblaje del péptido IIa y su variante, así como la segunda repetición	77
Figura 34. Ensamblaje del péptido VQIVYK y sus variantes modificadas	78
Figura 35. Tinción con tioflavina-S de los polímeros tau y la variante que pierde el péptido IIIa	79
Figura 36. Fosforilación de tau 3R y tau 3R $\Delta_{275-280}$ en células COS-7 transfectadas	81
Figura 37. La variante de tau 3R, tau 3R $\Delta_{275-280}$ , se une a los microtúbulos en menor proporción <i>in vitro</i> y en células COS-7 transfectadas	81
Figura 38. Los niveles de fosforilación de tau 3R aumentan tras la delección de los residuos 275 al 280	82
Figura 39. Identificación de los residuos fosforilados de tau y tau $\Delta_{VQIVYK}$ (tau 3R $\Delta_{306-311}$ ) por la GSK-3 $\beta$	83
Figura 40. Interacción del anticuerpo conformacional específico de Alzheimer Alz-50 con la variante tau 3R $\Delta_{275-280}$	84

Figura 41. Fosforilación de tau 3R y la variante tau 3R $\Delta_{275-280}$ en presencia de tioflavina-S	85
Figura 42. Ensamblaje de tau 3R en presencia de tioflavina-S	86
Figura 43. Fosforilación de tau 3R en presencia de los péptidos VQIVYK y 1/2R	87
Figura 44. Helicidad y tinción de los PHFs y SFs con tioflavina-S	89
Figura 45. Tinción de los PHFs con tioflavina-S al 0.01% en presencia de heparinasa I	90
Figura 46. Microscopia de fluorescencia de los polímeros de tau 3R ensamblados en presencia de quinonas	91
Figura 47. Fluorescencia de los polímeros fibrilares del péptido VQIVYK, de tau 3R y de la variante tau 3R $\Delta_{275-280}$	91
Figura 48. Caracterización de los PHFs mediante análisis por microscopía óptica de fluorescencia	92
Figura 49. Presencia de diferentes tipos de polímeros fibrilares aislados de cerebros de enfermos de Alzheimer	93
Figura 50. Caracterización de la proteína tau recombinante conjugada covalentemente con el colorante fluorescente Cy3 (tau-Cy3)	94
Figura 51. Análisis por microscopía óptica de fluorescencia de la unión de tau-Cy3 a los PHFs	94
Figura 52. Análisis de la unión de tau-Cy3 a los PHFs por microscopía electrónica	95
Figura 53. Formación de estructuras similares a los cuerpos de Hirano	96
Figura 54. Diferenciación de las células SH-SY5Y	97
Figura 55. Agregación de tau en células SH-SY5Y diferenciadas tratadas con Fe <sup>3+</sup> y dopamina	98
Figura 56. Efecto de quinonas sobre la viabilidad celular	99
Figura 57. Agregación de tau en células SH-SY5Y diferenciadas en presencia de benzoquinona	99
Figura 58. Eficiencia de la infección de células SH-SY5Y con el lentivirus GFP-Tau42	100
Figura 59. Agregación de tau en células SH-SY5Y infectadas con el lentivirus GFP-Tau42 tratadas con quinonas	101
Figura 60. Efecto de las quinonas en la red de microtúbulos de células en cultivo	103
Figura 61. Análisis del efecto de las quinonas sobre la viabilidad celular en células NIH-3T3	104
Figura 62. Polimerización de microtúbulos en presencia de quinonas	105
Figura 63. Efecto de las quinonas en cultivos primarios de neuronas de hipocampo	107
Figura 64. Efecto del 3-APS en células HEK 293 Tau	109
Figura 65. Agregación de tau en células HEK 293 Tau tratadas con 3-APS	109
Figura 66. Unión de tau a los microtúbulos en presencia de 3-APS	110
Figura 67. Efecto del 3-APS sobre los complejos de tau-actina	110
Figura 68. Polimerización de tau en presencia de 3-APS	111
Figura 69. Identificación del sitio de unión del 3-APS a tau mediante estudios de polimerización	112
Figura 70. Efecto del 3-APS en las células SH-SY5Y diferenciadas	113
Figura 71. Efecto de la taurina (2-AES) en el ensamblaje del péptido $\beta$ amiloide	114
Figura 72. La taurina promueve la polimerización de tau	115
Figura 73. Modelo propuesto de fosforilación y agregación de tau	124
Figura 74. Quinonas en la enfermedad de Alzheimer	128
Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados	40
Tabla 2. Anticuerpos secundarios utilizados	40
Tabla 3. Resumen de todos los oligonucleótidos utilizados como iniciadores para las distintas reacciones en cadena de la polimerasa (PCR)	52
Tabla 4. Estructura de las principales benzoquinonas utilizadas	65
Tabla 5. Estructura de las principales naftoquinonas utilizadas	65

## **Abreviaturas**

**2-AES:** *2-Aminoethanesulfonic acid* / Ácido 2-aminoetanosulfónico  
**3-APS:** *3-Amino-1-Propanesulfonic acid* / Ácido 3-amino-1-propanosulfónico  
**A $\beta$ :** *Amyloid  $\beta$ -peptide* / Péptido  $\beta$  amiloide  
**AIF:** *Apoptosis Inducing Factor* / factor inductor de apoptosis  
**AP2:** *Activator Protein 2* / Proteína activadora 2  
**Apaf-1:** *Apoptosis protease-activating factor-1* / factor de activación de proteasas apoptóticas 1  
**ApoE/APOE:** *Apolipoprotein E* / Apolipoproteína E (*gen/proteína*)  
**APP:** *Amyloid Precursor Protein* / Proteína precursora de amiloide  
**BCA:** *Bicinchoninic acid* / Ácido bicinconínico  
**BQ:** *Benzoquinone* / Benzoquinona  
**BSA:** *Bovine Serum Albumin* / Albumina de suero bovino  
**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  
**CHIP:** *Carboxyl terminus of the Hsp70-Interacting Protein* / Proteína que interacciona con el extremo carboxilo de la Hsp70  
**CKII:** *Casein Kinase II* / Caseína quinasa II  
**CoQ<sub>0</sub>:** *Coenzyme Q<sub>0</sub>* / Coenzima Q<sub>0</sub>  
**CTE:** Cadena Transportadora de Electrones  
**DAPI:** *4',6-Diamidino-2-Phenylindole* / 4',6-diamino-2-fenilindol  
**dbAMPC:** *dibutryl-cyclic Adenosine Monophosphate* / Dibutiril-adenosina monofosfato cíclico  
**DMSO:** *Dimethyl sulfoxide* / Dimetilsulfóxido  
**DNA:** *Deoxyribonucleic Acid* / Ácido desoxirribonucleico  
**eNFTs:** *extracellular Neurofibrillary Tangles* / Ovillos neurofibrilares extracelulares  
**FTDP-17:** *Frontotemporal Dementia and Parkinsonism linked to Chromosome 17* / Demencia frontotemporal con parkinsonismo asociada al cromosoma 17  
**FBS:** *Foetal Bovine Serum* / Suero fetal bovino  
**GAGs:** *Sphated glycosaminoglycans* / Glicosaminoglicanos sulfatados  
**GFP:** *Green Fluorescent Protein* / Proteína verde fluorescente  
**GSK-3:** *Glycogen Synthase Kinase-3* / Glucógeno sintasa quinasa-3  
**4-HNE:** *4-Hidroxy-2-Nonenal* / 4-hidroxi-2-nonenal  
**HBSS:** *Hank's Balanced Salt Solution* / Solución salina equilibrada de Hank  
**HQ:** *Hidroquinone* / Hidroquinona  
**Hsp:** *Heat shock protein* / Proteína de choque térmico  
**HSPGs:** *Heparan Sulfate Proteoglycans* / proteoglicanos heparan sulfato  
**JNK:** *c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal Kinase* / Quinasa c-Jun amino terminal  
**kDa:** *kilodalton* / kilo Dalton  
**kb:** kilobases  
**MAP:** *Microtubule Associated Protein* / Proteína asociada a microtúbulos  
**MAPK:** *Mitogen Activated Protein Kinase* / Proteína quinasa activada por mitógenos  
**MARK:** *MAP/microtubule Affinity-Regulating kinase* / Quinasa reguladora de afinidad entre MAPs/microtúbulos  
**MOI:** *Multiplicity Of Infection* / Multiplicidad de infección  
**mRNA:** *messenger Ribonucleic Acid* / Ácido ribonucleico mensajero  
**NFTs:** *Neurofibrillary Tangles* / Ovillos neurofibrilares  
**NMDA:** *N-Methyl-D-aspartic Acid* / N-metil-D-aspartato  
**PBS:** *Phosphate-Buffered Saline* / Solución salina de fosfato tamponada  
**PCR:** *Polymerase Chain Reaction* / Reacción en cadena de la polimerasa  
**PDPK:** *Proline Directed Protein Kinases* / Quinasas dirigidas por prolina  
**PSA:** *Peptidase A* / Peptidasa A  
**PFA:** *Paraformaldehyde* / paraformaldehído  
**PHFs:** *Paired Helical Filaments* / Filamentos apareados helicoidales  
**Pin-1:** *Peptidyl-prolyl isomerase 1* / Peptidil-prolil isomerasa 1  
**PKA:** *Protein Kinase A* / Proteína quinasa A  
**PKC:** *Protein Kinase C* / Proteína quinasa C  
**PMSF:** *Phenylmethylsulphonyl Fluoride* / Fluoruro de fenilmetilsulfonato  
**PP1:** *Protein Phosphatase 1* / proteína fosfatasa 1  
**PP2A:** *Protein Phosphatase 2A* / Proteína fosfatasa 2A  
**PP2B:** *Protein Phosphatase 2B* / Proteína fosfatasa dependiente de Ca<sup>2+</sup> 2B



**PP2C:** *Protein Phosphatase 2C* / Proteína fosfatasa 2C

**PS1:** *Presenilin 1* / Presenilina 1

**PS2:** *Presenilin 2* / Presenilina 2

**PSP:** *Progressive Supranuclear Palsy* / Parálisis supranuclear progresiva

**ROS:** *Reactive Oxygen Species* / Especies reactivas de oxígeno

**r.p.m.:** Revoluciones por minuto

**RT-PCR:** Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction / Transcripción reversa-Reacción en cadena de la polimerasa

**SAPK:** *Stress-Activated Protein Kinase* / Proteína quinasa activada por estrés

**SFs:** *Straight Filaments* / Filamentos rectos

**SNC:** Sistema Nervioso Central

**SNP:** Sistema Nervioso Periférico

**SOD:** *Superoxide Dismutase* / Superóxido dismutasa

**SORL1:** *Sortilin-Related receptor 1* / Receptor relacionado con Sortilina

**TCA:** Trichloroacetic Acid / Ácido tricloroacético

**UPS:** *Ubiquitin Proteasome System* / Sistema ubiquitina proteasoma

## Summary

The appearance of aberrant structures, in Alzheimer disease, like neurofibrillary tangles, senile plaques or Hirano bodies has been described.

Although the etiology of Alzheimer's disease is still incompletely understood it is thought that oxidative stress could play an important role in the onset and the progression of the disease. In addition to the oxidative stress promoted by amyloid  $\beta$  aggregates, mitochondria generate most of the reactive oxygen species produced during disease. Coenzyme Q is an important cofactor of mitochondrial bioenergetics and it has been directly involved, together with secondary metabolites obtained from xenobiotics metabolism, with aging related energetic changes. Quinones represent a class of intermediary metabolites that may produce cellular damage. The toxicity of quinones may take place through arylation reactions of important biomolecules like DNA or proteins. Alternatively, quinones, depending on the redox state, could exert prooxidant or antioxidant effects. On the other hand, it has been described that compounds like 4-hydroxi-2-nonenal, which are products of lipid peroxidation, could favour the assembly of aberrant structures like paired helical filaments present in neurofibrillary tangles. Compounds that are produced as a consequence of oxidative stress also may affect other microtubular proteins like tubulin.

Since it has been described the connection between oxidative stress and the assembly of aberrant structures, we wanted to study if quinones also could have the same effect on protein tau aberrant assembly and Hirano bodies formation.

First, we have identified the presence of quinones both in paired helical filaments and Hirano bodies. Once we have stated quinones may be involved in the formation of these aberrant structures that appear in Alzheimer disease, we have studied the effect of this molecules on tau polymerization or aggregation both *in vitro* and in cell cultures. On the other hand we have also tested if quinones could facilitate the formation of Hirano-like bodies *in vitro*.

Additionally, since microtubule network has been found affected in the onset and progression of Alzheimer disease we have studied the effect of quinones on microtubule network in cell cultures. We have observed that quinones could react with tubulin hampering microtubule polimerization. Thus, we propose that quinones produced by oxidative stress generated during Alzheimer disease, favour polymerization or aggregation of tau protein and prevent microtubule polymerization causing both disturbance on axonal transport and synaptic dysfunction.

Other well known inducers of tau aggregation are high molecular weight sulphated glycosaminoglycans, which also are known to favour the A $\beta$  peptide aggregation. Nowadays pharmaceutical companies are developing low molecular weight structural analogs of sulphated glycosaminoglycans to avoid the formation of A $\beta$  aggregates. One of these compounds is Tramiprosate (3-APS). This compound is able to interact with A $\beta$  peptide preventing its aggregation but until now, any research group was studied the effect of this small molecule on tau aggregation. Thus, and finally we have analyzed this interaction demonstrating that 3-APS facilitates aggregation of tau. In this way, also we have tested he effect of its structural analog, taurine, which may promote tau aggregation but in less extent.

In summary, our work demonstrates that tau protein modifications provoked by oxidative stress could explain, in part, what is occurring in Alzheimer disease and other tauopathies: its hyperphosphorylation and aggregation.

En la enfermedad de Alzheimer se ha descrito la aparición de estructuras aberrantes, entre las que se encuentran los ovillos neurofibrilares, las placas seniles y los cuerpos de Hirano.

Aunque la etiología de la enfermedad de Alzheimer aún esta por establecerse, el estrés oxidativo puede ser una de las causas más decisivas tanto en el inicio como en la progresión de la enfermedad. Además del estrés oxidativo promovido por los agregados del péptido  $\beta$  amiloide, en la mitocondria se van a generar la mayor parte de especies reactivas de oxígeno (ROS). El coenzima Q es un importante cofactor en la bioenergética mitocondrial que ha sido implicado directamente en las alteraciones energéticas relacionadas con el envejecimiento junto a potenciales metabolitos secundarios obtenidos de la metabolización de xenobióticos. Las quinonas representan a una clase de intermediarios con gran capacidad para provocar daños celulares. La toxicidad puede provenir por reacciones de alquilación o arilación de moléculas cruciales como son las proteínas o el DNA. Alternativamente el par quinona/hidroquinona puede considerarse como prooxidante o antioxidante. Por otra parte se ha descrito que compuestos resultantes de la peroxidación lipídica como el 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), pueden favorecer el ensamblaje de estructuras aberrantes, como son los filamentos apareados helicoidales presentes en los ovillos neurofibrilares. Los compuestos producidos como consecuencia del estrés oxidativo pueden también afectar a otras proteínas microtubulares como la tubulina.

Dada la relación entre estrés oxidativo y el ensamblaje de estructuras aberrantes hemos querido estudiar si las quinonas pueden afectar al ensamblaje de la proteína tau y los cuerpos de Hirano.

En primer lugar hemos identificado la presencia de quinonas tanto en los filamentos apareados helicoidales como en los cuerpos de Hirano. Una vez que hemos constatado que las quinonas pueden estar implicadas en la formación de estas estructuras aberrantes que aparecen en la enfermedad de Alzheimer, estudiamos el efecto que pueden tener, por un lado, sobre la polimerización o agregación de la proteína tau tanto *in vitro* como en cultivos celulares y, por otro, si estos derivados quinónicos podrían, de algún modo, facilitar la formación de los cuerpos de Hirano *in vitro*.

Además, hemos estudiado el efecto que podrían tener las quinonas sobre la red de microtúbulos en cultivos celulares, puesto que también dicha red se encuentra afectada en la enfermedad de Alzheimer. Hemos observado que las quinonas reaccionan con la tubulina impidiéndose así la polimerización de los microtúbulos. Por tanto podemos decir que las quinonas producidas por el estrés oxidativo, generado durante la enfermedad de Alzheimer, además de favorecer la agregación y polimerización de la proteína tau van a impedir la polimerización de los microtúbulos, lo que va a provocar una alteración del transporte axonal y una disfunción sináptica.

Otros inductores de la agregación de tau, los glicosaminoglicanos sulfatados de alto peso molecular, se sabe que también favorecen la agregación del péptido  $\beta$  amiloide. Actualmente se están desarrollando análogos estructurales de los sulfoaminoglicanos de bajo peso molecular para impedir que se formen los agregados del péptido  $\beta$  amiloide. Uno de estos compuestos es el tramiprosato (3-APS). Este compuesto parece impedir la agregación del péptido  $\beta$  amiloide aunque, hasta ahora, ningún grupo de investigación se ha planteado qué efecto puede ejercer sobre la agregación de tau. Por tanto, y en último lugar, hemos analizado dicha interacción, demostrando que el 3-APS favorece la agregación de tau, al igual que un análogo estructural como es la taurina, aunque ésta última con una menor potencia.

Resumiendo, nuestro trabajo demuestra que las modificaciones que experimenta la proteína tau como consecuencia del estrés oxidativo pueden explicar, en parte, lo que sucede en la enfermedad de Alzheimer y otras tauopatías: su hiperfosforilación y su agregación.

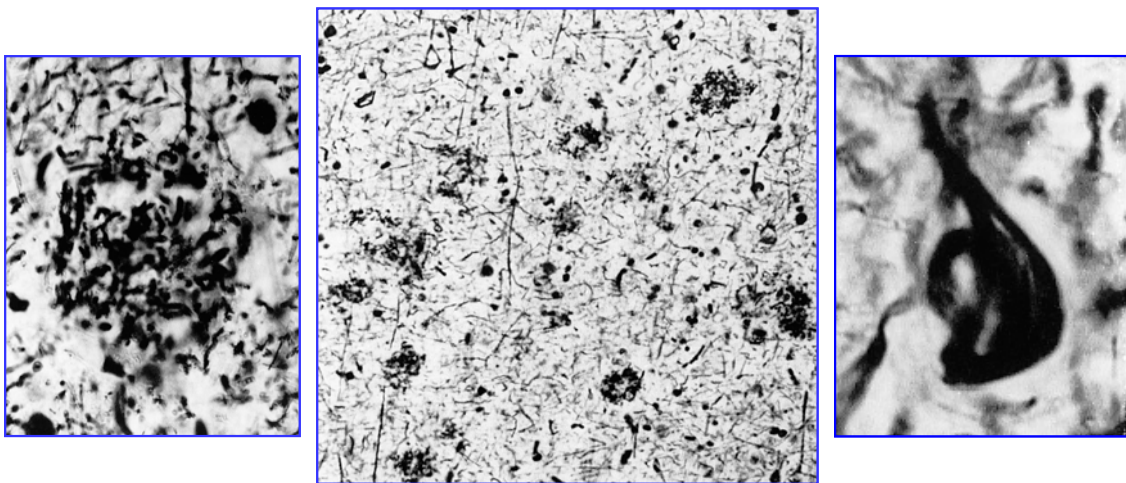
# Introducción

## 1. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

### 1.1. Descubrimiento de la enfermedad de Alzheimer

El 3 de noviembre de 1906 el neurólogo alemán Alois Alzheimer presentó un trabajo en el que se describían, por primera vez, las características clínicas y neuropatológicas de una nueva forma de demencia. Dicha demencia sería posteriormente bautizada con su apellido por sugerencia de Emil Kraepelin, neurólogo y director de la clínica psiquiátrica de la Universidad de Ludwing-Maximilians en Munich, donde ambos trabajaron juntos por un tiempo (Goedert & Ghetti, 2007). El trabajo se publicó de forma breve en 1907 y de forma más detallada y extensa en 1911.

En el trabajo de 1907 (Alzheimer, 1907; Alzheimer et al., 1995) se relataba la descripción clínico-patológica del caso de Auguste Deter, la cual presentaba, a los 51 años de edad, síntomas clínicos como desorientación, pérdida de memoria, déficit perceptivo, afasia, apraxia, agnosia y conductas anómalas, falleciendo a los 56 años. En la corteza cerebral de Auguste Deter, Alois Alzheimer pudo observar, mediante la técnica de impregnación argéntica descrita por Max Bielschowsky, la aparición de abundantes ovillos neurofibrilares y placas neuríticas (Graeber et al., 1998; Maurer et al., 1997) (**Figura 1**). En dicho trabajo (Alzheimer, 1907; Alzheimer et al., 1995), Alois Alzheimer describía los ovillos neurofibrilares como “extraños cambios de las neurofibrillas”. Posteriormente, en 1911 (Alzheimer, 1911; Graeber et al., 1997) Alois Alzheimer se refirió a los ovillos neurofibrilares como “cambios fibrilares extraños en las células nerviosas”.



**Figura 1.** Secciones de tejido teñidas mediante la técnica de impregnación argéntica descrita por Max Bielschowsky. En la corteza de Auguste D. se puede observar la presencia de numerosos ovillos neurofibrilares y placas neuríticas (centro). En las imágenes situadas a los lados, se pueden ver, a mayor aumento, una placa neurítica (izquierda) y un ovillo neurofibrilar (derecha) (Graeber et al., 1998).

La otra marca histopatológica de la enfermedad, las placas seniles, se describió por primera vez en 1892 por Blocq y Marinesco, en el cerebro de una paciente anciana afectada de epilepsia (Blocq & Marinesco, 1892). Más tarde, en 1898, Redlich describió las placas como “esclerosis miliar” en dos casos de demencia senil (Redlich, 1898). A esta descripción, le siguió la de Fischer en 1907 que describía placas en 12 de 16 casos de demencia senil. En este mismo trabajo no se describió presencia alguna de placas en cerebros de controles sanos, ni en casos de parálisis progresiva o casos de psicosis funcional (Fischer, 1907). Fischer afirmó que las placas eran una característica específica de demencia senil.

Alois Alzheimer, sin embargo, describió una nueva enfermedad, una demencia que combinaba la aparición de placas seniles y ovillos neurofibrilares junto con una notoria pérdida de células nerviosas en la corteza cerebral. Emil Kraepelin describió en 1910 la enfermedad como una demencia presenil, en la octava edición del libro titulado “Psiquiatría”. En él, Emil Kraepelin propuso llamar a esta enfermedad “Enfermedad de Alzheimer” (Kraepelin, 1910). Posteriormente, Francesco Bonfiglio y Graetano Perusini describieron varios casos que parecían ser similares a los descritos por Alois Alzheimer. Sin embargo, el artículo más clarividente fue el publicado por Alois Alzheimer en 1911 (Alzheimer, 1911; Graeber et al., 1997), ya que contenía una discusión sobre la posible relación entre placas y ovillos y su relevancia en el desarrollo de la enfermedad.

En los últimos 20 años, se ha descrito que la aparición de placas seniles parece estar relacionada con la edad, mientras que la aparición de ovillos neurofibrilares esta relacionada con el grado de demencia (Arriagada et al., 1992; Braak & Braak, 1991; Delacourte et al., 1999).

## **1.2. Marcas histopatológicas y características clínicas de la enfermedad de Alzheimer**

La enfermedad de Alzheimer es la causa más común de demencia en edad avanzada; afecta al 7-10% de los individuos mayores de 65 años y, posiblemente, al 40% de aquellos que sobrepasan los 80. La mayoría de los casos de enfermedad de Alzheimer son esporádicos (95%), mientras que solo un 5% tiene un patrón de herencia dominante (enfermedad de Alzheimer familiar). La enfermedad de Alzheimer de inicio temprano, generalmente con un componente familiar, comienza antes de los 65 años de edad. Sin embargo, la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío, en su mayor parte esporádica, aparece después de los 65 años de edad. Se puede decir que el mayor factor de riesgo, en los casos de la forma esporádica es, sin duda, la edad.

En las formas familiares se han identificado diferentes genes cuyas mutaciones conducen a la acumulación del péptido  $\beta$  amiloide (péptido A $\beta$ , del inglés “amyloid  $\beta$ -peptide”), siendo este el principal componente de las placas neuríticas o seniles (Bertram et al., 2007; Borenstein et al., 2006; Cruts & Van Broeckhoven, 1998; Gomez-Isla et al., 1999; Levy-Lahad & Bird, 1996; Selkoe, 2001; Serretti et al., 2005; Van Broeckhoven, 1995). Los genes asociados como factor causal de la enfermedad de Alzheimer familiar descritos hasta el momento son:

- El gen de la proteína precursora de amiloide (APP, del inglés “Amyloid Precursor Protein”) localizado en el cromosoma 21. La sobreexpresión, por una dosis génica elevada, de la APP en el síndrome de Down casi siempre conduce a la enfermedad de Alzheimer temprana (Selkoe, 2001).

- El gen de la presenilina 1 (PS1, del inglés “presenilin 1”) localizado en el cromosoma 14.

- El gen de la presenilina 2 (PS2, del inglés “presenilin 2”), localizado en el cromosoma 1.

Por otro lado, se ha descrito que la presencia del alelo e4 de la apolipoproteína E (ApoE4), localizado en el cromosoma 19, es un potente factor de susceptibilidad para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (Cedazo-Minguez & Cowburn, 2001; Strittmatter et al., 1993). De hecho, la presencia de este alelo es el mayor factor de riesgo para sufrir una forma esporádica de la enfermedad (Raber et al., 2004). La proteína APOE es un constituyente de varios tipos de lipoproteínas, y juega un papel muy importante en la distribución y metabolismo del colesterol y los triglicéridos en diferentes

órganos y tipos celulares del cuerpo humano. APOE es el principal determinante en el reconocimiento y captación de las lipoproteínas a través de receptores como el de lipoproteínas de baja densidad o el de lipoproteínas de muy baja densidad (Cedazo-Minguez & Cowburn, 2001; Beffert et al., 1998). En el cerebro los astrocitos y la microglia son las principales células productoras de APOE. La síntesis de esta proteína en el sistema nervioso central aumenta tras una lesión y parece que dicha proteína puede jugar un papel importante en mecanismos de regeneración neuronal. Las neuronas también producen APOE, aunque en menor medida (Beffert et al., 1998). No se conoce exactamente el mecanismo mediante el cual la APOE4 aumenta la fibrilación del péptido A $\beta$  y favorece la formación de las placas. Probablemente APOE4 impide una correcta eliminación del péptido A $\beta$ .

También se relaciona la presencia de un polimorfismo cerca o dentro del gen que codifica la proteína  $\alpha$ 2-macroglobulina en cuanto a la predisposición de padecer la enfermedad de Alzheimer (Blacker et al., 1998).

Recientemente se ha descrito que el receptor SORL1 (del inglés, "Sortilin-related receptor 1") se encuentra asociado genéticamente con la enfermedad de Alzheimer (Rogaeva et al., 2007). Estudios previos ya habían relacionado la pérdida de este receptor con la enfermedad de Alzheimer (Scherzer et al., 2004) y habían descrito cómo este receptor puede regular el procesamiento de la APP y la producción del A $\beta$  (Andersen et al., 2005; Offe et al., 2006).

Además, varios estudios han descrito otros genes candidatos que pudieran estar implicados en el desarrollo de la forma esporádica de la enfermedad de Alzheimer (Kehoe et al., 1999), pero ninguno de ellos se ha confirmado con certeza (Blomqvist et al., 2006). Así mismo, el colesterol, según diferentes estudios (Frears et al., 1999; Howland et al., 1998; Notkola et al., 1998), puede jugar un papel importante en esta enfermedad. Hace tiempo, se observó que personas con diabetes tipo II tienen el doble de probabilidad de sufrir enfermedad de Alzheimer (Ott et al., 1999).

Por otro lado, las características clínicas de la enfermedad de Alzheimer son, además del deterioro episódico de la memoria, la afasia (pérdida del habla), apraxia (imposibilidad de realizar movimientos coordinados) y agnosia (pérdida de la facultad de reconocer a personas o cosas), sumado a estos se da una reducida capacidad de juicio, de toma de decisiones y de orientación (Cummings, 2004).

El incremento de la población con edad avanzada en los últimos años ha hecho que aumente la incidencia de esta enfermedad. En la actualidad no se dispone de marcadores biológicos específicos para determinar los tipos de demencia, por ello el diagnóstico neuropatológico después de la muerte es crucial para determinar el diagnóstico definitivo de un paciente que padece un síndrome neurológico de demencia tipo Alzheimer.

Esta enfermedad se caracteriza, desde el punto de vista neuropatológico, por la presencia de varios tipos de lesiones morfológicas cerebrales, ninguna de las cuales es específica. A nivel macroscópico se pueden observar alteraciones generalmente simétricas y difusas de los giros cerebrales, que se evidencia en la disminución del espesor de las circunvalaciones, aumento en la profundidad de los surcos, dilatación del sistema ventricular y disminución del peso y volumen cerebral. La atrofia levemente asimétrica es menos frecuente.



La atrofia afecta a los lóbulos temporales (más frecuentemente), frontales, parietales y occipitales. Además, secciones realizadas a través de los hemisferios cerebrales revelan un adelgazamiento de la lámina cortical y dilatación simétrica del sistema ventricular. Por otra parte, estudios neuroquímicos y neuropatológicos indican que el cuadro clínico de la enfermedad de Alzheimer se asocia a una vulnerabilidad de determinados circuitos neuronales, y que dicha afectación compromete las poblaciones neuronales en el núcleo amigdalino, hipocampo, tálamo anterior, neocorteza, sistema colinérgico del núcleo basal de Meynert y sistema monoaminérgico del tronco cerebral. En la corteza, los cambios degenerativos afectan tanto a las grandes neuronas piramidales de las capas III y V como a varias poblaciones de interneuronas, algunas de las cuales utilizan somatostatina o corticotropina como transmisores. En el hipocampo y el lóbulo temporal medial, las alteraciones ocurren en neuronas piramidales, particularmente en las de la corteza entorrinal y las áreas CA1 y CA2 del hipocampo. La consecuencia fundamental de todas estas lesiones es la disminución de interacciones sinápticas de ciertas regiones cerebrales y la pérdida neuronal, que puede llegar a ser del orden del 30-40% en neocorteza, sobre todo en enfermos en los que el comienzo de la enfermedad fue temprano. Este hecho se asocia con astrogliosis y espongiosis, que queda limitada a las capas altas de la corteza cerebral. Relacionada topográficamente con las placas neuríticas, además de una proliferación de astrocitos reactivos, existe una activación microglial. Esto último ha llevado a especular sobre su papel amiloidogénico; a esto cabe añadir que la microglia activada por  $\beta$ -amiloide puede dar lugar a la secreción de citoquinas, tales como interleuquinas y a proteasas extracelulares, que son potencialmente neurotóxicas. Todas estas zonas afectadas en la enfermedad de Alzheimer están implicadas en los mecanismos que gobiernan la memoria y las emociones (Damasio, 1989). Por el contrario, las cortezas motora y sensitiva no parecen verse alteradas, permaneciendo intactas las funciones de este tipo, incluso en los estadios más avanzados de la enfermedad (Adams & Victor, 1993).

A nivel microscópico, la patología incluye la aparición de ovillos neurofibrilares, placas seniles o neuríticas, depósitos de amiloide en vasos sanguíneos y menínges, degeneración gránulo-vacuolar en neuronas piramidales del hipocampo, gliosis reactiva, aumento de las células de la microglia y acúmulos de lipofuscina. Además de todas estas marcas histopatológicas se ha descrito la presencia de los llamados cuerpos de Hirano (Hirano, 1994). Los cuerpos de Hirano son inclusiones citoplasmáticas descritas en una variedad de enfermedades neurodegenerativas que producen lesiones persistentes, caracterizadas por la presencia de filamentos de actina y otras proteínas asociadas, entre las que se encuentra la proteína tau (Galloway et al., 1987; Maciver & Harrington, 1995). En la enfermedad de Alzheimer se ha descrito la aparición de un mayor número de cuerpos de Hirano en comparación con individuos controles (Gibson & Tomlinson, 1977). La aparición de estos cuerpos de Hirano se ha observado principalmente en neuronas de hipocampo. Se ha identificado también en los cuerpos de Hirano la presencia de productos de glicación avanzada, que son modificaciones postraduccionales que contribuyen a la formación de depósitos de proteína insolubles como los ovillos neurofibrilares o las placas de  $\beta$ -amiloide. Estas observaciones sugieren que la formación de los productos de glicación avanzada y entrecruzamientos de proteínas intracelulares pueden estar ocurriendo en estadios tempranos durante la degeneración neuronal (Munch et al., 1998).

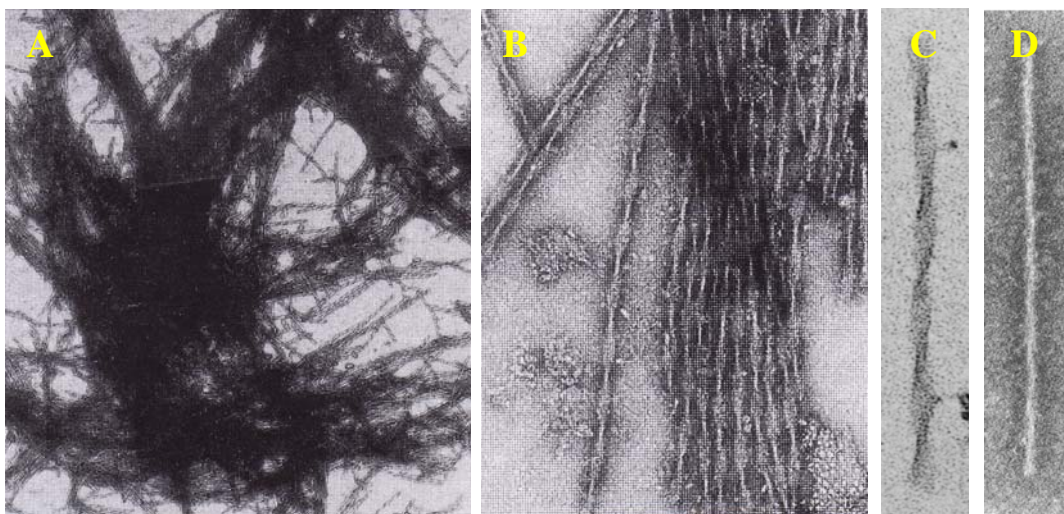
## 2. OVILLOS NEUROFIBRILARES, FILAMENTOS APAREADOS HELICOIDALES Y LA PROTEINA TAU

### 2.1. Ovillos neurofibrilares y filamentos apareados helicoidales

Hubo que esperar hasta la década de los 60 para que las dos principales marcas histopatológicas de la enfermedad (los ovillos neurofibrilares y las placas seniles), descritas a principio de siglo por Alois Alzheimer, pudieran observarse al microscopio electrónico. Así, se pudieron observar secciones de tejido con el fin de estudiar con más detalle la estructura de los ovillos neurofibrilares (NFTs, del inglés “Neurofibrillary Tangles”).

Se observaron haces de filamentos citoplasmáticos anormales en el cuerpo de células nerviosas y en sus prolongaciones (Kidd, 1963; Kidd, 1964; Terry, 1963; Terry et al., 1964). Estos haces de filamentos no unidos a membranas, forman los NFTs que ocupan una gran parte del citoplasma perinuclear. Estos filamentos permanecen tras la muerte neuronal, en el espacio extracelular dando lugar a los ovillos neurofibrilares extracelulares (eNFTs, del inglés “extracellular Neurofibrillary Tangles”, también conocidos como ovillos neurofibrilares fantasma, del inglés “Ghost NFTs” (Cras et al., 1995; Fukutani et al., 1995)). Tanto los NFTs como los eNFTs se encuentran, fundamentalmente, en la corteza entorrinal (lámina II y IV), hipocampo y amígdala. La región más vulnerable es la corteza entorrinal, seguida de CA1/subículo, amígdala y de la corteza asociativa (Arriagada et al., 1992).

En 1963, Michael Kidd describió la naturaleza de los filamentos que previamente habían sido identificadas como agrupaciones ordenados en haces (**Figura 2A**). La gran mayoría parecían consistir en dos filamentos apareados en forma helicoidal uno sobre el otro (PHFs, del inglés “Paired Helical Filaments”), con una longitud entre los entrecruzamientos, o periodicidad, de entre 65-80 nm y un grosor de entre 10-30 nm (**Figura 2B y 2C**) (Kidd, 1963). Más tarde, en 1968, Hirano y colaboradores (Hirano et al., 1968) describieron otro grupo de filamentos, los filamentos rectos (SFs, del inglés “Straight filaments”) que se encontraban en menor proporción junto con los PHFs. Este tipo de filamentos poseen un grosor menor, de unos 15 nm, y no parecen tener la morfología helicoidal (**Figura 2D**).



**Figura 2. Ovillos neurofibrilares, PHFs y SFs.** Un ovillo neurofibrilar (A), PHFs (B, C) y SF visualizados por microscopía electrónica de transmisión, después de ser aislados de cerebros de enfermos de Alzheimer, y de ser sometidos a tinción negativa (Wischik et al., 1997)

En la década de los 80, después de que Michael Kidd y el grupo de Asao Hirano describieran los filamentos, se propuso por primera vez su composición bioquímica. Estudios inmunológicos identificaron varias proteínas asociadas a los filamentos (PHFs y SFs) (Brion et al., 1985; Delacourte & Defossez, 1986; Grundke-Iqbal et al., 1986a; Kosik et al., 1984; Kosik et al., 1986; Masters et al., 1985; Mori et al., 1987; Nukina & Ihara, 1983; Perry et al., 1987; Wolozin et al., 1986; Wood et al., 1986; Yen et al., 1983). Finalmente y tras varias investigaciones, se pudo afirmar que los filamentos estaban compuestos principalmente por la proteína tau (Goedert et al., 1988; Lee et al., 1988; Wischik et al., 1988a; Wischik et al., 1988b), proteína que tras ser purificada era capaz de autoensamblarse *in vitro* formando polímeros fibrilares similares a los PHFs (Montejo de Garcini et al., 1988).

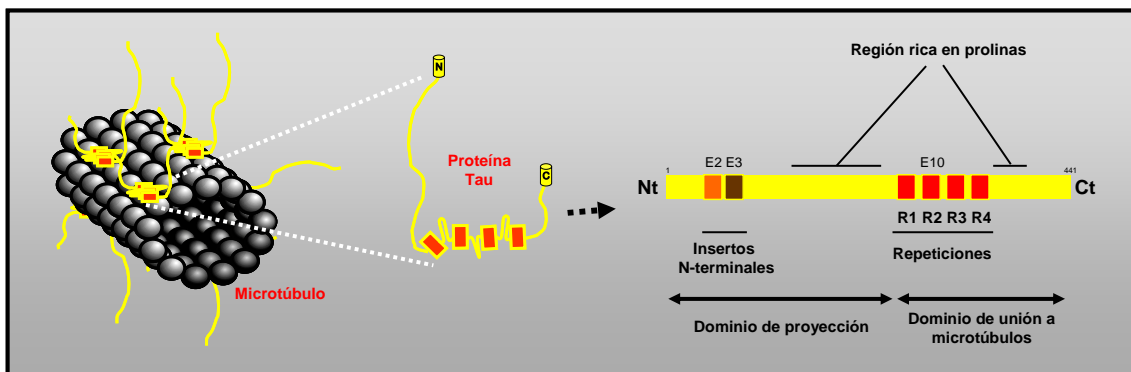
Mediante electroforesis en gel de acrilamida/bis-acrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), los PHFs purificados a partir de cerebros de enfermos de Alzheimer dan lugar a tres bandas mayoritarias de pesos moleculares aparentes de 60, 64 y 68 kDa, así como otra minoritaria a la altura de 72 kDa. En su conjunto, dicho patrón de bandas se conoce como PHF-tau (Greenberg & Davies, 1990). Cuando las muestras que contienen los PHFs se tratan con fosfatasa alcalina y se analiza por electrotransferencia e inmunodetección, aparecen seis bandas en vez de las cuatro previamente mencionadas. Estas bandas se corresponden con las seis isoformas mayoritarias de la proteína tau (Goedert & Jakes, 1990). Todas estas bandas son reconocidas tanto por anticuerpos específicos para la proteína tau, como por anticuerpos que reconocen su forma fosforilada. La importancia de la hiperfosforilación había sido descrita previamente (Grundke-Iqbal et al., 1986b).

## **2.2. La proteína tau y las tauopatías.**

La proteína tau se descubrió casi simultáneamente en Estados Unidos y en Europa por los grupos de Kirschner (Cleveland et al., 1977a; Cleveland et al., 1977b; Weingarten et al., 1975) y de Nuñez (Fellous et al., 1977). Se aisló por primera vez como una proteína asociada a microtúbulos (MAP, del inglés “Microtubule Associated Protein”) que facilitaba la polimerización de la tubulina, al igual que otras MAPs como MAP1A, MAP1B y MAP2 (Shelanski et al., 1973). La unión de tau a los microtúbulos se produce mediante los dominios de unión a tubulina. Estos dominios están compuestos por tres o cuatro secuencias repetidas de 31 ó 32 aminoácidos (conocidos como repeticiones) localizadas en la región central cercana al extremo carboxilo terminal de la molécula de tau (Goedert et al., 1989b; Himmler et al., 1989; Lee et al., 1988). A ambos lados de estos dominios, se encuentran dos regiones ricas en prolinas que presentan residuos de serina y treonina que al fosforilarse afectan a la capacidad de unión de tau a los microtúbulos. Además de los dominios de unión a tubulina, en el extremo amino terminal, podemos encontrar uno o dos insertos que contienen secuencias ricas en aminoácidos ácidos. Existen dos isoformas que no presentan ningún inserto en el extremo amino terminal. Se cree que el extremo amino pueda ser crucial en la estabilización y organización de ciertos tipos de axones (Buee et al., 2000) (**Figura 3**) y puede estar implicado en la generación de conformaciones patológicas que favorecen la polimerización de tau (Gamblin et al., 2003a). Por el contrario, el extremo carboxilo terminal de la proteína tau inhibe el proceso de polimerización o agregación, inhibición que se puede revertir parcialmente por fosforilación y completamente por truncación (Abraha et al., 2000).

La proteína tau se expresa predominantemente en células nerviosas, en las que promueve la polimerización y estabilización de los microtúbulos (Drubin & Kirschner, 1986). Tau es una proteína citosólica que se encuentra principalmente en los axones de las neuronas, aunque puede aparecer asociada a la membrana celular (Arrasate et al., 2000; Brandt et al., 1995; Maas et al., 2000). La proteína tau es importante en neurogénesis, mantenimiento y transporte axonal.

De igual forma que en la enfermedad de Alzheimer, se han encontrado polímeros compuestos de tau hiperfosforilado en otras enfermedades neurológicas como son: la demencia frontotemporal con parkinsonismo asociada al cromosoma 17 (FTDP-17, del inglés “Frontotemporal dementia linked to chromosome 17”), degeneración corticobasal, parálisis supranuclear progresiva, demencia pugilística, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C y el síndrome de Down entre otras (Buee et al., 2000; Lee et al., 2001; Tolnay & Probst, 1999). A estas enfermedades se les ha llamado en conjunto “Tauopatías”. A pesar de presentar diferentes manifestaciones fenotípicas, disfunciones cerebrales y degeneración, todas presentan inclusiones filamentosas de tau que, junto con la ausencia de otras anomalías neuropatológicas específicas, parece indicar que la proteína tau hiperfosforilada puede estar implicada en el desarrollo temprano de estas enfermedades. De hecho, se han descubierto mutaciones en el gen de tau en la FTDP-17 que evidencian que las anomalías de tau por sí solas son suficientes para causar la enfermedad (Foster et al., 1997; Hutton et al., 1998; Poorkaj et al., 2002; Spillantini et al., 1998).



**Figura 3. Representación esquemática de los dominios funcionales de la isoforma de la proteína tau de mayor tamaño, presente en el SNC.** El dominio de proyección (llamado así por proyectarse desde la superficie de los microtúbulos, para así interactuar con otros elementos del citoesqueleto y de la membrana celular), incluye una región rica en aminoácidos ácidos y otra rica en prolinas. Se cree que mediante este dominio la proteína tau es capaz de interactuar con otras proteínas como la fosfolipasa C- $\gamma$  y distintas quinasas Src. El dominio de unión a microtúbulos regula el ritmo de polimerización de los microtúbulos y los estabiliza. Este dominio está también implicado en la unión con otras proteínas como la proteína fosfatasa 2A o la presenilina 1.

## 2.2.1. Síntesis y degradación de la proteína tau. Implicación en tauopatías.

### 2.2.1.1. Síntesis de la proteína tau

El gen de tau está posicionado en el brazo largo del cromosoma 17, en la banda q21, y contiene 16 exones que abarcan aproximadamente unas 100 kb. Antes del primer exón hay una región que contiene sitios de unión consenso para factores de transcripción como el SP1. Ya que tau es una proteína principalmente neuronal, se ha propuesto la presencia de factores neuronales específicos implicados en la transcripción del gen de tau como es el factor AP2 (Sadot et al., 1996). Por otro lado, se ha descrito

recientemente la presencia de moléculas de ácido ribonucleico que pueden actuar como genes antisentido que regulen la expresión de tau (D'Souza et al., 2006).

El gen de tau se transcribe dando lugar a un RNA nuclear que, por procesamiento alternativo, origina diferentes especies de mRNA, las cuales se traducen en las diferentes isoformas de tau. El transcrito primario de tau contiene 16 exones (**Figura 4**), dos de los cuales no están presentes en ningún mRNA del SNC humano y son específicos de isoformas de tau del SNP. En el SNC, el procesamiento alternativo de los exones 2, 3 y 10 del gen de tau, origina 6 mRNAs (Goedert et al., 1989a; Goedert et al., 1989b; Himmler, 1989): (2+3-10-; 2+3-10-; 2+3+10-; 2-3-10+; 2+3-10+; 2+3+10+) (**Figura 4**). En el SNP se sintetiza un mRNA de tau que incluye el exón 4A, cuya traducción da lugar a una isoforma de unos 100 kDa conocida como “big tau” (Couchie et al., 1992; Goedert et al., 1992). El exón 4A se encuentra en bovinos, humanos y roedores con un alto grado de homología. Tampoco se ha descrito en humanos mRNAs con el exón 8, solo se han descrito en cerebros de bovino y mono rhesus (Himmler, 1989; Nelson et al., 1996).

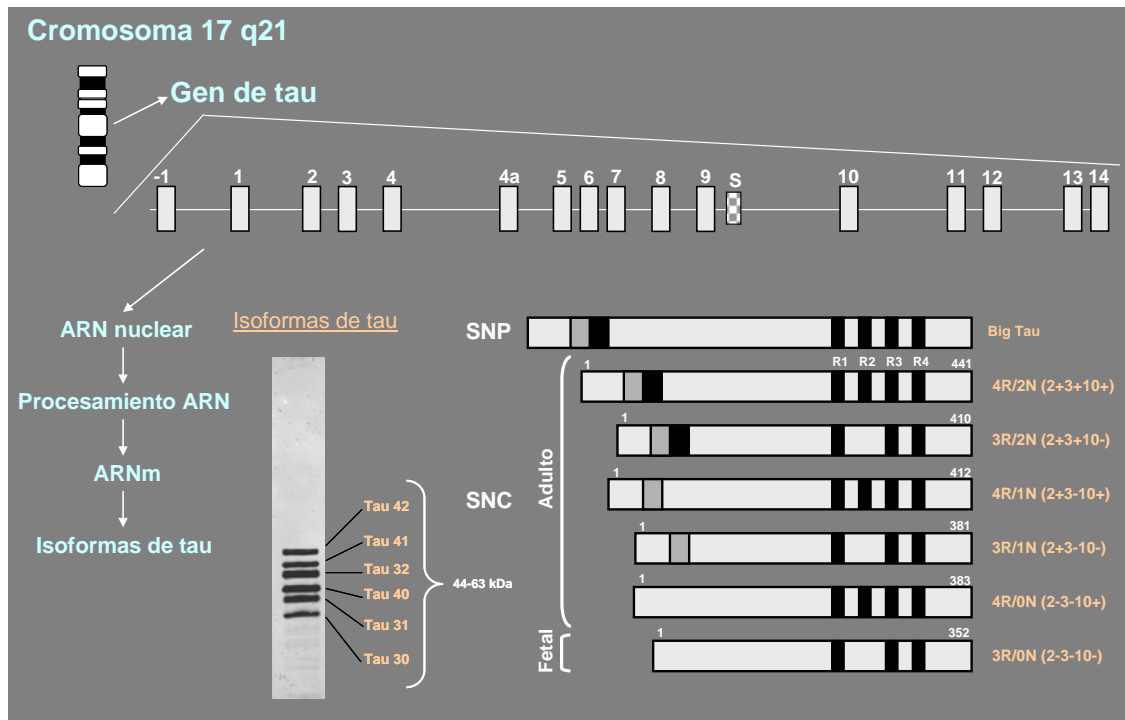
El exón -1 forma parte del promotor y se transcribe, pero no se traduce. Los exones 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 y 13 son constitutivos. El exón 14 se encuentra en el mRNA, pero no en la proteína traducida. El exón 3 nunca aparece independientemente del 2. Por otro lado, el exón 10 codifica una de las regiones de la proteína tau involucrada en la unión con los microtúbulos (segunda repetición). El procesamiento alternativo de este exón produce isoformas con 3 (tau 3R) ó 4 (tau 4R) repeticiones de la región de unión a microtúbulos (**Figura 4**). Además, en pollo aparece una región extra de unión (tau 5R) (Yoshida & Goedert, 2002).

Recientemente se han descrito mRNAs de tau humano que contienen el exón 6 (Luo et al., 2004). Al parecer se encuentran presentes dos sitios adicionales de procesamiento alternativo en la región 3' dentro de este exón y la traducción de estos mRNAs daría lugar a formas truncadas de tau que carecen del dominio de unión a microtúbulos.

La expresión de las distintas isoformas de tau es característica durante el desarrollo del cerebro. Así, las isoformas que carecen del exón 10 se encuentran en estadios del desarrollo temprano o en determinados tipos celulares como las células granulares del giro dentado del hipocampo. Se han estudiado con detalle los factores que determinan el procesamiento alternativo del exón 10 (D'Souza & Schellenberg, 2000; D'Souza & Schellenberg, 2002). Recientemente, se ha descubierto una forma de regulación del procesamiento del exón 10 mediante la fosforilación de factores de procesamiento, como la proteína SC35. La glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3, del inglés “Glycogen Synthase Kinase 3”) fosforila y regula este factor de procesamiento, por lo que esta quinasa parece jugar un papel importante en el procesamiento del exón 10 (Hernández et al., 2004c).

La contribución de las isoformas de tau en el desarrollo de tauopatías es importante ya que varias de las mutaciones de tau que causan la FTDP-17 afectan al procesamiento del exón 10, incrementando la proporción de las isoformas 4R respecto a las 3R. Esto se debe principalmente a mutaciones intrónicas que dan lugar a una expresión forzada del exón 10 (Grover et al., 1999; Heutink, 2000; Hutton et al., 1998; Spillantini et al., 1998; Varani et al., 1999). Por otra parte, se ha descrito que mutaciones que dan lugar a la delección de la lisina 280 producen un reducido procesamiento del exón 10 (Rizzu et al., 1999), mientras que la mutación E342V puede afectar al procesamiento de los exones 2 y 3 (Lippa et al., 2000).

Esto contrasta con lo que ocurre en la enfermedad de Pick, en la que los filamentos de tau están compuestos principalmente de isoformas de tau con tres repeticiones (Sergeant et al., 1997). En la enfermedad de Alzheimer no se han observado alteraciones en las isoformas de tau. Sin embargo, se ha descrito que se encuentra aumentada significativamente la cantidad de mRNAs de isoformas de tau que incluyen el exón 10 en diferentes áreas afectadas del cerebro (Glatz et al., 2006). Por tanto, cabe especular que un desequilibrio entre las isoformas de tau, y probablemente el tipo de neurona implicada, sea relevante para el desarrollo de una tauopatía específica (Morris et al., 1999).



**Figura 4. Expresión de las diferentes isoformas de la proteína tau.** El procesamiento alternativo del mRNA de tau humano en SNC genera seis isoformas diferentes de la proteína tau a partir de un único transcrito primario.

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente y su relación con la FTDP-17, el procesamiento del exón 10 se ha investigado y estudiado en profundidad. Se ha descrito que mutaciones que aparecen cerca del exón 10, dan lugar a un aumento de los niveles de las isoformas de tau que contienen el exón 10 (D'Souza et al., 1999; Grover et al., 1999; Hasegawa et al., 1999; Jiang et al., 2003).

Para añadir más complejidad, se han descrito polimorfismos en el gen de tau. De este modo, se han identificado dos haplotipos diferentes para el gen de tau, H1 y H2 (Baker et al., 1999). El haplotipo más común es el H1, mientras que el haplotipo H2 está presente sólo en la población caucásica (Evans et al., 2004). Se ha descrito que el haplotipo H1, o al menos algunas variantes, son un factor de riesgo para enfermedades como la parálisis supranuclear progresiva o la degeneración corticobasal (Di Maria et al., 2000; Houlden et al., 2001; Pastor et al., 2002). No se conoce el mecanismo de susceptibilidad asociado al haplotipo H1, sin embargo, teniendo en cuenta que a nivel transcripcional la región del promotor de H1 parece ser más eficiente que la de H2, se ha propuesto que la presencia de niveles altos de proteína tau podría ser la base de la susceptibilidad asociada al haplotipo de tau (Kwok et al., 2004). Esta idea está de acuerdo con la noción de que diferentes aspectos patológicos observados en ratones transgénicos que sobreexpresan tau, puedan ser producidos por los altos niveles de proteína generados en estos ratones.

### 2.2.1.2. Degradación de la proteína tau

La eliminación de especies de tau hiperfosforilado en la enfermedad de Alzheimer puede ocurrir mediante una reversión de la conformación aberrante que sea facilitada, por ejemplo, por la desfosforilación inducida por chaperonas, o bien directamente por degradación, mediada por el proteasoma o por distintas proteasas.

Las chaperonas Hsp40, Hsp70 y Hsp90, en presencia de tau hiperfosforilado, primero intentan revertir la conformación aberrante que presentan las especies de tau hiperfosforilado y retornar a un estado normal a la proteína tau (tau unido a microtúbulos). Si esto falla, una enzima ligasa de ubiquitina E3, conocida como CHIP (del inglés “Carboxyl terminus of the Hsp70-interactin protein”), ubiquitina a tau hiperfosforilado (Petrucci et al., 2004; Shimura et al., 2004) marcándolo así para su degradación mediante el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS, del inglés “Ubiquitin-proteasome system”). De hecho la supresión de CHIP en ratón provoca la acumulación de tau hiperfosforilado y truncado (Dickey et al., 2006). Se observa el mismo efecto cuando se inhiben proteínas como Pin-1 (peptidil-prolil isomerasa) ó P23 que también facilitan la reversión de conformaciones aberrantes de tau (Goryunov & Liem, 2007). La implicación del UPS en la degradación de tau viene soportada por la presencia en diferentes tauopatías de ubiquitina y subunidades del proteasoma en los depósitos aberrantes de tau. Este hecho, puede confirmar la idea de que una alteración del sistema UPS puede jugar un papel importante en estas enfermedades (Hernandez et al., 2004b; Sherman & Goldberg, 2001). Esta hipótesis se apoya en investigaciones que han descrito una disminución de la actividad del proteasoma en la enfermedad de Alzheimer (Keller et al., 2000). Además se había descrito previamente que los PHFs se marcaban con anticuerpos contra ubiquitina (Morishima-Kawashima et al., 1993). Recientemente se han descubierto, por espectrometría de masas, cuales son los residuos que se ubiquitinan en la proteína tau (Cripps et al., 2006). Además, esta hipótesis de inhibición del sistema UPS, en este grupo de enfermedades neurodegenerativas, se apoya con estudios que han demostrado que los NFTs y los cuerpos de Pick se marcan con anticuerpos contra CHIP y ubiquitina (Petrucci et al., 2004) y otros trabajos que demuestran que los PHFs de enfermos de Alzheimer producen una inhibición de la actividad del proteasoma *in vitro* (Keck et al., 2003).

También, se ha analizado la degradación de la proteína tau mediada por distintas proteasas. La proteína tau puede ser proteolizada por caspasas (Rohn et al., 2002), que reconocen el aspártico 421 (en la isoforma de tau de mayor tamaño), situado en el extremo carboxilo de la proteína. La proteína tau truncada en el aspártico 421 tiende a agregarse más rápidamente y en mayor medida (Gamblin et al., 2003b). Este dato sugiere que la proteólisis de tau mediada por caspasas puede preceder a la formación de los NFTs. Además, la proteína tau es sustrato de la calpaína (proteasa activada por calcio), aunque se ha visto que cuando tau esta fosforilada, es más resistente a proteólisis por calpaína (Litersky & Johnson, 1992).

Las proteasas lisosomales también proteolizan tau. Así, la catepsina D produce la proteólisis de tau, generando fragmentos similares a los encontrados en los NFTs (Kenessey et al., 1997). Por otro lado, se ha observado que en ratones que sobreexpresan la proteína tau con varias mutaciones de la FTDP-17, se incrementa el número de lisosomas con una morfología similar a los encontrados en la enfermedad de Alzheimer (Lim et al., 2001).

Recientemente se ha descrito que una peptidasa (PSA) que proteoliza la proteína tau y está implicada en la protección contra la neurodegeneración producida por tau (Karsten et al., 2006). Por último, estudios recientes han descrito la interacción entre Hsp 27 y la proteína tau (Kosik & Shimura, 2005). Parece que la Hsp 27 facilita la degradación de tau hiperfosforilado, pero aún no se sabe mediante qué mecanismo.

### 2.2.2. Modificaciones post-traduccionales de la proteína tau

Se conocen varias modificaciones post-traduccionales de la proteína tau, entre las que se encuentran la fosforilación, glicosilación, ubiquitinación, desamidación, oxidación, nitración, entrecruzamiento, glicación y truncación (Avila et al., 2004). Sin embargo, la más estudiada es la fosforilación.

#### 2.2.2.1. Fosforilación

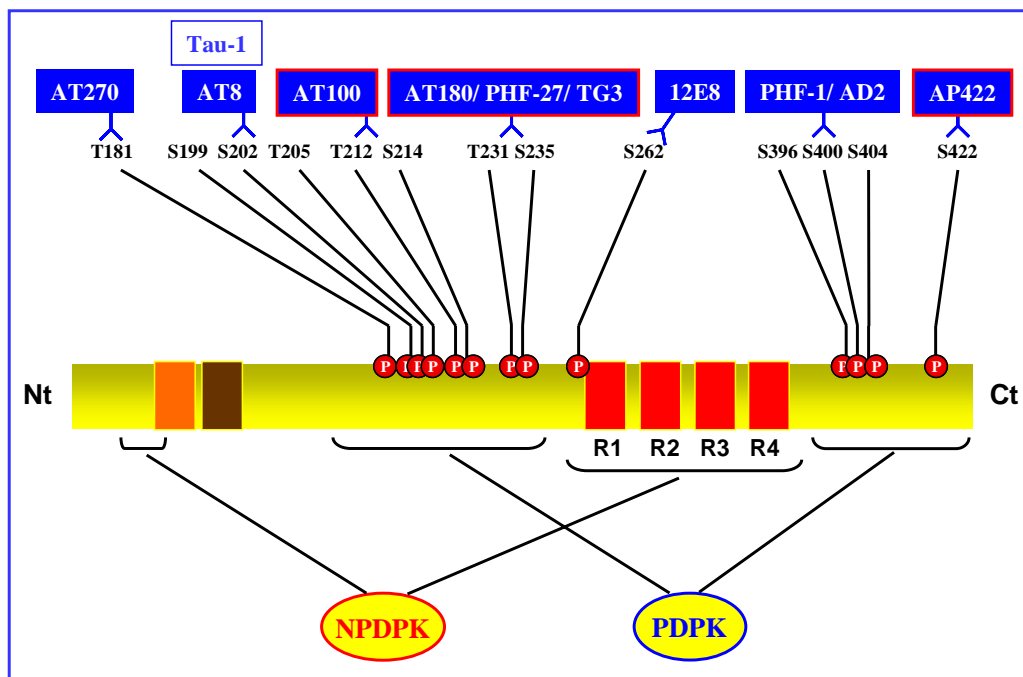
La proteína tau se definió en la década de los 80 como una fosfoproteína (Baudier et al., 1987; Grundke-Iqbal et al., 1986b; Ihara et al., 1986). Aunque la mayoría de los trabajos se centraron en la fosforilación en serina y treoninas, recientemente se han llevado a cabo estudios sobre la fosforilación en tirosinas (Williamson et al., 2002). La isoforma de tau de mayor tamaño presente en el SNC contiene 441 aminoácidos, de los cuales 79 sitios son susceptibles de fosforilación en serina y treonina. Estos sitios se han dividido en dos grupos principalmente: los que son modificados por quinasas dirigidas por prolina (PDPK, del inglés “Proline directed protein kinases”) como son la glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3) (Ishiguro et al., 1992), quinasa dependiente de ciclina 5 (CDK5) (Hosoi et al., 1995), proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK (p38)), y otras quinasas activadas por estrés como SAPK y quinasa c-Jun amino terminal (JNK)(Atzori et al., 2001; Buee-Scherrer & Goedert, 2002; Ferrer et al., 2001) y cdc2 (Ledesma et al., 1992). En un segundo grupo estarían aquellos residuos modificados por quinasas no dirigidas por prolina (NPDPK, del inglés “Non-proline directed protein kinases”) como la proteína quinasa A (PKA) (Sironi et al., 1998; Steiner et al., 1990), proteína quinasa C (PKC) (Correas et al., 1992), calmodulina quinasa II (CaMKII) (Sironi et al., 1998), quinasa reguladora de afinidad entre MAPs/ microtúbulos (MARK) (Drewes et al., 1997) o caseína quinasa II (CKII) (Correas et al., 1992) (**Figura 5**).

Como regla general, las quinasas dirigidas por prolinas fosforilan a tau en las regiones ricas en prolinas adyacentes a la región de las repeticiones y las no dirigidas por prolinas lo hacen en la región de unión a tubulina, salvo la CKII que modifica aminoácidos cercanos a los aminoácidos ácidos codificados por los exones 2 y 3 en el extremo amino terminal (Greenwood et al., 1994) (**Figura 5**).

En muchos casos, la fosforilación regula la unión de tau a los microtúbulos o a membranas (Brandt et al., 1995). Por tanto, la fosforilación parece ser la forma predominante, mediante la cual, se regula la función de tau. Además, la fosforilación de tau puede afectar al transporte axonal, ya que tau puede unirse tanto a los microtúbulos, impidiendo la unión de moléculas motoras, como la quinesina (Vershinin et al., 2007). También, recientemente se ha relacionado la neurotoxicidad inducida por tau en



distintas tauopatías con su asociación a actina, ya que tau fosforilado es capaz de promover cambios en el citoesqueleto de actina (Fulga et al., 2007). Sin embargo, todavía no se ha alcanzado un consenso sobre si la fosforilación de tau puede dar lugar o no a una ganancia de función tóxica o si sólo altera las funciones normales de la proteína tau. A este respecto, se desconoce si la característica común de todas las tauopatías que es la aparición de depósitos aberrantes de proteína tau hiperfosforilada, es un mecanismo patogénico común o un mecanismo de protección, como se ha descrito recientemente para los agregados intracelulares de la enfermedad de Huntington (Arrasate et al., 2004). Existen evidencias, como las anteriormente descritas con respecto a la degradación de tau, que apuntan a que los agregados de tau puedan ser en principio un mecanismo de protección y no los agentes patogénicos clave en enfermedades como la enfermedad de Alzheimer o tauopatías relacionadas.



**Figura 5. Representación esquemática de los principales sitios de hiperfosforilación de la isoforma de mayor tamaño de la proteína tau y sus anticuerpos específicos correspondientes.** La mayoría de los sitios de hiperfosforilación se agrupan a ambos lados de las repeticiones, a excepción de la Serina 262. En azul se indican los anticuerpos que reconocen los sitios más importantes de fosforilación (Tau-1 reconoce la secuencia de aminoácidos 189-207 desfosforilados) de la proteína tau, y además, bordeados en rojo, se indican los anticuerpos que reconocen fosforilaciones que únicamente aparecen en situaciones patológicas, como la enfermedad de Alzheimer.

Quinasas como la GSK-3 y la CDK5 parecen estar implicadas directamente en la fosforilación anómala en la enfermedad de Alzheimer. GSK-3 $\beta$  fosforila, *in vivo*, a la proteína tau en sitios comunes a los PHFs (Lovestone et al., 1996) y además colocaliza con tau fosforilado en cerebros de pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Shiurba et al., 1996). En un modelo murino se encontró que la fosforilación por GSK-3 de tau, facilita su agregación en polímeros filamentosos (Engel et al., 2006b).

El péptido A $\beta$  se encuentra también involucrado en un aumento de la fosforilación de tau por GSK-3, incrementando la actividad enzimática de la quinasa (Alvarez et al., 1999). El péptido A $\beta$  parece ser sólo tóxico cuando la proteína tau está presente en las neuronas (Rapoport et al., 2002). El efecto activador sobre GSK-3 puede ser debido a que el péptido A $\beta$  se comporta como un antagonista del receptor de insulina, (Xie et al., 2002), lo cual impide que la GSK-3 se inhiba. También se ha visto que

agregados esféricos del péptido A $\beta$  son altamente neurotóxicos y activan GSK-3, que después fosforila a tau (Hoshi et al., 2003). La sola adición del péptido A $\beta$  se ha visto que es suficiente para la formación de filamentos de tau, similares a los PHFs en cultivos de neuroblastoma humano (Ferrari et al., 2003). Para la formación de estos filamentos es imprescindible el residuo Ser 422, probablemente para su fosforilación ya que su mutación inhibe la formación de estos filamentos.

La CDK5 también parece estar implicada en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. La CDK5 se activa tras la proteólisis de su proteína reguladora p35 (da lugar a p25). Se ha visto que la fosforilación por quinasas como CDK5, estimula la posterior fosforilación por GSK-3 (Ishiguro, 1997; Cho & Johnson, 2003).

La sobreexpresión de p25 en un ratón transgénico resulta en pérdida neuronal y acumulación de tau hiperfosforilado, sugiriendo que la desregulación de CDK5 por p25, podría estar implicada en el desarrollo de patologías neurofibrilares (Cruz et al., 2003). El proceso proteolítico de p35 a p25 puede ser mediado por calpaína, cuyos niveles están aumentados en Alzheimer (Patrick et al., 1999); sin embargo, cuando aumentan los niveles de calpaína, en cultivos de células neuronales por tratamiento con glutamato, la fosforilación de tau disminuye, probablemente por la activación simultánea de la PP2B (calcineurina, fosfatasa dependiente de Ca<sup>2+</sup>) (Kerokoski et al., 2002).

Se han implicado también a las p38 MAP quinasas en las tauopatías. Así, se ha visto un incremento en las tinciones inmunológicas para p38 activa (fosforilada) en cerebros de pacientes de AD (Hensley et al., 1999; Sun et al., 2003). También se ha copurificado p38 y tau a partir de los PHFs y, además, cuando se inmunoprecipitó p38 de cerebros de pacientes de Alzheimer, se obtuvo material inmunoreactivo para anticuerpos anti-tau (Zhu et al., 2000). En otras tauopatías como la enfermedad de Pick, la degeneración corticobasal, la PSP y la FTDP-17, también se ha colocalizado a p38 en áreas con patología de tau (Atzori et al., 2001; Ferrer et al., 2001). Tau puede ser fosforilado por p38 *in vitro* (Goedert et al., 1997; Reynolds et al., 1997) y, al igual que la GSK-3, se activa con A $\beta$  microagregado (Giovannini et al., 2002). La quinasa p38 se activa en situaciones de estrés celular, como estrés osmótico (Jenkins et al., 2000) o estrés oxidativo (Zhu et al., 2000), este último está relacionado con estadios tempranos de la enfermedad de Alzheimer (Smith et al., 1996).

Varias fosfatasas son capaces de desfosforilar la proteína tau. Entre ellas se encuentra la proteína fosfatasa 1 (PP1), proteína fosfatasa 2A (PP2A), proteína fosfatasa 2B (PP2B o calcineurina) y proteína fosfatasa 2C (PP2C) (Cohen & Cohen, 1989; Ingebritsen & Cohen, 1983).

PP1, PP2A y PP2B purificadas, pueden desfosforilar tau *in vitro* (Fleming & Johnson, 1995; Goedert et al., 1995; Goto et al., 1985; Szucs et al., 1994). Sin embargo, en cultivos primarios corticales de neuronas, PP2A y la PP2B son las más implicadas (Saito et al., 1995).

En otros trabajos, realizados utilizando cortes de cerebro, en los que se ha inhibido la actividad fosfatasa de PP2A y PP2B, se ha comprobado que la inhibición selectiva de PP2A con ácido okadaico, causa hiperfosforilación de tau y fosforilación en sitios comunes a los que se encuentran en la enfermedad de Alzheimer. Dicha fosforilación se correlaciona con una reducción de la capacidad de unión a microtúbulos e imposibilidad de estimular el ensamblaje de éstos. Esto no ocurre cuando se inhibe selectivamente a la PP2B con ciclosporina A (Gong et al., 2000). De estos resultados se deduce que PP2A

participa de una forma más activa en la regulación de la fosforilación de tau *in vivo* y que alteraciones en su regulación, podrían originar hiperfosforilación anormal de tau.

También se cree que es la PP2A la que actúa en un mayor número de sitios de fosforilación (Goedert et al., 1995; Gong et al., 2000). PP2A se une a tau, a través de su dominio de unión a microtúbulos (Sontag et al., 1999). En FTDP-17, tauopatía originada por mutaciones en el gen de tau, mutaciones en el dominio de unión a microtúbulos, podrían dificultar la interacción de tau con esta fosfatasa, con lo que se produciría un incremento en la fosforilación de tau, tal y como ocurre en pacientes con ésta enfermedad (Goedert et al., 2000). Se ha propuesto que las fosfatasas pueden jugar un papel importante en la enfermedad de Alzheimer ya que en condiciones de hipotermia producidas por un metabolismo reducido de glucosa, se ha visto un aumento en la fosforilación de tau, debido a que la PP2A es menos activa que las quinasas en esas condiciones (Avila & Diaz-Nido, 2004; Planel et al., 2004). También, se ha descrito que la hiperfosforilación de tau puede provocar cambios conformacionales que inhiben la función de las fosfatasas y es posible que proteínas como la proteína Pin-1, puedan revertir parcialmente estas conformaciones aberrantes y promover la actividad de las fosfatasas, como se ha mencionado previamente en relación a la degradación de tau. Por tanto, Pin-1 puede jugar un papel importante disminuyendo la fosforilación de tau en la enfermedad de Alzheimer (Butterfield et al., 2006).

#### 2.2.2.2. Otras modificaciones de tau

Se produce N-glicosilación en tau hiperfosforilado (Wang et al., 1996), mientras que tau no modificado sólo puede ser O-glicosilado (Arnold et al., 1996). Se cree que la O-glicosilación puede tener un papel en la posible localización nuclear de tau (Lefebvre et al., 2003).

Tau puede ser ubiquitinado (Mori et al., 1987), tal y como demuestra el marcaje de los PHFs de pacientes con AD (Morishima-Kawashima et al., 1993), con el uso de anticuerpos específicos contra la ubiquitina.

El tau procedente de los PHFs puede estar glicado. Esto se da cuando los grupos  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de las lisinas reaccionan no enzimáticamente con un grupo aldehído o cetona de un azúcar (Ledesma et al., 1994). Los productos de esta glicación pueden conducir a cambios irreversibles y llevar a la formación de los llamados “productos de glicación avanzada”, que pueden provocar entrecruzamiento entre las proteínas modificadas (Eble et al., 1983). Se cree que esta glicación podría estar implicada en la formación de NFTs a partir de PHFs (Ledesma et al., 1994). También se ha visto que cuando se añade tau glicado a cultivos celulares, se generan especies reactivas derivadas del oxígeno, productos ROS que pueden interrumpir el normal funcionamiento de la neurona (Smith et al., 1995).

Otras modificaciones que pueden favorecer la agregación de tau son: la truncación de la proteína tras el residuo de glutámico 391 (Wischnik et al., 1997) o el residuo de aspártico 421 (Gamblin et al., 2003b), la desamidación de asparraginas (o glutaminas) (Montejo de Garcini et al., 1986; Watanabe et al., 1999) y la posible oxidación de cisteínas en las isoformas que contienen el exón 10, que podría permitir la formación de puentes disulfuro intramoleculares de tau (Schweers et al., 1995).

Se ha descrito cómo la proteína tau puede entrecruzarse mediante una reacción enzimática modulada por la transglutaminasa (Dudek & Johnson, 1993; Miller & Johnson, 1995; Norlund et al.,

1999). Además, se han identificado modificaciones que dan lugar a un cambio conformacional o una isomerización cis-trans de la prolina en la proteína tau (Wedemeyer et al., 2002).

Todas estas modificaciones parecen ser importantes en el ensamblaje de tau en polímeros fibrilares, aunque la contribución relativa de cada una de ellas se desconoce.

### **2.2.3. Polimerización y agregación de la proteína tau**

#### **2.2.3.1. Estudios *in vitro***

La principal característica que comparten las tauopatías es la formación de agregados aberrantes de la proteína tau, como sucede en la enfermedad de Alzheimer, con la aparición de ovillos neurofibrilares, formados por un gran número de filamentos de tau (PHFs). En los años 80, distintos grupos empezaron a investigar cómo podían producirse estas estructuras.

En 1986, se describió, por primera vez, que la proteína tau podía formar polímeros fibrilares, similares a los PHFs encontrados en cerebros de enfermos de Alzheimer (Montejo de Garcini et al., 1986). Desde entonces, se ha estudiado en profundidad el ensamblaje *in vitro* de la proteína tau (Crowther et al., 1992; Troncoso et al., 1993; Wilson & Binder, 1997; Wille et al., 1992) y se ha descrito que, para que se produzca la polimerización espontánea de tau *in vitro*, se necesita una elevada concentración de proteína (Crowther et al., 1992). Este dato ha permitido sugerir que son necesarios otros compuestos que faciliten su ensamblaje.

Las primeras moléculas que se estudiaron fueron los glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs), que se encontraron presentes en los PHFs. Los GAGs facilitan la polimerización de tau, independientemente de su estado de fosforilación (Perez et al., 1996). Además, los GAGs, juegan un papel importante en la morfología de los polímeros de tau. La heparina o el condroitín sulfato, aumentan la helicidad de los polímeros fibrilares de tau o PHFs encontrados en la enfermedad de Alzheimer.

Los GAGs son polianiones, lo que ha llevado a estudiar otras biomoléculas con estas características. Así, el RNA (Kampers et al., 1996) o el ácido poliglutámico (Kampers et al., 1996; Perez et al., 1996), favorecen la agregación de tau *in vitro*. Agregación que requiere el tercer motivo de unión a tubulina de la molécula (Perez et al., 1996).

Se ha descrito que la región de la molécula de tau implicada en su autoensamblaje corresponde a la región implicada en la unión a los microtúbulos (Perez et al., 1996). Sin embargo, esta región esta compuesta, como se ha mencionado anteriormente, de cuatro secuencias repetidas, estando la primera y la segunda repetición implicadas principalmente en la unión a los microtúbulos (Goode et al., 1997), mientras que la tercera es la que tiene un papel fundamental en el autoensamblaje de tau (Perez et al., 1996).

La oxidación puede jugar un papel importante en la formación de filamentos de tau *in vitro*, como ya se ha sugerido anteriormente. La oxidación de la cisteínas, presentes en el dominio de unión a microtúbulos, pueden permitir la formación de puentes disulfuro intermoleculares (en tau 3R o tau 4R), lo que facilita su autoensamblaje. En tau 4R, la formación de puentes disulfuro intramoleculares no favorece su autoensamblaje, mas bien lo impide (Barghorn & Mandelkow, 2002). Por otro lado, la polimerización de tau también puede verse favorecida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en presencia de cationes metálicos como el hierro a

través de procesos de oxidación (Reacción de Fenton) (Troncoso et al., 1993). Además, se ha descrito que metales como el hierro y el aluminio favorecen la polimerización y agregación de tau (Langui et al., 1990; Yamamoto et al., 2002).

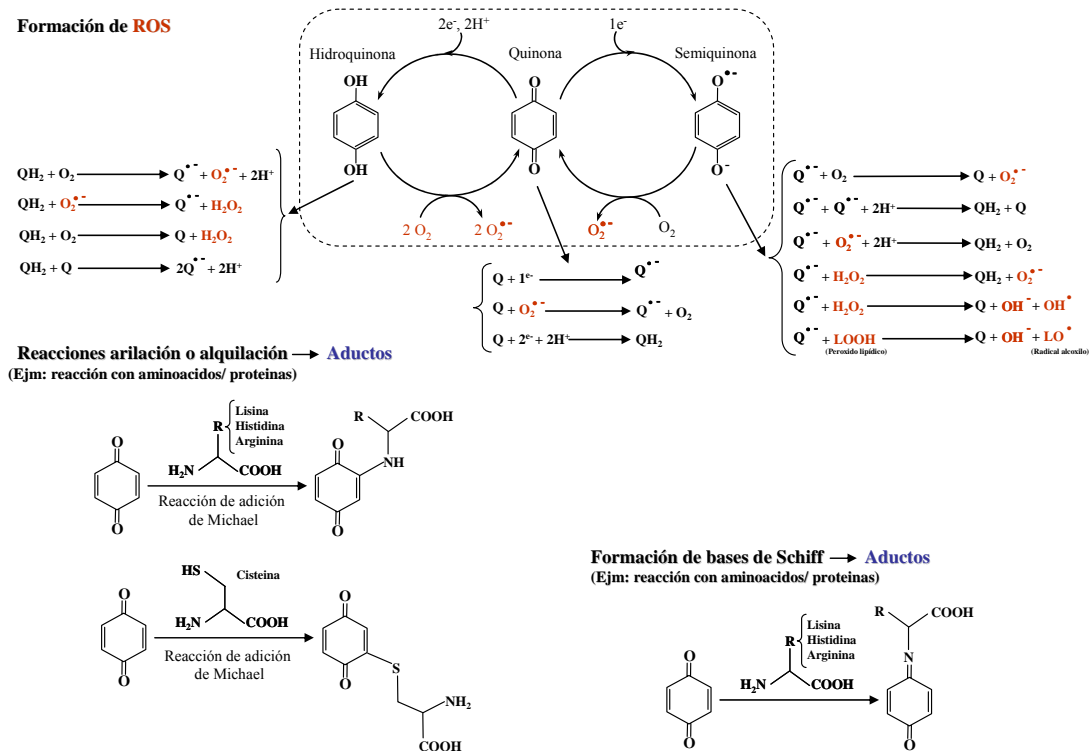
También los ácidos grasos, como el ácido araquidónico, pueden favorecer la polimerización de tau (Abraha et al., 2000), lo cual puede estar relacionado con la interacción de tau con la membrana plasmática. El ácido araquidónico liberado podría formar estructuras micelares que favorecerían la formación de agregados de tau (Abraha et al., 2000).

Un hecho que ocurre en la célula en condiciones de estrés oxidativo, como las que se producen en la enfermedad de Alzheimer, es la peroxidación lipídica. Como resultado de este proceso, el ácido araquidónico puede ser fragmentado dando lugar a la aparición de aldehídos altamente reactivos y por tanto muy tóxicos para la célula, como el 4-hidroxinonenal (4-HNE) y la acroleína (Sayre et al., 1997; Uchida et al., 1998). Estos compuestos colocalizan con los NFTs en cerebros de pacientes de Alzheimer (Calingasan et al., 1999; Lovell et al., 2001; Sayre et al., 1997). Además, el 4-HNE inhibe la desfosforilación de tau en células en cultivo de hipocampo (Mattson et al., 1997) y también se ha comprobado que favorece la polimerización de tau previamente fosforilado *in vitro* (Perez et al., 2000a). Por otro lado, la acroleína se ha asociado en ocasiones con eventos relacionados con la fosforilación de tau mediada por la PKC en células no neuronales. Así, se ha visto que puede regular a PKC (Karolak et al., 1993) y que puede activar a la MAP quinasa p38 (Finkelstein et al., 2001; Karolak et al., 1993) en células no neuronales.

Otros compuestos relacionados con el estrés oxidativo son las quinonas. Se ha descrito un aumento en las concentraciones de quinonas en la enfermedad de Alzheimer, en comparación con individuos sanos (Dallner & Sindelar, 2000). Las quinonas son compuestos altamente reactivos que pueden llevar a cabo reacciones de oxido-reducción y promover la formación de especies reactivas de oxígeno (Boveris et al., 1976; Sugioka et al., 1988; Afanas'ev et al., 1990; Bittner, 2006; Bolton et al., 2000; Brunmark & Cadenas, 1989; Nohl et al., 2003; Pinkus et al., 1995; Weiner, 1994), además de poder reaccionar y modificar proteínas mediante reacciones de alquilación/arilación (reacciones de adición de Michael) (Bellomo et al., 1990a; Bellomo et al., 1990b; Bolton et al., 2000; Irons, 1985; Malorni et al., 1991; Mason, 1955; Pfeiffer & Metzler, 1996; Santa-Maria et al., 2004; Santa-Maria et al., 2005b; Sladic et al., 2004) (**Figura 6**). También, se ha descrito que diferentes quinonas biológicas (derivados de la dopamina) pueden inhibir el proteasoma (Zafar et al., 2006), afectando así a los sistemas de degradación de proteínas. Estos sistemas de degradación se encuentran alterados en distintas enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Alzheimer (Keller et al., 2000; Sherman & Goldberg, 2001; Hernandez et al., 2004b). Además, se ha descrito que estos derivados quinónicos de la dopamina pueden producir la inhibición de la cadena de transporte de electrones mitocondrial en cerebro (Khan et al., 2005) implicando, por tanto, a estos derivados quinónicos en el mecanismo de muerte neuronal asociado a estas enfermedades neurodegenerativas.

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral hemos descrito cómo quinonas de diferente naturaleza (derivados xenobióticos, que al ser modificados por los sistemas desintoxicantes celulares generan derivados quinónicos, como sucede con el benceno como ejemplo, precursores de componentes de la cadena respiratoria mitocondrial, derivados de catecolaminas, etc..., (Bittner, 2006; Bolton et al., 2000)),

pueden facilitar el ensamblaje y polimerización de tau. Este efecto de las quinonas podría estar relacionado con distintas anomalías mitocondriales y el estrés oxidativo descrito en la enfermedad de Alzheimer (Hirai et al., 2001; Smith et al., 2000).



**Figura 6. Principales reacciones llevadas a cabo por las quinonas, cuyo efecto resulta tóxico para la célula.** Las quinonas, debido a su capacidad de aceptar/donar electrones, son capaces de producir reacciones de óxido-reducción, dando lugar a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). También, las quinonas, mediante reacciones de adición de Michael o mediante la formación de bases de Schiff, pueden reaccionar con aminoácidos, proteínas y DNA.

Además de los diferentes compuestos o moléculas mencionados anteriormente, se han descrito diferentes proteínas que pueden favorecer la polimerización de tau. La  $\alpha$ -sinucleína, proteína que juega un papel importante en la enfermedad de Parkinson, puede unirse a la proteína tau y facilitar su fosforilación por la PKA (Jensen et al., 1999), ensamblaje o polimerización (Giasson et al., 2003). Por otro lado, una proteína similar a las chaperonas, la proteína 14-3-3 zeta puede facilitar la formación de polímeros fibrilares de tau (Hernandez et al., 2004a). Otra chaperona que se une a la proteína tau es, como ya se ha mencionado previamente, Pin-1. Al contrario que la proteína 14-3-3 zeta, Pin-1 parece prevenir, de forma indirecta, la polimerización de tau (Lu et al., 1999). Otra proteína que puede unirse a tau y favorecer su polimerización es la ferritina (Perez et al., 1998), responsable de almacenar las reservas mayoritarias de hierro intracelular, hierro que, como se ha descrito previamente, puede favorecer la formación de especies reactivas de oxígeno y, por tanto, aumentar el estrés oxidativo (Reif, 1992) y facilitar la agregación de tau. La tubulina, por otro lado, a través de su región carboxilo terminal, rica en residuos de ácido glutámico (por tanto región rica en cargas negativas -puede actuar de la misma manera que los polianiones-) puede favorecer la polimerización de tau (Makrides et al., 2003).

Como se ha descrito previamente, la modificación principal que sufre la proteína tau es la fosforilación, modificación que juega un papel importante en la polimerización de tau. La fosforilación

que se lleva a cabo en las regiones de tau formadoras del núcleo de los PHFs, parece ser un paso previo al ensamblaje de la proteína tau (Eldar-Finkelman, 2002). Se ha descrito cómo, dependiendo de la región de tau que se fosforile, se puede ver favorecida o impedida su polimerización (Perez et al., 2000b; Schneider et al., 1999). De los compuestos mencionados anteriormente que facilitan la polimerización de tau, el HNE (Perez et al., 2000a) y las quinonas (estudiadas durante el desarrollo de esta tesis doctoral, (Santa-Maria et al., 2004)) favorecen aún más el ensamblaje de la proteína tau fosforilada.

Diferentes investigaciones se han centrado en el estudio de la estructura y conformación que presenta la proteína tau cuando forma polímeros fibrilares (Binder et al., 2005; Gamblin, 2005). El anticuerpo Alz-50 ha resultado ser una herramienta importante en este campo. Este anticuerpo sólo se une eficientemente a tau cuando el extremo amino terminal entra en contacto con el dominio de unión a microtúbulos. Este cambio conformacional sólo se detecta en los filamentos de tau encontrados en muestras de enfermos de Alzheimer. Por otro lado, se ha descrito que la región mínima requerida para la polimerización de tau se restringe a la tercera repetición (Perez et al., 1996; von Bergen et al., 2000). Dentro de esta región se han implicado a dos péptidos en el autoensamblaje de tau. El primero de ellos es el péptido que contiene los residuos 306 a 311, el cual es capaz de polimerizar espontáneamente incluso en ausencia de inductores (von Bergen et al., 2000). El segundo péptido contiene los residuos 317 al 335 (Perez et al., 1996). Hasta hace poco tiempo se pensaba que la agregación aberrante y patológica de una proteína implicaba la formación de estructuras en lámina  $\beta$ , dando lugar a la aparición de las típicas fibrillas de amiloide como, por ejemplo, las descritas previamente en el caso del péptido A $\beta$  (Serpell et al., 1997). Sin embargo, se han descrito recientemente estructuras en hélice  $\alpha$  en los polímeros que forman los PHFs (Sadqi et al., 2002), sugiriendo que los PHFs no son un caso típico de amiloidosis. Además, varios estudios han demostrado que regiones de la proteína tau implicadas en la formación de los PHFs parecen mostrar una estructura en hélice  $\alpha$  que facilita el ensamblaje (Hiraoka et al., 2004; Minoura et al., 2002). También, se ha descrito que la fosforilación puede favorecer la formación de estructuras hélice  $\alpha$  y la polimerización de un péptido (péptido 1/2R, (Perez et al., 1996)) de la región de tau implicada en la formación de los PHFs (Mendieta et al., 2005). Sin embargo, no se ha descrito ningún modelo sobre el mecanismo o la relación que pueden tener fosforilación, estructura y ensamblaje de la isoforma de mayor tamaño de tau. Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se han estudiado y caracterizado variantes de tau que pierden alguno de los péptidos indicados anteriormente como secuencias mínimas necesarias para la polimerización. Más adelante, se describe en el apartado de Resultados, el papel que parecen jugar estos dos péptidos en la polimerización y fosforilación de la proteína tau. Recientemente se ha descrito un modelo que explica la influencia de ambos péptidos en la formación de filamentos de tau (Gamblin, 2005). Dicho modelo sugiere que tau solo es capaz de polimerizar cuando los dos péptidos sufren un cambio conformacional: el péptido que contiene los residuos 306-311 debe formar una lámina  $\beta$  y el péptido que contiene los residuos 317-335 forma una hélice  $\alpha$ .

Por otro lado, se han llevado a cabo diferentes estudios en líneas celulares, en los que se han investigado distintos procesos relevantes de la enfermedad de Alzheimer, como son la fosforilación/desfosforilación de tau (Ding et al., 2006; Fath et al., 2002; Malchiodi-Albedi et al., 1997) y la formación

de polímeros fibrilares de tau (Delobel et al., 2003; Khlistunova et al., 2006; Ko et al., 2005; Ko et al., 2002; Perez et al., 2002; Santa-Maria et al., 2005a).

Además, recientemente se ha descrito el uso de cultivos de rodajas organotípicas de secciones de hipocampo para estudiar la agregación de tau (Shahani et al., 2006).

#### 2.2.3.2. Estudios *in vivo*

En los últimos años se han desarrollado diferentes modelos de animales transgénicos para intentar reproducir diferentes aspectos de la patología de tau encontrada en la enfermedad de Alzheimer y otras tauopatías como la FTDP-17 (Gotz et al., 2007; McGowan et al., 2006). Se ha generado un ratón que sobreexpresa la secuencia genómica del gen de tau humano (Duff et al., 2000), aunque no se han encontrado lesiones neuropatológicas en este ratón hasta pasados los ocho meses de edad. Sin embargo, la sobreexpresión de tau humano en ratones “Knock out” para tau, genera una agregación aberrante de tau (Andorfer et al., 2005). En otro modelo murino que sobreexpresa la quinasa GSK-3 de manera condicional una vez finalizado el desarrollo del sistema nervioso central, se ha descrito la acumulación de tau hiperfosforilado en neuronas de hipocampo (Lucas et al., 1999). Por otro lado, se han generado ratones transgénicos que expresan tau con alguna de las diferentes mutaciones presentes en enfermos con la FTDP-17. Así, se han generado ratones que contienen mutaciones en el gen de tau con la mutación P301L (Gotz et al., 2001), la P301S (Allen et al., 2002) o la V337M (Tanemura et al., 2002). En todos los casos se observó la aparición de filamentos de tau, al igual que ocurre en ratones que expresan tau humano con la mutación R406W (Tatebayashi et al., 1999), mutación que disminuye la fosforilación de tau y la interacción de tau fosforilado con los microtúbulos (Perez et al., 2000b). Otro abordaje consistió en generar un ratón transgénico con varias de las mutaciones que se han descrito en la FTDP-17 (G272V, P301L, R406W (Lim et al., 2001)). El análisis de este ratón reveló la presencia de estructuras filamentosas de tau, así como alteraciones lisosomales similares a las que ocurren en la enfermedad de Alzheimer. Este ratón se cruzó posteriormente con un ratón transgénico que sobreexpresa la quinasa GSK-3 $\beta$  de manera condicional y se obtuvieron filamentos de tau similares, en forma y tamaño, a los encontrados en diferentes tauopatías (Engel et al., 2006b).

También, se han generado distintos ratones transgénicos que expresan presenilinas o la proteína precursora de amiloide (ver apartado 3.1) con mutaciones descritas principalmente en casos de la enfermedad de Alzheimer familiar (Citron et al., 1997; De Strooper et al., 1999; Duff et al., 1996; Games et al., 1995; Hsia et al., 1999). Estos ratones se han cruzado con algunos de los ratones que sobreexpresan tau con mutaciones (Oddo et al., 2003; Perez et al., 2005) descritos anteriormente. En todos ellos se ha descrito la aparición de filamentos de tau y agregación del péptido  $\beta$  amiloide.

Por último, mencionar que se han desarrollado distintos modelos en otras especies, como en *Drosophila* (Jackson et al., 2002; Wittmann et al., 2001) o en *Lamprea* (Hall et al., 2000; Hall et al., 2001; Hall et al., 1997) entre otros, donde se ha estudiado características de las tauopatías humanas, expresando diferentes formas de tau.



#### 2.2.4. Toxicidad y neurodegeneración mediada por tau

Como se ha mencionado anteriormente, en la enfermedad de Alzheimer y otras tauopatías, la proteína tau deja de estar asociada a los microtúbulos, agregándose posteriormente dentro de las neuronas para dar lugar a los ovillos neurofibrilares. En términos generales, las consecuencias patológicas de estos eventos, producidos por una pérdida de la función normal de la proteína tau y por una ganancia de función patológica de la misma, son la agregación en filamentos para formar los ovillos neurofibrilares neuronales en las neuritas distróficas.

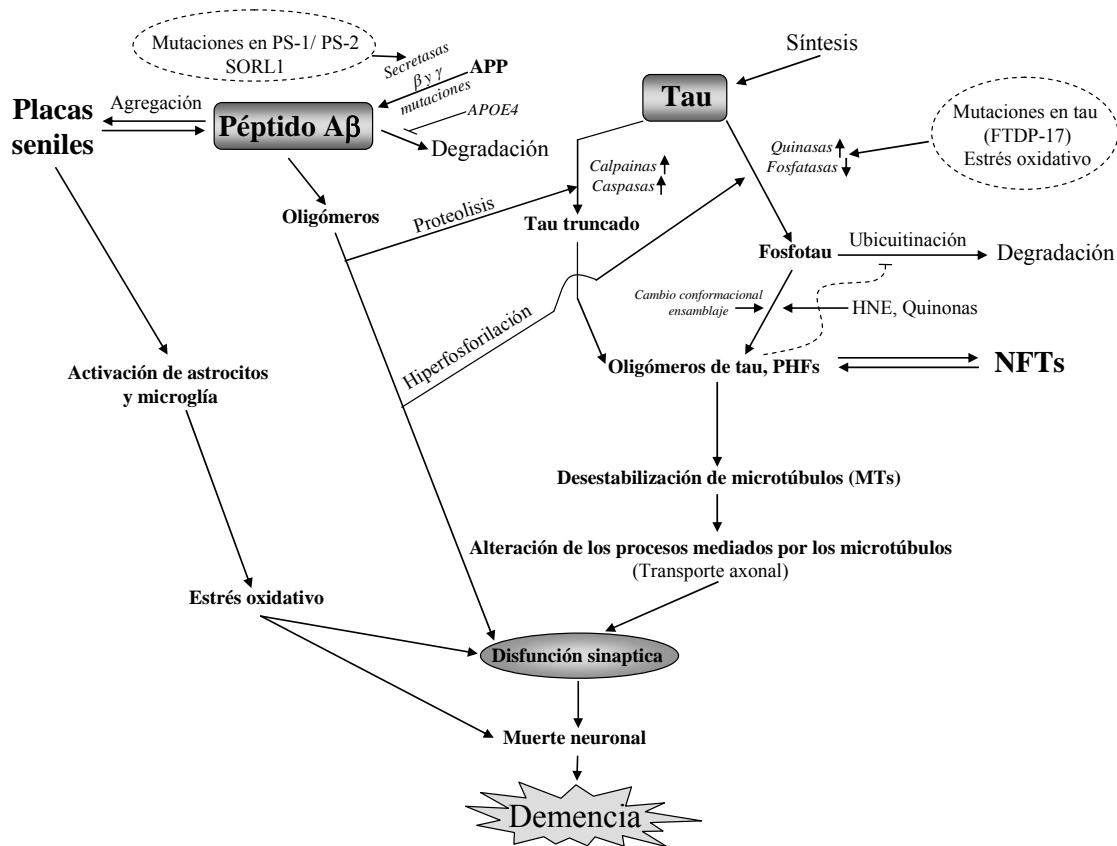
La pérdida de la capacidad de tau para estabilizar los microtúbulos, va a producir una alteración patológica de la estructura y de las capacidades funcionales del citoesqueleto, lo cual va a poner en peligro el transporte axonal y va a contribuir a una disfunción sináptica (Roy et al., 2005). Sin embargo, el descubrimiento de que los niveles totales de NFTs se correlacionan con el grado de demencia (Arriagada et al., 1992; Braak & Braak, 1991; Delacourte et al., 1999), nos proporciona una evidencia que sugiere que la ganancia de función tóxica de los NFTs puede jugar un papel importante en el avance de la enfermedad.

Es posible que los efectos tóxicos de los NFTs sean parcialmente debidos a la acumulación de grandes cantidades de este material fibroso dentro de las neuronas, lo que puede provocar un obstáculo directo en algunas funciones celulares, como el transporte axonal (**Figura 7**). Así, los NFTs pueden contribuir al desarrollo de la enfermedad secuestrando más tau y otras proteínas, incrementando, potenciando y amplificando de esta manera la pérdida de la función normal de tau. Por otro lado, se ha descrito que neuronas que contienen lesiones neurofibrilares pueden vivir un largo periodo de tiempo (Morsch et al., 1999), sugiriendo que los NFTs son un mecanismo que desarrollan las neuronas para secuestrar tau hiperfosforilado, que puede, en un principio, formar agregados intermedios u oligómeros que podrían incluso ser más tóxicos que los propios NFTs (Duff & Planel, 2005) (**Figura 7**). En este sentido, se ha estudiado y discutido exhaustivamente la implicación de diferente tipos de agregados de proteína en neurodegeneración (Caughey & Lansbury, 2003; Gomez-Ramos et al., 2006). De hecho, pacientes que manifiestan una FTDP-17 avanzada, muestran una intensa neurodegeneración con altos niveles de proteína tau hiperfosforilada, pero con un bajo número de NFTs (Bird et al., 1999).

La idea de que los NFTs pueden tener un papel importante en la progresión de la enfermedad está cambiando desde que se ha descrito que, en un ratón que expresa una variante de tau de forma condicional, mejoran funciones como la memoria tras la represión de la expresión del transgen, aunque se siga acumulando tau en forma de NFTs (Santacruz et al., 2005; Trojanowski & Lee, 2005). En otro modelo murino de la patología amiloide tipo Alzheimer, se han descrito defectos axonales con cantidades anormales de tau acumulado, otras proteínas y vesículas que preceden en un año a la formación de depósitos de  $\beta$ -amiloide (Stokin et al., 2005). Por otro lado, el restablecimiento del transporte axonal dañado en un modelo murino de tauopatía, rescata el fenotipo de la enfermedad (Zhang et al., 2005). Añadido a estos hallazgos, se suman los estudios descritos en un ratón transgénico que contiene la mutación P301S en tau, que revelan una pérdida de sinapsis y activación microglial previa a la aparición

de los NFTs, posiblemente debido a un deterioro en el transporte axonal que se produce como consecuencia de la hiperfosforilación de la proteína tau (**Figura 7**) (Allen et al., 2002).

Todos estos estudios apoyan la idea de que defectos en el transporte axonal, pérdida de sinapsis y neuroinflamación son signos tempranos de la neurodegeneración provocada por la proteína tau hiperfosforilada, mientras que los ovillos neurofibrilares son manifestaciones tardías que pueden o no contribuir a la enfermedad interfiriendo con diferentes funciones normales de la célula. De hecho, si la función de los agregados es proteger a la neurona (como se ha mencionado previamente en esta memoria (Arrasate et al., 2004)), la protección no es completa. Además, la ganancia de función tóxica de la proteína tau patológica puede ser atribuida a la existencia de especies de tau pre-fibrilares (Maeda et al., 2007; Maeda et al., 2006; Gomez-Ramos et al., 2006). Por tanto, aunque la pérdida de la función de tau y la ganancia de función tóxica de los PHFs u otras variantes anormales de tau, añadido a la propiedades tóxicas de los NFTs, podrían contribuir a la neurodegeneración a diferentes niveles, siendo factible que ambos mecanismos contribuyan al desarrollo temprano de la enfermedad de Alzheimer u otras tauopatías en los diferentes estadios de la patología (**Figura 7**).



**Figura 7. Diagrama de secuencia de los principales mecanismos moleculares que producen toxicidad neuronal y disfunción sináptica en la enfermedad de Alzheimer.** La hiperfosforilación de tau facilita la formación de agregados aberrantes o polímeros de tau, que forman los ovillos neurofibrilares. Esta hiperfosforilación afecta a la unión de tau a los microtúbulos, desestabilizándolos. Todos estos eventos conducen a un mal funcionamiento del transporte axonal que en último lugar, causa una disfunción sináptica que genera muerte neuronal y, por tanto, dada el área del cerebro afectada, produce demencia.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, es posible que tratamientos que disminuyan la hiperfosforilación de tau, pudieran estar entre los más eficaces para frenar la ganancia de función tóxica de la proteína tau hiperfosforilada. Sin embargo, esta hipótesis debe tomarse con cautela, puesto que aún

no se sabe con exactitud qué papel pueden jugar las diferentes formas de tau (intermediarios de la agregación) y qué relación tienen con otros eventos como el estrés oxidativo o la toxicidad mediada por el péptido  $\beta$ -amiloide. En este sentido, recientemente se han realizado estudios con inhibidores de quinasas en ratones transgénicos que desarrollan características de la enfermedad de Alzheimer, en los que parece que disminuye la cantidad de tau hiperfosforilado (Engel et al., 2006c; Takashima, 2006).

### 3. LAS PLACAS SENILES

Dyvirí logró teñir las placas seniles utilizando el colorante Congo Red en el año 1930. Dicho colorante se une a un componente llamado amiloide, por ser parecido en sus propiedades fisicoquímicas a los polisacáridos (Maccioni et al., 2001). Estas placas son depósitos microscópicos extracelulares con un diámetro de 10-120  $\mu\text{m}$  asociados a lesiones axonales y dendríticas, que normalmente se encuentran en la zona límbica y en la corteza asociativa (Maccioni et al., 2001). Existen dos tipos diferentes de placas, las placas difusas o depósitos preamiloides (que se supone son las precursoras) y las placas seniles propiamente dichas (Selkoe, 2001). El componente fundamental de las placas seniles es el péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta_{40}$  ó  $A\beta_{42}$ ). Estos péptidos son fragmentos generados a partir de cortes proteolíticos secuenciales de la APP (Masters et al., 1985) (**Figura 8**).

#### 3.1. La proteína precursora del amiloide y su derivado, el péptido $A\beta$

La APP es una glicoproteína transmembrana del tipo 1 que consta de un péptido señal, un largo dominio extracelular, un solo dominio transmembrana hidrófobo y una pequeña cola citoplasmática. La APP se encuentra evolutivamente muy conservada y se expresa en todos los mamíferos. Como consecuencia de un procesamiento alternativo y de modificaciones postraduccionales, la APP es un grupo heterogéneo de polipéptidos expresados ubicuamente con un peso molecular de 110-140 kDa (Selkoe et al., 1988).

No se conoce con certeza cuáles son las funciones de la APP, pero se le atribuye la capacidad de inhibir serin-proteasas, la posibilidad de unir zinc y cobre, puede tener un papel en la adhesión celular, así como propiedades neuroprotectoras y neurotróficas (Maccioni et al., 2001; Storey & Cappai, 1999).

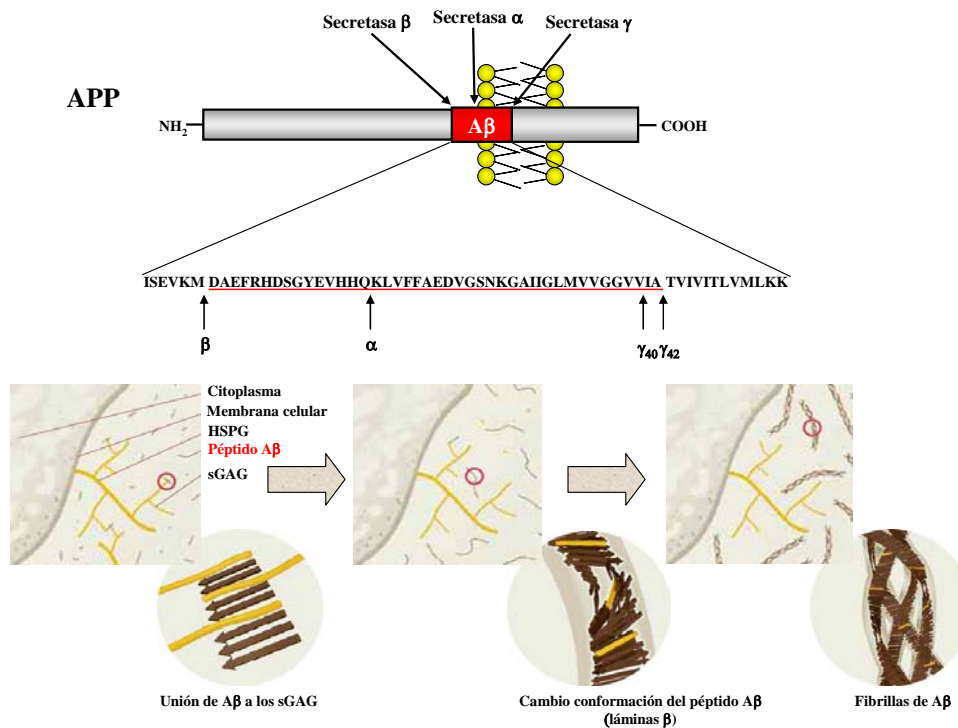
La APP es sensible a cortes proteolíticos durante y después de su transporte a través de la vía secretora. En el procesamiento proteolítico de la APP participan varias proteasas que se denominan  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -secretasa. Los cortes consecutivos de las  $\beta$  y  $\gamma$  secretasa generan un péptido de 40 ó 42 aminoácidos ( $A\beta_{40}$  ó  $A\beta_{42}$ ), que es liberado al espacio extracelular (Selkoe, 2001) (**Figura 8**).

El péptido  $A\beta$  tiene un peso molecular de 4 kDa. El péptido constituido por 42 aminoácidos ( $A\beta_{42}$ ), es la forma más hidrofóbica y, particularmente, más propenso a agregarse (Selkoe, 2001). Se ha descrito como los proteoglicanos heparan sulfato (HSPGs, del inglés "Heparan sulfate proteoglycans", moléculas ancladas a la matriz extracelular) favorecen la agregación del péptido  $A\beta$ . El péptido  $A\beta$  tiene un dominio de unión a heparina (Clarris et al., 1997), mediante el cual es capaz de unirse a los glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs), que forman parte de los HSPGs. Los GAGs promueven un cambio estructural que favorece la formación de láminas beta, siendo responsable de la formación de las

fibrillas de  $\beta$ -amiloide. Estas fibrillas se depositan alrededor de las células formando las placas (**Figura 8**).

Por otro lado, el péptido  $A\beta$  es capaz de inducir apoptosis, tanto en cultivos celulares de neuronas de hipocampo (Forloni, 1993), como en ratones transgénicos (Selkoe, 2001). Además, el péptido  $A\beta$  puede estimular la liberación de citoquinas y quimioquinas por parte de células asociadas a las placas seniles (microglía y astrocitos) y producir especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés “Reactive Oxygen Species”) que pueden producir neurodegeneración y muerte neuronal (**Figura 7**).

La primera causa genética de la enfermedad de Alzheimer que se identificó fueron mutaciones puntuales en APP. Las mutaciones puntuales están localizadas justo antes de los sitios de corte endoproteolíticos de la  $\beta$ -secretasa, inmediatamente después del sitio de corte de la  $\alpha$ -secretasa y justo después del sitio de corte de la  $\gamma$ -secretasa en el extremo carboxilo terminal respectivamente. Estos datos, y el hecho de que no se han encontrado otras mutaciones en la proteína APP, sugieren que estas mutaciones puntuales provocan la enfermedad de Alzheimer debido a la alteración que producen en el procesamiento proteolítico de las secretasas. Además, todas estas mutaciones aumentan, de diferentes maneras, la producción de  $A\beta$  (Selkoe, 2001) (**Figura 7**).



**Figura 8. Procesamiento proteolítico de la APP y posible mecanismo de formación de fibrillas del péptido beta-amiloide.** Representación esquemática de la isoforma más larga de la proteína precursora de amiloide (APP). En rojo se señala el péptido  $\beta$  amiloide generado por cortes endoproteolíticos secuenciales en la APP, llevados a cabo por las secretasas  $\beta$  y  $\gamma$ . En la parte inferior se puede observar un posible mecanismo mediante el cual se puede facilitar, mediante la unión  $A\beta$ -GAGs, la formación de los agregados de  $\beta$  amiloide. “HSPG” hace referencia a los proteoglicanos heparán sulfato, de los cuales forman parte los glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs).

### 3.2. Las presenilinas 1 y 2

Actualmente existen muchas evidencias que indican que las proteínas integrales de membrana llamadas presenilinas (PS) son, o forman parte de la  $\gamma$ -secretasa (Selkoe, 2001). Las presenilinas son

aspartil proteasas (Selkoe & Kopan, 2003) que presentan dos isoformas; PS-1 y PS-2. Estas proteínas se encuentran ancladas a la membrana plasmática a través de ocho dominios transmembrana y tienen un peso molecular de 46 y 55 kDa respectivamente. La holoproteína se corta endoproteolíticamente después de su síntesis y los dos fragmentos generados forman un heterodímero, que es la forma biológica funcional (Loetscher et al., 1997). Posteriormente, las presenilinas se asocian a complejos con un alto peso molecular (de 100 a 200 kDa), que parecen representar la forma principal en la que las presenilinas ejercen sus funciones en la célula (Capell et al., 1998).

La mayoría de los casos de la enfermedad de Alzheimer de origen temprano (familiar), son causados por mutaciones en los genes de las presenilinas. Dichas mutaciones se han asociado con un incremento en la producción del péptido A $\beta$ <sub>42</sub> (Citron et al., 1997; De Strooper et al., 1998; Levy-Lahad et al., 1995; Sherrington et al., 1996) (**Figura 7**). Además, mutaciones en el gen de la PS-1 pueden facilitar la apoptosis por desestabilización de la  $\beta$ -catenina (Nishimura et al., 1999).

#### **4. ESTRÉS OXIDATIVO EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Cuando hablamos de estrés oxidativo, nos referimos a un grave desequilibrio entre la producción de especies reactivas y los sistemas de defensa antioxidante. El estrés oxidativo puede producirse por una disminución de los niveles de agentes antioxidantes. Ejemplos de ello son mutaciones que afecten a la actividad de enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa Cu/Zn citosólica o la glutatión peroxidasa, o bien por productos tóxicos que reducen las concentraciones de antioxidantes. Esto último sucede con algunos xenobióticos, sobre los cuales pueden actuar los sistemas desintoxicantes celulares generándose quinonas que pueden reducir los niveles de glutatión y causar estrés oxidativo. Por otro lado, el estrés oxidativo puede producirse también por un aumento en la producción de especies reactivas, entre las que se encuentran las especies reactivas de oxígeno, del nitrógeno, del bromo y del cloro (Halliwell, 2006). Estas moléculas son producidas, por ejemplo, tras una exposición prolongada a niveles elevados de oxígeno como consecuencia de una elevada producción de poder reductor en las formas de NADH ó FADH<sub>2</sub> o por una exposición a toxinas que en sí mismas son especies reactivas.

El daño oxidativo puede definirse como el daño biomolecular que se produce por el ataque de las especies reactivas durante el estrés oxidativo. El estrés oxidativo, por tanto, puede causar un daño celular que afecta al DNA, lípidos y proteínas fundamentalmente. No todo el daño que produce el estrés oxidativo es producido por especies reactivas. También se producen daños, por ejemplo, por alteraciones en niveles de iones, generados por el estrés oxidativo o por activación de proteasas. Además, si el daño oxidativo se produce en el DNA mitocondrial puede generar una síntesis de los componentes proteicos de los complejos de la cadena respiratoria deficientes; este hecho origina, en última instancia, un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno o una pérdida en la capacidad para sintetizar ATP, lo que puede desencadenar la muerte celular por apoptosis o necrosis.

La mitocondria es la fuente importante de productos ROS, ya que se ha calculado que el 1% del oxígeno molecular que entra en la cadena respiratoria no es reducido completamente, provocando la formación del anión superóxido y demás productos ROS asociados (Boveris & Chance, 1973).

Entre las distintas especies reactivas de oxígeno producidas por la célula (peróxido de hidrógeno, anión superóxido, radical hidroxilo), el radical hidroxilo es el más reactivo frente a cualquier biomolécula. Éste se forma como producto de la reacción de Fenton entre el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y distintos metales de transición (normalmente el  $\text{Fe}^{2+}$  y el  $\text{Cu}^+$  (Wardman & Candeias, 1996)). Posteriormente, la reducción de los metales de transición oxidados durante la reacción de Fenton ( $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ ), por la vitamina C, el tocoferol u otros agentes reductores celulares, regenera los metales de transición “activos”, que pueden dar lugar, mediante ciclos redox, a la formación de radicales libres. A menudo, los niveles de estos reductores celulares y de las defensas antioxidantes se encuentran disminuidos en diferentes enfermedades neurodegenerativas (De Leo et al., 1998). Por otro lado, se pueden generar especies reactivas de nitrógeno mediante la reacción del radical óxido nítrico con el anión superóxido, produciendo el anión peroxinitrito y el radical dióxido de nitrógeno, el cual puede nitrar residuos de aminoácidos aromáticos, causar daños en el DNA y oxidar grupos tioles (Smith et al., 1997; Temple et al., 2005).

Existen una variedad de antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos), que protegen a la célula del daño oxidativo. Por ejemplo, la superóxido dismutasa Cu-Zn citosólica y la superóxido dismutasa Mn mitocondrial son responsables de la conversión del anión superóxido a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , controlando el equilibrio de metales, los cuales son esenciales para que se de una correcta homeostasis celular. Además, existen otras enzimas que catalizan la formación de agua a partir del peróxido de hidrógeno, como son la catalasa o la glutatión peroxidasa.

El sistema nervioso central es particularmente susceptible de sufrir daño oxidativo (Halliwell, 1992) debido a varias razones: el consumo de oxígeno es elevado (20% de consumo basal de oxígeno del cuerpo); existen monoamino oxidasas (específicas de cerebro) que son capaces de generar especies reactivas; contiene niveles elevados de ácidos grasos poliinsaturados de membrana, susceptibles de ser atacados por radicales libres; es relativamente deficiente en sistemas antioxidantes (actividad de la catalasa baja y actividad moderada de superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa) y, en determinadas regiones cerebrales, se encuentran altos niveles de hierro y ascorbato, permitiéndose la generación de más especies reactivas de oxígeno mediante las reacciones de Fenton y de Haber Weiss (reacción esta última que recupera los niveles de metales de transición reducidos).

La mitocondria también sirve como lugar de almacenaje de  $\text{Ca}^{2+}$ , manteniendo así la homeostasis celular del  $\text{Ca}^{2+}$  que es necesaria para un correcto funcionamiento de la neurona (Moreira et al., 2007). En este sentido, se ha demostrado que una entrada excesiva de calcio en la mitocondria produce un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno, inhibe la síntesis de ATP y modula la permeabilidad de la membrana mitocondrial, con lo que se produce la liberación al citosol de pequeñas proteínas de bajo peso molecular (que en situaciones normales se encuentran alojadas dentro de la mitocondria) que inician la apoptosis, como el citocromo c y el factor inductor de apoptosis (AIF, del inglés “Apoptosis Inducing Factor”). El citocromo c al unirse en el citosol al factor de activación de proteasas apoptóticas 1 (Apaf-1) y a la procaspasa 9 forman el apoptosoma y activan la cascada de las caspasas (proteasas conocidas como cisteinil-aspartil proteasas), que median el procesamiento proteolítico de numerosas proteínas intracelulares. Se ha propuesto que todas estas alteraciones de la función mitocondrial normal pueden desencadenar la enfermedad de Alzheimer (Moreira et al., 2007).

Durante el envejecimiento el número mitocondrias se reduce y, al mismo tiempo, los lisosomas acumulan desechos celulares en forma de gránulos de lipofuscina (Brunk & Terman, 2002). Se cree que estos hechos no son solo consecuencia de un estrés oxidativo continuo, el cual causa la oxidación de constituyentes de la mitocondria y distintas moléculas autofagocitadas, sino también por que las células son incapaces de eliminar estructuras o moléculas oxidadas dañadas (Terman & Brunk, 2006; Terman et al., 2006). De hecho, el acúmulo de lipofuscina, produce una disminución de la capacidad degradativa de los lisosomas, impidiendo que las enzimas lisosomales se concentren en el autofagosoma, limitando el reciclaje de mitocondrias (Grune et al., 2004; Moreira et al., 2007; Terman et al., 2007). Por todas estas razones, el reciclaje mitocondrial disminuye con la edad, produciendo un incremento del estrés oxidativo, una acumulación de orgánulos dañados y lipofuscina, una disminución de la producción de ATP, una liberación de factores apoptóticos y, eventualmente, la muerte celular, ya que las neuronas no pueden asumir esta conjunción de daños en su estructura que se traducen en daños en su fisiología (Cavallini et al., 2007; Cuervo et al., 2005; Kurz et al., 2007).

Junto con todos los procesos descritos anteriormente, la acumulación de agregados de proteínas parece jugar un papel importante en la enfermedad de Alzheimer (Mattson & Sherman, 2003).

#### **4.1. Formación de agregados de tau y su relación con el estrés oxidativo**

Como ya se ha mencionado el envejecimiento es un proceso inevitable asociado a la acumulación de daños oxidativos en las biomoléculas que constituyen las células y tejidos de un organismo (Harman, 1956). Además, el envejecimiento se ha relacionado con el consumo de glucosa. Distintos modelos animales en los que se modifican las vías de señalización implicadas en el consumo de glucosa han indicado su implicación en el envejecimiento (Kenyon, 2001; Kenyon et al., 1993; Kim, 2007; Tatar et al., 2003). En los mamíferos, la hiperglicemia produce un incremento en la expresión y secreción de insulina, la cual es responsable, a su vez, de la utilización de glucosa por las células. Los mecanismos moleculares por los cuales la insulina ejerce su acción, implica que se activen o inactiven quinasas, como la proteína quinasa B o la GSK-3 respectivamente, favoreciendo que no se fosforilen ciertos sustratos como la proteína tau. También la activación de esta vía de señalización produce una disminución de la actividad de factores de transcripción como FOXO, que potencian la resistencia al estrés oxidativo (Kops et al., 2002; Nemoto & Finkel, 2002; van der Horst & Burgering, 2007). Por tanto, la existencia de unos niveles elevados de glucosa, ya sea por enfermedades como la diabetes, por sedentarismo o simplemente por envejecimiento, puede producir un aumento en las concentraciones de especies reactivas de oxígeno. Así, se ha observado que durante episodios de restricción calórica disminuyen los niveles de ROS y el ejercicio regula la actividad de la glucógeno sintasa, disminuyendo los niveles altos de glucosa. En la enfermedad de Alzheimer todas estas vías pueden estar alteradas, produciéndose un aumento del estrés oxidativo. Además, se ha descrito que en casos de enfermedad familiar, ocasionados por mutaciones en distintos genes que codifican proteínas como la APP, la PS-1 o la PS-2 (proteínas que están implicadas en la producción del péptido A $\beta$ ), los cambios observados en los niveles de A $\beta$  pueden inducir estrés oxidativo (Butterfield et al., 2002; Nguyen et al., 2007; Nunomura et al., 2004).

Por otro lado, se ha descrito como, la proteína tau, aparece modificada por procesos de estrés oxidativo (Nunomura et al., 2001; Sayre et al., 1997; Smith et al., 1994; Smith et al., 1997; Smith et al., 1998; Takeda et al., 2000). La proteína tau puede reaccionar con productos del estrés oxidativo como son los peróxidos lipídicos o productos de su degradación (como el 4-HNE) y azúcares, dando lugar a la formación de productos finales de glicación avanzada (Yan et al., 1994) y tau entrecruzado.

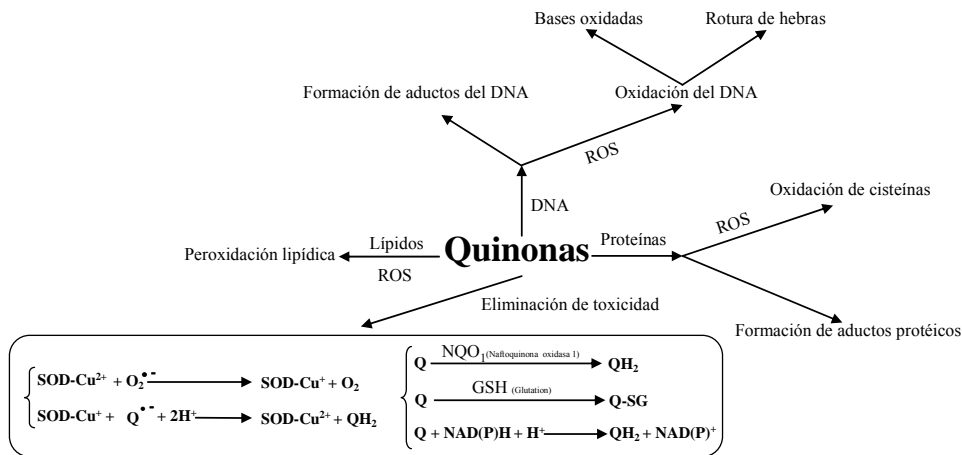
Además, se ha estudiado cómo el estrés oxidativo mitocondrial puede causar la hiperfosforilación de tau (Melov et al., 2007), o como distintos inhibidores del complejo I mitocondrial pueden causar la patología de tau (Escobar-Khondiker et al., 2007; Hoglinger et al., 2005).

Todas estas modificaciones afectan a la función normal de la proteína tau y favorecen su agregación.

En el año 2001, se publicó un trabajo en el que se relacionaba el estrés oxidativo producido por una quinona, la menadiona, con la agregación de tau (Utton et al., 2001). Previamente, se había descrito que esta misma quinona mediaba la desfosforilación de la proteína tau (Ko et al., 1997). Las quinonas son moléculas altamente reactivas que pueden llevar a cabo ciclos redox a través de sus radicales semiquinónicos, dando lugar a la aparición de especies reactivas de oxígeno (**Figuras 6 y 9**) como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno o el radical hidroxilo, entre otras. Las quinonas representan una clase de intermediarios toxicológicos que pueden producir diferentes efectos *in vivo* (Bolton et al., 2000). En proteínas, las quinonas pueden producir, tanto por la formación de especies reactivas de oxígeno (**Figuras 6 y 9**), como por reacciones de adición de Michael o formación de bases de Schiff (reacciones de alquilación o arilación que ocurren principalmente en lisinas o histidinas) (**Figuras 6 y 9**), la oxidación de cisteínas; dicha oxidación favorece la formación de puentes disulfuro (intra o intermoleculares), o la generación de aductos o agregados proteicos, respectivamente, siendo todos ellos altamente dañinos para la célula. Los lípidos pueden sufrir peroxidación por las especies reactivas de oxígeno, producidas por las quinonas. Respecto al DNA, las quinonas pueden mediar la formación de aductos o roturas de las hebras, así como, mediante la formación de ROS, producir la oxidación de las bases (**Figura 9**). Además, quinonas como el coenzima Q (cofactor importante en la bioenergética mitocondrial (James et al., 2005)), han sido implicadas directamente en alteraciones energéticas relacionadas con el envejecimiento (Hirai et al., 2001; Larsen & Clarke, 2002).

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral hemos estudiado cómo diferentes quinonas pueden favorecer la agregación de la proteína tau (marca histopatológica que aparece en la enfermedad de Alzheimer y otras tauopatías), y cómo afectan a otras proteínas microtubulares. Se han utilizado derivados quinónicos que se generan fisiológicamente y están directa o indirectamente relacionados con el coenzima Q (en las vías de síntesis o de degradación), distintos derivados xenobióticos (presentes como aditivos en alimentos o como agentes contaminantes y que como consecuencia de su metabolismo generan derivados quinónicos), junto a productos generados como consecuencia de la acción de productos ROS. Hemos visto como la forma oxidada del coenzima Q<sub>0</sub>, favorece la polimerización de tau (fosforilado o no), de una forma muy eficiente (Santa-Maria et al., 2004), aunque no solo el coenzima Q<sub>0</sub> facilita la polimerización de tau, sino también otras quinonas (Santa-Maria et al., 2004; Santa-Maria et al., 2006).





**Figura 9. Mecanismos citotóxicos de las quinonas.** Las quinonas pueden producir especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que afectan a lípidos, proteínas y DNA. Además las quinonas son capaces de reaccionar directamente con DNA y proteínas, modificándolas irreversiblemente y causando así un daño celular, en muchos casos irreparable. En la figura se puede observar, en el recuadro, los principales sistemas que presenta la célula para evitar el daño citotóxico producido por las quinonas. En casos de toxicidad aguda, se produce una pérdida casi total de glutation, permitiendo una elevada concentración de ROS muy perjudicial para la célula.

**5. NUEVAS TERAPIAS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Hoy en día, existen cinco fármacos que están siendo utilizados para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer; cuatro de ellos son inhibidores de colinesterasa, como el Donazepilo, la Rivastigmina, la Galantamina y la Tacrina. El quinto es un modulador de los receptores NMDA, la Memantina. Con el uso de estos fármacos se trata de modificar los síntomas de la enfermedad de Alzheimer, aunque no previenen o revierten la progresión de la enfermedad (Melnikova, 2007) (**Figura 10**).

Actualmente, se están desarrollando nuevos fármacos dirigidos contra dos dianas terapéuticas, como son el péptido Aβ y la proteína tau; ambas son, en definitiva, los constituyentes principales de las placas seniles y los ovillos neurofibrilares consideradas como principales marcas histopatológicas y causas fisiopatológicas de la enfermedad de Alzheimer. Además, los agregados de tau son causantes de otras enfermedades conocidas como Tauopatías.

Además, numerosos estudios están analizando el posible papel beneficioso del uso de antioxidantes y anti-inflamatorios que evitan el daño oxidativo y que producen una disminución de la activación de microglia en la enfermedad de Alzheimer (Esposito et al., 2002; Zandi et al., 2004).

**5.1. Terapias dirigidas contra el péptido Aβ**

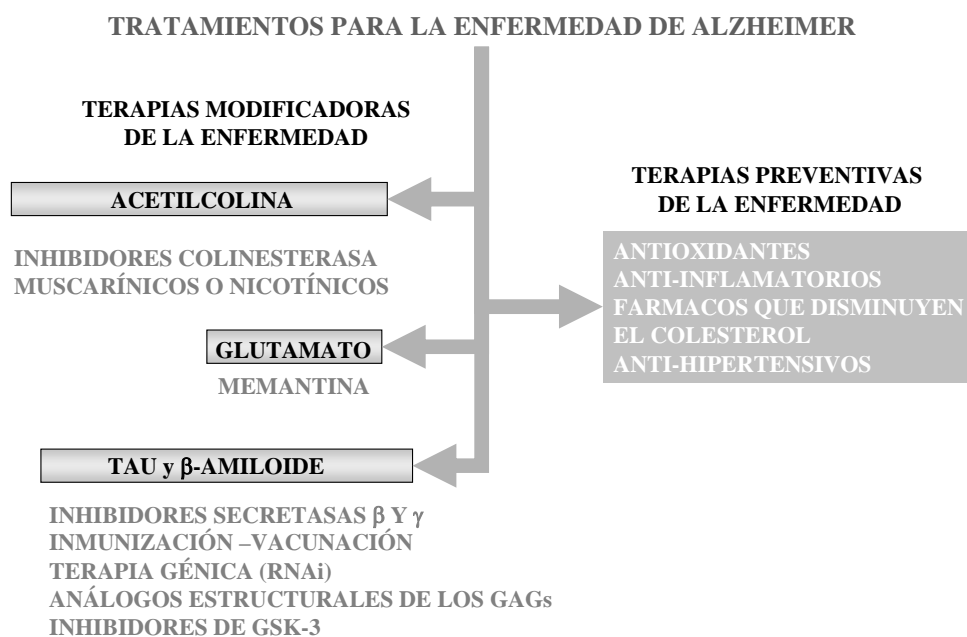
Entre las terapias dirigidas contra el péptido β amiloide, se encuentran las que pretenden alterar la producción de la APP mediante el uso de inhibidores de la traducción, con la consiguiente disminución de la producción del péptido β amiloide. Otras terapias como el uso de activadores de las α-secretasas se enfocan hacia la producción de fragmentos de la APP que no son amiloidogénicos y, por tanto, protectores. Por otro lado, se están desarrollando inhibidores de β-secretasa y γ-secretasa (como el

Tarenflurbil), que como se ha mencionado anteriormente, son las enzimas responsables de la generación del péptido amiloidogénico A $\beta$ .

Además de estas terapias, que pretenden disminuir la cantidad de péptido  $\beta$  amiloide, existen actualmente en desarrollo otras que pretenden alterar la acumulación del péptido A $\beta$  y su agregación. De esta manera se pretende neutralizar la toxicidad generada por el péptido A $\beta$ , las fibrillas de  $\beta$  amiloide y las placas seniles. Entre los fármacos que se están desarrollando, se encuentran los que evitan su acumulación, como vacunas con anticuerpos anti-A $\beta$  (ACC-001 (inmunización activa) o el Bapineuzumab (inmunización pasiva)), o los que inhiben la formación de agregados de  $\beta$  amiloide, entre los que se encuentra el Tramiprosato (Gervais et al., 2007). Este compuesto mimetiza los GAGs (McLaurin et al., 1999) inhibiendo la formación de agregados. Dicho compuesto ha sido utilizado durante esta tesis doctoral para estudiar, por el contrario, su implicación en la agregación de tau (Santa-Maria et al., 2007).

## 5.2. Terapias dirigidas contra la proteína tau

Como terapias dirigidas contra tau, se están desarrollando y estudiando distintos inhibidores de quinasas implicadas en la hiperfosforilación aberrante de tau (Mazanetz & Fischer, 2007), e inhibidores de la agregación (Honson et al., 2007; Khlistunova et al., 2006; Pickhardt et al., 2007; Taniguchi et al., 2005). También se están llevando a cabo estudios en los que se trata de alterar la síntesis de tau (Ashe, 2007; Marx, 2007; Roberson et al., 2007; Santacruz et al., 2005) o el plegamiento aberrante de la misma. Actualmente se ha estudiado el papel que pueden jugar distintas chaperonas de tau en la enfermedad de Alzheimer. Además se está evaluando la posibilidad de utilizar agentes que estabilicen los microtúbulos, disminuyendo así los daños producidos tras la hiperfosforilación de tau (Trojanowski et al., 2005).



**Figura 10. Principales terapias en uso y en desarrollo hoy en día para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.** En el diagrama se representan las terapias más importantes que se están utilizando tanto para reducir los síntomas del deterioro cognitivo, así como tratamientos que tratan de prevenir y disminuir la progresión de la enfermedad.

# Objetivos

En esta tesis nos hemos propuesto realizar estudios sobre la fosforilación y agregación de la proteína tau en presencia de diferentes derivados quinónicos y compuestos que mimetizan la acción de los glicosaminoglicanos sulfatados, investigando su posible implicación con la enfermedad de Alzheimer. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Identificación de derivados quinónicos en estructuras aberrantes encontradas en los cerebros de enfermos de Alzheimer: PHFs y cuerpos de Hirano.
2. Estudiar el efecto de diferentes derivados quinónicos sobre la polimerización de la proteína tau *in vitro*.
3. Caracterización y mapeo de las regiones de la proteína tau implicadas en la polimerización promovida por las quinonas *in vitro*. Estudio del efecto de la fosforilación sobre el ensamblaje de la proteína tau.
4. Estudio de los mecanismos de ensamblaje de los PHFs y los cuerpos de Hirano.
5. Análisis del efecto de diferentes derivados quinónicos sobre la agregación y polimerización de tau en cultivos celulares.
6. Caracterización del efecto de las quinonas sobre el citoesqueleto de microtúbulos.
7. Estudio del efecto de compuestos que mimetizan la acción de los glicosaminoglicanos sulfatados sobre la agregación de tau y su posible repercusión en la terapia de la enfermedad de Alzheimer.

# **Materiales y Métodos**

## 1. MATERIALES Y REACTIVOS

Las siguientes naftoquinonas y benzoquinonas se obtuvieron de Sigma-Aldrich (España): 5-hidroxi-1, 4-naftoquinona (juglona, Ref. H4, 700-3), 2-hidroxi-1, 4-naftoquinona (lausona, Ref. H0508), 2-metil-3-fetil-1, 4-naftoquinona (vitamina K<sub>1</sub>, Ref.V-3501), 2-metil-1, 4-naftoquinona (menadiona, Ref. M-5625), 2-metil-1, 4-naftoquinona bisulfito sodico (bisulfito sódico menadiona, Ref. 5750), *p*-benzoquinona (Ref. B-1266), hidroquinona (Ref. H-9003), tetrametil-*p*-benzoquinona (duroquinona, Ref. D22, 320-4), 2,3 dimetoxi-5-metil-1, 4-benzoquinona (coenzima Q<sub>0</sub> (CoQ<sub>0</sub>) o DMM, Ref. D9150), 2,3 dimetoxi-5-metil-6-decil-1, 4-benzoquinona (decilubiquinona, Ref. D7911). Todas se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO), pero no se conservaron a -20°C debido a que al ser muy reactivas se oxidan rápidamente.

La heparina (Ref. H8537), el clorhidrato de dopamina (Ref. H8502), cloruro de hierro III (Ref. F-2877), GTP (Ref. G5884) y la albúmina se disolvieron en agua y también se obtuvieron de Sigma-Aldrich (España).

El 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) (Cayman Chemical Corporation, cat n° 32100) fue preparado según lo descrito previamente (Xu et al., 1999).

La tioflavina-S (Ref. T1892), la heparinasa I (Ref. H2519), el ácido 3-amino-propanosulfónico (3-APS, Ref. A4147) y la taurina (Ref. T9931), se obtuvieron de Sigma-Aldrich (España).

El ( $\gamma^{32}\text{P}$ )-ATP se obtuvo de Amersham Biosciences y el ATP de Boehringer-Mannheim (actualmente Roche Diagnostics). La subunidad catalítica de la Proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA, Ref. P2645. Sigma) y la glucogeno sintasa quinasa-3 beta (GSK-3 $\beta$ , Ref. G1663. Sigma) se resuspendieron en agua, se alicuotearon y guardaron a -20°C hasta su uso. El ácido okadaico (inhibidor de fosfatasas) se obtuvo de LC Laboratories (Woburn, MA).

El fluoruro de fenilmetilsulfato (PMSF), 2-mercaptoetanol, N-laurilsarcosinato y reactivos como: Tris, MES, PIPES, EDTA, EGTA, cloruro de magnesio y cloruro de sodio se obtuvieron de Sigma.

El dibutiril-monofosfato de adenosina cíclico (dibutiril AMP cíclico, Ref. D-0627, Sigma) fue disuelto en tampón fosfato salino 1X (PBS 1X), esterilizado por filtración utilizando filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  y conservado a -20°C hasta su uso.

La resina de intercambio aniónico, DEAE Sephacell-R, se compró a Pharmacia-Biotech (Code n° N7-0500-01).

## 2. ANTICUERPOS

Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en esta tesis, así como las diluciones empleadas en la electrotransferencia e inmunodetección (Western-Blot), tinción inmunocitoquímica, inmunohistoquímica e inmunomarcaje con oro coloidal (Inmunomicroscopía electrónica), se resumen en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados

<i>Anticuerpo</i>	<i>Antígeno</i>	<i>Especie</i>		<i>Aplicación</i>				<i>Procedencia</i>
		<i>Monoclonal</i>	<i>Policlonal</i>	<i>WB</i>	<i>IC</i>	<i>IME</i>	<i>IHQ</i>	
<b>Anti-<math>\beta</math>-tubulina</b>	$\beta$ -tubulina	Ratón		1:2000	1:400			Sigma-Aldrich
<b>Anti-<math>\alpha</math>-tubulina</b>	$\alpha$ -tubulina	Ratón		1:2000	1:400			Sigma-Aldrich
<b>196</b>	tubulina		Conejo		1:200			Generado en nuestro laboratorio
<b>Anti-<math>\beta</math>-actina</b>	$\beta$ -actina	Ratón		1:2500				Sigma-Aldrich
<b>T14</b>	Tau (G83-G120)	Ratón		1:1000	1:500	1:40		Zymed Laboratories
<b>7.51</b>	Tau (region de unión a tubulina)	Ratón		1:1000				Dr. Wischik (MRC, Cambridge, Reino Unido)
<b>Tau-5</b>	Tau (S210-R230)	Ratón		1:1000	1:500		1:1000	Chemicon
<b>Tau-1</b>	Tau (S202-T205)	Ratón		1:1000	1:500			Chemicon
<b>Alz-50</b>	Tau (conformacional)	Ratón		1:100				Dr. P. Davies (E.E.U.U.) (Jicha et al, 1999)
<b>12E8</b>	Fosfo-Tau (S262)	Ratón		1:1000				Dr. Seubert (Seubert et al, 1995)
<b>PHF-1</b>	Fosfo-Tau (S396-S404)	Ratón		1:100				Dr. P. Davies (E.E.U.U.) (Greenberg & Davies, 1990)
<b>AT8</b>	Fosfo-Tau (S202-T205)	Ratón		1:100				Innogenetics
<b>AT180</b>	Fosfo-Tau (T231)	Ratón		1:100				Innogenetics
<b>422</b>	Fosfo-Tau (S422)	Ratón		1:100				Innogenetics
<b>Anti-CoQ<sub>0</sub></b>	aductos Q <sub>0</sub> -proteína		Conejo	1:6000	1:500	1:100		Dr. MacDonald (E.E.U.U.) (MacDonald et al, 2004)
<b>Anti-Cy3/Cy5</b>	Cy3/ Cy5	Ratón		1:1000				Sigma-Aldrich

WB: western blot; IC: inmunocitoquímica; IME: inmunomicroscopía electrónica; IHQ: inmunohistoquímica.

Tabla 2. Anticuerpos secundarios utilizados

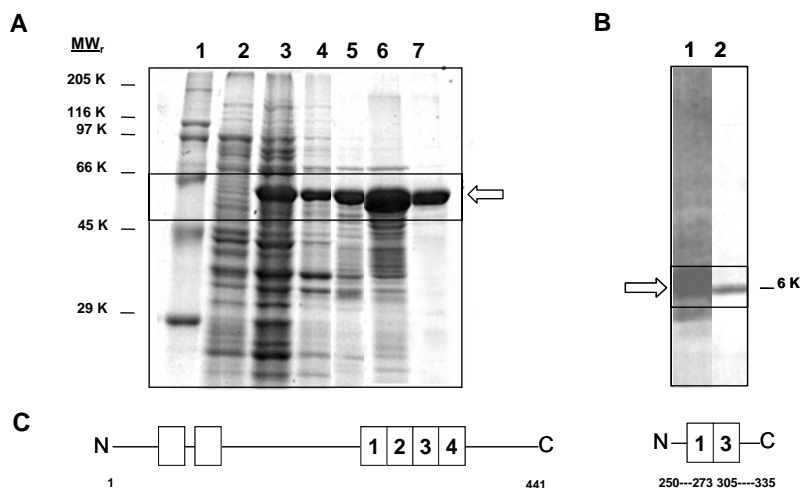
<i>Anticuerpos conjugados</i>	<i>Especie</i>	<i>Aplicación</i>			<i>Procedencia</i>
		<i>WB</i>	<i>IC</i>	<i>IME</i>	
<b>Anti-ratón HRP</b>	Cabra	1:2500			Dako
<b>Anti-conejo HRP</b>	Cabra	1:2500			Dako
<b>Anti-ratón Alexa 488, 594, 647</b>	Cabra		1:1000		Molecular probes
<b>Anti-conejo Alexa 488, 594, 647</b>	Cabra		1:1000		Molecular probes
<b>Anti- ratón-oro coloidal 10 nm</b>	Cabra			1:50	Biocell Research Laboratories
<b>Anti-conejo-oro coloidal 10 nm</b>	Cabra			1:50	Biocell Research Laboratories

WB: western blot; IC: inmunocitoquímica; IME: inmunomicroscopía electrónica;

### 3. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA TAU

#### 3.1 Purificación de tau 42 y tau 2R

La expresión y purificación de la proteína recombinante htau 40 (tau 42 ó tau 4R), isoforma de mayor tamaño presente en el sistema nervioso central, la cual se diferencia por la expresión del exón 10 y los exones 2 y 3 (insertos aminoterminales) (Goedert et al., 1989) y su fragmento tau 2R (primera y tercera repetición del dominio de unión a tubulina), se realizó según se ha descrito previamente (Moreno et al., 1995; Perez et al., 1996). Brevemente, tau 42 (residuos 1-441) y tau 2R (residuos 250-273 unidos a los residuos 305-335), se clonaron en el vector pRK172 (Medina et al., 1995), para su expresión inducible en *E. coli*. La purificación de la proteína se desarrolló siguiendo un protocolo que incluye un paso de choque térmico a 100 °C en un tampón que contiene 100 mM Tris pH 7.5, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 1 mM 2-mercaptoetanol, 100 mM NaCl y los inhibidores de proteasas: 2 mM PMSF, 10 µg/ml de aprotinina, de leupeptina y de pepstatina, durante 5 minutos. La proteína soluble se aisló por centrifugación y posterior precipitación con sulfato amónico; la proteína precipitada se resuspendió en PBS 1x, se dializó y se realizó una cromatografía de intercambio iónico utilizando la resina DEAE Sephacel-R, equilibrada previamente en PBS 1x. La proteína se eluyó utilizando 1M NaCl en PBS 1x. Posteriormente la proteína fue caracterizada mediante electroforesis en gel de acrilamida/bis-acrilamida (10 %) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Figura 11).



**Figura 11. Purificación de tau 42 y del péptido tau 2R.** A) Procedimiento de purificación de tau 42. Carril 1: marcadores de peso molecular. Carril 2: extractos de bacterias en las que no se ha inducido la expresión de la proteína. Carril 3: extractos de bacterias en las que se ha inducido la expresión de la proteína. La proteína se purificó en varias etapas incluyendo una de resistencia térmica (carril 4), precipitación con sulfato amónico (carril 5), cromatografía en DEAE sephacel-R (carril 6) y una precipitación adicional con sulfato amónico. B) Se purificó tau 2R de la misma manera y se muestran los carriles 1 y 2, extractos de bacterias en las que se ha inducido la expresión de la proteína y paso final de la purificación respectivamente. En C) se muestran los diagramas de los polipéptidos en los que se pueden apreciar cuadros numerados que indican los distintos motivos de unión a tubulina de ambas proteínas tau 42 y tau 2R.

#### 3.2 Obtención y purificación de otras proteínas o péptidos utilizados

La expresión y purificación de la isoforma de tau que contiene tres repeticiones del dominio de unión a tubulina (no se expresa el exon 10), tau30 (tau 3R, residuos 1-410), así como los fragmentos que se han derivado de esta isoforma; péptido tau 2N, que contiene el extremo amino sin la región de unión a tubulina (residuos 1-240), péptido tau 3RC, que contiene tres repeticiones del dominio de unión a



tubulina y el extremo carboxilo (residuos 240-410), y péptido tau 3R (residuos 240-335), que contiene únicamente las tres repeticiones del dominio de unión a tubulina, se realizó según lo descrito previamente (Medina et al., 1995; Moreno et al., 1995; Perez et al., 1996). También se expresaron y purificaron tres variantes de la proteína tau 42 (tau 4R) y tres de la proteína tau 30 (tau 3R): tau 4R $\Delta_{306-311}$ , tau 4R $\Delta_{317-335}$ , tau 4R $\Delta_{305-335}$  y tau 3R $\Delta_{275-281}$ , tau 3R $\Delta_{287-305}$  y tau 3R $\Delta_{275-305}$  respectivamente, siguiendo el protocolo descrito en el apartado anterior. En estas variantes se han deletado dos de las secuencias importantes de la tercera repetición del dominio de unión a tubulina o la tercera repetición completa. Estas variantes se obtuvieron en el laboratorio por la Dra. Mar Pérez (Perez M et al., 2007; Santa-María et al., 2006).

Además, los péptidos correspondientes a los residuos 306-311 (VQIVYK) y sus variantes (Santa-Maria et al., 2006), el péptido 1/2R (residuos 317-335; KVTSKCGSLGNIHHKPGGG) y su variante fosforilada en las serinas 320 y 324, el péptido “VQIINK” (residuos 275-280) y sus variante mutada en la asparagina a ácido aspártico “VQIIDK” y el péptido correspondiente a los residuos 274-305 (VQIINKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGG) y su variante con la asparagina 279 mutada a ácido aspártico (VQIIDKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGG), fueron sintetizados químicamente por NeomPS S.A (Estrasburgo, Francia).

#### **4. PURIFICACIÓN DE FILAMENTOS HELICOIDALES APAREADOS (PHFs) DE CEREBRO HUMANO DE ENFERMOS DE ALZHEIMER**

Las muestras de cerebros post-mortem de pacientes con Alzheimer, fueron usadas como fuente para aislar los filamentos helicoidales apareados. Las fracciones de PHFs se obtuvieron siguiendo el método descrito por Greenberg y Davies (Greenberg & Davies, 1990). La presencia de PHFs se determinó por microscopía electrónica (Nieto et al., 1988).

#### **5. FOSFORILACIÓN DE TAU *IN VITRO***

##### **5.1. Fosforilación de tau por proteína quinasa A y glucógeno sintasa quinasa-3 $\beta$**

La fosforilación de tau 42, tau2R y la variante de tau, tau 4R $\Delta_{306-311}$ , por la PKA y la GSK-3 $\beta$  se realizó según lo descrito previamente (Arrasate et al., 1997; Martin et al., 2002; Stambolic & Woodgett, 1994). La fosforilación de tau por la PKA (25 unidades/ensayo) ó GSK-3 $\beta$  (5 unidades/ensayo) se realizó en 50 mM Tris HCl pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA y 1  $\mu$ M ácido okadaico, a 37°C durante 30 minutos (en algunos casos, hasta 3 horas). Brevemente, se mezclaron la quinasa PKA o la quinasa GSK-3 $\beta$  y concentraciones crecientes (1-4  $\mu$ g), de sustrato (tau 42, tau 2R o la variante de tau, tau 4R $\Delta_{306-311}$ ), durante los tiempos indicados, en un volumen total de 15  $\mu$ l en una solución tampón que contiene 20  $\mu$ M ATP (en ensayos de incorporación se utilizaron distintas cantidades de ATP, hasta 200  $\mu$ M) y 0.2  $\mu$ Ci de ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P)-ATP.

Para medir la radioactividad incorporada, 4  $\mu$ l del medio de reacción fueron depositadas sobre piezas de 2 x 2 cm de papel de fosfocelulosa Whatman P81. Tras 20 seg, se lavaron las muestras 4 veces (al menos diez minutos cada una), con ácido fosfórico 1%. Los papeles con las muestras secas se transfirieron a los viales de centelleo y se midió la radiactividad en un contador de centelleo líquido. La

proteína fosforilada también se caracterizó por electroforesis en gel de acrilamida/bis-acrilamida en condiciones desnaturalizantes, seguida de autoradiografía tras el previo secado de los geles. La incorporación de  $^{32}\text{P}$  se determinó mediante densitometría de las bandas de proteína marcada y posterior análisis con el programa GS-710 (Bio-Rad). Para calcular las concentraciones molares se estimó un peso molecular relativo de 44.000 dalton para la proteína tau y 5.500 dalton para el péptido tau 2R.

La presencia de cantidades similares de tau se confirmó mediante análisis por Western Blot (ver métodos más adelante). Como controles positivos de fosforilación por la PKA y GSK-3 $\beta$  se usaron la proteína p24 (Martin et al., 2002) y el péptido GS-1 (Stambolic & Woodgett, 1994), respectivamente. Los ensayos realizados en presencia de tioflavina-S o el péptido VQIVYK se llevaron a cabo de la misma manera que se ha descrito (ATP 20 $\mu\text{M}$  y durante una hora).

Los sitios de fosforilación de la proteína tau y su variante, se identificaron mediante espectrometría de masas (Servicio de Proteómica, CBMSO) según lo descrito previamente (Reynolds et al., 2000).

## **6. ENSAMBLAJE Y AGREGACIÓN DE TAU RECOMBINANTE *IN VITRO***

### **6.1. Polimerización de tau, péptidos y variantes relacionadas.**

El ensamblaje de las proteínas se realizó según lo descrito previamente (Perez et al., 1996), y de forma similar al sistema de la “gota colgante” usado en cristalización de proteínas. En este sistema se colocan las gotas de proteínas a polimerizar dentro de cámaras selladas en las cuales, por difusión de vapor, se facilita la polimerización de la proteína tau (Crowther et al., 1994). Para obtener los polímeros de tau, 1 a 4  $\mu\text{g}$  de proteína (tau 42, variantes y péptidos relacionados), se mezclan en 10 ó 15  $\mu\text{l}$  de tampón A (0.1 M MES pH 6.4, 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$  y 2mM EGTA), que contienen 50 mM NaCl y concentraciones variables de heparina (hasta 0.5 mg/ml), o de HNE (0 a 3 mM), o de diferentes quinonas, como coenzima  $\text{Q}_0$ , benzoquinona o Juglona, en un intervalo de concentraciones de 0.25 a 8 mM. En el experimento de polimerización en presencia de dopamina (1-4 mM), se añadieron también distintas concentraciones de hierro ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (10 y 100  $\mu\text{M}$ ). En todos los casos, el reservorio de las cámaras donde se ponen las gotas colgantes se llena con tampón A 0.2 M NaCl. Los filamentos se obtuvieron tras una incubación de 4 días a 4°C.

### **6.2. Medidas de polimerización y agregación de tau, péptidos y variantes relacionadas**

Actualmente, las técnicas más utilizadas para la cuantificación de la formación de polímeros o agregados de tau son: A) la medición de la dispersión de luz emitida por un láser (Laser Light Scattering), la cual nos proporciona una medición exacta de cómo se forman los polímeros o agregados en función del tiempo o la concentración de proteína (Gamblin et al., 2000; Lomakin et al., 1996); B) la espectroscopia de fluorescencia mediante la utilización de colorantes fluorescentes, como la tioflavina-S o T, los cuales se unen con gran afinidad a bolsillos hidrofóbicos formados al plegarse y formarse estructuras como los polímeros de tau, para la medición mediante espectroscopia de fluorescencia (Friedhoff et al., 1998; LeVine, 1993); C) la sedimentación, técnica mediante la que se obtienen por centrifugación polímeros o

agregados formados en función del tiempo o la concentración, permitiendo la cuantificación de la proteína agregada (Chirita et al., 2003); y D) la Microscopia Electrónica de Transmisión, con la cual es posible visualizar las estructuras o polímeros formados e incluso hacer mediciones de anchura, longitud e incluso cuantificar el número de polímeros formados (Necula & Kuret, 2004). En el desarrollo de esta tesis, se han utilizado principalmente las dos últimas técnicas mencionadas.

### **6.2.1. Análisis por sedimentación**

En algunos experimentos, las muestras, tras la incubación con quinonas y demás compuestos, se centrifugaron durante 30 min a la máxima velocidad en una Airfuge (Beckman) y la proteína, presente en el precipitado y el sobrenadante, se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS. La electroforesis en gel de poliacrilamida se desarrolló según el procedimiento de Laemmli en gels del 10 ó del 18 % (Laemmli, 1970). Los gels se tiñeron con azul de coomassie, ó bien se analizaron por autoradiografía (cuando la proteína esta marcada con fosforo 32), en las condiciones previamente descritas. En otros casos se analizaron por Western Blot (ver métodos más adelante) utilizando el anticuerpo monoclonal 12E8 que reconoce la serina 262 fosforilada de tau (epitopo que es fosforilado por la PKA). La cantidad de proteína se cuantificó mediante densitometría utilizando un densitometro de Bio-Rad, modelo GS-6470, comparando las bandas de proteína obtenidas con bandas de albúmina de suero bovino de concentración conocida. Además, cuando las proteínas estaban fosforiladas y marcadas radiativamente se midió y determinó la radiación de Cerenkov mediante un contador de centelleo liquido (Kisielecki, 1969).

### **6.2.2. Análisis por microscopia e inmunomicroscopía electrónica de transmisión**

Los polímeros formados tras incubación de las distintas muestras de la manera anteriormente descrita, se visualizaron por microscopia electrónica. Las muestras se sometieron previamente a tinción negativa. Brevemente, las muestras se colocan durante unos minutos (entre 5 y 10), sobre una rejilla de cobre o níquel sombreada con carbono. Tras la adsorción de la muestra, las rejillas se tiñen con acetato de uranilo al 2% (p/v), durante 1 minuto y se lavan con agua destilada. Se dejan secar y se analizan en un microscopio electrónico modelo JEOL 1200EX operado a 100kV. Las microfotografías, tomadas con una cámara Eikonix IEEE-488 digital acoplada al microscopio electrónico, se realizaron a 80000 y 120000 aumentos, con un tamaño de píxel equivalente a 7 Å en el plano de la muestra. El procesamiento y mediciones se realizaron con el software Digital micrograph 2.1 de Gatan, para el cual se usaron estándares como control de las mediciones. Se escogieron cinco campos de visión al azar y se procesaron siguiendo el procedimiento descrito por Gamblin et al. (Gamblin et al., 2003).

Por otro lado, los filamentos aislados de células SH-SY5Y diferenciadas y tratadas (ver métodos más adelante), se analizaron por inmunomarcaje con oro coloidal (inmunomicroscopía electrónica). El inmunomarcaje se realizó tras la adsorción de las muestras a rejillas similares a las previamente descritas. Las rejillas se bloquearon con un solución de ovoalbúmina de pollo al 1% en PBS 1X durante 10 minutos y posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario (ver Tabla 1), durante 1 hora a temperatura

ambiente. Tras un lavado intensivo con PBS, las rejillas se incubaron con anticuerpos secundarios (anti-ratón o anti-conejo), conjugado con partículas de oro coloidal de 10 nm durante 30 minutos. Finalmente, las muestras se sometieron a tinción negativa con acetato de uranilo 2% y se visualizaron en el microscopio electrónico como se ha descrito anteriormente.

Adicionalmente, PHFs purificados de cerebros de enfermos de Alzheimer fueron analizados por inmunomicroscopia electrónica de la misma manera descrita anteriormente, mediante el uso de anticuerpos que reconocen a la proteína tau y a la quinona “coenzima Q<sub>0</sub>”.

## **7. POLIMERIZACIÓN Y PURIFICACIÓN DE TUBULINA**

La tubulina se purificó a partir de cerebros de rata (Wistar, hembras de 3 meses) (Shelanski et al., 1973), mediante ciclos de polimerización y despolimerización. La tubulina (1.5 mg/ml), se polimerizó en presencia de GTP 0.1 mM, a 37°C en un tampón A (100mM MES pH 6.5, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM EGTA). El ensamblaje de los microtúbulos en presencia ó ausencia de quinonas se determinó mediante tres tipos de análisis: (1) mediante microscopía electrónica, en la cual la proteína polimerizada se adsorbía en rejillas de níquel y posteriormente se visualizaba con un microscopio electrónico de transmisión (JEOL 1200 EX); (2) por sedimentación de los polímeros (microtúbulos) (Medina et al., 1995), y (3) por turbidimetría (light scattering) (Gaskin et al., 1974; Gaskin et al., 1975).

## **8. INMUNOHISTOQUÍMICA**

Los ratones fueron anestesiados con una solución xylazine/ketamine y perfundidos transcardialmente con paraformaldehído al 4% (PFA), en tampón Sorensen durante 10 minutos. Los cerebros se postfijaron en PFA 4% durante 2 horas a 4°C y después se crioprotegieron en disolución de sacarosa al 30% en PBS durante 2 días. Se cortaron secciones sagitales de 30 µm en un criomicrotomo (Leica), y se recogieron en una solución de 0,1% azida-PBS. Las secciones se pretrataron durante 1 h con 1% BSA, 5% FBS y 0,2% Triton X-100. Después se incubaron las secciones con el anticuerpo primario Tau-5. Posteriormente, se incubaron las secciones con el complejo avidina-biotina usando el kit de Elite Vectastain. La reacción cromógena se realizó con diaminobenzidina y 0,003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 10 minutos. Las secciones fueron montadas con Fluoromount-G y se visualizaron por microscopia óptica (Microscopio vertical Axioskop2 plus (Zeiss)) y con una lupa de Leica.

## **9. CULTIVOS CELULARES**

Todos los cultivos de la presente tesis se mantuvieron en un incubador a una temperatura de 37°C, 5 % 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.

## 9.1 Cultivo de líneas celulares

Las líneas celulares NIH-3T3 (fibroblasto de ratón), HEK 293 (embrionarias humanas de riñón), HEK 293T (modificadas con el antígeno T de SV-40) y SH-SY5Y (neuroblastoma humano) se crecieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, 4,5 g/l glucosa) suplementado con suero bovino fetal (FBS; Invitrogen Life Technologies-Gibco, España) al 10%, L-glutamina 2 mM y mezcla de antibióticos (penicilina 100U/ml y estreptomycin 100 mg/ml). Adicionalmente, la línea establemente transfectada HEK 293 Tau3R (cedida por el Dr. Miguel Medina, actualmente en Neuropharma, Madrid, España), fue mantenida en presencia del antibiótico de selección Zeocina (200µg/ml; Invivo Gen).

Los pases para mantenerlas se hacen con tripsina/EDTA, durante 5 minutos a 37°C, para disgregarlas antes de volver a plaquearlas (antes de plaquearlas se centrifugan, se lavan (PBS 1X) y se recuentan).

### 9.1.1. Diferenciación del neuroblastoma humano 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-B27 (Invitrogen Life Technologies-Gibco), suplementado con dbAMPc 2 mM y Glutamina 1 mM durante 7 días. A este tiempo, el 90% de las células presentan una morfología similar a neuronas con extensiones semejantes a neuritas.

### 9.1.2. Aislamiento de filamentos de tau de células SH-SY5Y diferenciadas

El aislamiento de filamentos de tau de células SH-SY5Y diferenciadas, se realizó conforme a una versión modificada del método usado por Greenberg y Davies para aislar PHFs de cerebros humanos (Greenberg & Davies, 1990). Las células diferenciadas y tratadas fueron recolectadas por centrifugación, lavadas con PBS y homogeneizadas en 1 ml de tampón H (10 mM Tris, 1 mM EGTA, 0.8 M NaCl, y 10% (p/v) sacarosa, pH 7.4). Tras centrifugación a 27000 g durante 20 minutos a 4° C, se recuperó el sobrenadante y el precipitado se homogeneizó en 1 ml de tampón H y se centrifugó a 27000 x g durante 20 minutos. Los sobrenadantes de ambas centrifugaciones se mezclaron y se añadió 1% (p/v) N-laurilsarcosinato (sarcosil) y 1% (v/v) 2-mercaptoetanol. Después fueron incubados a 37° C durante 2.5 horas en un agitador orbital. Todos los pasos siguientes se realizaron a temperatura ambiente.

Tras una centrifugación a 92000 g durante 1 hora, los sobrenadantes se deshecharon y los precipitados fueron homogeneizados en 0.5 ml de tampón H/ 1% (v/v) CHAPS/ 1% (v/v) 2-mercaptoetanol, centrifugados a 92000 x g y el precipitado resuspendido en 50 µL de PBS. Posteriormente se analizaron los filamentos aislados por inmunomicroscopía electrónica según lo descrito anteriormente en ésta memoria.

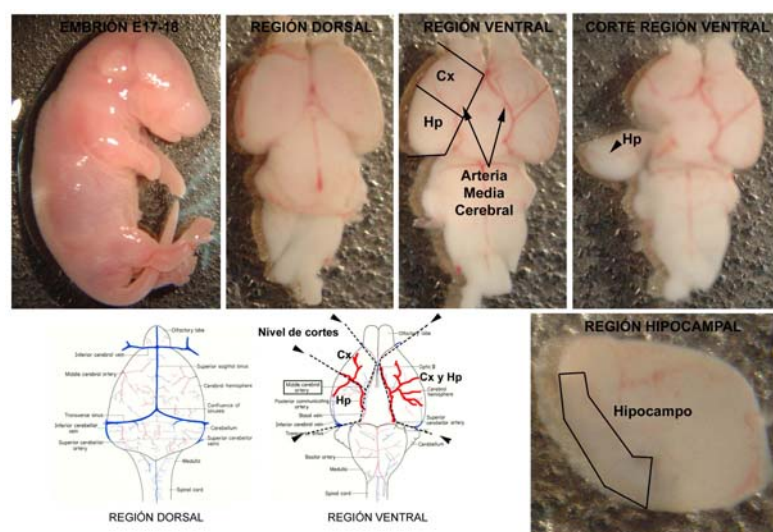
## 9.2. Cultivos primarios

El empleo de animales de experimentación (ratones) 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.

### 9.2.1. Neuronas de hipocampo de ratón

Las neuronas primarias de hipocampo se obtuvieron a partir de embriones de ratón (*Mus musculus*), de la cepa Swiss. Los cultivos primarios se realizaron siguiendo el protocolo descrito previamente (Banker & Cowan, 1977). Para ello se sacrificaron a las ratonas gestantes en el día 17 en una cámara de CO<sub>2</sub>, y los embriones (E17), fueron extraídos mediante cesárea (Figura 12). A continuación, la disección del hipocampo y la retirada de las meninges se hizo en condiciones de esterilidad en disolución salina equilibrada de Hank (HBSS; del inglés *Hank's Balanced Salt Solution*; Invitrogen Life Technologies-Gibco) atemperada (Figura 12). Tras retirar el medio de disección, las células fueron obtenidas por digestión con papaína y DNAsa, siguiendo las instrucciones del fabricante (Worthington Biochemical Corporation), durante 30 minutos. Tras la digestión, el tejido se homogeneiza y centrifuga. Tras la primera centrifugación, el precipitado se homogeneiza y se centrifuga de nuevo. El nuevo precipitado celular, que contiene las neuronas de hipocampo, se resuspende en medio neurobasal (NB-Invitrogen), suplementado con 10% suero de caballo (HS), 2 mM glutamina, 2 mM piruvato, 100U/ml penicilina y 100 mg/ml estreptomicina.

Las células se siembran sobre 1mg/ml de poly-L-lisina (Sigma) y 20µg/ml de laminina (Sigma) y a las 3 horas de haberlas plaqueado el medio se cambia por otro que contiene NB suplementado con N2 (Invitrogen), B27 (Gibco-BRL), 2mM glutamina, 2mM piruvato, 100U/ml penicilina y 100mg/ml estreptomicina. Si se quiere impedir la proliferación de la glía, se añade 1-β-D-arabinofuranosilcitosina 5µM (Ara-C; Calbiochem).



**Figura 12. Disección de cerebro de embrión de ratón.** En la figura se puede observar (de izquierda a derecha), cómo es un embrión de ratón de 17-18 días y cómo tras extraer el cerebro se pueden distinguir las distintas regiones, como la región ventral, y tras distinguir la corteza (Cx) y el hipocampo (Hp) finalmente se puede aislar el hipocampo (Hp), para obtener de él los cultivos primarios de neuronas de hipocampo.

## **10. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR ELECTROTRANSFERENCIA E INMUNODETECCIÓN (WESTERN BLOT)**

### **10.1. Electrotransferencia e inmunodetección de extractos celulares**

Las placas de células se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) y, posteriormente, se homogeneizaron las células mecánicamente en un tampón de lisis compuesto por 20mM HEPES pH 7.4, 100mM NaCl, 100mM NaF, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 5mM EDTA y un cóctel de inhibidores de proteasas (COMPLETE<sup>TM</sup>; Roche diagnostics). La concentración de proteína en los extractos fue cuantificada por los métodos de Bradford (Bradford, 1976), y del ácido bicinonínico (BCA) (Smith et al., 1985), utilizando como control albúmina bovina de suero (BSA). Después de medir la concentración de proteína, se mezclaron las muestras con tampón de carga con SDS, se hirvieron 5 minutos y se separaron por electroforesis en geles del 6-15% acrilamida-bisacrilamida, y transfiriéndose finalmente a membranas de nitrocelulosa. Dichas membranas fueron bloqueadas en una solución de leche desnatada liofilizada al 10% en PBS con 0.2% Tween-20 (PBST).

A continuación, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario diluido en la disolución de bloqueo (ver **Tabla 1**), durante 1 hora. Las membranas fueron entonces lavadas tres veces con PBST e incubadas 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a peroxidasa (ver **Tabla 2**). La inmunoreactividad fue visualizada mediante un sistema de quimioluminiscencia (*enhanced chemiluminescence detection system, ECL*, PerkinElmer Life Sciences). El análisis densitométrico de la intensidad de las bandas se llevó a cabo con un densitómetro GS-710 (BioRad).

### **10.2. Análisis por electrotransferencia e inmunodetección de la proteína tau presente en tejido**

Muestras post-mortem del lóbulo temporal de individuos sanos y enfermos de Alzheimer se obtuvieron del banco de cerebros de Netherland (Dr. Ravid), o del banco de cerebros de Madrid (Dr. García de Yébenes). Las muestras se homogeneizaron en PBS pH 7.2 y posteriormente se analizaron según lo descrito previamente (Nieto et al., 1991) usando el anticuerpo anti- $\beta$ -tubulina como control de carga.

Para determinar la cantidad de proteína tau presente en las distintas zonas del cerebro de ratón, se sacrificaron ratones y sus cerebros se diseccionaron rápidamente en placas sobre hielo. El tejido se procesó por Western Blot según lo descrito previamente (Lucas et al., 2001). Se utilizó, el anticuerpo 7.51 para detectar la proteína tau, el cual reconoce la región de unión a microtúbulos (Novak et al., 1991) y un anticuerpo anti- $\alpha$ -tubulina como control de carga. Los niveles de proteínas se cuantificaron por densitometría.

### **10.3. Análisis por electrotransferencia e inmunodetección de la proteína tau polimerizada**

En algunos experimentos, se determinó la aparición de monómeros, oligómeros, y polímeros de tau mediante Western Blot. Para ello, tau 42 recombinante se mezcló con los distintos compuestos (ver apartado 6.1), se dejaron reaccionar y se analizaron por electrotransferencia e inmunodetección al igual que esta descrito en el apartado 10.1 para los cultivos celulares, una vez añadido el tampón de carga con SDS.

## **11. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR INMOVILIZACIÓN MEDIANTE MICROFILTRACIÓN E INMUNODETECCIÓN (DOT BLOT)**

Para el análisis por inmovilización mediante microfiltración e inmunodetección de los agregados, las muestras se inmovilizaron en membranas de nitrocelulosa usando la unidad de microfiltración Bio-Dot (Bio-Rad). Todas las muestras unidas a la membranas de nitrocelulosa se incubaron en una disolución de leche desnatada liofilizada al 10% en PBS con Tween-20 al 0.2% (PBST), durante 1 hora a temperatura ambiente, para bloquear uniones inespecíficas. Posteriormente, al igual que en el Western Blot, se incubaron las membranas con los anticuerpos primarios y secundarios. La inmunoreactividad fue visualizada mediante un sistema de quimioluminiscencia (ECL, PerkinElmer Life Sciences).

## **12. TINCIÓN INMUNOCITOQUÍMICA**

### **12.1. Tinción inmunocitoquímica de líneas celulares**

Las líneas celulares NIH-3T3, HEK 293, HEK 293 Tau 3R, HEK 293T y SH-SY5Y cultivadas sobre cubres de vidrio después de ser tratadas, fueron fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS (método de fijación para observar filamentos de actina), o metanol (método de fijación para observar microtúbulos), durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de varios lavados con PBS 1X, las células fueron preincubadas 1 hora con una solución de bloqueo consistente en 1% BSA en PBS y 0.1% Tritón X-100. Después, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos primarios diluidos en la misma disolución de bloqueo. Tras la incubación con el anticuerpo primario (para ver inmunofluorescencia de actina se incubó solo con faloidina rodaminada TRITC, Sigma), las células fueron lavadas tres veces con PBS e incubadas a continuación durante 45 minutos-1 hora con el anticuerpo secundario (ver Tabla 2), diluido en solución de bloqueo y en oscuridad. Después de lavar con PBS 1X, los cubres fueron inmediatamente montados con Fluoromount G (Southern Biotech Assoc. Inc.) o FluorSave (Calbiochem) y examinados en un microscopio invertido de fluorescencia Zeiss Axiovert 200 utilizando los objetivos de inmersión de 40X y 63X. Las imágenes se procesaron posteriormente con el programa MetaVue.



## **12.2. Tinción inmunocitoquímica de cultivos primarios de neuronas**

Los cultivos primarios de neuronas, después de ser tratados, se fijaron con 4% paraformaldehído en PBS 1X durante 20 minutos a 37°C. Después de varios lavados con PBS 1X, las células se permeabilizaron con Tritón X-100 en PBS 1X durante 5 minutos a temperatura ambiente y se bloquearon con BSA 5% por 1 hora. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo primario en BSA 1% en PBS 1X durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar tres veces con PBS 1X, se incubó el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente. Los cubres se lavaron tres veces con PBS 1X, una vez con agua y se montaron con FluorSave o Fluoromount G.

Adicionalmente, en varios experimentos, se incubaron los cubres de vidrio mencionados previamente con DAPI 1 µg/ml (4',6-diamino-2-fenilindol, Calbiochem), 10 minutos antes del montaje de las preparaciones para visualizar los núcleos.

También, se realizó la tinción de las células y cultivos primarios con 0,01% (p/v) tioflavina-S en DMSO, para visualizar agregados o filamentos de tau (ver siguiente apartado 12.3).

## **12.3. Análisis por inmunofluorescencia de filamentos de tau y PHFs**

Los PHFs aislados o los filamentos de tau se pusieron sobre un cubre de vidrio que se sitúa en el fondo de un tubo de centrifuga Corex. Después de la centrifugación a 1500 r.p.m. en un rotor HB4 durante 1 hora, la proteína sedimentada en el cubre de vidrio se fijó con 4% paraformaldehído y se procesó para doble o simple inmunofluorescencia, como en el caso de los cultivos celulares, usando anticuerpos contra tau y 0,01% (p/v) tioflavina-S. De manera opcional, en vez de centrifugar sobre cubres de vidrio se pueden depositar las muestras sobre portas de vidrio gelatinizados y dejar secar a 37°C durante 1 hora. La cuantificación de la intensidad de fluorescencia (tanto en líneas celulares o cultivos primarios como en PHFs o polímeros de tau), se llevó a cabo con el programa informático MetaMorph v6.2r6 (Universal Imaging). Para esta cuantificación los ajustes de luz y exposición de la cámara de alta resolución CCD se mantuvieron constantes en cada experimento.

## **13. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR**

### **13.1. Incorporación de calceína y yoduro de propidio**

El método de medida de viabilidad basado en la incorporación de calceína-yoduro de propidio ha sido previamente descrito (Mattson et al., 1995). La calceína/acetoximetil-éster es incorporada e hidrolizada por las esterasas celulares presentes en células vivas, siendo retenida en su interior por la generación de carga negativa y emitiendo fluorescencia en el intervalo de la fluoresceína, mientras que el yoduro de propidio es incorporado sólo por las células con la membrana celular perforada intercalándose en su material genético y emitiendo fluorescencia roja. Las células fueron incubadas a 37°C durante 30 minutos con 8 µM yoduro de propidio (Sigma-Adrich) y 1 µM calceína/acetoximetil-éster (Molecular Probes). A continuación, se lavaron las células una vez con HBSS suplementado con 2 mM CaCl<sub>2</sub>, y las células se visualizaron por microscopía de fluorescencia usando un microscopio invertido Zeiss Axiovert

200. Para el análisis cuantitativo se seleccionaron al azar cinco campos por pocillo de una placa M24 (300-400 células/campo), en al menos tres experimentos independientes. La viabilidad celular se expresó como el porcentaje de células positivas para calceína frente al número total de células contadas.

### **13.2. Cuantificación celular mediante el uso del colorante azul de Coomassie R-250**

Este método colorimétrico es simple y reproducible. Es un método que permite la cuantificación del número de células ancladas o sujetas a la superficie de la placa de cultivo de varios pocillos (células vivas). Este método se basa en la tinción de las células con azul de coomassie R-250 seguido de una posterior elución y cuantificación del colorante. Brevemente, las células en cultivo (usualmente este tipo de método se desarrolla creciendo las células en placas de cultivos de varios pocillos) se fijan con paraformaldehído 4% (p/v), posteriormente las células son teñidas con el colorante azul de coomassie R-250 (solución de azul de coomassie R-250 al 0,2% preparada en ácido acético 10% (v/v) y metanol 40% (v/v)), durante 1 hora a temperatura ambiente (25°C). Pasada la hora, las células se lavan exhaustivamente con agua destilada y se dejan secar a temperatura ambiente (25°C). La cantidad de colorante adsorbido se cuantifica tras su elución. La elución del colorante se lleva cabo con una disolución de NaOH 0,1 N en Metanol 50%. Para llevar a cabo la cuantificación colorimétrica del eluido, éste se colorea mediante acidificación con una cantidad similar de 10% TCA, y la solución resultante se lee usando un espectrofotómetro multipocillo Titerek a 595nm. A esta longitud de onda se ha determinado el máximo coeficiente de extinción para el azul de coomassie R-250 en un dilución final de TCA 5% (Margis & Borojevic, 1989).

### **13.3. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo y tinción de núcleos con DAPI**

Después de los tratamientos, las células tratadas y sin tratar se lavan dos veces con PBS 1X, se tripsinizan y se recogen mediante una centrifugación a 1000 r.p.m. durante 5 minutos. Posteriormente se fijan en etanol al 70% y se guardan a 4°C hasta su análisis en el citómetro de flujo. Las células fijadas se centrifugan a 3000 rpm durante 5 minutos), se retira el etanol y se tiñen con Yoduro de Propidio (Sigma), conteniendo 50 mg/ml de RNAsa (Sigma) en PBS, durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Las células se analizan posteriormente usando un citómetro de flujo FACSCalibur (BD, Biosciences), y mediante el uso del software Cell Quest.

En cada análisis se estudian como mínimo 20000 células por punto. En las gráficas que se obtienen tras el análisis de la muerte celular mediante fragmentación de ADN se pueden observar los porcentajes de células que se encuentran en cada fase del ciclo celular. De esta forma se puede cuantificar el número de células vivas o muertas tras los distintos tratamientos. También, se realizó la tinción de núcleos celulares con DAPI 1 µg/ml (Calbiochem), para analizar la aparición de figuras apoptóticas tras los diferentes tratamientos.

## 14. EXTRACCIÓN DE ÁCIDO RIBONUCLEICO (RNA)

La extracción de RNA total de las distintas regiones del cerebro de ratón y de líneas celulares, para su análisis por RT-PCR, se llevó a cabo empleando el reactivo TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Barcelona, España). Las células, levantadas de las placas con un rascador, y los tejidos, se resuspendieron en TRIzol y se procesaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante hasta purificar el RNA total. El RNA total se resuspendió en agua libre de ribonucleasas (tratada con DEPC, dietil-pirocarbonato; Sigma, España), y se guardó a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior uso. La concentración y pureza del RNA total se determinó, para cada una de las muestras, empleando el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies).

## 15. RETROTRANSCRIPCIÓN Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR)

La retrotranscripción de RNA a la primera cadena de DNA complementario (cDNA), fue llevada a cabo con el kit "First strand cDNA synthesis kit" (Roche Applied Science), partiendo de 1-5  $\mu\text{g}$  de RNA total aislado de células o de tejidos de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La PCR se desarrolló con la ADN polimerasa Taq (Promega), en su tampón correspondiente y a una concentración de  $\text{MgCl}_2$  de 2,5 mM. Los ciclos de amplificación se describen a continuación:

1 ó 2 min. $94^{\circ}\text{C}$			Desnaturalización inicial
30 ciclos	30-60''	$94^{\circ}\text{C}$	Desnaturalización
	1'	$T_{\text{oligo}}$	Anillamiento
	1-2'	$72^{\circ}\text{C}$	Extensión
5 ó 10 min. $72^{\circ}\text{C}$			Extensión final

Los oligonucleótidos utilizados como iniciadores, sus temperaturas óptimas de anillamiento ( $T_{\text{oligo}}$ ) y el tamaño de los productos correspondientes se describen en la **Tabla 3**.

**Tabla 3. Resumen de todos los oligonucleótidos utilizados como iniciadores para las distintas reacciones en cadena de la polimerasa (PCR)**

PCR/ RT-PCR	Nombre/ Secuencia	Temperatura anillamiento	Tamaño (pb)
GFP (PCR)	5' BAM: 5'-CCACCGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGG-3' 3' GXT: 5'-CGGACTCAGACTCGAGATGGCTGAGCCCGCCAGGAGTTC-3'	$60^{\circ}\text{C}$ $60^{\circ}\text{C}$	~300
Tau 42 (PCR)	5' GPXT: 5'-GCTCAGCCATCTCGAGTCTGAGTCCGGACTTGTACA-3' 3' SAL: 5'-AATTCGTCGACTCACAACCCTGCTTGGCCAG-3'	$60^{\circ}\text{C}$ $60^{\circ}\text{C}$	~1700
GFP-Tau 42 (PCR)	5' BAM: 5'-CCACCGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGG-3' 3' SAL: 5'-AATTCGTCGACTCACAACCCTGCTTGGCCAG-3'	$60^{\circ}\text{C}$ $60^{\circ}\text{C}$	~2000
Tau (RT-PCR)	5' R1: 5'-GGCGAATTCGGATCCATGCCAAGACCTGAAGAATG-3' 3' R2: 5'-GGCCTGCAGTACTCGCGGAAGGTCAGCTTGTGGG-3'	$55^{\circ}\text{C}$ $55^{\circ}\text{C}$	~700
Actina (RT-PCR)	5' H1: 5'-GCATGGAGTCCTGTGGCATCCACG-3' 5' H2: 5'-GGGTGTAACGCAACTAAGTCATAG-3'	$55^{\circ}\text{C}$ $55^{\circ}\text{C}$	~650

Los productos de PCR se resolvieron en geles de agarosa del 1-1.8 % (p/v), con Bromuro de etidio. Como control de carga, se desarrolló para cada muestra la RT-PCR para la actina, usando los oligonucleótidos correspondientes.

## 16. LENTIVIRUS

### 16.1. Construcciones lentivirales

Los vectores lentivirales que se han utilizado en esta tesis son vectores denominados de tercera generación, en los que han sido eliminados algunos genes virales presentes en el genoma del virus parental (Dull et al., 1998). Solo tres de los nueve genes, gag, pol, y rev (genes que codifican las proteínas estructurales, polimerasa/ intregresa y genes implicados en la exportación del núcleo al citoplasma del RNA viral, respectivamente), se co-expresan en células empaquetadoras para constituir el virus. De este modo, se está impidiendo que el vector pueda replicar, dado que las secuencias que codifican para estas proteínas se distribuyen en distintos vectores (pCMVdR8.74, pMD2G, y pLV), minimizando el riesgo de aparición de virus recombinantes competentes en replicación. El núcleo y componentes del virión provienen del VIH-1 original, pero para la envuelta se ha cambiado por la envuelta VSVg, glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular. Esta envuelta presenta una gran estabilidad física y amplio tropismo, lo que permite la infección de prácticamente cualquier célula animal, y su concentración por ultracentrifugación (Burns et al., 1993; Yang et al., 2002). Para la producción y empaquetamiento eficaz del virus, es necesaria la co-transfección de los genes virales gag, pol y rev, así como la envuelta (en nuestro caso VSVg), junto con el esqueleto lentiviral que porta la secuencia génica de la proteína de interés.

Los tres vectores o plásmidos utilizados para la obtención de las partículas lentivirales son:

**pCMVdR8.74:** Este plásmido recibe el nombre de vector helper o ayudador. Contiene los genes gag, pol (para su expresión), y rev (para el procesamiento “splicing” y transporte del RNA), bajo la acción del promotor del citomegalovirus. Contiene al final una secuencia de poliadenilación del gen de la insulina en sustitución del fragmento LTR (Long Term Repeat), en la posición 3’.

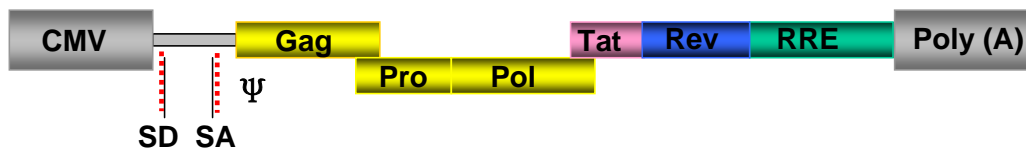


Figura 13. Esquema del vector pCMVdR8.74.

**pMD2G:** Este plásmido contiene el gen env del virus de la estomatitis vesicular (VSG) que codifica para las proteínas de la envuelta o capsida vírica.

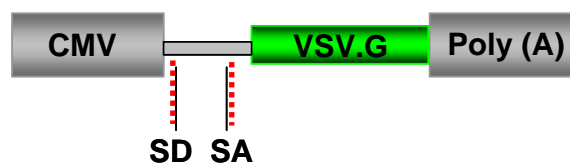


Figura 14. Esquema del vector pMD2G.

**pLV:** Este plásmido o bien contiene el cDNA del gen reportero GFP o el gen de interés (en este caso corresponde al cDNA de la proteína tau de mayor tamaño unida al gen reportero eGFP (GFPTau42)) y por otro lado, contiene los elementos en cis del virus del VIH, necesarios para el empaquetamiento, la transcripción reversa y la integración del virus, bajo el promotor del citomegalovirus.



Figura 15. Esquema del vector pLV.

Para la generación de la construcción pLVGFPTau42, el plásmido original pLVFrat (cedido por el Dr. Filip Lim de la Universidad Autónoma de Madrid) se digirió con las enzimas de restricción BamHI y Sall (Roche applied biosystems) para producir la escisión del cDNA de la Frataxina y así, en su lugar, poder introducir el producto de PCR “GFPTau42” digerido con las enzimas de restricción BamHI y Sall y purificado. Para la obtención del producto final de PCR “GFPTau42” se llevaron a cabo tres reacciones de PCR. Las dos primeras consistían en amplificar tanto la secuencia de cDNA de la eGFP como la de Tau42 y la tercera consistía en unir mediante PCR estos dos fragmentos (Figura 16). Los oligos utilizados como iniciadores para las distintas reacciones en cadena de la polimerasa se detallan en la tabla 3.

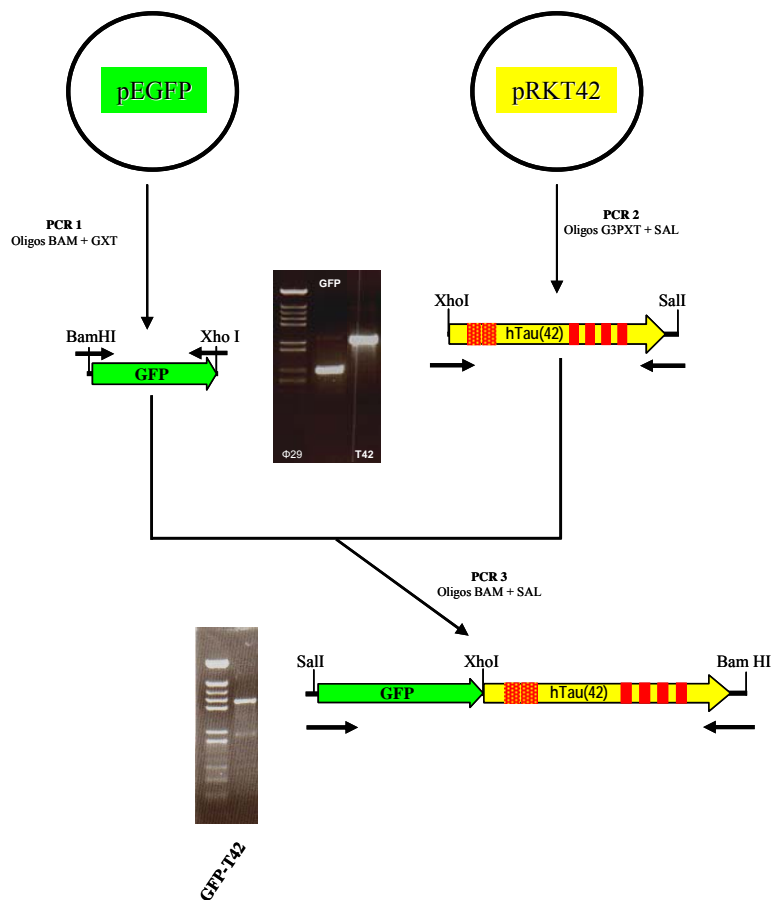


Figura 16. Obtención de los productos de PCR necesarios para la obtención del fragmento GFPTau42.

Tras la obtención del producto de PCR, éste se ligó, usando la DNA ligasa del bacteriófago T4 (Roche Applied Biosystems), a el plásmido pLV que se había preparado previamente (digestión para eliminar el cDNA de la frataxina, purificación y tratamiento del plásmido pLV digerido, con fosfatasa alcalina de gamba (Roche applied biosystems). Con el producto de ligación se transformaron bacterias competentes (método cloruro de Rubidio), de la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ , se plaquearon en placas LB-agar con los antibióticos de selección apropiados y a las 24 horas se aislaron los clones potencialmente positivos de bacterias. Para ello, se pusieron a crecer, a 37°C y en agitación, en medio líquido LB los clones supuestamente positivos. De estos pequeños cultivos, parte se utilizó para purificar el ADN plasmídico (Miniprep Kit, Promega), y determinar por digestión con enzimas de restricción, cuales eran clones positivos y la otra parte del cultivo se utilizó como pre-inóculo para crecer una mayor cantidad de cultivo, de los cuales solo se purificarían el ADN plasmidico (Maxiprep Kit, Invitrogen), de la supuestas construcciones positivas que serian analizadas posteriormente por secuenciación (Figura 17).

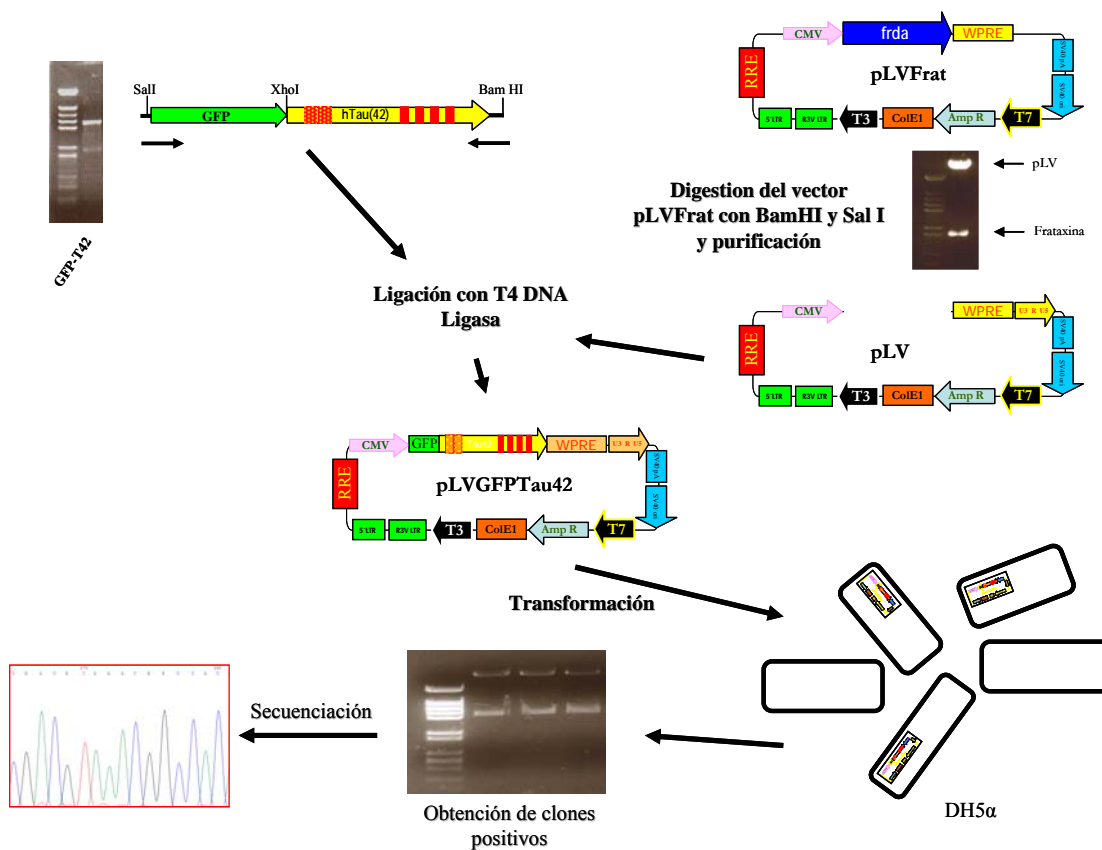


Figura 17. Obtención del vector pLVGFPTau42.

## 16.2. Producción de partículas lentivirales

Para la producción de partículas lentivirales, se empleó la línea celular HEK 293T, originada a partir de fibroblastos embrionarios humanos de riñón (ver apartado 9.1 para las condiciones de cultivo de esta línea celular). Estas células se co-transfectan mediante precipitación con fosfato cálcico siguiendo el

protocolo descrito previamente (Sambrook et al., 1989). Los pasos a seguir para la obtención de las partículas virales se relatan brevemente a continuación; en primer lugar se co-transfectan células HEK 293T ( $4,5 \times 10^6$ ) en placa de 10 cm de diámetro (Falcon, Becton-Dickinson), con el vector lentiviral de interés (pLVGFP (plásmido control) ó pLVGFPTau42), junto con los plásmidos de expresión de las proteínas accesorias para la obtención del lentivirus. Los plásmidos que codifican las distintas proteínas que requiere el virus para su correcto empaquetamiento son: pCMVdR8.74 y pMD2G, descritos anteriormente. Se añade también cloroquina  $25 \mu\text{M}$  (Sigma), para mejorar la entrada en las células de los complejos precipitados de ADN. A las 8 horas se retira el medio y se reemplaza por medio fresco, dado que tanto la cloroquina como los complejos ADN-fosfato resultan tóxicos para las células. A las 12 horas siguientes se cambia otra vez el medio y tras 24 horas se recoge el medio que contiene las partículas virales o sobrenadante viral. Los restos celulares se eliminan por filtración ( $0,45 \mu\text{m}$ , Millipore). El filtrado resultante puede ser utilizado o bien se puede almacenar a  $-80^\circ\text{C}$ .

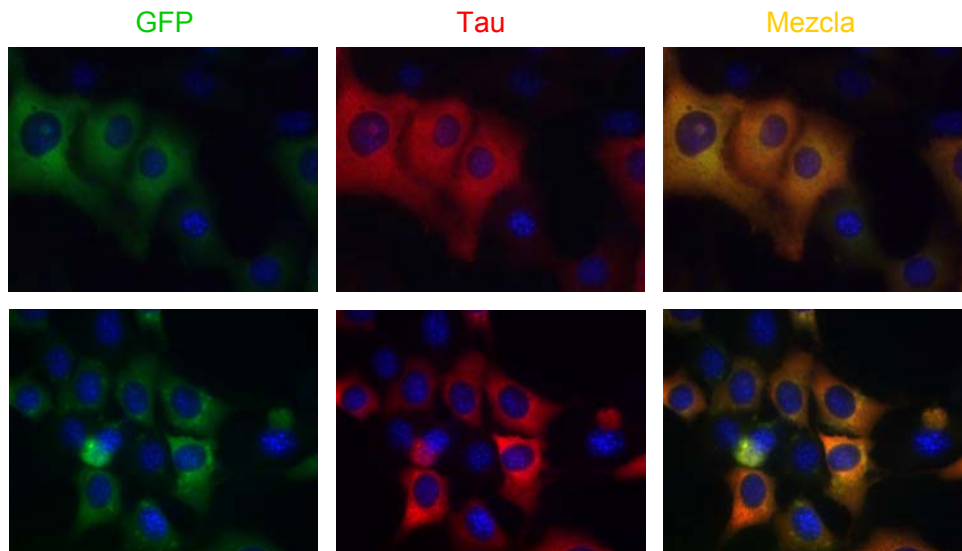
Alternativamente los filtrados virales recogidos se pueden concentrar mediante ultracentrifugación. Para ello, los filtrados lentivirales se centrifugan en una ultracentrifuga a 50000g durante 2 horas. Tras la centrifugación retiramos el sobrenadante, que contiene restos celulares y medio, y el precipitado (las partículas lentivirales) se resuspende en 200 ml de PBS, de tal forma que así conseguimos tener un sobrenadante de partículas lentivirales mas concentrado y, por tanto, obtenemos un título viral de hasta dos ordenes de magnitud superior. Al igual que con los filtrados virales obtenidos tras la transfección, se pueden usar directamente o almacenar a  $-80^\circ\text{C}$ .

### **16.3. Titulación del sobrenadante lentiviral.**

La titulación se realiza en la línea celular NIH-3T3 (ver apartado 9.1 para su mantenimiento). Se puede llevar a cabo de diferentes formas: mediante cuantificación, por citometría de flujo, del porcentaje de células que expresan el marcador eGFP, mediante el uso de un kit de ELISA comercial de Innogenetics (INNOTEST<sup>®</sup> HIV Antigen mab) que reconoce la proteína P24 antigénica nuclear de los virus VIH y que también se expresa en la partículas lentivirales utilizadas en la presente tesis, o bien mediante cuantificación por inmunofluorescencia del porcentaje de células que expresan el marcador eGFP (ver ejemplo en Figura 18).

En esta tesis se desarrolló el último método de titulación descrito en el párrafo anterior. Se realizan diluciones seriadas de las muestras lentivirales y se añaden a las células, previamente crecidas en cubres en placas de 24 pocillos ( $3 \times 10^4$ /pocillo), en presencia de  $8\mu\text{g/ml}$  de polibreno (Sigma). Se analizan a las 48-72 horas. El título se calculó como unidades infectivas por ml (UI/ml), mediante la ecuación:

$(\% \text{ de células positivas}) \times (\text{n}^\circ \text{ células totales (se supone que el tiempo de duplicación es de aproximadamente 24 horas)/100}) \times (\text{factor de dilución})$ .



**Figura 18. Infección de células NIH-3T3 con el lentivirus GFP-Tau42.** En las imágenes de inmunofluorescencia se puede observar como 48 horas después de la infección con el lentivirus GFP-Tau42, se expresa la proteína tau fusionada en su extremo amino terminal a la proteína eGFP. La inmunofluorescencia se realizó utilizando el anticuerpo Tau-5 (anti-tau).

## 17. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE DATOS

Los datos fueron analizados estadísticamente con los programas OriginPro y Excel. Con estos programas se realizaron los cálculos de: valor medio, desviación estándar y significancia estadística (utilizando el test  $t$  de Student).



# Resultados

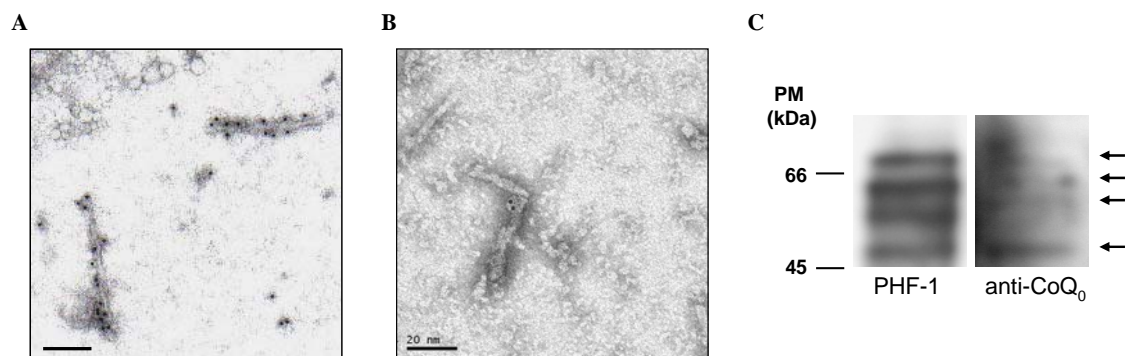
## 1. IDENTIFICACIÓN DE QUINONAS EN PHFs Y CUERPOS DE HIRANO

Una característica común de todas las tauopatías, como sucede en la enfermedad de Alzheimer, es la agregación de tau. En la enfermedad de Alzheimer, la proteína tau no solo polimeriza formando los PHFs, los cuales a su vez forman los ovillos neurofibrilares, sino que también está presente en otros agregados aberrantes, los llamados cuerpos de Hirano.

Como se ha mencionado previamente en la Introducción, y debido al posible papel que parecen jugar las quinonas en distintos procesos neurodegenerativos, durante el desarrollo de esta tesis doctoral hemos querido demostrar cómo distintas quinonas y compuestos producidos como consecuencia del estrés oxidativo en un proceso patológico, pueden favorecer el ensamblaje aberrante de la proteína tau de forma similar a la encontrada en la enfermedad de Alzheimer. Para ello, en primer lugar, quisimos demostrar la presencia de quinonas en las dos estructuras aberrantes en las que se encuentra principalmente la proteína tau, los filamentos apareados helicoidales y los cuerpos de Hirano.

### 1.1. Presencia de quinonas en PHFs aislados *ex vivo* de cerebros de enfermos de Alzheimer

El doctor Michael J. MacDonald, del “Childrens Diabetes Center” de la Universidad de Wisconsin-Madison (Madison, USA) nos proporcionó un anticuerpo policlonal anti-CoQ<sub>0</sub>, que reconoce la quinona “coenzima Q<sub>0</sub>” (MacDonald et al., 2004). Con este anticuerpo y mediante el análisis por inmunomicroscopía electrónica y Western Blot, pudimos observar la presencia de esta quinona en los PHFs de enfermos de Alzheimer (**Figura 19**).



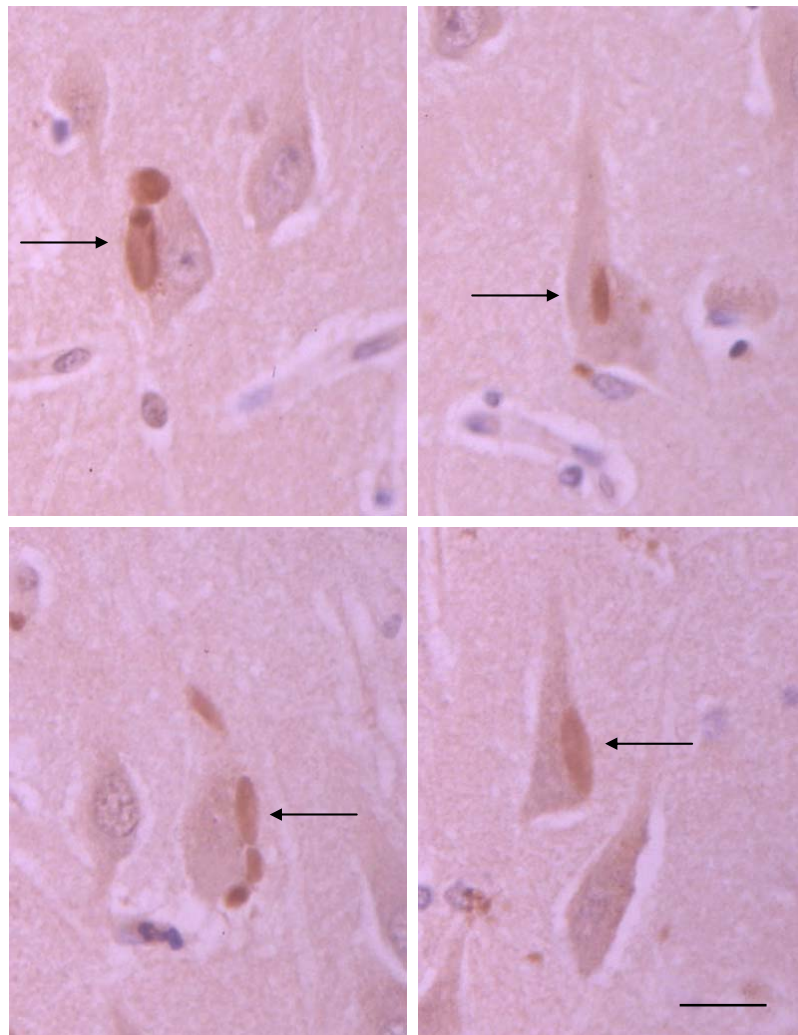
**Figura 19. Detección de tau y coenzima Q<sub>0</sub> en PHFs de enfermos de Alzheimer.** **A**) PHFs purificados incubados con un anticuerpo anti-proteína tau (anticuerpo 134) y analizados por microscopía electrónica. **B**) Igual que en A) pero el análisis se llevó a cabo utilizando un anticuerpo anti-coenzima Q<sub>0</sub>. Barra indica 20 nm. **C**) PHFs purificados se separaron en función del tamaño mediante electroforesis en gel en condiciones desnaturizantes y se analizaron por Western Blot usando un anticuerpo anti-fosfotau (anticuerpo PHF-1) y otro anticuerpo contra coenzima Q<sub>0</sub> (anti-CoQ<sub>0</sub>). Las flechas señalan las principales bandas obtenidas tras la incubación con el anticuerpo anti-CoQ<sub>0</sub>. Se indica, a la izquierda, la posición de los marcadores estándar de peso molecular (kDa).

En la **figura 19B** se puede observar que el marcaje de los PHFs con el anticuerpo anti-CoQ<sub>0</sub> es muy bajo, el número de partículas de oro es de entre 0-2 por filamento. Sin embargo, en la **figura 19C** podemos observar como al analizar los PHFs por Western Blot existe reactividad del anticuerpo con el PHF-tau, a la misma altura que aparecen las bandas de tau fosforilado en su forma monomérica; este hecho indica que las quinonas están presentes en los polímeros fibrilares aislados de cerebros de enfermos de Alzheimer. A la vista de los resultados, parece que cuando el PHF esta formado, los epítomos que

reconoce el anticuerpo anti-CoQ<sub>0</sub> quedan ocluidos, impidiéndose la detección de las quinonas. Un fenómeno similar se ha descrito previamente para diversos epítopos fosforilados (Hernandez et al., 2002).

### 1.2. Presencia de quinonas en cuerpos de Hirano presentes en cerebros post mortem de enfermos de Alzheimer

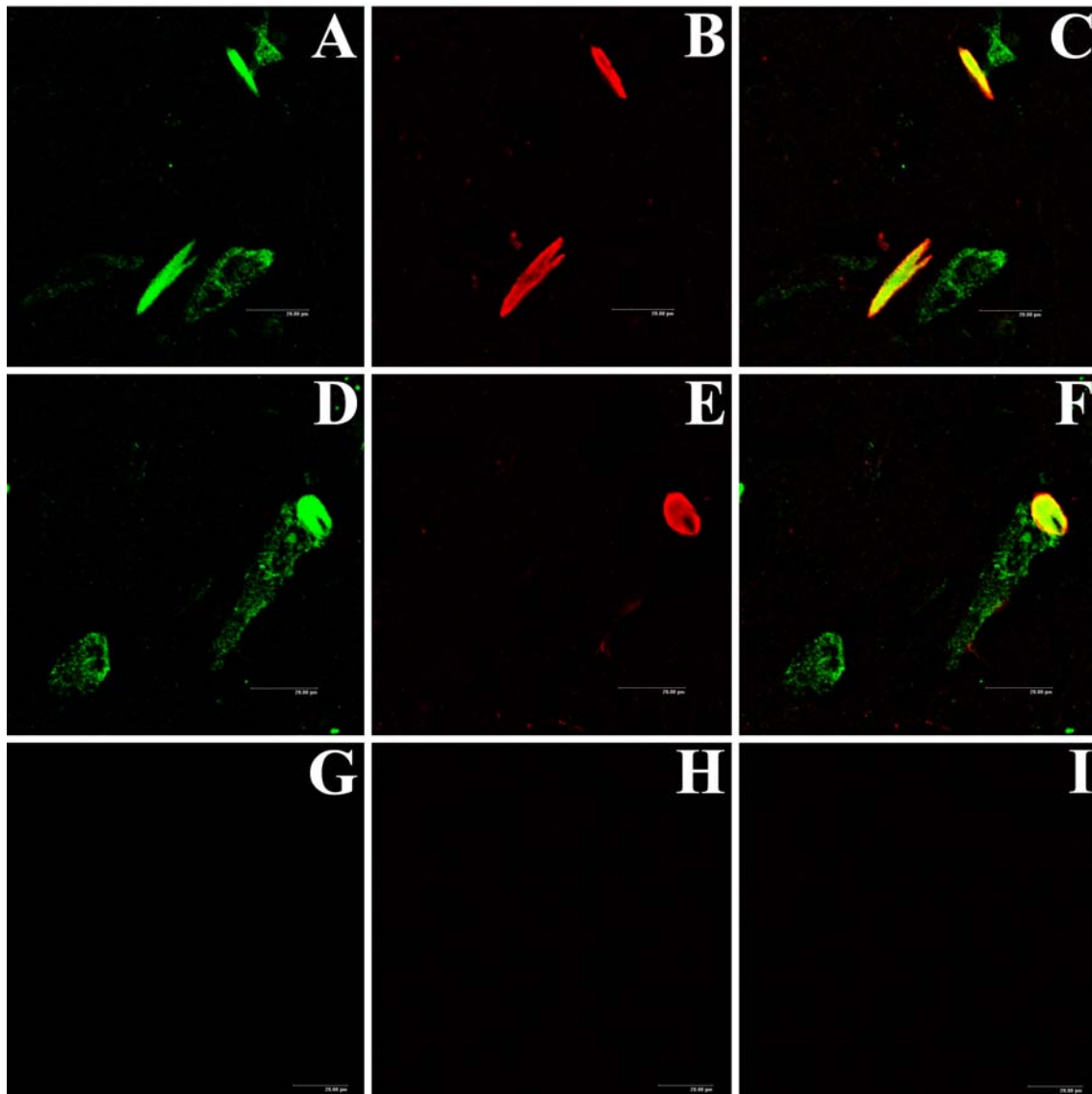
Por otro lado, en colaboración con el grupo del Doctor Isidro Ferrer del Instituto de Neuropatología del Hospital Universitario de Bellvitge (Barcelona, España), se realizó un análisis inmunohistoquímico y por microscopía confocal de tejido cerebral de enfermos de Alzheimer utilizando el anticuerpo anti-CoQ<sub>0</sub>. El análisis inmunohistoquímico mostró una tinción muy intensa de los cuerpos de Hirano con este anticuerpo (**Figura 20**). Esta fuerte inmunoreactividad está restringida a cuerpos de Hirano presentes en el área CA1 el hipocampo.



**Figura 20.** La quinona coenzima Q<sub>0</sub> está presente en los cuerpos de Hirano. Inmunohistoquímica de la región CA1 del hipocampo de cerebros de enfermos de Alzheimer en la que se muestra inmunoreactividad para la coenzima Q<sub>0</sub>, en cuerpos neuronales o perineuronales alargados y con forma ovoide. Las secciones fueron contrateñidas levemente con hematoxilina. Las flechas señalan los cuerpos de Hirano. Barra = 25  $\mu$ m.

Para demostrar la presencia de CoQ<sub>0</sub> en los cuerpos de Hirano, las diferentes secciones de tejido cerebral del área CA1 del hipocampo de enfermos de Alzheimer se analizaron por microscopía confocal.

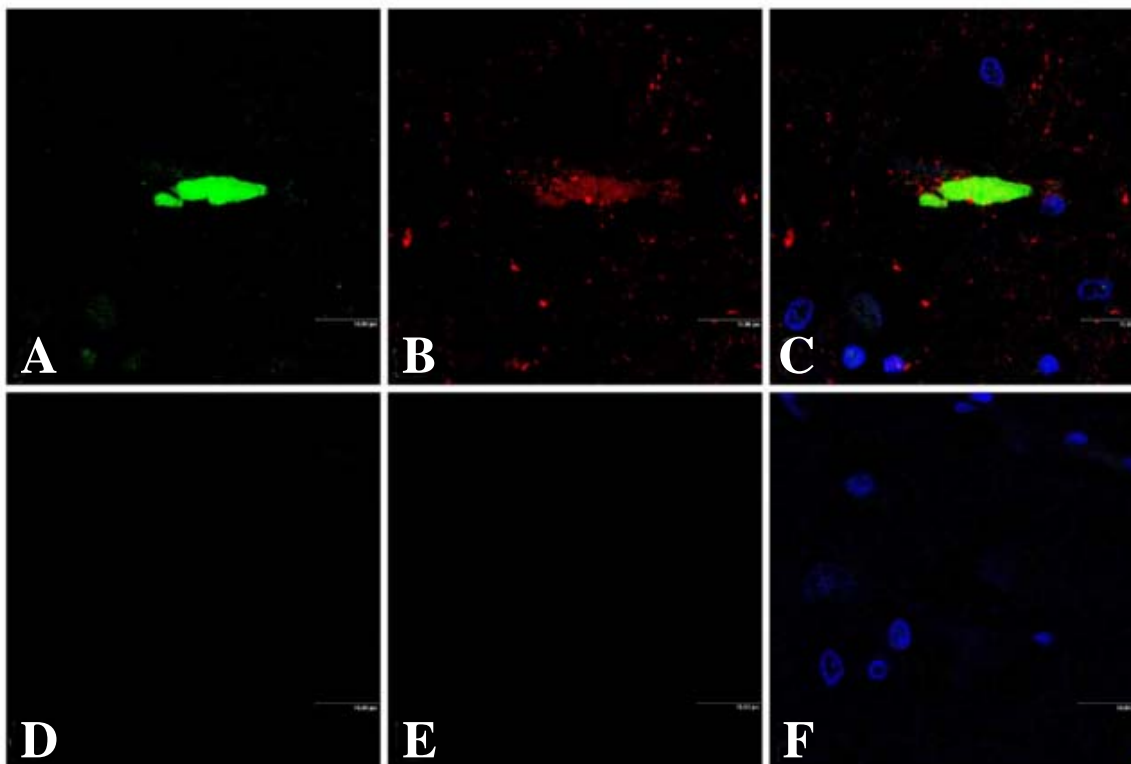
Dicho análisis mostró una colocalización casi completa del CoQ<sub>0</sub> y la actina (principal componente de los cuerpos de Hirano), en los cuerpos de Hirano (**Figura 21**).



**Figura 21. Colocalización de actina y CoQ<sub>0</sub> en los cuerpos de Hirano.** El doble inmunomarcaje analizado por microscopía confocal muestra una co-localización completa de CoQ<sub>0</sub> (A, D: verde) y actina (B, E: rojo) (mezcla en C y F: amarillo) en los cuerpos de Hirano. Las fotografías inferiores (G-H) muestran el control negativo de las secciones incubadas sin el anticuerpo primario. Barra = 20 µm.

Hasta ahora nuestros resultados sugieren que las quinonas están interaccionando directamente con tau en los PHFs y que están presentes en los cuerpos de Hirano junto con la actina. Como ya se ha mencionado en la Introducción, se ha descrito la presencia de la proteína tau en algunos cuerpos de Hirano, por lo que quisimos analizar si, igual que ocurre en los PHFs, las quinonas están interaccionando directamente con tau en los cuerpos de Hirano.

El análisis por microscopía confocal mostró una colocalización parcial de tau y CoQ<sub>0</sub> en los cuerpos de Hirano (**Figura 22**), sugiriendo que, al igual que se observa en los PHFs, las quinonas pueden estar covalentemente unidas a tau en los cuerpos de Hirano. Como no todos los cuerpos de Hirano contienen proteína tau, es posible que ésta sea reemplazada por otras proteínas que, junto con la actina y las quinonas, promueven la formación de estructuras aberrantes como los cuerpos de Hirano.



**Figura 22. Colocalización parcial de tau y CoQ<sub>0</sub> en los cuerpos de Hirano.** El doble inmunomarcaje analizado por microscopía confocal muestra una colocalización parcial de CoQ<sub>0</sub> (A, verde) y tau (B, rojo) (mezcla en C) en los cuerpos de Hirano. Las fotografías inferiores (D, E y F) muestran el control negativo de las secciones incubadas sin los anticuerpos primarios. En C y F se muestran los núcleos marcados con To-Pro 3. Barra = 40  $\mu$ m.

En definitiva, el análisis inmunohistoquímico muestra como las quinonas están formando parte de los cuerpos de Hirano y como al unirse a tau podrían tener, de igual forma que ocurre en los PHFs, un posible papel en la formación de estas estructuras aberrantes.

## 2. ESTUDIO DE LA FOSFORILACIÓN, POLIMERIZACIÓN Y AGREGACIÓN DE LA PROTEINA TAU *IN VITRO*

En la enfermedad de Alzheimer se han descrito diferentes inductores de la polimerización de tau como ya se ha expuesto previamente. Una vez demostrada la presencia de las quinonas en los principales agregados aberrantes encontrados en la enfermedad de Alzheimer, los filamentos apareados helicoidales o PHFs y los cuerpos de Hirano, quisimos estudiar y caracterizar el posible efecto que pueden tener las quinonas sobre el proceso de ensamblaje de la proteína tau.

### 2.1. Caracterización del efecto de las quinonas como inductoras de la polimerización de la proteína tau


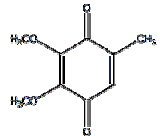
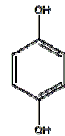
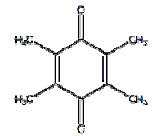
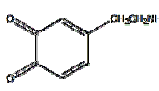
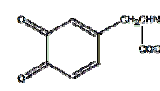
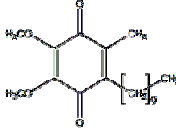
Como sucede con otros compuestos que favorecen la polimerización de tau como el 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) (Perez et al., 2000a), las quinonas son compuestos muy reactivos, debido a su elevada capacidad de llevar a cabo reacciones tanto de óxido-reducción como de arilación o alquilación, por lo

que pueden jugar un papel importante en la polimerización y agregación de la proteína tau. Por ello quisimos estudiar, en primer lugar, el efecto que ejercen las quinonas sobre la polimerización de tau.

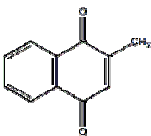
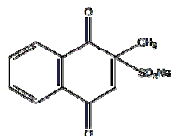
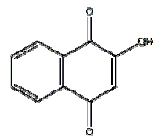
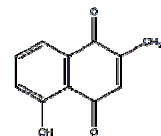
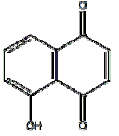
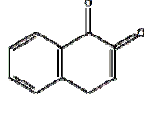
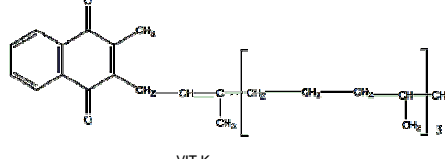
### 2.1.1. Efecto de quinonas sobre la polimerización de tau

En el transcurso de este estudio se analizó el efecto de diferentes benzoquinonas y naftoquinonas, sobre la polimerización de la proteína tau. En las siguientes **Tablas (4 y 5)** se muestran la estructura de una selección de las diferentes quinonas utilizadas en esta tesis doctoral. También se indica el efecto que producen sobre la polimerización de tau.

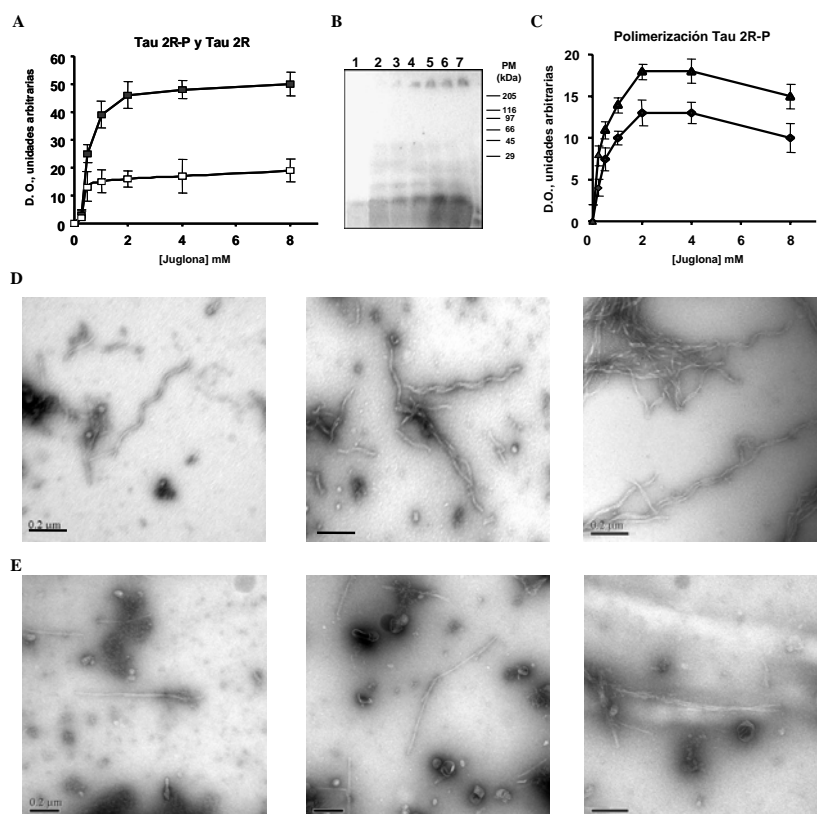
**Tabla 4. Estructura de las principales benzoquinonas utilizadas.**

Polimerización de tau			
Benzoquinonas			
Si promueven		No promueven	
			
BENZOQUINONA	COENZIMA Q <sub>10</sub>	HIDROQUINONA	DUOROQUINONA
			
DOPAMINA QUINONA	DOPA QUINONA	DECILUBIQUINONA	

**Tabla 5. Estructura de las principales naftoquinonas utilizadas.**

Polimerización de tau			
Naftoquinonas			
Si promueven		No promueven	
			
MENADIONA, VIT K <sub>3</sub>	BISULFITO DE SODIO MENADIONA	LAUSONA	PLUMBAGINA
			
JUGLONA	LAPACHONA	VIT K <sub>1</sub>	

Entre las diferentes quinonas que hemos estudiado, comprobamos que la juglona, una naftoquinona que puede unirse covalentemente a diferentes moléculas (Chao et al., 2001; Liu et al., 1998; Rappaport et al., 2002), facilita el ensamblaje de fosfotau 2R (fosforilado por la PKA), de manera similar a la que lo hace el 4-HNE (**Figura 23**). Cuando analizamos el efecto de la juglona sobre tau 2R sin fosforilar se observó menos agregación que cuando tau 2R era fosforilado previamente por la PKA (**Figura 23A**). Para determinar la formación de polímeros o agregados de tau en presencia de juglona, las muestras se analizaron por microscopía electrónica y por sedimentación. El resultado de la caracterización de la proteína presente en el precipitado tras la sedimentación, mostró la presencia de monómeros y oligómeros de tau o fosfotau 2R. Los oligómeros de tau o fosfotau 2R se forman por entrecruzamiento de monómeros de tau 2R. Los entrecruzamientos son probablemente producidos por reacciones de arilación, o formación de bases de Schiff mediadas por la juglona (**Figura 23B, C**). Estos resultados sugieren que el entrecruzamiento entre monómeros de proteína tau pueden jugar un papel importante en la agregación y además sugieren que los monómeros de tau van entrecruzándose para generar oligómeros y posteriormente polímeros. Por otro lado, el análisis mediante microscopía electrónica reveló la presencia de polímeros fibrilares tras la incubación de la variante fosfotau 2R con la juglona (**Figura 23D**).

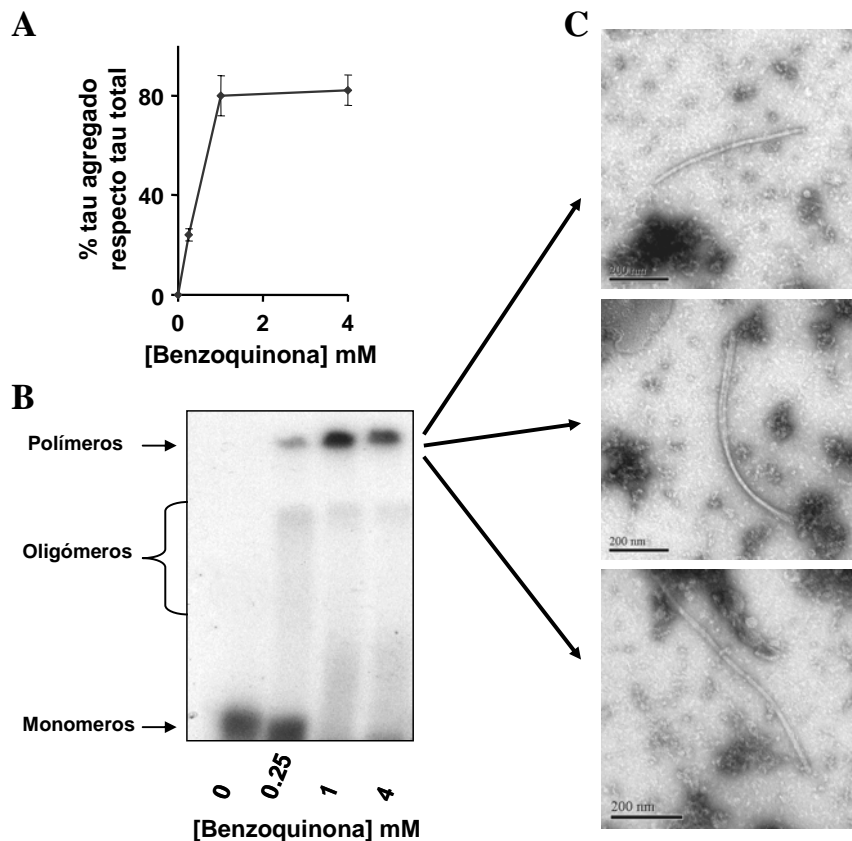


**Figura 23. Agregación de tau en presencia de juglona.** **A)** Se mezclaron las mismas cantidades (180  $\mu$ M) de tau 2R fosforilado (■) (marcado con fósforo-32 ( $^{32}$ P)) y tau 2R sin fosforilar (□) con concentraciones crecientes (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 mM) de juglona. La cantidad de proteína agregada se determinó por centrifugación o sedimentación y mediante medición de la radioactividad asociada. La determinación de la agregación de tau 2R sin fosforilar se llevó a cabo según lo descrito en Materiales y Métodos. **B)** Caracterización por electroforesis en gel en condiciones desnaturalizantes seguida de autoradiografía de las distintas fracciones de proteína presente en los precipitados tras centrifugación de las distintas muestras que contienen tau 2R fosforilada y concentraciones crecientes de juglona. Se indican los marcadores de peso molecular. En **C)** se indican las proporciones de las formas monoméricas (▲) y oligoméricas (◆) de tau 2R fosforilado, medidas tras la adición de concentraciones crecientes de juglona. En **D)** se muestran distintas imágenes de microscopía electrónica en las que se puede observar la morfología de los agregados ensamblados en presencia de juglona 1mM y de tau 2R fosforilado por la PKA. **E)** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de diferentes muestras de fosfotau 2R ensamblado en presencia de menadiona 1mM. Barra = 0,2  $\mu$ m.

Además de la juglona, se analizó el efecto de diferentes quinonas sobre la polimerización de tau. Hemos demostrado que algunas de ellas no promueven la polimerización de tau (ver **Tablas 4 y 5**), aunque otras sí favorecen el autoensamblaje de la proteína tau, de las cuales, las más representativas son la benzoquinona, el coenzima Q<sub>0</sub> y la menadiona.

La menadiona (compuesto que se ha descrito que puede regular la fosforilación de tau (Ko et al., 1997)) puede inducir la formación de polímeros de fosfotau 2R (**Figura 23E**). El derivado de la menadiona, el bisulfito sodico de menadiona, también favorece, aunque en menor grado, la polimerización de tau (datos no mostrados).

Por otro lado, estudiamos con detalle el efecto del estado redox del isómero *p*-benzoquinona sobre la agregación de tau. En organismos superiores el coenzima Q está ampliamente distribuido y tiene una estructura básica de benzoquinona que puede estar en su forma oxidada o reducida ya que tiene atribuida una función de transportador electrónico. En la **Figura 24** se puede ver como la benzoquinona (forma oxidada) induce la agregación de tau (**Figura 24A**), entrecruzamiento entre moléculas de tau (**Figura 24B**) y la formación de polímeros fibrilares (**Figura 24C**).

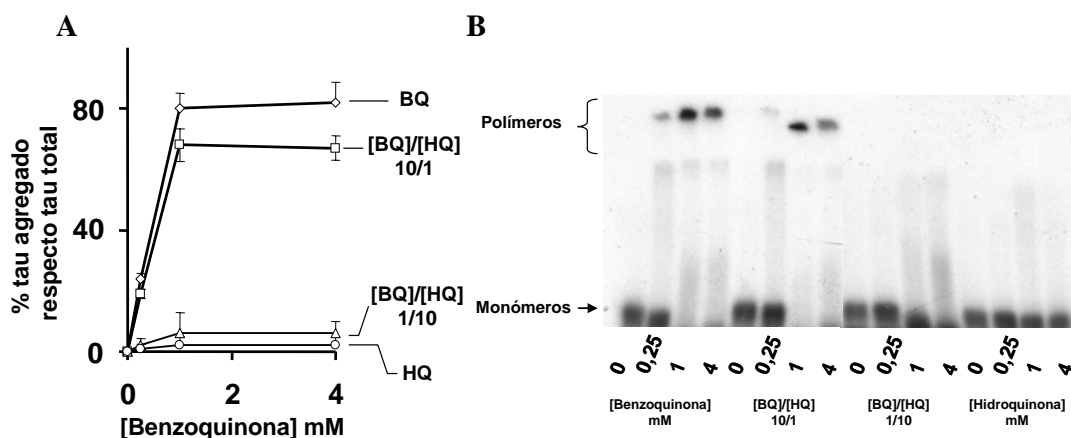


**Figura 24. Agregación de tau en presencia de *p*-benzoquinona.** **A)** Se incubó la proteína tau 42 (1 μg) con distintas concentraciones de benzoquinona (0, 0,25, 1 y 4 mM) (ver Materiales y Métodos). Se muestra como en presencia de concentraciones crecientes de benzoquinona aumenta la agregación de tau. **B)** La benzoquinona provoca el entrecruzamiento de moléculas de tau, facilitando la formación de oligómeros y polímeros de tau. **C)** Imágenes de microscopía electrónica en las que se puede observar la morfología que presentan los filamentos de tau ensamblados en presencia de benzoquinona.

Sin embargo, en la **Figura 25** se muestra como la *p*-hidroquinona (forma reducida), no sólo es incapaz de promover la agregación de tau sino que, además, puede prevenir la agregación provocada por su forma oxidada, la benzoquinona (**Figura 25A, B**). La hidroquinona es capaz de prevenir la formación



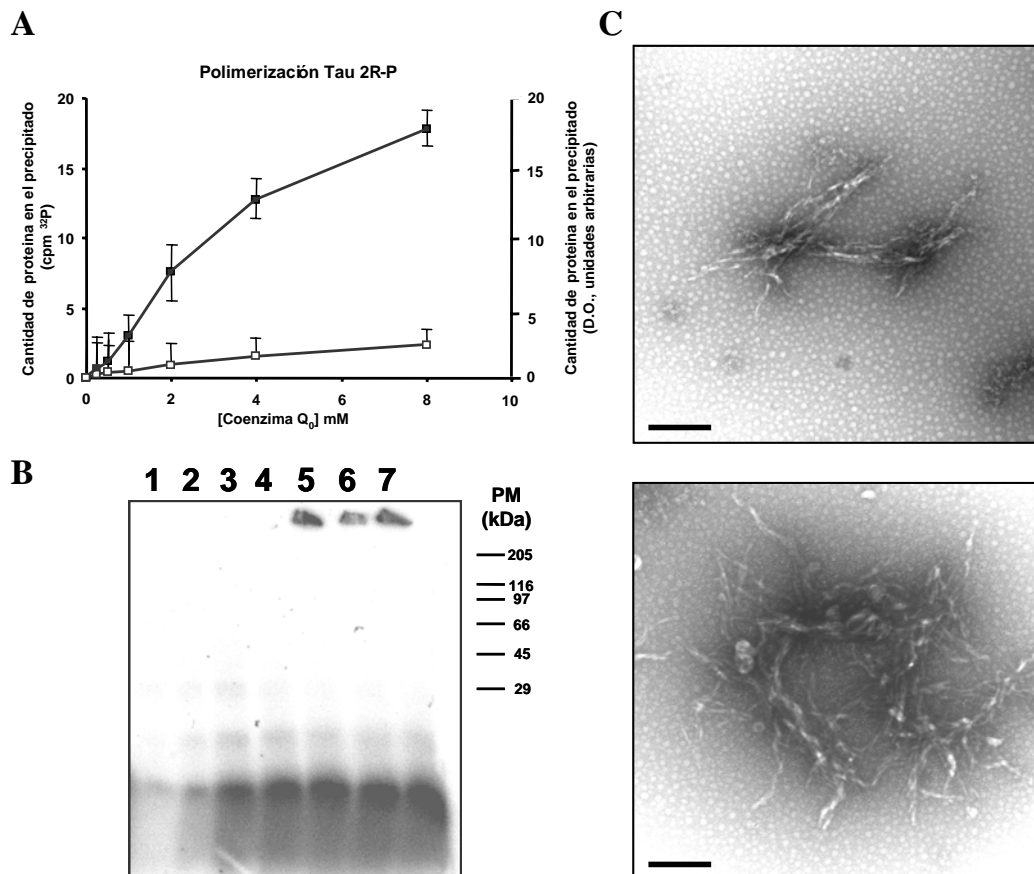
de diferentes especies (oligómeros y polímeros) de tau (**Figura 25B**). Estos resultados sugieren que, en condiciones de estrés oxidativo, donde la concentración de benzoquinona u otras quinonas pueden verse incrementadas, aumenta el riesgo de agregación de tau.



**Figura 25. La hidroquinona impide la agregación de tau provocada por la *p*-benzoquinona.** A) En un experimento similar al descrito en la **Figura 23A**, se determinó el efecto de la hidroquinona sobre la agregación de tau o el efecto de la adición de concentraciones crecientes de hidroquinona sobre la agregación de tau provocada por la benzoquinona. B) Se puede observar como la hidroquinona previene el entrecruzamiento de moléculas de tau promovido por la benzoquinona.

El coenzima Q se encuentra principalmente formando parte de la cadena respiratoria mitocondrial. Debido a su localización celular en diferentes biomembranas (membrana interna mitocondrial, vesículas del Golgi, y membranas lisosomales (Nohl et al., 2001)) y las propiedades redox que tiene esta molécula, se pueden producir modificaciones moleculares en el interior celular que, en última instancia, pueden provocar la muerte celular. Durante el envejecimiento, principal factor de riesgo de la enfermedad de Alzheimer, se van acumulando daños y defectos en la célula, de entre los cuales los más significativos son los producidos, entre otros, en las mitocondrias (Brunk & Terman, 2002; Terman et al., 2006). Es posible que se produzcan quinonas altamente reactivas, semiquinonas, que pueden dañar distintas proteínas y otras biomoléculas cuya función es muy importante en la neurona, como por ejemplo la proteína tau. El coenzima Q<sub>0</sub> no posee la cadena lateral isoprenoide (**Tabla 4**) que posee el coenzima Q<sub>10</sub>. En mamíferos, esta cadena contiene 10 unidades de isoprenoide y es por lo que se denomina Q<sub>10</sub>. Esta cadena hidrofóbica del coenzima Q<sub>10</sub> hace que sea soluble en la bicapa lipídica de la membrana mitocondrial, por lo que el CoQ<sub>0</sub>, al carecer de la cadena lateral poliisoprenoide, pierde esa solubilidad en las bicapas lipídicas favoreciéndose que se encuentre libre en el interior celular, pudiendo así interactuar con distintas proteínas, como se ha mencionado anteriormente.

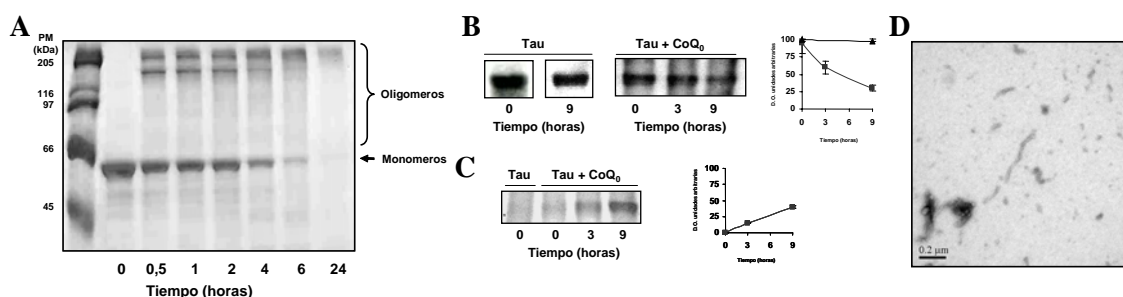
Cuando se analizó el efecto del CoQ<sub>0</sub> sobre la polimerización o agregación de la proteína tau se observó un efecto similar al descrito con la juglona. La agregación de fosfotau 2R es dependiente de la concentración de CoQ<sub>0</sub> (**Figura 26A**) y es capaz de inducir o facilitar la formación de polímeros fibrilares (**Figura 26C**).



**Figura 26. Agregación de tau en presencia del coenzima  $\text{Q}_0$ .** A) Tau 2R fosforilado y marcado con  $^{32}\text{P}$  se incubó con concentraciones crecientes (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 mM) de  $\text{CoQ}_0$  y posteriormente se midió, tras centrifugación de las distintas muestras, la cantidad de proteína presente en el precipitado. Al mismo tiempo se determinó la radioactividad asociada de  $^{32}\text{P}$  en la fracción del precipitado (■). También se midió la agregación de la misma cantidad de proteína sin fosforilar (□). B) La proteína presente en la fracción del precipitado tras la adición de concentraciones crecientes (carril 1: 0; carril 2: 0,25 mM; carril 3: 0,5 mM; carril 4: 1 mM; carril 5: 2 mM; carril 6: 4 mM; y carril 7: 8 mM) de  $\text{CoQ}_0$  se caracterizaron por electroforesis en gel seguida de autoradiografía. Se indican los marcadores de peso molecular. C) Morfología de los filamentos obtenidos tras incubación tau 2R fosforilado con  $\text{CoQ}_0$  1mM. Barra = 200nm.

La interacción de tau y el coenzima  $\text{Q}_0$  u otras quinonas es más probable a través de enlaces covalentes. En la **Figura 27**, al igual que con otras quinonas en las **Figuras 23 y 24**, se puede observar como en presencia de  $\text{CoQ}_0$  aparecen agregados de tau 42 formados por uniones covalentes. El análisis de estos agregados en geles de acrilamida/bisacrilamida en condiciones desnaturalizantes reveló un cambio en la movilidad electroforética de tau 42, cambios debidos a los entrecruzamientos (modificaciones covalentes entre varias moléculas de tau), producidos por las quinonas. Por tanto, el cambio en la movilidad revela la formación de distintas especies (monómeros, dímeros y oligómeros) de tau (**Figura 27A**). Cuando se analizan los agregados de tau 42, previamente mencionados, por microscopía electrónica se pueden observar en las imágenes la formación de polímeros fibrilares (**Figura 27D**). Adicionalmente, si se analiza por Western Blot (utilizando el anticuerpo anti-tau 7.51) la formación de las especies de tau entrecruzado, formadas tras la adición de  $\text{CoQ}_0$ , se detecta una disminución de las especies monoméricas con respecto al tiempo (**Figura 27B**), lo que sugiere que se van formando las distintas especies oligoméricas a partir de los monómeros que pueden, en última instancia, facilitar la formación de polímeros fibrilares de tau. Si este mismo análisis se realiza con un anticuerpo anti- $\text{CoQ}_0$  se puede ver que, efectivamente, el  $\text{CoQ}_0$  y tau interactúan. Además, esta interacción se ve incrementada

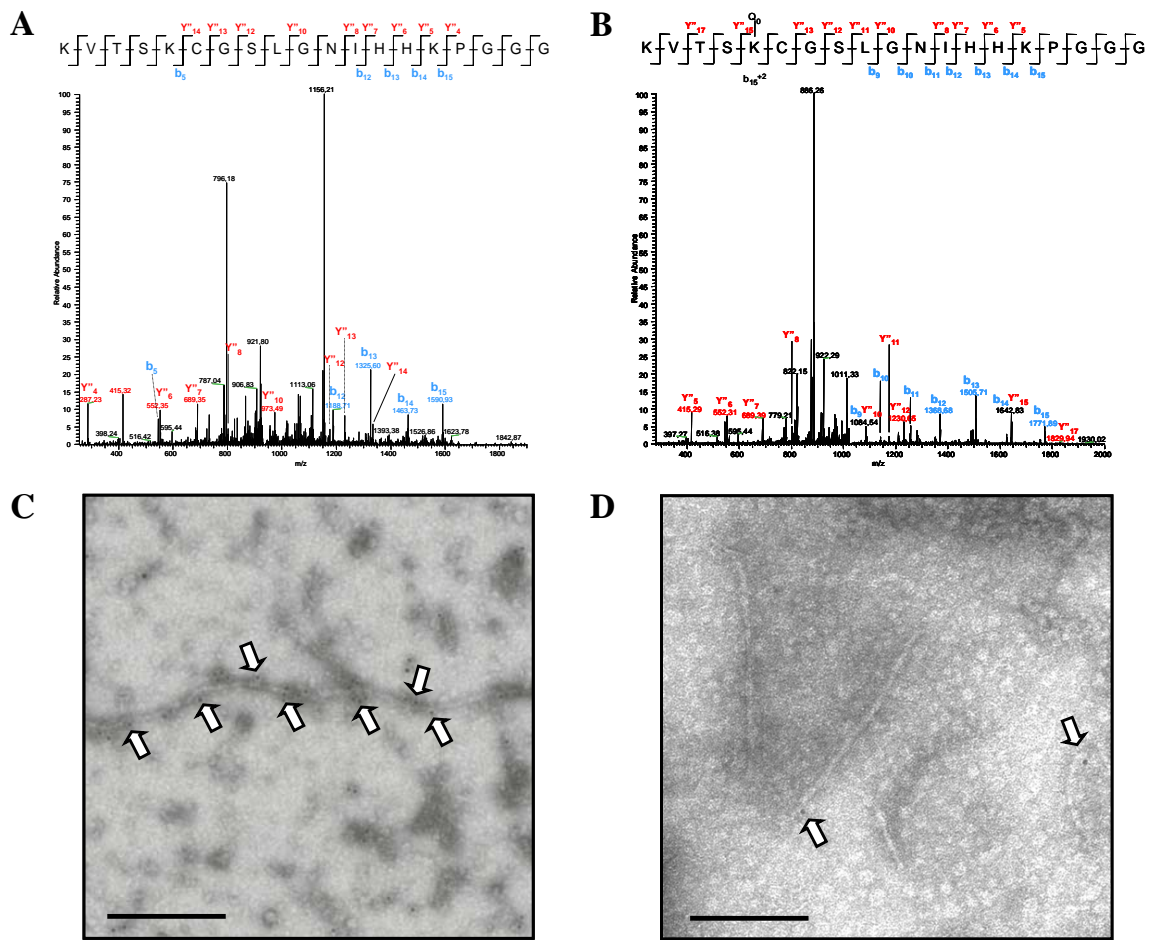
en función del tiempo de reacción. Sin embargo, con el anticuerpo solo somos capaces de detectar esta interacción en la forma monomérica de tau (**Figura 27C**). El anticuerpo anti-CoQ<sub>0</sub> no detecta las especies oligoméricas sugiriendo que cuando el CoQ<sub>0</sub> se encuentra entrecruzando a tau, el anticuerpo no reconoce a CoQ<sub>0</sub> en presencia de dos o más moléculas de tau.



**Figura 27. Caracterización de los agregados de tau formados por unión covalente con el coenzima Q<sub>0</sub>.** **A)** Una mezcla de proteína tau 42 (0,5 μg/μl) y CoQ<sub>0</sub> 1 mM se incubó de 0 a 24 horas a 37°C. Tras este tiempo se caracterizó la proteína por electroforesis en gel. Posteriormente el gel se tiñó con azul de Coomassie para visualizar las bandas. Se observa como en función del tiempo la proteína tau se entrecruza y se forman dímeros, oligómeros y polímeros. **B)** Análisis por Western Blot de las especies monoméricas de tau incubadas en presencia (■) o en ausencia (▲) de CoQ<sub>0</sub> utilizando el anticuerpo anti-tau (7.51). **C)** De la misma manera que en B), pero únicamente se analizaron las especies monoméricas de tau en presencia (■) de CoQ<sub>0</sub> empleando un anticuerpo anti-CoQ<sub>0</sub>. **D)** Imagen tomada por microscopía electrónica en la que se pueden observar polímeros fibrilares de tau obtenidos tras la incubación de la proteína tau 42 con CoQ<sub>0</sub>.

Una vez analizados los efectos que produce el CoQ<sub>0</sub> sobre la agregación y polimerización de tau, quisimos localizar cuales eran los sitios de unión o reacción de esta quinona en la proteína tau. Se sabe que las quinonas son capaces de reaccionar con distintos aminoácidos, principalmente con residuos de cisteína, lisina e histidina. Para conocer qué residuos de la proteína tau estaban interaccionando con las quinonas, los agregados o especies formadas por entrecruzamiento de monómeros de tau (formados tras la incubación en presencia de CoQ<sub>0</sub>) se separaron por electroforesis en gel en condiciones desnaturizantes (**Figura 27A**) y se caracterizaron mediante técnicas de proteómica (ver Materiales y Métodos). En la **Figura 28A** y **28B** se puede ver uno de los sitios que fuimos capaces de detectar. El CoQ<sub>0</sub> se une, al menos, a la lisina 321 (la numeración corresponde a la isoforma de mayor tamaño de la proteína tau). También se detectó la unión a otra lisina, la lisina 311. Por tanto, el CoQ<sub>0</sub> parece reconocer principalmente, la tercera repetición, región implicada en la polimerización de tau (Perez et al., 1996).

Resumiendo, en los polímeros formados en presencia de CoQ<sub>0</sub> los sitios de unión de tau con CoQ<sub>0</sub> quedan enmascarados, ya que éstos coinciden con el sitio de unión de tau requerido para su autoensamblaje (tercera repetición). Por ello, la reacción del anticuerpo anti-CoQ<sub>0</sub> con los polímeros es muy tenue (**Figura 28D**). Ya hemos descrito previamente como los PHFs se inmunodecoran con el anticuerpo anti-CoQ<sub>0</sub> también muy débilmente. Una explicación plausible es que, al formarse los polímeros de tau en presencia de CoQ<sub>0</sub>, el sitio reconocido por el anticuerpo anti-CoQ<sub>0</sub> queda enmascarado. El anticuerpo reconoce la unión de CoQ<sub>0</sub> y tau, pero una vez que se forman dímeros y oligómeros por entrecruzamiento, el anticuerpo no es capaz de reconocer la quinona. Esta hipótesis no excluye que las quinonas interaccionen con tau de una forma no covalente, puesto que en los estudios llevados a cabo las uniones no covalentes se rompen por lo que somos incapaces de detectarlas.



**Figura 28. Localización de los sitios de unión de CoQ<sub>0</sub> en la molécula de tau.** Mediante técnicas proteómicas se caracterizaron los principales sitios de unión del CoQ<sub>0</sub> en la molécula de tau. El análisis de los espectros de fragmentación reveló los principales sitios de modificación. En **A**) se puede observar el espectro de fragmentación de uno de los péptidos candidatos (según el análisis por MALDI-TOF) en ausencia del CoQ<sub>0</sub>. En **B**) el espectro de fragmentación del mismo péptido candidato en presencia del CoQ<sub>0</sub> indica que se encuentra modificada la lisina 321. El análisis por inmunofluorescencia electrónica de los polímeros ensamblados de tau en presencia de CoQ<sub>0</sub> utilizando un anticuerpo anti-tau (134) (**C**) o un anticuerpo anti-CoQ<sub>0</sub> (**D**) mostró una tenue reacción del anticuerpo anti-CoQ<sub>0</sub> con los polímeros fibrilares (se indica con flechas) en comparación con la observada para la reacción del anticuerpo anti-tau (se indica con flechas). Barra = 200 nm.

### 2.1.2. Efecto de la dopamina quinona sobre la polimerización de tau

Otra quinona que puede generarse biológicamente es la dopamina quinona. Dicha quinona se forma al oxidarse la dopamina. Se ha descrito que la dopamina se puede oxidar por tres mecanismos diferentes; por autooxidación, mediante reacciones de oxidación enzimática (tirosinasa, prostaglandina H sintasa, xantina oxidasa) o en presencia de metales como el hierro. La formación de este derivado quinónico neurotóxico (LaVoie & Hastings, 1999; Zecca et al., 2003), la dopamina quinona, se ha relacionado con la enfermedad de Parkinson (Linert & Jameson, 2000; Perez et al., 2002b). Se ha descrito como la dopamina quinona al entrecruzar moléculas de  $\alpha$ -sinucleína puede favorecer su agregación (Conway et al., 2001). La  $\alpha$ -sinucleína es una proteína que está implicada genética y mecanísticamente en la patogénesis de la muerte de las neuronas dopaminérgicas que ocurre en la enfermedad de Parkinson. Además, también se ha descrito que la dopamina quinona inactiva a la parkina (ligasa de ubiquitina E3). La aparición de mutaciones en el gen que codifica para la parkina o la modificación directa de esta

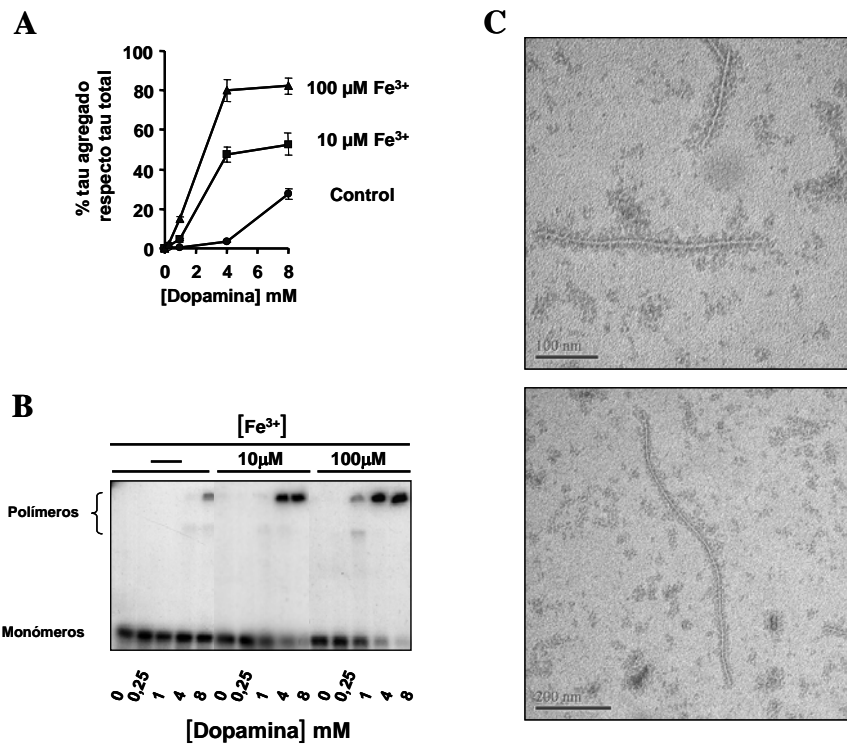
proteína por la dopamina quinona es suficiente para inducir una pérdida de neuronas catecolaminérgicas en la sustancia nigra pars compacta (LaVoie et al., 2005).

Con estos antecedentes, descritos en su mayoría sobre el efecto que tiene la dopamina quinona en la formación de los polímeros fibrilares y agregados de  $\alpha$ -sinucleína y los relatados previamente en esta tesis sobre el efecto que tienen las quinonas en la agregación y polimerización de tau, quisimos estudiar el efecto que podía tener la dopamina quinona sobre la agregación y polimerización de la proteína tau.

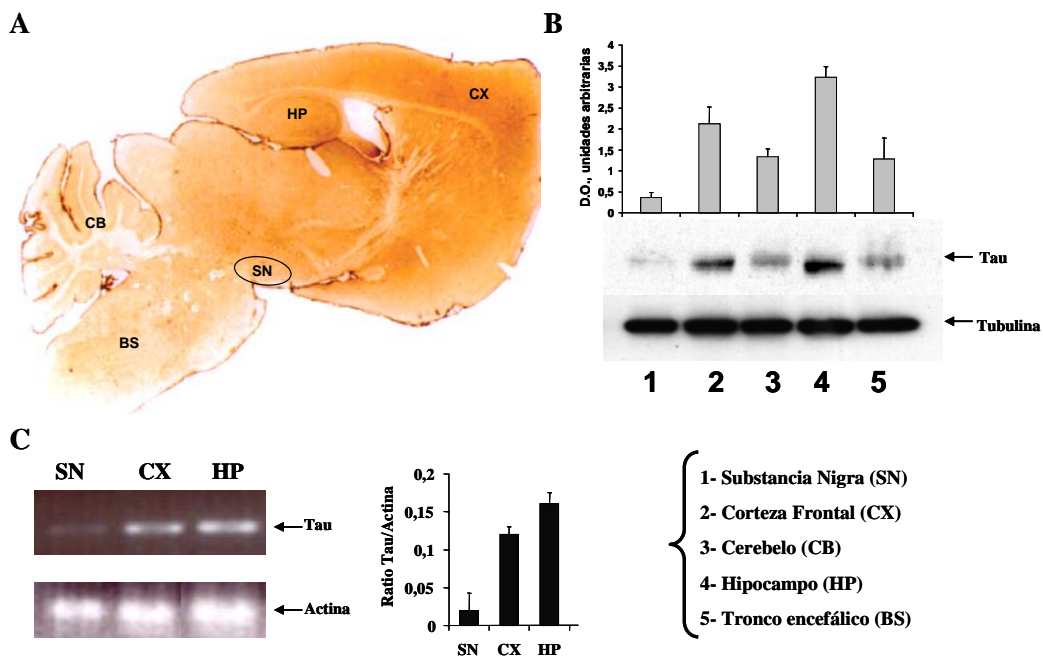
Observamos como en presencia de hierro y dopamina la agregación de tau se ve incrementada (**Figura 29A, B**). La quinona producida tras la oxidación de la dopamina, la dopamina quinona, puede entrecruzar moléculas de tau dando lugar a la aparición de oligómeros y polímeros (**Figura 29C**) como lo hacen la juglona, la benzoquinona, o el coenzima Q<sub>0</sub>, entre otras. Sin embargo, nos preguntamos como era posible que en el área del cerebro en el que existe una mayor cantidad de neuronas dopaminérgicas (sustancia nigra), área por tanto con grandes cantidades de dopamina que puede oxidarse fácilmente, dando lugar a la aparición de derivados quinónicos, no se hubiera descrito la aparición de ningún tipo de agregado de tau o polímero fibrilar. También nos preguntamos cual podría ser la causa de que esta región no se viera afectada por la patología de tau.

La sustancia nigra es una de las regiones del cerebro con mayor concentración de hierro y dopamina. Extrapolando nuestros resultados obtenidos *in vitro* se esperaría poder observar la presencia de polímeros de tau en la sustancia nigra. Sin embargo se sabe poco sobre la presencia de polímeros de tau en esta región, donde la patología de tau no suele ocurrir (Clark et al., 1998).

Una posible explicación es que la concentración de tau en esta región es menor que la requerida para que la polimerización tenga lugar. Con el fin de dar explicación a este fenómeno, medimos los niveles de tau en distintas áreas del cerebro. El análisis inmunohistoquímico sugiere que la cantidad de tau presente en la sustancia nigra es muy baja (**Figura 30A**). Para validar el resultado obtenido por inmunohistoquímica, analizamos la cantidad de proteína tau presente en las distintas regiones por Western Blot (**Figura 30B**) y la cantidad de cDNA de tau por RT-PCR (**Figura 30C**). Se pudo observar que los niveles de tau presentes en la sustancia nigra eran muy bajos en comparación con los existentes en la corteza y el hipocampo. También pudimos observar que la cantidad de tau en el cerebelo es muy baja. Curiosamente en éste área del cerebro no se ha descrito la aparición de polímeros de tau (Avila et al., 2004). Por tanto, estos resultados confirman datos previos, indicando que el contenido de tau en la sustancia nigra es muy bajo. Esta observación puede explicar la ausencia, en esta región, de polímeros aberrantes de tau.



**Figura 29. Polimerización de tau favorecida por la oxidación de la dopamina en presencia de hierro.** A) Efecto de añadir diferentes concentraciones de dopamina (0-8 mM) y concentraciones crecientes de hierro (FeCl<sub>3</sub>) 0 µM (●), 10 µM (■), y 100 µM (▲) a una solución 0,5 mg/ml de proteína tau. La proteína agregada resultante se aisló por centrifugación y se cuantificó la cantidad de proteína presente en el precipitado mediante densitometría de las bandas teñidas después de la electroforesis en gel. Los valores de las densitometrías (representados como porcentajes respecto a la cantidad de tau total) se muestran en función de las concentraciones de dopamina usadas. B) Electroforesis en gel, en condiciones desnaturalizantes, de las diferentes muestras en las que se incubaba tau con distintas concentraciones de dopamina e ión férrico. Se puede observar la formación de agregados formados por proteína tau entrecruzada. C) En las imágenes se puede ver como tras la adición a tau de dopamina e ión férrico se puede observar la formación de polímeros fibrilares.



**Figura 30. Expresión de tau en diferentes áreas del cerebro.** A) Análisis inmunohistoquímico que muestra la cantidad de tau en las distintas zonas del cerebro. Se muestra la tinción con el anticuerpo anti-tau (Tau-5) de las diferentes áreas del cerebro. Casi no se observó tinción en la sustancia nigra (SN). B) Se aislaron muestras de la sustancia nigra (SN), corteza frontal (CX), cerebelo (CB), hipocampo (HP) y tronco encefálico (BS) y se analizaron por Western Blot utilizando un anticuerpo anti-tau (7.51). Los niveles de tubulina (anticuerpo anti- $\alpha$ -tubulina) se emplearon como control de carga. C) Se aisló el RNA de las muestras anteriores y se analizaron los niveles de cDNA de tau mediante RT-PCR. RNA de actina se usó como control. En la figura se muestra la relación tau/actina en unidades arbitrarias.

## 2.2. Mapeo de las regiones críticas de tau en la polimerización inducida por quinonas y estudio del papel de la fosforilación de estas regiones sobre la agregación.

Como hemos descrito previamente, las quinonas favorecen la agregación de tau y la formación de polímeros fibrilares. Además, la fosforilación de esta proteína en la región donde se encuentran los dominios de unión a tubulina (repeticiones), parece favorecer la unión de quinonas las cuales, a su vez, favorecen la agregación y polimerización de tau. Nuestro siguiente objetivo consistió en investigar cuales eran las regiones principalmente implicadas en la polimerización de tau promovida por las quinonas y su importancia.

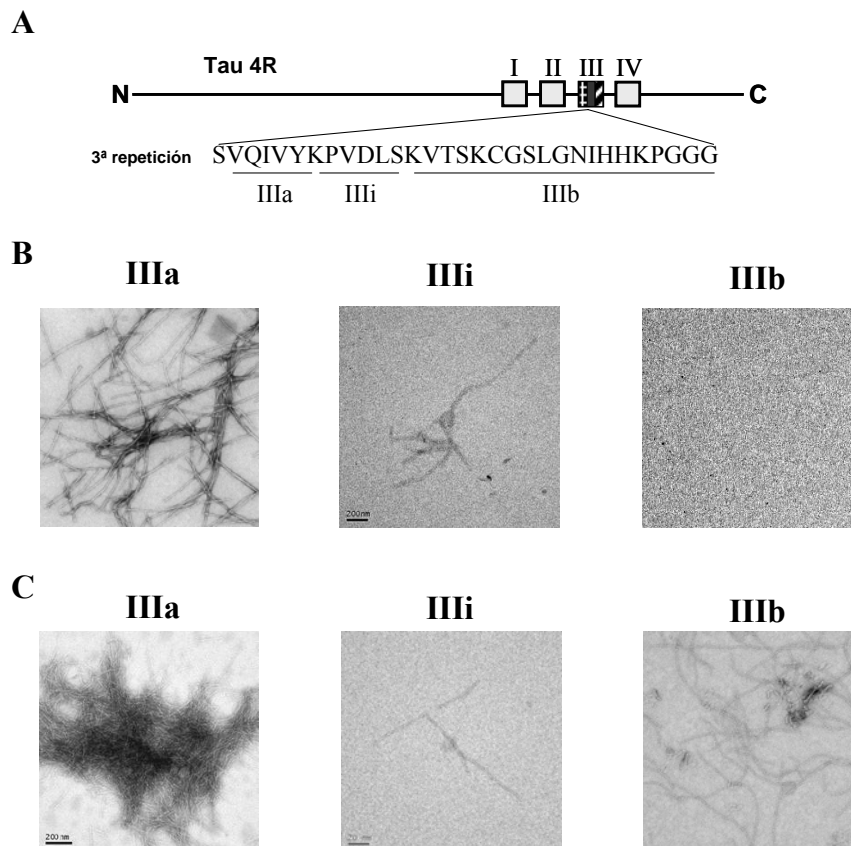
### 2.2.1. Mapeo de las regiones críticas en la polimerización de tau en presencia de quinonas.

Se sabe que el núcleo de los PHFs esta formado por un fragmento de la proteína tau de unos 100 residuos, que se corresponde con el dominio de unión a tubulina (Wischik et al., 1988). Además, estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que la tercera repetición de la región de unión a tubulina tiene un papel clave en la polimerización de tau (Perez et al., 1996). Por tanto, durante el desarrollo de esta tesis doctoral, quisimos identificar cuales eran las regiones de tau que participan en la formación de los polímeros fibrilares tras la adición de las quinonas, utilizando para ello diferentes fragmentos y variantes de tau (ver Materiales y Métodos).

En primer lugar estudiamos el papel de la segunda y tercera repetición de tau. Existen diferentes trabajos, donde se describe como los péptidos correspondientes a la segunda y tercera repetición pueden polimerizar *in vitro* (Arrasate et al., 1999; Crowther et al., 1992; Perez et al., 1996; Wille et al., 1992). Quisimos hacer un estudio complementario, que consistía en investigar la capacidad de polimerizar de una variante de tau que carece de la segunda y la tercera repetición (tau 3R $\Delta$ <sub>275-305</sub>). Si la segunda y tercera repetición son los dominios de la proteína tau de mayor tamaño que favorecen la polimerización, una variante sin las dos repeticiones debería ser incapaz de polimerizar *in vitro*. Para comprobar esta hipótesis, analizamos si esta variante polimeriza en presencia de quinonas. Y lo que observamos es que era incapaz de formar polímeros fibrilares (datos no mostrados). Este resultado nos estaba indicando que la segunda y la tercera repetición eran las secuencias críticas en la formación de estos polímeros fibrilares *in vitro*. Teniendo en cuenta que se ha descrito que la isoforma de tau que carece de forma natural de la segunda repetición (tau 3R) es capaz de polimerizar *in vitro* (Crowther et al., 1992), este dato, junto con los nuestros, sugiere que la secuencia de la proteína tau más importante en la polimerización puede ser mapeada como la tercera repetición.

Para analizar esta región de la isoforma de mayor tamaño de tau, la hemos dividido en tres segmentos, el péptido IIIa (VQIVYK, residuos 306 a 311 de tau 4R,), el péptido IIIi (PVDLSKVTS, residuos 312 a 320 de tau 4R) y el péptido IIIb (KVTSKCGSLGNIHHKPGGG, residuos 317 a 335 de tau 4R, también llamado 1/2R) (ver **Figura 31A**). Los tres péptidos polimerizan en presencia de quinonas (en presencia de heparina se pudo observar el mismo comportamiento) (**Figura 31C**). Sin embargo, el péptido IIIi polimeriza de manera significativa con una eficiencia más baja que los otros dos péptidos. El péptido IIIa, el cual sólo presenta seis aminoácidos, polimeriza incluso en ausencia de cualquier inductor

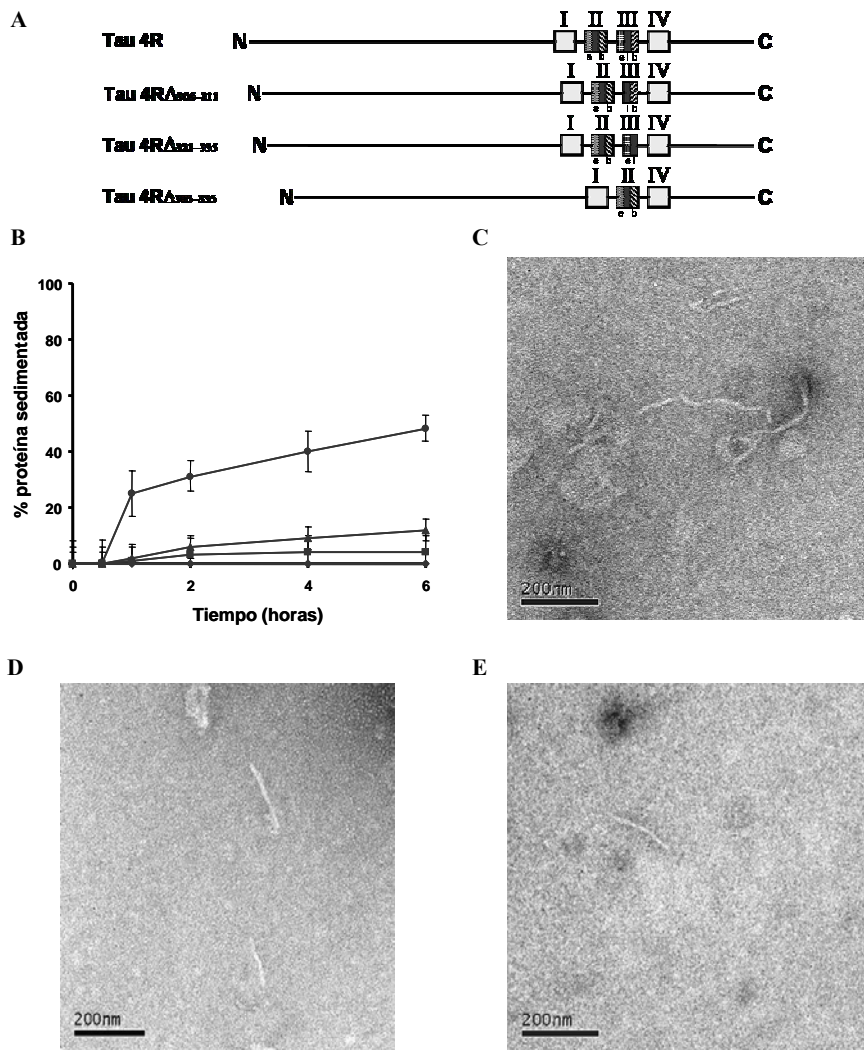
(Figura 31B), a diferencia del péptido IIIb que no polimeriza en ausencia de inductor. Esta elevada tendencia del péptido IIIa a polimerizar podría indicar que esta secuencia es la secuencia crítica en la polimerización de tau. Sin embargo, se ha descrito que estos péptidos de pequeño tamaño son muy propensos a agregar formando polímeros fibrilares con estructura secundaria de lámina- $\beta$  (López de la Paz & Serrano, 2004).



**Figura 31. Polimerización de los tres péptidos que componen la tercera repetición de tau, en presencia de quinonas. A)** Esquema de la molécula de tau en el que se muestra la tercera repetición (dominio de unión a tubulina) dividido en tres péptidos, IIIa, IIIi y IIIb. **B)** Ensamblaje de los tres péptidos (1 mg/ml) en ausencia de algún inductor de la polimerización. **C)** Ensamblaje de los tres péptidos en presencia de coenzima  $Q_0$  1 mM (ver Materiales y Métodos).

Quisimos estudiar, a continuación, el papel que tenían cada uno de ellos, no en forma aislada, sino en la proteína tau de mayor tamaño (tau 42 ó tau 4R). Para ello se generaron distintas variantes que carecían del péptido IIIa, IIIb, o de toda la repetición (residuos 306-335) (Figura 32A). Pudimos observar como la variante de tau, que carece de la secuencia del péptido IIIa (tau 4R $\Delta_{306-311}$ ), era capaz de polimerizar en presencia de quinonas. Esta variante presentaba sin embargo una capacidad de polimerizar reducida en comparación con la proteína completa (Figura 32C), aunque se podían encontrar algún agregado al llevar a cabo estudios de sedimentación (Figura 32B) y observar algunos polímeros fibrilares al analizar dichas muestras por microscopía electrónica (Figura 32D). Sin embargo, cuando se examinaron las variantes que carecían del péptido IIIb (tau 4R $\Delta_{321-335}$ ) o de la tercera repetición completa (tau 4R $\Delta_{305-335}$ ), se observó incluso una menor capacidad de polimerizar (Figuras 32B, E). Estos resultados demuestran la importancia de la tercera repetición en la polimerización de tau y como determinadas secuencias favorecen su polimerización.

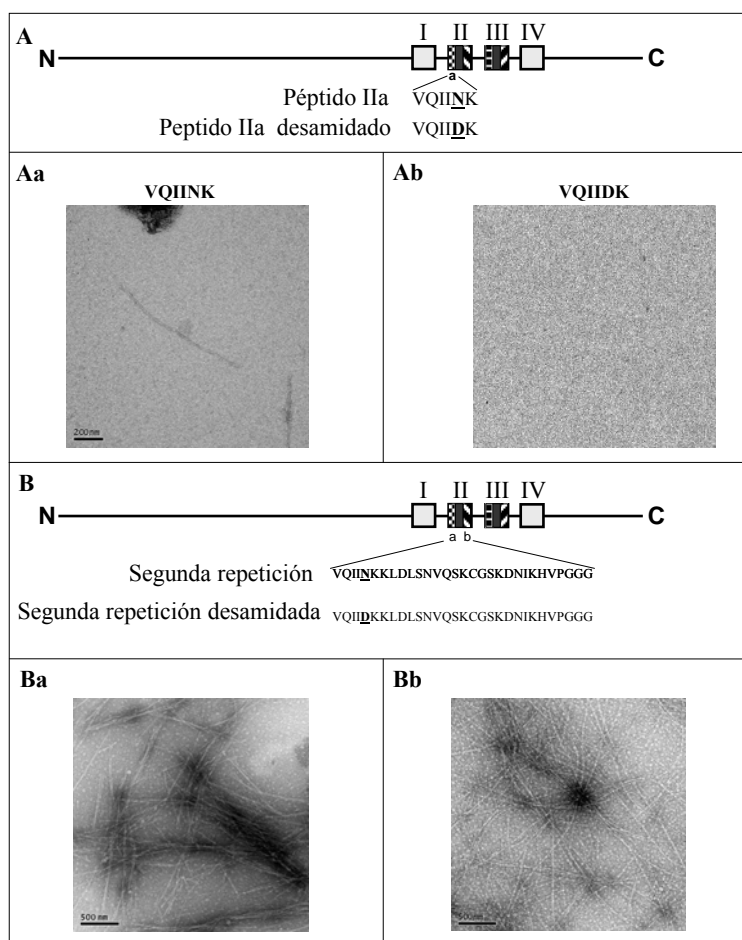




**Figura 32. Polimerización de las variantes de tau que pierden algunos residuos de la tercera repetición.** **A)** Esquema de la proteína tau 4R y las variantes empleadas en este estudio. **B)** Se mezclaron la proteína de tau completa (●) o las variantes que carecen de los residuos 305 al 335 (◆) los residuos 317 al 335 (■) que corresponde al péptido IIIb o los residuos 306 al 311 (▲) que corresponden con el péptido IIIa a una concentración de 1 mg/ml con CoQ<sub>0</sub> 2 mM y se midió, por sedimentación, la cantidad de proteína presente en el precipitado (proteína agregada o polimerizada). En las imágenes de microscopía electrónica se muestran ejemplos de los polímeros encontrados de tau (C), la variante que pierde el péptido IIIa (D) y la que pierde el péptido IIIb (E).

Una vez que habíamos mapeado las regiones críticas en la polimerización de tau, estudiamos el papel que tienen en la polimerización distintas modificaciones químicas. En la enfermedad de Alzheimer a menudo se encuentra una asparragina desamidada en el péptido equivalente al IIIa de la tercera repetición, pero en la segunda repetición (péptido IIa) (Watanabe et al., 1999). En primer lugar analizamos la capacidad de polimerizar de los dos péptidos VQIINK (péptido IIa) y VQIIDK (péptido IIa desamidado). En ausencia de cualquier inductor, el péptido IIa sin modificar es capaz de polimerizar, mientras que no encontramos polímeros en el caso del péptido IIa modificado (**Figura 33A**). Sin embargo, cuando analizamos la capacidad de polimerizar de un péptido que comprende toda la segunda repetición con la asparragina control o desamidada obtuvimos resultados muy diferentes. Ambos péptidos requieren de un inductor, como las quinonas, para polimerizar (ambos polimerizan también en presencia de heparina) y, aunque ambos polimerizan, no se observan diferencias en la capacidad de polimerizar

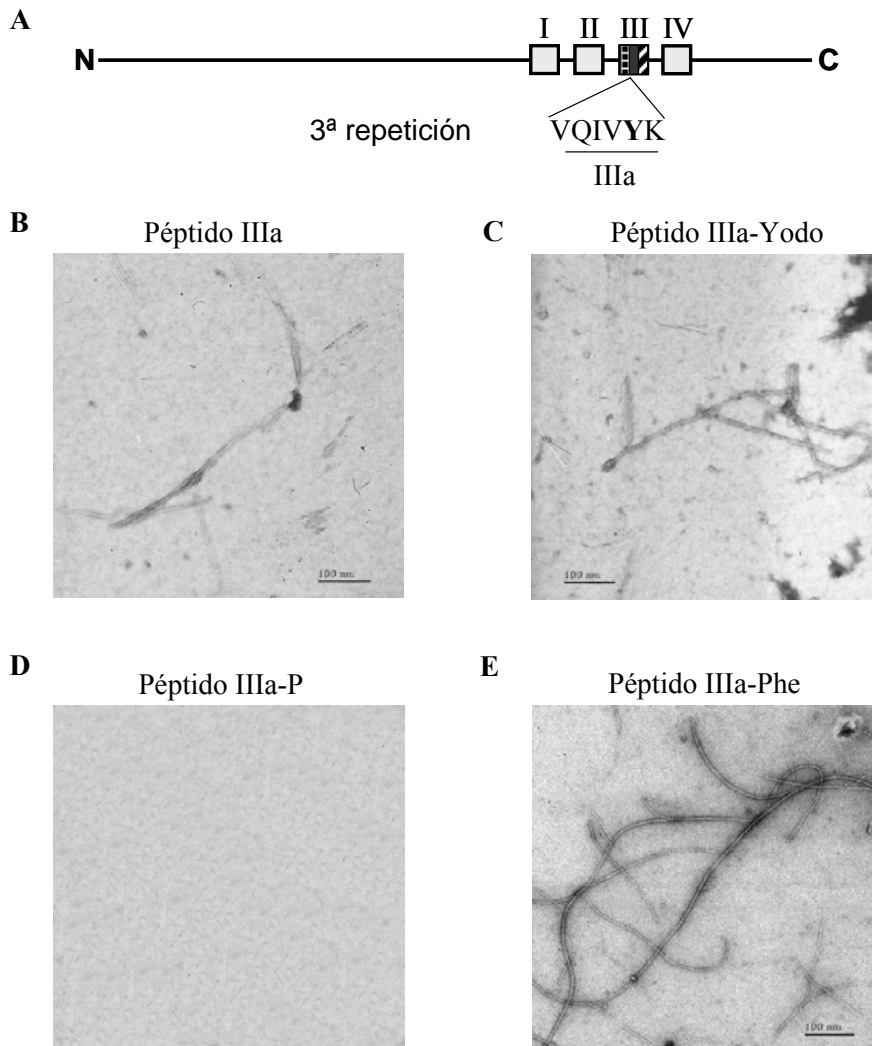
entre ambos péptidos (control y desamidado) (**Figura 33B**). Estos resultados demuestran una vez más que hay que ser precavidos al estudiar la capacidad de polimerización de estos péptidos de pequeño tamaño.



**Figura 33. Ensamblaje del péptido IIa y su variante, así como la segunda repetición. A)** Esquema de la localización del péptido IIa (VQIINK) en la molécula de tau. También se indica el péptido en el cual la asparagina es reemplazada por un ácido aspártico. **(Aa)** El análisis por microscopía electrónica mostró pocos polímeros del péptido VQIINK en ausencia de algún inductor. **(Ab)** No se encontraron polímeros del péptido VQIIDK. **B)** Esquema del péptido que forma la segunda repetición y su variante cuya asparagina es reemplazada por un ácido aspártico. **(Ba)** Imágenes de microscopía electrónica en las que se puede ver la polimerización de la segunda repetición en presencia de CoQ<sub>0</sub>. **(Bb)** Imágenes de microscopía electrónica en las que se observan los polímeros de la segunda repetición desamidada formados tras la adición de CoQ<sub>0</sub> 1 mM.

Por otro lado, el péptido IIIa (VQIVYK) puede verse afectado por modificaciones en su tirosina, la cual puede ser fosforilada o, artificialmente, yodada (von Bergen et al., 2000). Este péptido es de particular interés porque otros grupos han descrito que puede actuar como nucleador de la polimerización de tau (von Bergen et al., 2000). Este fragmento de tau es demasiado pequeño como para jugar un papel crítico en la polimerización aunque sí forma parte de la secuencia más importante en la polimerización de tau. El estudio de las modificaciones en este péptido muestra que la yodación no afecta a la capacidad de polimerizar de este péptido (**Figura 34B** y **34C**). Sin embargo, la fosforilación de este péptido en la tirosina 310 impide su polimerización (**Figura 34D**). Si la tirosina se reemplaza por fenilalanina (aminoácido que aumenta la hidrofobicidad), la capacidad de formar polímeros fibrilares se ve aumentada. Estos resultados están de acuerdo con descubrimientos descritos previamente (Pawar et al., 2005). La combinación de estos resultados sugiere que la polimerización del péptido IIIa es consecuencia

de su pequeño tamaño y de su carácter hidrofóbico y no parece que sea específico de la formación de los PHFs.

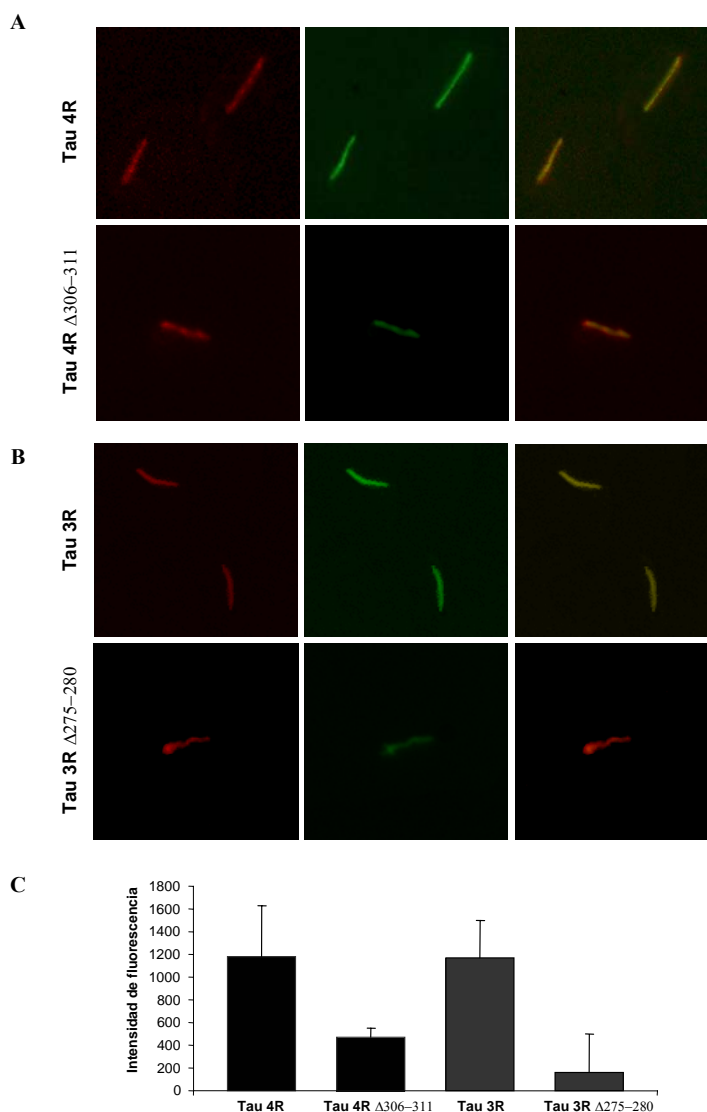


**Figura 34. Ensamblaje del péptido VQIVYK y sus variantes modificadas.** A) Esquema en el que se muestra la localización del péptido IIIa (VQIVYK) en la molécula de tau. B) Polímeros del péptido IIIa formados en ausencia de algún inductor. C) Polímeros del péptido IIIa con la tirosina yodada. D) Cuando la tirosina se fosforila no se forman polímeros fibrilares. E) Ensamblaje del péptido IIIa cuando la tirosina se reemplaza por fenilalanina.

En definitiva, hemos investigado la capacidad de polimerizar de una variedad de fragmentos y variantes de la proteína tau en presencia de un inductor, el coenzima  $Q_0$ . Para poder identificar las secuencias críticas en la polimerización de tau comparamos la capacidad de polimerizar los fragmentos de tau que contienen las secuencias posiblemente críticas y las variantes de tau que tienen estas mismas secuencias delecionadas. Además, investigamos los efectos de distintas modificaciones químicas que pueden sufrir estos péptidos tales como fosforilación o desamidación. Hemos podido observar, al realizar este estudio, que los residuos 305 al 335 son esenciales para la polimerización de tau *in vitro* en presencia de quinonas. Por otro lado, los residuos del 306 al 311 facilitan el ensamblaje *in vitro*, pero parecen no ser suficientes para que la polimerización de tau tenga lugar. De hecho, la elevada capacidad de polimerizar del péptido VQIVYK se ve altamente disminuida cuando la tirosina es modificada por fosforilación, modificación que se ha encontrado *in vivo*.

## 2.2.2. Papel del péptido VQIVYK en la fosforilación de tau. Relación entre fosforilación y agregación.

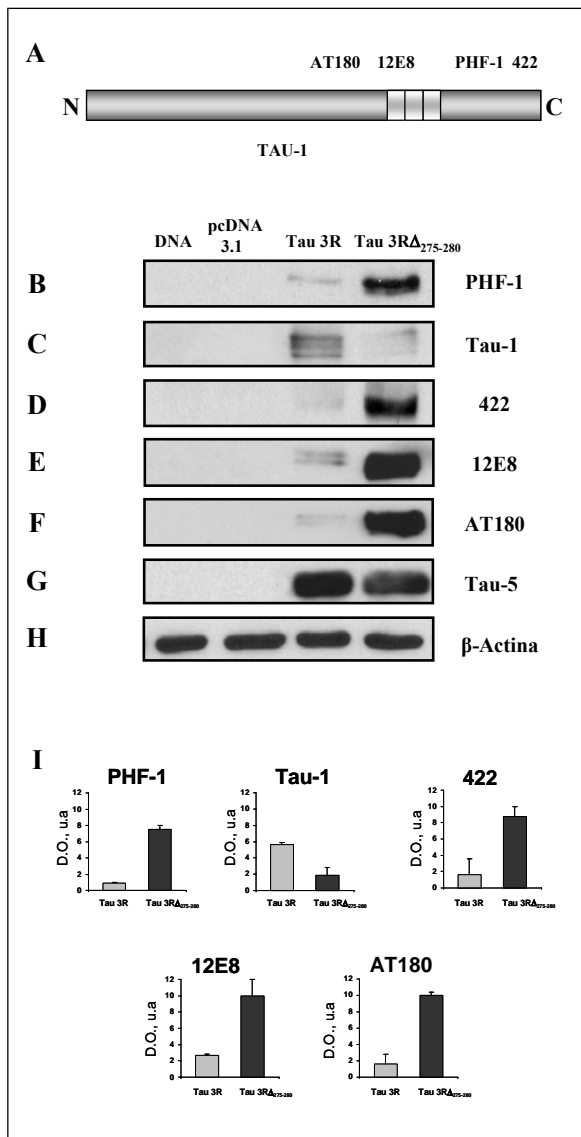
La agregación aberrante y la hiperfosforilación de tau son distintivos patológicos de diferentes tauopatías, entre las que se encuentra la enfermedad de Alzheimer. Se han descrito algunos modelos animales en los que se relacionan estas dos características, la agregación y la fosforilación (Perez et al., 2003; Noble et al., 2005), aunque no se sabe con exactitud si la fosforilación es necesaria para que se produzca la agregación de tau. Por este motivo quisimos estudiar cual podría ser la posible relación entre fosforilación y agregación. Para realizar este estudio utilizamos las isoformas de tau (Tau 4R y tau 3R) silvestres y sus correspondientes mutantes que carecen del péptido VQIVYK. La **Figura 35** muestra como las isoformas de delección polimerizan peor y, además, unen menos tioflavina-S.



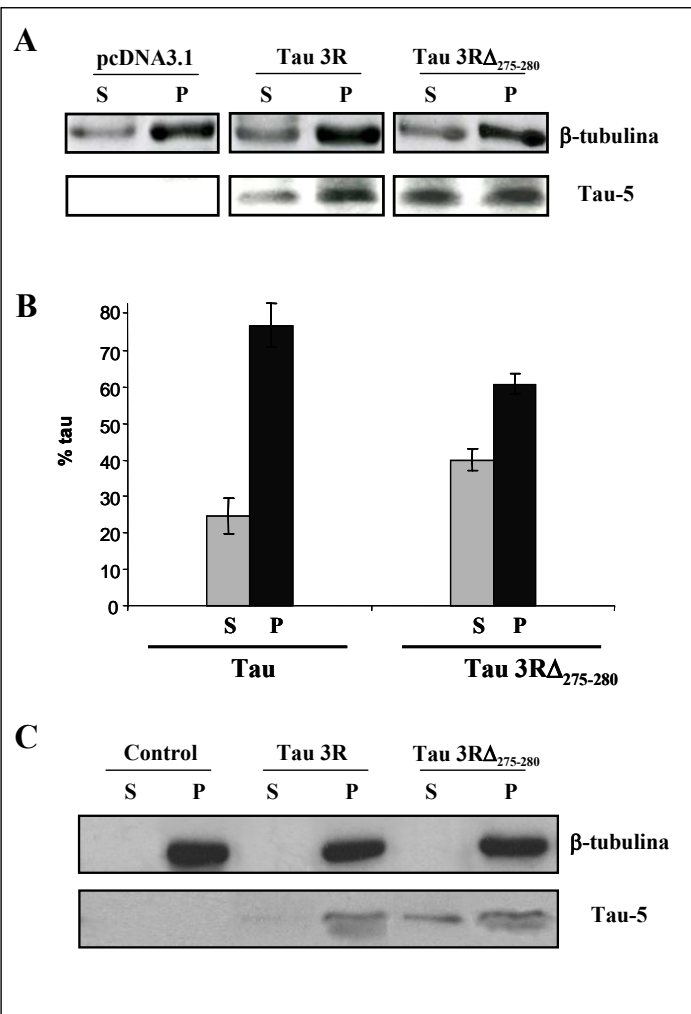
**Figura 35. Tinción con tioflavina-S de los polímeros de tau y la variante que pierde el péptido IIIa.** A) La proteína tau completa (tau 4R) y la variante sin el péptido IIIa (tau 4R $\Delta_{306-311}$ ) se ensamblaron en presencia de CoQ<sub>0</sub> y se visualizaron por inmunofluorescencia (ver Materiales y Métodos) usando un anticuerpo anti-tau T14 o la tioflavina-S. Se muestran las imágenes obtenidas y la mezcla de T14 y la tioflavina-S. B) Al igual que en (A) pero se utilizó tau 3R y la variante que pierde el péptido IIIa (tau 3R $\Delta_{275-281}$ ). C) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia emitida por la tioflavina-S. La intensidad de fluorescencia se obtuvo restando el fondo. Se mantuvieron las condiciones para esta medida en todos los casos (ver Materiales y Métodos). Las variantes de tau que pierden el péptido IIIa muestran una reducción significativa en la intensidad de fluorescencia (n=10, P<0,01 comparando con tau 4R o tau 3R).

Cuando estudiamos el efecto de la fosforilación en la agregación de estas isoformas nos encontramos con un resultado inesperado. La variante de tau 3R que carece del péptido VQIVYK (tau 3R $\Delta_{275-280}$ ) muestra una capacidad menor de agregación (**Figura 35**), aunque es mejor sustrato para PDPK (como la GSK-3) y NPPDK (como la PKA) que la proteína tau completa. Así, en cultivos celulares se pudo observar como, al transfectar células COS-7 con las construcciones de tau 3R y la variante tau 3R $\Delta_{275-280}$ , se fosforila en mayor medida la variante que carece del péptido VQIVYK, en sitios fosforilados tanto por PDPK como por NPPDK (**Figura 36**). Además, pudimos observar como la variante de tau 3R, tau 3R $\Delta_{275-280}$ , se une a los microtúbulos de las células COS-7 transfectadas con menor afinidad, posiblemente debido a su estado hiperfosforilado o a un cambio conformacional ocasionado probablemente por la delección que presenta (**Figura 37A, 37B**). Este resultado se confirmó en estudios *in vitro*, donde se pudo observar que la variante de tau 3R (tau 3R $\Delta_{275-280}$ ) se une con menor afinidad a microtúbulos estabilizados con Taxol (**Figura 37C**). Estudios de fosforilación *in vitro* mostraron que tras la incubación de tau 3R y tau 3R $\Delta_{275-280}$  con concentraciones crecientes de ATP, los valores de Km para el ATP de la GSK-3 y la PKA, no cambian, mientras que la Vmax se reduce en un 68% para la GSK-3 y en un 20% para la PKA (**Figura 38C y 38D**). Estos datos sugieren que tau 3R $\Delta_{275-280}$  es mejor sustrato para ambas quinasas que tau 3R mientras que la afinidad de ambas quinasas por el ATP, en presencia de tau 3R y tau 3R $\Delta_{275-280}$ , no se altera.

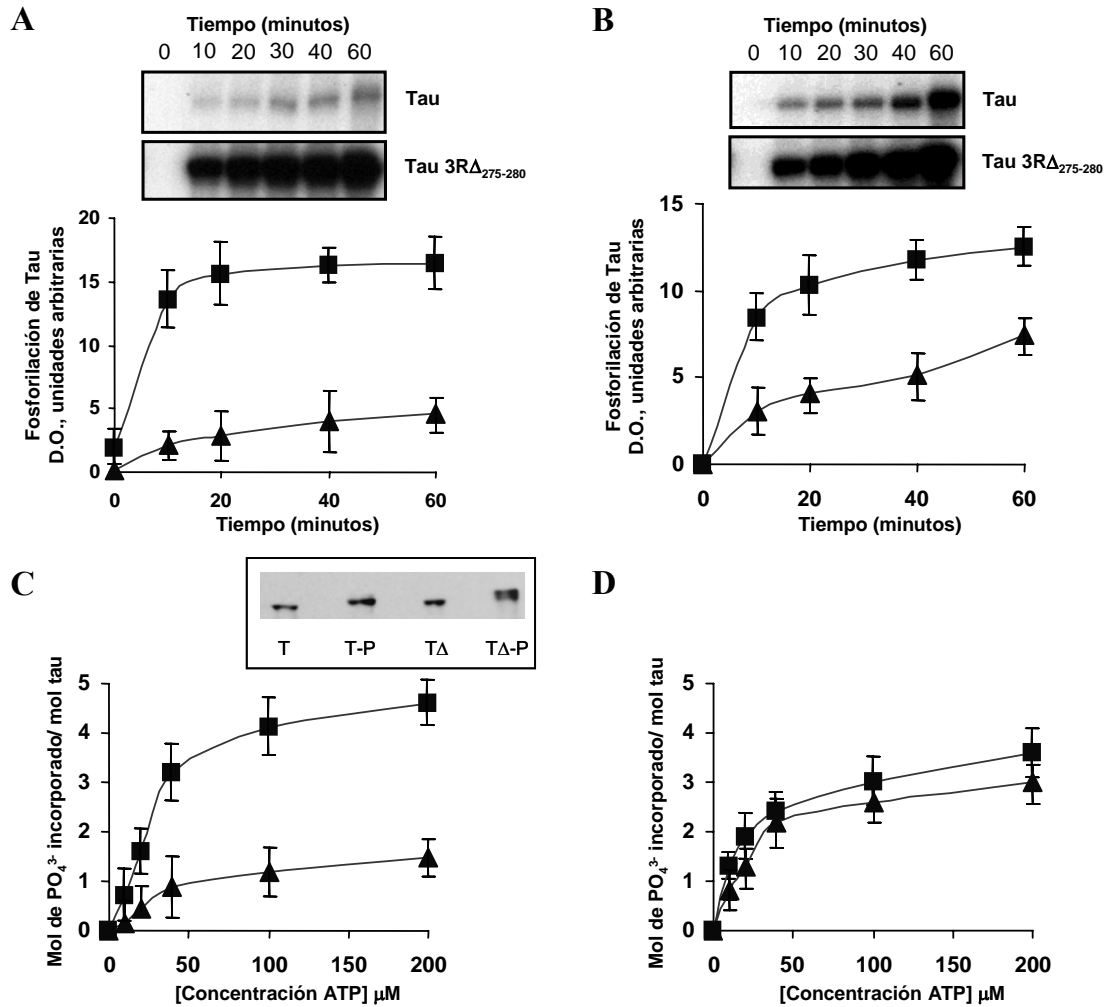
A continuación estudiamos mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF), los sitios modificados en ambas proteínas, tau 3R y tau 3R $\Delta_{275-280}$ , tras 5 horas de incubación con la quinasa GSK-3. Algunos de los péptidos detectados tras la digestión con tripsina, aumentaban su masa molecular en 80 tras la fosforilación, lo que sugiere que los péptidos se han fosforilado en un único residuo. En otros casos, la masa de los péptidos aumentaba en 160, lo que nos indicaba que se están incorporando dos fosfatos en el péptido. Por tanto, se examinaron las secuencias primarias de algunos péptidos modificados de tau 3R y tau 3R $\Delta_{275-280}$  y el número de fosfatos incorporados en los péptidos tras ser incubados con la GSK-3 (**Figura 39**). De acuerdo con datos descritos previamente (Reynolds et al., 2000), encontramos que el péptido cuyos residuos comprenden los aminoácidos 195 al 209/211, se encontraba modificado tanto en tau 3R como en su variante tau 3R $\Delta_{275-280}$ , aunque pudimos observar un sitio de fosforilación extra en la variante tau 3R $\Delta_{275-280}$ . Además, el péptido 386-406 en la variante tau 3R $\Delta_{275-280}$ , se veía modificado (**Figura 39**). Añadido a esto, pudimos detectar fosforilación en ambas proteínas en el péptido que contiene los residuos 210 al 212/221 (**Figura 39**). Para corroborar estos indicios, se sometieron las muestras a otro tipo de análisis espectrométrico que permite la obtención de espectros de fragmentación a partir de péptidos individuales (ionización por electrospray acoplada a trampa iónica). Mediante este tipo de análisis identificamos la serina 199 y la treonina 212 como los sitios de fosforilación, los cuales corresponden a algunos de los sitios fosforilados por la GSK-3 en tau 3R (Reynolds et al., 2000).



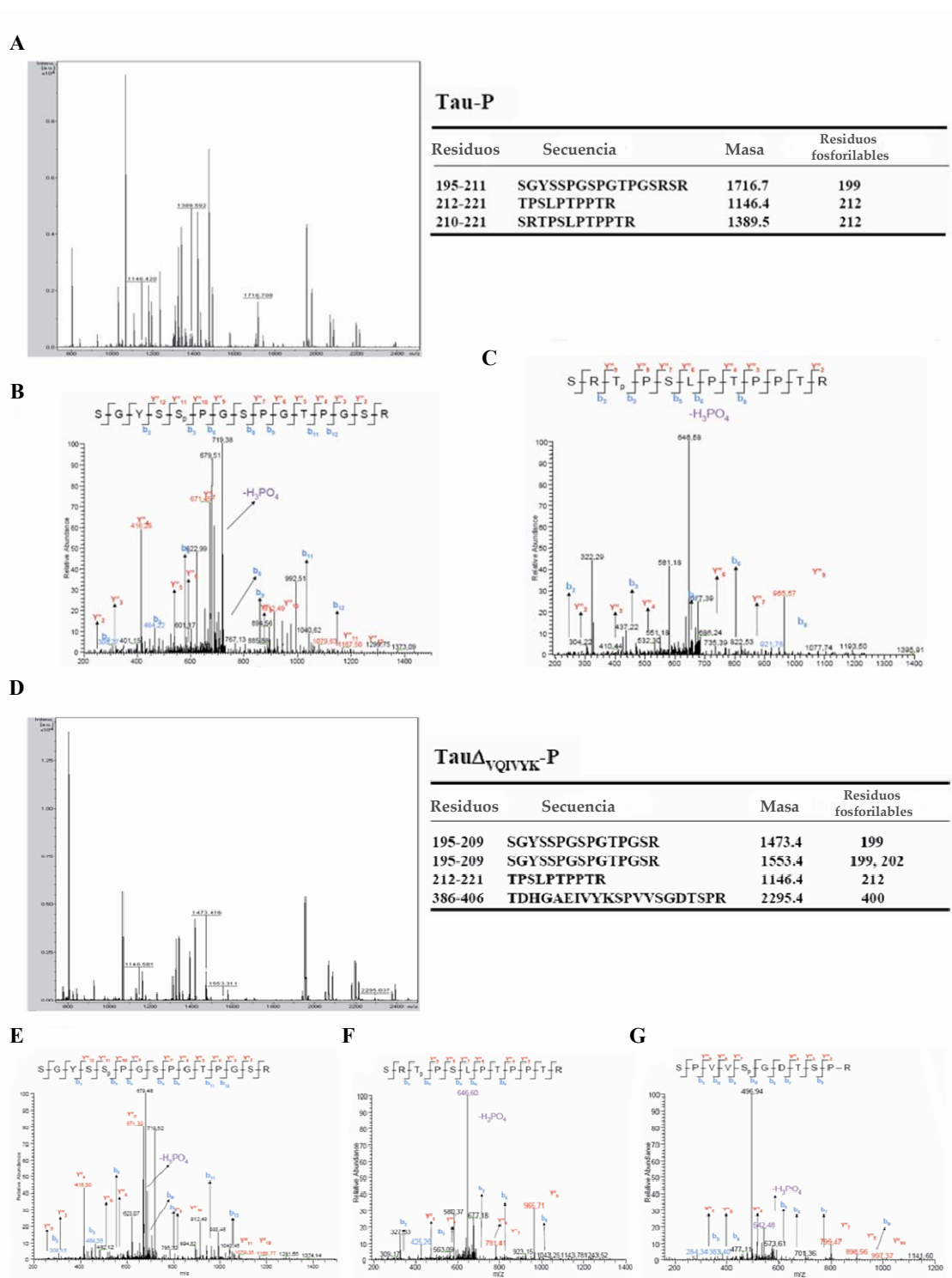
**Figura 36. Fosforilación de tau 3R y tau 3R $\Delta_{275-280}$  en células COS-7 transfectadas.** A) Esquema de la molécula de tau y los sitios de fosforilación analizados en este estudio. Los lisados de células COS-7 sin transfectar y transfectadas con el plásmido pcDNA tau 3R, el plásmido pcDNA tau 3R $\Delta_{275-280}$  o el plásmido vacío original pcDNA 3.1, se analizaron por Western Blot usando diferentes anticuerpos: el anticuerpo Tau-5, que reconoce tau total (G), Tau-1, que reconoce tau desfosforilado (C), o los anticuerpos fosfo-dependientes PHF-1 (B), 422 (D), 12E8 (E) y AT180 (F). El anticuerpo anti  $\beta$ -actina se usó como control de carga (H). La variante tau 3R $\Delta_{275-280}$  se fosforila en las células COS-7 en mayor medida en los sitios reconocidos por los anticuerpos PHF-1, 422, AT180, 12E8 y en menor medida en los sitios reconocidos por los anticuerpos Tau-1 que en las células que expresan Tau. En (I) se muestra la cuantificación por densitometría de los resultados obtenidos en los apartados B-F, después de normalizar con respecto a tau total (n=3, P<0.01).



**Figura 37. La variante de tau 3R, tau 3R $\Delta_{275-280}$ , se une a los microtúbulos en menor proporción *in vitro* y en células COS-7 transfectadas.** A) Se transfectaron células COS-7 con los plásmidos pcDNA3.1, pcDNA tau 3R y pcDNA tau 3R $\Delta_{275-280}$  y a las 48 horas las células se incubaron durante 30 segundos con el buffer de extracción o de lisis que contiene 0.5% Triton X-100. Los homogenizados se separaron por centrifugación en la fracción soluble en el detergente (sobrenadante (S)) y la insoluble (precipitado (P)) que contiene los microtúbulos polimerizados y las proteínas asociadas. Se analizaron por Western Blot usando el anticuerpo Tau-5, anticuerpo que se une de manera específica a tau y nos permite medir los niveles totales, y con un anticuerpo anti  $\beta$ -tubulina como control de carga. B) Se cuantificó la proporción de tau encontrado en el precipitado (P) y en el sobrenadante (S), (n=3, P<0.05). C) Los microtúbulos obtenidos tras incubación durante 20 minutos a 37°C de la tubulina purificada (5mM) con Taxol 10  $\mu$ M se incubaron durante 5 minutos a 37°C con tau 3R y tau 3R $\Delta_{275-280}$  (0.2 mM). Tras la incubación se centrifugaron las muestras para separar los microtúbulos (tubulina polimerizada (precipitado (P)) de la proteína no polimerizada (sobrenadante (S))). Una vez separadas se determinó por tinción con azul de Coomassie la cantidad de tubulina tras la copolimerización en ausencia (control) o presencia de la proteína tau 3R y tau 3R $\Delta_{275-280}$ . La presencia de las proteínas tau en el sobrenadante se determinó usando el anticuerpo Tau-5.



**Figura 38. Los niveles de fosforilación de tau 3R aumentan tras la delección de los residuos 275 al 280.** Tau 3R ( $\blacktriangle$ ) y tau 3R $\Delta_{275-280}$  ( $\blacksquare$ ) fosforilados por la GSK-3 (A y C) o por la PKA (B y D) en presencia de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP se separaron por electroforesis en gel en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y se analizaron mediante densitometría de las bandas obtenidas en las autoradiografías (A y B, los valores de las densitometrías se representan como unidades arbitrarias). También se midió el efecto de la concentración de ATP en la fosforilación por la GSK-3 o la PKA (C y D). En el recuadro en (C) se puede observar el cambio en la movilidad electroforética de las proteínas al ser fosforiladas (T= tau, T-P= tau fosforilado, T $\Delta$ = tau 3R $\Delta_{275-280}$ , T $\Delta$ -P= tau 3R $\Delta_{275-280}$  fosforilado).



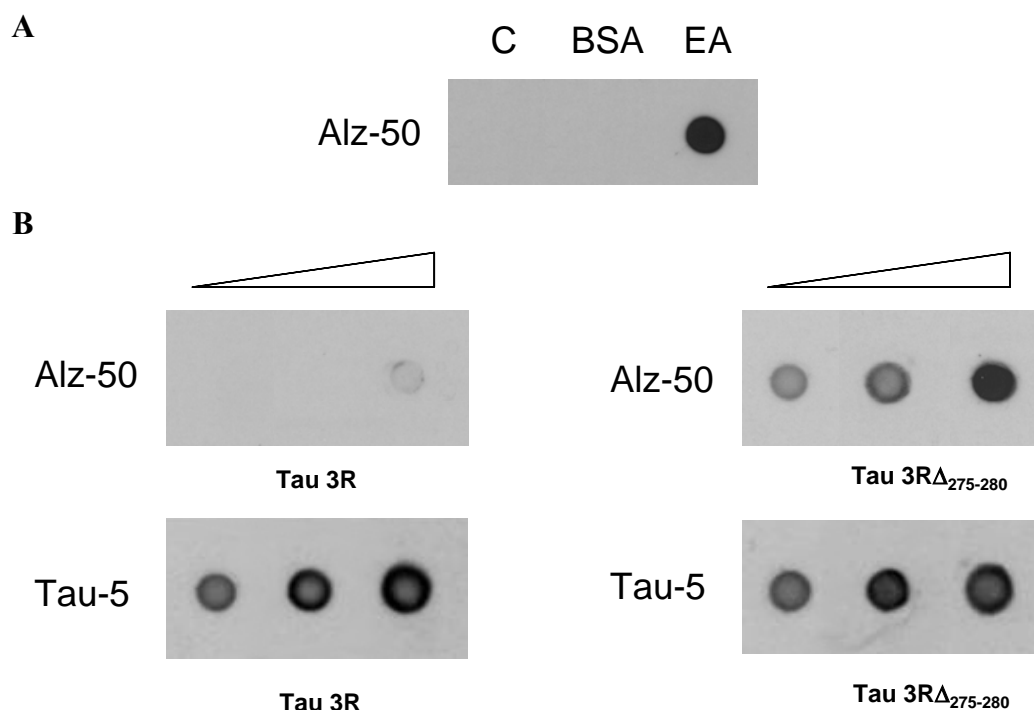
**Figura 39. Identificación de los residuos fosforilados de tau y tau $\Delta$ VQIVYK (tau 3R $\Delta$ <sub>306-311</sub>) por la GSK-3 $\beta$ .** A) Se puede ver el espectro obtenido por MALDI-TOF y la masa molecular junto con la secuencia de los péptidos trípticos de tau candidatos de ser fosforilados por la GSK-3 $\beta$  (tau-P y tau $\Delta$ VQIVYK-P (tau 3R $\Delta$ <sub>306-311</sub>-P)). Para corroborar estos indicios se resolvió la muestra por HPLC-ESI-IT, trabajando en modo SIM (monitorización de iones aislados), de manera que el analizador sólo fragmentara el péptido candidato. A las masas peptídicas reconocibles se les asignó su serie (denominada b<sub>n</sub> o y'<sub>n</sub>, en función del transcurso de la fragmentación). En B, y C se pueden ver los espectros de fragmentación en los que se encuentran masas diferenciales con respecto al espectro de la muestra sin fosforilar. Estos picos son indicativos de que la fosforilación esta teniendo lugar en la tercera serina (serina 199 de tau) y en la primera treonina (treonina 212 de tau) de los péptidos correspondientes. D) Al igual que en A) pero para la variante de tau, tau $\Delta$ VQIVYK (tau 3R $\Delta$ <sub>306-311</sub>). También al igual que en B y C, en F, G y H se pueden observar los picos indicativos de que la fosforilación esta teniendo lugar en la tercera serina (serina 199 de tau), en la primera treonina (treonina 212 de tau) y la segunda serina (serina 400) de los péptidos correspondientes.



Resumiendo hemos demostrado que la variante tau 3R $\Delta_{275-280}$  se fosforila más eficientemente y en más residuos por la GSK-3 que la variante silvestre. Sin embargo, la fosforilación mediada por PKA también es más eficiente (Figura 39, serina 262 fosforilada reconocida por el anticuerpo 12E8) aunque en este caso ambas isoformas se fosforilan en los mismos epítomos.

Estos resultados sugieren que un cambio conformacional en la proteína tras la delección pueda estar facilitando la fosforilación mediada por las quinasas GSK-3 y PKA. El cambio conformacional que ocurre tras la delección del péptido VQYVYK se puede identificar por un anticuerpo conformacional, el Alz-50 (Carmel et al., 1996; Jicha et al., 1999). Este anticuerpo solo reconoce específicamente a tau cuando su extremo amino está en contacto con la región de unión a microtúbulos (Brion et al., 1985; Carmel et al., 1996; Jicha et al., 1999). La conformación de tau reconocida por el Alz-50 aparece en neuronas en las que se están empezando a formar los ovillos neurofibrilares, aunque también esta presente en neuronas con ovillos neurofibrilares más maduros (Tabaton et al., 1988). De hecho, el anticuerpo Alz-50 se une a los PHFs (Carmel et al., 1996) o a otros agregados de tau encontrados en otras tauopatías (Tabaton et al., 1988).

Cuando utilizamos este anticuerpo para saber si existen cambios conformacionales en la variante tau 3R $\Delta_{275-280}$  observamos que dicho anticuerpo, además de reconocer los PHFs (Figura 40A), era capaz de unirse a la variante tau 3R $\Delta_{275-280}$ , con más alta afinidad que a la variante silvestre.



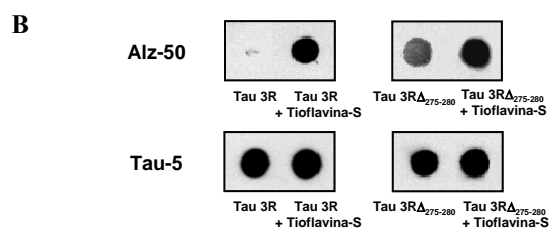
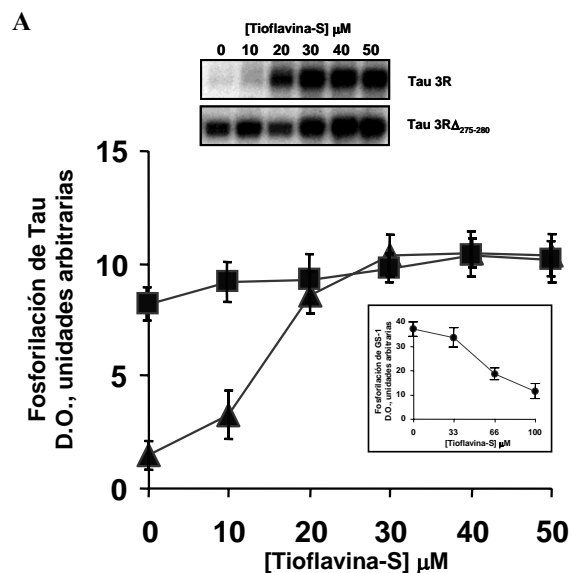
**Figura 40. Interacción del anticuerpo conformacional específico de Alzheimer Alz-50 con la variante tau 3R $\Delta_{275-280}$ .** A) Mediante análisis por Dot Blot se pudo observar como el anticuerpo Alz-50 reacciona específicamente con un extracto de cerebro de un enfermo de Alzheimer (EA) y no con uno de un control no enfermo (C) o con 2  $\mu$ g de Albumina de suero bovino (BSA, del inglés "Bovine Serum Albumin"). B) También, mediante Dot Blot, se analizaron cantidades crecientes (0.01, 0.1 y 1  $\mu$ g de tau 3R y de la variante tau $\Delta_{275-280}$  utilizando el anticuerpo Alz-50. Como se puede observar el anticuerpo reacciona de manera mucho mas intensa con la variante de tau 3R que con la proteína tau 3R. El anticuerpo Tau-5 se utilizó para verificar que se habían cargado las mismas cantidades de ambas proteínas.

En la Figura 35 se puede observar la importancia de los residuos VQIVYK en la unión de tioflavina-S a los filamentos de tau, ya que cuando estos residuos están ausentes en la proteína (tau

3R $\Delta_{275-280}$ ) se ve una clara disminución en la tinción de los polímeros fibrilares con tioflavina-S, en comparación con los polímeros ensamblados a partir de la proteína tau completa. Además, se ha descrito que la unión de la tioflavina-S a tau favorece su polimerización (Chirita et al., 2005). Por tanto, la interacción de la tioflavina-S con los residuos VQIVYK de la proteína tau debe favorecer su agregación o polimerización. Sin embargo, no se había estudiado hasta el momento, si esta misma interacción puede tener efecto sobre la fosforilación.

Por tanto, en primer lugar quisimos investigar si la interacción de la tioflavina-S con tau afecta a la fosforilación. Se estudió el efecto *in vitro* de la tioflavina-S sobre la fosforilación de tau añadiendo cantidades crecientes del colorante a la mezcla de reacción.

Medimos como control el efecto que puede tener la tioflavina-S sobre la actividad de la GSK-3 y PKA (quinasas utilizadas en este estudio) usando los péptidos GS-1 y p24 como sustratos. Por debajo de 30  $\mu\text{M}$  de tioflavina-S, la actividad de la GSK-3 disminuye levemente (ver **Figura 41**), mientras que la actividad inicial de la PKA en presencia de 10  $\mu\text{M}$  de tioflavina-S es menor del 10% de, indicando que la tioflavina-S es un inhibidor más potente para la PKA que para la GSK-3.

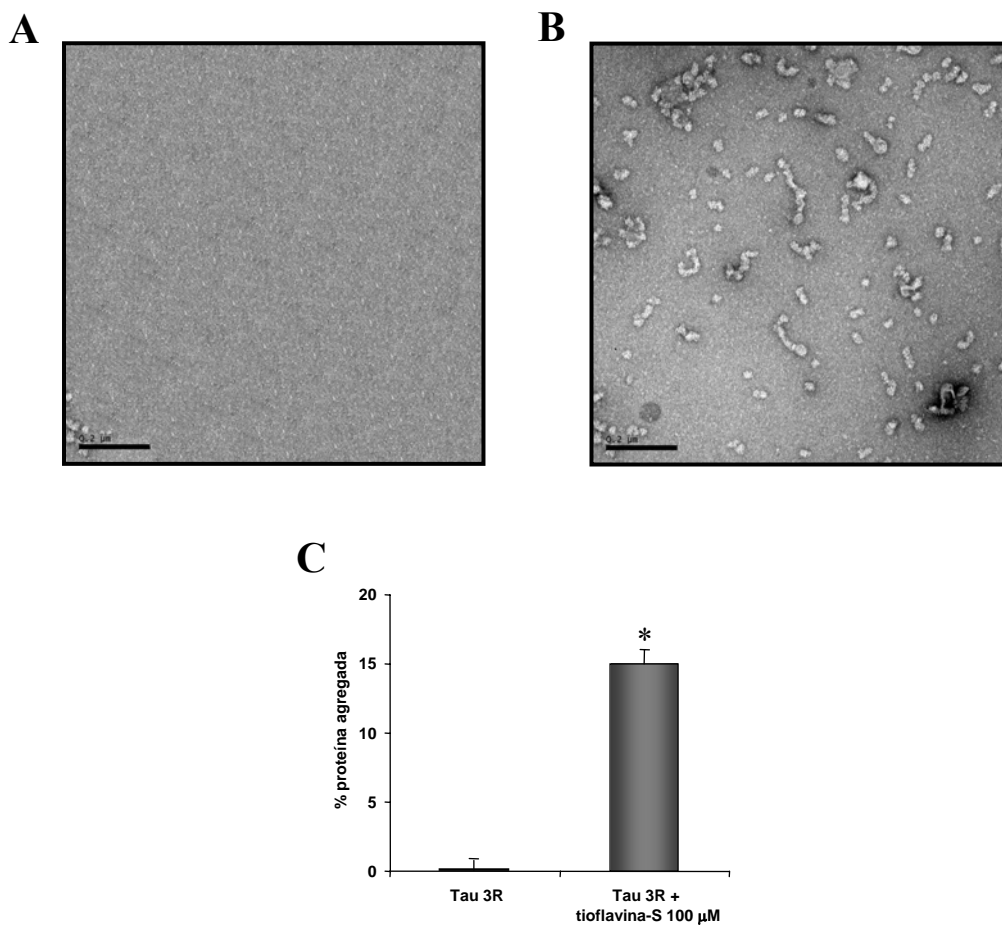


**Figura 41. Fosforilación de tau 3R y la variante tau 3R $\Delta_{275-280}$  en presencia de tioflavina-S.** A) Fosforilación de tau 3R ( $\blacktriangle$ ) y tau 3R $\Delta_{275-280}$  ( $\blacksquare$ ) *in vitro* por la GSK-3 en presencia de [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP y distintas concentraciones de tioflavina-S. Las proteínas, una vez fosforiladas se separaron por electroforesis en gel en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y se analizaron mediante densitometría de las bandas obtenidas en las autoradiografías (los valores de las densitometrías se presentan como unidades arbitrarias). En el recuadro se puede ver como se fosforila el péptido GS-1 ( $\bullet$ ) por la GSK-3 en presencia de concentraciones crecientes de tioflavina-S. B) Mediante análisis por Dot Blot se pudo observar como reaccionaba el anticuerpo Alz-50 con tau 3R y tau 3R $\Delta_{275-280}$  en presencia o ausencia de tioflavina-S. El anticuerpo Tau-5 se utilizó para verificar que se habían cargado las mismas cantidades de ambas proteínas.

Después de determinar el efecto que la tioflavina-S tiene sobre la actividad de la GSK-3, quisimos medir el efecto que ejerce la tioflavina-S sobre la fosforilación de tau y su variante. En

presencia de concentraciones crecientes de tioflavina-S, se produce un claro aumento en la fosforilación de tau por la GSK-3, mientras que con la variante de delección no se observan cambios (**Figura 41**). Por tanto, la interacción de los residuos VQIVYK con la tioflavina-S produce un efecto similar en la fosforilación de tau al que ocurre cuando se deleciona este péptido.

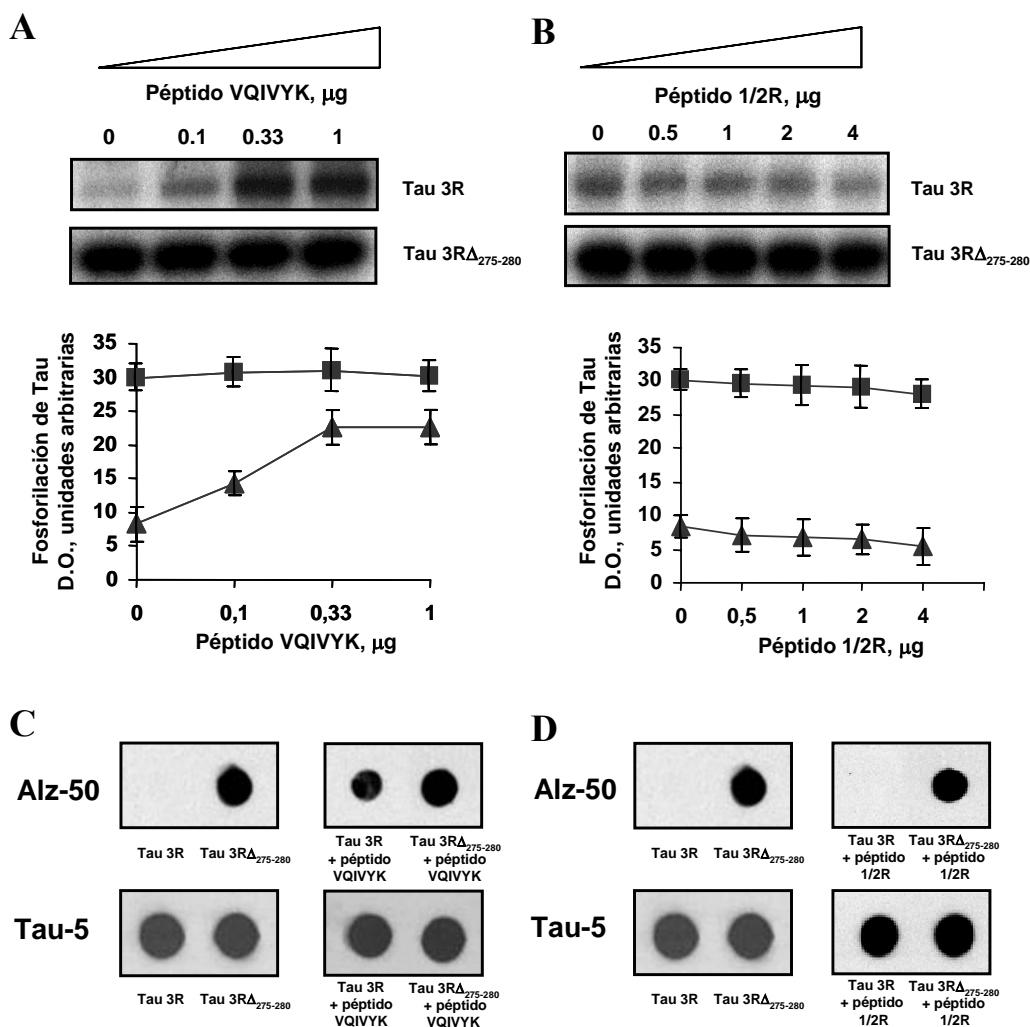
Además, hemos podido apreciar como en presencia de la tioflavina-S, la unión de tau a los microtúbulos se vé disminuida en un 15% (datos no mostrados). Este resultado no es de extrañar, puesto que, como hemos descrito anteriormente, la región donde se une la tioflavina-S forma parte de la región por donde tau se une a los microtúbulos y más concretamente a la tubulina (Goode et al., 1997). También, pudimos observar, como se ha descrito anteriormente (Chirita et al., 2005), que un  $15\% \pm 2$  del total de proteína tau se agrega en presencia de  $100 \mu\text{M}$  tioflavina-S (estos resultados se analizaron por sedimentación y por microscopía electrónica) (**Figura 42**).



**Figura 42. Ensamblaje de tau 3R en presencia de tioflavina-S.** Se incubó proteína tau 3R (1 mg/ml) en ausencia o presencia de tioflavina-S  $100 \mu\text{M}$ . Los polímeros ensamblados se visualizaron por microscopía electrónica (A y B respectivamente) y se cuantificaron tras la centrifugación ( $n=3$ , \*  $P<0,01$ ).

En estudios publicados previamente (von Bergen et al., 2000) se ha sugerido que dos moléculas de tau pueden interactuar entre sí, en parte, a través de los residuos VQIVYK. Por tanto, nos preguntamos si la interacción del péptido VQIVYK con tau puede, al igual que la unión de la tioflavina-S, favorecer la fosforilación de tau. Cuando hicimos los experimentos para confirmar esta hipótesis, observamos que la fosforilación de tau aumenta en presencia de concentraciones crecientes del péptido

VQIVYK (**Figura 43**). Quisimos comprobar si esta interacción puede tener lugar a través de la unión del péptido VQIVYK a esta misma secuencia en la molécula completa de tau. Para ello hicimos el mismo experimento con la variante de tau 3R, tau 3R $\Delta_{275-280}$ .



**Figura 43. Fosforilación de tau 3R en presencia de los péptidos VQIVYK y 1/2R.** Fosforilación de tau 3R (▲) y tau 3R $\Delta_{275-280}$  (■) *in vitro* por la GSK-3 en presencia de [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP y distintas cantidades del péptido VQIVYK (A) y del péptido 1/2R (B). Las proteínas después de ser fosforiladas, se separaron por electroforesis en gel en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Posteriormente se analizaron las bandas obtenidas en las autoradiografías mediante densitometría (los valores de las densitometrías se presentan en unidades arbitrarias). Mediante el análisis por Dot Blot se pudo observar como reaccionaba el anticuerpo Alz-50 con tau y tau 3R $\Delta_{306-311}$  en presencia o ausencia de los péptidos VQIVYK (C) y el péptido 1/2R (D). El anticuerpo Tau-5 se utilizó para verificar que se habían cargado las mismas cantidades de ambas proteínas.

Al añadir el péptido VQIVYK a tau 3R $\Delta_{275-280}$  no se observó ningún cambio en la fosforilación por GSK-3 de esta variante (**Figura 43**). Por tanto, podemos decir que la delección del péptido VQIVYK, o una interacción con tioflavina-S o el péptido VQIVYK, produce un aumento en la fosforilación de tau 3R.

Además del péptido VQIVYK existe otro péptido implicado en el autoensamblaje de tau, el péptido 1/2R. Pero, al contrario que lo que ocurre en presencia del péptido VQIVYK, la interacción con este péptido no favorece la fosforilación de tau (**Figura 43**). Para analizar si las diferencias observadas entre ambos péptidos son debidas a cambios en la conformación de tau, se analizó, en presencia o en ausencia de ambos péptidos, y mediante Dot Blot, la reacción de tau con el anticuerpo conformacional

Alz-50. En la **Figura 43C y 43D** se puede ver como la interacción del péptido VQIVYK con tau favorece el cambio conformacional, mientras que la interacción con el péptido 1/2R no produce ningún cambio conformacional que pueda ser reconocido con el anticuerpo Alz-50.

En definitiva, nuestros resultados sugieren que la unión del péptido VQIVYK a tau mimetiza la agregación de tau y facilita su fosforilación. De este modo, la delección de este péptido o la interacción del mismo péptido, dentro de la molécula de tau, con otras moléculas como la tioflavina-S o el mismo péptido, daría lugar a un incremento en la fosforilación que podría producirse como consecuencia de un cambio conformacional. Sin embargo, únicamente se favorece la agregación cuando el péptido VQIVYK no se deleciona, ya que éste parece jugar un papel importante, junto con el péptido 1/2R, en la agregación de tau (von Bergen et al., 2000). Por tanto, podemos proponer como modelo para los eventos que ocurren en la patología de tau, la aparición de un cambio conformacional que facilitaría la fosforilación de tau, la agregación de tau o ambas a la vez. El péptido VQIVYK parece estar jugando un papel importante en el cambio conformacional. Este cambio conformacional también puede inducirse *in vivo* por diferentes señales, como el estrés oxidativo (Takeda et al., 2000). De acuerdo con nuestro modelo, el cambio conformacional reconocido por el anticuerpo Alz-50 predispone a tau a ser fosforilado, agregarse o ambas cosas, dependiendo de las diferentes quinasas presentes en la neurona o de la concentración de tau. Por tanto, estas diferencias podrían explicar como diferentes tipos de patologías de tau ocurren en diferentes neuronas.

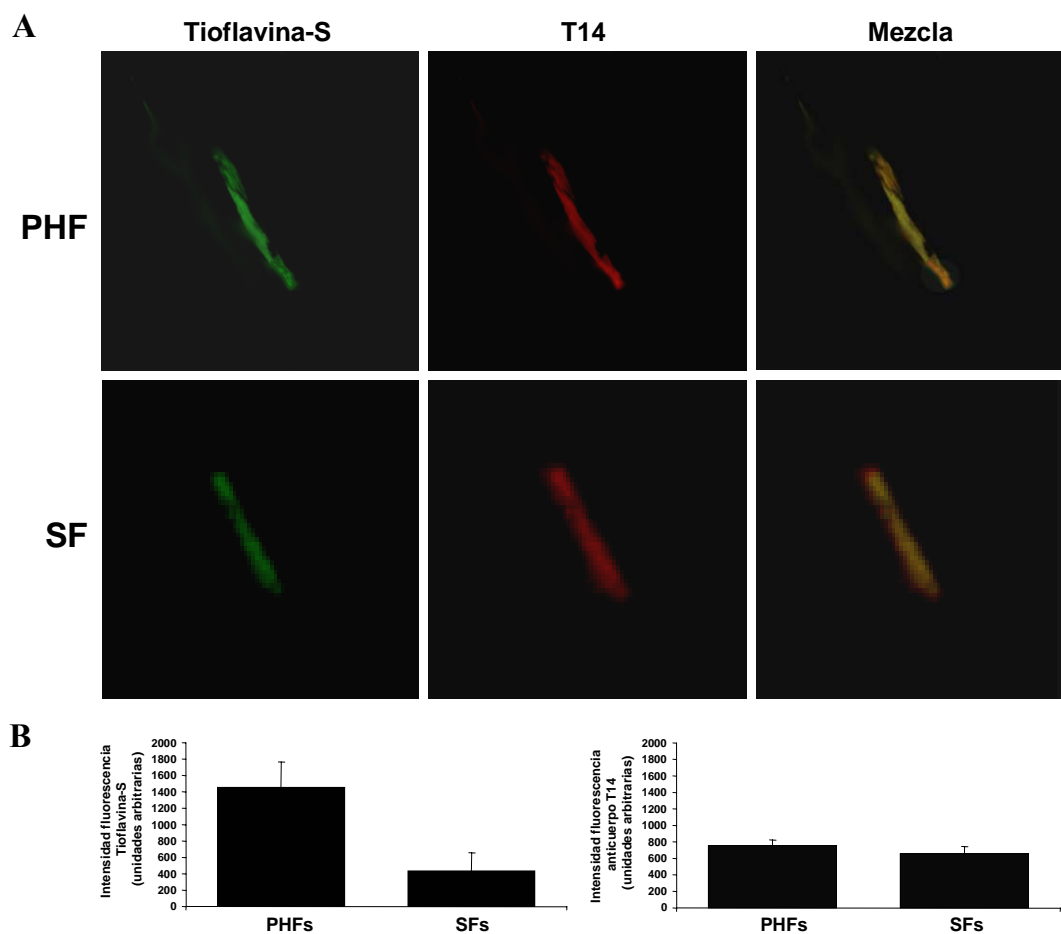
### **3. MECANISMOS DE ENSAMBLAJE DE LOS PHFs Y CUERPOS DE HIRANO**

#### **3.1. Caracterización de la estructura de los PHFs mediante una técnica nueva**

Como ya se ha podido observar en varios de los resultados mostrados previamente en esta memoria, para la visualización de los filamentos de tau se ha recurrido al uso de técnicas de microscopía electrónica. También es posible visualizar los agregados de tau directamente en cortes de tejido, por microscopía óptica de fluorescencia mediante el uso de anticuerpos que se unen específicamente a estos agregados o mediante colorantes como la tioflavina-S. La tioflavina-S es un colorante que se une a agregados proteicos que presentan estructuras en lámina  $\beta$  o bolsillos hidrofóbicos. Nos preguntamos si, como se pueden visualizar y estudiar por técnicas de inmunofluorescencias otras estructuras filamentosas como son los microtúbulos (Evans et al., 1985), seríamos capaces de visualizar los filamentos de tau, ya fueran PHFs/ SFs (aislados de cerebros de enfermos de Alzheimer) o filamentos de tau polimerizados *in vitro* en presencia de quinonas. Para llevar a cabo este tipo de estudio se han utilizado distintos anticuerpos que reconocen la proteína tau y la tioflavina-S, que es capaz de unirse a los PHFs (LeVine, 1999). Para ello modificamos en parte el protocolo original mediante el cual se visualizaban los microtúbulos por microscopía óptica de fluorescencia (Evans et al., 1985). De acuerdo con este protocolo, las muestras que contienen los microtúbulos polimerizados se centrifugan sobre cubres de vidrio que se colocan en el fondo de tubos de centrifuga Corex de 30 ml. Posteriormente se fijan y se procede a realizar el análisis por inmunofluorescencia. En un principio, realizamos el análisis siguiendo el mismo protocolo descrito para los microtúbulos, pero vimos que se perdía mucha muestra en los lavados de la inmunofluorescencia. Lo que hicimos fue, tratar previamente los cubres de vidrio con polilisina y después

de la centrifugación fijar la muestra con paraformaldehído al 4%. Otra modificación que se introdujo fue que, en vez de centrifugar, tratamos los portas de vidrio con gelatina con el fin de inmovilizar las muestras. Posteriormente, sobre éstos se añade un volumen de muestra que contiene los filamentos, se deja deshidratar a 37°C y posteriormente se realiza el ensayo de inmunofluorescencia.

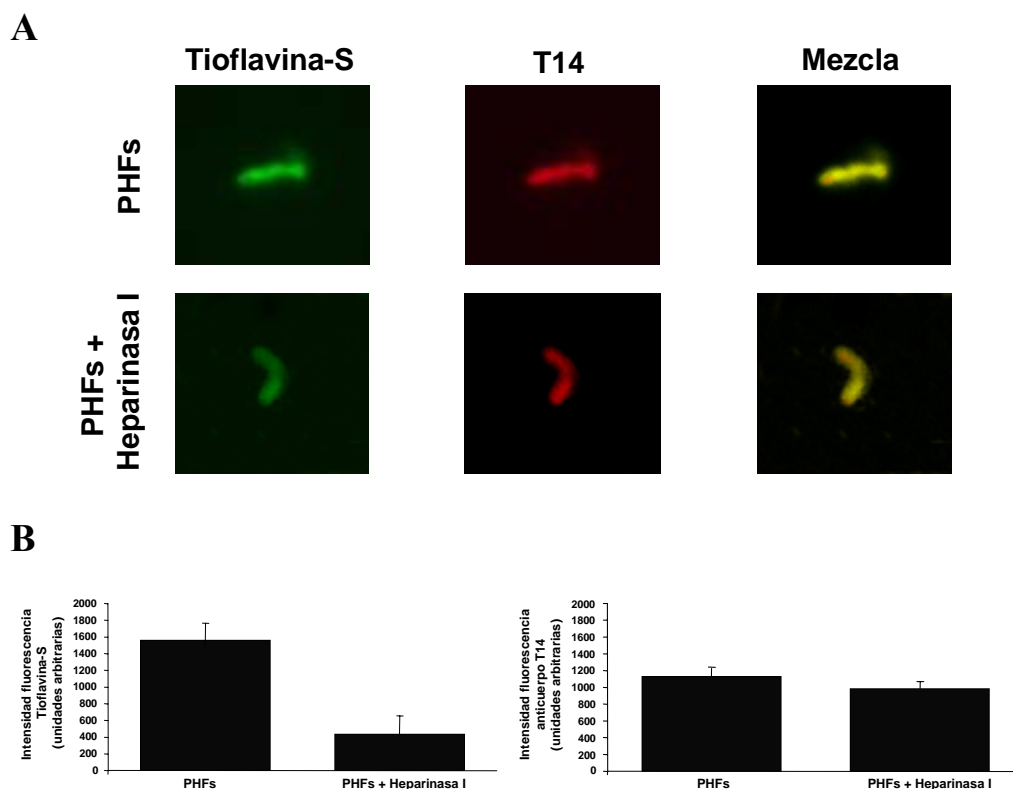
En primer lugar se quiso examinar si los PHFs o SFs, aislados de cerebros de enfermos de Alzheimer, se pueden visualizar por microscopía óptica de fluorescencia. El ensayo fue positivo y se pudo observar que existen diferencias en las intensidades de fluorescencia emitidas. Cuando analizamos la fluorescencia emitida por la tioflavina-S unida a dichos filamentos, observamos que existían diferencias entre los PHFs y los SFs (**Figura 44**). Así, se teñían más los PHFs que los SFs.



**Figura 44. Helicidad y tinción de los PHFs y SFs con tioflavina-S. A)** Visualización de los PHFs y los SFs por microscopía óptica de fluorescencia, utilizando el anticuerpo anti-tau T14 y la tioflavina-S al 0.01%. **B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia tras la tinción de ambos filamentos. Se puede observar una disminución en la tinción con tioflavina-S en los SFs en comparación con los PHFs. También se cuantificó la intensidad de fluorescencia tras la incubación con el anticuerpo T14. En este caso, las diferencias que se observaron no fueron significativas.

La diferente intensidad de tinción entre ambos tipos de polímeros (PHFs y SFs) con tioflavina-S sugiere que puede existir alguna relación entre la helicidad del polímero y la tinción con tioflavina-S. Así, parece que cuanto más helicidad presente el polímero, más se tiñe con tioflavina-S (**Figura 44**). Se sabe que la helicidad de los PHFs varía según los niveles de glicosaminoglicanos sulfatados unidos a tau (Arrasate et al., 1997), por ello quisimos analizar como se tiñen los PHFs tras ser tratados con heparinasa I.

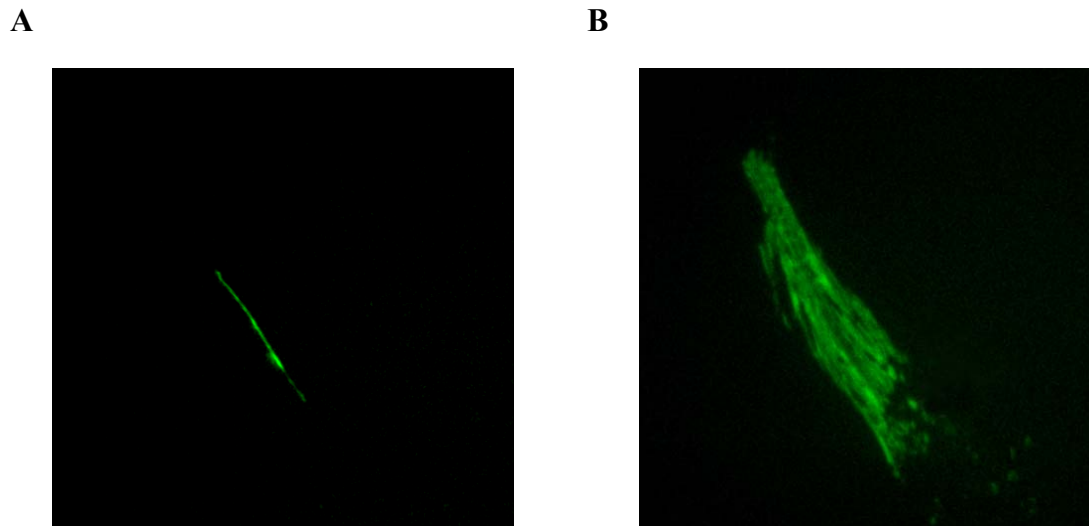
En la **Figura 45**, se puede observar cual es el efecto de la heparinasa I sobre la tinción con tioflavina-S al 0,01%. Se puede apreciar como, tras el tratamiento de los PHFs con heparinasa I, se da una disminución en la señal de la tinción con tioflavina-S. Este resultado, por tanto, corrobora la observación previamente descrita en la que se puede relacionar el grado de helicidad de los polímeros con el grado de tinción con tioflavina-S.



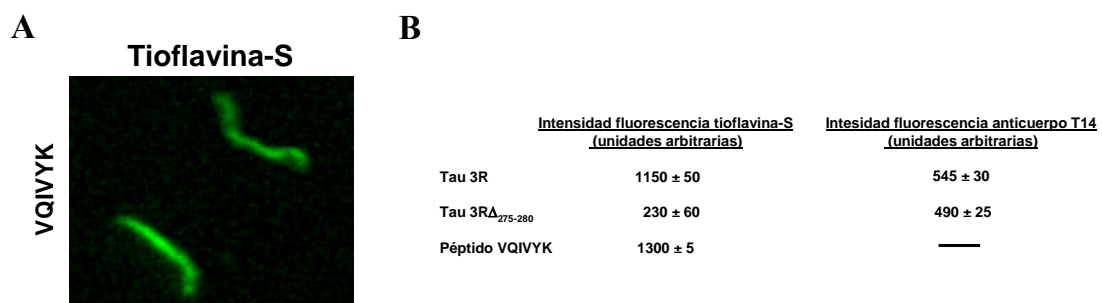
**Figura 45. Tinción de los PHFs con tioflavina-S al 0.01% en presencia de heparinasa I. A)** PHFs visualizados y analizados por microscopía de fluorescencia tras ser tratados con heparinasa I. **B)** La cuantificación de la intensidad de fluorescencia reveló una disminución en la fluorescencia de la tioflavina-S. A la derecha se puede observar la cuantificación de la intensidad de fluorescencia tras la incubación con el anticuerpo T14, en este caso no se observaron diferencias significativas.

Además de visualizar los PHFs o los SFs mediante este método nuevo, pudimos visualizar polímeros de tau ensamblados en presencia de quinonas. En este caso no vimos solamente filamentos aislados teñidos con tioflavina-S, sino que también pudimos observar agrupaciones de filamentos que parecen formar estructuras similares a los ovillos neurofibrilares (**Figura 46**).

El que los filamentos polimerizados *in vitro* se tiñan con tioflavina-S nos indica que estos polímeros fibrilares presentan una estructura en forma de lámina  $\beta$ . Se sabe que el péptido VQIVYK adquiere ésta conformación cuando se forman los polímeros fibrilares (von Bergen et al., 2000), por lo que analizamos, por un lado, si los polímeros ensamblados a partir de este péptido se pueden visualizar tras la tinción con tioflavina-S y, por otro lado, si se afecta esta tinción de los polímeros ensamblados a partir de variantes de tau que carecen de este péptido (**Figura 35** y **Figura 47**). En primer lugar, pudimos observar como los polímeros ensamblados a partir del péptido VQIVYK se tiñen intensamente con la tioflavina-S y como en los polímeros ensamblados a partir de las variantes de tau que carecen de este péptido, la tinción con tioflavina-S disminuye (**Figura 47B**).



**Figura 46. Microscopia de fluorescencia de los polímeros de tau 3R ensamblados en presencia de quinonas.** Imágenes de un filamento de tau 3R (A) y de una de las agrupaciones de filamentos (B) que pudimos encontrar tras la tinción con tioflavina-S al 0,01%. Se puede observar como estas agrupaciones de filamentos presentan una morfología similar a los ovillos neurofibrilares. Los polímeros fibrilares de tau 3R se ensamblaron en presencia de CoQ<sub>0</sub> 1 mM.



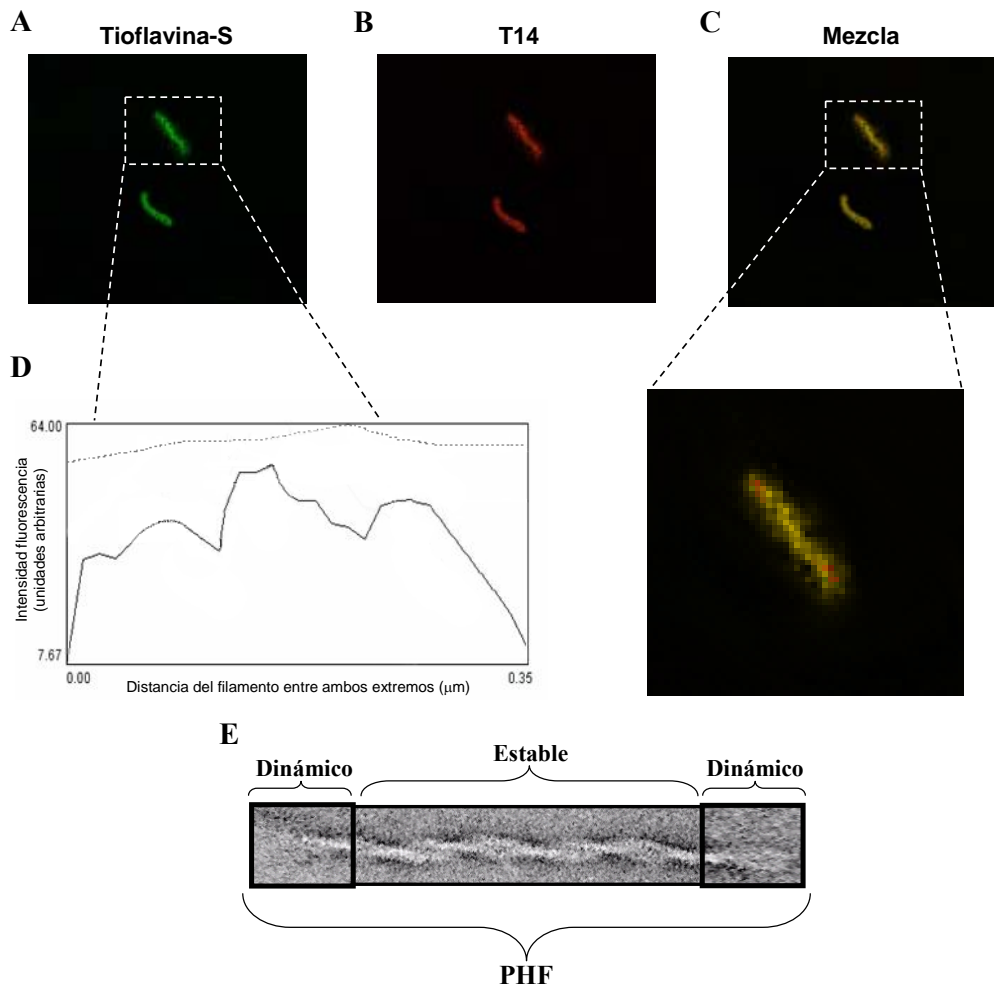
**Figura 47. Fluorescencia de los polímeros fibrilares del péptido VQIVYK, de tau 3R y de la variante tau 3R $\Delta_{275-280}$ .** A) Tinción con tioflavina-S al 0,01% de los filamentos del péptido VQIVYK. B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia del área de los filamentos de tau 3R, tau 3R $\Delta_{VQIVYK}$ , y del péptido VQIVYK tras la tinción con tioflavina-S (en la **Figura 34** se pueden observar las imágenes de los filamentos de tau 3R y de la variante polimerizados en presencia de CoQ<sub>0</sub>). Se puede observar una disminución en la intensidad de fluorescencia de los polímeros ensamblados a partir de la variante que carece del péptido VQIVYK en comparación con los polímeros formados de tau 3R o del péptido VQIVYK (n=10, P< 0,01). A la derecha se puede observar la cuantificación de la intensidad de fluorescencia tras la incubación con el anticuerpo T14. No se observaron diferencias significativas.

Durante el desarrollo de estos experimentos pudimos observar que, al teñir los PHFs con tioflavina-S, sus extremos se marcan menos. En la **Figura 48** puede apreciarse como colocaliza la tinción de tioflavina-S con la del anticuerpo T14, a lo largo de todo el filamento salvo en los extremos, donde la tioflavina-S parece no estar uniéndose (**Figura 48A y 48D**).

Todos estos resultados sugieren que los PHFs presentan una región central rica en lámina  $\beta$  y por tanto con afinidad por tioflavina-S (**Figura 48E**), la cual se tiñe muy bien con tioflavina-S, lo que sugiere la existencia de un alto contenido de conformación en lámina  $\beta$  en esta región central donde parece formarse una hélice bastante estable. Por otro lado, están los extremos del PHF, donde la tinción con tioflavina-S disminuye, lo que nos sugiere que los extremos pueden ser estructuras más dinámicas donde pueden darse procesos de polimerización/despolimerización, pudiendo ser los extremos los lugares por donde el polímero sigue creciendo. De hecho, como se puede observar en la **Figura 48E**, en la imágenes



de microscopía electrónica podemos ver como los extremos parecen estructuras más desestructuradas y probablemente más dinámicas.

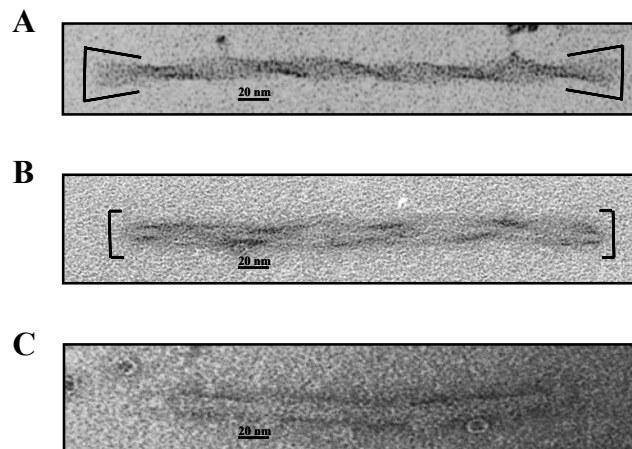


**Figura 48. Caracterización de los PHFs mediante análisis por microscopía óptica de fluorescencia.** PHFs visualizados por inmunofluorescencia utilizando tioflavina-S (A), y un anticuerpo anti-tau (T14) (B). En (C) se muestra la mezcla de ambas imágenes. Como se puede observar en el recuadro de la imagen en (C), en el que se muestra esta misma imagen aumentada, la tinción de tioflavina-S disminuye en los extremos, al igual que se puede observar en la gráfica (D) obtenida al analizar la intensidad de fluorescencia del área del polímero teñido con tioflavina-S, mostrado en (A). En esta gráfica se muestran la intensidad de fluorescencia para el anticuerpo T14 (-----) y para la tinción con tioflavina-S (—) a lo largo de todo el PHF. En (E) se muestra un modelo de la estructura del PHF. La imagen obtenida por microscopía electrónica muestra las características de las diferentes regiones descritas en este apartado.

### 3.2. Análisis de la elongación de los polímeros fibrilares de tau. Unión de tau en los extremos de los PHFs

Como hemos propuesto anteriormente, la elongación de los PHFs puede producirse en los extremos del filamento. Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito ningún experimento que validara esta hipótesis. Por tanto, nos pareció interesante investigar cual era el mecanismo de elongación de los polímeros previamente nucleados o formados (PHFs *ex vivo* aislados de cerebros de enfermos de Alzheimer). Se sabe que los polímeros de tau tardan del orden de días en elongar y formarse, incluso en presencia de inductores como la heparina (Gamblin et al., 2003a; Goedert et al., 1996; Perez et al., 1996). En particular, hemos estudiado como puede crecer un PHF al incubarlo durante algún tiempo con tau recombinante. Para llevar a cabo este tipo de estudio aislamos, en primer lugar, los PHFs a partir de

cerebros de enfermos de Alzheimer. Se observó que existen tres tipos de polímeros (**Figura 49**); unos presentan una morfología helicoidal con extremos “deshilachados” (**Figura 49A**), otros presentan la misma estructura, pero con extremos romos (**Figura 49B**) y, por último, otros filamentos que carecen de dicho patrón helicoidal (SFs, **Figura 49C**).



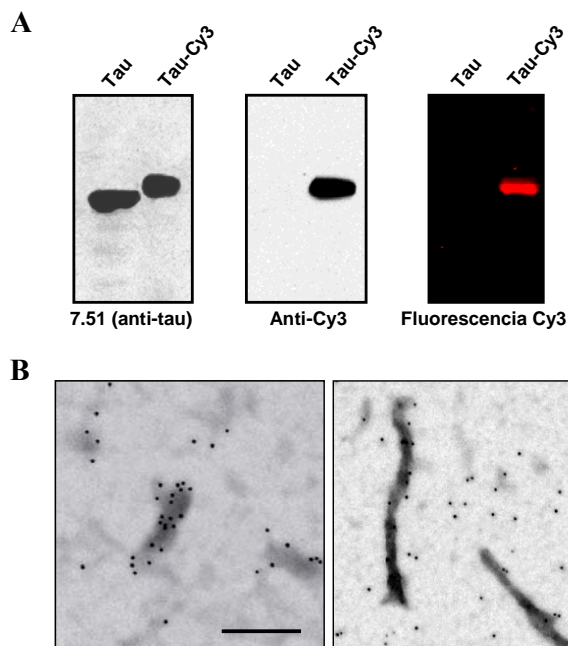
**Figura 49. Presencia de diferentes tipos de polímeros fibrilares aislados de cerebros de enfermos de Alzheimer.** En (A) se puede observar un PHF con los extremos desorganizados. En (B), al contrario que (A) el otro tipo de PHF encontrado presenta los extremos organizados y en (C) podemos observar el tercer tipo de polímeros fibrilar encontrado que es un SF. Barra = 20 nm.

Una vez que se habían aislado los PHFs (con una longitud media de  $0,30 \pm 0,2 \mu\text{m}$ ), se incubaron durante 10 días con tau recombinante. Después de este tiempo, la longitud media de estos filamentos era de  $0,35 \pm 0,28 \mu\text{m}$ , lo que nos indicaba que se estaba produciendo un ligero crecimiento de los PHFs. Repetimos el mismo experimento con PHFs previamente sonicados que tienen una longitud media de  $0,20 \pm 0,2 \mu\text{m}$  y, tras la incubación, los PHFs presentan una longitud media de  $0,29 \pm 0,28 \mu\text{m}$ . De nuevo el resultado parece indicarnos que, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas, se está produciendo un crecimiento de los polímeros, aunque la extensión total de estos filamentos es muy pequeña.

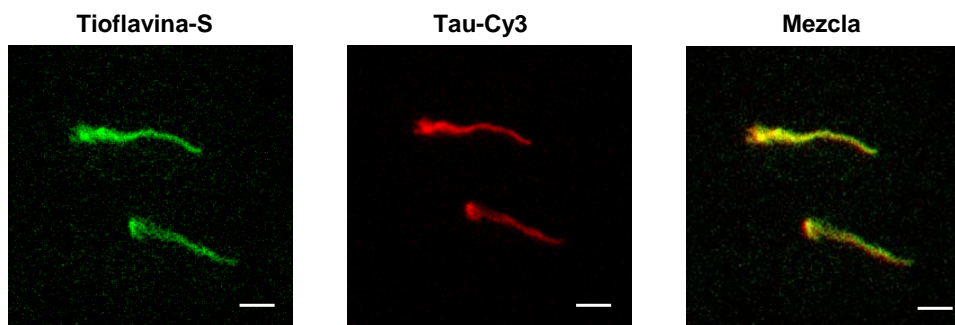
En este experimento nos encontramos con el impedimento de no poder marcar las moléculas de tau recombinante humano unido, puesto que los anticuerpos que reconocen dicho tau recombinante también reconocen a los PHFs. Para evitar este problema, lo que hicimos fue conjugar covalentemente tau recombinante con el colorante fluorescente Cy3 (ver Materiales y Métodos, (Liu et al., 2004)). La proteína marcada fluorescentemente se caracterizó mediante electroforesis en gel y Western Blot utilizando un anticuerpo anti-tau (7.51) y un anticuerpo que reconoce al fluoróforo Cy3 (**Figura 50A**). Con objeto de descartar la posibilidad de que el tau modificado covalentemente con Cy3 pudiera no agregar, también analizamos la capacidad de polimerizar de esta proteína marcada. Así, después de 10 días de incubación, el análisis por inmunomicroscopía electrónica reveló la presencia de algunos agregados amorfos y de agregados filamentosos que se marcan con el anticuerpo anti-Cy3 (**Figura 50B**).

Una vez que teníamos la proteína recombinante marcada, volvimos a repetir los experimentos de crecimiento o extensión para así estudiar con más detalle este proceso. En la mayoría de los casos se puede ver, después de incubar los PHFs con la proteína tau marcada con Cy3, como alguno de los extremos se marca más intensamente en rojo, debido a la unión de tau-Cy3 en ese extremo (**Figura 51**).

Esta unión se da de manera preferente en los extremos de los PHFs y no sobre toda la superficie del filamento.



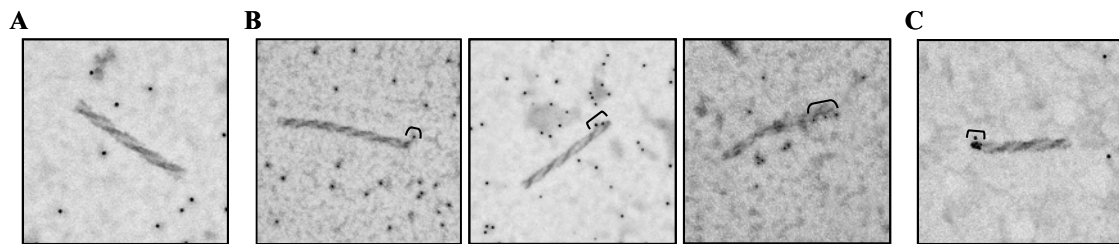
**Figura 50. Caracterización de la proteína tau recombinante conjugada covalentemente con el colorante fluorescente Cy3 (tau-Cy3).** A) La proteína tau conjugada con el colorante Cy3 se analizó por Western Blot utilizando anticuerpos que reconocen a Tau (7.51) y a Cy3 (anti-Cy3). Además, se pudo visualizar el marcaje de la proteína con el colorante fluorescente Cy3 en gel de acrilamida/bisacrilamida-SDS, mediante el uso de un escáner de fluorescencia Typhoon 9410. B) Se muestran dos imágenes de microscopía electrónica en las que se pueden observar la capacidad de autoensamblaje de la proteína tau marcada con Cy3, puesto que los agregados o estructuras filamentosas encontradas se inmunomarcaron usando el anticuerpo anti-Cy3 que posteriormente se marcó con un anticuerpo secundario conjugado a oro coloidal de 5nm (puntos negros). Barra = 0,1  $\mu$ m.



**Figura 51. Análisis por microscopía óptica de fluorescencia de la unión de tau-Cy3 a los PHFs.** Se mezclaron los PHFs con tau-Cy3 y se incubaron durante cuatro días. Después de la incubación se realizó la inmunofluorescencia (al igual que en la Figura 46) tiñendo los PHFs con tioflavina-S al 0,01%. En las tres imágenes de izquierda a derecha se puede ver la tinción con tioflavina-S, con el anticuerpo anti-Cy3 y la mezcla de ambas tinciones, en la cual se puede observar como al menos uno de los extremos de los PHFs presenta más tau-Cy3 unido. Barra = 1  $\mu$ m.

La unión preferencial de tau-Cy3 en los extremos de los PHFs se confirmó mediante el análisis por inmunomicroscopía electrónica utilizando para ello el anticuerpo que reconoce Cy3 (Figura 52). Tras diez días de incubación de tau-Cy3 con los PHFs, se pudo observar una pequeña proporción de filamentos a los que no parece que se haya unido la proteína tau-Cy3 (Figura 52A). Otra fracción mayoritaria de PHFs muestran una o varias partículas de oro unidas a alguno de los extremos facilitando el crecimiento

(Figura 52B). Por último, otra fracción minoritaria en la que se pueden ver partículas de oro unidas a uno de los extremos, pero sin facilitar el crecimiento del filamento (Figura 52C).



**Figura 52. Análisis de la unión de tau-Cy3 a los PHFs por microscopía electrónica.** La unión se pudo analizar mediante el inmunomarcaje con el anticuerpo anti-Cy3 seguido de la incubación con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con oro coloidal de 5 o 10 nm. Se observaron tres poblaciones de PHFs. En (A) se puede ver un ejemplo de aquellos PHFs a los que no se ha unido tau-Cy3 tras la incubación de ambos. B) Se muestran tres imágenes en las que se puede ver como existe una fracción de PHFs que presentan tau-Cy3 unido a uno de los extremos. Además, se puede ver como se van incorporando distintas moléculas de tau-Cy3 (elongación). C) PHFs con moléculas de tau-Cy3 unido que son incapaces de producir una correcta extensión.

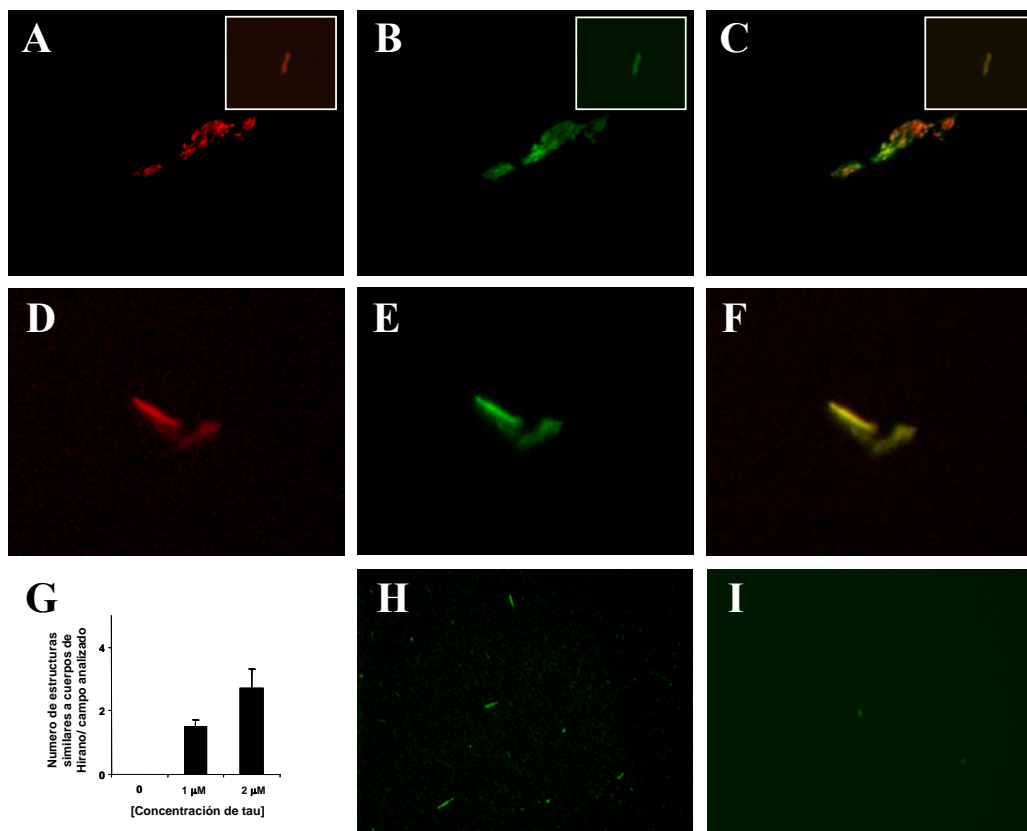
En definitiva, estos resultados son importantes ya que sugieren que la elongación de los PHFs puede ocurrir con una determinada polaridad, puesto que este ocurre principalmente en los extremos. Recientemente se ha descrito que pueden existir estados intermedios de polimerización que están formados por oligómeros de tau (Kunjithapatham et al., 2005; Maeda et al., 2007). Por tanto, no podemos descartar la idea de que en nuestros experimentos se estén uniendo estos oligómeros granulares a los extremos de los PHFs, o incluso, de que su unión pueda estar favoreciendo el crecimiento de los filamentos. Esta interpretación de los resultados obtenidos daría explicación de los diferentes tipos de PHFs mostrados en la Figura 52.

### 3.3. Mecanismos de ensamblaje de los cuerpos de Hirano.

La proteína tau, además de en los PHFs, está presente en otras estructuras aberrantes que se forman, y podemos encontrar, en los cerebros de pacientes con la Enfermedad de Alzheimer, los cuerpos de Hirano. Hemos descrito previamente como, además de la proteína tau y la actina, las quinonas forman parte de dichos cuerpos de Hirano.

Al igual que hemos estudiado y podido observar como las quinonas facilitan la formación de polímeros fibrilares de tau similares a los PHFs, quisimos estudiar *in vitro* si la unión de las quinonas a tau puede estar jugando algún papel en la formación de estructuras similares a los cuerpos de Hirano. Lo que hicimos fue incubar tau con CoQ<sub>0</sub>, actina con CoQ<sub>0</sub> o tau con CoQ<sub>0</sub> y actina. Después de cuatro días de incubación analizamos las distintas muestras que contienen las diferentes mezclas para ver si se ha formado algún tipo de estructuras similar a los cuerpos de Hirano. Para llevar a cabo este análisis, recurrimos al método nuevo que desarrollamos previamente para visualizar los PHFs por microscopía óptica de fluorescencia. En la Figura 53, se puede observar como solamente en la mezcla de tau, actina y CoQ<sub>0</sub> podemos encontrar estructuras similares a los cuerpos de Hirano. Como era de esperar en la mezcla de tau y CoQ<sub>0</sub> observamos polímeros fibrilares de tau (Figura 53H). Por el contrario, en la mezcla de actina y CoQ<sub>0</sub> solo encontramos algún pequeño agregado amorfo (Figura 53I). Por otro lado, probamos distintas cantidades de tau para saber cual era la concentración de tau necesaria para que se formen

estructuras similares a los cuerpos de Hirano (**Figura 53G**), y vimos que una concentración de tau 1  $\mu\text{M}$  era capaz de inducir la formación de estas estructuras.



Estos resultados coinciden con los resultados mostrados en la Figura 22, donde se puede observar una colocalización parcial de tau y CoQ<sub>0</sub> en los cuerpos de Hirano de enfermos de Alzheimer.

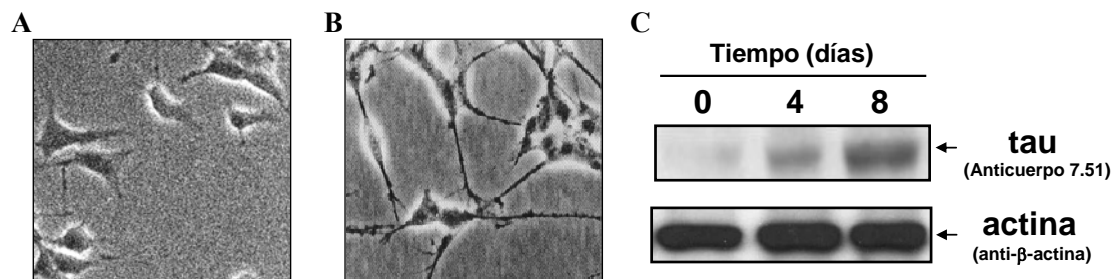
En definitiva hemos demostrado como tau y CoQ<sub>0</sub>, formando un complejo con la actina, pueden facilitar o dar lugar a la formación de estructuras semejantes a los cuerpos de Hirano.

#### 4. ESTUDIO DEL EFECTO DE QUINONAS SOBRE LA AGREGACIÓN DE TAU EN CULTIVOS CELULARES

##### 4.1. Estudios de agregación de tau en cultivos de células similares a neuronas humanas obtenidos mediante la diferenciación del neuroblastoma SH-SY5Y

Habiendo estudiado el efecto que tienen las quinonas en la polimerización de tau en un sistema *in vitro*, quisimos investigar si éstas podrían provocar un efecto similar en un modelo experimental más complejo como son los cultivos celulares.

Previamente, hemos descrito que los derivados quinónicos de la dopamina facilitan la polimerización de tau. Para estudiar si en cultivos celulares de origen neuronal, se forman agregados de tau en presencia de derivados quinónicos de la dopamina, utilizamos la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y (Biedler et al., 1978). Estas células, presentan unos niveles bajos de tau en división, pero mediante su diferenciación con dibutilil AMP cíclico podemos obtener cultivos celulares con una morfología neuronal, los cuales presentan concentraciones más elevadas de tau (**Figura 54**). Además, estas células contienen dopamina. De esta forma disponíamos de un buen modelo celular para probar si los derivados quinónicos de la dopamina favorecen la agregación de tau.

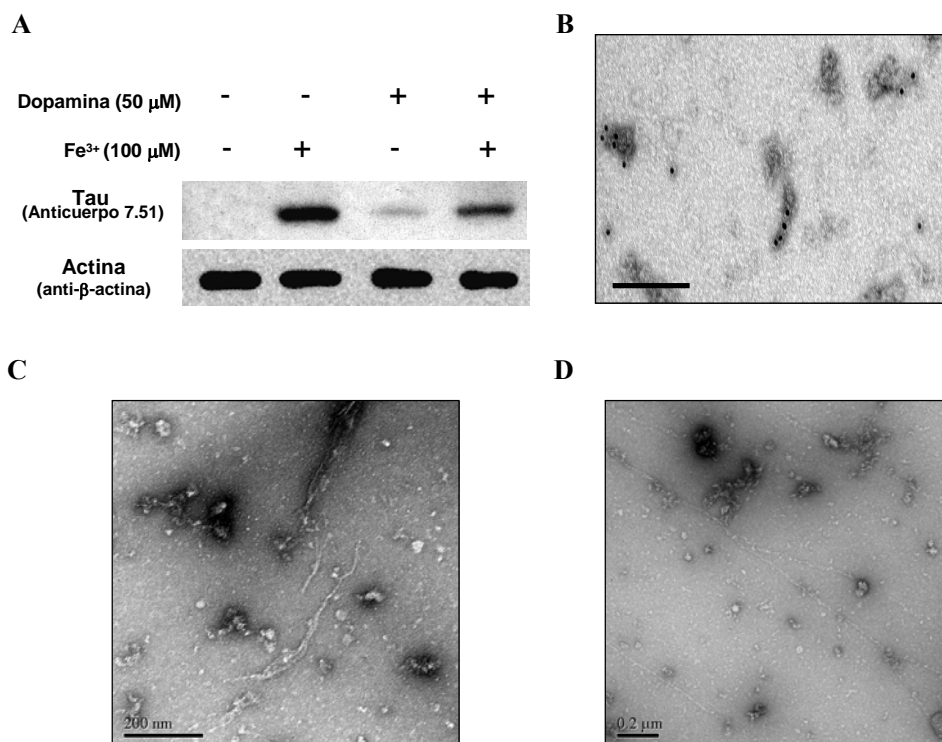


**Figura 54. Diferenciación de las células SH-SY5Y.** En (A) se puede observar la morfología de las células SH-SY5Y en división. (B) Observamos como tras la diferenciación (ver Materiales y Métodos), las células presentan una morfología similar a las neuronas. (C) Extractos de proteínas de células SH-SY5Y a distintos tiempos a lo largo de la diferenciación (de 0 a 8 días) fueron analizados por Western Blot con el anticuerpo 7.51 (anti-tau) y con el anticuerpo anti- $\beta$ -actina, como control de carga. Se puede observar como los niveles de tau aumentan con la diferenciación.

Se ha descrito que la dopamina en presencia del ión férrico ( $Fe^{3+}$ ) se oxida, formándose así sus correspondientes derivados quinónicos. La adición de  $Fe^{3+}$ , a los cultivos de células SH-SY5Y sin diferenciar no provoca la agregación de tau. Al analizar la proteína tau insoluble en sarcosil, no detectamos la presencia de tau agregado, posiblemente debido a que estas células, como se ha mencionado previamente, expresan en división unos niveles muy bajos de tau. Sin embargo, cuando diferenciamos las células SH-SY5Y con dibutilil AMP cíclico, la adición de  $Fe^{3+}$  da lugar a la aparición de agregados de tau insoluble en sarcosil (**Figura 55A**). Por microscopia electrónica fuimos capaces de visualizar estos agregados. La gran mayoría de los agregados eran amorfos (**Figura 55B**), observándose en unos pocos casos, la aparición de polímeros fibrilares (**Figura 55C, 55D**).

Estos resultados apoyan la hipótesis de que es necesaria una concentración elevada de proteína tau para que se formen agregados o polímeros de dicha proteína y explican porque no aparecen agregados de tau en la sustancia nigra (región rica en dopamina, ver **Figura 30**).

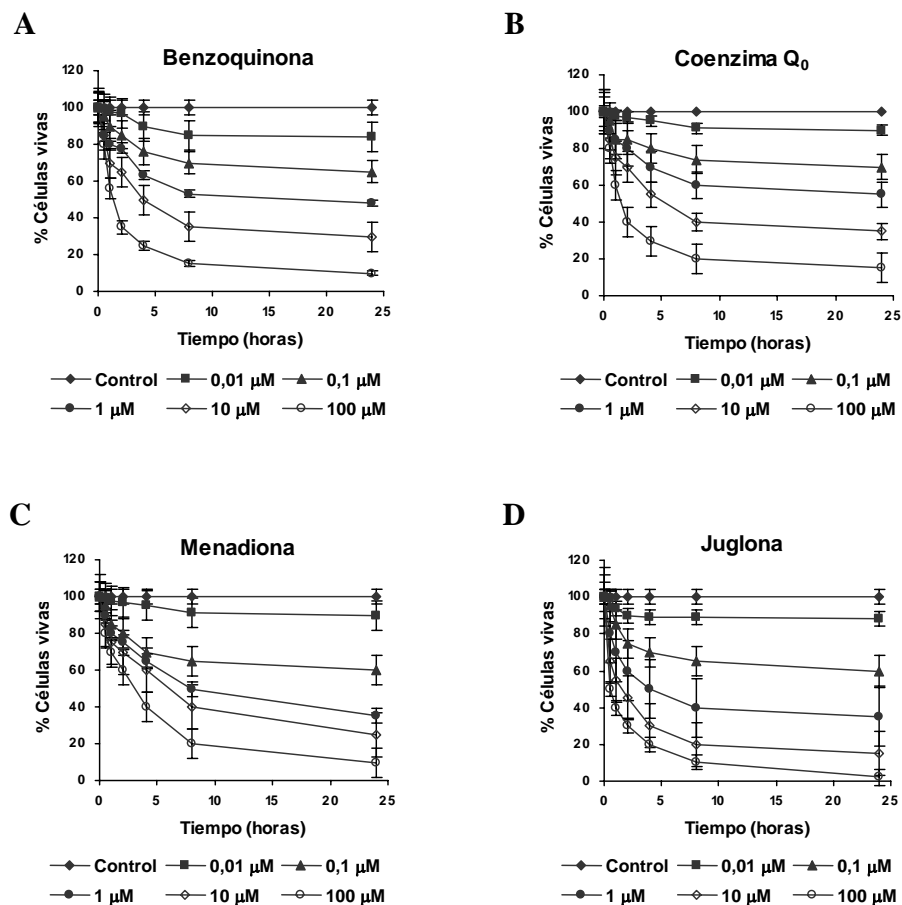
De igual manera que existen poblaciones de neuronas que casi no expresan tau, existen neuronas que no sintetizan dopamina y, sin embargo, en situaciones patológicas como en la enfermedad de Alzheimer, en dichas neuronas la proteína tau se agrega. Existen muchos factores que pueden favorecer la formación de estos agregados de tau. Nosotros quisimos estudiar si era posible que otras quinonas, que no fueran derivados quinónicos de la dopamina, pueden promover la formación de agregados de tau en nuestro modelo celular.



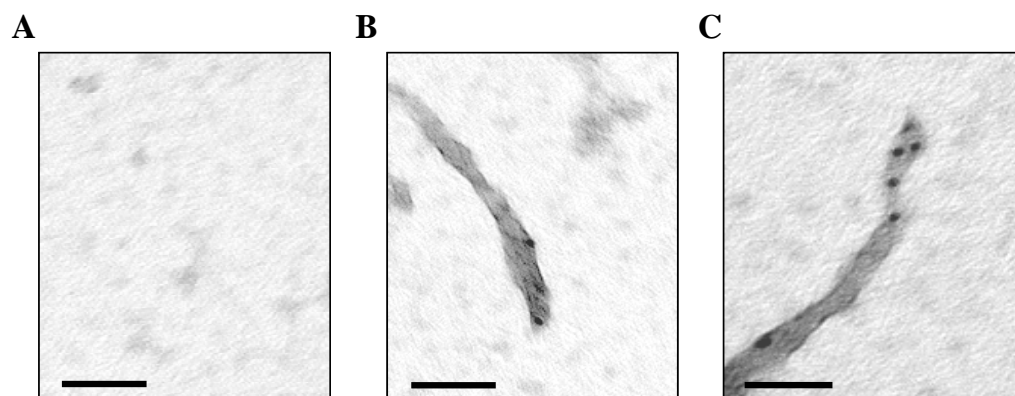
**Figura 55. Agregación de tau en células SH-SY5Y diferenciadas tratadas con  $\text{Fe}^{3+}$  y dopamina.** A) Células SH-SY5Y tras 7 días de diferenciación, fueron tratadas con  $\text{Fe}^{3+}$  y/o dopamina. Posteriormente, se analizó la cantidad de agregados de tau insolubles en sarcosil mediante extracción, centrifugación, electroforesis en gel y Western Blot utilizando el anticuerpo 7.51 (anti-tau) y el anti- $\beta$ -actina como control de carga. B) Observamos mediante el análisis por inmunomicroscopía electrónica, utilizando el anticuerpo T14 (anti-tau), que la mayoría de agregados tienen una estructura amorfa. En las imágenes de microscopía electrónica en C) y D) podemos observar algunos de los polímeros fibrilares formados tras el tratamiento con  $\text{Fe}^{3+}$  y dopamina. Barra = 200 nm.

El primer paso consistió en estudiar el efecto de las quinonas sobre la viabilidad celular. Conociendo cuales son las concentraciones y a que tiempos resultan tóxicas las quinonas, podemos realizar los ensayos para estudiar si facilitan o no la agregación de tau en los cultivos celulares con la viabilidad asegurada. En este estudio utilizamos cuatro quinonas, la juglona, la menadiona, la benzoquinona y el coenzima  $\text{Q}_0$ , ya que demostramos previamente que facilitan la polimerización de tau *in vitro*. Tras el análisis de la supervivencia celular en presencia de las diferentes quinonas, podemos decir que las naftoquinonas (juglona y menadiona) resultan ser más tóxicas para las células SH-SY5Y que las benzoquinonas (coenzima  $\text{Q}_0$  y benzoquinona) (Figura 56). A continuación, tratamos las células SH-SY5Y con las diferentes quinonas. Al igual que los derivados quinónicos de la dopamina, pudimos observar como, por ejemplo, en presencia de benzoquinona, se formaban agregados de tau en las células SH-SY5Y diferenciadas (Figura 57).

Estos estudios, por primera vez, demuestran que las quinonas son capaces de inducir la agregación o polimerización de tau en cultivos celulares. Sin embargo, quisimos desarrollar un modelo celular que nos permitiera, sin necesidad de esperar los días de la diferenciación, estudiar más en detalle todos los procesos de agregación de tau inducidos por las quinonas. Para ello, desarrollamos un lentivirus que nos permitiera, tras la infección viral, sobreexpresar la proteína tau fusionada a GFP tanto en líneas no neuronales como neuronales. En la sección de Materiales y Métodos se describe en detalle como se realizaron las construcciones virales, como se empaquetaron y obtuvieron las partículas virales, así como se llevó a cabo su titulación.



**Figura 56. Efecto de quinonas sobre la viabilidad celular.** A) Se incubaron células SH-SY5Y con benzoquinona (A), coenzima Q<sub>0</sub> (B), menadiona (C), y juglona (D) a las concentraciones y tiempos indicados, y se determinó la viabilidad celular por el método de la calceína / yoduro de propidio (ver Materiales y Métodos).



**Figura 57. Agregación de tau en células SH-SY5Y diferenciadas en presencia de benzoquinona.** En las imágenes se pueden observar los agregados de tau formados tras el tratamiento de las células. Análisis por inmunomicroscopía electrónica utilizando el anticuerpo Tau-5. A) Células sin tratar. B) y C) Células tratadas. Barra = 200 nm.

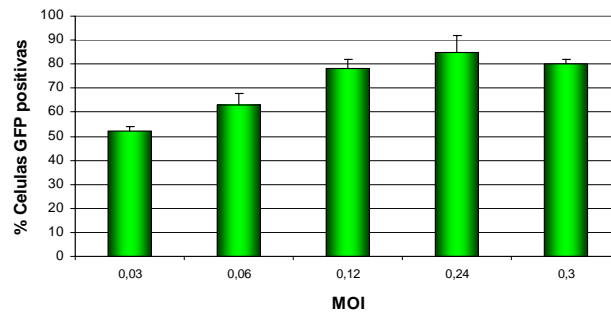
Con este sistema lentiviral podemos sobreexpresar la proteína tau en un espacio corto de tiempo, ya que el pico de expresión ocurre entre las 48 y 72 horas tras la infección. De este modo acortamos el tiempo que empleábamos con la diferenciación. Además este sistema nos permite sobreexpresar la proteína tau en cultivos primarios, pudiendo así estudiar en diferentes modelos celulares el efecto que tienen las quinonas sobre la agregación o polimerización de tau.



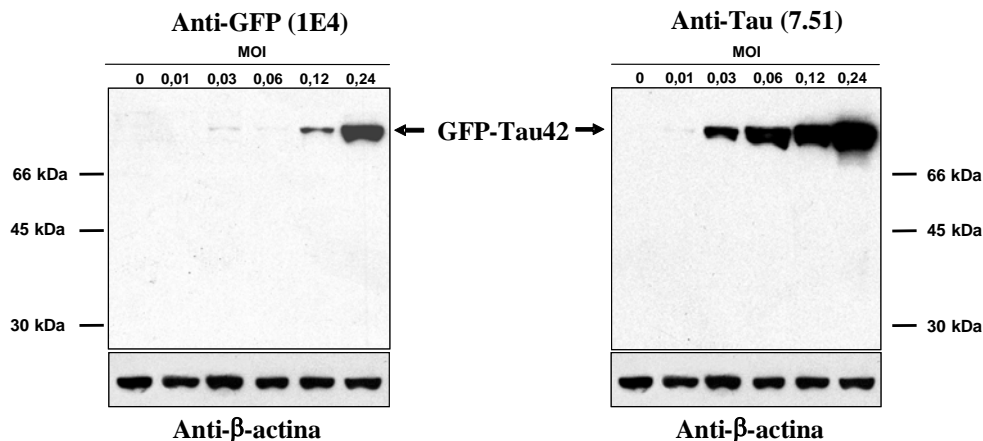
#### 4.2. Estudios de agregación de tau en cultivos de células SH-SY5Y infectadas con el lentivirus GFP-Tau42

En primer lugar, estudiamos la eficiencia de infección del lentivirus GFP-Tau42 en células SH-SY5Y. Utilizamos distintas multiplicidades de infección (MOI), entre 0,01 y 0,3, y pudimos observar, mediante inmunofluorescencia, como a una MOI de 0,2 más del 80% de las células expresaban la proteína GFP-Tau42 (**Figura 58A**). De la misma manera, mediante el análisis por Western Blot podemos observar como a medida que aumentamos la MOI se expresan mayores cantidades de proteína GFP-Tau42 (**Figura 58B**). En paralelo se llevaron a cabo ensayos de viabilidad y se pudo observar como 48 horas después de la infección con el lentivirus GFP-Tau42 menos del 5 % de las células morían. Como control infectamos las células con el lentivirus GFP y observamos un efecto similar. Mediante análisis por Western Blot, utilizando un anticuerpo anti-GFP (1E4) y un anticuerpo anti-tau (7.51), pudimos ver como pasadas 48 horas de la infección con el lentivirus GFP-Tau42, se expresaba la proteína GFP fusionada a Tau 42 (GFP-Tau42)). Mediante este tipo de análisis pudimos observar también que la proteína tau fusionada a GFP presenta un peso molecular aparente de aproximadamente 80 kDa (**Figura 58B**).

**A**



**B**

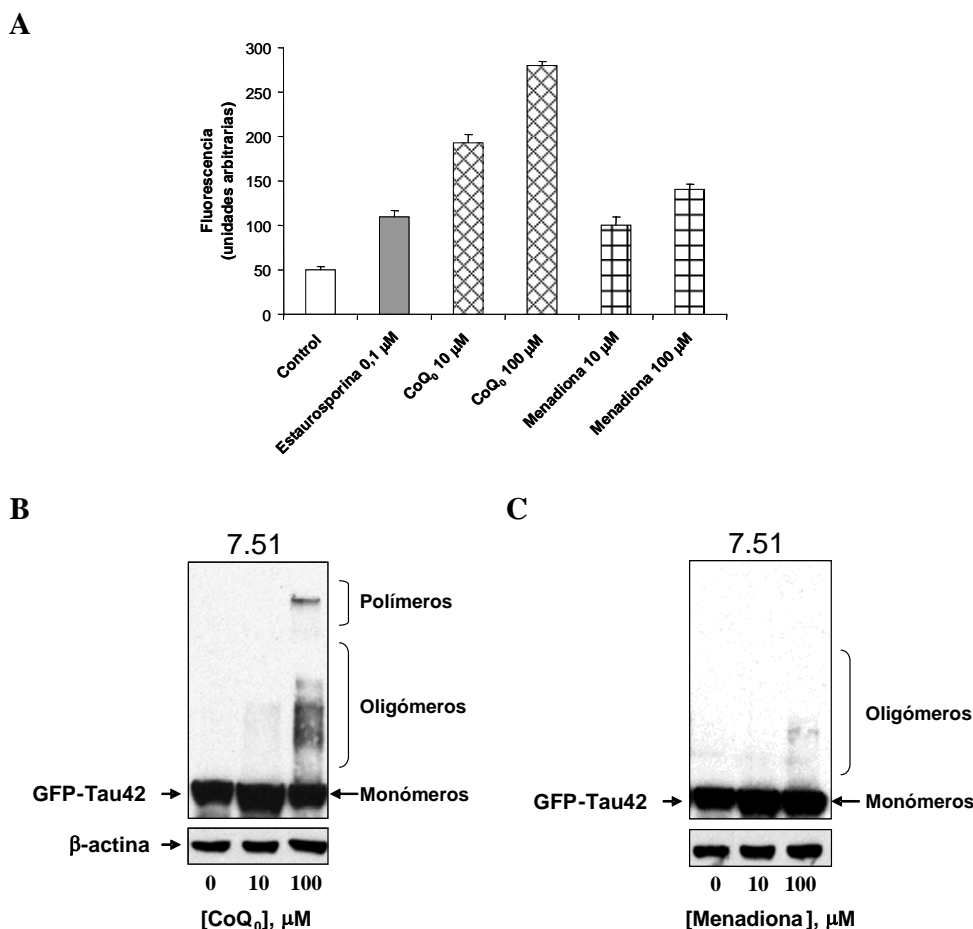


**Figura 58. Eficiencia de la infección de células SH-SY5Y con el lentivirus GFP-Tau42.** En A) se puede observar la eficiencia de la infección de las células SH-SY5Y con lentivirus GFP-Tau42 pasadas 48 horas. Se puede observar como a una MOI entre 0,1 y 0,2, pasadas 48 horas, más del 80 % de las células expresan la proteína GFP-Tau42. En B) se puede observar como mediante análisis por Western Blot, utilizando el anticuerpo 7.51 (anti-tau), a diferentes MOIs se expresa la proteína GFP-Tau42. El anticuerpo anti-β-actina se utilizó como control de carga.

Habiendo caracterizado la infección llevada a cabo con el lentivirus GFP-Tau42, usamos para los siguientes experimentos una MOI de 0,1.

Lo siguiente que quisimos estudiar utilizando este sistema de sobreexpresión de la proteína tau fue el efecto que podían tener las quinonas. Queríamos demostrar que las quinonas facilitan la agregación de tau en este sistema celular. Como ya hemos indicado previamente, las quinonas pueden, además de reaccionar y modificar proteínas mediante reacciones de alquilación/arilación, llevar a cabo reacciones de óxido-reducción y promover la formación de especies reactivas de oxígeno (ver **Figura 6**). Al tratar las células SH-SY5Y, infectadas con el lentivirus GFP-Tau42, con coenzima Q<sub>0</sub> y menadiona observamos, mediante citometría de flujo y utilizando la sonda MitoSOX (para medir la producción de anión superóxido, ver Materiales y Métodos), que dichas quinonas provocan la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). En la **Figura 59A** mostramos como el coenzima Q<sub>0</sub> promueve la formación del anión superóxido en mayor medida de lo que lo hace la menadiona.

Una vez que habíamos visto como las quinonas promueven la formación de especies reactivas de oxígeno en las células SH-SY5Y, analizamos el efecto que tenían estas mismas quinonas, la menadiona y el coenzima Q<sub>0</sub>, sobre la agregación de tau. Pudimos observar mediante análisis por Western Blot y utilizando el anticuerpo 7.51 (anti-tau), la formación de agregados de GFP-Tau42 (**Figura 59B y 59C**). De las dos quinonas empleadas en este estudio, el coenzima Q<sub>0</sub> facilita en mayor medida la agregación de de la proteína tau. Sin embargo, la menadiona reduce la viabilidad de los cultivos en mayor medida que el coenzima Q<sub>0</sub> (ver **Figura 56**).



**Figura 59. Agregación de tau en células SH-SY5Y infectadas con el lentivirus GFP-Tau42 tratadas con quinonas. A)** Cuantificación de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células SH-SY5Y (no infectadas) tratadas con coenzima Q<sub>0</sub> y menadiona durante 1 hora. Como control positivo se utilizó la estaurosporina (inhibidor de proteínas quinonas). También se muestra la producción de anión superóxido en células sin tratar (control). **B)** Formación de agregados de tau en células SH-SY5Y que sobreexpresan GFP-Tau42 mediante infección lentiviral tratadas con coenzima Q<sub>0</sub> o menadiona. Se puede observar como a medida que se incrementa la concentración de las quinonas aparece un mayor número de agregados.

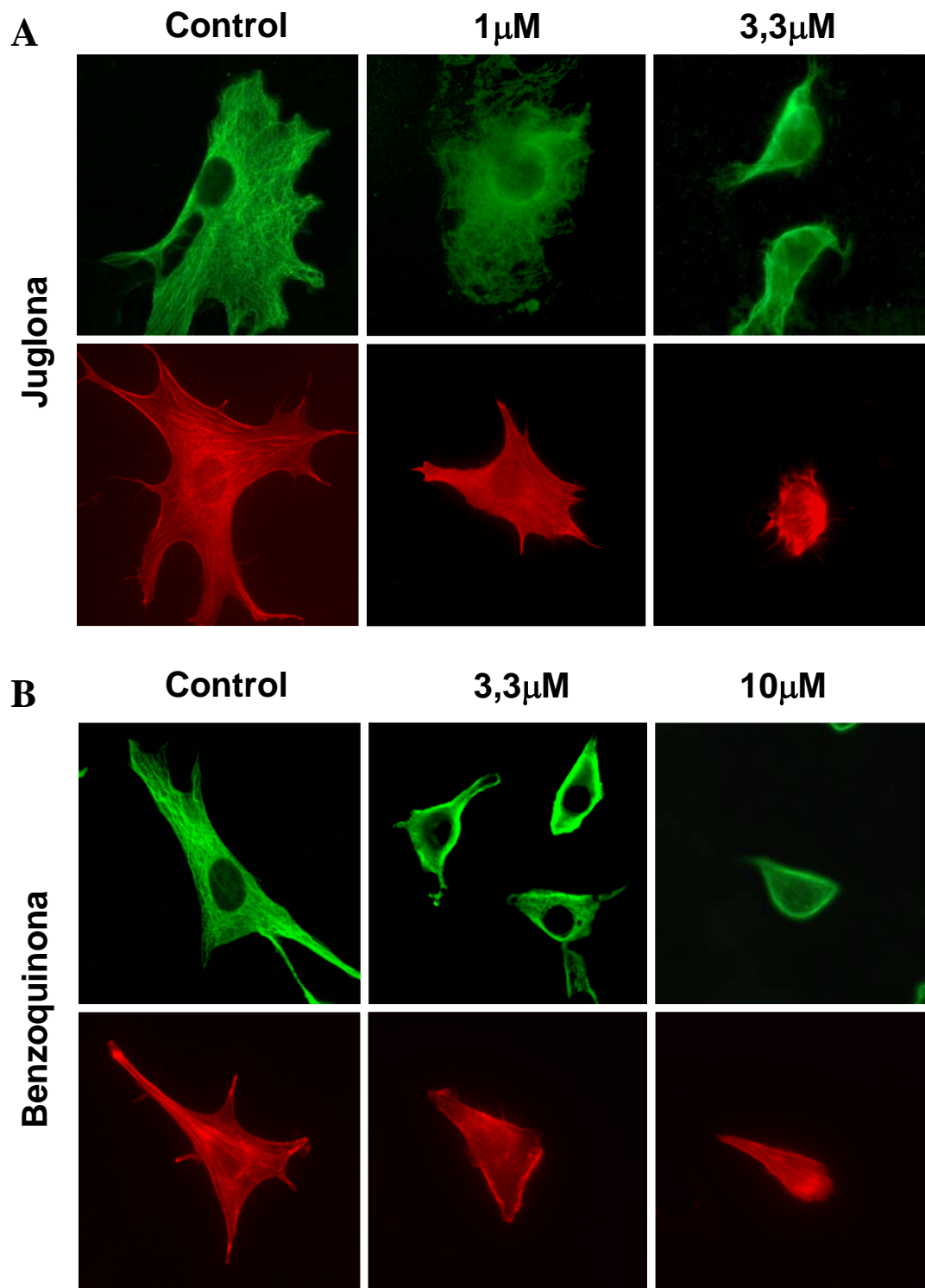
En definitiva, hemos demostrado que las quinonas favorecen la formación de agregados de tau en un sistema celular que nos permite llevar a cabo un análisis rápido de las diferentes condiciones experimentales. Por otro lado, el sistema lentiviral aquí desarrollado nos va a permitir profundizar en los mecanismos de agregación de tau.

## **5. ESTUDIO DEL EFECTO DE LAS QUINONAS SOBRE LA POLIMERIZACIÓN DE LOS MICROTÚBULOS.**

El estrés oxidativo parece jugar un papel importante en el comienzo y desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (Nunomura et al., 2001). En esta enfermedad existe una clara reducción de la red de microtúbulos en determinados tipos de neuronas. Esta reducción del número de microtúbulos polimerizados ocurre de manera independiente a la hiperfosforilación de tau u otras anomalías de tau también encontradas en la enfermedad de Alzheimer (Cash et al., 2003; Kopke et al., 1993). Como el estrés oxidativo precede temporalmente a las alteraciones que ocurren en la proteína tau (Nunomura et al., 2001), es posible que el estrés oxidativo actué directamente sobre la tubulina. El lugar más probable de la iniciación del daño oxidativo es la mitocondria. Además, se ha descrito que en la enfermedad de Alzheimer existen defectos mitocondriales (Hirai et al., 2001). Defectos que afectan al equilibrio redox de la neurona, proceso en el que las quinonas están directamente implicadas. Se ha descrito que un aumento en los niveles de quinonas mitocondriales puede acelerar el proceso de envejecimiento (Larsen & Clarke, 2002; Tatar & Rand, 2002), el cual es el mayor factor de riesgo para la enfermedad de Alzheimer. Además, se han encontrado concentraciones de quinonas más altas en enfermos de Alzheimer que en controles sanos (Dallner & Sindelar, 2000). Además, como hemos descrito previamente, las quinonas juegan un papel importante en la producción de especies reactivas de oxígeno y en la modificación de proteínas mediante reacciones de arilación, o formación de bases de Schiff o debido al estado redox intracelular. En base a estos antecedentes, nos planteamos estudiar el efecto que tienen las quinonas en el desensamblaje y desorganización de la red de microtúbulos, tanto en células no neuronales como neuronales para así poder relacionar directamente a las quinonas con el estrés oxidativo, la disfunción neuronal y la muerte que ocurre en la enfermedad de Alzheimer.

### **5.1. Efecto de las quinonas sobre la red de microtúbulos de células no neuronales**

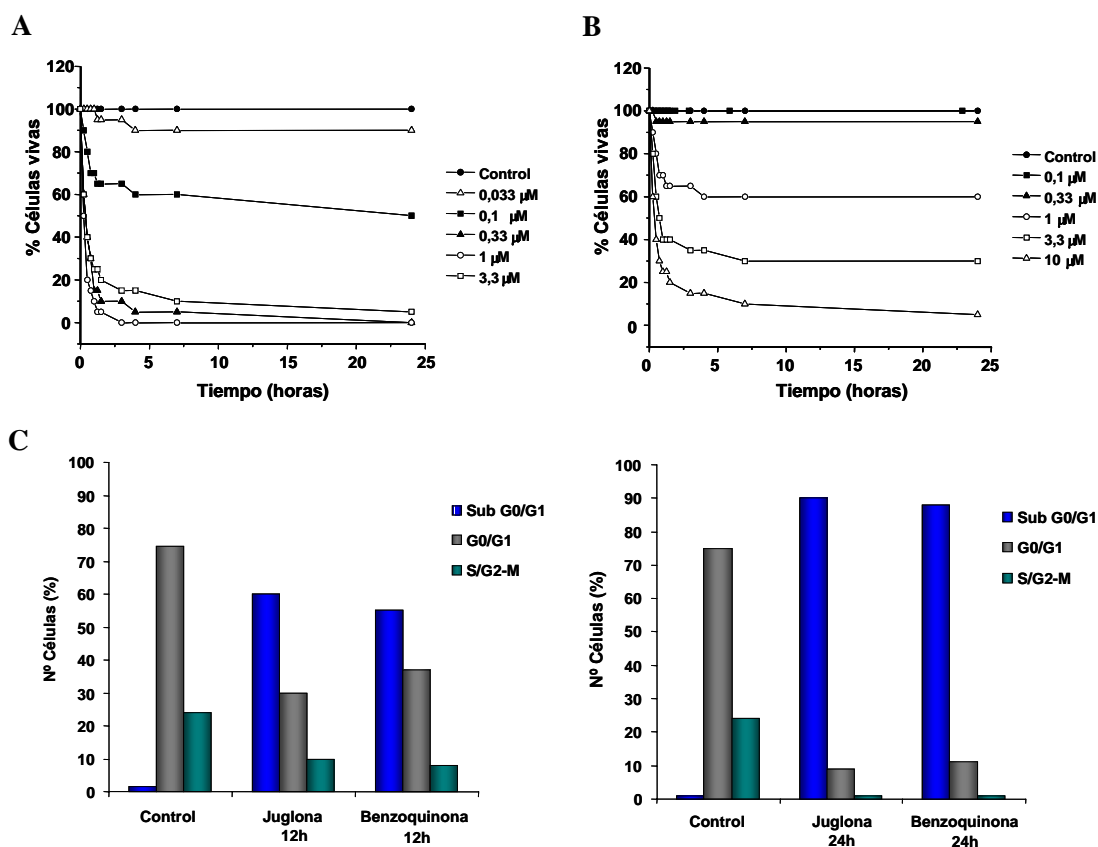
Nuestra primera aproximación, fue estudiar la acción de las quinonas en el ensamblaje de microtúbulos de células no neuronales. Para ello, células NIH-3T3 (no neuronales) se incubaron en presencia o ausencia de juglona y benzoquinona. Se puede observar como, en presencia de juglona (**Figura 60A**), la red de microtúbulos está dañada, mientras que los filamentos de actina no se veían afectados de la misma manera, aunque no se puede excluir una reorganización en el citoesqueleto de actina. Por otro lado, cuando incubamos las células NIH-3T3 con benzoquinona, obtuvimos resultados similares (**Figura 60B**), al igual que cuando añadíamos dicumarol (compuesto que aumenta los niveles de quinonas en las células (Lewis et al., 2004), datos no mostrados).



**Figura 60. Efecto de las quinonas en la red de microtúbulos de células en cultivo.** A) Células NIH-3T3 se incubaron 30 minutos en ausencia (Control) y en presencia de 1  $\mu$ M y 3,3  $\mu$ M de juglona. B) También se incubaron con benzoquinona 3,3  $\mu$ M y 10  $\mu$ M. Los paneles superiores de ambas imágenes muestran el efecto sobre la red de microtúbulos y los de abajo, el efecto en los filamentos de actina.

Cuando estudiamos la viabilidad celular de las células 3T3, tras la adición de las dos diferentes quinonas, observamos una reducción de la misma (**Figura 61**). Dicha respuesta es parecida a la producida

en la línea celular SH-SY5Y por estas mismas quinonas (ver **Figura 56**). Por otro lado, al analizar los núcleos mediante tinción con DAPI, no pudimos observar la aparición de formas apoptóticas tras 1 hora de tratamiento con las quinonas. Sin embargo, al analizar la fragmentación del DNA (células en apoptosis tardía presentan fragmentación del DNA) por citometría de flujo en tratamientos más prolongados, sí pudimos observar como un porcentaje de las células se encontraban en fase SubG0/G1, población que podríamos afirmar es apoptótica (**Figura 61C**). Por tanto, podemos decir que las quinonas afectan, en primer lugar y directamente a la red de microtúbulos provocando que estos se despolimericen, lo que provoca que en última instancia las células mueran por apoptosis. En este sentido, la adición de drogas como el nocodazol a cultivos celulares promueve la despolimerización de la red de microtúbulos, lo que puede producir la muerte celular por apoptosis (Hasegawa et al., 2004). Al igual que cuando se tratan las células con nocodazol, el uso de otras drogas como la pironetina también produce que las células se mueran por apoptosis (Kondoh et al., 1999).



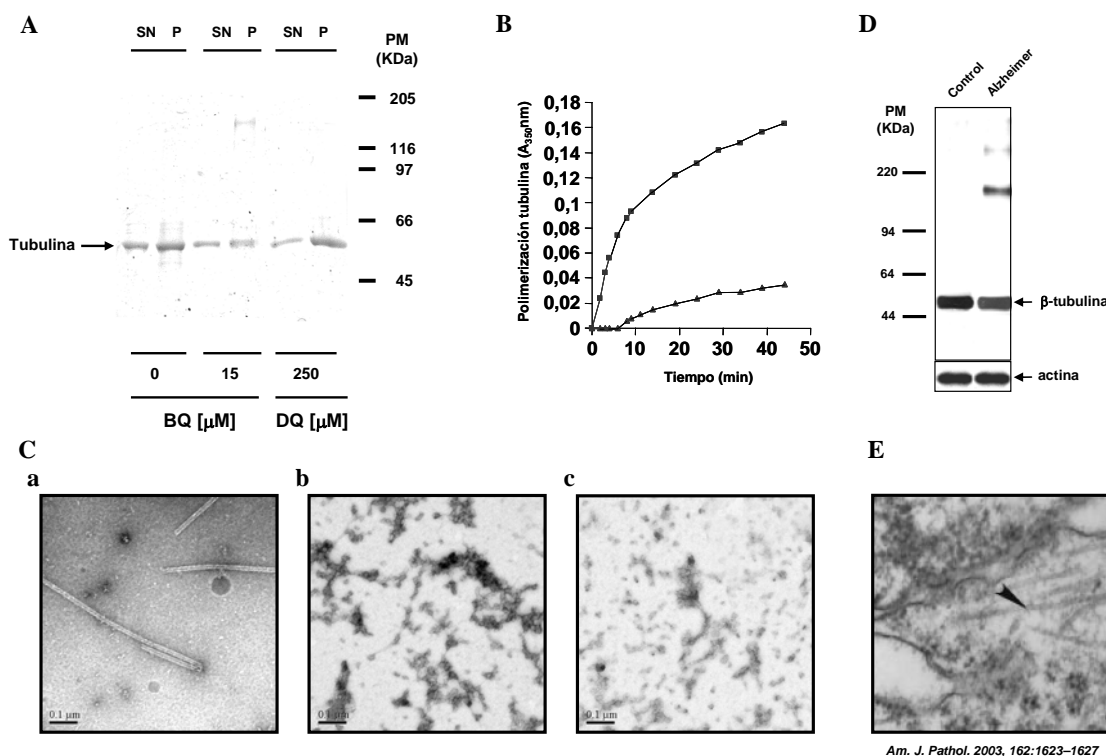
**Figura 61. Análisis del efecto de las quinonas sobre la viabilidad celular en células NIH-3T3.** Estudio de viabilidad celular mediante tinción con azul de Coomassie R-250 (Margis & Borojevic, 1989) en el que se cuantifica el número de células ancladas a la placa de cultivo (células vivas) tras el tratamiento con diferentes concentraciones de juglona (**A**) y de benzoquinona (**B**), durante distintos tiempos. **C**) Análisis de la muerte celular inducida por la juglona (1 µM) y benzoquinona (3.3 µM) a las 12 horas y 24 horas de tratamiento en células NIH-3T3 en proliferación, mediante análisis de fragmentación del DNA por citometría de flujo. Las gráficas muestran los porcentajes de células que se encuentran en cada fase del ciclo celular, correspondiente a la media de tres experimentos independientes, tanto para los tiempos de 12 horas como de 24 horas.

## 5.2. La adición de quinonas impide la polimerización de los microtúbulos *in vitro*

Para confirmar la interacción de las quinonas con los microtúbulos, estudiamos el efecto que tienen sobre su polimerización *in vitro*. Observamos que la adición de quinonas impide el ensamblaje de

microtúbulos (**Figura 62**). En presencia de benzoquinona 15  $\mu\text{M}$ , se observó una disminución en la tubulina polimerizada del 30-50 % en comparación con el control (**Figura 62A**). Como control negativo se empleó la duroquinona (ver **Tabla 4**), quinona que no puede arilar a la tubulina debido a que en su anillo presenta en posiciones 2, 3, 5, y 6 grupos metilo que bloquean su reactividad.

Todos estos resultados se confirmaron por turbidimetría (**Figura 62B**), y por microscopía electrónica (**Figura 62C**). Pudimos confirmar que las quinonas impiden la polimerización de los microtúbulos. Además, estudios previos (Cash et al., 2003) ya habían confirmado que en la enfermedad de Alzheimer se producía una reducción del número de microtúbulos polimerizados. En la **Figura 62D** mostramos como, una proporción de la tubulina presente en un extracto de tejido de cerebro de un caso de Alzheimer se encuentra entrecruzada de un modo similar al que podemos observar en la **Figura 61A** en el precipitado en presencia de benzoquinona 15  $\mu\text{M}$ . Además podemos observar como la tubulina, en un extracto de un control sano no se encuentra entrecruzada. Estos resultados se observaron en 3 de 10 casos de Alzheimer analizados y en ninguno de los controles sanos. En la **Figura 62E** se muestra también una imagen de microscopía electrónica tomada de una publicación (Cash et al., 2003) en la que se puede observar como aparecen microtúbulos aislados con una morfología anómala, sin formar parte de la red de microtúbulos, en estadios tempranos de un caso de Alzheimer.



**Figura 62. Polimerización de microtúbulos en presencia de quinonas.** **A**) Caracterización de la tubulina polimerizada (P de precipitado) o no polimerizada (SN de sobrenadante) *in vitro*, en presencia de benzoquinona (BQ) 15  $\mu\text{M}$  o su análogo estructural, la duroquinona (DQ) 250  $\mu\text{M}$ , tras la centrifugación (ver Materiales y Métodos). **B**) Efecto de la benzoquinona en la polimerización de la tubulina analizado por turbidimetría. La polimerización de tubulina se indica en ausencia (■) o en presencia (▲) de benzoquinona 30  $\mu\text{M}$ . **C**) Microtúbulos de cerebro de rata se polimerizaron *in vitro* en ausencia (a) o en presencia de 4  $\mu\text{M}$  de juglona (b) o en presencia de benzoquinona 30  $\mu\text{M}$  (c). Barra = 0.1  $\mu\text{m}$  **D**) Caracterización de la tubulina presente en extractos de cerebro de un paciente de Alzheimer y de un control sano. Los extractos de cerebro (lóbulo temporal) de un control y de un enfermo de Alzheimer se fraccionaron mediante electroforesis en gel y posteriormente se analizó la presencia de tubulina mediante Western Blot utilizando un anticuerpo anti- $\beta$ -tubulina. Se analizó la actina como control de carga utilizando un anticuerpo anti- $\beta$ -actina. **E**) Imagen de microscopía electrónica en la que se muestran algunos microtúbulos aislados y con una morfología anómala, presentes en una muestra de tejido cerebral de un enfermo de Alzheimer (Cash et al., 2003).

Estos resultados previos sugieren que las quinonas modifican covalentemente la tubulina, por tanto, el siguiente paso consistió en estudiar si las quinonas facilitan el entrecruzamiento y agregación de la tubulina. Cuando se incubó *in vitro* la tubulina en presencia de benzoquinona, esta se entrecruza (**Figura 62A**). Por el contrario, éste efecto no se produce cuando se incubaba albumina o actina (no mostrado), o bien cuando la tubulina se ensaya en presencia de duroquinona (**Figura 62A**).

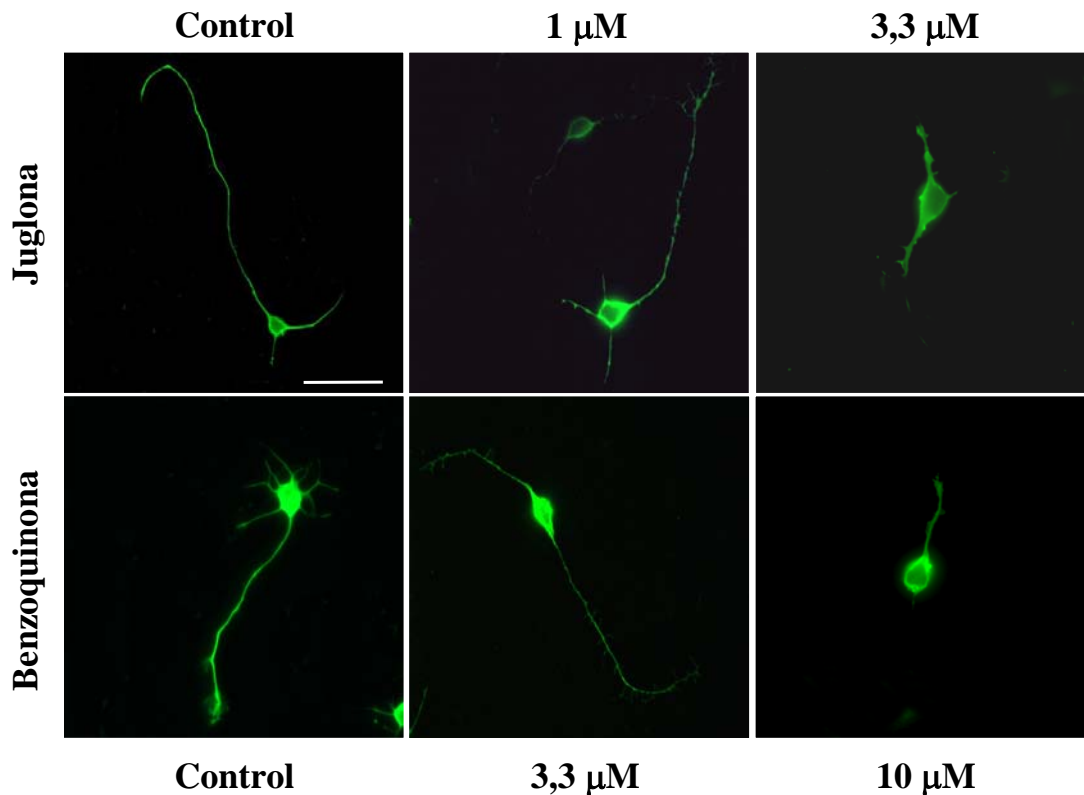
Las quinonas pueden modificar químicamente distintos aminoácidos como pueden ser las cisteínas (Feng et al., 1999; Guo et al., 2002) y facilitar así su entrecruzamiento. Previamente, en esta memoria ya describimos como las quinonas pueden modificar residuos de lisina en la proteína tau. Para estudiar si las quinonas reaccionaban con las cisteínas presentes en la tubulina, incubamos tubulina con benzoquinona y posteriormente con un compuesto que corta las proteínas por las cisteínas, el NTCB (2-nitro-5-thiocyano-benzoic acid) (Correas et al., 1992). Pudimos observar como, al añadir la benzoquinona previamente, se impedía el corte por el NTCB, demostrando que la benzoquinona interacciona con las cisteínas y que pueden ser estos residuos por los que las quinonas interaccionan con la tubulina, ya que la tubulina presenta unos 20 residuos de cisteína (resultado no mostrado).

Otro residuo que puede ser modificado por las quinonas es la histidina. Para estudiar la interacción con la histidina se incubó un péptido de  $\beta$ -tubulina (residuos 133-142) con y sin benzoquinona y se sometió a un proceso de secuenciación por el método de Edman. El proceso de secuenciación se paraba en el residuo de histidina, sugiriendo que este residuo está siendo modificado por la quinona. Además, al estudiar los residuos que pueden estar modificados en la tubulina en muestras de enfermos de Alzheimer se describió una disminución en la proporción de histidinas (Hobart et al., 2004; Mazurkiewicz-Kwilecki & Nsonwah, 1989). Estos datos son compatibles con una modificación de la tubulina por las quinonas en la enfermedad de Alzheimer.

### **5.3. La adición de quinonas a neuronas en cultivo produce una reducción en la longitud de sus neuritas**

Hasta ahora se ha estudiado el efecto que tienen las quinonas en células no neuronales e *in vitro*, sin embargo no sabemos que efecto pueden tener las quinonas en cultivos de neuronas (modelo celular más relevante al estar investigándose una enfermedad neurodegenerativa). Se sabe que existe una relación entre polimerización de microtúbulos y extensión de neuritas (Daniels, 1975; Mitchison & Kirschner, 1988), por tanto, nos preguntamos si las quinonas que impiden la polimerización de los microtúbulos pueden provocar una reducción en la longitud de las neuritas.

Cuando se añade quinonas al medio de cultivo en el que crecen los cultivos primarios de neuronas de hipocampo, se produce una reducción en la longitud de sus neuritas. Conforme se aumenta la concentración de quinonas, el efecto sobre las neuritas es más evidente (**Figura 63**).



**Figura 63. Efecto de las quinonas en cultivos primarios de neuronas de hipocampo.** Cultivos primarios de neuronas de hipocampo en un estadio 3 (Dotti et al., 1998) se incubaron en ausencia (control) y en presencia de juglona (panel superior) o benzoquinona (panel inferior) a las concentraciones que se indican. Barra = 50  $\mu\text{m}$ .

## 6. ESTUDIO DEL EFECTO DE COMPUESTOS QUE MIMETIZAN EL EFECTO DE LOS GLICOSAMINOGLICANOS SULFATADOS SOBRE LA AGREGACIÓN DE TAU. REPERCUSIÓN EN EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

Como previamente hemos indicado en la Introducción, se ha propuesto que en la enfermedad de Alzheimer compuestos como los glicosaminoglicanos sulfatados (Kjellen & Lindahl, 1991) pueden promover la agregación del péptido  $\beta$  amiloide y la proteína tau (Goedert et al., 1996; Snow et al., 1994a). Se sabe que varios tipos de glicosaminoglicanos sulfatados, entre los que se incluyen el heparan sulfato, keratan sulfato y condroitín sulfato facilitan en gran medida la polimerización del péptido  $\beta$  amiloide *in vitro* (Castillo et al., 1999; Small et al., 1996; Snow et al., 1994b). Varios de estos glicosaminoglicanos sulfatados también facilitan la agregación de tau *in vitro* (Arrasate et al., 1997; Castillo et al., 1999; Goedert et al., 1996; Perez et al., 1996; Small et al., 1996; Snow et al., 1994b). La implicación de los GAGs en la enfermedad de Alzheimer se ve también apoyada por el descubrimiento de que dichos GAGs se asocian al péptido  $\beta$  amiloide y a los agregados de tau *in vivo* (DeWitt et al., 1993; Snow et al., 1990; Perry et al., 1991). Por otro lado, se sabe que la unión del péptido  $\beta$  amiloide a los glicosaminoglicanos sulfatados impide su degradación (Gupta-Bansal et al., 1995). Los glicosaminoglicanos sulfatados parecen interaccionar con el péptido  $\beta$  amiloide a través de residuos de aminoácidos básicos (McLaurin & Fraser, 2000), lo que respalda estudios previos donde se demostraba la importancia que tienen los



distintos grupos funcionales de los glicosaminoglicanos sulfatados, entre los que se destacaban los grupos sulfato, en la formación de las fibrillas de amiloide (Fraser et al., 1992).

En la actualidad se están investigando diferentes estrategias para impedir que el péptido  $\beta$  amiloide agregue. Según la teoría de la cascada del amiloide, una reducción del péptido  $\beta$  amiloide no solo mejoraría la patología del amiloide, sino también la patología de tau (Hardy & Selkoe, 2002). Por este motivo, se están desarrollando diferentes drogas con las que se pretende impedir que el péptido  $\beta$  amiloide agregue. El problema que ha surgido al emplear alguna de estas drogas es que sólo se ha estudiado el efecto sobre la patología del amiloide sin tener en cuenta la posible repercusión sobre la proteína tau (Aisen, 2005; Bergamaschini et al., 2004). Uno de estos compuestos es el Tramiprosato (ácido 3-amino-1-propanosulfónico, 3-APS), también conocido como Alzhemed (Aisen et al., 2004; Gervais et al., 2006), compuesto que se ha desarrollado como un agente que mimetiza la acción de los glicosaminoglicanos sulfatados que puede interactuar con el péptido  $\beta$  amiloide impidiendo su agregación (Gervais, 2004; Gervais et al., 2001). Por tanto, se ha estudiado el posible efecto que puede tener el 3-APS sobre la agregación de tau.

### **6.1. Estudio del efecto del 3-APS sobre la agregación de tau**

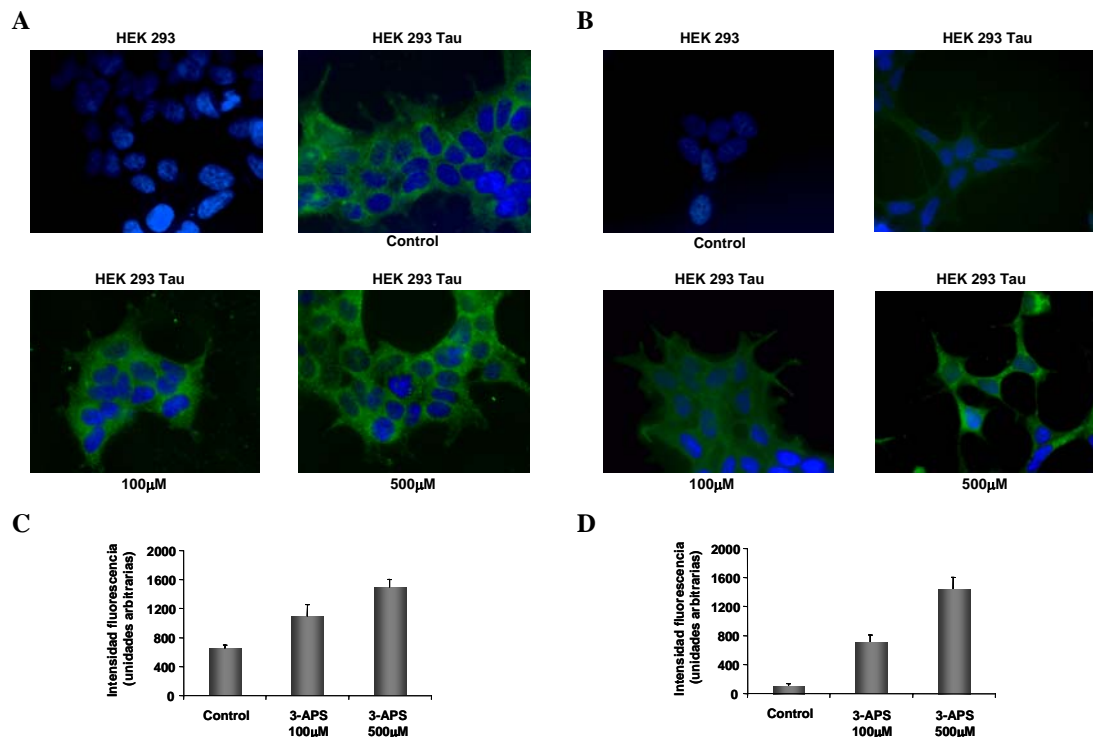
De igual forma que estudiamos el efecto de las quinonas sobre la agregación y polimerización de tau y sobre la red de microtúbulos quisimos estudiar el efecto del 3-APS en una línea celular no neuronal que sobreexpresa tau, sobre la polimerización de tau *in vitro* y, por último, el efecto en células neuronales.

#### **6.1.1. Efecto del 3-APS en células HEK293 que sobreexpresan tau de forma estable**

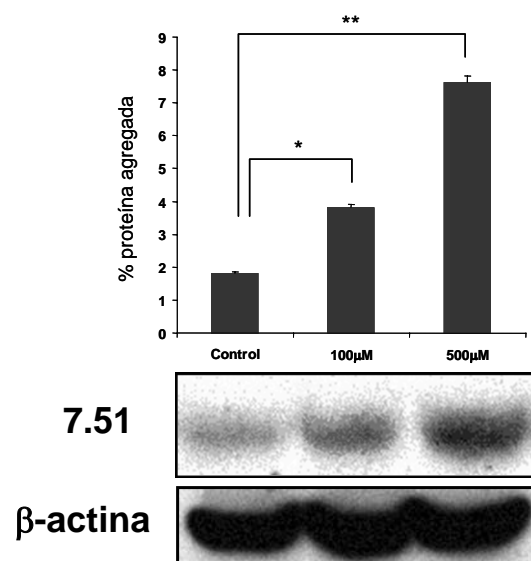
La línea celular HEK 293 Tau sobreexpresa tau de forma estable. La cantidad de tau expresada es de aproximadamente un 0,1 % respecto al total de proteína de la célula siendo el contenido de tubulina de alrededor del 2 %, por lo que la proporción de tau respecto a la de tubulina es similar a la descrita en células neuronales (Avila et al., 1994).

En la **Figura 64** se puede observar como tras añadir concentraciones crecientes de 3-APS a las células HEK 293 Tau se da un aumento en la tinción de tau (**Figura 64A**). Este aumento se produce, probablemente, porque el 3-APS facilita la agregación de tau. De hecho las células tratadas con 3-APS son tioflavina-S positivas (**Figura 64B**).

Para confirmar el incremento en la agregación de tau visto en las células HEK 293 Tau tras ser tratadas con 3-APS, lo que hicimos fue aislar los agregados insolubles en el tampón RIPA y analizar la cantidad de tau insoluble mediante Western Blot. El análisis mediante Western Blot reveló la presencia de tau en los agregados. La cantidad de tau aumentaba en función de la cantidad de 3-APS añadido (**Figura 65**). Cuando tratamos de realizar los mismos experimentos utilizando Heparina en lugar de 3-APS, no fuimos capaces de observar ningún tipo de agregación, posiblemente debido a que el 3-APS, a diferencia de la heparina, sí puede entrar en las células.



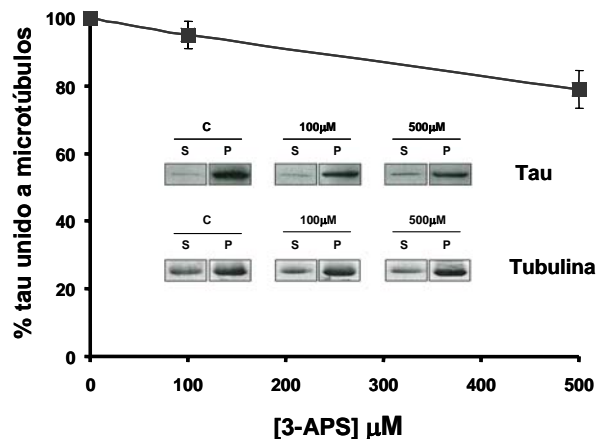
**Figura 64. Efecto del 3-APS en células HEK 293 Tau.** Inmunofluorescencia de células HEK 293 Tau tratadas con 3-APS 100 y 500 μM utilizando el anticuerpo anti-tau T14 (A) o la tioflavina-S al 0,01% (B). También se muestra la tinción de las células HEK 293 Tau sin tratar (Control) y de la misma línea celular sin transfectar. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia emitida tras la incubación con la tioflavina-S (C) o el anticuerpo secundario específico contra el anticuerpo T14 (D) acoplado al fluoróforo Alexa 488. Se puede observar un incremento en ambas tinciones tras el tratamiento con el 3-APS.



**Figura 65. Agregación de tau en células HEK 293 Tau tratadas con 3-APS.** Tras el tratamiento de células HEK 293 Tau con 3-APS se aislaron los agregados de tau insolubles en el tampón RIPA (ver Materiales y Métodos). Las células sin tratar se muestran como "Control". Posteriormente, los agregados se analizaron por Western Blot utilizando el anticuerpo 7.51 (anti-tau). Como control de carga se muestra la reacción del anticuerpo anti-β-actina con el extracto de células sin fraccionar (previo al aislamiento de los agregados). Se muestran los valores medios y sus desviaciones estándar de tres experimentos independientes. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$  (test *t* Student).

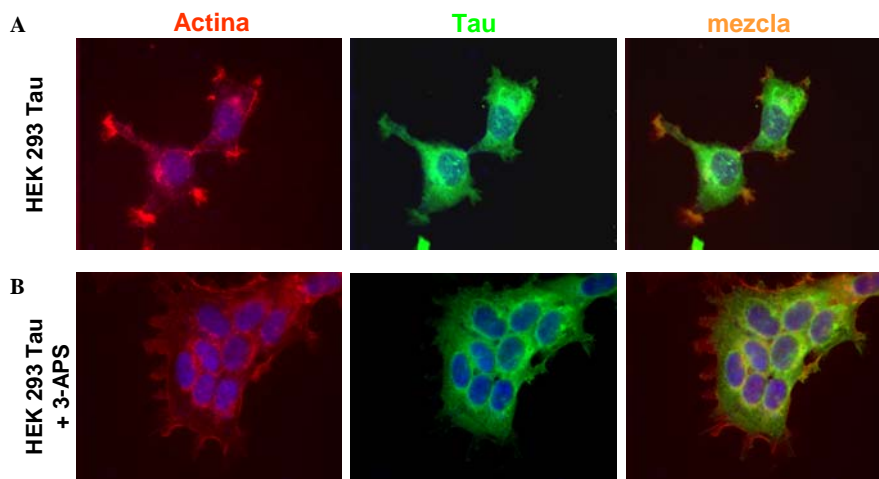
Una vez que habíamos observado como el 3-APS facilita la agregación de tau, quisimos estudiar si la unión de 3-APS a tau puede afectar a la interacción de tau con los microtúbulos produciendo, por consiguiente, una alteración en la red de microtúbulos. Mediante el análisis por inmunofluorescencia para

visualizar tau y tubulina tras el tratamiento de las células HEK 293 Tau con el 3-APS no observamos ninguna diferencia significativa. Sin embargo, cuando estudiamos la unión de tau a los microtúbulos *in vitro* en presencia de 3-APS, observamos como en presencia de 3-APS 0,5 mM se produce una disminución en la cantidad de tau unido a los microtúbulos (**Figura 66**).



**Figura 66. Unión de tau a los microtúbulos en presencia de 3-APS.** Se incubó 2  $\mu\text{M}$  tubulina en presencia de 10  $\mu\text{M}$  taxol durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, se añadieron 0,2  $\mu\text{M}$  tau y cantidades crecientes de 3-APS a las distintas muestras. Tras 10 minutos de incubación a 37°C, las fracciones de proteína polimerizada y despolimerizada se aislaron por centrifugación y se cuantificó mediante Western Blot la proteína tau y tubulina presente el sobrenadante (S) o en el precipitado (P). Se determinó el porcentaje de proteína tau presente en el precipitado de las muestras con distintas concentraciones de 3-APS respecto de la que no presentaban 3-APS (C).

Aunque no observamos ningún cambio en la red de microtúbulos, el tratamiento con 3-APS parecía alterar el citoesqueleto de actina. Previamente se ha descrito que la sobreexpresión de tau provoca la desaparición de las fibras de estrés, formándose agregados en estructuras similares a lamelipodios que se tiñen con faloidina (actina agregada) y con anticuerpos anti-tau (Yu & Rasenick, 2006; Sharma et al., 2007). Cuando analizamos el citoesqueleto de actina observamos que desaparecían los agregados de tau y actina tras el tratamiento con 3-APS, lo que sugiere que el 3-APS puede estar uniéndose a tau impidiendo así que se formen agregados de tau y actina (**Figura 67**).



**Figura 67. Efecto del 3-APS sobre los complejos de tau-actina.** En (A) se muestran células HEK 293 Tau analizadas mediante inmunofluorescencia utilizando faloidina (actina polimerizada) y el anticuerpo Tau-5 (anti-tau). Los núcleos se marcaron con DAPI. En estas imágenes se pueden observar algunos lamelipodios en los que están presentes actina y tau. (B) En presencia de 3-APS 200  $\mu\text{M}$  se ve una clara disminución en la tinción de estas estructuras.

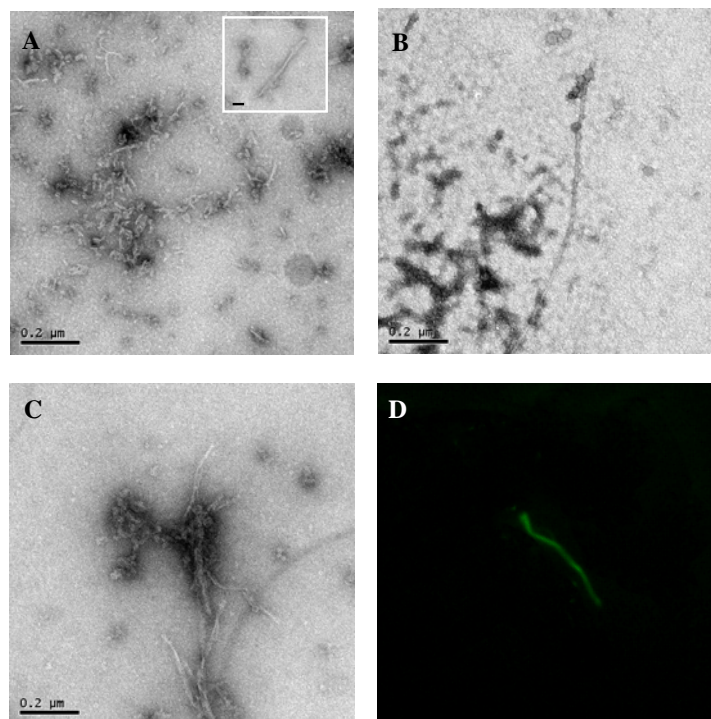
Lo que no sabíamos hasta el momento era si la formación de agregados de tau en las células HEK 293 Tau tras la adición del 3-APS resultaba ser tóxico o no. Lo que hicimos fue incubar las células con concentraciones crecientes de 3-APS (entre 0 y 400  $\mu\text{M}$ ) y medir la viabilidad (método Calceina-Yoduro de propidio) entre 0 y 120 horas. Pudimos observar como, tras 5 días en presencia de distintas

concentraciones de 3-APS, existe un número similar de células vivas tanto en los cultivos tratados como sin tratar.

Una vez que habíamos establecido que el 3-APS promueve la agregación de tau sin causar ninguna toxicidad y favorece la desaparición de agregados en los que colocalizan tau y actina quisimos analizar si el 3-APS facilita directamente la agregación o polimerización de tau *in vitro*.

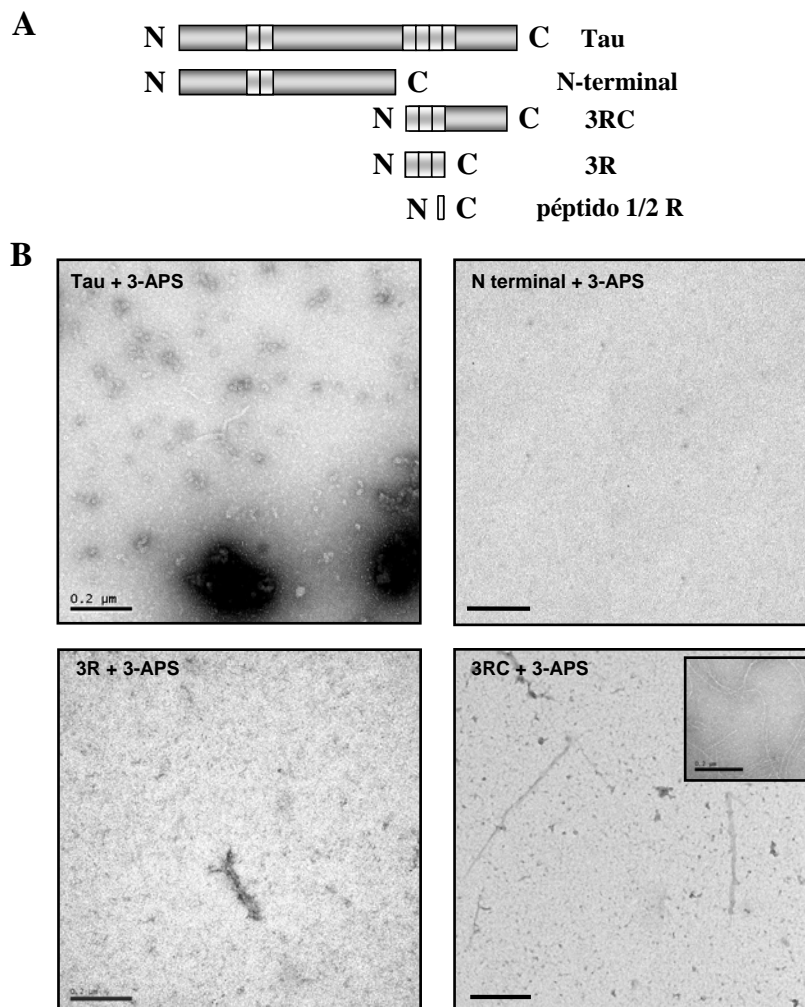
### 6.1.2. Efecto del 3-APS sobre la polimerización de tau *in vitro*

Incubamos tau 42 recombinante con 3-APS (ver condiciones en Materiales y Métodos) y tras la incubación se visualizaron los agregados por microscopía electrónica. En la **Figura 68** podemos ver como, en presencia de 3-APS, se forman polímeros fibrilares de dos tipos, unos cortos (la gran mayoría) y otros que más largos y gruesos (una pequeña fracción) (**Figura 68A**). Podemos observar en la **Figura 68B** como los filamentos que son más largos y gruesos son similares a los polímeros encontrados tras la adición de heparina (conocido inductor de la polimerización de tau). Cuando incubamos la proteína tau 42 en presencia de heparina y 3-APS se puede ver que se forman ambos tipos de polímeros (**Figura 68C**). Además de observar estos filamentos por microscopía electrónica, quisimos analizar los filamentos de tau por inmunofluorescencia, como se ha realizado previamente. Este análisis nos permitió demostrar que los filamentos de tau inducidos por 3-APS poseen un alto contenido en lámina  $\beta$  puesto que se tiñen con tioflavina-S (**Figura 68D**). Este dato nos permite sugerir que es posible que el incremento observado en la tinción con tioflavina-S tras la adición de 3-APS a las células HEK 293 Tau puede deberse a la presencia de agregados de tau.



**Figura 68. Polimerización de tau en presencia de 3-APS.** **A)** Imagen de microscopía electrónica de los polímeros de tau ensamblados en presencia de 3-APS 1mM. En la imagen se puede observar como, la gran mayoría son polímeros de pequeño tamaño, sin embargo, también encontramos algunos más largos y gruesos (recuadro). **B)** Polímeros ensamblados en presencia de heparina 0.5 mg/ml. **C)** Cuando incubamos tau en presencia de ambos compuestos, 3-APS y heparina, a las concentraciones indicadas, podemos observar que se forman un mayor número de polímeros, tanto cortos como largos. **D)** Imágenes de microscopía óptica de fluorescencia de los filamentos teñidos con tioflavina-S (ver Materiales y Métodos).

Nuestro siguiente objetivo consistió en identificar cual es la región de unión del 3-APS. Para ello utilizamos diferentes fragmentos de tau (**Figura 69**). Vimos que uno de estos péptidos o fragmentos de tau que llamamos 3RC (contiene las tres repeticiones de la región de unión a tubulina y el extremo carboxilo de tau), polimeriza en presencia de 3-APS (**Figura 69B**). Por el contrario, el péptido 3R (contiene únicamente las tres repeticiones de la región de unión a tubulina de tau) o el péptido N-terminal (contiene solo el extremo amino de tau sin las repeticiones), no polimerizan en presencia de 3-APS (**Figura 69B**). Únicamente se encuentra algún pequeño polímero del péptido 3R. En definitiva, estos resultados sugieren que el 3-APS se puede unir a la región carboxilo terminal de la proteína tau, lo que explicaría por qué el 3-APS no interfiere en la unión de tau a los microtúbulos.

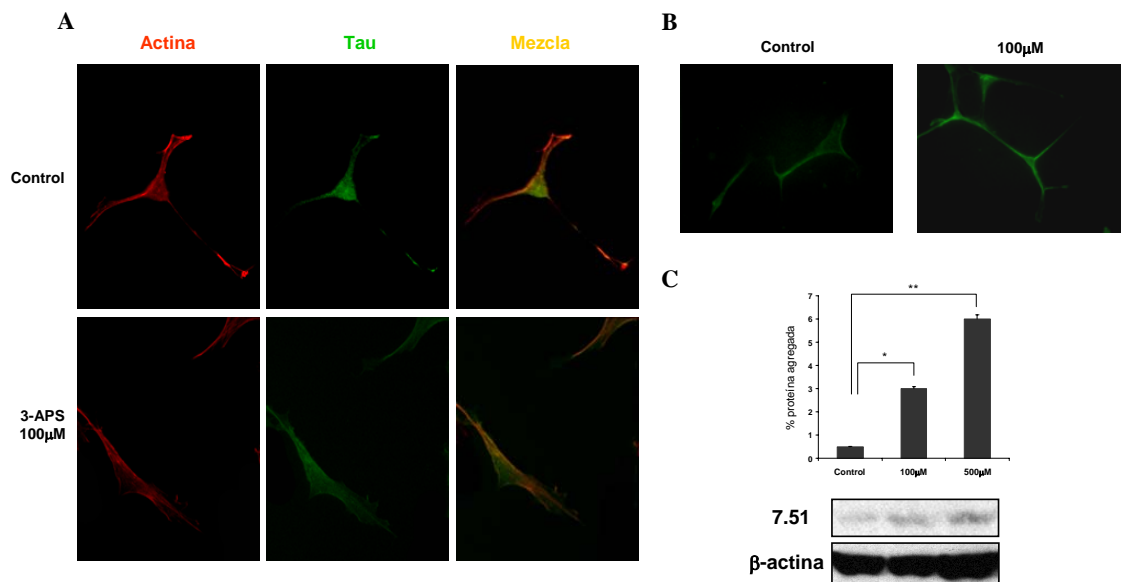


**Figura 69. Identificación del sitio de unión del 3-APS a tau mediante estudios de polimerización.** En (A) se muestra un esquema de tau y los fragmentos de tau utilizados en este estudio. En (B) mostramos las imágenes de microscopía electrónica de los polímeros formados tras la incubación de tau y sus fragmentos en presencia de 3-APS. En el recuadro (imagen de abajo a la derecha) se muestran los polímeros formados tras la incubación del péptido de tau 1/2 R con el 3-APS.

### 6.1.3. Efecto del 3-APS en células de origen neuronal

Habiendo estudiado el efecto que tiene el 3-APS en las células no neuronales que sobreexpresan tau, quisimos estudiar si el 3-APS tendría el mismo efecto en células de neuroblastoma humano SH-

SY5Y. Cuando tratamos las células SH-SY5Y diferenciadas con 3-APS, fuimos incapaces de encontrar complejos tau-actina como los descritos previamente en las células HEK 293 Tau. Probablemente por que el número de fibras de estrés en las células SH-SY5Y diferenciadas es mucho menor que en las células HEK 293 Tau (**Figura 70A**). Por otro lado, al tratar las células SH-SY5Y diferenciadas con 3-APS pudimos observar un incremento en la tinción con tioflavina-S, en comparación con las células no tratadas (**Figura 70B**). También observamos, tras el tratamiento con 3-APS, un incremento en la cantidad de agregados de tau insolubles en el tampón RIPA (**Figura 70C**).



**Figura 70. Efecto del 3-APS en las células SH-SY5Y diferenciadas.** A) Células SH-SY5Y diferenciadas durante 8 días fueron tratadas con 3-APS 100  $\mu$ M durante 48 horas. Las células sin tratar se muestran como "Control". Tras el tratamiento, las células se analizaron por inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo Tau-5 (anti-tau) y la faloidina rodamina (tinción de actina polimerizada). B) De la misma manera, células tratadas con 3-APS 100  $\mu$ M durante 48 horas, fueron teñidas con tioflavina-S 0,01% y analizadas por Microscopia Óptica de fluorescencia. Tras el tratamiento con 3-APS pudimos observar un incremento en la tinción. C) Después de tratar las células HEK 293 Tau con 3-APS se aislaron los agregados de tau formados, insolubles en el tampón RIPA, y se analizaron por Western Blot utilizando el anticuerpo 7.51 (anti-tau). Como control de carga se muestra la reacción del anticuerpo anti- $\beta$ -actina con el extracto de células sin fraccionar (previo al aislamiento de los agregados). Se muestran los valores medios y sus desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$  (test  $t$  Student).

En conclusión, podemos decir que el 3-APS facilita la agregación de tau, por lo que es recomendable que los fármacos que se desarrollan para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer se prueben y estudien tanto para la patología causada por el péptido  $\beta$  amiloide como para la causada por tau.

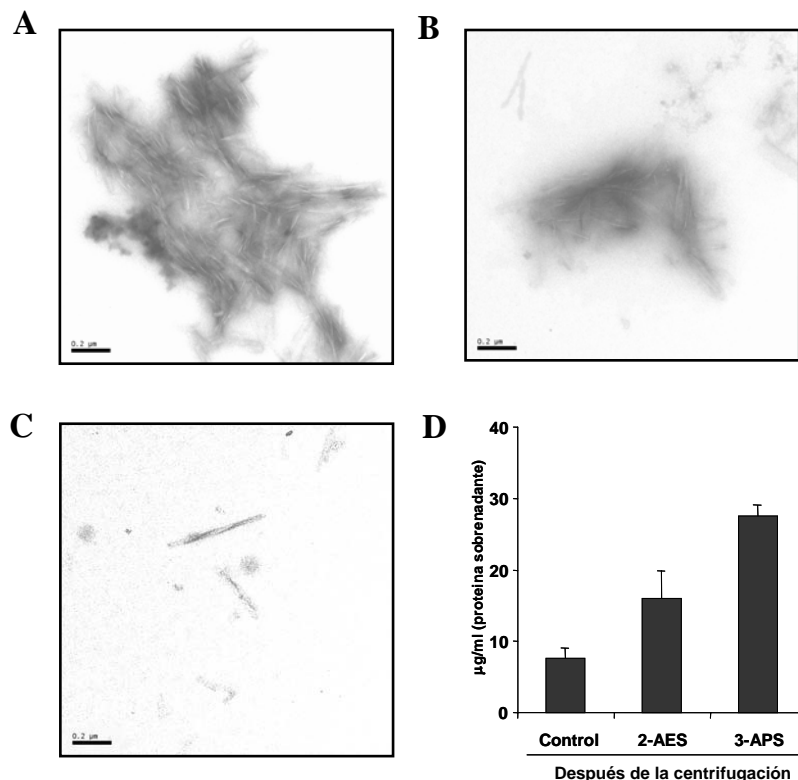
## 6.2. Estudio del efecto de la taurina como inductor de la polimerización de tau

La taurina (ácido 2-aminoetanosulfónico, 2-AES), posee una estructura química similar a la del 3-APS, compuesto que como hemos visto interfiere con la agregación del péptido  $\beta$  amiloide y según lo demostrado, favorece la agregación de tau.

Nuestro siguiente objetivo consistió en analizar si la taurina posee las mismas cualidades que el 3-APS respecto a su capacidad antiagregante del péptido  $A\beta$  y de agregar tau.

Estudiamos, en primer lugar, el efecto de la taurina sobre la agregación del péptido A $\beta$ . En la **Figura 71A** se muestran imágenes de microscopía electrónica en las que se puede observar como, en ausencia de taurina el péptido  $\beta$  amiloide agrega, mientras que en presencia de taurina la agregación disminuye (**Figura 71B**), como control positivo usamos el 3-APS y vimos que éste provocaba una mayor disminución en la agregación que la ocasionada por la taurina. Quisimos cuantificar la cantidad de polímeros formados en presencia o ausencia de la taurina y el 3-APS. Para realizar la cuantificación medimos la turbidez (a una longitud de onda de 310 nm) de la proteína agregada. Tomando como 100% la turbidez del péptido  $\beta$  amiloide agregado en ausencia de los compuestos ensayados, fuimos capaces de obtener unos valores del  $66 \pm 21\%$  en presencia de la taurina y del  $38 \pm 7\%$ , en presencia del 3-APS en relación al control. Sin embargo, se puede argumentar que la medición de la turbidez no es uno de los métodos más adecuados para medir la agregación del péptido  $\beta$  amiloide. Por tanto, lo que hicimos fue centrifugar en una airfuga, a 10000 x g durante 60 minutos, las muestras que contienen los polímeros y tras la centrifugación determinar la cantidad de proteína no polimerizada. En la **Figura 71D** se muestra como en presencia de taurina se produce un aumento en la cantidad del péptido  $\beta$  amiloide sin polimerizar en comparación con el control sin taurina ni 3-APS. Pudimos observar también, como en presencia de 3-APS la cantidad del péptido  $\beta$  amiloide sin agregar es mayor que en presencia de su análogo estructural.

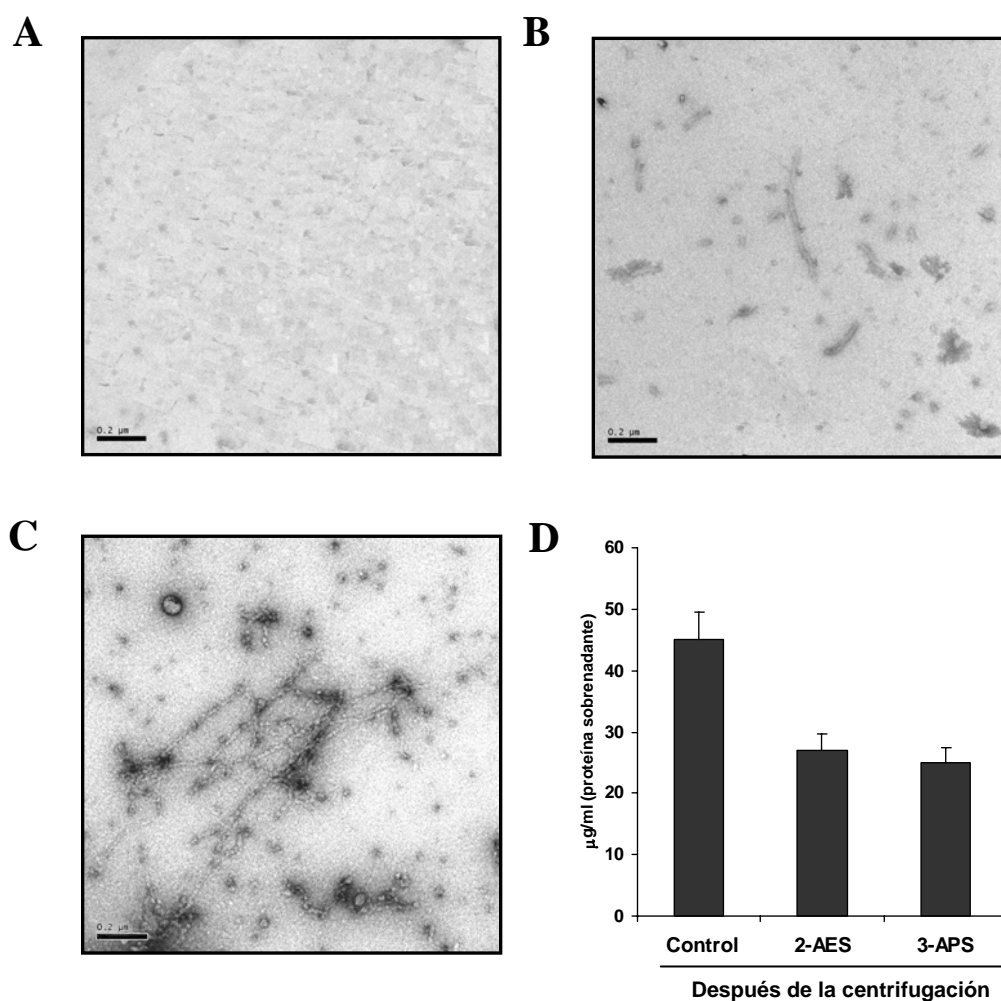
Por tanto, podemos decir que la taurina no previene el cambio de conformación a lámina  $\beta$  del péptido  $\beta$  amiloide (Gervais et al., 2007), pero sí interfiere con su agregación.



**Figura 71. Efecto de la taurina (2-AES) en el ensamblaje del péptido  $\beta$  amiloide.** Se muestran imágenes de microscopía electrónica de los agregados del péptido  $\beta$  amiloide<sub>25-35</sub> formados tras la incubación durante 48 horas a 37°C en ausencia (A) o presencia de taurina 1 mM (B) o 3-APS 1 mM (C). En D) se muestra la medida de la cantidad de proteína sin polimerizar tras la incubación del péptido  $\beta$  amiloide con la taurina. Como control se incubó el péptido  $\beta$  amiloide<sub>25-35</sub> en presencia del 3-APS y solo sin ningún compuesto añadido (se indica como Control). Para determinar la cantidad de proteína no polimerizada después de la incubación, se centrifugaron las muestras en una airfuga, a 10000 x g durante 60 minutos. Tras la centrifugación medimos la absorbancia (230 y 260 nm) de la proteína que quedaba en el sobrenadante. Previamente se había descrito que existe una relación lineal entre la cantidad de proteína (usando albúmina como control) y la absorbancia a 230 y 260 nm, llevando a cabo el siguiente cálculo:  $\mu\text{g/ml} = 183A_{230} - 75.8A_{260}$  (Kalb & Bernlohr, 1977).

Sin embargo, en la enfermedad de Alzheimer, además de los agregados del péptido  $\beta$  amiloide, aparece otra marca histopatológica, los ovillos neurofibrilares. Hemos observado previamente que el 3-APS facilitaba la formación de polímeros de tau *in vitro*, por lo que quisimos probar si la taurina podría tener un efecto similar. En la **Figura 72** observamos como en presencia de la taurina se forman polímeros de tau que podemos visualizar por microscopía electrónica (**Figura 72B**). Mientras que en ausencia de la taurina no encontramos ningún polímero fibrilar de tau (**Figura 72A**). Utilizamos el 3-APS como control positivo y vimos que facilita, en mayor medida que la taurina, la polimerización de la proteína tau (**Figura 72C**). La cuantificación de la cantidad de polímeros de tau ensamblados se llevó a cabo empleando el mismo criterio que el previamente mencionado para medir la cantidad de péptido  $\beta$  amiloide agregado (**Figura 72D**). La única diferencia es que la proteína tau, en ausencia de compuestos no polimeriza, por lo que se encuentra toda tras la centrifugación en el sobrenadante. Sin embargo, la proteína tau soluble disminuye en aquellas muestras que se han incubado en presencia de taurina o 3-APS.

En resumen, la taurina y el 3-APS muestran características comunes como la de ser capaces de prevenir la formación de agregados del péptido  $\beta$  amiloide (aunque en distinta medida), y facilitar la formación de polímeros de tau.



**Figura 72. La taurina promueve la polimerización de tau.** Se muestran imágenes de microscopía electrónica de los polímeros de tau formados tras la incubación en ausencia (A) o presencia de taurina (2-AES) 1 mM (B) o 3-APS 1 mM (C). En **D**) se muestra la medida de la cantidad de tau polimerizado en presencia de taurina. La medida se hizo, al igual que con el péptido  $\beta$  amiloide, cuantificando la cantidad de proteína que queda sin polimerizar tras la centrifugación.



## Discusión

En la enfermedad de Alzheimer y tauopatías relacionadas, la proteína tau juega un papel importante (Avila et al., 2004). La proteína tau, en una situación de normalidad fisiológica, se encuentra unida a los microtúbulos estabilizándolos; sin embargo, en diferentes situaciones patológicas, ésta proteína deja de estar unida a los microtúbulos provocando su desestabilización. Cuando la proteína tau deja de interactuar con los microtúbulos y tiende a agregarse formando estructuras filamentosas como, por ejemplo, los PHFs que aparecen en la enfermedad de Alzheimer. A su vez, estos polímeros fibrilares se asocian en el citoplasma de las neuronas formando los llamados ovillos neurofibrilares, que pueden bloquear el transporte axonal impidiendo así que la célula funcione correctamente. La polimerización de tau no es un proceso que se dé espontáneamente a concentraciones fisiológicas de proteína, es por ello que se ha sugerido que deben existir inductores intracelulares de la misma (Avila et al., 2004). Entre los diferentes inductores que se han descrito se encuentran la heparina, polianiones como los ácidos nucleicos o el ácido poliglútamico o incluso proteínas como la  $\alpha$ -sinucleína y la 14-3-3 (Hernandez et al., 2004a). También, se ha descrito que ácidos grasos como el ácido araquidónico, así como sus productos de peroxidación lipídica, el 4-HNE y la acroleína, promueven la agregación de tau. El ácido araquidónico y los ácidos grasos poliinsaturados que se encuentran en la doble membrana mitocondrial pueden fragmentarse y generar productos altamente reactivos que, a su vez, pueden alterar biomoléculas claves en el funcionamiento celular. Las mitocondrias se encuentran alteradas en la enfermedad de Alzheimer presentando distintas anomalías que pueden afectar a su correcto funcionamiento (Atamna & Frey, 2007; Hirai et al., 2001). Su principal función, la generación de ATP, puede así verse comprometida. Uno de los componentes que participa en la cadena transportadora de electrones (CTE) es el coenzima Q que puede encontrarse en forma oxidada (quinona) o reducida (hidroquinona). El estado redox mitocondrial se altera tanto por la presencia del péptido A $\beta$  como por la generación de productos ROS o derivados semiquinónicos. Además, estudios previos han descrito que en la enfermedad de Alzheimer los niveles de quinona reductasa (NQO<sub>1</sub>) están aumentados, un indicador muy sensible del estado redox de la célula (Raina et al., 1999). NQO<sub>1</sub> aumenta durante la enfermedad de Alzheimer como respuesta de la célula al daño oxidativo producido por el incremento del número de quinonas oxidadas. En definitiva, podemos decir que el estrés oxidativo va a jugar un papel importante en la enfermedad de Alzheimer.

Por tanto, el objetivo fundamental de este trabajo ha sido estudiar y caracterizar el efecto que pueden tener, al igual que otros compuestos implicados en el estrés oxidativo como son el 4-HNE o la acroleína, ciertos derivados quinónicos sobre la polimerización de tau, tanto *in vivo* como *in vitro*. Además, hemos estudiado como se inicia el proceso de formación de los PHFs y si ciertas quinonas pueden estar implicadas en la formación de otra de las estructuras aberrantes que se han encontrado en la enfermedad de Alzheimer, los cuerpos de Hirano. También nos pareció importante estudiar qué otras alteraciones pueden provocar los derivados quinónicos sobre los componentes microtubulares, puesto que en la enfermedad de Alzheimer la red de microtúbulos se encuentra afectada y muy desestructurada. Por último, hemos estudiado qué efecto pueden tener dos compuestos que mimetizan la acción de los glicosaminoglicanos sulfatados (conocidos inductores de la polimerización de tau), el 3-APS y la taurina, sobre la agregación y polimerización de tau, ya que estos compuestos parecen prevenir la formación de agregados del péptido A $\beta$  y hasta el momento nadie ha descrito su posible implicación en la patología de tau. A continuación pasamos a discutir más específicamente cada uno de los puntos clave de esta tesis.

### **Presencia de quinonas en PHFs y cuerpos de Hirano.**

En primer lugar, quisimos estudiar si las quinonas pueden encontrarse asociadas *ex vivo* a las estructuras aberrantes de tau encontradas en la enfermedad de Alzheimer. En las neuronas, una posible fuente de quinonas pueden ser los intermediarios de la vía de síntesis o degradación del coenzima Q. El coenzima Q es un derivado quinónico presente en la mitocondrias cuyo estado quinónico o hidroquinónico depende del estado redox mitocondrial. Como ya describimos en la Introducción, el coenzima Q, y demás derivados quinónicos, pueden comportarse como agentes antioxidantes en su estado reducido o como agentes prooxidantes en su forma oxidada, pudiendo encontrarse también como semiquinonas bajo ciertas condiciones y convertirse en agentes altamente tóxicos (James et al., 2005). Se sabe que, en situaciones fisiopatológicas, la mitocondria es la principal fuente de productos ROS, acumulando este orgánulo daños oxidativos más rápidamente que el resto de los orgánulos de la célula. Cabe especular que, bajo determinadas condiciones, derivados del coenzima Q pueden generar compuestos con capacidad para reaccionar, al igual que lo hacen el 4-HNE y la acroleína, con la proteína tau promoviendo su polimerización. Por tanto, pensamos que el coenzima Q<sub>0</sub> puede ser un ejemplo de quinona relevante a nivel fisiológico, ya que al carecer de la cadena lateral isoprenoide es altamente reactivo. Además, en el laboratorio disponíamos del anticuerpo anti-CoQ<sub>0</sub> (MacDonald et al., 2004) que reconoce aductos promovidos por el coenzima Q<sub>0</sub>. Utilizando este anticuerpo detectamos la presencia de coenzima Q<sub>0</sub> unida a las moléculas de tau extraídas de los PHFs (PHF-tau) aislados de muestras de cerebros de enfermos de Alzheimer, sugiriendo que el coenzima Q<sub>0</sub> promueve la formación de los agregados fibrilares de tau. De estos primeros experimentos cabe especular que es posible que el coenzima Q<sub>0</sub> pueda favorecer más la nucleación que el crecimiento de los polímeros de tau, puesto que no fuimos capaces de ver un marcaje muy intenso, utilizando inmunomicroscopía electrónica, de los PHFs con el anticuerpo anti-CoQ<sub>0</sub>. Por otro lado, lo que sí pudimos ver fue una tinción muy intensa de los cuerpos de Hirano con el anticuerpo anti-CoQ<sub>0</sub>. Se ha descrito que la proteína tau está presente en algunos cuerpos de Hirano (Galloway et al., 1987), por lo que se ha especulado si tau podría tener alguna implicación en su formación. De hecho, se han encontrado agregados de tau y actina formando estas estructuras. Resumiendo, gracias al empleo del anticuerpo anti-CoQ<sub>0</sub> hemos sido capaces de detectar aductos de CoQ<sub>0</sub> tanto en los PHFs como en los cuerpos de Hirano, sugiriendo que, al menos el CoQ<sub>0</sub>, puede estar implicado *in vivo* en la formación de dichas estructuras. Este dato no descarta la implicación de otras quinonas. Así, una posible fuente orgánica de derivados quinónicos altamente reactivos se puede generar como consecuencia de los procesos de desintoxicación que se ponen en marcha en presencia de derivados xenobióticos presentes en los componentes de la dieta o el medio ambiente.

### **Polimerización y agregación de la proteína tau *in vitro*. Secuencias críticas.**

Una vez que fuimos capaces de detectar la presencia de quinonas en los PHFs y en los cuerpos de Hirano, presentes en el cerebro de los enfermos de Alzheimer, nos planteamos si estos compuestos pueden favorecer o promover la polimerización de tau. Nuestros resultados demuestran por primera vez que, además de compuestos como la heparina o el 4-HNE, previamente descritos en la literatura (ver

Introducción), diferentes tipos de derivados quinónicos, ya sean benzoquinonas como el coenzima  $Q_0$  y la *p*-benzoquinona, o naftoquinonas como la juglona y la menadiona, promueven el ensamblaje de la proteína tau y forman estructuras filamentosas similares a los PHFs. Sin embargo, no todas las quinonas ensayadas presentan idénticas potencialidades como agentes agregantes de tau (ver Tabla 4 y Tabla 5). Por ejemplo, la decilubiquinona (2,3 dimetoxi-5-metil-6-decil-1, 4-benzoquinona, coenzima  $Q_{10}$ ), la lausona (2-hidroxi-1, 4-naftoquinona) o la vitamina  $K_1$  (2-metil-3-fitol-1, 4-naftoquinona) entre otras, no promueven la polimerización de tau. La única diferencia entre la lausona y la juglona (5-hidroxi-1, 4-naftoquinona) es la posición del grupo hidroxilo, lo que provoca una diferente reactividad de estas quinonas frente a tau. Esta diferencia en la reactividad se da también entre el coenzima  $Q_0$  y el coenzima  $Q_{10}$ , sugiriendo que la presencia de esta cadena lateral isoprenoide impide la polimerización de tau. Por otro lado, también existen diferencias en cuanto a la reactividad dependiendo del estado oxidado o reducido de estas quinonas. Un ejemplo claro lo podemos encontrar entre la hidroquinona y la benzoquinona. La única diferencia entre ambas quinonas es que una se encuentra reducida y otra oxidada, siendo ésta la forma más reactiva. Cuando se compara la reactividad de la benzoquinona (*p*-benzoquinona) con la duroquinona (tetrametil-*p*-benzoquinona) es aún más esclarecedor. La duroquinona presenta las posiciones 2, 3, 5 y 6 metiladas y, por tanto, sin posibilidad alguna de entrecruzar tau en relación a la benzoquinona, con 4 átomos de carbono susceptibles de ser alquilados.

Pudimos observar como los polímeros fibrilares de tau ensamblados en presencia de quinonas como el coenzima  $Q_0$ , la juglona o la menadiona presentan una morfología similar a la de los PHFs de enfermos de Alzheimer; de hecho estos filamentos presentan un morfología más semejante a los PHFs que los obtenidos en presencia de heparina o ácido araquidónico, dos conocidos inductores de la polimerización de tau. En esta tesis hemos también demostrado mediante análisis proteómico que la unión del coenzima  $Q_0$  a tau tiene lugar en los restos de aminoácidos implicados en su autoensamblaje. Este resultado permite explicar por qué los PHFs se marcan levemente con el anticuerpo anti-Co $Q_0$ . Las quinonas al incorporarse a estos aminoácidos quedan ocluidas en el interior del PHF cuando tau se agrega impidiendo, por tanto, su reconocimiento por anticuerpos. Así pues, el coenzima  $Q_0$  actúa como un inductor de la polimerización de tau al promover el entrecruzamiento entre monómeros de tau, formando agregados que pueden actuar como centros de nucleación para obtener estructuras poliméricas más complejas. De nuestros resultados se deduce que el coenzima  $Q_0$  se incorpora en restos de aminoácidos que participan en las uniones tau-tau.

Además de poder estudiar el efecto de quinonas como el coenzima  $Q_0$  o la menadiona nos pareció interesante examinar el efecto que podían tener sobre la polimerización y agregación de tau otra quinona que se genera endógenamente en el sistema nervioso, la dopamina quinona. Dicha quinona se genera a partir de la dopamina cuando ésta se oxida. Nuestros resultados demuestran que los productos de oxidación de la dopamina son capaces de promover también la agregación de tau y facilitar la formación de estructuras fibrilares semejantes a los PHFs. Este resultado es especialmente significativo puesto que cabría esperar que, en la enfermedad de Alzheimer, la sustancia nigra, rica en dopamina, debería ser también especialmente sensible a la formación de PHFs. Sin embargo, de los datos anatomopatológicos se sabe que esto no es así, salvo en raras excepciones. Una de las posibles explicaciones de que no se hayan encontrado agregados de tau en casos normales de la enfermedad de Parkinson, donde sí se ha descrito la

presencia de derivados quinónicos de la dopamina, es que es necesaria simultáneamente una concentración crítica mínima de tau para que esta se agregue y se ensamble. Esta hipótesis la verificamos mediante distintos tipos de análisis bioquímicos y pudimos observar como existen diferencias en la expresión de la proteína tau dependiendo de la región cerebral. Así, la substantia nigra (zona principalmente afectada en la enfermedad de Parkinson y cuyas neuronas sintetizan dopamina) presenta unos niveles muy bajos de tau no pudiéndose, por tanto, formar estructuras aberrantes de tau, salvo raras excepciones. En casos raros de enfermedad de Parkinson familiar se ha descrito la agregación de  $\alpha$ -sinucleína y tau. En estos casos es posible que las células que expresan dopamina además expresen unas cantidades anormalmente altas de tau (Duda et al., 2002; Galloway et al., 1989; Giasson et al., 2003). Sin embargo, en esta área cerebral la dopamina al oxidarse generalmente no induce la agregación de tau, sino de otra proteína cuyo metabolismo está relacionado con la enfermedad de Parkinson, la  $\alpha$ -sinucleína. Alteraciones en el metabolismo de dicha proteína están estrechamente relacionados con la muerte de neuronas dopaminérgicas y, por tanto, con la enfermedad de Parkinson (Conway et al., 2001).

Después de haber demostrado que diferentes derivados quinónicos endógenos como el coenzima  $Q_0$  o la dopamina quinona, así como derivados quinónicos exógenos de distinta naturaleza, favorecen el ensamblaje de la proteína tau en polímeros fibrilares, quisimos estudiar qué secuencias o dominios de tau pueden estar implicadas en el proceso de polimerización. Estudios previos desarrollados en nuestro laboratorio (Perez et al., 1996) habían descrito que la tercera repetición del dominio de unión a microtúbulos es la región requerida para que tenga lugar el autoensamblaje o polimerización de la proteína tau. Por tanto, decidimos estudiar si ésta es la región clave para que la polimerización de tau tenga lugar en presencia de quinonas, como sucede en presencia de otro inductor de la agregación bien caracterizado como es la heparina. Realizamos un estudio con distintos péptidos y variantes de delección de tau que afectan a la tercera repetición. Varios de los fragmentos que se deleccionaron polimerizan por sí solos, como es el caso del péptido VQIVYK. Sin embargo, hemos de tener en cuenta que estos péptidos de pequeño tamaño se encuentran formando parte de la molécula de tau completa, por lo que es posible que su comportamiento sea distinto. De hecho, estos péptidos forman láminas  $\beta$  cuando polimerizan *in vitro* (von Bergen et al., 2000) y los polímeros de tau encontrados en muestras de cerebros de enfermos de Alzheimer parecen tener una mezcla de hélices  $\alpha$  y láminas  $\beta$  (Gamblin, 2005). Además hemos podido demostrar en esta tesis como algunas de las modificaciones químicas que aparecen en los PHFs aislados de cerebros de enfermos de Alzheimer, como es la desamidación (Watanabe et al., 1999), parecen disminuir la capacidad de polimerización de estos péptidos de pequeño tamaño. Por todo ello, hemos de ser precavidos a la hora de afirmar que estos péptidos son las secuencias mínimas requeridas para la polimerización de la proteína tau. En la molécula completa de tau, el péptido VQIVYK, parece facilitar la polimerización de tau *in vitro* en presencia de quinonas, ya que la variante de tau que carece de este fragmento pierde, en gran medida, su capacidad de polimerizar. De los resultados presentados se deduce que la secuencia peptídica que comprende el fragmento 1/2R (residuos 317-335; KVTSCGSLGNIHKK PGGG) parece ser la región verdaderamente importante en el proceso de agregación de tau, ya que la variante de tau que carece de este péptido es casi incapaz de polimerizar. Por tanto concluimos que la tercera repetición del dominio de unión a microtúbulos es la región mínima requerida y necesaria para

que la proteína tau polimerice en presencia de quinonas. De hecho, la variante de delección de tau sin la tercera repetición completa es absolutamente incapaz de polimerizar.

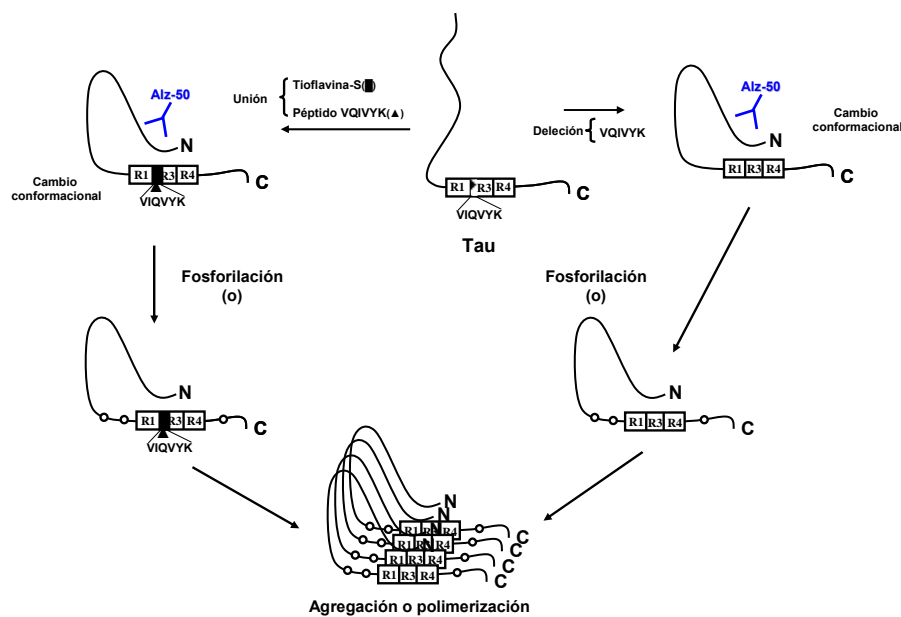
### Fosforilación de la proteína tau.

Existe una gran controversia en el campo de las tauopatías sobre qué es primero, la fosforilación o la agregación. Los resultados presentados en esta tesis permiten apoyar la idea de que la fosforilación aberrante de tau encontrada en diferentes tauopatías puede ser previa a la polimerización, puesto que hemos demostrado que tanto tau 42 como tau 2R son más propensos a polimerizar en presencia de quinonas cuando se encuentran previamente fosforilados. El mecanismo molecular propuesto para explicar cómo la fosforilación promueve la polimerización se basa en la observación de que la fosforilación del péptido 1/2 R estabiliza la estructura en hélice  $\alpha$  (Mendieta et al., 2005; Hiraoka et al., 2004). Así, en situaciones fisiológicas, los dominios de unión a microtúbulos presentarían una estructura desordenada al azar “random-coil”, mientras que en situaciones patológicas dichos dominios presentarían una estructura secundaria aberrante en forma de hélice  $\alpha$ .

La fosforilación de tau se ha estudiado en profundidad porque parece generar toxicidad cuando ésta se examina *in vivo* (Engel et al., 2006b; Fulga et al., 2007; Jackson et al., 2002), toxicidad que puede ponerse de manifiesto en diferentes modelos animales incluso antes de que la agregación de tau tenga lugar (Engel et al., 2006a; Lucas et al., 2001; Noble et al., 2005; Perez et al., 2003; Santacruz et al., 2005). Nuestros resultados han demostrado que diferentes sucesos pueden inducir la fosforilación de tau: (i) la delección de la secuencia que codifica para el péptido VQIVYK, en la molécula completa de tau, favorece su fosforilación, aunque, como hemos comentado anteriormente, no facilita la agregación; (ii) la interacción de tioflavina-S o el péptido VQIVYK con la proteína completa de tau, incrementa tanto la fosforilación como la agregación. Estos resultados sugieren que puede existir alguna relación entre ambos sucesos, al igual que se ha descrito en varios modelos animales (Noble et al., 2005; Perez et al., 2003; Rogueva et al., 2007). De esta forma, nuestros resultados demuestran que la unión del péptido VQIVYK a la proteína tau facilita la fosforilación y la agregación de tau. Por tanto, la delección del péptido VQIVYK o la interacción de esta secuencia peptídica, presente en la molécula de tau, con moléculas como la tioflavina-S o el mismo péptido, provocan un aumento en la fosforilación de tau. Por tanto, podemos proponer un modelo (**Figura 73**) de los sucesos que pueden estar ocurriendo en las patologías de tau, en el que un cambio conformacional (en el que las hélices  $\alpha$  formadas por la secuencia de aminoácidos presentes en el extremo amino terminal y por el péptido 1/2R fosforilado estarían interaccionando) provocaría que la proteína tau se fosforilase en mayor medida (hiperfosforilación), lo que facilitaría su agregación. La tercera repetición del dominio de unión a microtúbulos de tau, es necesaria para que se produzca el cambio conformacional. Además, compuestos como el 4-HNE, generados por estrés oxidativo, favorecen el cambio conformacional. De hecho, el anticuerpo Alz-50 reconoce el cambio conformacional de tau inducido por el 4-HNE (Takeda et al., 2000). Nosotros hemos demostrado que la unión de la tioflavina-S o del péptido VQIVYK a la proteína tau provocan dicho cambio conformacional. La unión del péptido VQIVYK podría estar mimetizando lo que puede estar ocurriendo, en una situación patológica, para que la fosforilación y agregación tenga lugar. Es posible que al igual que el 4-HNE, la

unión de quinonas a tau pueda también estar facilitando el cambio conformacional, puesto que las quinonas pueden entrecruzar dos o mas moléculas de tau favoreciendo la interacción entre ambas y por tanto el cambio conformacional. De acuerdo con nuestro modelo, el cambio conformacional reconocido por el anticuerpo Alz-50 (Binder et al., 2005) va a predisponer a la molécula de tau a fosforilarse y agregarse dependiendo de las diferentes afinidades de la proteína tau por las distintas quinonas presentes en la neurona, o dependiendo de la concentración de tau modificado presente. Estas diferencias podrían explicar los diferentes tipos de patologías de tau que ocurren en diferentes áreas del cerebro.

En resumen, la delección del péptido VQIVYK en la molécula de tau provoca un cambio conformacional que disminuye la unión de tau a los microtúbulos y favorece su fosforilación. La interacción del péptido VQIVYK o la tioflavina-S con tau, puede estar mimetizando un tipo de agregación que va a favorecer la fosforilación, lo que sugiere que la agregación de tau podría favorecer la fosforilación de tau en determinados restos de aminoácidos.



**Figura 73. Modelo propuesto de fosforilación y agregación de tau.** El esquema muestra como la unión de moléculas como la tioflavina-S y el péptido VQIVYK a la molécula de tau completa o la delección de este péptido en la molécula de tau, facilita un cambio conformacional de la proteína tau, el cual es específicamente reconocido por el anticuerpo Alz-50, que a su vez favorece la fosforilación y/o agregación. Los diferentes sitios de fosforilación fueron identificados por su reacción con anticuerpos específicos o por espectrometría de masas.

### Ensamblaje de los PHFs y los cuerpos de Hirano

Después de haber analizado y estudiado en profundidad los eventos iniciales de la polimerización de tau *in vitro*, quisimos caracterizar eventos tardíos, es decir, como pueden estar formándose o ensamblándose los PHFs y los cuerpos de Hirano.

Para llevar a cabo este tipo de estudios tuvimos en primer lugar que desarrollar un método que nos permitiera estudiar la elongación de los PHFs. El método que diseñamos y pusimos a punto es un método inmunofluorescente. Nos preguntamos que, al igual que se pueden visualizar y estudiar por técnicas de inmunofluorescencias otras estructuras filamentosas como son los microtúbulos (Evans et al.,

1985), si seríamos capaces de visualizar los filamentos de tau, ya fueran PHFs o SFs, aislados de cerebros de enfermos de Alzheimer utilizando dichas técnicas fluorescentes. Para ello, modificamos el método utilizado para visualizar los microtúbulos, para ver si podíamos identificar tanto PHFs, SFs como los filamentos polimerizados *in vitro*.

Mediante este tipo de análisis pudimos observar que los PHFs interactúan más que los SFs con la tioflavina-S. Este dato sugiere que ambos polímeros presentan una conformación diferente. A su vez, la tioflavina-S tiñe más la región central del polímero que los extremos y el tratamiento con heparinasa I provoca una disminución de la tinción con tioflavina-S. La tinción con tioflavina-S se relaciona con la proporción de tau polimerizado que presenta estructura en lámina  $\beta$  (Schweers et al., 1995); por tanto, parece que la región central del polímero, que está formando una estructura helicoidal estable, presenta un mayor contenido en lámina  $\beta$ . En los extremos esta tinción disminuye, lo que sugiere que los extremos pueden ser estructuralmente más dinámicos, permitiendo que el polímero pueda crecer. Por otro lado, el tratamiento con heparinasa I, además de sugerir que los GAGs están formando parte de los PHFs (Arrasate et al., 1997), disminuye la tinción con tioflavina-S de los PHFs, lo que hace pensar que dicho tratamiento provoca una disminución en la proporción de proteína con estructura en lámina  $\beta$ .

Una vez que habíamos establecido que los extremos de los PHFs parecen ser estructuras más dinámicas, nos preguntamos si es posible que los PHFs crezcan por estas regiones. Para llevar a cabo este estudio lo que hicimos fue incubar PHFs con proteína tau humana recombinante marcada o no con el fluoróforo Cy3. En definitiva, pudimos observar que el crecimiento del polímero se puede llevar a cabo con una determinada polaridad, puesto que este sucede principalmente en uno de los extremos. Nuestros experimentos, sin embargo, no nos permiten saber si los filamentos crecen con la adición de moléculas individuales de tau o con la adición de microagregados de tau previamente formados a los extremos de los PHFs. Este último mecanismo ha sido de hecho sugerido para la extensión de los filamentos de tau (Maeda et al., 2007).

En segundo lugar, y utilizando también técnicas fluorescentes, puesto que previamente hemos podido observar la presencia de quinonas en los cuerpos de Hirano, hemos querido conocer si las quinonas desempeñan un papel semejante en la formación de los cuerpos de Hirano al que ejercen en la formación de los polímeros fibrilares de tau.

Tratando de simular el ensamblaje de los cuerpos de Hirano *in vitro*, hemos podido observar que al incubar tau con coenzima  $Q_0$  y actina se forman estructuras con forma de bastones similares a los cuerpos de Hirano. Sin embargo, y puesto que se ha descrito que no todos los cuerpos de Hirano contienen proteína tau (Galloway et al., 1987), es posible especular que, dependiendo de la naturaleza de la neurona implicada, la proteína tau sea reemplazada por otras proteínas que, junto con la actina, formen estructuras similares a los cuerpos de Hirano.

### **Estudios de agregación de tau en cultivos celulares. Efecto de las quinonas.**

Tras discutir el efecto agregante de las quinonas mediante experimentos llevados a cabo *in vitro*, hemos querido ampliar dicho estudio a cultivos celulares para validar su implicación fisiológica. Para llevar a cabo los estudios de agregación o polimerización de tau mediada por quinonas hemos



desarrollado dos modelos celulares. En ambos modelos se utilizó la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

El primer modelo que desarrollamos fue el cultivo de células SH-SY5Y diferenciadas con dibutiril-AMPcíclico y que son similares a neuronas humanas en cultivo. Dichas células expresan mayores cantidades de tau que las no diferenciadas y son por tanto un buen modelo para llevar a cabo los estudios de agregación de tau. En primer lugar quisimos estudiar si el derivado quinónico de la dopamina, la dopamina-quinona, podría promover la formación de agregados de tau en estas células diferenciadas. Para llevar a cabo este estudio resultó especialmente útil el que este neuroblastoma sintetice dopamina de forma constitutiva. Para promover la formación endógena de los derivados quinónicos de la dopamina, provocamos su oxidación en presencia del ión  $Fe^{3+}$ , a través de la reacción de Fenton, tal y como se ha descrito previamente (Stokes et al., 1999). En estas condiciones hemos sido capaces de inducir la agregación de tau y la formación de algún polímero fibrilar. También quisimos analizar si en estas mismas células, otros tipos de quinonas pueden también facilitar la agregación de tau. Para ello, tratamos las células con benzoquinona y observamos que esta quinona también facilita la formación de estructuras aberrantes de tau. Además, pudimos observar como la adición de distintas quinonas a estas células genera una cierta citotoxicidad en función de la concentración de quinona utilizada.

Este modelo celular (células SH-SY5Y diferenciadas) presenta, bajo nuestro punto de vista, una limitación, y es que las células tardan unos 8 días en diferenciarse y en cualquier caso los niveles de tau nunca son muy altos. Por este motivo decidimos desarrollar otro sistema o modelo celular para poder estudiar más en profundidad la agregación de tau.

El segundo modelo que desarrollamos consistió en un sistema de sobreexpresión de tau obtenido mediante transducción génica con lentivirus. Generamos una construcción lentiviral de tau unida a la GFP. Los lentivirus pueden infectar tanto líneas neuronales como no neuronales y con ellos se consigue expresar la proteína de interés en cantidades elevadas. Por tanto, decidimos sobreexpresar la proteína tau en la línea celular SH-SY5Y mediante infección con el lentivirus GFP-Tau42. Pudimos observar que, tras la infección a una MOI de 0.1, se expresan altas cantidades de GFP-Tau42, lo que nos permitía poder estudiar si las quinonas facilitaban o no la agregación de tau. Nuestros resultados demuestran que el tratamiento de estas células con quinonas, como por ejemplo, el coenzima  $Q_0$  o la menadiona incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno, como es el anión superóxido y provoca la agregación de tau. Este resultado confirma que la toxicidad de estos derivados quinónicos está mediada en parte por la formación de derivados ROS y, además, nos ha permitido demostrar que *in vivo* dichos derivados quinónicos inducen la agregación de tau.

### **Microtúbulos, quinonas y estrés oxidativo en la enfermedad de Alzheimer.**

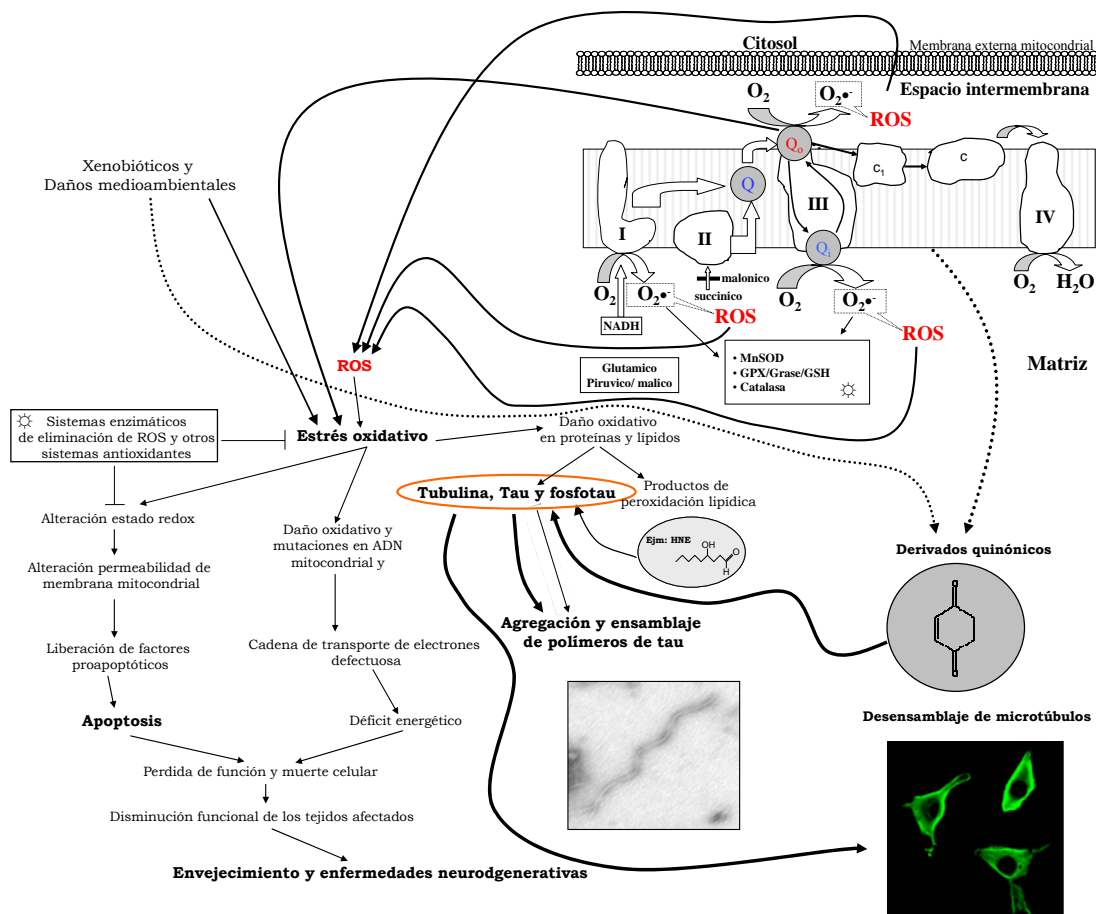
El estrés oxidativo se produce cuando existe un desequilibrio entre los sistemas pro y antioxidantes y esto conduce a que se dañen irreversiblemente una serie de biomoléculas como son las proteínas, haciendo que sus estructuras, funciones y estabildades se vean alteradas. El daño oxidativo se produce cuando la velocidad de formación de agentes oxidantes supera a las defensas antioxidantes en células que son especialmente vulnerables a bajadas en la concentración de ATP. Alteraciones en la CTE

se reconoce como la mayor causa de producción de los derivados ROS. La producción de ROS se incrementa tomando dietas hipercalóricas, por daños celulares ocasionados por radiaciones UV, ciclos redox de quinonas, metabolización de xenobióticos, envejecimiento, toxinas mitocondriales o proteínas mutadas. Así, daños oxidativos en proteínas conduce a la pérdida funcional y muerte celular. Estudios recientes han establecido que una disfunción mitocondrial puede ser la causa inicial para que se desarrollen un elevado número de enfermedades, superior a los que se aceptaban previamente. La disfunción mitocondrial se han implicado en una amplia variedad de enfermedades en el hombre incluyendo el envejecimiento, diabetes y enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, y cáncer. Por otro lado, se sabe que la mitocondria esta íntimamente relacionada con otros componentes celulares, destacando el citoesqueleto en su función de movilidad y organización de diferentes orgánulos (Warda & Han., 2008).

En la enfermedad de Alzheimer se han descrito cambios en la organización de los microtúbulos. Ciertas modificaciones microtubulares son dependientes de la proteína tau (Alonso et al., 1994; Khatoon et al., 1995; Schuller et al., 2001; Vijayan et al., 2001), mientras que otras ocurren como consecuencia de alteraciones de la tubulina (Hempfen & Brion, 1996; Price et al., 1986). Por tanto, quisimos estudiar si las quinonas, además de afectar a la proteína tau, pueden afectar a la red de microtúbulos. Mediante análisis tanto *in vitro* como en líneas celulares hemos demostrado que las quinonas pueden estar implicadas en los cambios que se producen en la tubulina. De hecho, nuestros resultados sugieren una posible conexión entre el daño oxidativo y la desorganización de los microtúbulos que tiene lugar en la enfermedad de Alzheimer mediante una modificación directa de la tubulina por quinonas, como sucede en presencia de benzoquinona. La tubulina puede interactuar con las quinonas a través de sus cisteínas, ya que tiene 20 residuos sulfidrilos (Luduena, 1979; Luduena et al., 1982). Nuestros resultados sugieren, además, una cierta especificidad en la interacción, puesto que otras proteínas ricas en cisteínas, como la albúmina, no se entrecruzan en presencia de quinonas y otras proteínas que también participan en el citoesqueleto, como la actina, tampoco se ve afectada. Por otro lado, hemos demostrado en esta tesis que la interacción entre quinonas y tubulina conduce a una disminución en el ensamblaje de los microtúbulos. Estos datos *in vitro* se vieron confirmados en cultivos celulares. Así, el efecto de las quinonas es más evidente sobre la red de microtúbulos que en la de microfilamentos, lo que sugiere, de nuevo, una especificidad de la acción de las quinonas sobre la tubulina.

Debido a que se necesitan diferentes concentraciones de quinonas tanto para desorganizar la red de microtúbulos, como para inhibir la polimerización de microtúbulos *in vitro*, como para inducir su entrecruzamiento, es posible que las quinonas afecten al metabolismo de la tubulina de diferente manera dependiendo de los niveles de estrés oxidativo alcanzados intracelularmente. De hecho, como en la enfermedad de Alzheimer se han encontrado alteraciones en la red de microtúbulos y proteínas dañadas por el estrés oxidativo, nuestros resultados sugieren que, efectivamente, es posible una conexión entre los niveles elevados de quinonas que se han encontrado en el cerebro de enfermos de Alzheimer (Dallner & Sindelar, 2000; Soderberg et al., 1992) y el daño microtubular observado. El efecto que el estrés oxidativo tiene sobre el citoesqueleto de microtúbulos no se restringe únicamente al papel que los derivados quinónicos aquí descritos tengan sobre el mismo. Además, se sabe que las especies reactivas de oxígeno también modifican la tubulina (Aksenov et al., 2001; Landino et al., 2002; Smith et al., 1997) lo que

apoya la idea de que el estrés oxidativo pueda estar afectando a la red de microtúbulos bien desorganizándola o bien impidiendo que estos polimericen.



**Figura 74. Quinonas en la enfermedad de Alzheimer.** En el esquema se muestra como un aumento en la formación de ROS producido, por ejemplo, por estrés oxidativo, altera el metabolismo del coenzima Q dando lugar a derivados quinónicos que alteran a su vez la red de microtúbulos a través de la modificación de las proteínas claves de los mismos, la tubulina y la proteína tau. La proteína tau agrega en forma filamentososa en presencia de dichos derivados quinónicos. Además, las quinonas pueden también producir estrés oxidativo, mediante la formación de especies reactivas de oxígeno, provocando alteraciones en el estado redox de la célula y daños en el DNA. Todos estos cambios culminan, en el caso de la enfermedad de Alzheimer, en una despolimerización de los microtúbulos, disfunción y muerte neuronal.

En resumen, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que una disfunción mitocondrial (Hirai et al., 2001) y el estrés oxidativo asociado mediado por quinonas reactivas, produce una modificación directa en la red de microtúbulos, lo que puede provocar la disfunción y muerte neuronal en la enfermedad de Alzheimer. Nuestros resultados soportan la hipótesis de que este efecto se debe, en parte, a quinonas reactivas generadas durante dicho estrés oxidativo.

Añadido a estos daños provocados por las quinonas sobre la red de microtúbulos se pueden sumar los previamente mencionados sobre la proteína tau, con lo que agregación o polimerización de tau y un daño en la red microtubular son los efectos principales de las quinonas que van a provocar, en última instancia, una disfunción neuronal y la muerte celular (Figura 74).

## Efecto de compuestos que impiden la agregación del péptido A $\beta$ sobre la agregación y polimerización de la proteína tau.

Un último objetivo de esta tesis ha consistido en estudiar el efecto que algunos fármacos, que actualmente se encuentran en estudio, tienen sobre la agregación de tau.

Nuestro estudio se ha centrado fundamentalmente en analizar el efecto del 3-APS, y su análogo la taurina, sobre la agregación de tau tanto *in vitro* como en cultivos celulares. La razón para llevar a cabo este estudio ha sido que el 3-APS es un fármaco (tramiprosato) que actualmente se encuentra en fase III de los ensayos clínicos como un inhibidor de la polimerización del péptido A $\beta$  y que, por semejanza con los GAGs, nos hizo pensar que también podría tener algún efecto sobre la patología asociada a tau.

Como ya hemos descrito en la Introducción, tanto la agregación del péptido A $\beta$  como de la proteína tau se pueden inducir con los GAGs. Se ha sugerido que los grupos sulfato de los GAGs son los responsables de favorecer la formación de los agregados del péptido A $\beta$  (Fraser et al., 1992). Sin embargo, se ha descrito que una heparina de bajo peso molecular reduce la acumulación de los agregados del péptido A $\beta$  en un modelo murino (Bergamaschini et al., 2004) y el 3-APS, un compuesto con un grupo sulfonato que mimetiza la unión de los GAGs, puede interactuar con el péptido A $\beta$  soluble y prevenir su agregación (Gervais, 2004).

En esta tesis, hemos demostrado que el 3-APS inhibe, en efecto, la agregación del péptido A $\beta$ , pero también favorece la polimerización de la proteína tau en estructuras filamentosas. La formación de agregados de tau tras la adición del 3-APS a nuestro modelo celular resultó inocuo, al igual que cuando se añadió a cultivos primarios de neuronas. Una posible explicación para que el 3-APS no genere toxicidad, a pesar de interactuar con la proteína tau, puede ser que el 3-APS se une, como hemos demostrado en esta tesis (**Figura 69**) a tau por una región cercana al extremo carboxilo, no comprometiéndose por tanto la unión de tau a los microtúbulos, al no interferir con su función estabilizadora. El 3-APS presenta grupos funcionales que, a pH fisiológico, están cargados positiva y negativamente. Así, cabe especular que la región cargada positivamente del 3-APS puede interactuar electrostáticamente con restos de aminoácidos ácidos de la proteína tau, como los que se encuentran presentes en el extremo carboxilo terminal, lo que podría hacer disminuir el efecto inhibitorio de las cargas negativas sobre el autoensamblaje de tau, permitiendo así la polimerización de la proteína tau (Abraha et al., 2000). Por otro lado, el grupo sulfonato cargado negativamente del 3-APS puede unirse a los residuos con carga positiva presentes también en la región central de la molécula de tau, residuos que se sabe están implicados en la unión a actina (Yu & Rasenick, 2006). Por tanto, cuando 3-APS se une a tau va a existir una competición por la unión de tau a la actina. Esta región contiene una secuencia de aminoácidos (NIHHK) similar a la secuencia presente en el péptido  $\beta$  amiloide VHHQK, por donde se sabe que 3-APS se une al péptido A $\beta$  (Gervais et al., 2006).

Por otro lado, no podemos excluir que el 3-APS pueda unirse también a la región amino terminal de tau cargada negativamente, provocando un efecto similar en el autoensamblaje de tau (Gamblin et al., 2003). Es más, es posible que la unión del 3-APS a la región amino terminal de tau pueda influenciar la unión de tau a los agregados de actina que se forman en la membrana (Brandt et al., 1995).

En lo que respecta a la proteína tau, se ha descrito que el contenido en condroitín sulfatos correlaciona inversamente con la cantidad de tau hiperfosforilado encontrado en las áreas corticales de cerebros de enfermos de Alzheimer (Bruckner et al., 1999). Por tanto, no hemos de excluir un posible papel neuroprotector de los GAGs en la enfermedad de Alzheimer, papel neuroprotector que podemos extender a compuestos como el 3-APS. De hecho el 3-APS puede usarse para disminuir la patología del  $\beta$  amiloide y, aunque favorece la agregación de tau, ésta no parece generar toxicidad en los cultivos celulares. Actualmente parece existir un consenso en el campo de las tauopatías sobre el papel neuroprotector de los macroagregados de tau (como los PHFs) a corto plazo, mientras que los microagregados de tau hiperfosforilado son las especies realmente tóxicas para la neurona (Santacruz et al., 2005; Gomez-Ramos et al., 2006). Resumiendo, el 3-APS podría ser neuroprotector al promover la agregación de tau y “secuestrar” las especies tóxicas de tau. Unido a estos efectos, el 3-APS provoca una disminución de los complejos de tau y actina (Sharma et al., 2007; Yu & Rasenick, 2006), complejos que parecen resultar tóxicos para la célula (Fulga et al., 2007).

Además de estudiar el efecto que tiene el 3-APS sobre la agregación de tau estudiamos el efecto que puede tener un compuesto fisiológico y análogo químicamente como es la taurina. La taurina es uno de los aminoácidos más abundantes en el cerebro (Guidotti et al., 1972) donde juega un papel como osmorregulador, antioxidante, neuromodulador o incluso puede controlar la entrada de calcio (Huxtable, 1989). También se ha descrito que la taurina altera las propiedades iónicas de los receptores GABA<sub>A</sub> (del Olmo et al., 2000). Recientemente, se ha visto que la taurina protege de la neurotoxicidad producida por el péptido  $\beta$  amiloide (Paula-Lima et al., 2005) y que dicha neuroprotección esta relacionada con la activación de receptores de GABA<sub>A</sub>.

En relación con la enfermedad de Alzheimer, se sabe que los ovillos neurofibrilares aparecen en neuronas que sintetizan taurina (Kowall & Beal, 1991). Además, se ha observado una disminución en los niveles de taurina presentes en el líquido cefalorraquídeo de enfermos de Alzheimer (Alom et al., 1991; Arai et al., 1984).

La taurina como hemos mencionado es un compuesto estructuralmente relacionado con el 3-APS y, aunque se ha sugerido que este compuesto no impide la formación de las fibrillas de amiloide (Gervais et al., 2007), hasta el momento no se había realizado ningún experimento que lo demostrara. En esta tesis hemos demostrado que la taurina se une al péptido  $\beta$  amiloide de manera similar a como lo hace el 3-APS, impidiendo la agregación del péptido A $\beta$ , aunque en menor grado que el 3-APS. Por otro lado, también facilita la formación de polímeros fibrilares de tau, mimetizando la acción de su análogo estructural, el 3-APS.

En resumen, nuestros resultados claramente demuestran que drogas o compuestos que tengan un interés potencial en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer deben analizarse tanto en la patología del  $\beta$  amiloide como en la de tau. Compuestos como el 3-APS (tramiprosato) o la taurina inhiben la agregación del péptido A $\beta$ , pero favorecen la agregación de tau y todavía no se sabe qué posible efecto puede tener la agregación de tau sobre la célula, sobre todo a largo plazo. Por otro lado, la unión de estos compuestos a la proteína tau reduce la cantidad de tau funcional en la célula. Por tanto se han de tener en cuenta estos diferentes aspectos a la hora de utilizar estos compuestos como posible terapia para la enfermedad de Alzheimer o tauopatías relacionadas.

## **Conclusiones**

1. El coenzima  $Q_0$  se encuentra asociado a los cuerpos de Hirano presentes en secciones de tejido cerebral de enfermos de Alzheimer colocalizando, en algunas ocasiones, con la proteína tau. Los PHFs también presentan esta quinona, lo que sugiere una posible implicación del coenzima  $Q_0$  y otras quinonas en la formación de estas estructuras aberrantes tanto *in vitro* como *in vivo*.
2. Distintos derivados quinónicos endógenos como el coenzima  $Q_0$  o la dopamina quinona, así como derivados quinónicos exógenos de distinta naturaleza, favorecen el ensamblaje de la proteína tau en polímeros fibrilares *in vitro*. La región de la proteína tau más importante en el autoensamblaje se ha mapeado en la tercera repetición del dominio de unión a microtúbulos. Las variantes de delección de la proteína que carecen de dicha región o de alguna de sus secuencias muestran una reducida capacidad de polimerización secuencia de aminoácidos correspondiente a los residuos número 315 al 335 es esencial para la polimerización de tau *in vitro* en presencia de quinonas.
3. La delección de la secuencia que codifica para el péptido VQIVYK de la tercera repetición del dominio de unión a microtúbulos de la proteína tau, favorece su fosforilación por distintas quinasas y provoca un cambio conformacional reconocido por el anticuerpo conformacional Alz-50 que también reconoce a la proteína tau obtenida de los PHFs aislados de muestras de cerebros de enfermos de Alzheimer. La interacción de la tioflavina-S o el péptido VQIVYK con la proteína tau mimetiza el efecto producido al deleccionar la secuencia que codifica para el péptido VQIVYK y además favorece la agregación de tau.
4. El desarrollo de una nueva técnica inmunofluorescente revela la estructura de los PHFs, que presentan una región central más estable que se tiñe con tioflavina-S y unos extremos más dinámicos que se tiñen en menor medida. La adición de moléculas de tau a los PHFs aislados *ex vivo* sugiere que la elongación de estos polímeros tiene lugar por los extremos, bien por unión de moléculas individuales o de oligómeros.
5. Utilizando esta técnica también se ha observado que las quinonas pueden favorecer la formación de estructuras similares a cuerpos de Hirano *in vitro*.
6. A su vez, las quinonas favorecen la formación de agregados o estructuras fibrilares en dos modelos celulares, en un cultivo de células SH-SY5Y diferenciadas y en un sistema celular en el que se sobreexpresa la proteína tau mediante transducción génica con lentivirus. Por tanto, en estos modelos celulares se ha demostrado que las quinonas inducen la agregación de tau *in vivo*.
7. La presencia de quinonas daña la red de microtúbulos. Las quinonas impiden la polimerización de la tubulina en microtúbulos, lo que sugiere una posible conexión entre el daño oxidativo y la desorganización de los microtúbulos que tiene lugar en la enfermedad de Alzheimer.
8. Compuestos que mimetizan la acción de los glicosaminoglicanos sulfatados, como el 3-APS y su análogo estructural, la taurina, impiden la formación de agregados del péptido  $\beta$  amiloide, pero sin embargo, favorecen la formación de polímeros fibrilares o agregados de tau.
9. En definitiva, nuestros resultados caracterizan el efecto que tienen distintos derivados quinónicos sobre la formación de dos de las estructuras aberrantes encontradas en la enfermedad de Alzheimer, los PHFs y los cuerpos de Hirano. Además las quinonas proporcionan una conexión entre el estrés oxidativo, el daño observado en la red de microtúbulos, y la disfunción y muerte neuronal encontrada en la enfermedad Alzheimer.

# Bibliografía





- Abraha, A., Ghoshal, N., Gamblin, T. C., Cryns, V., Berry, R. W., Kuret, J. & Binder, L. I. (2000). C-terminal inhibition of tau assembly in vitro and in Alzheimer's disease. *J Cell Sci* 113 Pt 21, 3737-3745.
- Adams, R. & Victor, M. (1993). Principles of Neurology (ed. I. Mc Graw-Hill).
- Afanas'ev, I. B., Korkina, L. G., Suslova, T. B. & Soodaeva, S. K. (1990). Are quinones producers or scavengers of superoxide ion in cells? *Arch Biochem Biophys* 281, 245-250.
- Aisen, P. S. (2005). The development of anti-amyloid therapy for Alzheimer's disease: from secretase modulators to polymerisation inhibitors. *CNS Drugs* 19, 989-996.
- Aisen, P. S., Mehran, M., Poole, R., Lavoie, I., Gervais, F., Laurin, J., Briand, R. & Garceau, D. (2004). Clinical data on Alzhemed after 12 months of treatment in patients with mild to moderate Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 25, S20
- Aksenov, M. Y., Aksenova, M. V., Butterfield, D. A., Geddes, J. W. & Markesbery, W. R. (2001). Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 103, 373-83.
- Alom, J., Mahy, J. N., Brandi, N. & Tolosa, E. (1991). Cerebrospinal fluid taurine in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 30, 735.
- 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.
- 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, 9340-9351.
- 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. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Z Psychiat Psych Gerichtl Med* 64, 146-148.
- Alzheimer, A. (1911). Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren. *Z ges Nurol Psychiat* 4, 356-385.
- Alzheimer, A., Stelzmann, R. A., Schnitzlein, H. N. & Murtagh, F. R. (1995). An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde". *Clin Anat* 8, 429-431.
- Andersen, O. M., Reiche, J., Schmidt, V., Gotthardt, M., Spoelgen, R., Behlke, J., Von Arnim, C. A., Breiderhoff, T., Jansen, P., Wu, X., Bales, K. R., Cappai, R., Masters, C. L., Gliemann, J., Mufson, E. J., Hyman, B. T., Paul, S. M., Nykjaer, A. & Willnow, T. E. (2005). Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13461-13466.
- Andorfer, C., Acker, C. M., Kress, Y., Hof, P. R., Duff, K. & Davies, P. (2005). Cell-cycle reentry and cell death in transgenic mice expressing nonmutant human tau isoforms. *J Neurosci* 25, 5446-5454.
- Arai, H., Kobayashi, K., Ichimiya, Y., Kosaka, K. & Iizuka, R. (1984). A preliminary study of free amino acids in the postmortem temporal cortex from Alzheimer-type dementia patients. *Neurobiol Aging* 5, 319-321.
- 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, 1115-1122.

- Arrasate, M., Pérez, 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., Mitra, S., Schweitzer, E. S., Segal, M. R. & Finkbeiner, S. (2004). Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* 431, 805-810.
- Arnold, C. S., Johnson, G. V., Cole, R. N., Dong, D. L., Lee, M. & Hart, G. W. (1996). The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine. *J Biol Chem* 271, 28741-28744.
- Arriagada, P. V., Growdon, J. H., Hedley-Whyte, E. T. & Hyman, B. T. (1992). Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42, 631-639.
- Ashe, K. H. (2007). A tale about tau. *N Engl J Med* 357, 933-935.
- Atamna, H. & Frey, W. H., 2nd. (2007). Mechanisms of mitochondrial dysfunction and energy deficiency in Alzheimer's disease. *Mitochondrion* 7, 297-310.
- Atzori, C., Ghetti, B., Piva, R., Srinivasan, A. N., Zolo, P., Delisle, M. B., Mirra, S. S. & Migheli, A. (2001). Activation of the JNK/p38 pathway occurs in diseases characterized by tau protein pathology and is related to tau phosphorylation but not to apoptosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 60, 1190-1197.
- Avila, J. & Diaz-Nido, J. (2004). Tangling with hypothermia. *Nat Med* 10, 460-461.
- 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.
- Avila, J., Dominguez, J. & Diaz-Nido, J. (1994). Regulation of microtubule dynamics by microtubule-associated protein expression and phosphorylation during neuronal development. *Int J Dev Biol* 38, 13-25.
- Bancher, C., Brunner, C., Lassmann, H., Budka, H., Jellinger, K., Wiche, G., Seitelberger, F., Grundke, I. 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, 90-99.
- Baker, M., Litvan, I., Houlden, H., Adamson, J., Dickson, D., Perez-Tur, J., Hardy, J., Lynch, T., Bigio, E. & Hutton, M. (1999). Association of an extended haplotype in the tau gene with progressive supranuclear palsy. *Hum Mol Genet* 8, 711-715.
- Banker, G. A. & Cowan, W. M. (1977). Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res* 126, 397-425.
- Barghorn, S. & Mandelkow, E. (2002). Toward a unified scheme for the aggregation of tau into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry* 41, 14885-14896.
- Baudier, J., Lee, S. H. & Cole, R. D. (1987). Separation of the different microtubule-associated tau protein species from bovine brain and their mode II phosphorylation by Ca<sup>2+</sup>/phospholipid-dependent protein kinase C. *J Biol Chem* 262, 17584-17590.
- Beffert, U., Danik, M., Krzykowski, P., Ramassamy, C., Berrada, F. & Poirier, J. (1998). The neurobiology of apolipoproteins and their receptors in the CNS and Alzheimer's disease, *Brain Res Rev* 27, 119-142.
- Bellomo, G., Mirabelli, F., Richelmi, P., Malorni, W., Iosi, F. & Orrenius, S. (1990a). The cytoskeleton as a target in quinone toxicity. *Free Radic Res Commun* 8, 391-399.

- Bellomo, G., Thor, H. & Orrenius, S. (1990b). Modulation of cellular glutathione and protein thiol status during quinone metabolism. *Methods Enzymol* 186, 627-635.
- Bergamaschini, L., Rossi, E., Storini, C., Pizzimenti, S., Distaso, M., Perego, C., De Luigi, A., Vergani, C. & De Simoni, M. G. (2004). Peripheral treatment with enoxaparin, a low molecular weight heparin, reduces plaques and beta-amyloid accumulation in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 24, 4181-4186.
- Bertram, L., McQueen, M. B., Mullin, K., Blacker, D. & Tanzi, R. E. (2007). Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat Genet* 39, 17-23.
- 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, 3751-3757.
- Binder, L. I., Guillozet-Bongaarts, A. L., Garcia-Sierra, F. & Berry, R. W. (2005). Tau, tangles, and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1739, 216-223.
- 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), 741-756.
- Bittner, S. (2006). When quinones meet amino acids: chemical, physical and biological consequences. *Amino Acids* 30, 205-224.
- Blacker, D., Wilcox, M. A., Laird, N. M., Rodes, L., Horvath, S. M., Go, R. C., Perry, R., Watson, B., Jr., Bassett, S. S., McCinnis, M. G., Albert, M. S., Hyman, B. T. & Tanzi, R. E. (1998). Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet* 19, 357-360.
- Blocq, P. & Marinesco, G. (1892). Sur les lésions et la pathogénie de l'épilepsie dite essentielle. *Sem Méd* 12, 445-446.
- Blomqvist, M. E., Reynolds, C., Katzov, H., Feuk, L., Andreasen, N., Bogdanovic, N., Blennow, K., Brookes, A. J. & Prince, J. A. (2006). Towards compendia of negative genetic association studies: an example for Alzheimer disease. *Hum Genet* 119, 29-37.
- Bolton, J. L., Trush, M. A., Penning, T. M., Dryhurst, G. & Monks, T. J. (2000). Role of quinones in toxicology. *Chem Res Toxicol* 13, 135-60.
- Borenstein, A. R., Copenhaver, C. I. & Mortimer, J. A. (2006). Early-life risk factors for Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 20, 63-72.
- Boveris, A. & Chance, B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 134, 707-716.
- Boveris, A., Cadenas, E. & Stoppani, A.O.M. (1976). Role of Ubiquinone in the mitochondrial Generation of Hydrogen Peroxide. *Biochem J* 156, 435-444.
- Braak, H. & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol (Berl)* 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, 248-254.
- 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, 1327-1340.
- Brion, J. P., Passareiro, H., Nunez, J. & Flament-Durand, J. (1985). Mise en évidence immunologique de la protéine tau au niveau des lésions de dégénérescence neurofibrillaire de la maladie d'Alzheimer. *Arch Biol* 95, 229-235.

- Bruckner, G., Hausen, D., Hartig, W., Drlicek, M., Arendt, T. & Brauer, K. (1999). Cortical areas abundant in extracellular matrix chondroitin sulphate proteoglycans are less affected by cytoskeletal changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 92, 791-805.
- Brunk, U. T. & Terman, A. (2002). Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic Biol Med* 33, 611-619.
- Brunk, U. T. & Terman, A. (2002). The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur J Biochem* 269, 1996-2002.
- Brunmark, A. & Cadenas, E. (1989). Redox and addition chemistry of quinoid compounds and its biological implications. *Free Radic Biol Med* 7, 435-477.
- 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.
- Buee-Scherrer, V. & Goedert, M. (2002). Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases in intact cells. *FEBS Lett* 515, 151-154.
- Burns, J. C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M. & Yee, J. K. (1993). Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8033-8037.
- Butterfield, D. A., Abdul, H. M., Opii, W., Newman, S. F., Joshi, G., Ansari, M. A. & Sultana, R. (2006). Pin1 in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 98, 1697-1706.
- Butterfield, D. A., Castegna, A., Lauderback, C. M. & Drake, J. (2002). Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiol Aging* 23, 655-664.
- Calingasan, N. Y., Uchida, K. & Gibson, G. E. (1999). Protein-bound acrolein: a novel marker of oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 72, 751-756.
- Capell, A., Grunberg, J., Pesold, B., Diehlmann, A., Citron, M., Nixon, R., Beyreuther, K., Selkoe, D. J. & Haass, C. (1998). The proteolytic fragments of the Alzheimer's disease-associated presenilin-1 form heterodimers and occur as a 100-150-kDa molecular mass complex. *J Biol Chem* 273, 3205-3211.
- Carmel, G., Mager, E. M., Binder, L. I. & Kuret, J. (1996). The structural basis of monoclonal antibody Alz50's selectivity for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem* 271, 32789-32795.
- Cash, A. D., Aliev, G., Siedlak, S. L., Nunomura, A., Fujioka, H., Zhu, X., Raina, A. K., Vinters, H. V., Tabaton, M., Johnson, A. B., Paula-Barbosa, M., Avila, J., Jones, P. K., Castellani, R. J., Smith, M. A. & Perry, G. (2003). Microtubule Reduction in Alzheimer's Disease and Aging Is Independent of tau Filament Formation. *Am J Pathol* 162, 1623-1627.
- Castillo, G. M., Lukito, W., Wight, T. N. & Snow, A. D. (1999). The sulfate moieties of glycosaminoglycans are critical for the enhancement of beta-amyloid protein fibril formation. *J Neurochem* 72, 1681-1687.
- Caughey, B. & Lansbury, P. T. (2003). Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci* 26, 267-298.
- Cavallini, G., Donati, A., Taddei, M. & Bergamini, E. (2007). Evidence for selective mitochondrial autophagy and failure in aging. *Autophagy* 3, 26-27.
- Cedazo-Minguez, A. & Cowburn, R. F. (2001). Apolipoprotein E: a major piece in the Alzheimer's disease puzzle. *J Cell Mol Med* 5, 254-266.

- Chao, S. H., Greenleaf, A. L. & Price, D. H. (2001). Juglone, an inhibitor of the peptidyl-prolyl isomerase Pin1, also directly blocks transcription. *Nucleic Acids Res* 29, 767-773.
- Chirita, C. N., Necula, M. & Kuret, J. (2003). Anionic micelles and vesicles induce tau fibrillization in vitro. *J Biol Chem* 278, 25644-50.
- Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., Kholodenko, D., Motter, R., Sherrington, R., Perry, B., Yao, H., Strome, R., Lieberburg, I., Rommens, J., Kim, S., Schenk, D., Fraser, P., St George Hyslop, P. & Selkoe, D. J. (1997). Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med* 3, 67-72.
- Chirita, C. N., Congdon, E. E., Yin, H. & Kuret, J. (2005). Triggers of full-length tau aggregation: a role for partially folded intermediates. *Biochemistry* 44, 5862-5872.
- 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, 187-193.
- Clark, L. N., Poorkaj, P., Wszolek, Z., Geschwind, D. H., Nasreddine, Z. S., Miller, B., Li, D., Payami, H., Awert, F., Markopoulou, K., Andreadis, A., D'souza, I., Lee, V. M., Reed, L., Trojanowski, J. Q., Zhukareva, V., Bird, T., Schellenberg, G. & Wilhelmsen, K. C. (1998). Pathogenic implications of mutations in the tau gene in pallido-ponto-nigral degeneration and related neurodegenerative disorders linked to chromosome 17. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13103-13107.
- Clarris, H. J., Cappai, R., Heffernan, D., Beyreuther, K., Masters, C. L. & Small, D. H. (1997). Identification of heparin-binding domains in the amyloid precursor protein of Alzheimer's disease by deletion mutagenesis and peptide mapping. *J Neurochem* 68, 1164-1172.
- 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, 227-247.
- 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, 207-225.
- Cohen, P. & Cohen, P. T. (1989). Protein phosphatases come of age. *J Biol Chem* 264, 21435-21438.
- Conway, K. A., Rochet, J. C., Bieganski, R. M. & Lansbury, P. T., Jr. (2001). Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct. *Science* 294, 1346-1349.
- 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, 15721-15728.
- 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, 4378-4381.
- Cras, P., Smith, M. A., Richey, P. L., Siedlak, S. L., Mulvihill, P. & Perry, G. (1995). Extracellular neurofibrillary tangles reflect neuronal loss and provide further evidence of extensive protein cross-linking in Alzheimer disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 89, 291-295.
- Cripps, D., Thomas, S. N., Jeng, Y., Yang, F., Davies, P. & Yang, A. J. (2006). Alzheimer disease-specific conformation of hyperphosphorylated paired helical filament-Tau is polyubiquitinated through Lys-48, Lys-11, and Lys-6 ubiquitin conjugation. *J Biol Chem* 281, 10825-10838.
- Crowther, R. A., Olesen, O. F., Jakes, R. & Goedert, M. (1992). The microtubule binding repeats of tau protein assemble into filaments like those found in Alzheimer's disease. *FEBS Lett* 309, 199-202.
- Crowther, R. A., Olesen, O. F., Smith, M. J., Jakes, R. & Goedert, M. (1994). Assembly of Alzheimer-like filaments from full-length tau protein. *FEBS Lett* 337, 135-138.

- Cruts, M. & Van Broeckhoven, C. (1998). Presenilin mutations in Alzheimer's disease. *Hum Mutat* 11, 183-190.
- Cruz, J. C., Tseng, H. C., Goldman, J. A., Shih, H. & Tsai, L. H. (2003). Aberrant Cdk5 activation by p25 triggers pathological events leading to neurodegeneration and neurofibrillary tangles. *Neuron* 40, 471-483.
- Cuervo, A. M., Bergamini, E., Brunk, U. T., Droge, W., Ffrench, M. & Terman, A. (2005). Autophagy and aging: the importance of maintaining "clean" cells. *Autophagy* 1, 131-140.
- Cummings, J. L. (2004). Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 351, 56-67.
- D'Souza, I., Yu, C. E. & Mcmilan, P. (2006). A natural antisense gene regulates MAPT expression. *Alzheimer Dementia* 2, S29.
- Dallner, G. & Sindelar, P. J. (2000). Regulation of ubiquinone metabolism. *Free Radic Biol Med* 29, 285-294.
- Damasio, A. R. (1989). Time-locked multiregional retroactivation: a systems-level proposal for the neural substrates of recall and recognition. *Cognition* 33, 25-62.
- Daniels, M. (1975). The role of microtubules in the growth and stabilization of nerve fibers. *Ann N Y Acad Sci* 253, 535-544.
- De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Schrijvers, V., Wolfe, M. S., Ray, W. J., Goate, A. & Kopan, R. (1999). A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398, 518-522.
- De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., Von Figura, K. & Van Leuven, F. (1998). Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 391, 387-390.
- Delacourte, A., David, J. P., Sergeant, N., Buee, L., Wattez, A., Vermersch, P., Ghazali, 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, 1158-1165.
- Delacourte, A. & Defossez, A. (1986). Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *J Neurol Sci* 76, 173-186.
- De Leo, M. E., Borrello, S., Passantino, M., Palazzotti, B., Mordente, A., Daniele, A., Filippini, V., Galeotti, T. & Masullo, C. (1998). Oxidative stress and overexpression of manganese superoxide dismutase in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 250, 173-176.
- Delobel, P., Mailliot, C., Hamdane, M., Sambo, A. V., Begard, S., Violleau, A., Delacourte, A. & Buee, L. (2003). Stable-tau overexpression in human neuroblastoma cells: an open door for explaining neuronal death in tauopathies. *Ann N Y Acad Sci* 1010, 623-634.
- Del Olmo, N., Bustamante, J., Del Rio, R. M. & Solis, J. M. (2000). Taurine activates GABA(A) but not GABA(B) receptors in rat hippocampal CA1 area. *Brain Res* 864, 298-307.
- Dewitt, D. A., Silver, J., Canning, D. R. & Perry, G. (1993). Chondroitin sulfate proteoglycans are associated with the lesions of Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 121, 149-152.
- Di Maria, E., Tabaton, M., Vigo, T., Abbruzzese, G., Bellone, E., Donati, C., Frasson, E., Marchese, R., Montagna, P., Munoz, D. G., Pramstaller, P. P., Zanusso, G., Ajmar, F. & Mandich, P. (2000). Corticobasal degeneration shares a common genetic background with progressive supranuclear palsy. *Ann Neurol* 47, 374-377.

- Dickey, C. A., Yue, M., Lin, W. L., Dickson, D. W., Dunmore, J. H., Lee, W. C., Zehr, C., West, G., Cao, S., Clark, A. M., Caldwell, G. A., Caldwell, K. A., Eckman, C., Patterson, C., Hutton, M. & Petrucelli, L. (2006). Deletion of the ubiquitin ligase CHIP leads to the accumulation, but not the aggregation, of both endogenous phospho- and caspase-3-cleaved tau species. *J Neurosci* 26, 6985-6996.
- 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.
- Drewes, G., Ebner, A., Preuss, U., Mandelkow, E. M. & Mandelkow, E. (1997). MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* 89, 297-308.
- Drubin, D. G. & Kirschner, M. W. (1986). Tau protein function in living cells. *J Cell Biol* 103, 2739-2746.
- D'souza, I., Poorkaj, P., Hong, M., Nochlin, D., Lee, V. M., Bird, T. D. & Schellenberg, G. D. (1999). Missense and silent tau gene mutations cause frontotemporal dementia with parkinsonism-chromosome 17 type, by affecting multiple alternative RNA splicing regulatory elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5598-5603.
- D'souza, I. & Schellenberg, G. D. (2000). Determinants of 4-repeat tau expression. Coordination between enhancing and inhibitory splicing sequences for exon 10 inclusion. *J Biol Chem* 275, 17700-17709.
- D'souza, I. & Schellenberg, G. D. (2002). tau Exon 10 expression involves a bipartite intron 10 regulatory sequence and weak 5' and 3' splice sites. *J Biol Chem* 277, 26587-26599.
- Duda, J. E., Giasson, B. I., Mabon, M. E., Miller, D. C., Golbe, L. I., Lee, V. M. & Trojanowski, J. Q. (2002). Concurrence of alpha-synuclein and tau brain pathology in the Contursi kindred. *Acta Neuropathol (Berl)* 104, 7-11.
- Dudek, S. M. & Johnson, G. V. (1993). Transglutaminase catalyzes the formation of sodium dodecyl sulfate-insoluble, Alz-50-reactive polymers of tau. *J Neurochem* 61, 1159-1162.
- Duff, K., Eckman, C., Zehr, C., Yu, X., Prada, C. M., Perez-Tur, J., Hutton, M., Buee, L., Harigaya, Y., Yager, D., Morgan, D., Gordon, M. N., Holcomb, L., Refolo, L., Zenk, B., Hardy, J. & Younkin, S. (1996). Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* 383, 710-713.
- Duff, K., Knight, H., Refolo, L. M., Sanders, S., Yu, X., Picciano, M., Malester, B., Hutton, M., Adamson, J., Goedert, M., Burki, K. & Davies, P. (2000). Characterization of pathology in transgenic mice over-expressing human genomic and cDNA tau transgenes. *Neurobiol Dis* 7, 87-98.
- Duff, K. & Planel, E. (2005). Untangling memory deficits. *Nat Med* 11, 826-827.
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D. & Naldini, L. (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72, 8463-8471.
- Eble, A. S., Thorpe, S. R. & Baynes, J. W. (1983). Nonenzymatic glycosylation and glucose-dependent cross-linking of protein. *J Biol Chem* 258, 9406-9412.
- Eldar-Finkelman, H. (2002). Glycogen synthase kinase 3: an emerging therapeutic target. *Trends Mol Med* 8, 126-132.
- 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.
- Engel, T., Goni-Oliver, P., Lucas, J. J., Avila, J. & Hernandez, F. (2006c). Chronic lithium administration to FTDP-17 tau and GSK-3beta overexpressing mice prevents tau hyperphosphorylation and neurofibrillary tangle formation, but pre-formed neurofibrillary tangles do not revert. *J Neurochem* 99, 1445-55.
- Escobar-Khondiker, M., Hollerhage, M., Muriel, M. P., Champy, P., Bach, A., Depienne, C., Respondek, G., Yamada, E. S., Lannuzel, A., Yagi, T., Hirsch, E. C., Oertel, W. H., Jacob, R., Michel, P. P., Ruberg, M. & Hoglinger, G. U. (2007). Annonacin, a natural mitochondrial complex I inhibitor, causes tau pathology in cultured neurons. *J Neurosci* 27, 7827-7837.
- Esposito, E., Rotilio, D., Di Matteo, V., Di Giulio, C., Cacchio, M. & Algeri, S. (2002). A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. *Neurobiol Aging* 23, 719-735.
- Evans, L., Mitchison, T. & Kirschner, M. (1985). Influence of the centrosome on the structure of nucleated microtubules. *J Cell Biol* 100, 1185-1191.
- Evans, W., Fung, H. C., Steele, J., Eerola, J., Tienari, P., Pittman, A., Silva, R., Myers, A., Vrieze, F. W., Singleton, A. & Hardy, J. (2004). The tau H2 haplotype is almost exclusively Caucasian in origin. *Neurosci Lett* 369, 183-185.
- Fath, T., Eidenmuller, J. & Brandt, R. (2002). Tau-mediated cytotoxicity in a pseudohyperphosphorylation model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 22, 9733-9741.
- Fellous, A., Francon, J., Lennon, A. M. & Nunez, J. (1977). Microtubule assembly in vitro. Purification of assembly-promoting factors. *Eur J Biochem* 78, 167-174.
- Feng, W., Liu, G., Xia, R., Abramson, J. J. & Pessah, I. N. (1999). Site-selective modification of hyperreactive cysteines of ryanodine receptor complex by quinones. *Mol Pharmacol* 55, 821-831.
- Ferrari, A., Hoerndli, F., Baechi, T., Nitsch, R. M. & Gotz, J. (2003). beta-Amyloid induces paired helical filament-like tau filaments in tissue culture. *J Biol Chem* 278, 40162-40168.
- Ferrer, I., Blanco, R., Carmona, M. & Puig, B. (2001). Phosphorylated mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK-P), protein kinase of 38 kDa (p38-P), stress-activated protein kinase (SAPK/JNK-P), and calcium/calmodulin-dependent kinase II (CaM kinase II) are differentially expressed in tau deposits in neurons and glial cells in tauopathies. *J Neural Transm* 108, 1397-1415.
- Finkelstein, E. I., Nardini, M. & Van Der Vliet, A. (2001). Inhibition of neutrophil apoptosis by acrolein: a mechanism of tobacco-related lung disease? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281, L732-739.
- Fischer, O. (1907). Miliare Nekrosen mit drusigen Wucherungen der Neurofibrillen, eine regelmässige Veränderung der Hirnrinde bei seniler Demenz. *Monatsschr Psychiat Neurol* 22, 361-372.
- Fleming, L. M. & Johnson, G. V. (1995). Modulation of the phosphorylation state of tau in situ: the roles of calcium and cyclic AMP. *Biochem J* 309 ( Pt 1), 41-47.
- Forloni, G. (1993). beta-Amyloid neurotoxicity. *Funct Neurol* 8, 211-225.
- Foster, N. L., Wilhelmsen, K., Sima, A. A., Jones, M. Z., D'amato, C. J. & Gilman, S. (1997). Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17: a consensus conference. Conference Participants. *Ann Neurol* 41, 706-715.



- Fraser, P. E., Nguyen, J. T., Chin, D. T. & Kirschner, D. A. (1992). Effects of sulfate ions on Alzheimer beta/A4 peptide assemblies: implications for amyloid fibril-proteoglycan interactions. *J Neurochem* 59, 1531-1540.
- Frears, E. R., Stephens, D. J., Walters, C. E., Davies, H. & Austen, B. M. (1999). The role of cholesterol in the biosynthesis of beta-amyloid. *Neuroreport* 10, 1699-1705.
- Friedhoff, P., Schneider, A., Mandelkow, E. M. & Mandelkow, E. (1998). Rapid assembly of Alzheimer-like paired helical filaments from microtubule-associated protein tau monitored by fluorescence in solution. *Biochemistry* 37, 10223-10230.
- Fukutani, Y., Kobayashi, K., Nakamura, I., Watanabe, K., Isaki, K. & Cairns, N. J. (1995). Neurons, intracellular and extracellular neurofibrillary tangles in subdivisions of the hippocampal cortex in normal ageing and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 200, 57-60.
- Fulga, T. A., Elson-Schwab, I., Khurana, V., Steinhilb, M. L., Spires, T. L., Hyman, B. T. & Feany, M. B. (2007). Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo. *Nat Cell Biol* 9, 139-148.
- Galloway, P. G., Perry, G., Kosik, K. S. & Gambetti, P. (1987). Hirano bodies contain tau protein. *Brain Res* 403, 337-340.
- Galloway, P. G., Bergeron, C. & Perry, G. (1989). The presence of tau distinguishes Lewy bodies of diffuse Lewy body disease from those of idiopathic Parkinson disease. *Neurosci Lett* 100, 6-10.
- Gamblin, T. C., King, M. E., Kuret, J., Berry, R. W. & Binder, L. I. (2000). Oxidative regulation of fatty acid-induced tau polymerization. *Biochemistry* 39, 14203-14210.
- Gamblin, T. C., Berry, R. W. & Binder, L. I. (2003a). Modeling tau polymerization in vitro: a review and synthesis. *Biochemistry* 42, 15009-15017.
- Gamblin, T. C., Chen, F., Zambrano, A., Abraha, A., Lagalwar, S., Guillozet, A. L., Lu, M., Fu, Y., Garcia-Sierra, F., Lapointe, N., Miller, R., Berry, R. W., Binder, L. I. & Cryns, V. L. (2003b). Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10032-10037.
- Gamblin, T. C., Berry, R. W. & Binder, L. I. (2003c). Tau polymerization: role of the amino terminus. *Biochemistry* 42, 2252-7.
- Gamblin, T. C. (2005). Potential structure/function relationships of predicted secondary structural elements of tau. *Biochim Biophys Acta* 1739, 140-149.
- Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., Blackwell, C., Carr, T., Clemens, J., Donaldson, T., Gillespie, F. & Et Al. (1995). Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* 373, 523-527.
- Gaskin, F., Cantor, C. R. & Shelanski, M. L. (1974). Turbidimetric studies of the in vitro assembly and disassembly of porcine neurotubules. *J Mol Biol* 89, 737-755.
- Gaskin, F., Cantor, C. R. & Shelanski, M. L. (1975). Biochemical studies on the in vitro assembly and disassembly of microtubules. *Ann N Y Acad Sci* 253, 133-146.
- Gervais, F. (2004). Glycosaminoglycans mimetics: Potential to modify underlying disease process in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 25S1, S11-S12.
- Gervais, F., Chalifour, R., Garceau, D., Kong, X., Laurin, J., McLaughlin, R., Morissette, C. & Paquette, J. (2001). Glycosaminoglycan mimetics: a therapeutic approach to cerebral amyloid angiopathy. *Amyloid* 8 Suppl 1, 28-35.

- Gervais, F., Paquette, J., Morissette, C., Krzywkowski, P., Yu, M., Azzi, M., Lacombe, D., Kong, X., Aman, A., Laurin, J., Szarek, W. A. & Tremblay, P. (2007). Targeting soluble Abeta peptide with Tramiprosate for the treatment of brain amyloidosis. *Neurobiol Aging* 28, 537-547.
- Giasson, B. I., Forman, M. S., Higuchi, M., Golbe, L. I., Graves, C. L., Kotzbauer, P. T., Trojanowski, J. Q. & Lee, V. M. (2003). Initiation and synergistic fibrillization of tau and alpha-synuclein. *Science* 300, 636-640.
- Gibson, P. H. & Tomlinson, B. E. (1977). Numbers of Hirano bodies in the hippocampus of normal and demented people with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 33, 199-206.
- Giovannini, M. G., Scali, C., Prosperi, C., Bellucci, A., Vannucchi, M. G., Rosi, S., Pepeu, G. & Casamenti, F. (2002). Beta-amyloid-induced inflammation and cholinergic hypofunction in the rat brain in vivo: involvement of the p38MAPK pathway. *Neurobiol Dis* 11, 257-274.
- Glatz, D. C., Rujescu, D., Tang, Y., Berendt, F. J., Hartmann, A. M., Faltraco, F., Rosenberg, C., Huette, C., Jellinger, K., Hampel, H., Riederer, P., Moller, H. J., Andreadis, A., Henkel, K. & Stamm, S. (2006). The alternative splicing of tau exon 10 and its regulatory proteins CLK2 and TRA2-BETA1 changes in sporadic Alzheimer's disease. *J Neurochem* 96, 635-644.
- Goedert, M. & Ghetti, B. (2007). Alois Alzheimer: his life and times. *Brain Pathol* 17, 57-62.
- Goedert, M., Jakes, R., Spillantini, M. G., Hasegawa, M., Smith, M. J. & Crowther, R. A. (1996). Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature* 383, 550-553.
- 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, 4225-4230.
- Goedert, M., Jakes, R., Qi, Z., Wang, J. H. & Cohen, P. (1995). Protein phosphatase 2A is the major enzyme in brain that dephosphorylates tau protein phosphorylated by proline-directed protein kinases or cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Neurochem* 65, 2804-2807.
- Goedert, M., Satumtira, 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, 2155-2162.
- Goedert, M., Spillantini, M. G. & Crowther, R. A. (1992). Cloning of a big tau microtubule-associated protein characteristic of the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 1983-1987.
- 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, 519-526.
- 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, 393-399.
- 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, 4051-4055.
- Gomez-Isla, T., Growdon, W. B., Mcnamara, M. J., Nochlin, D., Bird, T. D., Arango, J. C., Lopera, F., Kosik, K. S., Lantos, P. L., Cairns, N. J. & Hyman, B. T. (1999). The impact of different presenilin 1 and presenilin 2 mutations on amyloid deposition, neurofibrillary changes and

- neuronal loss in the familial Alzheimer's disease brain: evidence for other phenotype-modifying factors. *Brain* 122 ( Pt 9), 1709-1719.
- 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.
- 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, 5535-5544.
- 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, 353-365.
- 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, 163-175.
- Goryunov, D. & Liem, R. K. (2007). CHIP-ping away at tau. *J Clin Invest* 117, 590-592.
- Goto, S., Yamamoto, H., Fukunaga, K., Iwasa, T., Matsukado, Y. & Miyamoto, E. (1985). Dephosphorylation of microtubule-associated protein 2, tau factor, and tubulin by calcineurin. *J Neurochem* 45, 276-283.
- Gotz, J., Chen, F., Barmettler, R. & Nitsch, R. M. (2001). Tau filament formation in transgenic mice expressing P301L tau. *J Biol Chem* 276, 529-534.
- Gotz, J., Deters, N., Doldissen, A., Bokhari, L., Ke, Y., Wiesner, A., Schonrock, N. & Ittner, L. M. (2007). A decade of tau transgenic animal models and beyond. *Brain Pathol* 17, 91-103.
- Graeber, M. B., Kosel, S., Egensperger, R., Banati, R. B., Muller, U., Bise, K., Hoff, P., Moller, H. J., Fujisawa, K. & Mehraein, P. (1997). Rediscovery of the case described by Alois Alzheimer in 1911: historical, histological and molecular genetic analysis. *Neurogenetics* 1, 73-80.
- Graeber, M. B., Kosel, S., Grasbon-Frodl, E., Moller, H. J. & Mehraein, P. (1998). Histopathology and APOE genotype of the first Alzheimer disease patient, Auguste D. *Neurogenetics* 1, 223-228.
- Greenberg, S. G. & Davies, P. (1990). A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5827-5831.
- Greenwood, J. A., Scott, C. W., Spreen, R. C., Caputo, C. B. & Johnson, G. V. (1994). Casein kinase II preferentially phosphorylates human tau isoforms containing an amino-terminal insert. Identification of threonine 39 as the primary phosphate acceptor. *J Biol Chem* 269, 4373-4380.
- Grover, A., Houlden, H., Baker, M., Adamson, J., Lewis, J., Prihar, G., Pickering-Brown, S., Duff, K. & Hutton, M. (1999). 5' splice site mutations in tau associated with the inherited dementia FTDP-17 affect a stem-loop structure that regulates alternative splicing of exon 10. *J Biol Chem* 274, 15134-15143.
- 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, 6084-6089.
- 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, 4913-4917.

- Grune, T., Jung, T., Merker, K. & Davies, K. J. (2004). Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and 'aggresomes' during oxidative stress, aging, and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 2519-2530.
- Guidotti, A., Badiani, G. & Pepeu, G. (1972). Taurine distribution in cat brain. *J Neurochem* 19, 431-435.
- Guo, Q., Corbett, J. T., Yue, G., Fann, Y. C., Qian, S. Y., Tomer, K. B. & Mason, R. P. (2002). Electron spin resonance investigation of semiquinone radicals formed from the reaction of ubiquinone 0 with human oxyhemoglobin. *J Biol Chem* 277, 6104-6110.
- Gupta-Bansal, R., Frederickson, R. C. & Brunden, K. R. (1995). Proteoglycan-mediated inhibition of A beta proteolysis. A potential cause of senile plaque accumulation. *J Biol Chem* 270, 18666-18671.
- Hall, G. F., Chu, B., Lee, G. & Yao, J. (2000). Human tau filaments induce microtubule and synapse loss in an in vivo model of neurofibrillary degenerative disease. *J Cell Sci* 113 ( Pt 8), 1373-1387.
- Hall, G. F., Lee, V. M., Lee, G. & Yao, J. (2001). Staging of neurofibrillary degeneration caused by human tau overexpression in a unique cellular model of human tauopathy. *Am J Pathol* 158, 235-46.
- Hall, G. F., Yao, J. & Lee, G. (1997). Human tau becomes phosphorylated and forms filamentous deposits when overexpressed in lamprey central neurons in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4733-4738.
- Halliwell, B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59, 1609-1623.
- Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 97, 1634-1658.
- Hardy, J. & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353-356.
- Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11, 298-300.
- Hasegawa, M., Smith, M. J., Iijima, M., Tabira, T. & Goedert, M. (1999). FTDP-17 mutations N279K and S305N in tau produce increased splicing of exon 10. *FEBS Lett* 443, 93-96.
- Hasegawa, T., Matsuzaki, M., Takeda, A., Kikuchi, A., Akita, H., Perry, G., Smith, M. A. & Itoyama, Y. (2004). Accelerated alpha-synuclein aggregation after differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Brain Res* 1013, 51-59.
- Hempen, B. & Brion, J. P. (1996). Reduction of acetylated alpha-tubulin immunoreactivity in neurofibrillary tangle-bearing neurons in Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 55, 964-72.
- Hensley, K., Floyd, R. A., Zheng, N. Y., Nael, R., Robinson, K. A., Nguyen, X., Pye, Q. N., Stewart, C. A., Geddes, J., Markesbery, W. R., Patel, E., Johnson, G. V. & Bing, G. (1999). p38 kinase is activated in the Alzheimer's disease brain. *J Neurochem* 72, 2053-2058.
- Hernandez, F., Perez, M., Lucas, J.J. & 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., Cuadros, R. & Avila, J. (2004a). Zeta 14-3-3 protein favours the formation of human tau fibrillar polymers. *Neurosci Lett* 357, 143-146.
- Hernandez, F., Diaz-Hernandez, M., Avila, J. & Lucas, J. J. (2004b). Testing the ubiquitin-proteasome hypothesis of neurodegeneration in vivo. *Trends Neurosci* 27, 66-69.

- Hernandez, F., Perez, M., Lucas, J. J., Mata, A. M., Bhat, R. & Avila, J. (2004c). 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.
- Heutink, P. (2000). Untangling tau-related dementia. *Hum Mol Genet* 9, 979-986.
- Himmler, A. (1989). Structure of the bovine tau gene: alternatively spliced transcripts generate a protein family. *Mol Cell Biol* 9, 1389-1396.
- Himmler, A., Drechsel, D., Kirschner, M. W. & Martin, D. W., Jr. (1989). Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Mol Cell Biol* 9, 1381-1388.
- Hirai, K., Aliev, G., Nunomura, A., Fujioka, H., Russell, R. L., Atwood, C. S., Johnson, A. B., Kress, Y., Vinters, H. V., Tabaton, M., Shimohama, S., Cash, A. D., Siedlak, S. L., Harris, P. L., Jones, P. K., Petersen, R. B., Perry, G. & Smith, M. A. (2001). Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21, 3017-3023.
- Hirano, A. (1994). Hirano bodies and related neuronal inclusions. *Neuropathol Appl Neurobiol* 20, 3-11.
- 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, 167-182.
- Hiraoka, S., Yao, T. M., Minoura, K., Tomoo, K., Sumida, M., Taniguchi, T. & Ishida, T. (2004). Conformational transition state is responsible for assembly of microtubule-binding domain of tau protein. *Biochem Biophys Res Commun* 315, 659-663.
- Hobart, L. J., Seibel, I., Yeargans, G. S. & Seidler, N. W. (2004). Anti-crosslinking properties of carnosine: significance of histidine. *Life Sci* 75, 1379-1389.
- Hoglinger, G. U., Lannuzel, A., Khondiker, M. E., Michel, P. P., Duyckaerts, C., Feger, J., Champy, P., Prigent, A., Medja, F., Lombes, A., Oertel, W. H., Ruberg, M. & Hirsch, E. C. (2005). The mitochondrial complex I inhibitor rotenone triggers a cerebral tauopathy. *J Neurochem* 95, 930-939.
- Honson, N. S., Jensen, J. R., Darby, M. V. & Kuret, J. (2007). Potent inhibition of tau fibrillization with a multivalent ligand. *Biochem Biophys Res Commun* 363, 229-234.
- Hoshi, M., Sato, M., Matsumoto, S., Noguchi, A., Yasutake, K., Yoshida, N. & Sato, K. (2003). Spherical aggregates of beta-amyloid (amylospheroid) show high neurotoxicity and activate tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6370-6375.
- Hosoi, T., Uchiyama, M., Okumura, E., Saito, T., Ishiguro, K., Uchida, T., Okuyama, A., Kishimoto, T. & Hisanaga, S. (1995). Evidence for cdk5 as a major activity phosphorylating tau protein in porcine brain extract. *J Biochem (Tokyo)* 117, 741-749.
- Houlden, H., Baker, M., Morris, H. R., Macdonald, N., Pickering-Brown, S., Adamson, J., Lees, A. J., Rossor, M. N., Quinn, N. P., Kertesz, A., Khan, M. N., Hardy, J., Lantos, P. L., St George-Hyslop, P., Munoz, D. G., Mann, D., Lang, A. E., Bergeron, C., Bigio, E. H., Litvan, I., Bhatia, K. P., Dickson, D., Wood, N. W. & Hutton, M. (2001). Corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy share a common tau haplotype. *Neurology* 56, 1702-1706.
- Howland, D. S., Trusko, S. P., Savage, M. J., Reaume, A. G., Lang, D. M., Hirsch, J. D., Maeda, N., Siman, R., Greenberg, B. D., Scott, R. W. & Flood, D. G. (1998). Modulation of secreted beta-amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide in brain by cholesterol. *J Biol Chem* 273, 16576-16582.

- Hsia, A. Y., Masliah, E., Mcconlogue, L., Yu, G. Q., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Malenka, R. C., Nicoll, R. A. & Mucke, L. (1999). Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3228-3233.
- 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, 702-705.
- Huxtable, R. J. (1989). Taurine in the central nervous system and the mammalian actions of taurine. *Prog Neurobiol* 32, 471-533.
- Ihara, Y., Nukina, N., Miura, R. & Ogawara, M. (1986). Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J Biochem (Tokyo)* 99, 1807-1810.
- Ingebritsen, T. S. & Cohen, P. (1983). Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science* 221, 331-338.
- Irons, R. D. (1985). Quinones as toxic metabolites of benzene. *J Toxicol Environ Health* 16, 673-678.
- 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.
- Ishiguro, K. (1997). Tau protein kinases. In *Brain Microtubule Associated Proteins* (ed. J. Avila, R. Brandt and K. S. Kosik), pp. 73-79. Switzerland: Harwood Academic.
- Ishiguro, K., Takamatsu, M., Tomizawa, K., Omori, A., Takahashi, M., Arioka, M., Uchida, T. & Imahori, K. (1992). Tau protein kinase I converts normal tau protein into A68-like component of paired helical filaments. *J Biol Chem* 267, 10897-10901.
- 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.
- James, A. M., Cocheme, H. M., Smith, R. A. & Murphy, M. P. (2005). Interactions of mitochondria-targeted and untargeted ubiquinones with the mitochondrial respiratory chain and reactive oxygen species. Implications for the use of exogenous ubiquinones as therapies and experimental tools. *J Biol Chem* 280, 21295-21312.
- Jenkins, S. M. & Johnson, G. V. (1998). Tau complexes with phospholipase C-gamma in situ. *Neuroreport* 9, 67-71.
- Jenkins, S. M., Zinnerman, M., Garner, C. & Johnson, G. V. (2000). Modulation of tau phosphorylation and intracellular localization by cellular stress. *Biochem J* 345 Pt 2, 263-270.
- 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, 25481-25489.
- Jiang, Z., Tang, H., Havlioglu, N., Zhang, X., Stamm, S., Yan, R. & Wu, J. Y. (2003). Mutations in tau gene exon 10 associated with FTDP-17 alter the activity of an exonic splicing enhancer to interact with Tra2 beta. *J Biol Chem* 278, 18997-19007.

- 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.
- Kalb, V. F., Jr. & Bernlohr, R. W. (1977). A new spectrophotometric assay for protein in cell extracts. *Anal Biochem* 82, 362-371.
- Kampers, T., Friedhoff, P., Biernat, J., Mandelkow, E. M. & Mandelkow, E. (1996). RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments. *FEBS Lett* 399, 344-349.
- Karolak, L., Chandra, A., Khan, W., Marks, B., Petros, W. P., Peters, W. P., Greenberg, C. S. & Hannun, Y. A. (1993). High-dose chemotherapy-induced platelet defect: inhibition of platelet signal transduction pathways. *Mol Pharmacol* 43, 37-44.
- Karsten, S. L., Sang, T. K., Gehman, L. T., Chatterjee, S., Liu, J., Lawless, G. M., Sengupta, S., Berry, R. W., Pomakian, J., Oh, H. S., Schulz, C., Hui, K. S., Wiedau-Pazos, M., Vinters, H. V., Binder, L. I., Geschwind, D. H. & Jackson, G. R. (2006). A genomic screen for modifiers of tauopathy identifies puromycin-sensitive aminopeptidase as an inhibitor of tau-induced neurodegeneration. *Neuron* 51, 549-560.
- Keck, S., Nitsch, R., Grune, T. & Ullrich, O. (2003). Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brains of patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem* 85, 115-122.
- Kehoe, P., Wavrant-De Vrieze, F., Crook, R., Wu, W. S., Holmans, P., Fenton, I., Spurlock, G., Norton, N., Williams, H., Williams, N., Lovestone, S., Perez-Tur, J., Hutton, M., Chartier-Harlin, M. C., Shears, S., Roehl, K., Booth, J., Van Voorst, W., Ramic, D., Williams, J., Goate, A., Hardy, J. & Owen, M. J. (1999). A full genome scan for late onset Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 8, 237-245.
- Keller, J. N., Hanni, K. B. & Markesbery, W. R. (2000). Impaired proteasome function in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 75, 436-439.
- Kenessey, A., Nacharaju, P., Ko, L. W. & Yen, S. H. (1997). Degradation of tau by lysosomal enzyme cathepsin D: implication for Alzheimer neurofibrillary degeneration. *J Neurochem* 69, 2026-2038.
- Kenyon, C. (2001). A conserved regulatory system for aging. *Cell* 105, 165-168.
- Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A. & Tabtiang, R. (1993). A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366, 461-464.
- Kerokoski, P., Suuronen, T., Salminen, A., Soininen, H. & Pirttila, T. (2002). Cleavage of the cyclin-dependent kinase 5 activator p35 to p25 does not induce tau hyperphosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 298, 693-698.
- Khan, F. H., Sen, T., Maiti, A. K., Jana, S., Chatterjee, U. & Chakrabarti, S. (2005). Inhibition of rat brain mitochondrial electron transport chain activity by dopamine oxidation products during extended in vitro incubation: implications for Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1741, 65-74.
- Khatoon, S., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. (1995). Guanosine triphosphate binding to beta-subunit of tubulin in Alzheimer's disease brain: role of microtubule-associated protein tau. *J Neurochem* 64, 777-787.
- Khlistunova, I., Biernat, J., Wang, Y., Pickhardt, M., Von Bergen, M., Gazova, Z., Mandelkow, E. & Mandelkow, E. M. (2006). Inducible expression of Tau repeat domain in cell models of tauopathy: aggregation is toxic to cells but can be reversed by inhibitor drugs. *J Biol Chem* 281, 1205-1214.
- Kidd, M. (1963). Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* 197, 192-193.

- Kidd, M. (1964). Alzheimer's Disease, an Electron Microscopical Study. *Brain* 87, 307-320.
- Kim, S. K. (2007). Cell biology. Proteins that promote long life. *Science* 317, 603-604.
- Kisielewski, W. E. (1969). Cerenkov radiation and liquid scintillation counting. ANL-7635. *ANL Rep*, 152-153.
- Kjellen, L. & Lindahl, U. (1991). Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem* 60, 443-475.
- Ko, L., Odawara, T. & Yen, S. H. (1997). Menadione-induced tau dephosphorylation in cultured human neuroblastoma cells. *Brain Res* 760, 118-128.
- Ko, L. W., Deture, M., Sahara, N., Chihab, R., Vega, I. E. & Yen, S. H. (2005). Recent advances in experimental modeling of the assembly of tau filaments. *Biochim Biophys Acta* 1739, 125-139.
- Ko, L. W., Deture, M., Sahara, N., Chihab, R. & Yen, S. H. (2002). Cellular models for tau filament assembly. *J Mol Neurosci* 19, 311-316.
- Kondoh, M., Usui, T., Nishikiori, T., Mayumi, T. & Osada, H. (1999). Apoptosis induction via microtubule disassembly by an antitumour compound, pironetin. *Biochem J* 340 ( Pt 2), 411-416.
- 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, 24374-24384.
- Kops, G. J., Dansen, T. B., Polderman, P. E., Saarloos, I., Wirtz, K. W., Coffey, P. J., Huang, T. T., Bos, J. L., Medema, R. H. & Burgering, B. M. (2002). Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* 419, 316-321.
- Kosik, K. S., Duffy, L. K., Dowling, M. M., Abraham, C., Mccluskey, A. & Selkoe, D. J. (1984). Microtubule-associated protein 2: monoclonal antibodies demonstrate the selective incorporation of certain epitopes into Alzheimer neurofibrillary tangles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 7941-7945.
- 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, 4044-4048.
- Kosik, K. S. & Shimura, H. (2005). Phosphorylated tau and the neurodegenerative foldopathies. *Biochim Biophys Acta* 1739, 298-310.
- Kowall, N. W. & Beal, M. F. (1991). Glutamate-, glutaminase-, and taurine-immunoreactive neurons develop neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 29, 162-167.
- Kraepelin, E. (1910). *Psychiatrie. Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte*, 8. Auflage, Band II: Klinische Psychiatrie (ed. B. Verlag), Leipzig.
- Kunjithapatham, R., Oliva, F. Y., Doshi, U., Perez, M., Avila, J. & Munoz, V. (2005). Role for the alpha-helix in aberrant protein aggregation. *Biochemistry* 44, 149-156.
- Kurz, T., Terman, A. & Brunk, U. T. (2007). Autophagy, ageing and apoptosis: the role of oxidative stress and lysosomal iron. *Arch Biochem Biophys* 462, 220-230.
- Kwok, J. B., Teber, E. T., Loy, C., Hallupp, M., Nicholson, G., Mellick, G. D., Buchanan, D. D., Silburn, P. A. & Schofield, P. R. (2004). Tau haplotypes regulate transcription and are associated with Parkinson's disease. *Ann Neurol* 55, 329-334.



- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Landino, L. M., Hasan, R., McGaw, A., Cooley, S., Smith, A. W., Masselam, K. & Kim, G. (2002). Peroxynitrite oxidation of tubulin sulfhydryls inhibits microtubule polymerization. *Arch Biochem Biophys* 398, 213-20.
- Langui, D., Probst, A., Anderton, B., Brion, J. P. & Ulrich, J. (1990). Aluminium-induced tangles in cultured rat neurones. Enhanced effect of aluminium by addition of maltol. *Acta Neuropathol (Berl)* 80, 649-655.
- Larsen, P. L. & Clarke, C. F. (2002). Extension of life-span in *Caenorhabditis elegans* by a diet lacking coenzyme Q. *Science* 295, 120-123.
- Lavoie, M. J. & Hastings, T. G. (1999). Dopamine quinone formation and protein modification associated with the striatal neurotoxicity of methamphetamine: evidence against a role for extracellular dopamine. *J Neurosci* 19, 1484-1491.
- Lavoie, M. J., Ostaszewski, B. L., Weihofen, A., Schlossmacher, M. G. & Selkoe, D. J. (2005). Dopamine covalently modifies and functionally inactivates parkin. *Nat Med* 11, 1214-1221.
- Ledesma, M. D., Bonay, P., Colaco, C. & Avila, J. (1994). Analysis of microtubule-associated protein tau glycation in paired helical filaments. *J Biol Chem* 269, 21614-21619.
- Ledesma, M. D., Correas, I., Avila, J. & Diaz-Nido, J. (1992). Implication of brain cdc2 and MAP2 kinases in the phosphorylation of tau protein in Alzheimer's disease. *FEBS Lett* 308, 218-224.
- Lee, G., Cowan, N. & Kirschner, M. (1988). The primary structure and heterogeneity of tau protein from mouse brain. *Science* 239, 285-288.
- Lee, V. M., Goedert, M. & Trojanowski, J. Q. (2001). Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci* 24, 1121-1159.
- Lefebvre, T., Ferreira, S., Dupont-Wallois, L., Bussiere, T., Dupire, M. J., Delacourte, A., Michalski, J. C. & Caillet-Boudin, M. L. (2003). Evidence of a balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation of Tau proteins--a role in nuclear localization. *Biochim Biophys Acta* 1619, 167-176.
- Levine, H., 3rd. (1993). Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci* 2, 404-410.
- Levy-Lahad, E. & Bird, T. D. (1996). Genetic factors in Alzheimer's disease: a review of recent advances. *Ann Neurol* 40, 829-840.
- Levy-Lahad, E., Wijsman, E. M., Nemens, E., Anderson, L., Goddard, K. A., Weber, J. L., Bird, T. D. & Schellenberg, G. D. (1995). A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science* 269, 970-973.
- Lewis, A., Ough, M., Li, L., Hinkhouse, M. M., Ritchie, J. M., Spitz, D. R. & Cullen, J. J. (2004). Treatment of pancreatic cancer cells with dicumarol induces cytotoxicity and oxidative stress. *Clin Cancer Res* 10, 4550-4558.
- 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.
- Linert, W. & Jameson, G. N. (2000). Redox reactions of neurotransmitters possibly involved in the progression of Parkinson's Disease. *J Inorg Biochem* 79, 319-326.

- Lippa, C. F., Zhukareva, V., Kawarai, T., Uryu, K., Shafiq, M., Nee, L. E., Grafman, J., Liang, Y., St George-Hyslop, P. H., Trojanowski, J. Q. & Lee, V. M. (2000). Frontotemporal dementia with novel tau pathology and a Glu342Val tau mutation. *Ann Neurol* 48, 850-858.
- Litersky, J. M., & Johnson, G. V. (1992). Phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase inhibits the degradation of tau by calpain. *J Biol Chem* 267, 1563-1568.
- Liu, M., Ni, J., Kosik, K. S. & Yeh, L. A. (2004). Development of a fluorescent high throughput assay for tau aggregation. *Assay Drug Dev Technol* 2, 609-619.
- Liu, R. M., Shi, M. M., Giulivi, C. & Forman, H. J. (1998). Quinones increase gamma-glutamyl transpeptidase expression by multiple mechanisms in rat lung epithelial cells. *Am J Physiol* 274, L330-336.
- Loetscher, H., Deuschle, U., Brockhaus, M., Reinhardt, D., Nelboeck, P., Mous, J., Grunberg, J., Haass, C. & Jacobsen, H. (1997). Presenilins are processed by caspase-type proteases. *J Biol Chem* 272, 20655-20659.
- Lomakin, A., Chung, D. S., Benedek, G. B., Kirschner, D. A. & Teplow, D. B. (1996). On the nucleation and growth of amyloid beta-protein fibrils: detection of nuclei and quantitation of rate constants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1125-1129.
- Lopez De La Paz, M. & Serrano, L. (2004). Sequence determinants of amyloid fibril formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 87-92.
- Lovell, M. A., Xie, C. & Markesbery, W. R. (2001). Acrolein is increased in Alzheimer's disease brain and is toxic to primary hippocampal cultures. *Neurobiol Aging* 22, 187-194.
- 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, 1145-1157.
- 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, 784-788.
- Lucas, J. J., Hernandez, F. & Avila, J. (1999). Nuclear localization of beta-catenin in adult mouse thalamus correlates with low levels of GSK-3beta. *Neuroreport* 10, 2699-2703.
- 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.
- Ludueno, R. F. (1979). Biochemistry of tubulin. *Microtubules* Roberts K, Hyams JS (eds), 65-116.
- Ludueno, R. F., Roach, M. C., Trcka, P. P., Little, M., Palanivelu, P., Binkley, P. & Prasad, V. (1982). beta 2-Tubulin, a form of chordate brain tubulin with lesser reactivity toward an assembly-inhibiting sulfhydryl-directed cross-linking reagent. *Biochemistry* 21, 4787-94.
- Luo, M. H., Tse, S. W., Memmott, J. & Andreadis, A. (2004). Novel isoforms of tau that lack the microtubule-binding domain. *J Neurochem* 90, 340-351.
- Maas, T., Eidenmuller, J. & Brandt, R. (2000). Interaction of tau with the neural membrane cortex is regulated by phosphorylation at sites that are modified in paired helical filaments. *J Biol Chem* 275, 15733-15740.
- Maccioni, R. B., Munoz, J. P. & Barbeito, L. (2001). The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch Med Res* 32, 367-381.
- Macdonald, M. J., Husain, R. D., Hoffmann-Benning, S. & Baker, T. R. (2004). Immunochemical identification of coenzyme Q0-dihydrolipoamide adducts in the E2 components of the alpha-

- ketoglutarate and pyruvate dehydrogenase complexes partially explains the cellular toxicity of coenzyme Q0. *J Biol Chem* 279, 27278-27285.
- Maciver, S. K. & Harrington, C. R. (1995). Two actin binding proteins, actin depolymerizing factor and cofilin, are associated with Hirano bodies. *Neuroreport* 6, 1985-1988.
- Maeda, S., Sahara, N., Saito, Y., Murayama, S., Ikai, A. & Takashima, A. (2006). Increased levels of granular tau oligomers: an early sign of brain aging and Alzheimer's disease. *Neurosci Res* 54, 197-201.
- Maeda, S., Sahara, N., Saito, Y., Murayama, M., Yoshiike, Y., Kim, H., Miyasaka, T., Murayama, S., Ikai, A. & Takashima, A. (2007). Granular tau oligomers as intermediates of tau filaments. *Biochemistry* 46, 3856-61.
- Makrides, V., Shen, T. E., Bhatia, R., Smith, B. L., Thimm, J., Lal, R. & Feinstein, S. C. (2003). Microtubule-dependent oligomerization of tau. Implications for physiological tau function and tauopathies. *J Biol Chem* 278, 33298-33304.
- Malchiodi-Albedi, F., Petrucci, T. C., Picconi, B., Iosi, F. & Falchi, M. (1997). Protein phosphatase inhibitors induce modification of synapse structure and tau hyperphosphorylation in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 48, 425-438.
- Malorni, W., Iosi, F., Mirabelli, F. & Bellomo, G. (1991). Cytoskeleton as a target in menadione-induced oxidative stress in cultured mammalian cells: alterations underlying surface bleb formation. *Chem Biol Interact* 80, 217-236.
- Margis, R. & Borojevic, R. (1989). Quantification of attached cells in tissue culture plates and on microcarriers. *Anal Biochem* 181, 209-211.
- Martin, C. P., Vazquez, J., Avila, J. & Moreno, F. J. (2002). P24, a glycogen synthase kinase 3 (GSK 3) inhibitor. *Biochim Biophys Acta* 1586, 113-122.
- Marx, J. (2007). Alzheimer's disease. A new take on tau. *Science* 316, 1416-1417.
- Mason, H. S. (1955). Reactions between Quinones and Proteins. *Nature* 175, 771-772.
- 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, 2757-2763.
- Mattson, M. P., Barger, S. W., Begley, J. G. & Mark, R. J. (1995). Calcium, free radicals, and excitotoxic neuronal death in primary cell culture. *Methods Cell Biol* 46, 187-216.
- Mattson, M. P., Fu, W., Waeg, G. & Uchida, K. (1997). 4-Hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, inhibits dephosphorylation of the microtubule-associated protein tau. *Neuroreport* 8, 2275-2281.
- Mattson, M. P. & Sherman, M. (2003). Perturbed signal transduction in neurodegenerative disorders involving aberrant protein aggregation. *Neuromolecular Med* 4, 109-132.
- Maurer, K., Volk, S. & Gerbaldo, H. (1997). Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet* 349, 1546-1549.
- Mazanetz, M. P. & Fischer, P. M. (2007). Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. *Nat Rev Drug Discov* 6, 464-479.
- Mazurkiewicz-Kwilecki, I. M. & Nsonwah, S. (1989). Changes in the regional brain histamine and histidine levels in postmortem brains of Alzheimer patients. *Can J Physiol Pharmacol* 67, 75-78.
- Mcgowan, E., Eriksen, J. & Hutton, M. (2006). A decade of modeling Alzheimer's disease in transgenic mice. *Trends Genet* 22, 281-289.

- Mclaurin, J., Franklin, T., Zhang, X., Deng, J. & Fraser, P. E. (1999). Interactions of Alzheimer amyloid-beta peptides with glycosaminoglycans effects on fibril nucleation and growth. *Eur J Biochem* 266, 1101-1110.
- Mclaurin, J. & Fraser, P. E. (2000). Effect of amino-acid substitutions on Alzheimer's amyloid-beta peptide-glycosaminoglycan interactions. *Eur J Biochem* 267, 6353-6361.
- Medina, M., Montejo De Garcini, E. & Avila, J. (1995). The role of tau phosphorylation in transfected COS-1 cells. *Mol Cell Biochem* 148, 79-88.
- Melnikova, I. (2007). Therapies for Alzheimer's disease. *Nat Rev Drug Discov* 6, 341-342.
- Melov, S., Adlard, P. A., Morten, K., Johnson, F., Golden, T. R., Hinerfeld, D., Schilling, B., Mavros, C., Masters, C. L., Volitakis, I., Li, Q. X., Laughton, K., Hubbard, A., Cherny, R. A., Gibson, B. & Bush, A. I. (2007). Mitochondrial oxidative stress causes hyperphosphorylation of tau. *PLoS ONE* 2, e536.
- Mendieta, J., Fuertes, M. A., Kunjishapatham, R., Santa-Maria, I., Moreno, F. J., Alonso, C., Gago, F., Munoz, V., Avila, J. & Hernandez, F. (2005). Phosphorylation modulates the alpha-helical structure and polymerization of a peptide from the third tau microtubule-binding repeat. *Biochim Biophys Acta* 1721, 16-26.
- Miller, M. L. & Johnson, G. V. (1995). Transglutaminase cross-linking of the tau protein. *J Neurochem* 65, 1760-1770.
- Minoura, K., Tomoo, K., Ishida, T., Hasegawa, H., Sasaki, M. & Taniguchi, T. (2002). Amphipathic helical behavior of the third repeat fragment in the tau microtubule-binding domain, studied by (1)H NMR spectroscopy. *Biochem Biophys Res Commun* 294, 210-214.
- Minoura, K., Yao, T. M., Tomoo, K., Sumida, M., Sasaki, M., Taniguchi, T. & Ishida, T. (2004). Different associational and conformational behaviors between the second and third repeat fragments in the tau microtubule-binding domain. *Eur J Biochem* 271, 545-552.
- Mitchison, T. & Kirschner, M. (1988). Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* 1, 761-772.
- 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, 790-796.
- Moreira, P. I., Santos, M. S. & Oliveira, C. R. (2007). Alzheimer's disease: a lesson from mitochondrial dysfunction. *Antioxid Redox Signal* 9, 1621-1630.
- Moreno, F. J., Medina, M., Perez, M., Montejo De Garcini, E. & Avila, J. (1995). Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates recombinant human tau protein at serine-262 in the presence of heparin (or tubulin). *FEBS Lett* 372, 65-68.
- Mori, H., Kondo, J. & Ihara, Y. (1987). Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Science* 235, 1641-1644.
- 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.
- Morris, H. R., Lees, A. J. & Wood, N. W. (1999). Neurofibrillary tangle parkinsonian disorders--tau pathology and tau genetics. *Mov Disord* 14, 731-736.
- Morsch, R., Simon, W. & Coleman, P. D. (1999). Neurons may live for decades with neurofibrillary tangles. *J Neuropathol Exp Neurol* 58, 188-197.

- Munch, G., Cunningham, A. M., Riederer, P. & Braak, E. (1998). Advanced glycation endproducts are associated with Hirano bodies in Alzheimer's disease. *Brain Res* 796, 307-310.
- Necula, M. & Kuret, J. (2004). Electron microscopy as a quantitative method for investigating tau fibrillization. *Anal Biochem* 329, 238-246.
- Nelson, P. T., Stefansson, K., Gulcher, J. & Saper, C. B. (1996). Molecular evolution of tau protein: implications for Alzheimer's disease. *J Neurochem* 67, 1622-1632.
- Nemoto, S. & Finkel, T. (2002). Redox regulation of forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway. *Science* 295, 2450-2452.
- Nguyen, H. N., Lee, M. S., Hwang, D. Y., Kim, Y. K., Yoon Do, Y., Lee, J. W., Yun, Y. P., Lee, M. K., Oh, K. W. & Hong, J. T. (2007). Mutant presenilin 2 increased oxidative stress and p53 expression in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 357, 174-180.
- Nieto, A., Correas, I., Lopez-Otin, C. & Avila, J. (1991). Tau-related protein present in paired helical filaments has a decreased tubulin binding capacity as compared with microtubule-associated protein tau. *Biochim Biophys Acta* 1096, 197-204.
- Nieto, A., Correas, I., Montejo De Garcini, E. & Avila, J. (1988). A modified form of microtubule-associated tau protein is the main component of paired helical filaments. *Biochem Biophys Res Commun* 154, 660-667.
- Nishimura, M., Yu, G. & St George-Hyslop, P. H. (1999). Biology of presenilins as causative molecules for Alzheimer disease. *Clin Genet* 55, 219-225.
- Noble, W., Planel, E., Zehr, C., Olm, V., Meyerson, J., Suleman, F., Gaynor, K., Wans, 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.
- Nohl, H., Kozlov, A. V., Staniek, K. & Gille, L. (2001). The multiple functions of coenzyme Q. *Bioorg Chem* 29, 1-13.
- Nohl, H., Staniek, K., Kozlov, A. V. & Gille, L. (2003). The biomolecule ubiquinone exerts a variety of biological functions. *Biofactors* 18, 23-31.
- Norlund, M. A., Lee, J. M., Zainelli, G. M. & Muma, N. A. (1999). Elevated transglutaminase-induced bonds in PHF tau in Alzheimer's disease. *Brain Res* 851, 154-163.
- Notkola, I. L., Sulkava, R., Pekkanen, J., Erkinjuntti, T., Ehnholm, C., Kivinen, P., Tuomilehto, J. & Nissinen, A. (1998). Serum total cholesterol, apolipoprotein E epsilon 4 allele, and Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology* 17, 14-20.
- 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 7.51. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5837-5841.
- Nukina, N. & Ihara, Y. (1983). Immunocytochemical study on senile plaques in Alzheimer's disease. II. Abnormal dendrites in senile plaques as revealed by anti-microtubule-associated proteins (MAPs) immunostaining. *Proc Jpn Acad* 59, 284-292.
- Nunomura, A., Chiba, S., Lippa, C. F., Cras, P., Kalaria, R. N., Takeda, A., Honda, K., Smith, M. A. & Perry, G. (2004). Neuronal RNA oxidation is a prominent feature of familial Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 17, 108-113.
- Nunomura, A., Perry, G., Aliev, G., Hirai, K., Takeda, A., Balraj, E. K., Jones, P. K., Ghanbari, H., Wataya, T., Shimohama, S., Chiba, S., Atwood, C. S., Petersen, R. B. & Smith, M. A. (2001).

- Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 60, 759-767.
- 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, 409-421.
- Offe, K., Dodson, S. E., Shoemaker, J. T., Fritz, J. J., Gearing, M., Levey, A. I. & Lah, J. J. (2006). The lipoprotein receptor LR11 regulates amyloid beta production and amyloid precursor protein traffic in endosomal compartments. *J Neurosci* 26, 1596-1603.
- Ott, A., Stolk, R. P., Van Harskamp, F., Pols, H. A., Hofman, A. & Breteler, M. M. (1999). Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. *Neurology* 53, 1937-1942.
- Pastor, P., Ezquerra, M., Tolosa, E., Munoz, E., Marti, M. J., Valldeoriola, F., Molinuevo, J. L., Calopa, M. & Oliva, R. (2002). Further extension of the H1 haplotype associated with progressive supranuclear palsy. *Mov Disord* 17, 550-556.
- Patrick, G. N., Zukerberg, L., Nikolic, M., De La Monte, S., Dikkes, P. & Tsai, L. H. (1999). Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* 402, 615-622.
- Paula-Lima, A. C., De Felice, F. G. & Brito-Moreira, J. (2005). Activation of GABA<sub>A</sub> receptors by taurine and muscinol blocks the neurotoxicity of  $\beta$ -amyloid in rat hippocampal and cortical neurons. *Neuropharmacology* 49, 1140-1148.
- Pawar, A. P., Dubay, K. F., Zurdo, J., Chiti, F., Vendruscolo, M. & Dobson, C. M. (2005). Prediction of "aggregation-prone" and "aggregation-susceptible" regions in proteins associated with neurodegenerative diseases. *J Mol Biol* 350, 379-392.
- 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.
- Perez, M., Valpuesta, J. M., De Garcini, E. M., Quintana, C., Arrasate, M., Lopez Carrascosa, J. L., Rabano, A., Garcia De Yébenes, J. & Avila, J. (1998). Ferritin is associated with the aberrant tau filaments present in progressive supranuclear palsy. *Am J Pathol* 152, 1531-1539.
- Perez, M., Cuadros, R., Smith, M. A., Perry, G. & Avila, J. (2000a). Phosphorylated, but not native, tau protein assembles following reaction with the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal. *FEBS Lett* 486, 270-274.
- Perez, M., Lim, F., Arrasate, M. & Avila, J. (2000b). The FTDP-17-linked mutation R406W abolishes the interaction of phosphorylated tau with microtubules. *J Neurochem* 74, 2583-2589.
- Perez, M., Hernandez, F., Gomez-Ramos, A., Smith, M., Perry, G. & Avila, J. (2002a). 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., 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, 339-347.
- 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, R. G., Waymire, J. C., Lin, E., Liu, J. J., Guo, F. & Zigmond, M. J. (2002b). A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J Neurosci* 22, 3090-3099.

- Perry, G., Friedman, R., Shaw, G. & Chau, V. (1987). Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer disease brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 3033-3036.
- Perry, G., Siedlak, S. L., Richey, P., Kawai, M., Cras, P., Kalaria, R. N., Galloway, P. G., Scardina, J. M., Cordell, B., Greenberg, B. D. & Et Al. (1991). Association of heparan sulfate proteoglycan with the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 11, 3679-3683.
- Petrucelli, 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.
- Pfeiffer, E. & Metzler, M. (1996). Interaction of p-benzoquinone and p-biphenylquinone with microtubule proteins in vitro. *Chem Biol Interact* 102, 37-53.
- Pickhardt, M., Larbig, G., Khlistunova, I., Coksezen, A., Meyer, B., Mandelkow, E. M., Schmidt, B. & Mandelkow, E. (2007). Phenylthiazolyl-hydrazide and its derivatives are potent inhibitors of tau aggregation and toxicity in vitro and in cells. *Biochemistry* 46, 10016-10023.
- Pinkus, R., Weiner, L. M. & Daniel, V. (1995). Role of quinone-mediated generation of hydroxyl radicals in the induction of glutathione S-transferase gene expression. *Biochemistry* 34, 81-88.
- 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.
- 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, 511-516.
- Price, D. L., Alschuler, R. J., Struble, R. G., Casanova, M. F., Cork, L. C. & Murphy, D. B. (1986). Sequestration of tubulin in neurons in Alzheimer's disease. *Brain Res* 385, 305-10.
- Raber, J., Huang, Y. & Ashford, J. W. (2004). ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology. *Neurobiol Aging* 25, 641-650.
- Raina, A. K., Templeton, D. J., Deak, J. C., Perry, G. & Smith, M. A. (1999). Quinone reductase (NQO1), a sensitive redox indicator, is increased in Alzheimer's disease. *Redox Rep* 4, 23-7.
- 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.
- Rappaport, S. M., Waidyanatha, S., Qu, Q., Shore, R., Jin, X., Cohen, B., Chen, L. C., Melikian, A. A., Li, G., Yin, S., Yan, H., Xu, B., Mu, R., Li, Y., Zhang, X. & Li, K. (2002). Albumin adducts of benzene oxide and 1,4-benzoquinone as measures of human benzene metabolism. *Cancer Res* 62, 1330-1337.
- Redlich, E. (1898). Über miliare Sklerose der Hirnrinde bei seniler Atrophie. *Jahrb Psychiat Neurol* 17, 208-216.
- Reif, D. W. (1992). Ferritin as a source of iron for oxidative damage. *Free Radic Biol Med* 12, 417-427.
- Reynolds, C. H., Nebreda, A. R., Gibb, G. M., Utton, M. A. & Anderton, B. H. (1997). Reactivating kinase/p38 phosphorylates tau protein in vitro. *J Neurochem* 69, 191-198.
- Reynolds, C. H., Betts, J. C., Blackstock, W. P., Nebreda, A. R. & Anderton, B. H. (2000). Phosphorylation sites on tau identified by nano-electrospray mass spectrometry: differences in

- vitro between the mitogen-activated protein kinases ERK2, c-Jun N-terminal kinase and P38, and glycogen synthase kinase-3beta. *J Neurochem* 74, 1587-1595.
- Rizzu, P., Van Swieten, J. C., Joosse, M., Hasegawa, M., Stevens, M., Tibben, A., Niermeijer, M. F., Hillebrand, M., Ravid, R., Oostra, B. A., Goedert, M., Van Duijn, C. M. & Heutink, P. (1999). High prevalence of mutations in the microtubule-associated protein tau in a population study of frontotemporal dementia in the Netherlands. *Am J Hum Genet* 64, 414-421.
- Roberson, E. D., Scarce-Levie, K., Palop, J. J., Yan, F., Cheng, I. H., Wu, T., Gerstein, H., Yu, G. Q. & Mukke, L. (2007). Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* 316, 750-754.
- Rogaeva, E., Meng, Y., Lee, J. H., Gu, Y., Kawarai, T., Zou, F., Katayama, T., Baldwin, C. T., Cheng, R., Hasegawa, H., Chen, F., Shibata, N., Lunetta, K. L., Pardossi-Piquard, R., Bohm, C., Wakutani, Y., Cupples, L. A., Cuenco, K. T., Green, R. C., Pinessi, L., Rainero, I., Sorbi, S., Bruni, A., Duara, R., Friedland, R. P., Inzelberg, R., Hampe, W., Bujo, H., Song, Y. Q., Andersen, O. M., Willnow, T. E., Graff-Radford, N., Petersen, R. C., Dickson, D., Der, S. D., Fraser, P. E., Schmitt-Ulms, G., Younkin, S., Mayeux, R., Farrer, L. A. & St George-Hyslop, P. (2007). The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet* 39, 168-177.
- Rohn, T. T., Rissman, R. A., Davis, M. C., Kim, Y. E., Cotman, C. W. & Head, E. (2002). Caspase-9 activation and caspase cleavage of tau in the Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Dis* 11, 341-354.
- Roy, S., Zhang, B., Lee, V. M. & Trojanowski, J. Q. (2005). Axonal transport defects: a common theme in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol (Berl)* 109, 5-13.
- Sadot, E., Heicklen-Klein, A., Barg, J., Lazarovici, P. & Ginzburg, I. (1996). Identification of a tau promoter region mediating tissue-specific-regulated expression in PC12 cells. *J Mol Biol* 256, 805-812.
- Sadqi, M., Hernandez, F., Pan, U., Perez, M., Schaeberle, M. D., Avila, J. & Munoz, V. (2002). Alpha-helix structure in Alzheimer's disease aggregates of tau-protein. *Biochemistry* 41, 7150-7155.
- Saito, T., Ishiguro, K., Uchida, T., Miyamoto, E., Kishimoto, T. & Hisanaga, S. (1995). In situ dephosphorylation of tau by protein phosphatase 2A and 2B in fetal rat primary cultured neurons. *FEBS Lett* 376, 238-242.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*, Second Edition edition, New York.
- Santacruz, K., Lewis, J., Spires, T., Paulson, J., Kotilinek, L., Ingelsson, M., Guimaraes, A., Deture, M., Ramsden, M., McGowan, E., Forster, C., Yue, M., Orne, J., Janus, C., Mariash, A., Kuskowski, M., Hyman, B., Hutton, M. & Ashe, K. H. (2005). Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 309, 476-481.
- Santa-Maria, I., Hernandez, F., Del Rio, J., Moreno, F. J. & 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.
- 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.
- Santa-Maria, I., Hernandez, F., Smith, M. A., Perry, G., Avila, J. & Moreno, F. J. (2005a). Neurotoxic dopamine quinone facilitates the assembly of tau into fibrillar polymers. *Mol Cell Biochem* 278, 203-212.



- Santa-Maria, I., Perez, M., Hernandez, F., Munoz, V., Moreno, F. J. & Avila, J. (2006). In vitro tau fibrillization: mapping protein regions. *Biochim Biophys Acta* 1762, 683-692.
- Santa-Maria, I., Smith, M. A., Perry, G., Hernandez, F., Avila, J. & Moreno, F. J. (2005b). Effect of quinones on microtubule polymerization: a link between oxidative stress and cytoskeletal alterations in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1740, 472-480.
- Sayre, L. M., Zelasko, D. A., Harris, P. L., Perry, G., Salomon, R. G. & Smith, M. A. (1997). 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 68, 2092-2097.
- Scherzer, C. R., Offe, K., Gearing, M., Rees, H. D., Fang, G., Heilman, C. J., Schaller, C., Bujo, H., Levey, A. I. & Lah, J. J. (2004). Loss of apolipoprotein E receptor LR11 in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 61, 1200-1205.
- 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, 3549-3558.
- Schuller, E., Gulesserian, T., Seidl, R., Cairns, N. & Lube, G. (2001). Brain t-complex polypeptide 1 (TCP- 1) related to its natural substrate beta1 tubulin is decreased in Alzheimer's disease. *Life Sci* 69, 263-70.
- Schweers, O., Mandelkow, E. M., Biernat, J. & Mandelkow, E. (1995). Oxidation of cysteine-322 in the repeat domain of microtubule-associated protein tau controls the in vitro assembly of paired helical filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8463-8467.
- 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, 1166-1173.
- Selkoe, D. & Kopan, R. (2003). Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu Rev Neurosci* 26, 565-597.
- Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81, 741-766.
- Selkoe, D. J., Podlisny, M. B., Joachim, C. L., Vickers, E. A., Lee, G., Fritz, L. C. & Oltersdorf, T. (1988). Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 7341-7345.
- Sergeant, N., David, J. P., Lefranc, D., Vermersch, P., Watzet, A. & Delacourte, A. (1997). Different distribution of phosphorylated tau protein isoforms in Alzheimer's and Pick's diseases. *FEBS Lett* 412, 578-582.
- Serpell, L. C., Sunde, M. & Blake, C. C. (1997). The molecular basis of amyloidosis. *Cell Mol Life Sci* 53, 871-887.
- Serretti, A., Artioli, P., Quartesan, R. & De Ronchi, D. (2005). Genes involved in Alzheimer's disease, a survey of possible candidates. *J Alzheimers Dis* 7, 331-353.
- Shahani, N., Subramaniam, S., Wolf, T., Tackenberg, C. & Brandt, R. (2006). Tau aggregation and progressive neuronal degeneration in the absence of changes in spine density and morphology after targeted expression of Alzheimer's disease-relevant tau constructs in organotypic hippocampal slices. *J Neurosci* 26, 6103-6114.
- Sharma, V. M., Litersky, J. M., Bhaskar, K. & Lee, G. (2007). Tau impacts on growth-factor-stimulated actin remodeling. *J Cell Sci* 120, 748-757.

- Shelanski, M. L., Gaskin, F. & Cantor, C. R. (1973). Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 765-768.
- Sherman, M. Y. & Goldberg, A. L. (2001). Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron* 29, 15-32.
- Sherrington, R., Froelich, S., Sorbi, S., Campion, D., Chi, H., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Rogaev, E. I., Lin, C., Liang, Y., Ikeda, M., Mar, L., Brice, A., Agid, Y., Percy, M. E., Clerget-Darpoux, F., Piacentini, S., Marcon, G., Nacmias, B., Amaducci, L., Frebourg, T., Lannfelt, L., Rommens, J. M. & St George-Hyslop, P. H. (1996). Alzheimer's disease associated with mutations in presenilin 2 is rare and variably penetrant. *Hum Mol Genet* 5, 985-988.
- Shimura, H., Schwartz, D., Gygi, S. P. & Kosik, K. S. (2004). CHIP-Hsc70 complex ubiquitinates phosphorylated tau and enhances cell survival. *J Biol Chem* 279, 4869-4876.
- 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 of tau phosphoserine 413 and tau protein kinase I in Alzheimer pathology. *Brain Res* 737, 119-132.
- Sironi, J. J., Yen, S. H., Gondal, J. A., Wu, Q., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. (1998). Ser-262 in human recombinant tau protein is a markedly more favorable site for phosphorylation by CaMKII than PKA or PhK. *FEBS Lett* 436, 471-475.
- Sladic, D., Novakovic, I., Vujcic, Z., Bozic, T., Bozic, N., Milic, D., Solaja, B. & Gasic, M. J. (2004). Protein covalente modification by biologically active quinones. *J. Serb. Chem. Soc* 69, 901-907.
- Small, D. H., Williamson, T., Reed, G., Clarris, H., Beyreuther, K., Masters, C. L. & Nurcombe, V. (1996). The role of heparan sulfate proteoglycans in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci* 777, 316-321.
- Smith, M. A., Kutty, R. K., Richey, P. L., Yan, S. D., Stern, D., Chader, G. J., Wiggert, B., Petersen, R. B. & Perry, G. (1994). Heme oxygenase-1 is associated with the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 145, 42-47.
- Smith, M. A., Perry, G., Richey, P. L., Sayre, L. M., Anderson, V. E., Beal, M. F. & Kowall, N. (1996). Oxidative damage in Alzheimer's. *Nature* 382, 120-121.
- Smith, M. A., Richey Harris, P. L., Sayre, L. M., Beckman, J. S. & Perry, G. (1997). Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 17, 2653-2557.
- Smith, M. A., Rottkamp, C. A., Nunomura, A., Raina, A. K. & Perry, G. (2000). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1502, 139-144.
- Smith, M. A., Sayre, L. M., Monnier, V. M. & Perry, G. (1995). Radical AGEing in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 18, 172-176.
- Smith, M. A., Wehr, K., Harris, P. L., Siedlak, S. L., Connor, J. R. & Perry, G. (1998). Abnormal localization of iron regulatory protein in Alzheimer's disease. *Brain Res* 788, 232-236.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85.
- Snow, A. D., Mar, H., Nochlin, D., Sekiguchi, R. T., Kimata, K., Koike, Y. & Wight, T. N. (1990). Early accumulation of heparan sulfate in neurons and in the beta-amyloid protein-containing lesions of Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Am J Pathol* 137, 1253-1270.
- Snow, A. D., Sekiguchi, R., Nochlin, D., Fraser, P., Kimata, K., Mizutani, A., Arai, M., Schreier, W. A. & Morgan, D. G. (1994a). An important role of heparan sulfate proteoglycan (Perlecan) in a model system for the deposition and persistence of fibrillar A beta-amyloid in rat brain. *Neuron* 12, 219-234.

- Snow, A. D., Sekiguchi, R., Nochlin, D., Fraser, P., Kimata, K., Mizutani, A., Arai, M., Schreier, W. A. & Morgan, D. G. (1994b). An important role of heparan sulfate proteoglycan (Perlecan) in a model system for the deposition and persistence of fibrillar A beta-amyloid in rat brain. *Neuron* 12, 219-234.
- Soderberg, M., Edlund, C., Alafuzoff, I., Kristensson, K. & Dallner, G. (1992). Lipid composition in different regions of the brain in Alzheimer's disease/senile dementia of Alzheimer's type. *J Neurochem* 59, 1646-53.
- Sontag, E., Nunbhakdi-Craig, V., Lee, G., Brandt, R., Kamibayashi, C., Kuret, J., White, C. L., 3rd, Mumby, M. C. & Bloom, G. S. (1999). Molecular interactions among protein phosphatase 2A, tau, and microtubules. Implications for the regulation of tau phosphorylation and the development of tauopathies. *J Biol Chem* 274, 25490-25498.
- 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, 7737-7741.
- Stambolic, V. & Woodgett, J. R. (1994). Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta in intact cells via serine 9 phosphorylation. *Biochem J* 303 ( Pt 3), 701-704.
- Steiner, B., Mandelkow, E. M., Biernat, J., Gustke, N., Meyer, H. E., Schmidt, B., Mieskes, G., Soling, H. D., Drechsel, D., Kirschner, M. W. & Et Al. (1990). Phosphorylation of microtubule-associated protein tau: identification of the site for Ca<sup>2+</sup>(+)-calmodulin dependent kinase and relationship with tau phosphorylation in Alzheimer tangles. *Embo J* 9, 3539-3544.
- Stokes, A. H., Hastings, T. G. & Vrana, K. E. (1999). Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. *J Neurosci Res* 55, 659-665.
- 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, 1282-1288.
- Storey, E. & Cappai, R. (1999). The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease and the A beta peptide. *Neuropathol Appl Neurobiol* 25, 81-97.
- 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.
- Sugioka, K., Nakano, M., Totsune-Nakano, H., Minakami, H., Tero-Kubota, S. & Ikegami, Y. (1988). Mechanism of O<sub>2</sub><sup>-</sup> generation in reduction and oxidation cycle of ubiquinones in a model of mitochondrial electron transport systems. *Biochim Biophys Acta* 936, 377-385.
- Sun, A., Liu, M., Nguyen, X. V. & Bing, G. (2003). P38 MAP kinase is activated at early stages in Alzheimer's disease brain. *Exp Neurol* 183, 394-405.
- 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, 175-178.
- Tabaton, M., Whitehouse, P. J., Perry, G., Davies, P., Autilio, G. L. & Gambetti, P. (1988). Alz 50 recognizes abnormal filaments in Alzheimer's disease and progressive supranuclear palsy. *Ann Neurol* 24, 407-413.
- Takashima, A. (2006). GSK-3 is essential in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 9, 309-317.

- Takeda, A., Smith, M. A., Avila, J., Nunomura, A., Siedlak, S. L., Zhu, X., Perry, G. & Sayre, L. M. (2000). In Alzheimer's disease, heme oxygenase is coincident with Alz50, an epitope of tau induced by 4-hydroxy-2-nonenal modification. *J Neurochem* 75, 1234-1241.
- 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, 133-141.
- Taniguchi, S., Suzuki, N., Masuda, M., Hisanaga, S., Iwatsubo, T., Goedert, M. & Hasegawa, M. (2005). Inhibition of heparin-induced tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins. *J Biol Chem* 280, 7614-7623.
- Tatar, M. & Rand, D. M. (2002). Aging. Dietary advice on Q. *Science* 295, 54-55.
- Tatar, M., Bartke, A. & Antebi, A. (2003). The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* 299, 1346-1351.
- Tatebayashi, Y., Iqbal, K. & Grundke-Iqbal, I. (1999). Dynamic regulation of expression and phosphorylation of tau by fibroblast growth factor-2 in neural progenitor cells from adult rat hippocampus. *J Neurosci* 19, 5245-5254.
- Temple, M. D., Perrone, G. G. & Dawes, I. W. (2005). Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends Cell Biol* 15, 319-326.
- Terman, A. & Brunk, U. T. (2006). Oxidative stress, accumulation of biological 'garbage', and aging. *Antioxid Redox Signal* 8, 197-204.
- Terman, A., Gustafsson, B. & Brunk, U. T. (2006). The lysosomal-mitochondrial axis theory of postmitotic aging and cell death. *Chem Biol Interact* 163, 29-37.
- Terman, A., Gustafsson, B. & Brunk, U. T. (2007). Autophagy, organelles and ageing. *J Pathol* 211, 134-143.
- Terry, R. D. (1963). The Fine Structure of Neurofibrillary Tangles in Alzheimer's Disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 22, 629-642.
- Terry, R. D., Gonatas, N. K. & Weiss, M. (1964). Ultrastructural Studies in Alzheimer's Presenile Dementia. *Am J Pathol* 44, 269-297.
- Tolnay, M. & Probst, A. (1999). REVIEW: tau protein pathology in Alzheimer's disease and related disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol* 25, 171-187.
- Trojanowski, J. Q. & Lee, V. M. (2005). Pathological tau: a loss of normal function or a gain in toxicity? *Nat Neurosci* 8, 1136-1137.
- Trojanowski, J. Q., Smith, A. B., Hurn, D. & Lee, V. M. (2005). Microtubule-stabilising drugs for therapy of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders with axonal transport impairments. *Expert Opin Pharmacother* 6, 683-686.
- Troncoso, J. C., Costello, A., Watson, A. L., Jr. & Johnson, G. V. (1993). In vitro polymerization of oxidized tau into filaments. *Brain Res* 613, 313-316.
- Uchida, K., Kanematsu, M., Morimitsu, Y., Osawa, T., Noguchi, N. & Niki, E. (1998). Acrolein is a product of lipid peroxidation reaction. Formation of free acrolein and its conjugate with lysine residues in oxidized low density lipoproteins. *J Biol Chem* 273, 16058-16066.
- Utton, M. A., Gibb, G. M., Burdett, I. D., Anderton, B. H. & Vandecastelle, A. (2001). Functional differences of tau isoforms containing 3 or 4 C-terminal repeat regions and the influence of oxidative stress. *J Biol Chem* 276, 34288-34297.

- Van Broeckhoven, C. L. (1995). Molecular genetics of Alzheimer disease: identification of genes and gene mutations. *Eur Neurol* 35, 8-19.
- Van Der Horst, A. & Burgering, B. M. (2007). Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 440-450.
- 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, 8229-8234.
- 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.
- Vijayan, S., El-Akkad, E., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. (2001). A pool of beta-tubulin is hyperphosphorylated at serine residues in Alzheimer disease brain. *FEBS Lett* 509, 375-81.
- 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., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. (1996). Glycosylation of microtubule-associated protein tau: an abnormal posttranslational modification in Alzheimer's disease. *Nat Med* 2, 871-875.
- Warda, M. & Han, J. (2008). Mitochondria, the missing link between body and soul: Proteomic prospective evidence. *Proteomics* 8, In press.
- Wardman, P. & Candeias, L. P. (1996). Fenton chemistry: an introduction. *Radiat Res* 145, 523-531.
- Watanabe, A., Takio, K. & Ihara, Y. (1999). Deamidation and isoaspartate formation in smeared tau in paired helical filaments. Unusual properties of the microtubule-binding domain of tau. *J Biol Chem* 274, 7368-7378.
- Wedemeyer, W. J., Welker, E. & Scheraga, H. A. (2002). Proline cis-trans isomerization and protein folding. *Biochemistry* 41, 14637-14644.
- Weiner, L. M. (1994). Oxygen radicals generation and DNA scission by anticancer and synthetic quinones. *Methods Enzymol* 233, 92-105.
- 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.
- Wilson, D. M. & Binder, L. I. (1997). Free fatty acids stimulate the polymerization of tau and amyloid beta peptides. In vitro evidence for a common effector of pathogenesis in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 150, 2181-2195.
- Wille, H., Drewes, G., Biernat, J., Mandelkow, E. M. & Mandelkow, E. (1992). Alzheimer-like paired helical filaments and antiparallel dimers formed from microtubule-associated protein tau in vitro. *J Cell Biol* 118, 573-584.
- Wischnik, C. M., Lai, R. Y. K. & Harrington, C. R. (1997). Modelling prion-like processing of tau protein in Alzheimer's disease for pharmaceutical development. In *Brain Microtubule Associated Proteins* (eds. J. Avila, R. Brandt and K. S. Kosik), pp. 185-241. Switzerland: Harwood Academic publishers.
- Wischnik, C. M., Novak, M., Edwards, P. C., Klug, A., Tichelaar, W. & Crowther, R. A. (1988a). Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 4884-4888.

- Wischik, C. M., Novak, M., Thogersen, H. C., Edwards, P. C., Runswick, M. J., Jakes, R., Walker, J. E., Milstein, C., Roth, M. & Klug, A. (1988b). Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 4506-4510.
- 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, 711-714.
- Wolozin, B. L., Pruchnicki, A., Dickson, D. W. & Davies, P. (1986). A neuronal antigen in the brains of Alzheimer patients. *Science* 232, 648-650.
- 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, 4040-4043.
- Xie, L., Helmerhorst, E., Taddei, K., Plewright, B., Van Bronswijk, W. & Martins, R. (2002). Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor. *J Neurosci* 22, RC221.
- Xu, G., Liu, Y., Kansal, M. M. & Sayre, L. M. (1999). Rapid cross-linking of proteins by 4-ketoaldehydes and 4-hydroxy-2-alkenals does not arise from the lysine-derived monoalkylpyrroles. *Chem Res Toxicol* 12, 855-861.
- Yamamoto, A., Shin, R. W., Hasegawa, K., Naiki, H., Sato, H., Yoshimasu, F. & Kitamoto, T. (2002). Iron (III) induces aggregation of hyperphosphorylated tau and its reduction to iron (II) reverses the aggregation: implications in the formation of neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 82, 1137-1147.
- Yan, S. D., Chen, X., Schmidt, A. M., Brett, J., Godman, G., Zou, Y. S., Scott, C. W., Caputo, C., Frappier, T., Smith, M. A. & Et Al. (1994). Glycated tau protein in Alzheimer disease: a mechanism for induction of oxidant stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 7787-7791.
- Yang, J., Friedman, M. S., Bian, H., Crofford, L. J., Roessler, B. & Mcdonagh, K. T. (2002). Highly efficient genetic transduction of primary human synoviocytes with concentrated retroviral supernatant. *Arthritis Res* 4, 215-219.
- Yen, S. H., Gaskin, F. & Fu, S. M. (1983). Neurofibrillary tangles in senile dementia of the Alzheimer type share an antigenic determinant with intermediate filaments of the vimentin class. *Am J Pathol* 113, 373-381.
- Yoshida, H. & Goedert, M. (2002). Molecular cloning and functional characterization of chicken brain tau: isoforms with up to five tandem repeats. *Biochemistry* 41, 15203-15211.
- Yu, J. Z. & Rasenick, M. M. (2006). Tau associates with actin in differentiating PC12 cells. *Faseb J* 20, 1452-1461.
- Zafar, K. S., Siegel, D. & Ross, D. (2006). A potential role for cyclized quinones derived from dopamine, DOPA, and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid in proteasomal inhibition. *Mol Pharmacol* 70, 1079-1086.
- Zandi, P. P., Anthony, J. C., Khachaturian, A. S., Stone, S. V., Gustafson, D., Tschanz, J. T., Norton, M. C., Welsh-Bohmer, K. A. & Breitner, J. C. (2004). Reduced risk of Alzheimer disease in users of antioxidant vitamin supplements: the Cache County Study. *Arch Neurol* 61, 82-88.
- Zecca, L., Zucca, F. A., Wilms, H. & Sulzer, D. (2003). Neuromelanin of the substantia nigra: a neuronal black hole with protective and toxic characteristics. *Trends Neurosci* 26, 578-580.
- 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, 227-231.

Zhu, X., Rottkamp, C. A., Boux, H., Takeda, A., Perry, G. & 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.

**Anexo**



### Relación de publicaciones del doctorando

**Santa-Maria I.**, Hernandez F., Martin C.P., Avila J., Moreno F.J. Quinones facilitate the self-assembly of the phosphorylated tubulin binding region of tau into fibrillar polymers. **Biochemistry**. 2004; 43 (10) : 2888-97.

Mendieta J., Fuertes M.A., Kunjishapatham R., **Santa-Maria I.**, Moreno F.J., Alonso C., Gago F., Munoz V., Avila J., Hernandez F. Phosphorylation modulates the alpha-helical structure and polymerization of a peptide from the third tau microtubule-binding repeat. **Biochimica et Biophysica Acta**. 2005; 1721 (1-3) : 16-26.

**Santa-Maria I.**, Smith M.A., Perry G., Hernandez F., Avila J., Moreno F.J. Effect of quinones on microtubule polymerization: a link between oxidative stress and cytoskeletal alterations in Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta**. 2005; 1740 (3) : 472-80.

**Santa-Maria I.**, Hernandez F., Smith M.A., Perry G., Avila J., Moreno F.J. Neurotoxic dopamine quinone facilitates the assembly of tau into fibrillar polymers. **Molecular and Cellular Biochemistry**. 2005; 278 (1-2) : 203-12.

**Santa-Maria I.**, Perez M., Hernandez F., Munoz V., Moreno F.J., Avila J. In vitro tau fibrillization: mapping protein regions. **Biochimica et Biophysica Acta**. 2006; 1762 (7): 683-692.

**Santa-Maria I.**, Perez M., Hernandez F., Avila J., Moreno F.J. Characteristics of the binding of thioflavin S to tau paired helical filaments. **Journal of Alzheimer's Disease**. 2006. 9 (3): 279-285.

**Santa-Maria I.**, Hernandez F., Del Rio J., Moreno F.J., Avila J. Tramiprosate, a drug of potential interest for the treatment of Alzheimer's disease, promotes an abnormal aggregation of tau. **Molecular Neurodegeneration**. 2007; 2 (1): 17.

Perez M\*, **Santa-Maria I**\*, Tortosa E., Cuadros R., del Valle M., Hernandez F., Moreno F.J., Avila J. The role of the VQIVYK peptide in tau Protein phosphorylation. **Journal of Neurochemistry**. 2007; 103 (4): 1447-1460. \* Estos dos autores han contribuido por igual en este trabajo.

**Santa-Maria I.**, Hernandez F., Moreno F.J., Avila J. Taurine, an inducer for tau polymerization and weak inhibitor for amyloid- $\beta$ -peptide aggregation. **Neuroscience Letters**. 2007; 429: 91-94.

Avila J., **Santa-Maria I.**, Pérez M., Hernández F., Moreno F.J. Tau phosphorylation, aggregation, and cell toxicity. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. 2006. Vol. 2006: 1-5.

Avila J., Perez M., Lucas J.J., Gomez-Ramos A., **Santa-Maria I.**, Moreno F., Smith M., Perry G., Hernandez F. Assembly in vitro of tau protein and its implications in Alzheimer's disease. **Current Alzheimer Research**. 2004; 1 (2) : 97-101.

**Santa-Maria I.**, Cuadros R, Moreno F. J., Avila J., Hernandez F. Binding of Tau protein to the Ends of *ex vivo* Paired Helical Filaments. **Journal of Alzheimer's Disease**. 2007; **Aceptado**.

Mondragón-Rodríguez S., Basurto-Islas G., **Santa-Maria I.**, Mena R., Binder L. I., Avila J., Smith M. A., Perry G., García-Sierra F. Cleavage and Conformational Changes of Tau Protein Follow Phosphorylation During Alzheimer's Disease. **International Journal of Experimental Pathology**. 2007; **Aceptado**.

**Santa-Maria I.**, Santpere G., MacDonald M. J., Gomez de Barreda E., Felix Hernandez F., Moreno F. J., Ferrer I., Avila J. Coenzyme Q as an inducer in vivo of tau aggregation, tau filaments and Hirano bodies. **Journal of Neuro pathology and Experimental Neurology**. 2008; **Aceptado**.

## Quinones Facilitate the Self-Assembly of the Phosphorylated Tubulin Binding Region of Tau into Fibrillar Polymers

Ismael Santa-María, Félix Hernández, Concepción Pérez Martín, Jesús Avila,\* and Francisco J. Moreno

Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

Received July 29, 2003; Revised Manuscript Received January 8, 2004

**ABSTRACT:** The fragment of tau containing the first and third tubulin-binding motifs, involved in self-assembly of tau, was phosphorylated by protein kinase A (PKA). In the presence of hydroxynonenal (HNE) or in the presence of quinones such as juglone, 2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone (coenzyme Q<sub>0</sub> or DMM), or menadione, the polymerization of this phosphorylated tau fragment is catalyzed, whereas polymerization of the unmodified fragment takes place in a lesser extent. The quinones coenzyme Q<sub>0</sub> and menadione are found in every cell, including neural cells, and may interact with tau protein to facilitate its assembly into filamentous structures. These tau filaments, assembled in the presence of quinones, have a fibrillar morphology very similar to that of paired helical filaments present in the brains of patients with Alzheimer's disease.

In pathological conditions such as those found in Alzheimer's disease (AD)<sup>1</sup> and other tauopathies, tau protein is observed in a hyperphosphorylated, aggregated form (1). Tau aggregates in AD (neurofibrillary tangles, NFT) are composed of paired helical filaments (PHF) (2) of which phosphotau is the main component (3).

Whether phosphorylation of tau facilitates tau assembly is a fundamental question in study of AD and other tauopathies (4). It has been suggested that tau phosphorylation at some specific sites may be a prerequisite for tau assembly (5, 6). However, *in vitro* experiments for tau assembly have shown different results, presumably reflecting differences in experimental conditions. In some cases, phosphotau has a lower assembly capacity (7), whereas in other conditions, its capacity for assembly increases (6). Phosphorylation of tau is catalyzed by two types of kinases, proline (PDPK) and nonproline (NPDPK) directed protein kinases (8). Examples of PDPK are cdk5 and GSK3 (9–11), whereas those of NPDPK are PKA (12) and MARK (13). Each of these protein kinases phosphorylates tau in different positions/residues in the molecule. PDPK phosphorylated residues of tau not located in the tubulin-binding region, whereas NPDPK phosphorylated residues present in the tubulin-binding region (8).

In the presence of compounds such as hydroxynonenal (HNE), phosphotau, but in less extent unmodified tau, can polymerize into filamentous polymers (7). Tau phosphory-

lation by both GSK3 and PKA appears to be required to facilitate tau assembly (7).

In this work, we focus on the phosphorylation of tau protein and how this modification affects its capacity to self-assemble. Our objective was to probe conditions where phosphorylation of tau by PKA increases its self-assembly capacity. Tau phosphorylation by PKA has been previously studied by different authors (12, 14), and the possible relationship between levels of cyclic AMP and Alzheimer's disease has been the subject of much speculation (14, 15).

Although tau can be phosphorylated by several protein kinases, we focused our investigation on the study of the effects of phosphorylation of tau by PKA alone. Since a tau fragment (tau 2R) containing the tubulin-binding region can be modified by PKA and this is the region involved in self-assembly (16), we have tested for compounds that can regulate its polymerization. Among them, we have found that HNE, a lipid peroxidation compound (8), and also several quinones, such as juglone, coenzyme Q<sub>0</sub>, or menadione, increase tau polymerization.

### MATERIALS AND METHODS

**Materials.** 5-Hydroxy-1,4-naphthoquinone (juglone, ref no. H4, 700-3) was obtained from Aldrich. 2-Hydroxy-1,4-naphthoquinone (lawsone, ref no. H0508), 2-methyl-3-phytyl-1,4-naphthoquinone (vitamin K<sub>1</sub>, ref no. V-3501), 2-methyl-1,4-naphthoquinone (menadione, ref no. M-5625), 2-methyl-1,4-naphthoquinone (menadione sodium bisulfite, ref no. 5750), 2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone (coenzyme Q<sub>0</sub> or DMM, ref no. D-9150), and 2,3-dimethoxy-5-methyl-6-decyl-1,4-benzoquinone (decylubiquinone, ref no. D7911) were purchased from Sigma. Acrylamide/bisacrylamide solution was supplied by Bio-Rad. Poly(vinylidene difluoride) membranes (Immobilon Pseq) were from Millipore Corp. The chemiluminescent detection kit (Western Light) was from Tropix. 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate

\* Address for correspondence: Jesús Avila, Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Facultad de Ciencias, Campus de Cantoblanco, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain. Phone: 34 913978460. Fax: 34 913974799. E-mail: javila@cbm.uam.es.

<sup>1</sup> Abbreviations: PKA, cAMP-dependent protein kinase; HNE, hydroxynonenal; PHFs, paired helical filaments; AD, Alzheimer's disease; Mab, monoclonal antibody; OD, optical density; EC<sub>50</sub>, the effective concentration of a compound that is required to promote 50% of maximum aggregation; NFT, neurofibrillary tangles.

(H2DCFDA) was from Molecular Probes (ref no. D-399). ( $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ )-ATP was purchased from Amersham. ATP was purchased from Boehringer-Mannheim. The catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase (PKA, P 2645) was purchased from Sigma (St. Louis, MO). According to the supplier's specifications, the kinase was purified to greater than 90% homogeneity from bovine heart to a specific activity of 50 U/ $\mu\text{g}$  protein. The activity of PKA using p24 as substrate was 20 pmol/min/ $\mu\text{g}$  of protein (17). Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), EDTA, EGTA, 2-mercaptoethanol, heparin, MES, and Tris were obtained from Sigma. DEAE Sephacel-R was purchased from Pharmacia-Biotech (code no. N7-0500-01). The protein phosphatase inhibitor okadaic acid (OkA) was purchased from LC Laboratories (Woburn, MA). Monoclonal antibody 12E8 (18), was a kind gift of Dr. Seubert, Athena, San Francisco, CA. Hydroxynonenal (HNE) was partly received as a kind gift of Dr. Perry (Case Western Reserve University, Cleveland, OH) or purchased from Cayman Chemical Co. (cat. no. 32100).

**Tau Isolation.** Expression and isolation of recombinant protein htau 40 and its fragment tau 2R were performed as described (19, 20). Briefly, tau 2R (residues 250–273 linked to residues 305–335), containing the first and third motifs of the largest tau isoform present in central nervous system (21), was cloned into vector pRK172 (20) for inducible expression in *Escherichia coli*. Protein purification was performed by a protocol involving a heat resistance step in a buffer containing 100 mM Tris, pH 7.5, 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EGTA, 1 mM 2-mercaptoethanol, 100 mM NaCl, and protease inhibitors, 2 mM PMSF, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  aprotinin, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  leupeptin, and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pepstatin. This step involves a treatment at 100 °C for 5 min. The soluble protein was isolated after centrifugation, and ammonium sulfate was added. The precipitated fraction between 25% and 50% was taken. The precipitated protein was resuspended in PBS (phosphate-buffered saline) and chromatographed on DEAE Sephacel-R equilibrated in PBS, and the protein was eluted stepwise using 1 M NaCl in PBS.

**Tau Phosphorylation by PKA.** The phosphorylation of tau and tau 2R by PKA was performed as previously described (17, 22). Briefly, purified PKA and 1–4  $\mu\text{g}$  of substrate were mixed in 12  $\mu\text{L}$  total volume buffer solution containing variable ATP concentrations and 0.2  $\mu\text{Ci}$  of ( $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ) ATP. The cAMP kinase protein (100 ng/reaction) was performed in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, and 1  $\mu\text{M}$  okadaic acid buffer at 37 °C. After 20 min of incubation, 4  $\mu\text{L}$  aliquots of the supernatant were spotted onto 2 cm  $\times$  2 cm pieces of Whatman p81 phosphocellulose paper. After 20 s, the filter was washed four times (for at least 10 min each time) in 1% phosphoric acid. The dried filters were transferred into scintillation vials, and the radioactivity was measured in a liquid scintillation counter. Also, in other experiments, the phosphorylation was carried out in the presence of 1 mM ATP for 24 h. At this incubation time, maximum phosphorylation was found. To calculate molar concentrations, an estimated relative molecular weight of 44 000 was taken for tau protein and 5500 for tau 2R.

**PHF Isolation.** PHF fractions were obtained by using the method of Greenberg and Davies (23). The presence of PHF

was determined by electron microscopy as previously described (24).

**Assembly of Tau Peptides into Filaments.** Filaments were grown by vapor diffusion in hanging drops in the standard way used for protein crystallization as previously indicated (25). In a typical experiment, 1–4  $\mu\text{g}$  of peptide was resuspended in 10–15  $\mu\text{L}$  of buffer A (0.1 M MES (pH 6.4), 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , and 2 mM EGTA) containing 50 mM NaCl and 0–3 mM HNE or containing different quinones, such as juglone, at concentrations ranging from 0.25 to 8 mM. In other assays, a similar amount of tau (1–4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) but in the presence of 0.5 mg/mL heparin was resuspended in buffer A (26). The reservoir in this case contained 0.2 M NaCl in buffer A. Filaments were obtained after incubation for 4 days at 4 °C. The samples were visualized by electron microscopy as described (26, 27), and the amount of polymers was quantified by sedimentation (7). Electron micrographs were obtained at a magnification of 80 000 on Kodak SO-163 film. Micrographs were digitized using an Eikonix IEEE-488 camera with a pixel size equivalent to 7 Å in the specimen plane. Processing and measurements were performed using the Digital micrograph 2.1 software from Gatan. Several standards were used for the control of the measurements.

**Measurements of Aggregated Tau Protein.** The samples were incubated at 37 °C for 1 day to a maximum of 4 days. In some experiments, samples were centrifuged for 30 min at maximal speed in an Airfuge (Beckman), and the protein present in the supernatant and pellet was analyzed by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE). SDS–PAGE was performed according to the procedure of Laemmli on 10% or 18% polyacrylamide gels (28). Gels were stained with Coomassie brilliant blue or analyzed by autoradiography (when the protein was labeled with  $^{32}\text{P}$  by phosphorylation with PKA) as the same conditions previously indicated (22) or subjected to Western blot analysis (7) making use of monoclonal antibody 12E8 to identify phosphotau. The amount of protein was quantified by densitometry of the fractionated protein after Coomassie brilliant blue staining of the gel and after comparison of the results obtained with those found for known amounts of bovine serum albumin, used as a control. Densitometric analysis was also performed on protein samples identified by autoradiography, and the data were processed with an imaging densitometer (GS-6470 model, Bio-Rad). Data were analyzed with Molecular Analyst software. Additionally, when the protein was labeled with  $^{32}\text{P}$ , the amount of associated radioactivity was measured and determined by Cerenkov radiation counting.

In the presence of different compounds, for example, juglone, cross-linked tau oligomers can be formed, and tau aggregation can be also measured by determining the amount of those cross-linked tau oligomers.

The above experiments were complemented by doing microscopy analysis in which five fields of view were blindly selected from the grid for processing, by following the indications of Gamblin et al. (29).

## RESULTS

**Isolation of Recombinant Tau and Tau 2R Peptide.** Tau and tau 2R were isolated as indicated in the Materials and Methods section by a heat resistance step followed by

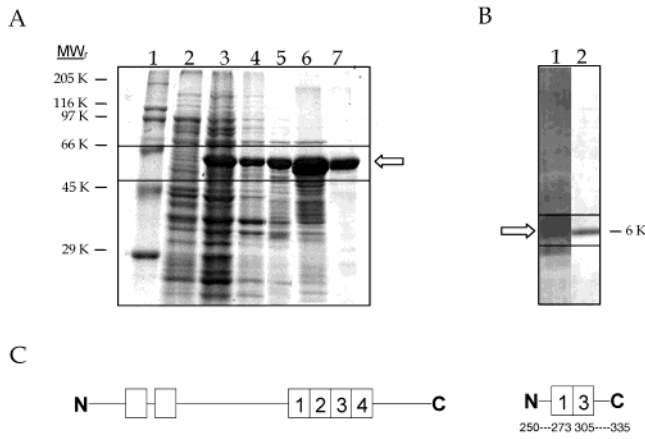


FIGURE 1: Purification of tau and tau 2R fragment. In panel A, lane 1 indicates molecular weight markers, lane 2 indicates *E. coli* cell extracts where the expression of tau was not induced. Lane 3 indicates recombinant tau isolated from *E. coli* cells expressing it (20). This recombinant tau was purified by several steps including a heat resistance step (lane 4), ammonium sulfate precipitation (lane 5), DEAE Sephacel-R chromatography (lane 6), and an additional ammonium sulfate precipitation step (lane 7). In panel B, a similar procedure was used for tau 2R, lane 1 being recombinant tau 2R isolated from *E. coli* and lane 2 the final purification step. Panel C provides a diagram of recombinant tau molecule and tau 2R fragment. The numbered boxes indicate the tubulin binding motifs in the tau molecule. The tau 2R fragment contains motifs 1 and 3. Motif 3 contains the tau site for self-assembly. The residues present in tau 2R fragment are indicated.

precipitation with ammonium sulfate and DEAE Sephacel-R chromatography. The purification level was more than 90% in each case (Figure 1, panel A, tau protein, and panel B, tau 2R). Purified polypeptides were used as substrates for *in vitro* phosphorylation by PKA.

**Phosphorylation of Tau and Tau 2R Peptide by PKA.** Tau (Figure 2A) and tau 2R (Figure 2B) were phosphorylated by PKA under conditions of increasing ATP concentrations. Figure 2A,B indicates that an incorporation (stoichiometry) of about 2.7 mol of phosphate/mol of tau and 0.8 mol of phosphate/mol of tau 2R was obtained when a concentration of 200  $\mu$ M ATP was used. Tau 2R peptide (residues 250–273 linked to residues 305–335) has the following sequence: MPDLKNVKSIGSTENLKHQGGGSVQIVYK-PVDLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGG. Phosphorylation of this peptide by PKA results only in the modification of serine residues (not shown). Those serines having a consensus sequence for PKA have been set in italics (serine 262 of tau protein is bold and italic).

To characterize a site modified by PKA in both phosphotau and phosphotau 2R, these phosphopeptides were incubated with Mab 12E8 that recognizes phosphoserine 262 (in tau protein). As shown in Figure 2C,D, both phosphopeptides bind to Mab 12E8, indicating that ser 262 is modified in both cases. In parallel, it has been shown that the increase in the reaction of modified tau with Mab 12E8 correlates

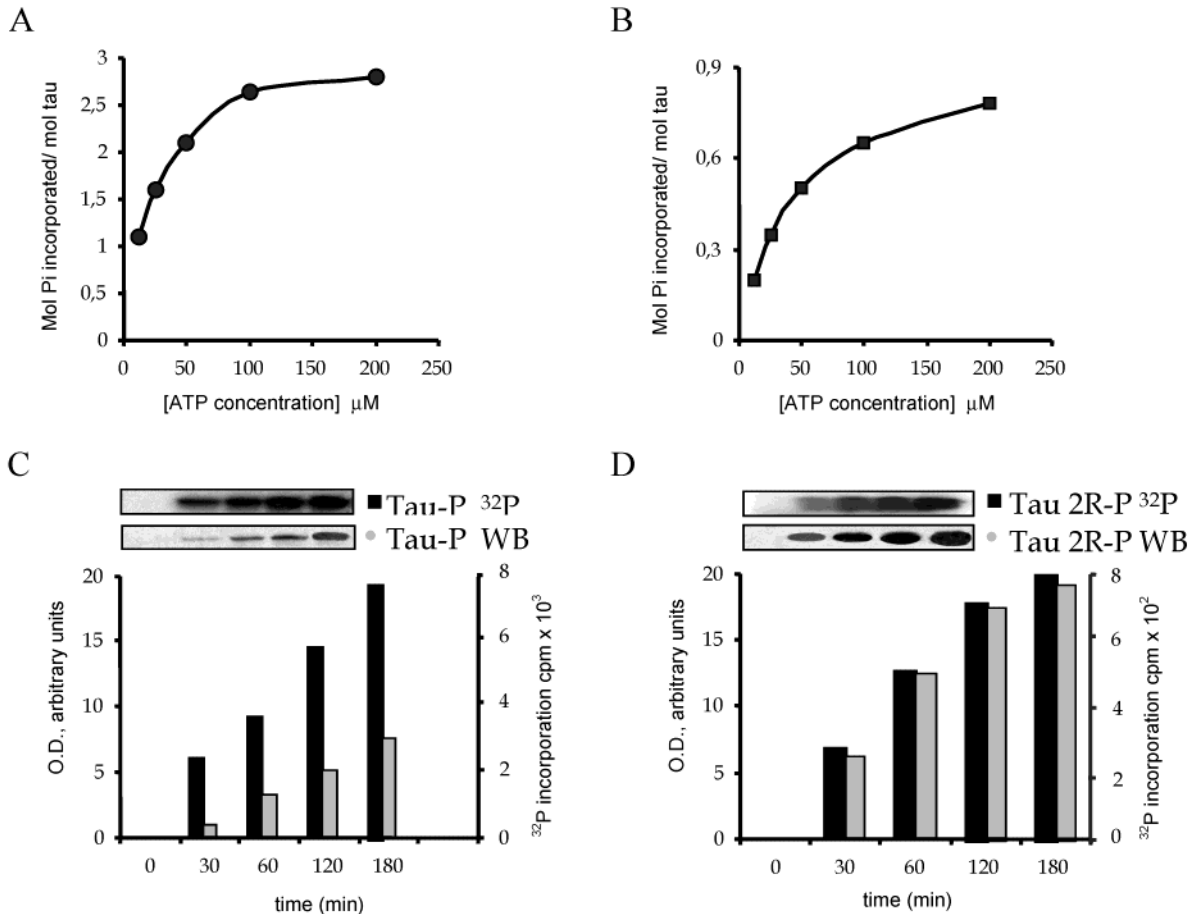


FIGURE 2: Phosphorylation of tau and tau 2R fragment by PKA. To test the extent of tau (A) and tau 2R fragment (B) phosphorylation by PKA, the effect of ATP concentration on phosphate incorporation was measured. Simultaneously, the reaction of tau (C) and tau 2R (D) with Mab 12E8 was measured by Western blotting, followed by densitometry of the obtained band. The values of those densitometries (OD, in arbitrary units) were compared to phosphate incorporation in a time-dependent reaction.

with tau phosphorylation, as measured directly by  $^{32}\text{P}$  incorporation. This result suggests that in tau 2R, PKA phosphorylates tau 2R mainly at one site, ser 262. We must indicate that this serine is also modified in tau protein obtained from the paired helical filaments present in the brain of Alzheimer's disease patients (8). Nevertheless, we cannot exclude the phosphorylation of other serines, such as ser320 or ser324, although when the peptide KVTSKCGSLGNIH-HKPGGG (containing both serines) was tested for PKA phosphorylation in the same conditions as those used for tau 2R, only 0.1 mol of phosphate/mol of peptide (or less) was incorporated.

*Aggregation of Phosphotau and Phosphotau 2R.* The purpose of the present work was to test for compounds that could favor the aggregation of phosphotau (modified by PKA) compared to that of unmodified tau. In previous studies, it was found that heparin and other polyanions could promote the assembly of unmodified and phosphotau (16, 30) with the self-assembly capacity similar or higher for unmodified tau (6). On the other hand, in the presence of hydroxynonenal (HNE), a peroxidation product of arachidonic acid, mainly phosphotau (modified by several kinases, including GSK3 and PKA) is assembled, while polymerization was observed to a less extent for unmodified tau (7). Both kinases (GSK3 and PKA) were implicated to be necessary for the assembly of modified tau in the presence of HNE (7). When the whole tau protein was only modified by PKA and its assembly capacity in the presence of increasing amounts of HNE was measured, a small amount of aggregated tau protein was detected (Figure 3A), probably because tau modification by other kinases (such as GSK3) could also facilitate the assembly (7). However, when tau 2R was phosphorylated by PKA (around 1 mol of phosphate/mol of peptide) and its polymerization in the presence of HNE was tested, a significant increase in phosphotau 2R self-assembly was found (no such increase was found for unmodified tau 2R, Figure 3C). Thus, tau 2R can be used as a useful model to test the influence of PKA phosphorylation on tau assembly. In the absence of HNE less aggregation was found for both unmodified and phosphotau or -tau 2R.

Since tau 2R was able to assemble into polymers, after the single modification of PKA, we tested for other compounds that could also favor the assembly of phosphotau 2R. In this empirical study, we tested the role of quinones. Quinones are present in the cytoplasm (where tau protein is also present) and in mitochondria, where they play a role in the respiratory chain. Toxic compounds, such as HNE, products of oxidative stress, could play a role in AD and are also formed in the cytoplasm and mitochondria. Among the different quinones tested, we have found that juglone, 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone, a compound that can bind to different molecules (31–33), facilitates the assembly of phosphotau 2R to a similar level to that found after HNE addition (Figure 4), as determined by employing centrifugation to isolate the pelleted (aggregated) protein fraction. Unmodified tau 2R assembles to a less extent (Figure 4). Protein characterization of the pelleted protein indicated the presence of tau 2R monomers and also cross-linked tau 2R

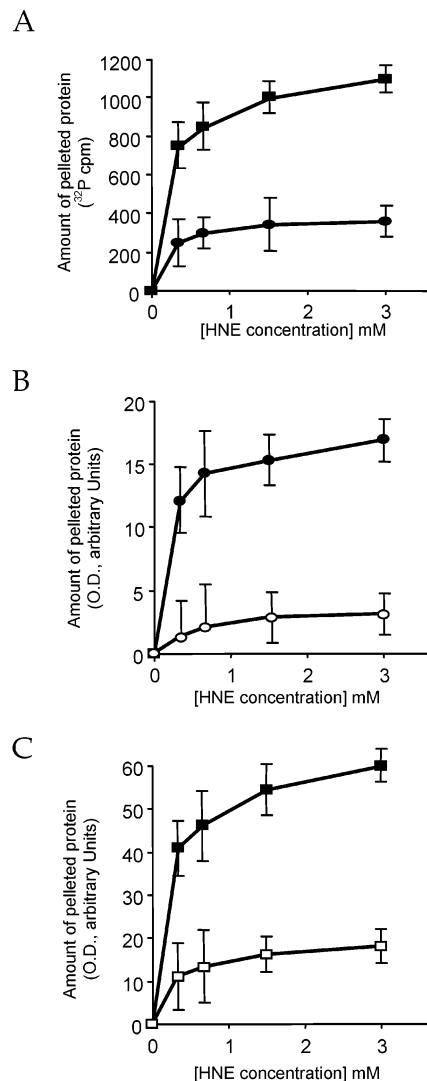
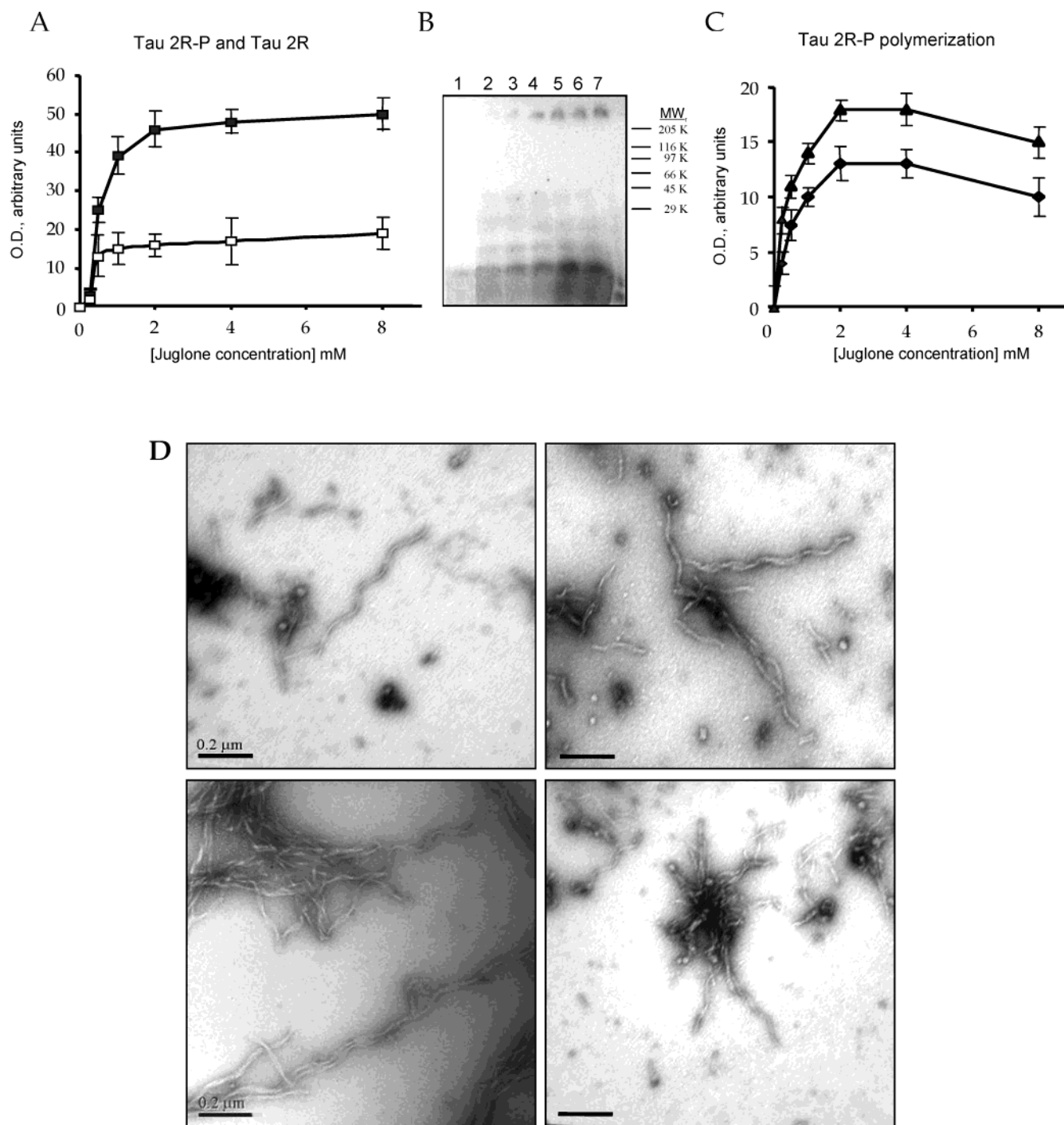


FIGURE 3: Protein aggregation in the presence of increasing HNE concentrations. In panel A, 4  $\mu\text{g}$  of tau (●) and of tau 2R (■) in phosphorylated form labeled with  $^{32}\text{P}$  were incubated with different HNE concentrations, and the protein present in aggregated form was determined by centrifugation in a Beckman airfuge, and quantification of the pelleted protein was performed by measuring  $^{32}\text{P}$  radioactivity or by autoradiography. The amount of tau (B) or tau 2R (C) in phospho (●, ■) or in unmodified form (○, □) present in aggregated form was determined in the same way, but the pelleted protein was identified by gel electrophoresis and Coomassie staining followed by densitometry of stained protein. The same amounts of phospho- and unmodified tau (180  $\mu\text{M}$ ) were used in the assay. Additionally, the amount of phosphotau (●) or phosphotau 2R (■) was determined by gel electrophoresis, autoradiography, and densitometry of the autoradiographed protein (see Materials and Methods). Error bars, from three different experiments, are shown.

oligomers in a constant ratio (Figure 4B,C). This observation suggests that such protein cross-linking plays a role in tau aggregation but also suggests that monomer tau is part of the assembled polymer. On the other hand, we have calculated that nearly 70% of the total protein could be present in aggregated form upon 8 mM juglone treatment for 1 day. To test for modified residues after juglone treatment, the treated protein was hydrolyzed and an amino acid analysis of the hydrolysate was done. The results (not shown) indicate a decrease (with respect to the untreated



**FIGURE 4:** Protein aggregation in the presence of increasing amounts of juglone. For panel A, the same amounts (180  $\mu$ M) of phosphorylated tau 2R (■) (labeled with  $^{32}$ P) or unmodified tau 2R (□) were mixed with increasing concentrations of juglone, and the amount of pelleted protein was determined by centrifugation and by measuring the  $^{32}$ P-associated radioactivity. The determination of the aggregation of tau 2R (□) in unmodified form was carried out as indicated in Materials and Methods. In panel B, the protein after adding increasing juglone concentrations (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, and 8 mM) present in the pellet fractions was characterized by gel electrophoresis followed by autoradiography. The electrophoretic mobility of molecular weight markers is indicated. In panel C, the proportions of tau 2R-P in monomer (▲) or oligomer (◆) forms were measured and are indicated with respect to juglone concentration. Panel D shows the morphology of tau 2R aggregates assembled in the presence of juglone. Different samples of phosphotau (modified by PKA) assembled in the presence of juglone are shown. A much lower amount of those filament aggregates were found by electron microscopy when unmodified tau was tested (not shown). Bars indicate 0.2  $\mu$ m.

sample) mainly of cysteine and histidine. This suggests that these are the main residues modified by juglone.

Phosphotau 2R fibrillar polymers were found when the protein was incubated with juglone (Figure 4D). These assembled polymers show a morphology similar to that of

paired helical filaments present in the brain of AD patients (see Figure 4 and Table 1).

*Effects of Other Quinones.* Other quinones such as lawsone, vitamin K<sub>1</sub>, and decylubiquinone were tested. These quinones, unlike juglone, did not promote phosphotau 2R

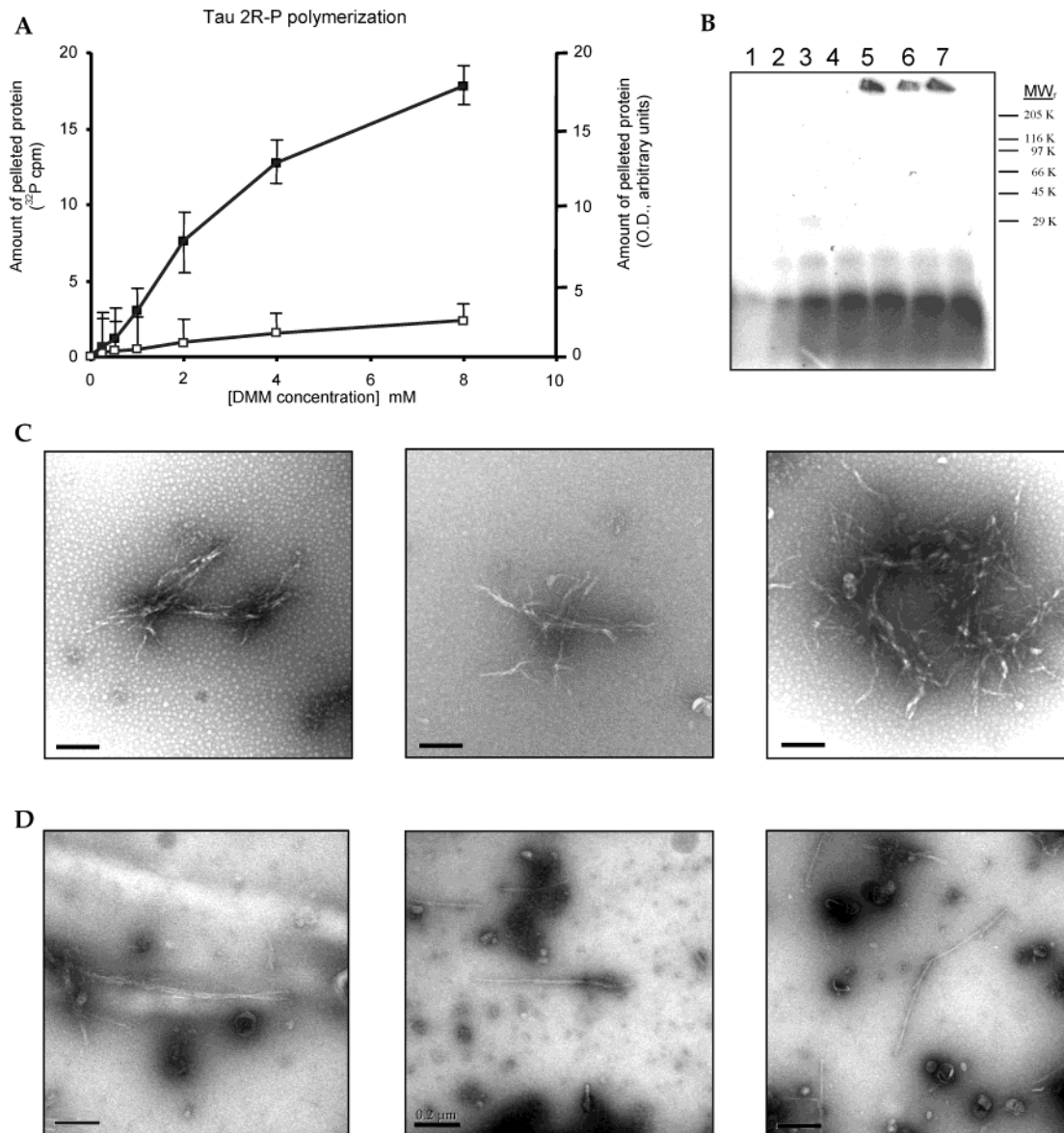


FIGURE 5: Tau 2R aggregation in the presence of DMM. For panel A, phosphotau 2R labeled with  $^{32}\text{P}$  was incubated in the presence of increasing concentrations of DMM and the amount of aggregated protein was measured by centrifugation and determination of the  $^{32}\text{P}$ -associated radioactivity in the pelleted fraction (■) (see left ordinate). The aggregation of the same amount of unmodified protein (□) (see right ordinate) has been also determined. In panel B, the protein after adding increasing DMM concentrations (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, and 8 mM) present in the pellet fractions was characterized by gel electrophoresis followed by autoradiography. The electrophoretic mobility of molecular weight markers is also indicated. Panel C shows the filament morphology of different samples of aggregated phosphotau 2R polymerized in the presence of 1 mM DMM. In panel D, different samples of phosphotau assembled in the presence of 1 mM menadione are shown. Bars indicate 0.2  $\mu\text{m}$ .

aggregation. In fact, preliminary experiments suggest that lawsone can partially inhibit the effect of juglone on promoting phosphotau 2R aggregation.

However, the addition of quinone 2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone (DMM or coenzyme  $\text{Q}_0$ ), menadione (Figure 5), or menadione sodium bisulfite (not shown), catalyzed the appearance of phosphotau 2R aggregates in a fashion similar to that of juglone (see below, Figure 5A,B,C). Figure 5 shows that phosphotau 2R aggregation in response to treatment with DMM was dependent on DMM concentration (Figure 5A). The appearance of the assembled tau polymers is shown (Figures 5B,C). Additionally, menadione (a compound that could also regulate tau phosphorylation at PDPK sites (34)) can induce the formation of phosphotau filaments (Figure 5D). Menadione sodium bisulfite also

Table 1: Features of Tau 2R-P Polymers Assembled in the Presence of Different Compounds and the Approximate  $\text{EC}_{50}$  Required for Assembly<sup>a</sup>

sample	compound	width ( $\text{\AA}$ )	$\text{EC}_{50}$ (mM)
tau 2R-P	heparin	$54 \pm 4$	<i>b</i>
tau 2R-P	HNE	$24 \pm 3$	2
tau 2R-P	juglone	$77 \pm 5$	0.4
tau 2R-P	DMM	$31 \pm 4$	2
tau 2R-P	menadione	$40 \pm 5$	5
PHFs		$94 \pm 8$	

<sup>a</sup> Samples were allowed to polymerize in the presence of different compounds (PHFs were used as control) and observed by electron microscopy. Photographs were taken, and 15 polymers of each sample were selected to measure their width as described in Materials and Methods. The results obtained are shown. Additionally, from the data shown in Figures 3, 4, and 5 and by use of a similar approach for menadione (not shown), the  $\text{EC}_{50}$  required for assembly was calculated. <sup>b</sup> See ref 20.

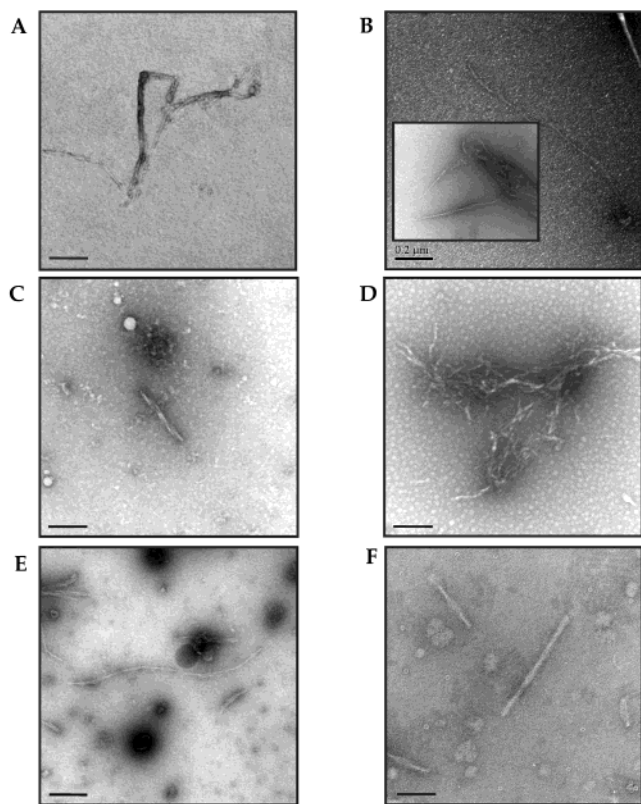


FIGURE 6: Comparison of tau 2R polymers assembled under different conditions. Panel A shows unmodified tau 2R assembled in the presence of heparin. Phosphotau 2R assembly in these conditions is slightly lower (not shown). Panel B shows phosphotau 2R assembled in the presence of HNE (the inset indicates a cluster of filaments). Phosphotau assembled in the presence of juglone (C), DMM (D) and menadione (E), and paired helical filaments (PHFs) isolated from a brain of an Alzheimer's disease patient (F) are also shown. Bars indicate 0.2  $\mu\text{m}$ .

promotes the formation of phosphotau filaments, although to a lesser extent than menadione (not shown).

**Comparison of Tau Polymers Assembled in Different Conditions.** We have compared the filaments assembled in response to different compounds, HNE, quinones, and heparin, with those filaments isolated from patients with AD (Figure 6). In Table 1 are indicated the different calibers of the different filaments, together with the  $EC_{50}$  needed for HNE and the different quinones to promote protein polymerization.

## DISCUSSION

In AD and other tauopathies, tau aggregates on filaments that are composed of assembled phosphotau (35, 36). Tau assembly likely requires, or is affected by, the presence of factors that facilitate its polymerization into fibrillar structures. Several factors that promote tau assembly *in vitro* have been identified. Heparin (and other polyanions) (16, 30), as well as a physiological role for heparin, have been suggested because of its presence in NFT (37). Additionally, polyglutamate (16, 38) and nucleic acids (39) facilitate tau assembly. More recently, it has been reported that  $\alpha$ -synuclein favors tau aggregation (40). Fatty acids, such as arachidonic acid or docosahexanoic acid, promote tau assembly (29, 41–44). A role for these fatty acids could be the basis for the reported interaction of tau with membrane components (45, 46). A peroxidation product of arachidonic

acid, hydroxynonenal (HNE), one that occurs in AD (47) and could facilitate tau phosphorylation (48), also facilitates the polymerization of phosphotau into fibrillar polymers (7). In our *in vitro* experiments, an effect was found at a HNE concentration of 100  $\mu\text{M}$ ; we do not know the concentration of HNE in cells (it cannot be greater to that of arachidonic acid), and therefore, we cannot indicate the possible physiological relevance of HNE effect, until that concentration can be measured in those locations where tau aggregates may assemble.

A common source for fatty acids and their oxidation products could be the mitochondrial membrane. A mitochondrial defect in AD has been suggested (49), and this defect could change the redox equilibrium. A peptide related to AD,  $\beta$  amyloid peptide, may play a pathological role by impairing mitochondrial function (50) related to the electron transport involving redox changes, a process where quinones are involved. In this work, we have shown that in the mitochondria, factors such as quinones that play a role in electron transport could also induce the assembly of tau in a pathological situation.

Mitochondrial quinones, such as coenzyme  $Q_{12}$ , could promote aging (51, 52), the highest risk factor known for AD. Other important quinones such as vitamin  $K_3$ , playing a role in vascular disorders, interfere with mitochondrial oxidative phosphorylation (53, 54). We speculate that such quinones could represent a risk for disorders involving oxidative stress, and perhaps AD is a prime example (55). Another quinone, juglone, has been widely used to study the function and dysfunction of several proteins (56–58). Other quinones, such as idebenone, have been used to correct mitochondrial defects (59). Juglone is mainly present in plant cells, and little is known about its presence in other cell types. More important could be the action of DMM (or coenzyme  $Q_0$ ) or that of menadione on tau assembly. DMM and menadione should be present in every cell, including neural cells, as an intermediate compound for the synthesis of other quinones. In this way, intracellular quinones may interact with and catalyze the assembly of tau protein.

Not all the quinones tested facilitate tau polymerization (Figure 7). For example, lawsone does not do it. A single difference between lawsone and menadione is that lawsone has a hydroxyl group in position 2, whereas menadione has a methyl group in that position. This would result in a different reactivity of the carbon in position 3, in each case, with tau protein. This different reactivity is also compatible with the fact that coenzyme  $Q_0$  but not decylubiquinone promotes the assembly of tau protein.

In the present work, we have found that *in vitro* treatment with juglone, DMM, or menadione promotes phosphotau 2R assembly. This tau fragment contains the minimal region of tau that is able to self-assemble (16). This fragment lacks the N-terminal and C-terminal regions, which also could have a regulatory effect on tau assembly (29, 60, 61). This tau fragment contains serine 262, a residue that can be phosphorylated by PKA to generate an epitope that can be recognized by Mab 12E8 (18). This antibody reacts with PHF-tau in Western blot analysis (5) but not in immunoelectron microscopy analysis (5). This indicates that in AD, tau is phosphorylated at that site prior to its assembly (Hernandez et al., *Neurobiology of Aging*, in press), and it



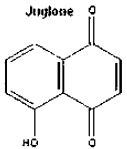
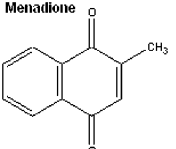
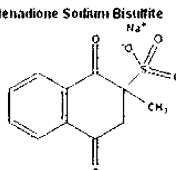
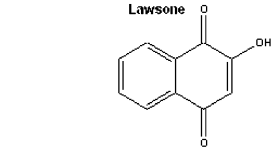
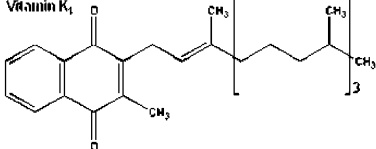
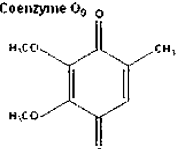
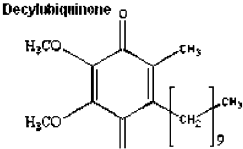
Group I Naphthoquinones		Group II Benzoquinones	
Tau assembly			
Does it	Does not	Does it	Does not
<p><b>Juglone</b></p>  <p><b>Menadione</b></p>  <p><b>Menadione Sodium Bisulfite</b></p> 	<p><b>Lawsone</b></p>  <p><b>Vitamin K<sub>1</sub></b></p> 	<p><b>Coenzyme Q<sub>9</sub></b></p> 	<p><b>Decylubiquinone</b></p> 

FIGURE 7: Structure of the quinones used in this study indicating their action on tau assembly.

is likely that this region, directly involved in tau–tau interactions, becomes buried in PHF structure (5).

By using tau 2R, we have mimicked the step that probably takes place in AD, involving tau phosphorylation by PKA followed by its assembly. This process can be promoted by treatment with compounds such as juglone, DMM, or menadione. It will be important to determine whether these or similar quinones could act inside the cell in a similar way to that found in vitro.

The present work suggests that tau 2R, once modified by PKA, provides a useful model with which to test the influence of PKA phosphorylation on tau assembly. It is not known whether phosphorylation by PKA will be found in every type of tau polymer. Upon the basis of the current, as well as previous, studies, it seems that PKA-catalyzed phosphorylation likely plays an important role in some of these tauopathies. One cannot rule out the possibility that in other cases the assembly of tau into polymers, like PHF, may require the presence of additional factors such as heparin (17, 30) or fatty acids. The assembly of the phosphorylated tau molecule itself may also require the participation of other protein kinases, such as GSK3, that can modify tau conformation (7).

In summary, our work suggests the possible involvement of components related to quinone metabolism (or to the incorporation of exogenous quinones that could be present in food) in the formation of tau filamentous polymers.

#### ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to Drs. Craig C. Malbon, Filip Lim, and Maria Parise for helpful discussions and critical reading of the manuscript and to Beatriz García Serelde, Raquel Cuadros, and Santiago Soto-Largo for skilful technical

assistance. We thank Prof. G. Perry (Cleveland, OH) for his advice and for providing HNE samples to us. This work was supported by grants from CICYT, Comunidad de Madrid, Fundación Lilly, and Neuropharma and by an Institutional Grant of Fundación R. Arecos.

#### REFERENCES

- 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.
- Kidd, M. (1963) Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease, *Nature* 197, 192–193.
- Alonso, A., Zaidi, T., Novak, M., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2001) Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 6923–6928.
- Bancher, C., Brunner, C., Lassmann, H., Budka, H., Jellinger, K., Wiche, G., Seitelberger, F., Grundke, I. I., Iqbal, K., and Wisniewski, H. M. (1989) Accumulation of abnormally phosphorylated tau precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease, *Brain Res.* 477, 90–99.
- Gordon-Krajcer, W., Yang, L., and 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, 163–175.
- Schneider, A., Biernat, J., von Bergen, M., Mandelkow, E., and 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, 3549–3558.
- Perez, M., Cuadros, R., Smith, M. A., Perry, G., and Avila, J. (2000) Phosphorylated, but not native, tau protein assembles following reaction with the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal, *FEBS Lett.* 486, 270–274.
- Morishima-Kawashima, M., Hasegawa, M., Takio, K., Suzuki, M., Yoshida, H., Titani, K., and Ihara, Y. (1995) Proline-directed and nonproline-directed phosphorylation of PHF-tau, *J. Biol. Chem.* 270, 823–829.
- Hanger, D. P., Hughes, K., Woodgett, J. R., Brion, J. P., and 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.
10. Ishiguro, K., Takamatsu, M., Tomizawa, K., Omori, A., Takahashi, M., Arioka, M., Uchida, T., and Imahori, K. (1992) Tau protein kinase I converts normal tau protein into A68-like component of paired helical filaments, *J. Biol. Chem.* 267, 10897–10901.
  11. 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.
  12. Scott, C. W., Spreen, R. C., Herman, J. L., Chow, F. P., Davison, M. D., Young, J., and 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, 1166–1173.
  13. Drewes, G., Lichtenberg, K. B., Doring, F., Mandelkow, E. M., Biernat, J., Goris, J., Doree, M., and Mandelkow, E. (1992) Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state, *EMBO J.* 11, 2131–2138.
  14. Jicha, G. A., Weaver, C., Lane, E., Vianna, C., Kress, Y., Rockwood, J., and Davies, P. (1999) cAMP-dependent protein kinase phosphorylations on tau in Alzheimer's disease, *J. Neurosci.* 19, 7486–7494.
  15. Grammas, P., Roher, A. E., and Ball, M. J. (1994) Increased accumulation of cAMP in cerebral microvessels in Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging* 15, 113–116.
  16. 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.
  17. Pérez Martín, C., Vázquez, J., Avila, J., and Moreno, F. J. (2002) P24, a glycogen synthase kinase 3 (GSK 3) inhibitor, *Biochim. Biophys. Acta* 1586, 113–122.
  18. Seubert, P., Mawaladewan, M., Barbour, R., Jakes, R., Goedert, M., Johnson, G. V. W., Litersky, J. M., Schenk, D., Lieberburg, I., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. Y. (1995) Detection of phosphorylated Ser(262) in fetal tau, adult tau, and paired helical filament tau, *J. Biol. Chem.* 270, 18917–18922.
  19. Moreno, F. J., Medina, M., Perez, M., Montejo de Garcini, E., and Avila, J. (1995) Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates recombinant human tau protein at serine-262 in the presence of heparin (or tubulin), *FEBS Lett.* 372, 65–68.
  20. Medina, M., Montejo de Garcini, E., and Avila, J. (1995) The role of tau phosphorylation in transfected COS-1 cells, *Mol. Cell. Biochem.* 148, 79–88.
  21. Goedert, M., and 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, 4225–4230.
  22. Moreno, F. J., and Avila, J. (1998) Phosphorylation of stathmin modulates its function as a microtubule depolymerizing factor, *Mol. Cell. Biochem.* 183, 201–209.
  23. 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. U.S.A.* 87, 5827–5831.
  24. Nieto, A., Correas, I., Montejo de Garcini, E., and Avila, J. (1988) A modified form of microtubule-associated tau protein is the main component of paired helical filaments, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154, 660–667.
  25. Crowther, R. A., Olesen, O. F., Smith, M. J., Jakes, R., and Goedert, M. (1994) Assembly of Alzheimer-like filaments from full-length tau protein, *FEBS Lett.* 337, 135–138.
  26. Arrasate, M., Pérez, M., Valpuesta, J. M., and Avila, J. (1997) Role of glycosaminoglycans in determining the helicity of paired helical filaments, *Am. J. Pathol.* 151, 1115–1122.
  27. Arrasate, M., Pérez, M., Armas-Portela, R., and Avila, J. (1999) Polymerization of tau peptides into fibrillar structures. The effect of FTDP-17 mutations, *FEBS Lett.* 446, 199–202.
  28. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680–685.
  29. Gamblin, T. C., Berry, R. W., and Binder, L. I. (2003) Tau polymerization: role of the amino terminus, *Biochemistry* 42, 2252–2257.
  30. Goedert, M., Jakes, R., Spillantini, M. G., Hasegawa, M., Smith, M. J., and Crowther, R. A. (1996) Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans, *Nature* 383, 550–553.
  31. Liu, R. M., Shi, M. M., Giulivi, C., and Forman, H. J. (1998) Quinones increase gamma-glutamyl transpeptidase expression by multiple mechanisms in rat lung epithelial cells, *Am. J. Physiol.* 274, L330–L336.
  32. Rappaport, S. M., Waidyanatha, S., Qu, Q., Shore, R., Jin, X., Cohen, B., Chen, L., Melikian, A. A., Li, G., Yin, S., Yan, H., Xu, B., Mu, R., Li, Y., Zhang, X., and Li, K. (2002) Albumin adducts of benzene oxide and 1,4-benzoquinone as measures of human benzene metabolism, *Cancer Res.* 62, 1330–1337.
  33. Chao, S. H., Greenleaf, A. L., and Price, D. H. (2001) Juglone, an inhibitor of the peptidyl-prolyl isomerase Pin1, also directly blocks transcription, *Nucleic Acids Res.* 29, 767–773.
  34. Ko, L. W., Odawara, T., and Yen, S. H. C. (1997) Menadione-induced tau dephosphorylation in cultured human neuroblastoma cells, *Brain Res.* 760, 118–128.
  35. Buee, L., Bussiere, T., Buee-Scherrer, V., Delacourte, A., and Hof, P. R. (2000) Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders, *Brain Res. Brain Res. Rev.* 33, 95–130.
  36. Goedert, M. (1999) Alzheimer's disease – Pinning down phosphorylated tau, *Nature* 399, 739–740.
  37. Perry, G., Siedlak, S. L., Richey, P., Kawai, M., Cras, P., Kalaria, R. N., Galloway, P. G., Scardina, J. M., Cordell, B., Greenberg, B. D., Ledbetter, S. R., and Gambetti, P. (1991) Association of heparan sulfate proteoglycan with the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease, *J. Neurosci.* 11, 3679–3683.
  38. Friedhoff, P., Schneider, A., Mandelkow, E. M., and Mandelkow, E. (1998) Rapid assembly of Alzheimer-like paired helical filaments from microtubule-associated protein tau monitored by fluorescence in solution, *Biochemistry* 37, 10223–10230.
  39. Kampers, T., Friedhoff, P., Biernat, J., Mandelkow, E. M., and Mandelkow, E. (1996) RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments, *FEBS Lett.* 399, 344–349.
  40. Giasson, B. I., Forman, M. S., Higuchi, M., Golbe, L. I., Graves, C. L., Kottbauer, P. T., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. (2003) Initiation and synergistic fibrillization of tau and alpha-synuclein, *Science* 300, 636–640.
  41. Gamblin, T. C., King, M. E., Dawson, H., Vitek, M. P., Kuret, J., Berry, R. W., and Binder, L. I. (2000) In vitro polymerization of tau protein monitored by laser light scattering: method and application to the study of FTDP-17 mutants, *Biochemistry* 39, 6136–6144.
  42. Gamblin, T. C., King, M. E., Kuret, J., Berry, R. W., and Binder, L. I. (2000) Oxidative regulation of fatty acid-induced tau polymerization, *Biochemistry* 39, 14203–14210.
  43. Abrahá, A., Ghoshal, N., Gamblin, T. C., Cryns, V., Berry, R. W., Kuret, J., and Binder, L. I. (2000) C-terminal inhibition of tau assembly in vitro and in Alzheimer's disease [In Process Citation], *J. Cell Sci.* 113, 3737–3745.
  44. Wilson, D. M., and Binder, L. I. (1997) Free fatty acids stimulate the polymerization of tau and amyloid beta peptides. In vitro evidence for a common effector of pathogenesis in Alzheimer's disease, *Am. J. Pathol.* 150, 2181–2195.
  45. Brandt, R., Leger, J., and Lee, G. (1995) Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain, *J. Cell Biol.* 131, 1327–1340.
  46. Arrasate, M., Perez, M., and Avila, J. (2000) Tau dephosphorylation at tau-1 site correlates with its association to cell membrane, *Neurochem. Res.* 25, 43–50.
  47. Takeda, A., Smith, M. A., Avila, J., Nunomura, A., Siedlak, S. L., Zhu, X., Perry, G., and Sayre, L. M. (2000) In Alzheimer's disease, heme oxygenase is coincident with Alz50, an epitope of tau induced by 4-hydroxy-2-nonenal modification, *J. Neurochem.* 75, 1234–1241.
  48. Mattson, M. P., Fu, W. M., Waeg, G., and Uchida, K. (1997) 4-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, inhibits dephosphorylation of the microtubule-associated protein tau, *Neuroreport* 8, 2275–2281.
  49. Hirai, K., Aliev, G., Nunomura, A., Fujioka, H., Russell, R. L., Atwood, C. S., Johnson, A. B., Kress, Y., Vinters, H. V., Tabaton, M., Shimohama, S., Cash, A. D., Siedlak, S. L., Harris, P. L., Jones, P. K., Petersen, R. B., Perry, G., and Smith, M. A. (2001) Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease, *J. Neurosci.* 21, 3017–3023.
  50. Anandatheerthavada, H. K., Biswas, G., Robin, M. A., and Avadhani, N. G. (2003) Mitochondrial targeting and a novel

- transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells, *J. Cell Biol.* 161, 41–54.
51. Echtay, K. S., Murphy, M. P., Smith, R. A., Talbot, D. A., and Brand, M. D. (2002) Superoxide activates mitochondrial uncoupling protein 2 from the matrix side. Studies using targeted antioxidants, *J. Biol. Chem.* 277, 47129–47135.
52. Berlett, B. S., and Stadtman, E. R. (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress, *J. Biol. Chem.* 272, 20313–20316.
53. Baldwin, J., Farajallah, A. M., Malmquist, N. A., Rathod, P. K., and Phillips, M. A. (2002) Malarial dihydroorotate dehydrogenase. Substrate and inhibitor specificity, *J. Biol. Chem.* 277, 41827–41834.
54. Tamura, K., Southwick, E. C., Kerns, J., Rosi, K., Carr, B. I., Wilcox, C., and Lazo, J. S. (2000) Cdc25 inhibition and cell cycle arrest by a synthetic thioalkyl vitamin K analogue, *Cancer Res.* 60, 1317–1325.
55. Smith, M. A., Sayre, L. M., Vitek, M. P., Monnier, V. M., and Perry, G. (1995) Early Aging and Alzheimer's, *Nature* 374, 316.
56. He, J., Lau, A. G., Yaffe, M. B., and Hall, R. A. (2001) Phosphorylation and cell cycle-dependent regulation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor-1 by Cdc2 kinase, *J. Biol. Chem.* 276, 41559–41565.
57. Kampkotter, A., Volkmann, T. E., de Castro, S. H., Leiers, B., Klotz, L. O., Johnson, T. E., Link, C. D., and Henkle-Duhrsen, K. (2003) Functional analysis of the glutathione S-transferase 3 from *Onchocerca volvulus* (Ov-GST-3): a parasite GST confers increased resistance to oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*, *J. Mol. Biol.* 325, 25–37.
58. Yao, J. L., Kops, O., Lu, P. J., and Lu, K. P. (2001) Functional conservation of phosphorylation-specific prolyl isomerases in plants, *J. Biol. Chem.* 276, 13517–13523.
59. Rustin, P., von Kleist-Retzow, J. C., Chantrel-Groussard, K., Sidi, D., Munnich, A., and Rotig, A. (1999) Effect of idebenone on cardiomyopathy in Friedreich's ataxia: a preliminary study, *Lancet* 354, 477–479.
60. Perez, M., Arrasate, M., Montejo De Garcini, E., Munoz, V., and Avila, J. (2001) In vitro assembly of tau protein: mapping the regions involved in filament formation, *Biochemistry* 40, 5983–5991.
61. Berry, R. W., Abraha, A., Lagalwar, S., LaPointe, N., Gamblin, T. C., Cryns, V. L., and Binder, L. I. (2003) Inhibition of Tau Polymerization by Its Carboxy-Terminal Caspase Cleavage Fragment, *Biochemistry* 42, 8325–8331.

BI035345J

# Phosphorylation modulates the alpha-helical structure and polymerization of a peptide from the third tau microtubule-binding repeat

Jesús Mendieta<sup>a,b</sup>, Miguel A. Fuertes<sup>a</sup>, Rani Kunjishapatham<sup>c</sup>, Ismael Santa-María<sup>a</sup>,  
Francisco J. Moreno<sup>a</sup>, Carlos Alonso<sup>a</sup>, Federico Gago<sup>b</sup>, Victor Muñoz<sup>c</sup>, Jesús Avila<sup>a,\*</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>Departamento de Farmacología, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain

<sup>c</sup>Department of Chemistry and Biochemistry and Center for Biomolecular Structure and Organization, University of Maryland, College Park, Maryland 20742, USA

Received 22 July 2004; received in revised form 10 September 2004; accepted 22 September 2004

Available online 19 October 2004

## Abstract

Paired helical filaments (PHFs) isolated from patients with Alzheimer’s disease (AD) mainly consist of the microtubule-associated protein tau in a hyperphosphorylated form. It has been found that PHFs are the first example of pathological protein aggregation associated with formation of  $\alpha$ -helices [Biochemistry (2002) 41, 7150–5]. In an effort to investigate the interplay between phosphorylation and the putative role of short regions of alpha-helix in the polymerization of tau, we have focused on the region of tau encompassing residues 317 to 335. This region is able to form protein fibrils in vitro and has two serines that are often found phosphorylated in PHFs. Using trifluoroethanol as an indicator of the alpha-helix, we find that the stability of the alpha-helix conformation is enhanced by phosphorylation. Circular dichroism data show that the phosphorylated peptide in water presents a content in alpha-helix similar to the unphosphorylated peptide at 40% of trifluoroethanol. Phosphorylation also stimulates the effect of juglone in promoting the in vitro polymerization. Furthermore, Fourier transformed infrared spectroscopy of samples of phosphorylated peptide polymerized with juglone renders a spectrum with maxima at  $\sim 1665$  and  $\sim 1675$   $\text{cm}^{-1}$ , which are suggestive of a mixture of turns and alpha-helix conformations. Our results provide a direct mechanistic connection between phosphorylation and polymerization in tau. The connection between phosphorylation and polymerization appears to involve formation of alpha-helix structure.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Phosphorylation; Tau; Alzheimer’s disease; Circular dichroism; Molecular dynamic; Fourier transformed infrared spectroscopy

## 1. Introduction

Alzheimer’s disease (AD) is characterized by the presence of two aberrant structures, senile plaques and neurofibrillary tangles (NFT). The main component of NFT is the paired helical filaments (PHFs) [1], which are mainly comprised of the protein tau in an abnormally phosphory-

lated status [2]. Tau was first isolated as a microtubule associated protein, since it co-purifies with microtubules and stabilizes them (for a review, see Ref. [3]). The binding of tau to microtubules was found to be through specific microtubule binding domains (MBDs). These domains are three or four imperfectly repeated sequences of 31 or 32 residues located in the C-terminal half of the tau molecule [4–6]. In AD, tau binds with lower affinity to microtubules and it self-aggregates into aberrant structures, probably helped by other molecules (for a review, see Ref. [7]). Proteolytic digestion of PHFs shows that the amino- and

\* Corresponding author. Tel.: +34 91 497 8443; fax: +34 91 497 4799.

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

carboxyl-terminal termini of tau protein form a coat around the filaments, while the MBDs form the core of the PHFs [8–10].

After the discovery that tau protein was the main component of PHFs, several attempts were made to obtain PHFs *in vitro*. It was reported that tau protein purified from brain extracts is able to aggregate *in vitro* although only at high concentrations [11–14]. This observation suggested that some other molecules might contribute to tau assembly. Sulfo-glycosaminoglycans (sGAG) received special attention mainly because they are present in the NFT [15,16]. *In vitro*, tau polymerization is facilitated by sGAG [17,18], with heparin being the most studied example. Similarly, other polyanions such as RNA [19] and polyglutamic acid [18,20] also favor tau aggregation. Fatty acids or fatty acid-like molecules [21–23] and the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) [24], enhance the polymerization of tau *in vitro*. Recently, several quinones, (e.g., juglone, coenzyme Q10 and menadione) have been described to induce the *in vitro* polymerization of tau into fibrillar structures [25]. The fact that peptides encompassing amino acids 306–311 [26] and 317–335 [18] polymerize into fibrillar aggregates suggests that the minimal region of tau able to self-assemble is localized in the third microtubule-binding repeat.

The role of phosphorylation in the self-assembly of tau is a fundamental question in the study of AD and other tauopathies. It has been suggested that phosphorylation of some specific tau sites may be a prerequisite for its assembly [27,28]. Some of these sites occur, indeed, in the PHF core-forming MBD domain. Serine-324 is part of the third microtubule-binding repeat and is phosphorylated by PKA [29]. Phosphorylation of serine-324 generates a putative consensus site for GSK-3 $\beta$  [30]. GSK-3 $\beta$  is identical to tau protein kinase I (TPK I), an enzyme that was identified in brain extracts because it could phosphorylate tau *in vitro* [31]. GSK-3 $\beta$  is one of the best candidate enzymes for generating the hyperphosphorylated tau that is characteristic of PHFs (for a review, see Ref. [32]). However, *in vitro* experiments to test the effect of phosphorylation on tau self-assembly have shown varied results, presumably reflecting slight differences in experimental conditions. In some experiments phosphorylated tau displays a decreased propensity to aggregate [33], whereas in other conditions the aggregation propensity increases [24]. Thus, discrepancy in the results can be due to differences in tau protein concentration or in the status of tau phosphorylation. In fact, phosphorylation of some regions can probably inhibit aggregation, while phosphorylation of other regions can induce tau polymerization. Compounds such as HNE [24] and several quinones [25] catalyze the formation of fibrillar aggregates of phosphorylated tau peptides, but fail to have an observable effect if the peptides are in a non-phosphorylated form.

Another fundamental question refers to the molecular structure of tau protein in the PHF particle. The current view is that pathological protein aggregation must involve formation of  $\beta$ -sheet structure giving rise to the typical amyloid fibrils [34]. The discovery of  $\alpha$ -helix structure in *ex vivo* PHFs [35] indicates that PHFs are not a typical case of amyloidosis. The role of  $\alpha$ -helix structure in PHF formation is also supported by recent work showing that the region implicated in forming the core of PHFs (i.e., MBD domain) becomes very  $\alpha$ -helix upon addition of the helix-promoting agent TFE [36–38]. The observation of electron diffraction patterns characteristic of crossed-beta structure in samples of Down-syndrome PHFs [39] and the identification of  $\beta$ -sheet structure in tau fibrils polymerized *in vitro* with heparin [39,40] support the role of  $\beta$ -structure in PHF formation.

The fact that phosphorylation of tau occurs in sites of the same region that is involved in forming the core of PHFs has led to suggestions that phosphorylation controls assembly. However, no mechanistic model of the interplay between phosphorylation and assembly has been proposed. Here, we attempt to address these issues using a peptide corresponding to tau region 317–335 as the simplest model system. Our results reveal a higher helical propensity of region 317–335 upon phosphorylation. Phosphorylation also facilitates the aggregation of region 317–335 into fibrillar polymers grown in the presence of juglone. FTIR analysis of these polymers indicates the presence of a mixture of turns and helical conformations, and the absence of  $\beta$ -structure. This is in sharp contrast to the structure of the polymers formed by a shorter peptide (306 VQIVYK 311, [26]) in the presence of heparin.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

5-Hydroxy-1,4-naphthoquinone (juglone, Ref. H4, 700-3) was obtained from Aldrich. ( $\gamma$ - $^{32}$ P) ATP was purchased from Amersham. ATP was purchased from Boehringer-Mannheim. The catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase (PKA, P 2645) and recombinant GSK-3 $\beta$  were purchased from Sigma. 2,2,2-Trifluoroethanol was from Fluka (TFE, Ref 91683). The peptide corresponding to residues 317–335 (1/2R peptide) of Tau protein (Fig. 1; KVTSKCGSLGNIHHKPGGG), the same peptide prephosphorylated (1/2R-P; KVTS(P)KCGS(P)LGNIHHKPGGG), and the peptide corresponding to residues 306–311 (VQIVYK) were chemically synthesized by Neosystem S.A. (Strasbourg, France).

### 2.2. Peptide phosphorylation

The phosphorylation of 1/2R peptide was performed as previously described [25]. Briefly, purified PKA and 4  $\mu$ g of peptide were used in a 12- $\mu$ l total volume of buffer

1	MAEPRQEFEV	MEDHAGTYGL	GDRKDOGGYT	MHQDQEGDTD	AGLKESPLQT
51	PTEDGSEEPG	SETSDAKSTP	TAEDVTAPLV	DEGAPGKQAA	AQPHEIPEG
101	TTAEEAGIGD	TPSLEDEAAG	HVTQARMVSK	SKDGTGSDDK	KAKGADGKTK
151	IATPRGAAPP	GQKGQANATR	IPAKTPPAPK	TPPSSGPEPK	SGDRSGYSSP
201	GSPGTPGSR	RTPSLPTPPT	REPKKVAVVR	TPPKSPSSAK	SRLQTAPVPM
251	PDLKNVSKI	GSTENLKHQP	GGGKVIINK	KLDLSNVQSK	CGSKDNIKHV
301	PGGGSVQIVY	KPVDLSKVTS	KCGSLGNIHH	KPGGGQVEVK	SEKLDKDRV
351	QSKIGSLDNI	THVPGGNKK	IETHKLTFRE	NAKAKTDHGA	EIVYKSPVVS
401	GDTSPRHLSN	VSSGTSIDMV	DSPQLATLAD	EVSASLAKQG	L

Fig. 1. Tau domains present in the largest CNS tau isoform. Shaded box, exons 2 and 3. Dotted box; the four microtubule-binding repeats. The 1/2R peptide is underlined. Asterisks indicate the Ser residues phosphorylated in the 1/2R-P peptide. Numbering of the amino acids is according to the longest human CNS tau isoform of 441 amino acids.

solution containing 50  $\mu$ M ATP. The cAMP kinase protein (100 ng/reaction) was performed in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA and 1  $\mu$ M okadaic acid buffer, at 37 °C. After 2 h of incubation, samples were boiled for 5 min to inactivate PKA. Then, 0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l recombinant GSK-3 $\beta$  and [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (20  $\mu$ M–1  $\mu$ Ci assay) were added. After 30 min, SDS-PAGE sample buffer was added to stop the reaction and samples were electrophoresed on a 15% SDS gel. The gels were vacuum-dried and autoradiographed. LiCl (20 mM) was used as specific GSK-3 $\beta$  inhibitor.

### 2.3. Molecular dynamics simulations

The peptide in  $\alpha$ -helical conformation was built using the biopolymer module of the Insight II program (Accelrys). Atomic charges for phospho-Ser residues were obtained with RESP program [41] so as to fit the molecular electrostatic potential calculated at 6-31G\* level of theory using the ab initio quantum mechanics program Gaussian98 [42].

Each molecular system was neutralized by the addition of the appropriate number of chloride ions and immersed in a rectangular box of TIP3P water molecules. Each water box extended 8 Å away of any solute atom, and the cutoff distance for non-bonded interaction was 10 Å. Periodic boundary conditions were applied and electrostatic interactions were represented using the smooth particle mesh Ewald method with a grid spacing of  $\sim$ 1 Å. Unrestrained molecular dynamics simulations (4 ns) at 298 °K and 1 atm were run for unphosphorylated, monophosphorylated and biphosphorylated peptides using the SANDER module of AMBER. SHAKE was applied to all bonds involving hydrogens, and an integration step of 2 fs was used.

### 2.4. CD measurements

Far-UV CD spectra were recorded using a Jasco spectropolarimeter, model 600 (Jasco Europe SLR) fitted to a thermostated cell holder at a temperature of 25 °C interfaced to a NESLAB RTE-100 water bath. The scan rate was 50 nm min<sup>-1</sup>, the time response was 2s, and the CD spectra were the mean of five accumulations for each run. A cell of 1-mm light path was used. Solutions of  $4 \times 10^{-2}$  mM of peptide with different proportions of TFE were scanned at room temperature. The results were expressed in term of mean residue ellipticity,  $[\theta]$ , in units of deg cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup>.

CD spectra were smoothed with Savitsky–Golay smooth function and arranged in a data matrix of ellipticity D (nR,nC), with as many nR rows as number CD spectra were recorded at each TFE proportion, and as many nC columns as wavelength was scanned during the run.

The more probable number of components is investigated simply from inspection of the magnitude of singular values of matrix D (Singular Value Decomposition). An initial estimation of the evolution of the components is obtained by Evolving Factor Analysis (EFA) [43]. From this estimation, a constrained Alternating Least Squares (ALS) optimization algorithm [44] is started to try to recover the correct set of concentration profiles and individual spectroscopic responses. This recovery is based on the assumption that the instrumental responses of the chemical contributions are bilinear, i.e., they can be expressed in a matrix equation like:

$$D = CS + E$$

where C is the matrix describing how the chemical contributions change (e.g., species distribution) with the

number of rows equal to the number of experimental measured CD spectra, and the number of columns equal to the number of proposed chemical contributions.  $S$  is the matrix of the pure individual spectroscopic contributions with the number of rows equal to the number of proposed chemical contributions and with the number of columns equal to the number of scanned wavelength.  $E$  is the residual matrix containing the variance not explained by  $C$  and  $S$ .

The ALS optimization procedure is started solving iteratively the equation previously given from an estimation of the concentration profiles and constraining at each stage of the iterative optimization the concentration profiles to be nonnegative. Details about the implementation of this method have been applied to study of conformational changes in protein previously [45,46].

The content of secondary structure was evaluated by least squares fitting deconvolution using as basis spectra corresponding to  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet and random coil [47].

### 2.5. Fourier transformed infrared spectroscopy

Fourier infrared absorption spectra were obtained in aqueous solution and dry film using a Digilab Excalibur FTS 3000 FTIR spectrometer equipped with a Harrick ConcentraIR horizontal multiple reflection (ATR) accessory. For each spectrum 1024 interferograms at  $4\text{ cm}^{-1}$  resolution were co-added, and then Fourier transformed using triangular apodization. Samples of each polymerization reaction were dried, resuspended in water, and then analyzed against a background of water.

### 2.6. Isolation of the paired helical filaments

Brain samples, supplied by Dr. Ravid (Netherlands Brain Bank, The Netherlands), from AD patients were used to isolate PHFs by following the procedure described previously [48]. The PHF samples were visualized by electron microscopy as described below.

### 2.7. Assembly of tau peptides into filaments

Filaments were grown by vapor diffusion in hanging drops in the standard way used for protein crystallization as previously indicated [11,49]. In a typical experiment,  $4\ \mu\text{g}$  of peptides was resuspended in  $20\ \mu\text{l}$  of buffer A (0.1 M MES, pH 6.4, 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$  and 2 mM EGTA) containing 50 mM NaCl plus DMSO (final concentration 0.5%) or juglone (2 mM). Filaments were obtained after incubation for 4 days at  $4^\circ\text{C}$ . The samples were visualized by electron microscopy.

### 2.8. Electron microscopy

Electron microscopy was performed after adsorption of the samples to electron microscopy carbon-coated grids and stained with 2% uranyl acetate for 1 min. Transmission

electron microscopy was performed in a JEOL Model 1200EX electron microscope operated at 100 kV.

## 3. Results

### 3.1. Molecular dynamics simulation

The relation between phosphorylation of tau protein and its aberrant assembly into PHFs [27,28], as well as the helical tendency of a peptide derived from the third MBD [36], strongly suggests that phosphorylation can be able to alter the secondary structure of some regions of tau protein. This structural modification can be an important issue in the aggregation process.

Molecular dynamics (MD) simulation is a useful tool to study the effects of covalent changes on peptide or protein structures. To test the hypothesis that phosphorylation could modify the stability of the helical structure of some MBD regions, we performed molecular dynamics simulations of the 1/2R peptide (Fig. 1). Simulations were carried out in the presence of explicit water molecules using as the starting conformation a peptide in which all residues presented the  $\Phi$  and  $\psi$  angles corresponding to a theoretical  $\alpha$ -helix ( $-57^\circ$  and  $-47^\circ$  respectively). Trajectories of 4 ns were performed for an unphosphorylated peptide, the peptide phosphorylated at residue Ser324, and the peptide phosphorylated at both Ser320 and Ser324. The stability of the putative  $\alpha$ -helix structure was monitored by the root mean square deviation (RMSD) of  $\text{C}\alpha$  atoms of all peptide residues using as reference the theoretical  $\alpha$ -helix. Due to the presence of a Pro and three Gly residues, which destabilize the  $\alpha$ -helix at the C-terminal extreme of the peptide, the RMSD of  $\text{C}\alpha$  atoms as far as residue 330 was also monitored. Fig. 2a shows that the helical structure of the unphosphorylated peptide progressively disorganized during the simulation. This disorganization affects the whole extension of the peptide as shown by RMSD of the peptide without the C-terminal Pro–Gly-rich fragment. The  $\alpha$ -helix structure of the Ser324-phosphorylated peptide presents more stability along the entire trajectory. The N-terminal fragment of the peptide was very stable during the firsts 2 ns. For the rest of the simulation this fragment becomes moderately unstable, but considering the whole extension of the peptide, a high helical structure was kept during the entire trajectory (Fig. 2b). The N-terminal fragment of the biphosphorylated peptide was highly stable during all the simulation (Fig. 2c). The moderate disorganization of the  $\alpha$ -helix observed during the trajectory seems to be due to the C-terminal Pro–Gly-rich fragment of the peptide.

Fig. 2d shows the ribbon representation of a theoretical  $\alpha$ -helix and the final structures corresponding to the three peptides used in the simulations. The  $\alpha$ -helix structure of the unphosphorylated peptide was broken just in the proximity of the phosphorylatable Ser residues, while both phosphorylated peptides keep a high helical structure at the

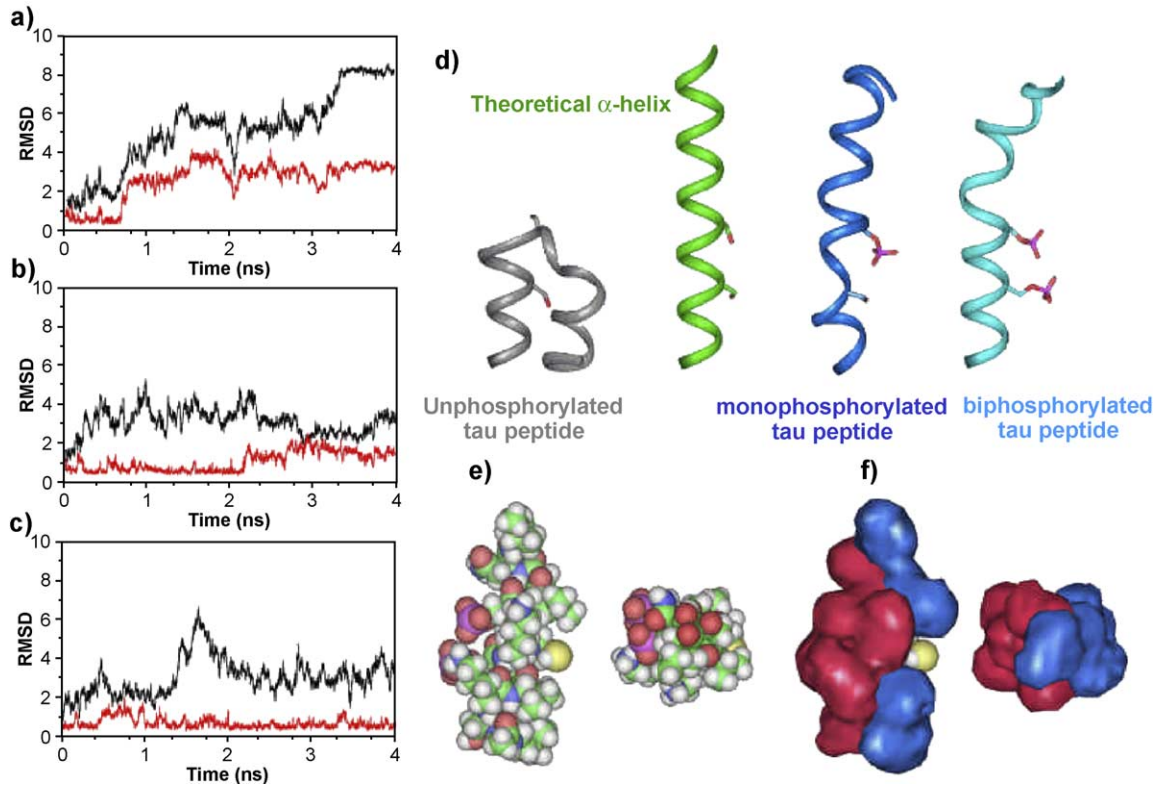


Fig. 2. (a) Root mean square deviations (RMSD) of C $\alpha$  atoms for all residues (black lines) and residues until the His 330 for the unphosphorylated, (b) the monophosphorylated and (c) the biphosphorylated 1/2R peptide. (d) Ribbon representation of the conformation of the initial theoretical  $\alpha$ -helix (green ribbon), and the final structures for the unphosphorylated (grey ribbon), the monophosphorylated (blue ribbon) and the biphosphorylated 1/2R peptide (cyan ribbon). (e) Representation of the atoms of the final structure obtained after molecular dynamics simulations of the phosphorylated peptide in a lateral view, and in the direction of the axis of the helix. (f) Similar views as in (e) but the atoms have been replaced by a surface formed by polar residues (red) and apolar residues (blue).

end of the simulations. Interestingly, in the case of the monophosphorylated peptide, the  $\alpha$ -helix was slightly distorted in the proximity of the phospho-Ser324 and the phosphorylatable Ser320. The biphosphorylated peptide keeps a structure very close to the theoretical  $\alpha$ -helix in the N-terminal fragment, including the two phospho-Ser, and the deviation of the helical structure was restricted to the Pro-Gly-rich fragment. The high stability of the biphosphorylated peptide could be due to strong interaction between the negatively charged phosphorylated residues and the Lys317 and Lys321 basic residues (not shown in Fig. 2d).

Our results suggest that the stability of the putative helical structure of the 1/2R peptide is highly influenced by its phosphorylation state. The  $\alpha$ -helix seems to be more stable when peptide is completely phosphorylated at Ser residues than in the non-modified peptide.

### 3.2. Tau 1/2R is phosphorylated by the priming kinase PKA and then by GSK-3 $\beta$

To demonstrate that the 1/2R peptide is phosphorylated in both serines, we focused our investigation in PKA and GSK-3. PKA is able to phosphorylate serine-324 [29] and

then generate a consensus site recognized by GSK-3 [30]. That motif is present in the peptide 1/2R prephosphorylated by PKA in serine-324 (Fig. 1). Thus, we prephosphorylate the peptide with or without PKA and unlabelled “cold” ATP, and later on with GSK-3 $\beta$  and [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (Fig. 3). The results demonstrate that the third MBD is modified by PKA and GSK-3, suggesting that PKA acts as a priming kinase for GSK-3. In fact, if the 1/2R peptide is not primed by PKA, GSK-3 $\beta$  is not able to incorporate  $^{32}$ P in the substrate. As a control, the effect of 20 mM LiCl, an inhibitor of GSK-3, is also shown.

PKA + ATP	-	+	+
GSK-3 $\beta$ + [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP	+	+	+
LiCl	-	+	-



Fig. 3. GSK-3 $\beta$  phosphorylates peptide 1/2R. GSK-3 $\beta$  phosphorylates a primed peptide prephosphorylated by PKA with “cold” ATP, while unprimed peptide is not phosphorylated by GSK-3 $\beta$ . As a control, GSK-3 $\beta$  was also incubated with 20 mM LiCl. The phosphorylation reactions were carried out as described in Materials and methods.



### 3.3. CD spectra of 1/2R and 1/2R-P in water and TFE solutions

Our results suggest that phosphorylation of residues Ser320 and Ser324 increases the stability of a putative  $\alpha$ -helix secondary structure of a peptide derived from the third MBD. A high helical content for a non-modified analogue peptide at TFE 100% (v/v) has been found [36]. With the aim of obtaining experimental support for our MD simulation results, we study the ability of TFE to induce helical structure in the biphosphorylated 1/2R peptide compared with the non-modified peptide. TFE is frequently used as a medium for determining the propensity to acquire  $\alpha$ -helix structure for polypeptides by CD spectroscopy, showing a relation between such propensity and the concentration at which the conformational change occurs [50].

Fig. 4 shows a 3D plot of the evolution of CD spectra corresponding to the unphosphorylated and the phosphorylated peptides. In both cases, spectra obtained in the absence of TFE were compatible with a very high content of random coil corresponding to a short peptide derived from an unfolded protein in native conditions. However, the behavior of the both peptides in the presence of TFE was different from usually observed in other peptides with helical propensity. No sharp transition between random coil and  $\alpha$ -helix spectra was found, but the shape of the spectrum changes softly to reach a plateau at intermediate concentrations of TFE. Only at higher concentration of TFE the spectrum corresponding to  $\alpha$ -helix appears. Such a behavior of the peptide makes it difficult to find significant differences in the helical propensity of the peptide in relation with the phosphorylation state. With the purpose to obtain all the structural information on the changes in the CD spectra, Factor Analysis techniques were applied to the study of the process as previously proposed [45,46]. CD data were arranged in a data matrix form (see Materials and

methods), and singular value decomposition was performed in order to discriminate if the data can be explained by a linear combination of two CD spectra. The singular value analysis of the data matrices corresponding to the unphosphorylated and the biphosphorylated peptides shows that in both cases only two components are necessary to explain the variation of the data, all other components are at the level of the background noise (data not shown). Furthermore, the singular value analysis of a matrix generated with the two sets of data can also be explained with two components (Fig. 5a). The result suggests that no additional components other than that present in the unphosphorylated peptide are necessary to explain the effect of phosphorylation in the peptide conformation.

An initial estimation of the concentration profiles corresponding to the two components can be obtained from evolving factor analysis and then the spectra for the components and the contribution of each to the spectra obtained at different concentrations of TFE were obtained using the ALS optimization algorithm (see Materials and methods). Fig. 5b shows the results of the factor analysis treatment of the matrix generated with the two sets of data. The spectra of the first component are in agreement with a high content of random coil. The relation among the ellipticity at 209 and 222 nm in the second component suggests a higher content of  $\alpha$ -helix. However, the evolution of the contribution of these two components shows a different profile for both peptides (Fig. 5c–d). In the case of the unphosphorylated peptide the first component is predominant at low concentration of TFE and decreases until 40% of TFE to reach a series of spectra in which the contributions of the two components are of the same order. Only for TFE concentration higher than 80% the second component becomes predominant. In the case of the biphosphorylated peptide the contribution of the second component is higher even at low concentration of TFE and becomes predominant at concentration higher than 50%.

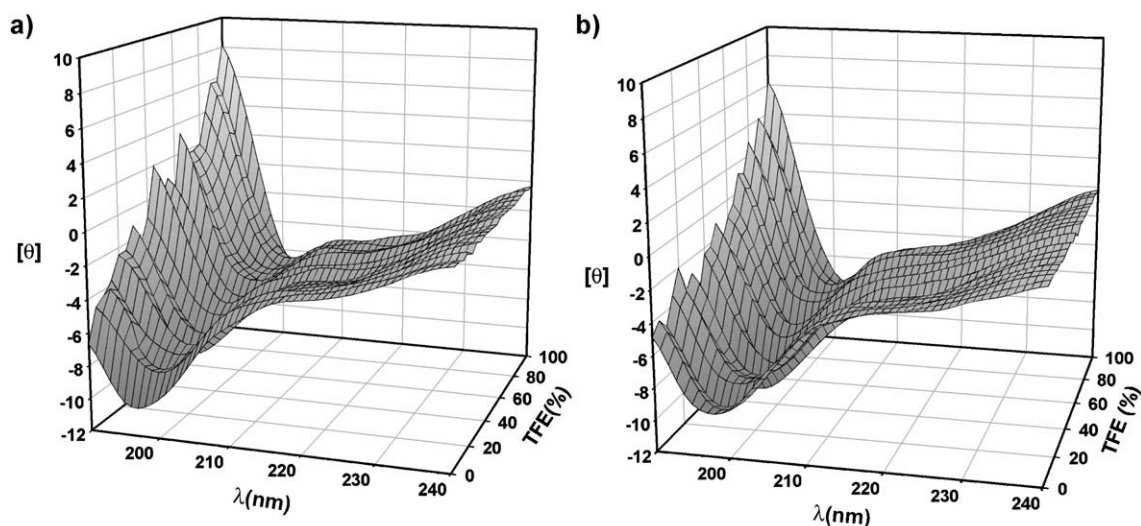


Fig. 4. Mesh 3D plot of the evolution of the CD spectra of 1/2R (a) and 1/2R-P (b) with increasing concentration of TFE.

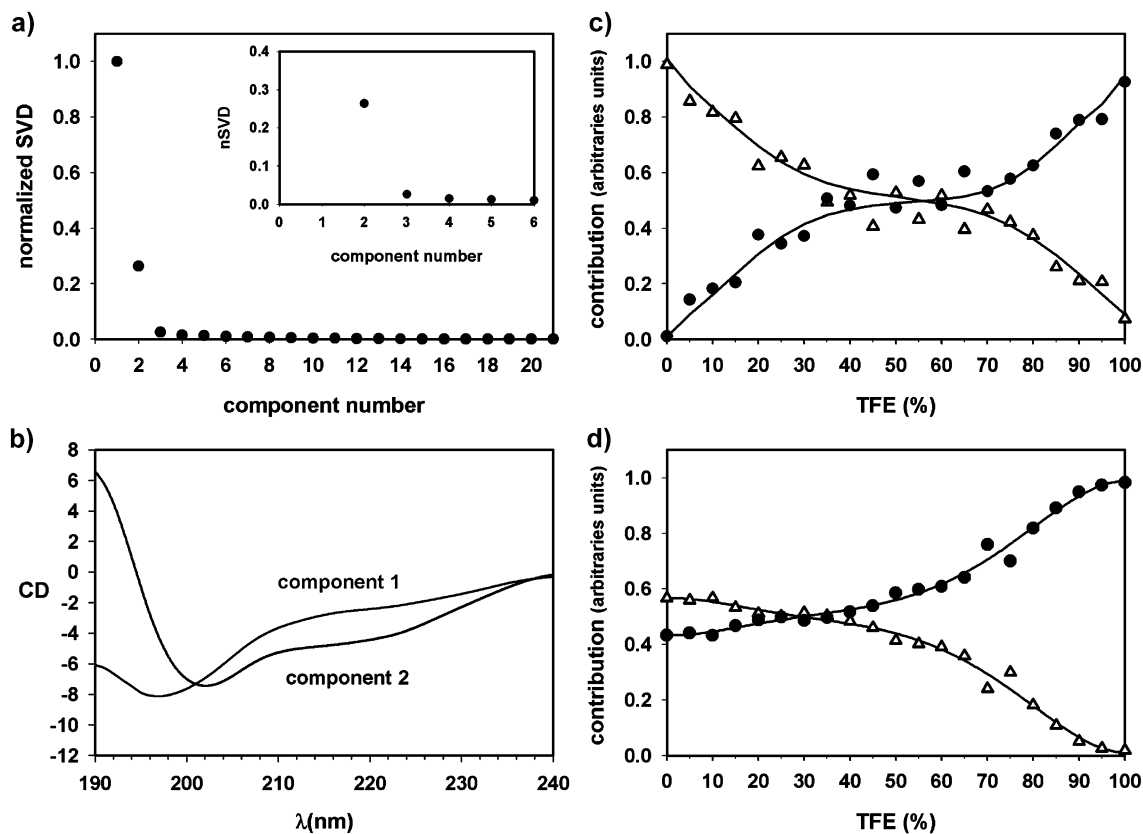


Fig. 5. (a) Singular value decomposition of the CD data matrix generated with the two sets of data from Fig. 4. (b) CD spectra of the two components obtained by Multivariate Curve Resolution of the data matrix. The evolution of the contribution of the components versus the concentration of TFE is shown for the unphosphorylated peptide (c) and the phosphorylated peptide (d).

More information about the conformational changes in the peptides can be obtained after deconvolution of the spectra of the two components to the basic spectra corresponding to  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet and random coil structures [47]. Once the secondary structure content of the spectra corresponding to the principal components has been estimated, the proportion of  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet and random coil present at each TFE concentration can be calculated taking into account the concentration profiles obtained by the ALS optimization method (Fig. 6). In both cases the peptides show a high content of random coil conformation which is not affected by the concentration of TFE. For the unphosphorylated peptide, at low TFE concentration the content of  $\beta$ -sheet decreases softly while the  $\alpha$ -helix content increases in the same proportion. At intermediate concentration of TFE the secondary structure of the peptide does not change. For a concentration higher than 60% the  $\beta$ -sheet is substituted by  $\alpha$ -helix to reach a content of this secondary structure around 45% and only residual content of  $\beta$ -sheet. In the case of the biphosphorylated peptide, the content of secondary structure at low concentrations of TFE was similar to that found in the case of the non-modified peptide at intermediate concentration. The  $\beta$ -sheet to  $\alpha$ -helix transition is initiated at 40% of TFE, a lower concentration than in the case of the unmodified peptide.

These results suggest a higher  $\alpha$ -helical propensity of the biphosphorylated peptide in relation to the unphosphorylated one, confirming the results obtained by MD simulations.

#### 3.4. Polymerization of the peptides in the presence of juglone

We have analyzed the propensity to self-assemble of both peptides in the presence of juglone, a quinone that has been described to induce tau polymerization *in vitro* [25]. No polymers were observed in the absence of juglone (data not shown), while bona fide filaments were obtained only when the peptide 1/2R-P was used (Fig. 7). The filaments obtained (Fig. 7C–D) have width and length similar to those of PHFs isolated from AD patients brains (Fig. 7A).

#### 3.5. FTIR analysis of polymerized samples

To investigate the molecular structure of the peptide in the polymeric structures, we measured the bulk FTIR spectrum of samples of each peptide after the polymerization reactions. Fig. 8a shows the amide I–amide II FTIR spectrum of a sample of peptide 317–335 biphosphorylated polymerized in the presence of juglone (dashed line), and a sample of a shorter peptide from the same region (306

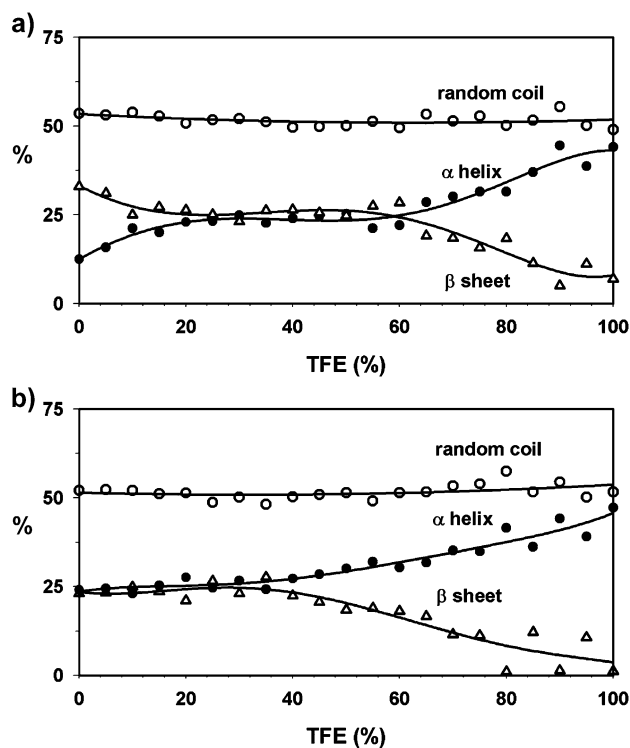


Fig. 6. The evolution of the contribution of  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet and random-coil versus the concentration of TFE for the unphosphorylated (a) and the phosphorylated peptide (b).

VQIVYK 311; Ref. [26]) polymerized with heparin (continuous line). Fig. 8b shows the second derivative spectrum of the data shown in Fig. 8a using the same color-coding. The short peptide polymerized with heparin has a broad amide I spectrum with a maximum at  $\sim 1670\text{ cm}^{-1}$  and a distinct shoulder at  $1620\text{ cm}^{-1}$ . The second derivative spectrum reveals that the shoulder at  $1620\text{ cm}^{-1}$  is produced by a sharp peak that corresponds to formation of crossed-beta structure [51]. The maximum at  $1670\text{ cm}^{-1}$  is due to a broader band characteristic of turns and/or beta. Samples of peptide 317–335 polymerized with juglone have a very different FTIR spectrum. The maximum is still found at  $\sim 1670\text{ cm}^{-1}$ , but the band at  $1620\text{ cm}^{-1}$  is totally absent. The absence of the  $1620\text{ cm}^{-1}$  band permits to unambiguously assign the peak at  $1670\text{ cm}^{-1}$  to turn conformations. The second derivative spectrum reveals that together with the major band at  $1670\text{ cm}^{-1}$ , there are two other bands of lower intensity at  $1685$  and  $1655\text{ cm}^{-1}$ , which can be assigned to turn and  $\alpha$ -helix conformations, respectively [52].

#### 4. Discussion

Knowing what regions of the protein tau are involved in its aggregation into aberrant filaments and what molecular structure is induced by aggregation are critical steps towards understanding the mechanisms involved in the pathological aggregation of tau. Tau protein is a natively unfolded protein,

but PHFs isolated from brain of people with AD have  $\alpha$ -helical structure [35]. The concomitant appearance of  $\alpha$ -helix structure and aggregation of tau indicates that the two processes are intertwined. Secondary structure prediction algorithms suggest that the MBD region of tau has significant propensity to form  $\alpha$ -helices [7]. By carrying out molecular dynamics simulations we find that the propensity of a short segment of tau protein located in the third MBD (residues 317 to 335, the peptide 1/2R) to populate  $\alpha$ -helix conformations seems to be higher when the peptide is phosphorylated in two serine sites. We have experimentally confirmed this prediction by analyzing the secondary structure of peptide 317–335 in non-phosphorylated and biphosphorylated forms using circular dichroism as a function of increasing amounts of TFE. This analysis shows that the highest  $\alpha$ -helix population is for the biphosphorylated peptide, and the lowest for the non-phosphorylated one. Furthermore, the assembly of these peptides in the presence of quinones is strongly facilitated by phosphorylation. The CD spectrum of the biphosphorylated peptide in the absence of TFE is similar to the spectrum of the unphosphorylated peptide at low concentration of TFE ( $<10\%$  [TFE]  $>40\%$ ). Interestingly, the polymerization of a similar non-phosphorylated peptide is favored in similar TFE concentrations [38].

Tau protein purified from brain extracts or recombinant tau is able to aggregate in vitro at high concentrations of protein [11–14]. However, to study the mechanism of tau aggregation using the full-length tau molecule is difficult because some regions of the protein act as inhibitors of tau polymerization. Furthermore, even if full-length tau obtained by recombinant means was used, this protein does not mimic the phosphorylation state of tau molecules comprising PHFs. Therefore, in spite of the growing amount of data suggesting that different domains of the protein may have different secondary structures (for a review, see Ref. [7]), we have decided to approach the problem studying these factors in small fragments of tau. Fragments from the tubulin-binding motif of tau can assemble into filaments in vitro. We have previously reported that the peptide 1/2R (contained in the third MBD) is possibly the minimal segment of that region able to grow in vitro into filaments in the presence of heparin [18,53]. This suggests that the ability of tau for self-assembly could be localized in a short sequence of amino acids present in the tubulin-binding repeats of the tau molecule, as it has been previously suggested [11,14].

Our analysis is germane to two open questions in the field of PHF formation. The first question refers to the contribution of  $\alpha$ -helix/ $\beta$ -sheet to the structure of in vivo PHF filaments. The second question is related to the contribution of phosphorylation to the formation of PHFs. In respect to the first point, the third tubulin-binding repeat can be separated in three segments: the short peptide 306 VQIVYK 311, which has been found to aggregate in vitro [26] in agreement with the conclusions of a comprehensive study on the aggregational properties of short peptides [54]; a peptide comprising the residues 314 DLSKVTS 320,

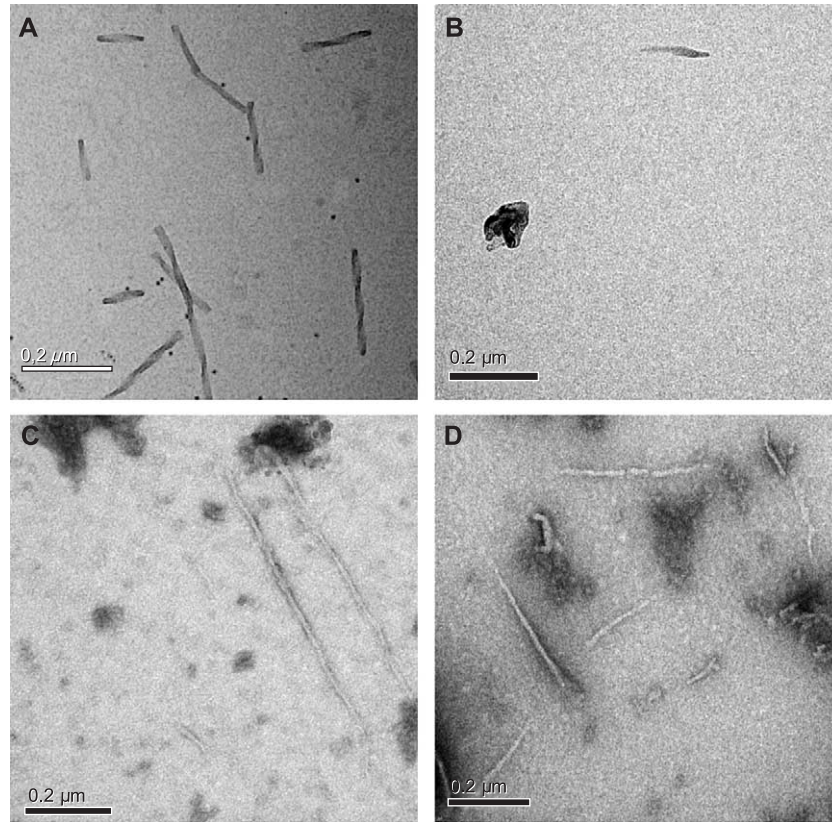


Fig. 7. Electron microscopy of negatively stained filaments. (A) PHFs isolated from human samples. (B–D) Morphology of filaments assembled in the presence of juglone by using unphosphorylated peptide (B) or phosphorylated peptide (C–D). The samples were treated as described in Materials and methods. Scale bar represents 200 nm.

which seems to also play an important role in the polymerization process of tau [55]; finally, the peptide 1/2R (KVTSKCGSLGNIHHGKPGGG), which is also able to self-assemble into fibrillar aggregates *in vitro* [18,53] while it displays significant  $\alpha$ -helix propensity (our data and [36,56]). Thus, the assembly of full-length tau is expected to involve contributions from each of these regions from the third MBD. Interestingly, it has been recently described that the isolated third MBD assembles more efficiently than the second MBD, although both domains have similar amino acid sequences [37]. All these data suggest a key role for the third MBD in tau polymerization. In another recent

publication it has been reported that assembly of the fourth MBD is most favored in concentrations of TFE ranging from 10% to 30% [38]. Based on this observation, the authors propose that the aggregation competent state involves a conformation with intermediate  $\alpha$ -helical content [38]. Our results add new and important information to the question of the contribution of  $\alpha$ -helix to the polymerization of tau protein (see Ref. [7]). We have here confirmed previous results [36,37] indicating that the third MBD populates  $\alpha$ -helix conformations in TFE. We also find that the peptide 1/2R biphosphorylated has a higher propensity to form  $\alpha$ -helical structures than the unphosphorylated one.

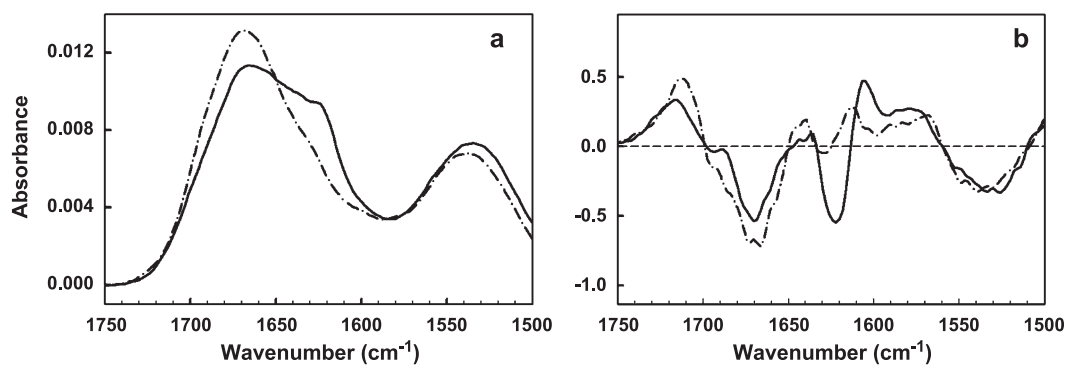


Fig. 8. FTIR analysis of samples of polymerized peptides. (a) Amide I–amide II region of the infrared spectrum of peptide 317–335 polymerized with juglone (dashed line), and peptide 306 VQIVYK 311 polymerized with heparin (continuous line). (b) Second derivative of the amide I–amide II spectra shown in a.

Furthermore, the FTIR spectrum of the juglone-induced polymers of the phosphorylated peptide indicates that the peptide is forming a mixture of turn and  $\alpha$ -helical conformations. These results are in agreement with the idea of the intermediate conformations being the aggregation competent state. Moreover, our results clearly show that the molecular structure of these aggregates is very different from that of the short peptide 306–311 polymerized with heparin. Thus, our findings support the idea that polymerization of MBD in the presence of juglone occurs through formation of partially  $\alpha$ -helical conformations, which are stimulated by phosphorylation. The amphipathic nature of the peptide 1/2R (Fig. 2e–f) suggests a mechanism for polymerization in which the interaction between two amphipathic  $\alpha$ -helices is the first step in polymerization. It can be matter of discussion if, after the interaction of the phosphorylated third MBD, PHF formation is facilitated in vivo by only some of the compounds that induce tau assembly in vitro, such as quinones and HNE. Another interesting issue is whether other tau domains are necessary for the tau assembly into bona fide filaments. In any event, the higher propensity to form  $\alpha$ -helical structure of 1/2R biphosphorylated peptide supports a physiological role for phosphorylation and  $\alpha$ -helix formation.

## Acknowledgements

We are grateful to Elena Langa and Raquel Cuadros for laboratory technical assistance. This work was supported by grants from Fundación La Caixa, Spanish CICYT, Comunidad de Madrid, Fundación Lilly, and by an institutional grant from Fundación Ramón Areces.

## References

- [1] M. Kidd, Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease, *Nature* 197 (1963) 192–193.
- [2] I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, Y.C. Tung, M. Quinlan, H.M. Wisniewski, L.I. Binder, Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau ( $\tau$ ) in Alzheimer cytoskeletal pathology, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83 (1986) 4913–4917.
- [3] J. Avila, J.J. Lucas, M. Perez, F. Hernandez, Role of tau protein in both physiological and pathological conditions, *Physiol. Rev.* 84 (2004) 361–384.
- [4] G. Lee, N. Cowan, M. Kirschner, The primary structure and heterogeneity of tau protein from mouse brain, *Science* 239 (1988) 285–288.
- [5] M. Goedert, M.G. Spillantini, M.C. Potier, J. Ulrich, R.A. Crowther, 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 (1989) 393–399.
- [6] A. Himmler, Structure of the bovine tau gene: alternatively spliced transcripts generate a protein family, *Mol. Cell. Biol.* 9 (1989) 1389–1396.
- [7] T.C. Gamblin, R.W. Berry, L.I. Binder, Modeling tau polymerization in vitro: a review and synthesis, *Biochemistry* 42 (2003) 15009–15017.
- [8] H. Ksiezak-Reding, S.H. Yen, Structural stability of paired helical filaments requires microtubule-binding domains of tau: a model for self-association, *Neuron* 6 (1991) 717–728.
- [9] M. Goedert, M.G. Spillantini, N.J. Cairns, R.A. Crowther, Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms, *Neuron* 8 (1992) 159–168.
- [10] C.M. Wischik, M. Novak, P.C. Edwards, A. Klug, W. Tichelaar, R.A. Crowther, Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85 (1988) 4884–4888.
- [11] R.A. Crowther, O.F. Olesen, M.J. Smith, R. Jakes, M. Goedert, Assembly of Alzheimer-like filaments from full-length tau protein, *FEBS Lett.* 337 (1994) 135–138.
- [12] E. Montejo de Garcini, J. Avila, In vitro conditions for the self-polymerization of the microtubule-associated protein, tau factor, *J. Biochem. (Tokyo)* 102 (1987) 1415–1421.
- [13] E. Montejo de Garcini, J.L. Carrascosa, I. Correas, A. Nieto, J. Avila, Tau factor polymers are similar to paired helical filaments of Alzheimer's disease, *FEBS Lett.* 236 (1988) 150–154.
- [14] H. Wille, G. Drewes, J. Biernat, E.M. Mandelkow, E. Mandelkow, Alzheimer-like paired helical filaments and antiparallel dimers formed from microtubule-associated protein tau in vitro, *J. Cell Biol.* 118 (1992) 573–584.
- [15] M.G. Spillantini, M. Tolnay, S. Love, M. Goedert, Microtubule-associated protein tau, heparan sulfate and alpha-synuclein in several neurodegenerative diseases with dementia, *Acta Neuropathol. (Berl)* 97 (1999) 585–594.
- [16] G. Perry, S.L. Siedlak, P. Richey, M. Kawai, P. Cras, R.N. Kalaria, P.G. Galloway, J.M. Scardina, B. Cordell, B.D. Greenberg, et al., Association of heparan sulfate proteoglycan with the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease, *J. Neurosci.* 11 (1991) 3679–3683.
- [17] M. Goedert, R. Jakes, M.G. Spillantini, M. Hasegawa, M.J. Smith, R.A. Crowther, Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulfated glycosaminoglycans, *Nature* 383 (1996) 550–553.
- [18] M. Perez, J.M. Valpuesta, M. Medina, E. Montejo de Garcini, J. Avila, Polymerization of tau into filaments in the presence of heparin: the minimal sequence required for tau–tau interaction, *J. Neurochem.* 67 (1996) 1183–1190.
- [19] T. Kampers, P. Friedhoff, J. Biernat, E.M. Mandelkow, E. Mandelkow, RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments, *FEBS Lett.* 399 (1996) 344–349.
- [20] P. Friedhoff, A. Schneider, E.M. Mandelkow, E. Mandelkow, Rapid assembly of Alzheimer-like paired helical filaments from microtubule-associated protein tau monitored by fluorescence in solution, *Biochemistry* 37 (1998) 10223–10230.
- [21] D.M. Wilson, L.I. Binder, Free fatty acids stimulate the polymerization of tau and amyloid beta peptides. In vitro evidence for a common effector of pathogenesis in Alzheimer's disease, *Am. J. Pathol.* 150 (1997) 2181–2195.
- [22] T.C. Gamblin, M.E. King, J. Kuret, R.W. Berry, L.I. Binder, Oxidative regulation of fatty acid-induced tau polymerization, *Biochemistry* 39 (2000) 14203–14210.
- [23] C.N. Chirita, M. Necula, J. Kuret, Anionic micelles and vesicles induce tau fibrillization in vitro, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 25644–25650.
- [24] M. Perez, R. Cuadros, M.A. Smith, G. Perry, J. Avila, Phosphorylated, but not native, tau protein assembles following reaction with the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal, *FEBS Lett.* 486 (2000) 270–274.
- [25] I. Santa-María, F. Hernández, C. Pérez-Martín, J. Avila, F.J. Moreno, Quinones facilitate the self-assembly of the phosphorylated tubulin binding region of tau into fibrillar polymers, *Biochemistry* 43 (2004) 2888–2897.
- [26] M. von Bergen, P. Friedhoff, J. Biernat, J. Heberle, E.M. Mandelkow, E. Mandelkow, 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 (2000) 5129–5134.
- [27] C. Bancher, C. Brunner, H. Lassmann, H. Budka, K. Jellinger, G. Wiche, F. Seitelberger, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, H.M. Wisniewski, Accumulation of abnormally phosphorylated tau precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease, *Brain Res.* 477 (1989) 90–99.
- [28] W. Gordon-Krajcer, L. Yang, H. Ksiazek-Reding, Conformation of paired helical filaments blocks dephosphorylation of epitopes shared with fetal tau except Ser199/202 and Ser202/Thr205, *Brain Res.* 856 (2000) 163–175.
- [29] C.W. Scott, R.C. Spreen, J.L. Herman, F.P. Chow, M.D. Davison, J. Young, C.B. Caputo, Phosphorylation of recombinant tau by cAMP-dependent protein kinase. Identification of phosphorylation sites and effect on microtubule assembly, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 1166–1173.
- [30] S. Frame, P. Cohen, R.M. Biondi, A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation, *Mol. Cell* 7 (2001) 1321–1327.
- [31] K. Ishiguro, A. Shiratsuchi, S. Sato, A. Omori, M. Arioka, S. Kobayashi, T. Uchida, K. Imahori, Glycogen synthase kinase 3 beta is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments, *FEBS Lett.* 325 (1993) 167–172.
- [32] H. Eldar-Finkelman, Glycogen synthase kinase 3: an emerging therapeutic target, *Trends Mol. Med.* 8 (2002) 126–132.
- [33] A. Schneider, J. Biernat, M. von Bergen, E. Mandelkow, E.M. Mandelkow, Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (Ser262, Ser214) also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments, *Biochemistry* 38 (1999) 3549–3558.
- [34] L.C. Serpell, M. Sunde, C.C. Blake, The molecular basis of amyloidosis, *Cell. Mol. Life Sci.* 53 (1997) 871–887.
- [35] M. Sadqi, F. Hernandez, U. Pan, M. Perez, M.D. Schaeberle, J. Avila, V. Munoz, Alpha-helix structure in Alzheimer's disease aggregates of tau-protein, *Biochemistry* 41 (2002) 7150–7155.
- [36] K. Minoura, K. Tomoo, T. Ishida, H. Hasegawa, M. Sasaki, T. Taniguchi, Amphipathic helical behavior of the third repeat fragment in the tau microtubule-binding domain, studied by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294 (2002) 210–214.
- [37] K. Minoura, T.M. Yao, K. Tomoo, M. Sumida, M. Sasaki, T. Taniguchi, T. Ishida, Different associational and conformational behaviors between the second and third repeat fragments in the tau microtubule-binding domain, *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 545–552.
- [38] S. Hiraoka, T.M. Yao, K. Minoura, K. Tomoo, M. Sumida, T. Taniguchi, T. Ishida, Conformational transition state is responsible for assembly of microtubule-binding domain of tau protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315 (2004) 659–663.
- [39] S. Barghorn, P. Davies, E. Mandelkow, Tau paired helical filaments from Alzheimer's disease brain and assembled in vitro are based on beta-structure in the core domain, *Biochemistry* 43 (2004) 1694–1703.
- [40] J. Berriman, L.C. Serpell, K.A. Oberg, A.L. Fink, M. Goedert, R.A. Crowther, Tau filaments from human brain and from in vitro assembly of recombinant protein show cross-beta structure, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 9034–9038.
- [41] P. Cieplak, W. Cornell, C. Bayly, P. Kollman, Application of the multimolecule and multiconformational RESP methodology to bio-polymers: charge derivation for DNA, RNA and proteins, *J. Comput. Chem.* 16 (1995) 1357–1377.
- [42] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, V.G. Zakrzewski, J.A. Montgomery Jr., R.E. Stratmann, J.C. Burant, S. Dapprich, J.M. Millam, A.D. Daniels, K.N. Kudin, M.C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G.A. Petersson, P.Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J. Cioslowski, J.V. Ortiz, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, C. Gonzalez, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B.G. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, J.L. Andres, M. Head-Gordon, E.S. Replogle, J.A. Pople, *Gaussian 98*, Gaussian: Pittsburgh, PA 1998.
- [43] H. Gamp, M. Maeder, C. Meyer, A.D. Zuberbühler, Calculation of equilibrium constants from multiwavelength spectroscopic data model-free least-square refinement by use of evolving factor analysis, *Talanta* 33 (1986) 943–951.
- [44] R. Tauler, Multivariate Curve resolution applied to second order data, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 30 (1995) 133–146.
- [45] J. Mendieta, H. Folque, R. Tauler, Two-phase induction of the nonnative alpha-helical form of beta-lactoglobulin in the presence of trifluoroethanol, *Biophys. J.* 76 (1999) 451–457.
- [46] J. Mendieta, M.S. Diaz-Cruz, M. Esteban, R. Tauler, Multivariate curve resolution: a possible tool in the detection of intermediate structures in protein folding, *Biophys. J.* 74 (1998) 2876–2888.
- [47] Y.H. Chen, J.T. Yang, K.H. Chau, Determination of the helix and beta form of proteins in aqueous solution by circular dichroism, *Biochemistry* 13 (1974) 3350–3359.
- [48] S.G. Greenberg, P. Davies, A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (1990) 5827–5831.
- [49] M. Arrasate, M. Perez, R. Armas-Portela, J. Avila, Polymerization of tau peptides into fibrillar structures. The effect of FTDP-17 mutations, *FEBS Lett.* 446 (1999) 199–202.
- [50] M.K. Luidens, J. Figge, K. Breese, S. Vajda, Predicted and trifluoroethanol-induced alpha-helicity of polypeptides, *Biopolymers* 39 (1996) 367–376.
- [51] A.L. Fink, S. Seshadri, R. Khurana, K.A. Oberg, in: B.R. Singh (Ed.), *Infrared Analysis of Peptides and Proteins, Principles and Applications*, ACS Symposium Series, vol. 750, 2000.
- [52] S. Krimm, in: B.R. Singh (Ed.), *Infrared Analysis of Peptides and Proteins, Principles and Applications*, ACS Symposium Series vol. 750, 2000.
- [53] M. Perez, M. Arrasate, E. Montejo De Garcini, V. Munoz, J. Avila, In vitro assembly of tau protein: mapping the regions involved in filament formation, *Biochemistry* 40 (2001) 5983–5991.
- [54] M. Lopez De La Paz, K. Goldie, J. Zurdo, E. Lacroix, C.M. Dobson, A. Hoenger, L. Serrano, De novo designed peptide-based amyloid fibrils, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 16052–16057.
- [55] A. Abraha, N. Ghoshal, T.C. Gamblin, V. Cryns, R.W. Berry, J. Kuret, L.I. Binder, C-terminal inhibition of tau assembly in vitro and in Alzheimer's disease, *J. Cell Sci.* 113 (Pt. 21) (2000) 3737–3745.
- [56] R.W. Berry, A. Abraha, S. Galgalwar, N. LaPointe, T.C. Gamblin, V.L. Cryns, L.I. Binder, Inhibition of tau polymerization by its carboxy-terminal caspase cleavage fragment, *Biochemistry* 42 (2003) 8325–8331.

# Effect of quinones on microtubule polymerization: a link between oxidative stress and cytoskeletal alterations in Alzheimer's disease

Ismael Santa-María<sup>a</sup>, Mark A. Smith<sup>b</sup>, George Perry<sup>b</sup>, Félix Hernández<sup>a</sup>,  
Jesús Avila<sup>a,\*</sup>, Francisco J. Moreno<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco 28049, Madrid, Spain

<sup>b</sup>Institute of Pathology, Case Western Reserve University, Cleveland, OH 44106, USA

Received 8 July 2004; received in revised form 18 November 2004; accepted 23 November 2004

Available online 13 December 2004

## Abstract

Increases in the concentration of quinones, such as benzoquinone, in pathological processes mediated by oxidative imbalance play a role in the disorganization and disassembly of the microtubule network in both non-neural and neural cells. In this study, we show that the effects on microtubules appear to be a direct result of the action of the quinones on tubulin, the main component of microtubules, since tubulin modification by quinones, including benzoquinone and juglone, leads to aggregation into dimers and other oligomers. Therefore, quinones and quinone-mediated effects provide a mechanistic link between oxidative stress, microtubule disruption, neuronal dysfunction and death, i.e., key salient feature of Alzheimer's disease.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Quinone; Tubulin; Microtubule; Alzheimer's disease; Oxidative damage

## 1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most prevalent cause of dementia. Except for a small number of cases due to genetic mutations, the main proportion of AD cases are sporadic. While the etiology of the disease is still somewhat elusive, oxidative stress appears to play a key role in the onset and progression of the disease [1]. Additionally in affected neurons in the disease, a change in the cytoskeleton occurs such that a reduction of assembled microtubules is evident. This reduction, not found in control cases, is independent and probably previous to tau hyperphosphorylation or to other tau abnormalities found in AD [2,3]. Since oxidative stress temporally precedes tau alterations [1], a direct action on tubulin, due to the consequences of oxidative damage is possible.

One source for the initiation of oxidation damage could be the mitochondria, and a mitochondrial defect in AD has been indicated [4], a defect that could change the redox equilibrium (a process where quinones are involved), in the neuron. In this regard, it is suggested that increased levels of mitochondrial quinones, like Coenzyme Q<sub>12</sub>, could accelerate the aging process [5,6], which is the highest risk factor in AD. Coenzyme Q is an important player in maintaining the proton gradient across the mitochondrial membrane that drives ATP synthesis. During that process, the production of reactive oxygen species, which could be toxic for the cell, takes place. Additionally, higher concentrations of quinones are found in AD compared to controls [7], and, more recently, we showed that quinones favor tau aberrant assembly, similar to that occurring in AD [8].

In this work, given in some occasions the lack of correlation between tau alterations and reduction in microtubules [2], we tested whether increased levels of quinones could directly affect microtubule assembly. Our results show that two quinones, benzoquinone (a ubiquitous quinone

\* Corresponding author. Tel.: +34 91497 8460; fax: +34 91497 4799.

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

present in many cells) and juglone (a quinone from plant cells that has been widely used to study the function and dysfunction of several proteins) [9,10], dramatically reduced microtubule assembly.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Hydroquinone (Ref. H-9003), *p*-Benzoquinone (Ref. B-1266), 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone (juglone, Ref. H4, 700-3), GTP (Ref. G5884) and Albumin (Ref. A-9418) were purchased from Sigma. Tetramethyl-*p*-benzoquinone (Duroquinone, Ref. D22, 320-4) was purchased from Aldrich (Steinheim, Germany). Acrylamide/bisacrylamide solution was supplied by Bio-Rad. Polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon Pseq) was from Millipore Corp. The chemiluminescent detection kit (Western Light) was from Tropix. Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), EDTA, EGTA, 2-Mercaptoethanol, MES, PIPES and Tris were obtained from Sigma. Protease Inhibitor Cocktail was purchased from Roche (Ref. 1697498).

### 2.2. Tubulin isolation and polymerization

Tubulin was isolated from bovine brain by cycles of microtubule polymerization-depolymerization as previously described [11]. Tubulin (1.5 mg/ml) was polymerized by the addition of 0.1 mM GTP and incubation at 35 °C in a buffer A containing 100 mM MES at pH 6.5, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EGTA. Assembly of microtubule protein was determined by three types of analysis: First, electron microscopy, in which polymerized protein, absorbed onto coated grids and stained with 2% (w/v) uranyl acetate for 1 min, was visualized by transmission electron microscopy (JEOL Model 1200EX) operated at 100 kV [12]; second, by sedimentation analysis of the polymer [13]; and third, by light scattering [14].

### 2.3. Antibodies

For immunoblot analysis, we used anti-tubulin (1/1000; Roche Diagnostics) followed by relevant secondary antibodies (1/2000; DAKO).

For immunofluorescence, we used anti- $\beta$ -tubulin or anti- $\alpha$ -tubulin (1/500; Sigma) and anti-tub-tyr (1/200; Sigma). Actin filaments were observed by using phalloidin TRITC (1/300; Sigma). The secondary antibodies (Molecular Probes) were used at 1/400.

### 2.4. Preparation of human brain cell extract

Samples of temporal lobe from control ( $n=10$ , 70–87 years) and Alzheimer's disease ( $n=10$ , 74–85 years) patients were obtained from Netherland's Brain Bank (gift of Dr.

Ravid) or from Madrid's Brain Bank (gift of Dr. García de Yébenes). Human brain samples were homogenized in phosphate-buffered saline (PBS), pH=7.2. After centrifugation at 100,000 $\times g$  for 1 h, supernatants were analyzed by immunoblot using an anti- $\beta$ -tubulin antibody.

### 2.5. Immunoblot analysis

Human brain samples prepared as described above were analyzed by immunoblotting as previously described [12] using an antibody raised against  $\beta$ -tubulin (Sigma). This antibody recognizes an epitope located at the C-terminal of  $\beta$ -tubulin. Primary antibody dilution was (1/1000). Western blot analyses were also done on rat brain extracts using an antibody raised against actin (Sigma).

### 2.6. Cross-linking of tubulin

Tubulin (0.5–1.5 mg/ml), actin and albumin samples were incubated at 37 °C for 1 h in the presence of different amounts of benzoquinone or duroquinone. Reaction products were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Coomassie Blue Staining. SDS-PAGE was performed according to the procedure of Laemmli on 10% polyacrylamide gels [15].

Binding of quinones to cysteine residues was analyzed by incubation of tubulin (1.5 mg/ml) with benzoquinone (15  $\mu$ M) for 30 min at 37 °C, followed by incubation with NTCB [16], a compound that cleaves a protein at its cysteine residues. Cleaved protein was analyzed by gel electrophoresis followed by Western Blot using an antibody against  $\beta$ -tubulin (recognizing an epitope located at its C-terminal region).

### 2.7. Cell culture

#### 2.7.1. Primary culture

Hippocampal neurons were cultured as described by Banker and Cowan [17]. Pregnant wild type females were sacrificed at gestational day 18, and the embryos were removed in sterility. Dissociated hippocampal neurons were plated on glass cover slips coated with 1 mg/ml poly-L-lysine and then 20  $\mu$ g/ml laminin. After incubating in medium containing 10% horse serum (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) for 24 h, the medium was changed and supplemented with N2 and B27 (Gibco-BRL). At this point, neurons were treated with juglone and benzoquinone for 1 h.

For determining neurite length, 20 neurons from each condition were chosen. Using an image analysis system, the length of each neurite was measured.

#### 2.7.2. 3T3 cell culture

3T3 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum and 2 mM Glutamine in a humidified



atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. Proliferating 3T3 cells were plated on glass cover slips coated with 1 mg/ml poly-L-lysine, maintained in the same culture medium during 24 h and treated with juglone and benzoquinone for 30 min or 1 h at the indicated concentrations.

### 2.7.3. Determination of cell viability

Determination of cell viability was carried out by quantification of attached cells in tissue culture plates [18] or by flow cytometry. Additionally, staining of cell nuclei was done to look for apoptosis figures.

The extraction of unassembled tubulin in cultured cells was done after cell permeabilization with 0.02% saponin in a warmed (37 °C) buffer containing 80 mM PIPES pH 6.8, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 30%V/V glycerol and 1mM GTP (buffer E). Afterwards, the cells were washed twice with

warmed buffer E. The cells were fixed for immunofluorescence analysis, with methanol for microtubule analysis or with paraformaldehyde for actin analysis.

### 2.8. Immunofluorescence

#### 2.8.1. Primary culture immunofluorescence

After treatment, cells were fixed with 4% paraformaldehyde and 4% saccharose for 20 min at 37 °C, and then washed with PBS. Cells were then permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS for 5 min at room temperature, blocked with 5% BSA for 1 h, and incubated in primary antibodies in 1% BSA in PBS 1 h at room temperature. After washing three times with PBS, secondary antibodies were added for incubation for 1 h at room temperature. The cover slips were washed three times with PBS and

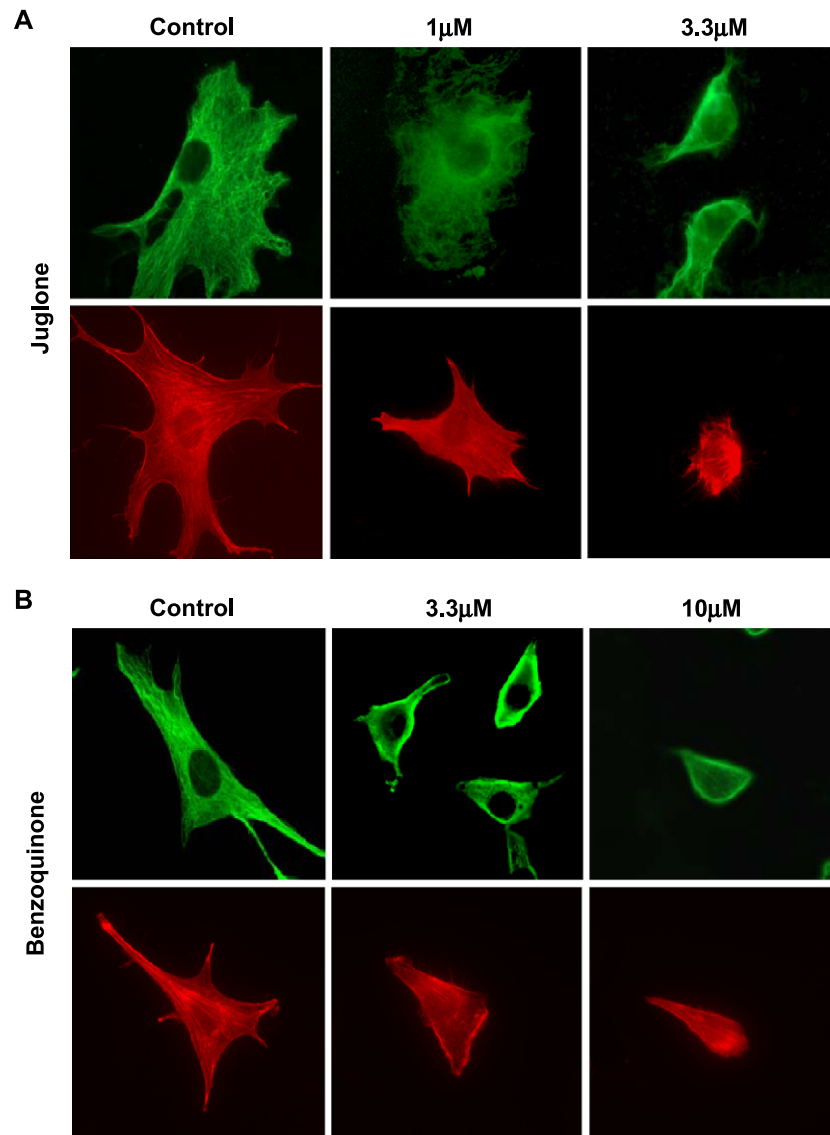


Fig. 1. Effect of quinones on microtubule network of cultured cells. (A) 3T3 cells were incubated 30 min in the absence (control) or in the presence of juglone at a concentration of 1 μM and 3.3 μM, or (B) benzoquinone at 3.3 μM and 10 μM. Upper panels shows the effect on microtubule network whereas lower panels indicate the effect on actin filaments.

once with H<sub>2</sub>O and mounted with FluorSave Reagent (Calbiochem).

### 2.8.2. 3T3 cells immunofluorescence

After treatment, 3T3 cells were fixed with either methanol (tubulin immunofluorescence) or 4% paraformaldehyde (actin immunofluorescence) for 20 min at 4 °C or 37 °C, respectively, and then washed with buffer A (0.1 M MES; 2 mM EGTA; 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>) or with phosphate buffered saline (PBS), respectively. Fixed cells were incubated with 1 M glycine 30 min then permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS or buffer A for 5 min at room temperature. The cover slips were blocked with 1% BSA/PBS or Buffer A for 1 h at room temperature and incubated in primary antibodies in 1% BSA, in PBS, or in buffer A, for 1 h at room temperature. After washing three times with PBS or with buffer A, the secondary antibodies were incubated for 1 h, at room temperature. Finally, the cover slips were washed three times with PBS or with buffer A and once with H<sub>2</sub>O, and mounted with FluorSave Reagent (Calbiochem).

## 3. Results

### 3.1. The addition of quinones promotes microtubule disassembly

As a first step to study the action of quinones on microtubule assembly, cultured (non-neural) 3T3 cells were incubated in the presence or absence of juglone or benzoquinone. Fig. 1A shows that in the presence of juglone, the microtubule network (upper part) was disrupted, whereas actin filaments can be observed (bottom of the figure); however, a reorganization of actin cytoskeleton could not be excluded. Fig. 1B shows similar results in the presence of benzoquinone. Also, similar results (data not shown) were found upon addition of dicumarol, a compound that increases quinone level in the cell [19].

The breaking down of microtubule network could result in cell death, as has been indicated for the addition of microtubule poisons like Nocodazol [20]. Upon drug addition, in a later stage to that of microtubule depolymerization, cells could enter in apoptosis [21].

Thus, we have tested cell death in the mouse cell line 3T3, in the presence of increasing amounts of quinones. Fig. 2 shows that the addition of quinones could result in a decrease in cell viability but it occurs at higher quinone concentrations and at longer treatment times of those required for microtubule depolymerization. Additionally, when cell nuclei were stained (DAPI), no apoptotic figures were found, after 1 h of treatment (not shown).

The previous results, showing an effect of quinones on microtubule network, were supported by *in vitro* experiments indicating that quinone addition prevents microtubule assembly (Fig. 3). In the presence of 15 μM benzoquinone,

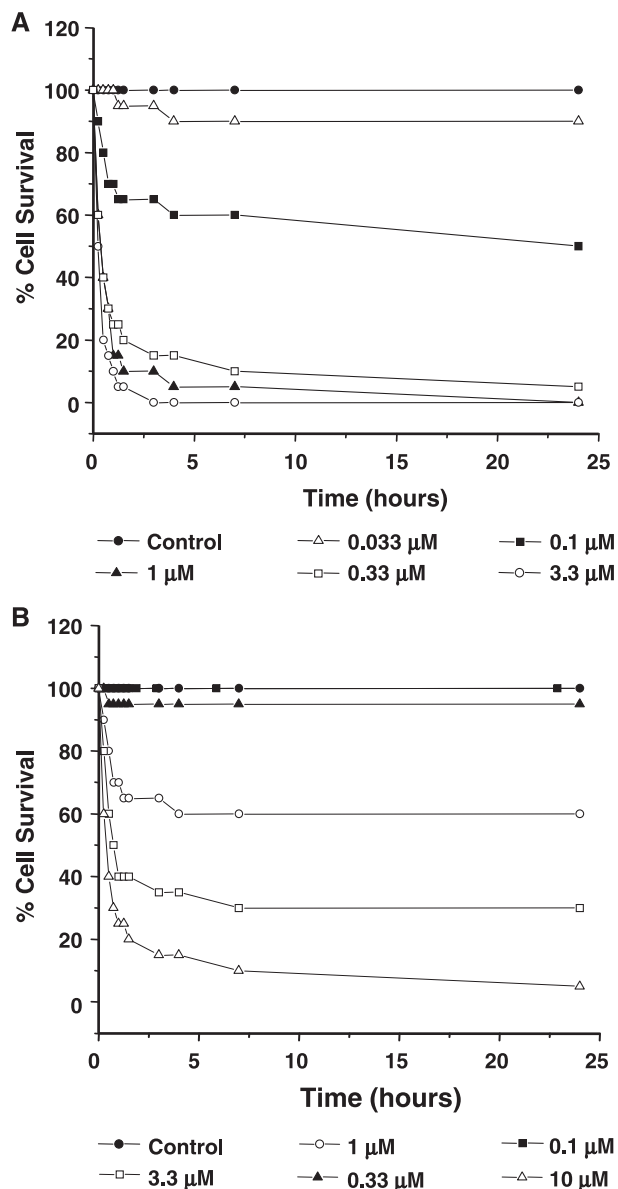


Fig. 2. Cell viability in the presence of quinones. (A) 3T3 cells were incubated with juglone at concentrations and times indicated, and cell viability was determined by quantification of attached cells in tissue culture plates [18]. (B) As in A but the incubation was done in the presence of different benzoquinone concentrations.

*in vitro*, a decrease of the 30–50% of polymerized tubulin was found compared with that of the control, in the absence of benzoquinone (Fig. 3B). As a control of specificity, a concentration 20 times larger of duroquinone, a molecule containing methyl groups at positions 2, 3, 5 and 6 of the benzoquinone ring, showed no effect on microtubule assembly (Fig. 3B).

The previous observations were further confirmed by light scattering analysis. Fig. 3C indicates the difference in tubulin assembly in the absence or presence of 30 μM benzoquinone.

Additionally, when tubulin, the main component of microtubules, was characterized after benzoquinone treat-

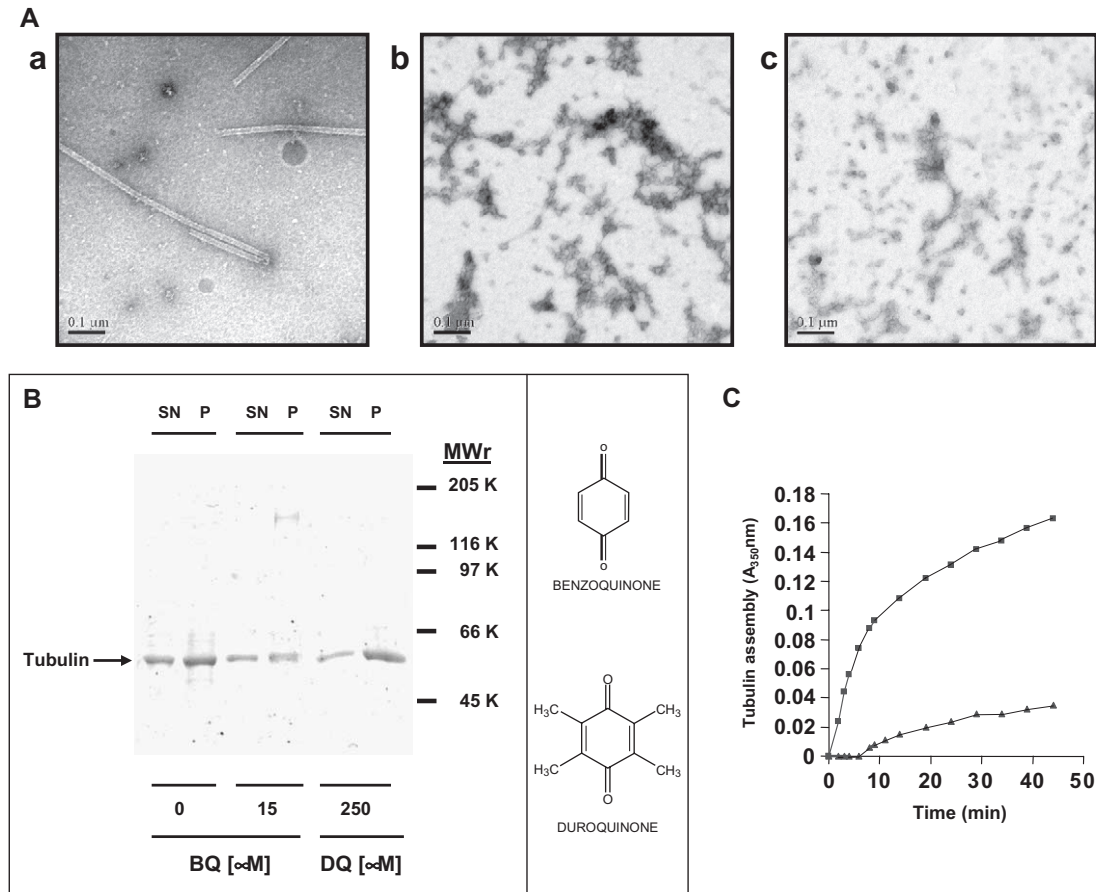


Fig. 3. Effect of quinones on the in vitro assembly of microtubules. (A) Rat brain microtubules were assembled in vitro in the absence (a) or in the presence (b) of 4  $\mu$ M juglone or in the presence of 30  $\mu$ M benzoquinone (c). (B) Characterization of the protein assembled (P) or not assembled (SN) on in vitro assay in the absence or in the presence of 15  $\mu$ M benzoquinone (BQ) or its structural analogs duroquinone (DQ) at 250  $\mu$ M. At the right, the structure of BQ and DQ are shown. (C) Effect of benzoquinone on tubulin assembly determined by light scattering. The assembly of tubulin is indicated in the absence ( $\blacksquare$ ) or presence ( $\blacktriangle$ ) of 30  $\mu$ M benzoquinone.

ment, a cross-linking of the protein was observed using a concentration up to 30  $\mu$ M (Fig. 4A). No such cross-linking was found for actin or albumin, tested under the same conditions (Fig. 4B).

Also, we have tested the proportion of assembled tubulin in the absence or presence of 1  $\mu$ M benzoquinone in cultured cells. To do that, cell membrane was partially dissolved by 0.02% saponin treatment and the unpolymerized tubulin was washed up.

Fig. 5A shows that after benzoquinone treatment, a decrease in the amount of assembled tubulin was found, and also a decrease in total tubulin was observed. In fact, a decrease in the immunofluorescence signal was shown by using the same exposure time for immunofluorescence analysis in treated and untreated cells. However, actin remains in polymerized form after benzoquinone treatment. Fig. 5B shows that in cells grown on polylysine, to facilitate the formation of stress fibers, treatment with benzoquinone does not change the formation of stress fibers, even in cells permeabilized with 0.02% saponin and washed to remove soluble tubulin.

Since in other proteins addition of quinones results in the modification of residues like cysteine [8,22,23] that could facilitate the cross-linking of the protein, the binding of benzoquinone to cysteine residues, in tubulin, was analyzed by incubation of the protein with benzoquinone, followed by incubation with NTCB, a compound that cleaves proteins at their unmodified cysteine residues [16].

Tubulin has 20 cysteine residues [24,25] that could have a variable reactivity [26]. Fig. 5C shows that upon incubation with 15  $\mu$ M benzoquinone, a decrease in the main tubulin NTCB-cleaved peptide was found. Thus, tubulin becomes more resistant to NTCB cleavage in the presence of the quinone. It suggests that cysteine is one of the residues involved in the binding of quinones to tubulin.

Other residue that could be modified by quinones is histidine [8]. To test if it is the case,  $\beta$ -tubulin peptide (FQLTHSLGGG, residues 133–142) was incubated with or without benzoquinone, and subjected to Edman's degradation. Only in the presence of benzoquinone, the lecture of the sequence was stopped at the histidine residue. It suggests that histidine is modified in the presence of the quinone.

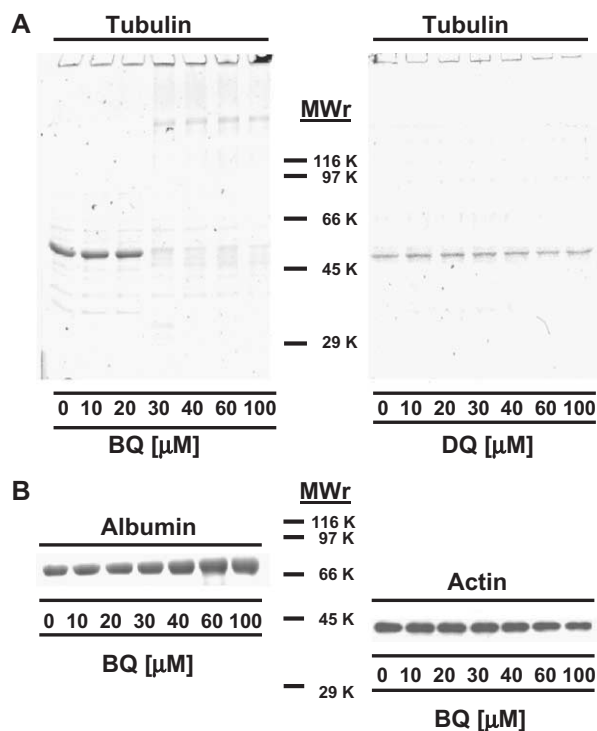


Fig. 4. Cross-linking of tubulin by benzoquinone. (A) Tubulin was incubated in the absence or in the presence of increasing concentrations of BQ or DQ. A clear cross-linking was found above 30  $\mu\text{M}$  BQ. (B) Albumin and actin (from a brain extract) were incubated without or with increasing concentrations of BQ. A lower cross-linking of these proteins, compared to that of tubulin, was found. Tubulin and albumin were detected by Coomassie blue staining. Actin was detected by Western blotting.

### 3.2. The addition of quinones results in the reduction of neurite length, in cultured neurons

Neurons develop cytoplasmic extensions (neurites) when cultured (Fig. 6). However, in the presence of added quinones, the length of neural (axon-like) processes of cells bearing neurites decreases (Fig. 6; Table 1). Since a relation between microtubule assembly and neurite extension is well known [27,28], it is likely that quinones prevent microtubule assembly (or stability) in these cultured neurons.

### 3.3. Microtubules in AD samples

Previous results demonstrated a reduction of polymerized microtubules in AD [2]. One possibility for this reduction is that tubulin (we have analyzed the  $\beta$ -tubulin subunit) from the brain of AD patients could be modified compared to that of controls. Fig. 7 shows that a proportion of AD tubulin is cross-linked, in a fashion similar to that shown in Fig. 3, for quinone-treated tubulin in 3 of 10 samples from AD patients tested and in 0 of 10 from controls. To determine the residues that could be modified, an amino acid analysis was done, and a decrease in the proportion of histidine was observed in AD samples ( $2.1 \pm 0.5\%$ ) compared to that of the control ( $2.7 \pm 0.2\%$ ) (see also Mazurkiewicz-Kwilecki, et al. *Can J Physiol Pharmacol.* 67(1) (1989)75–78 and Hobart et al., *Life Sci.* 75(11) (2004) 1379–1389). These data are compatible with a modification of tubulin in AD by quinones.

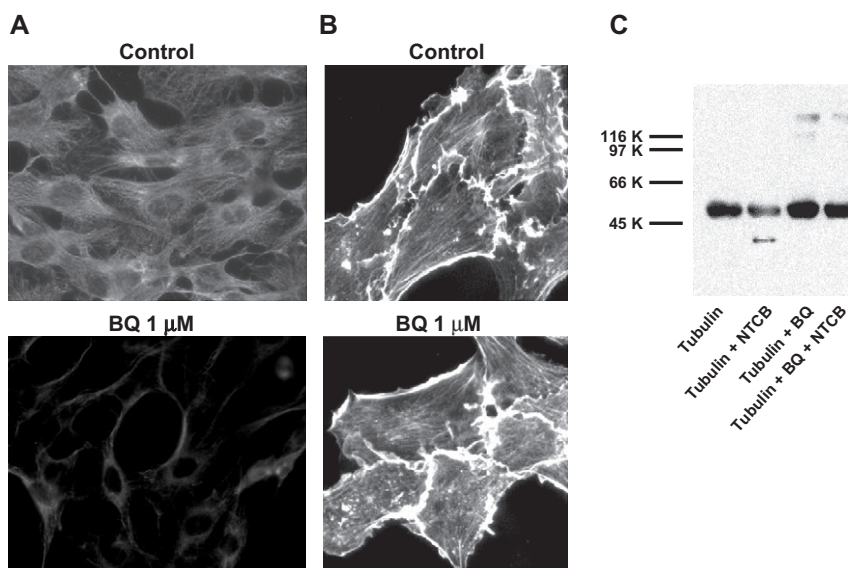


Fig. 5. Incubation with quinone, decreases amount of polymerized tubulin and prevents its cleavage by NTCB. (A) 3T3 cells were incubated in the absence (Control) or in the presence (BQ) of 1  $\mu\text{M}$ . The cells were permeabilized with 0.02% saponin and the unpolymerized tubulin was washed up (see Materials and methods). Then, the cells were fixed (with methanol) and immunofluorescence analysis was performed using a tubulin antibody. The exposure time was the same for untreated and BQ-treated cells. (B) In parallel, an analysis using an actin antibody was done in the same conditions than in A, except that the cells were grown in polylysine and fixed with paraformaldehyde (see Materials and methods). (C) Tubulin was incubated in the absence (a) or presence (b) of 15  $\mu\text{M}$  benzoquinone, and afterwards the protein was treated with NTCB to cleave it through its cysteine residues. The uncleaved and cleaved protein was analyzed by gel electrophoresis, followed by Western blot using an antibody raised against a  $\beta$ -tubulin peptide present at the C-terminal of the molecule (see Materials and methods). It was found a preferential cleavage in the absence of quinone. (compare lanes +NTCB  $\pm$  BQ). Also, in the presence of BQ, a fraction of tubulin was cross-linked.

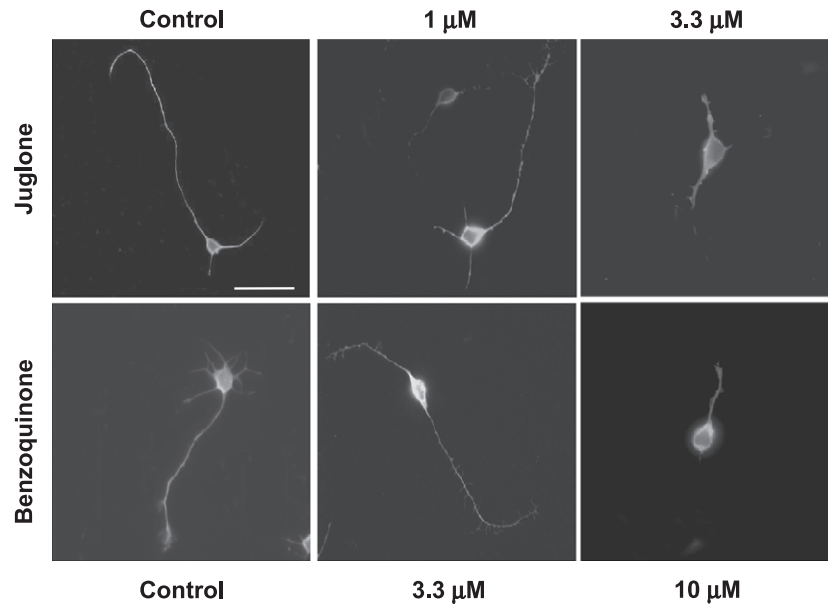


Fig. 6. Effect of quinones on cultured hippocampal neurons. Cultured hippocampal neurons at stage 3 [45] were incubated in the absence (control) or in the presence of juglone (upper panel) or benzoquinone (lower panel) at the indicated concentrations. Bar indicates 50  $\mu\text{m}$ .

Additionally, we may indicate that in tubulin from AD patients, a decrease in cysteine reactivity has been suggested, since the presence of an inhibitor of thiol groups prevents the binding of GTP to tubulin [29], and it could be the cause for the fact that GTP binding to tubulin, in AD brain, is decreased [29,30].

#### 4. Discussion

Changes in microtubule organization have been reported to take place in AD. Some of them could be dependent on tau protein [30–33] whereas other could be the consequence of a direct action on tubulin [34,35]. By both, in vivo and in vitro analysis, we have shown that direct changes on tubulin by quinones are likely involved. As such, our results suggest a possible link between oxidative damage and microtubule disassembly through the tubulin modification by increased levels of quinones such as benzoquinone. Tubulin accounts for almost 20% of the total soluble protein in brain [36,37]; therefore, at this high concentration, it is not unusual to find an interaction of quinones with tubulin, through cysteine residues (tubulin contains 20 free sulfhydryl groups)

Table 1  
Length of axon-like process in untreated or quinone-treated hippocampal neurons

	Length ( $\mu\text{m}$ )
Control	180 $\pm$ 25
Juglone	47 $\pm$ 12
Benzoquinone	39 $\pm$ 14

Cultured hippocampal neurons, from rat brain, were incubated in the absence (control) or in the presence of 3.3  $\mu\text{M}$  juglone or 10  $\mu\text{M}$  benzoquinone. The average length ( $\pm$ SD) of axon-like processes, after analyzing 20 different neurons, is indicated.

[38,39]. Some specificity in the interaction is found since a cysteine-rich protein, like albumin, is not cross-linked in the same conditions. Also, cross-linking was not evident for actin. As demonstrated in this study by in vitro and cell culture experiments, the consequences of tubulin–quinone interaction would be a decrease in microtubule assembly. In fact, that the effect of quinones is more evident on microtubule network than on microfilaments suggests a specific action of quinones on tubulin rather than on actin as found in Figs. 1, 4 and 5.

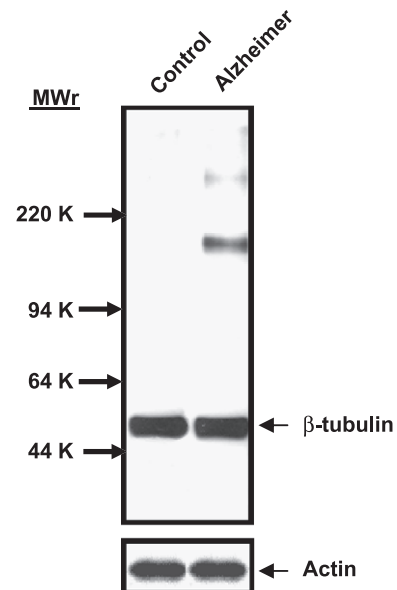


Fig. 7. Characterization of tubulin from control and Alzheimer's disease patients. Brain (temporal lobe) cell extracts from a control or an Alzheimer's disease patient were fractionated by gel electrophoresis and the presence of  $\beta$ -tubulin was detected by Western blotting. As a control of loaded protein, the amount of actin determined by Western Blot is shown.

Since different concentrations of quinones were needed to disturb the microtubule network, prevent microtubule assembly *in vitro*, and induce tubulin cross-linking, it is possible that quinones exert different effects on tubulin dependent on the levels of oxidative stress. Although the quinone concentration inside neurons is not known, the chronic nature of oxidative stress in AD [1] makes quinone oxidation of tubulin and resultant microtubule alterations a likely pathogenic mechanism in AD. In fact, since cytoskeletal abnormalities, as well as oxidative damage to proteins, have been found in AD, our results suggest that one possible link could be an increased quinone concentration present in the AD brain [7,40]. That tubulin also reacts with reactive oxygen species [41–43] lends further credence to the interplay between oxidative stress and cytoskeletal disorganization in AD and may play a role in the decreased microtubule assembly. In fact, modification of the redox state of tubulin by the glutathione/glutaredoxin reductase system [44] may be an important regulation of this interplay.

In summary, our findings further support the hypothesis that mitochondrial dysfunction [4] and oxidative stress [1], via reactive quinones, result in tubulin modification and microtubule disassembly, culminating in neuronal dysfunction and death in AD.

## Acknowledgements

We are grateful to Raquel Cuadros and Santiago Soto-Largo for technical assistance. This work was supported by grants from CICYT, Comunidad de Madrid, Fundación Lilly and Neuropharma, and by an Institutional Grant of Fundación R. Areces.

## References

- [1] A. Nunomura, G. Perry, G. Aliev, K. Hirai, A. Takeda, E.K. Balraj, P.K. Jones, H. Ghanbari, T. Wataya, S. Shimohama, S. Chiba, C.S. Atwood, R.B. Petersen, M.A. Smith, Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 60 (2001) 759–767.
- [2] A.D. Cash, G. Aliev, S.L. Siedlak, A. Nunomura, H. Fujioka, X. Zhu, A.K. Raina, H.V. Vinters, M. Tabaton, A.B. Johnson, M. Paula-Barbosa, J. Avila, P.K. Jones, R.J. Castellani, M.A. Smith, G. Perry, Microtubule reduction in Alzheimer's disease and aging is independent of tau filament formation, *Am. J. Pathol.* 162 (2003) 1623–1627.
- [3] E. Kopke, Y.C. Tung, S. Shaikh, A.C. Alonso, K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal, Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 24374–24384.
- [4] K. Hirai, G. Aliev, A. Nunomura, H. Fujioka, R.L. Russell, C.S. Atwood, A.B. Johnson, Y. Kress, H.V. Vinters, M. Tabaton, S. Shimohama, A.D. Cash, S.L. Siedlak, P.L. Harris, P.K. Jones, R.B. Petersen, G. Perry, M.A. Smith, Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease, *J. Neurosci.* 21 (2001) 3017–3023.
- [5] M. Tatar, D.M. Rand, Aging. Dietary advice on Q, *Science* 295 (2002) 54–55.
- [6] P.L. Larsen, C.F. Clarke, Extension of life-span in *Caenorhabditis elegans* by a diet lacking coenzyme Q, *Science* 295 (2002) 120–123.
- [7] G. Dallner, P.J. Sindelar, Regulation of ubiquinone metabolism, *Free Radic. Biol. Med.* 29 (2000) 285–294.
- [8] I. Santa-María, F. Hernandez, C.P. Martin, J. Avila, F.J. Moreno, Quinones facilitate the self-assembly of the phosphorylated tubulin binding region of tau into fibrillar polymers, *Biochemistry* 43 (2004) 2888–2897.
- [9] J. He, A.G. Lau, M.B. Yaffe, R.A. Hall, Phosphorylation and cell cycle-dependent regulation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor-1 by Cdc2 kinase, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 41559–41565.
- [10] J.L. Yao, O. Kops, P.J. Lu, K.P. Lu, Functional conservation of phosphorylation-specific prolyl isomerases in plants, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 13517–13523.
- [11] M.L. Shelanski, F. Gaskin, C.R. Cantor, Microtubule assembly in the absence of added nucleotides, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70 (1973) 765–768.
- [12] A. Nieto, I. Correas, C. López-Otín, J. Avila, Tau-related protein present in paired helical filaments has a decreased tubulin binding capacity as compared with microtubule-associated protein tau, *Biochim. Biophys. Acta* 1096 (1991) 197–204.
- [13] M. Medina, E. Montejo de Garcini, J. Avila, The role of tau phosphorylation in transfected COS-1 cells, *Mol. Cell. Biochem.* 148 (1995) 79–88.
- [14] F. Gaskin, C.R. Cantor, M.L. Shelanski, Turbidimetric studies of the *in vitro* assembly and disassembly of porcine neurotubules, *J. Mol. Biol.* 89 (1974) 737–755.
- [15] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [16] I. Correas, J. Diaz-Nido, J. Avila, Microtubule-associated protein tau is phosphorylated by protein kinase C on its tubulin binding domain, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 15721–15728.
- [17] G.A. Banker, W.M. Cowan, Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture, *Brain Res.* 126 (1977) 397–442.
- [18] R. Margis, R. Borojevic, Quantification of attached cells in tissue culture plates and on microcarriers, *Anal. Biochem.* 181 (1989) 209–211.
- [19] A. Lewis, M. Ough, L. Li, M.M. Hinkhouse, J.M. Ritchie, D.R. Spitz, J.J. Cullen, Treatment of pancreatic cancer cells with dicumarol induces cytotoxicity and oxidative stress, *Clin. Cancer Res.* 10 (2004) 4550–4558.
- [20] T. Hasegawa, M. Matsuzaki, A. Takeda, A. Kikuchi, H. Akita, G. Perry, M.A. Smith, Y. Itoyama, Accelerated alpha-synuclein aggregation after differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells, *Brain Res.* 1013 (2004) 51–59.
- [21] M. Kondoh, T. Usui, T. Nishikiori, T. Mayumi, H. Osada, Apoptosis induction via microtubule disassembly by an antitumour compound, pironetin, *Biochem. J.* 340 (Pt. 2) (1999) 411–416.
- [22] Q. Guo, J.T. Corbett, G. Yue, Y.C. Fann, S.Y. Qian, K.B. Tomer, R.P. Mason, Electron spin resonance investigation of semiquinone radicals formed from the reaction of ubiquinone 0 with human oxyhemoglobin, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 6104–6110.
- [23] W. Feng, G. Liu, R. Xia, J.J. Abramson, I.N. Pessah, Site-selective modification of hyperreactive cysteines of ryanodine receptor complex by quinones, *Mol. Pharmacol.* 55 (1999) 821–831.
- [24] E. Krauhs, M. Little, T. Kempf, R. Hofer-Warbinek, W. Ade, H. Ponstingl, Complete amino acid sequence of beta-tubulin from porcine brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78 (1981) 4156–4160.
- [25] H. Ponstingl, E. Krauhs, M. Little, T. Kempf, Complete amino acid sequence of alpha-tubulin from porcine brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78 (1981) 2757–2761.
- [26] M. Roychowdhury, N. Sarkar, T. Manna, S. Bhattacharyya, T. Sarkar, P. Basusarkar, S. Roy, B. Bhattacharyya, Sulfhydryls of tubulin. A probe to detect conformational changes of tubulin, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 3469–3476.
- [27] M. Daniels, The role of microtubules in the growth and stabilization of nerve fibers, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 253 (1975) 535–544.
- [28] T. Mitchison, M. Kirschner, Cytoskeletal dynamics and nerve growth, *Neuron* 1 (1988) 761–772.

- [29] J.C. Pendergrass, B.E. Haley, M.J. Vimy, S.A. Winfield, F.L. Lorscheider, Mercury vapor inhalation inhibits binding of GTP to tubulin in rat brain: similarity to a molecular lesion in Alzheimer diseased brain, *Neurotoxicology* 18 (1997) 315–324.
- [30] S. Khatoon, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, Guanosine triphosphate binding to beta-subunit of tubulin in Alzheimer's disease brain: role of microtubule-associated protein tau, *J. Neurochem.* 64 (1995) 777–787.
- [31] A.C. Alonso, T. Zaidi, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 5562–5566.
- [32] S. Vijayan, E. El-Akkad, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, A pool of beta-tubulin is hyperphosphorylated at serine residues in Alzheimer disease brain, *FEBS Lett.* 509 (2001) 375–381.
- [33] E. Schuller, T. Gulesserian, R. Seidl, N. Cairns, G. Lube, Brain t-complex polypeptide 1 (TCP-1) related to its natural substrate beta1 tubulin is decreased in Alzheimer's disease, *Life Sci.* 69 (2001) 263–270.
- [34] B. Hempen, J.P. Brion, Reduction of acetylated alpha-tubulin immunoreactivity in neurofibrillary tangle-bearing neurons in Alzheimer's disease, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55 (1996) 964–972.
- [35] D.L. Price, R.J. Altschuler, R.G. Struble, M.F. Casanova, L.C. Cork, D.B. Murphy, Sequestration of tubulin in neurons in Alzheimer's disease, *Brain Res.* 385 (1986) 305–310.
- [36] P.J. Anderson, The structure and amount of tubulin in cells and tissues, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 2168–2171.
- [37] G. Hiller, K. Weber, Radioimmunoassay for tubulin: a quantitative comparison of the tubulin content of different established tissue culture cells and tissues, *Cell* 14 (1978) 795–804.
- [38] R.F. Luduena, Biochemistry of tubulin, in: K Roberts, J.S Hyams (Eds.), *Microtubules*, 1979, pp. 65–116.
- [39] R.F. Luduena, M.C. Roach, P.P. Trcka, M. Little, P. Palanivelu, P. Binkley, V. Prasad, Beta 2-Tubulin, a form of chordate brain tubulin with lesser reactivity toward an assembly-inhibiting sulfhydryl-directed cross-linking reagent, *Biochemistry* 21 (1982) 4787–4794.
- [40] M. Soderberg, C. Edlund, I. Alafuzoff, K. Kristensson, G. Dallner, Lipid composition in different regions of the brain in Alzheimer's disease/senile dementia of Alzheimer's type, *J. Neurochem.* 59 (1992) 1646–1653.
- [41] M.A. Smith, P.L. Richey Harris, L.M. Sayre, J.S. Beckman, G. Perry, Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease, *J. Neurosci.* 17 (1997) 2653–2657.
- [42] M.Y. Aksenov, M.V. Aksenova, D.A. Butterfield, J.W. Geddes, W.R. Markesbery, Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease, *Neuroscience* 103 (2001) 373–383.
- [43] L.M. Landino, R. Hasan, A. McGaw, S. Cooley, A.W. Smith, K. Masselam, G. Kim, Peroxynitrite oxidation of tubulin sulfhydryls inhibits microtubule polymerization, *Arch. Biochem. Biophys.* 398 (2002) 213–220.
- [44] L.M. Landino, K.L. Moynihan, J.V. Todd, K.L. Kennett, Modulation of the redox state of tubulin by the glutathione/glutaredoxin reductase system, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314 (2004) 555–560.
- [45] C.G. Dotti, C.A. Sullivan, G.A. Banker, The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture, *J. Neurosci.* 8 (1988) 1454–1468.

# Neurotoxic dopamine quinone facilitates the assembly of tau into fibrillar polymers

Ismael Santa-María,<sup>1</sup> Félix Hernández,<sup>1</sup> Mark A. Smith,<sup>2</sup>  
George Perry,<sup>2</sup> Jesús Avila<sup>1</sup> and Francisco J. Moreno<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, Madrid, Spain;*

<sup>2</sup>*Institute of Pathology, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, USA*

Received 20 April 2005; accepted 18 May 2005

## Abstract

Aberrant aggregation of microtubule associated protein tau is the main characteristic of different disorders known as tauopathies. Different compounds have been described to facilitate tau aberrant aggregation. In this work, we demonstrate that oxidized products of dopamine (neurotoxic dopamine quinone), a neurotransmitter involved in Parkinson's disease, promote tau polymerization. Curiously, neurons expressing dopamine (substantia nigra) show a low content of tau protein and seldom have tau aggregation in tauopathies. In non-dopaminergic neurons, quinone oxidation products may be involved in tau polymerization. These results support a link between oxidative damage and the onset of tauopathies. (*Mol Cell Biochem* **278**: 203–212, 2005)

*Key words:* Alzheimer's disease, dopamine, paired helical filaments, quinones, tau protein

## Introduction

Tauopathies are neurological disorders with a common feature, the presence of aberrant phosphotau aggregates [1]. Tauopathies can be distinguished by the types of damaged neurons and their location in the central nervous system [2]. *In vitro* studies have indicated that various cellular components may facilitate tau polymerization [3–9] supporting the hypothesis that different compounds could be responsible for tau fibrillogenesis in different diseases.

Alzheimer's disease (AD) is the most common tauopathy where aging is the major risk factor. Alterations in energy metabolism have been implicated in AD [10]. Coenzyme Q, an important co-factor in mitochondrial bioenergetics [11], has been associated with age-related alterations in energetic metabolism [12, 13]. Quinones have been demonstrated to facilitate aberrant tau assembly in *in vitro* experiments [14] suggesting that oxidative damage could be the earliest event

in Alzheimer's disease [15]. This link between tau assembly and quinones suggests a new mechanism involved in the onset and progression of tauopathies.

The oxidation of dopamine to quinones has been implicated in Parkinson's disease (PD) [16, 17]. Dopamine can affect to the aggregation of the protein  $\alpha$ -synuclein [18], a protein genetically and mechanistically implicated in the pathogenesis of dopaminergic neuronal death.

Thus, different mechanisms of oxidative damage in distinct neurodegenerative disorders could be critical to the specific cellular phenomena found in each neurodegenerative disease.

In this work we tested if tau protein polymerization is enhanced by the action of dopamine oxidation products. Our results show that indeed it is the case. Furthermore, analysis of the levels of tau in different brain regions and in a cell model revealed that tau protein must reach a critical concentration for polymerization to occur. Homeostatic balance between



oxidative insult, antioxidant levels, and concentration of tau available for aberrant polymerization is critical in tauopathies and neurodegeneration.

## Materials and methods

### Materials

Dopamine hydrochloride (Ref. H8502), para-benzoquinone (*p*-benzoquinone) (Ref. B-1266), hydroquinone (Ref. H-9003), Fe(III) chloride hexahydrate (Ref. F-2877) were purchased from Sigma. Acrylamide/bisacrylamide solution was supplied by Bio-Rad. Polyvinylidene difluoride membranes (Immobilon Pseq) were from Millipore Corp. The chemiluminescent detection kit (Western Light) was from Tropix. ( $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ) ATP was purchased from Amersham. ATP was purchased from Boehringer-Mannheim. The catalytic subunit of cAMP dependent protein kinase (PKA, P 2645) was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). According to the supplier's specifications, the kinase was purified to greater than 90% homogeneity from bovine heart to a specific activity of 50 U/ $\mu\text{g}$  protein. The activity of PKA using p24 as substrate was 20 pmol/min/ $\mu\text{g}$  protein [19]. Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), EDTA, EGTA, 2-mercaptoethanol, *N*-lauroylsarcosine (Ref. L-5125), dibutyryl-cAMP (Ref. D-0627), MES and Tris were obtained from Sigma. DEAE Sephacel-R was purchased from Pharmacia-Biotech (Code no. N7-0500-01). Protease Inhibitor Cocktail was purchased from Roche (Ref. 1697498). The protein phosphatase inhibitor okadaic acid was purchased from LC Laboratories (Woburn, MA).

### Tau isolation

Expression and isolation of recombinant protein htau 42 was performed as described [20, 21]. Briefly, htau 42 was cloned into vector pRK172 [22] for inducible expression in *E. coli*. Protein purification was performed by a protocol involving a heat resistance step in a buffer containing 100 mM Tris pH 7.5, 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EGTA, 1 mM 2-mercaptoethanol, 100 mM NaCl and protease inhibitors: 2 mM PMSF, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin, and 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pepstatin (Protease Inhibitor Cocktail). This step involves a treatment at 100 °C for 5 min. The soluble protein was isolated after centrifugation and ammonium sulphate was added. The precipitated fraction between 25 and 50% was taken. The precipitated protein was resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) and chromatographed on DEAE Sephacel-R, equilibrated in PBS and the protein was eluted stepwise using 1 M NaCl in PBS.

### Tau phosphorylation by PKA

The phosphorylation of tau42 by PKA was performed as previously described [19, 23]. Briefly, purified PKA and 1–4  $\mu\text{g}$  of substrate were mixed in 12  $\mu\text{l}$  total volume buffer solution containing variable ATP concentrations and 0.2  $\mu\text{Ci}$  of ( $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ) ATP. The cAMP kinase protein (100 ng/reaction) was performed in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EGTA, 1 mM EDTA and 1  $\mu\text{M}$  okadaic acid, at 37 °C. The phosphorylation was carried out in the presence of 1 mM ATP for 24 h. At this incubation time, maximum phosphorylation (stoichiometry) was found.

### Assembly of tau into filaments

Filaments were grown by vapour diffusion in hanging drops in the standard way used for protein crystallization as previously indicated [5, 24]. In a typical experiment, 1–4  $\mu\text{g}$  of peptide was resuspended in 10–15  $\mu\text{l}$  of buffer A (0.1 M MES (pH 6.4), 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$  and 2 mM EGTA) containing 50 mM NaCl plus 4 mM dopamine in the presence of 100  $\mu\text{M}$  iron ( $\text{Fe}^{3+}$ ) in the presence of 1 mM *p*-benzoquinone. The reservoir in this case contained 0.2 M NaCl in buffer A. Filaments were obtained after incubation for 4 days at 4 °C. The samples were visualized by electron microscopy as described [14].

### Measurements of aggregated tau protein

The samples were incubated at 37 °C for 4–7 h. In some experiments, samples were centrifuged for 30 min at maximal speed in an airfuge (Beckman) and the protein present in the supernatant and pellet was analysed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). SDS-PAGE was performed according to the procedure of Laemmli on 10% polyacrylamide gels [25]. Gels were stained with Coomassie brilliant blue, or analysed by autoradiography (when the protein was labelled with  $^{32}\text{P}$  by phosphorylation with PKA) as the same conditions previously indicated [23]. Densitometric analysis was performed on protein samples identified by autoradiography and the data processed with an imaging densitometer (GS-6470 model, Bio-Rad). Data were analysed with Molecular Analyst software. Additionally, when the protein was labelled with  $^{32}\text{P}$ , the amount of associated radioactivity was measured and determined by Cerenkov radiation counting. The distribution of tau in different brain regions was analysed in normal middle aged (5 months old) C57/BL6 mice.

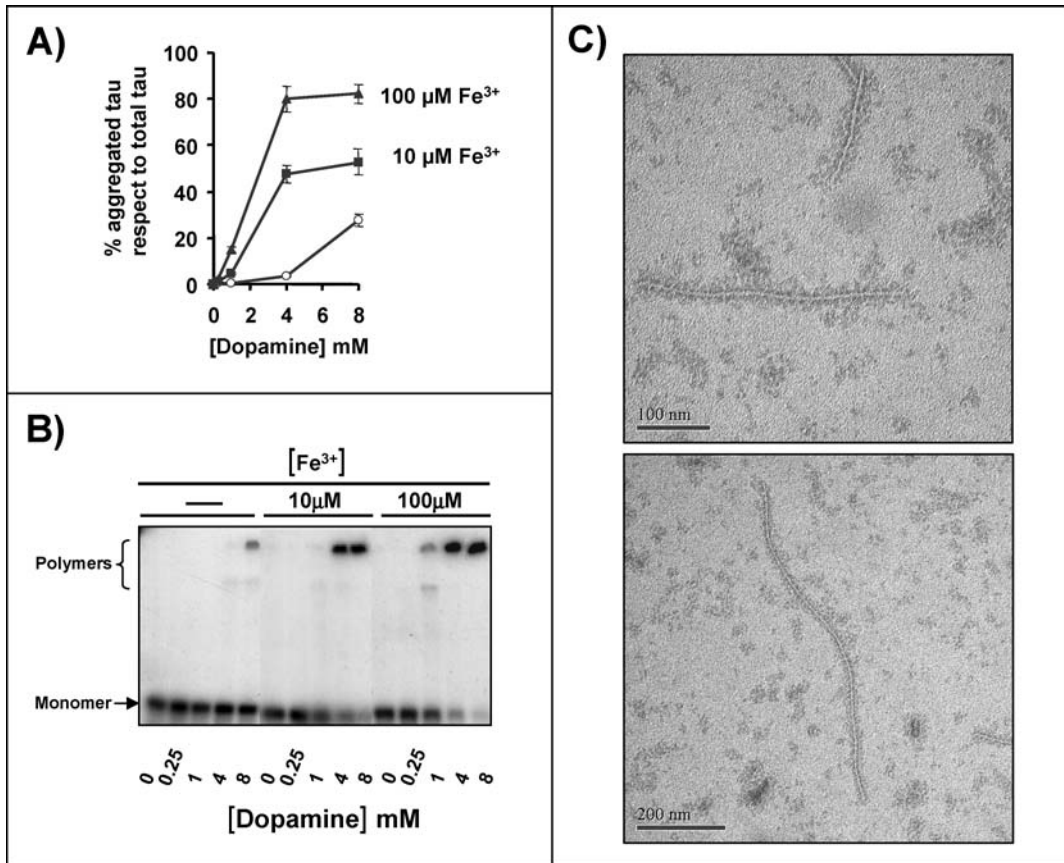
### Immunocytochemistry

Mice were deeply anesthetized with pentothal and transcardially perfused with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer for 10 min. The brains were post-fixed in

4% paraformaldehyde for 2 h at room temperature and placed in 30% sucrose in phosphate-buffered saline for 48 h at 4 °C. Sagittal sections (30 μm) were cut in a freezing microtome and collected in PBS. Free floating sections were pre-treated with 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS, and incubated overnight at 4 °C with primary antibodies: Tau-5 (1/500) (Calbiochem) in PBS containing 0.2% Triton X-100, 10% normal goat serum (Gibco) and 1% bovine serum albumin (Boehringer-Mannheim). Following three PBS washes, sections were carried through standard avidin-biotin immunohistochemical protocols using an Elite Vectastain kit (Vector Laboratories). Chromogen reaction was performed with diaminobenzidine (DAB) (Sigma) and 0.003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 min. The sections were mounted on chromalum-coated slides and coverslipped with Aqua-PolyMount (Polysciences). Omission of the primary antibody resulted in absence of labelling.

*Immunoblot analysis*

For tissue analysis mice were sacrificed and brains were quickly dissected out onto an ice-cold plate. Tissue was processed for Western blotting as previously described [26]. Antibody used to detect tau protein was 7.51 (a gift from Dr C. M. Wischik, UK), which is directed against the microtubule-binding region [27]. A monoclonal antibody directed against α-tubulin (1/1000) (Sigma No. T4026) was used as an internal control for protein quantity. Protein levels were quantified by densitometry of three exposures of each of two separate Western blot experiments. Primary antibody dilution was 7.51 (1/100). Protein extracts prepared from differentiated SH-SY5Y cells were processed and analysed by Western blot using tau antibody 7.51 (1/100).



*Fig. 1.* Tau polymerization in the presence of dopamine and iron. (A) Shows the results of adding different concentrations of dopamine (0–8 mM) and increasing FeCl<sub>3</sub> concentrations 0 μM (○), 10 μM (■), 100 μM (▲) to a solution of 0.5 mg/ml of tau protein. The resulting aggregate protein was isolated by gel centrifugation and the amount of protein in the pellet was quantified, after gel electrophoresis and densitometry the stained bands was done. The values of those densitometries (OD in arbitrary units) were plotted against dopamine concentrations. (B) Gel electrophoresis of total tau protein, after addition of dopamine and iron. The formation of crosslinked protein aggregates can be found. (C) Fibrillar polymers assembled in the presence of dopamine and iron. Bars indicate 0.1 μm and 0.2 μm.

*Reverse transcription of RNA and polymerase chain reaction (RT-PCR)*

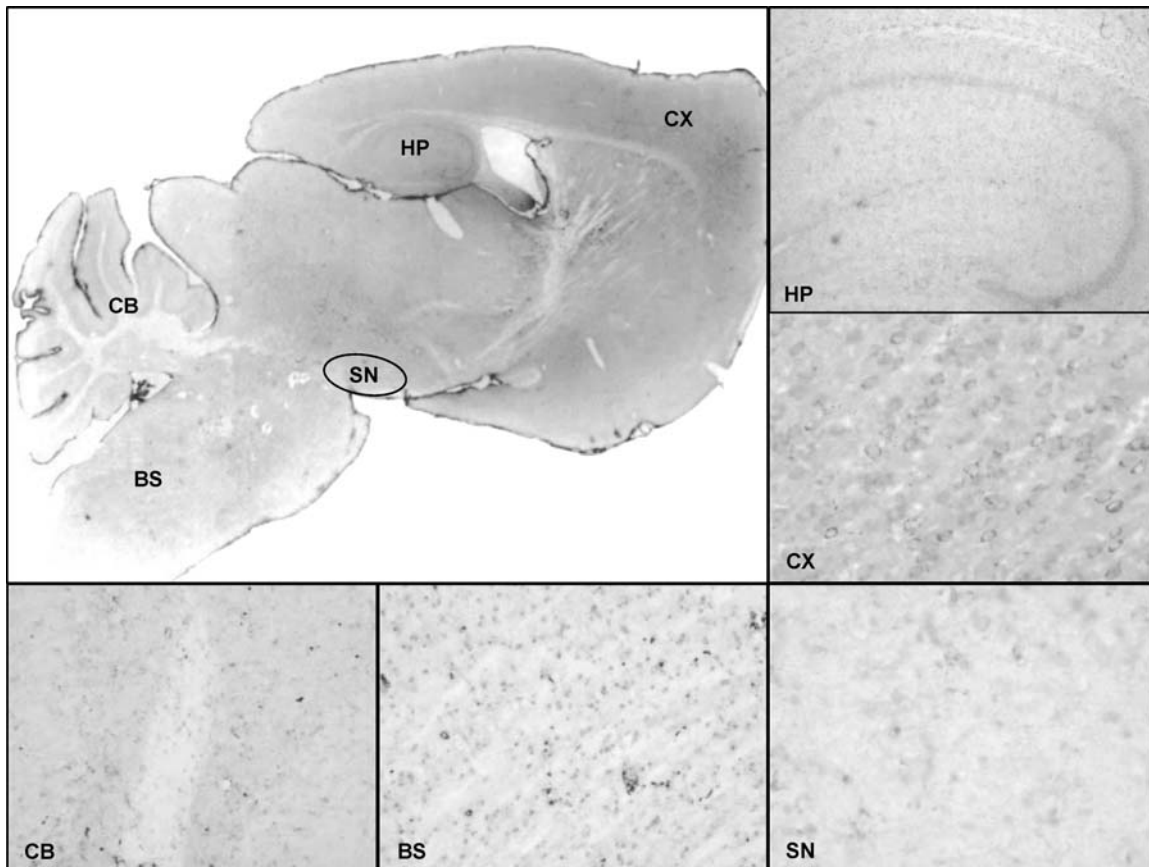
Total RNA from mice brain regions was prepared using the reagent TRIzol (Invitrogen) and following the supplier's protocol. Reverse transcription was performed using the first cDNA synthesis kit (Roche Applied Science) on 5 µg of RNA with oligo(dT) primers. PCR was performed with the oligonucleotides R1 (5'-GGCGAATTCGGATCCATGCCA GACCTGAAGAATG-3') and R2 (5'-GGCCTGCAGTTAC TCGCGGAAGGTCAGCTTGTG-3'). The amplifications were performed basically with the following protocol: 30 cycles of 94 °C for 45 s, 55 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min. The PCR products were resolved on a 1.8% agarose gel and stained with ethidium bromide. As a loading control, RT-PCR for actin was performed for each sample. The used primers for murine actin were 5'-GGG TGTAACGCAACTAAGTCATAG-3' and 5'-GCATGGA GTCCTGTGGCATCCACG-3'. Differences among groups

were analysed by Student's unpaired *t*-test to determine significant differences between means.

*Cell culture*

Human neuroblastoma SH-SY5Y cells [28] were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum and 2 mM glutamine in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. Proliferating SH-SY5Y cells were plated and then cultured in Neurobasal-B27 medium (Gibco, Grand Island, NY) supplemented with 2 mM dibutyl cyclic AMP (cAMP) and 1 mM glutamine for 7 days. At this time, about 90% of the cells has extended long neurites (see Fig. 4b) and became postmitotic (showing no significant incorporation of tritiated thymidine into DNA). Western Blot analysis was done as described earlier.

After 7 days differentiated SH-SY5Y cells were treated during 24 h with iron (Fe<sup>3+</sup>) 100 µM, dopamine 50 µM



*Fig. 2.* Immunocytochemistry analysis showing the amount of tau in different brain regions. Sagittal mouse brain slices were incubated with antibody Tau-5 raised against tau protein. The staining by the antibody of the different brain regions and the whole brain slice, substantia nigra (SN), hippocampus (HP), cortex (CX), brain stem (BS) and cerebellum (CB) are shown. In the case of substantia nigra almost no stain was found.

and dopamine 50  $\mu\text{M}$  plus iron ( $\text{Fe}^{3+}$ ) 100  $\mu\text{M}$ . In other experiment, differentiated SH-SY5Y cells were also treated with *p*-benzoquinone 3, 3  $\mu\text{M}$  during 1 h as described earlier.

#### Isolation of filaments from differentiated SH-SY5Y treated cells

Isolation of tau filaments from neuroblastoma SH-SY5Y differentiated cells was based on a modified version of the method used by Greenberg and Davies to isolate PHFs [29]. Differentiated and treated cells were recollected by centrifugation, washed with PBS and homogenised in 1 ml of buffer H (10 mM Tris, 1 mM EGTA, 0.8 M NaCl, 10% sucrose, pH 7.4). After centrifugation at  $27,000 \times g$  for 20 min at  $4^\circ\text{C}$ , the supernatant was saved, the pellet was homogenised with 1 ml of buffer H and centrifuged at  $27,000 \times g$  for 20 min. The  $27,000 \times g$  supernatants were combined, adjusted to 1% (w/v) *N*-lauroylsarcosine and 1% (v/v) 2-mercaptoethanol, and incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 2.5 h while being shaken in an orbital shaker. All subsequent steps were carried out at room temperature. After centrifugation at  $92,000 \times g$  for 40 min, the filament-containing pellets were homogenized in 0.5 ml of buffer H/1% (w/v) CHAPS/1% (v/v) 2-mercaptoethanol, centrifuged at  $92,000 \times g$  and the pellet resuspended in 50  $\mu\text{l}$  buffer H/1% (v/v) 2-mercaptoethanol. Western blot analysis of pelleted protein was done as described [14] using 7.51 antibody (1/100).

#### Electron and immunoelectron microscopy

To test for the presence of isolated filaments, samples were placed on a carbon-coated grid for 2 min and then stained with 2% (w/v) uranyl acetate for 1 min. Transmission electron microscopy was performed in a JEOL Model 1200EX electron microscope operated at 100 kV.

Immunoelectron microscopy was performed after adsorption of the samples to electron microscopy carbon-coated grids and incubation with the first antibody (1/40) for 1 h at room temperature. After extensive washing with phosphate-buffered saline, the grids were incubated with the secondary antibody (1/40) conjugated with 5 or 10-nm diameter gold particles. Finally, the samples were negatively stained and observed, as described earlier.

## Results

#### Dopamine facilitates the formation of sarkosyl insoluble tau polymers

Figure 1A shows that addition of increased amounts of dopamine results in the increased aggregation of tau protein

measured by centrifugation of tau polymers. These aggregates are sarkosyl insoluble tau polymers [29].

The aggregation increases in the presence of iron (ferric cation) that will facilitate the oxidation of dopamine into neurotoxic dopamine quinone (DA-quinone) [30]. Tau oligomerization can be also followed by gel electrophoresis (Fig. 1B), since the presence of quinones, resulting from the oxidation of dopamine, may crosslink tau molecules to yield oligomers [14]. Some of these oligomers cannot be fractionated by gel electrophoresis and they are located at the stacking gel.

Figure 1C shows the appearance of tau aggregates assembled in the presence of dopamine and iron. Fibrillar polymers are found. This polymerization was increased when tau was phosphorylated by PKA at the site recognized by the antibody 12E8 (not shown) (see also ref [14]).

#### Is tau present in dopaminergic cells? Distribution of tau in different brain regions

One of the brain region that contains higher concentrations of both, dopamine and iron, is the substantia nigra.

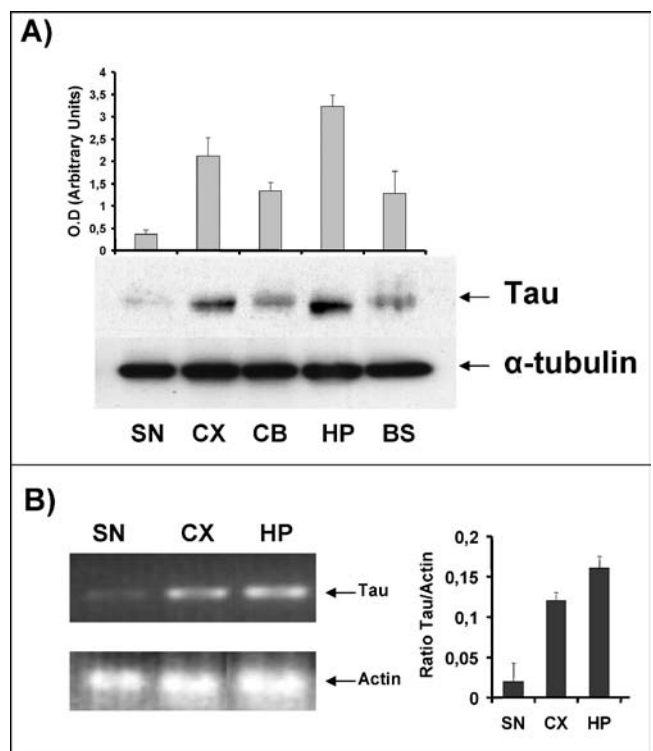


Fig. 3. Levels of tau in different brain regions. (A) Samples from substantia nigra (SN), frontal cortex (CX), cerebellum (CB), hippocampus (HP) and brain stem (BS) were obtained and Western blot analysis using an antibody against  $\alpha$ -tubulin and an antibody (ab 7.51) against tau, was done. (B) RNA was isolated from the previous samples and a quantitative RT/PCR analysis using actin RNA, as an internal control, was done. The quantitation of the ratio tau/actin in arbitrary units is shown.

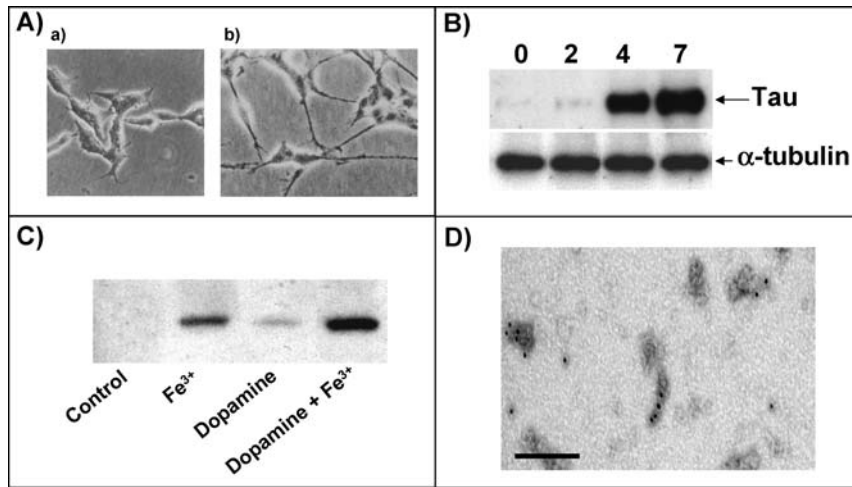


Fig. 4. Aggregation of tau in differentiated SH-SY5Y treated cells in the presence of dopamine and iron. (A) Shows undifferentiated (a) and differentiated (b) cells. (B) An increase of tau was found upon SH-SY5Y neuroblastoma cell differentiation. The time (in days) after addition of dibutyryl-cAMP to differentiate neuroblastoma cells is indicated. Also, the amount of  $\alpha$ -tubulin, like a control for protein loading, is shown. (C) The amount of sarkosyl insoluble-tau aggregates in samples (containing the same amount of tubulin) of SH-SY5Y cells, after 7 days of dibutyryl-cAMP treatment, was analysed after measuring them by detergent extraction, centrifugation, gel electrophoresis and Western Blot, using tau 7.51 antibody. (D) These aggregates have mainly an amorphous structure, after their characterization by immunoelectronmicroscopy, using T14 tau antibody (1/40). Bar indicates  $0.2 \mu\text{m}$ .

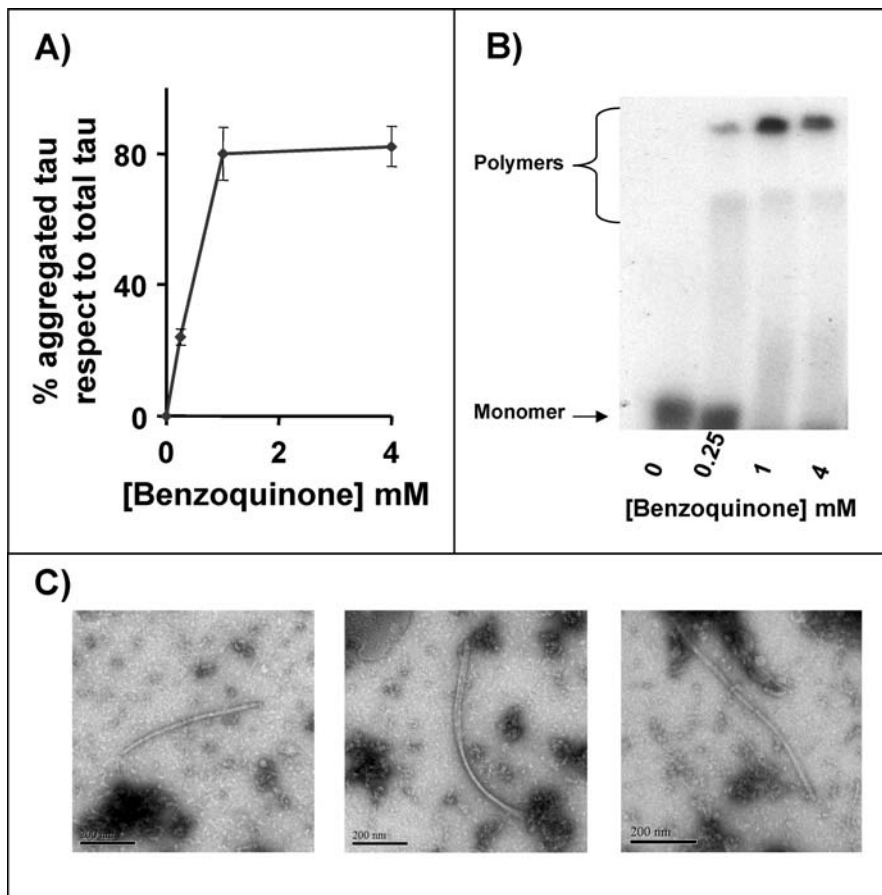


Fig. 5. Tau aggregates in the presence of *p*-benzoquinone. (A) A similar experiment is shown to that indicated in Fig. 1A, but adding *p*-benzoquinone in state of dopamine is shown. (B) In a way similar to that shown in Fig. 1B, *p*-benzoquinone also promotes the formation of crosslinked-tau aggregates. (C) Morphology of tau filaments assembled in the presence of *p*-benzoquinone.

Extrapolating our data to *in vivo* situations, it would be expected to observe tau polymers in substantia nigra. However, little is known about the presence of tau polymers in substantia nigra, where tau pathology is not usual [31]. One possibility is that tau concentration in that region is below that critical concentration needed for polymerization. To elucidate this phenomenon, we measured the levels of tau in different brain regions of normal mice. In fact, immunocytochemical data suggest that the amount of tau in the substantia nigra is very low (Fig. 2). To support these results, we also measured the amount of tau by immunoblot (Fig. 3A) and by quantitative RT/PCR (Fig. 3B). We observed that a very low amount of tau is present and expressed in the substantia nigra when compared to hippocampus and cortex (Fig. 3). We also observed a relative low amount of tau in cerebellum where, curiously, no aberrant polymers of tau have been previously described [32]. The analysis by quantitative RT/PCR (Fig. 3) confirms the previous data, indicating that the tau content in substantia nigra is very low. This observation can explain the absence, in that region, of aberrant tau polymers. Tubulin and actin levels were used as controls in immunoblot analysis and PCR, respectively.

#### *Iron addition to dopaminergic neuroblastoma cells results in the appearance of tau polymers*

To test if in neural cells, containing tau and expressing dopamine, aberrant tau filaments can be assembled, we have used a dopamine expressing human neuroblastoma cell line, SH-SY5Y [28]. These cells, when are dividing, shows a low level of tau, but this level increases upon their differentiation [33] (Fig. 4).

Addition of iron salt, to cultured undifferentiated human SH-SY5Y neuroblastoma expressing dopamine, did not resulted in the appearance of sarkosyl insoluble tau polymers, which could be due to the low amount of tau present in these undifferentiated cells (Fig. 4). However, when these cells are differentiated (Fig. 4A), by the addition of dibutyryl cAMP, an increase of almost four times in the amount of tau can be found (Fig. 4B). Addition of iron to induce dopamine oxidation, to these differentiated neuroblastoma cells, results in the appearance of sarkosyl insoluble tau aggregates (Fig. 4C). Electron microscopy showed that these aggregates are mainly amorphous (Fig. 4D) and, in very few cases, we observed the formation of fibrillar polymers (not shown).

The previous results support the idea that the amount of tau must exceed the critical concentration necessary to promote tau aggregation. Although this concentration is low in neurons from substantia nigra, other cell types may be sufficient to promote tau assembly.

Also, our results cannot exclude that oxidation of dopamine yields not only quinone but also reactive oxygen

species (ROS), superoxide and hydroxyl radical, that could have a toxic effect in addition to that of quinone.

#### *Tau assembly occurs in the presence of p-benzoquinone but not in the presence of hydroquinone*

As previously proposed, in neuronal populations producing low levels of dopamine, other quinones could facilitate tau

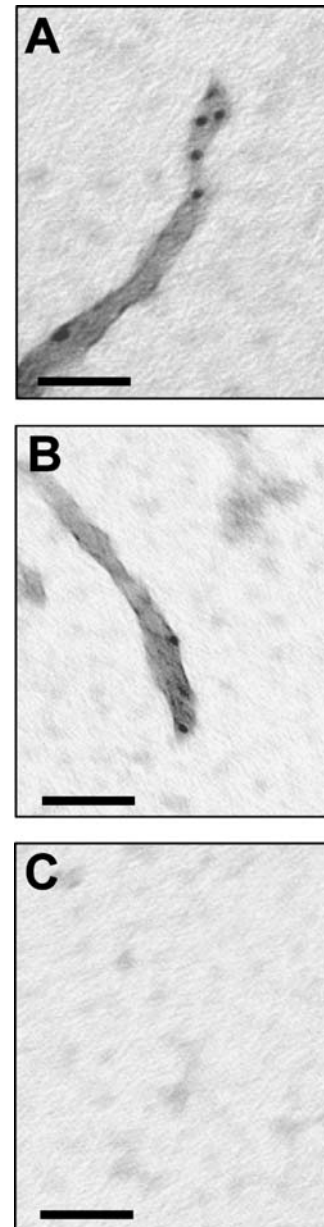


Fig. 6. Aggregation of tau in SH-SY5Y differentiated cells in the presence of *p*-benzoquinone. Figure shows immunoelectronmicroscopy of tau aggregates using Tau-5 antibody (1/40) in *p*-benzoquinone treated cells (A, B), but not untreated cells (C). Bars indicate 0.2  $\mu$ m.

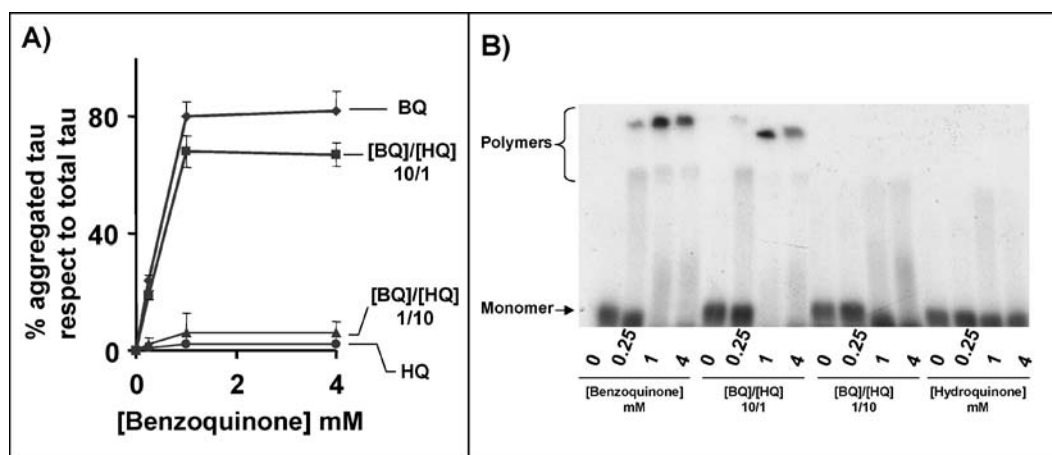


Fig. 7. Hydroquinone prevents tau aggregation promoted by *p*-benzoquinone. (A) In an experiment like that of Fig. 5A, the effect of hydroquinone or that of the increased addition of hydroquinone on the formation of tau aggregates promoted by *p*-benzoquinone was determined. (B) It shows that hydroquinone addition prevents the crosslinking induced by *p*-benzoquinone.

assembly [14]. To test if that is the case, we have analysed the action of *p*-benzoquinone (a quinone that should be present in every cell) and that of its reduced counterpart, hydroquinone, in tau aggregation. Figure 5 shows that *p*-benzoquinone induces tau aggregation (Fig. 5A), tau protein crosslinks (Fig. 5B) and the formation of tau polymers (Fig. 5C). However, hydroquinone did not induce tau aggregation (Fig. 7). Figures 6A and B show that, in cells treated with *p*-benzoquinone, some aggregates were assembled. These aggregates contain fibrillar polymers. However, no polymers (Fig. 6C) were found in the untreated cells.

#### *Hydroquinone could prevent tau assembly found in the presence of p-benzoquinone*

Figure 7 shows that hydroquinone is not only unable to promote tau aggregation but also prevents the assembly of tau induced by *p*-benzoquinone. Increasing amounts of hydroquinone decrease the formation of tau polymers (Fig. 7A) and prevented the crosslinking of tau molecules (Fig. 7B).

These results suggest that in oxidant conditions, where the concentration of *p*-benzoquinone (or other quinones) can be high, the risk for tau aggregation is exacerbated.

## Discussion

Tau polymerization could be the consequence of oxidative damage through the action of quinones related to coenzyme Q [14], vitamin K, or dopamine. In this way, tau polymerization will depend on the concentration of tau and dopamine and the presence of elements like free iron, which facilitates the oxidation of compounds like dopamine, leading to the

formation of quinones. Dopamine expressing cells, such as neurons present in substantia nigra [30], do not form tau polymers because they are essentially devoided of tau. In cerebellar neurons, neither dopamine nor tau are highly expressed and consequently do not presents hallmarks from AD or other tauopathies. In other types of dopamine expressing cells, the level of tau protein should be measured to know if aberrant polymers could be assembled, a feature that could take place in rare diseases [34–36]. In a rare familial Parkinson's disease [34, 35], the concurrence of  $\alpha$ -synuclein and tau aggregates can be the result of the action of oxidized products of dopamine. In cells, where neuromelanin is not present, the presence of other iron binding proteins like ferritin could facilitate the process of the aberrant formation of tau polymers [37]. On the other hand, in other neurons, other quinones would facilitate the formation of tau polymers [14].

Thus, oxidative damage could be involved in tau and  $\alpha$ -synuclein [16] aberrant assembly. In this scenario, different types of quinones in different types of neurons can induce tau and/or  $\alpha$ -synuclein aberrant aggregates.

Our current work hypothesis is that several compounds that promote tau assembly such as polyanions [4–6], fatty acids (or the products resulting from their oxidation) [3, 7, 8], or quinones [14], could have a role in the onset of different tauopathies. Our results also suggest that oxidative damage could play a role and could be one of the earliest events in the pathological process [38]. Our results are supported by a previous study showing that the level of quinone reductase (NQO1) is altered in Alzheimer's disease [39], suggesting a defense response against oxidative damage.

Aging is the main risk for neurological disorders like AD or PD. Aging studies, on several models, although mainly in *C. elegans* have indicated that longevity is controlled by

a conserved signalling pathway involving insulin or insulin-like factors (like IGF-1) [40–42]. In mammals, an association between oxidative stress and reduced IGF-1 signalling has been established. In this way the activity of antioxidant enzymes, like superoxide dismutase, is reduced in cells exposed to IGF-1 [43]. Additionally, a mitochondrial dysfunction in the elderly, due to a possible role in insulin resistance, has been also described and insulin regulation of mitochondrial function (that could result in oxidative stress) in non-neural cells has been indicated [44].

Thus, aging, the major risk for neurodegenerative diseases like AD or PD, could affect mitochondrial function [10, 45] that could result in oxidative damage and an increase of quinones, initiating aberrant protein aggregation of proteins like tau or  $\alpha$ -synuclein to form polymers inside a cell.

## Acknowledgments

We are grateful to Raquel Cuadros and Santiago Soto-Largo for technical assistance and to Mar Pérez and Tobias Engel for their advice in some experiments. This work was supported by grants from CICYT, Comunidad de Madrid, Fundación Lilly and Neuropharma, and by an Institutional Grant of Fundación R. Arecos.

## References

- 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* 83: 4913–4917, 1986
- Goedert M: Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases: tauopathies and alpha-synucleinopathies. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354: 1101–1118, 1999
- Gamblin TC, Berry RW, Binder LI: Tau polymerization: Role of the amino terminus. *Biochemistry* 42: 2252–2257, 2003
- Goedert M, Jakes R, Spillantini MG, Hasegawa M, Smith MJ, Crowther RA: Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature* 383: 550–553, 1996
- Perez M, Valpuesta JM, Medina M, Montejo de Garcini E, Avila J: Polymerization of tau into filaments in the presence of heparin: The minimal sequence required for tau-tau interaction. *J Neurochem* 67: 1183–1190, 1996
- Kampers T, Friedhoff P, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E: RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments. *FEBS Lett* 399: 344–349, 1996
- Gamblin TC, King ME, Kuret J, Berry RW, Binder LI: Oxidative regulation of fatty acid-induced tau polymerization. *Biochemistry* 39: 14203–14210, 2000
- Perez M, Cuadros R, Smith MA, Perry G, Avila J: Phosphorylated, but not native, tau protein assembles following reaction with the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal. *FEBS Lett* 486: 270–274, 2000
- Wilson DM, Binder LI: Free fatty acids stimulate the polymerization of tau and amyloid beta peptides. *In vitro* evidence for a common effector of pathogenesis in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 150: 2181–2195, 1997
- Ames BN: Mitochondrial decay, a major cause of aging, can be delayed. *J Alzheimers Dis* 6: 117–121, 2004
- Mitchell P: The vital protonmotive role of coenzyme Q. In: Folkers K, Littarru GP, Yamamura T (eds). *Biomedical and Clinical Aspects of Coenzyme Q*, Vol. 6, Elsevier, Amsterdam, 1991, pp 3–10
- Larsen PL, Clarke CF: Extension of life-span in *Caenorhabditis elegans* by a diet lacking coenzyme Q. *Science* 295: 120–123, 2002
- Tatar M, Rand DM: Aging. Dietary advice on Q. *Science* 295: 54–55, 2002
- Santa-Maria I, Hernandez F, Martin CP, Avila J, Moreno FJ: Quinones facilitate the self-assembly of the phosphorylated tubulin binding region of tau into fibrillar polymers. *Biochemistry* 43: 2888–2897, 2004
- Smith MA, Sayre LM, Vitek MP, Monnier VM, Perry G: Early AGEing and Alzheimer's. *Nature* 374: 316, 1995
- Perez RG, Waymire JC, Lin E, Liu JJ, Guo F, Zigmond MJ: A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J Neurosci* 22: 3090–3099, 2002
- Linert W, Jameson GN: Redox reactions of neurotransmitters possibly involved in the progression of Parkinson's disease. *J Inorg Biochem* 79: 319–326, 2000
- Conway KA, Rochet JC, Bieganski RM, Lansbury PT, Jr: Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct. *Science* 294: 1346–1349, 2001
- Pérez Martín C, Vázquez J, Avila J, Moreno FJ: P24, a glycogen synthase kinase 3 (GSK 3) inhibitor. *Biochim Biophys Acta* 1586: 113–122, 2002
- Moreno FJ, Medina M, Perez M, Montejo de Garcini E, Avila J: Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates recombinant human tau protein at serine-262 in the presence of heparin (or tubulin). *FEBS Lett* 372: 65–68, 1995
- Medina M, Montejo de Garcini E, Avila J: The role of tau phosphorylation in transfected COS-1 cells. *Mol Cell Biochem* 148: 79–88, 1995
- Goedert M, Jakes R: Expression of separate isoforms of human tau protein: Correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J* 9: 4225–4230, 1990
- Moreno FJ, Avila J: Phosphorylation of stathmin modulates its function as a microtubule depolymerizing factor. *Mol Cell Biochem* 183: 201–209, 1998
- Crowther RA, Olesen OF, Smith MJ, Jakes R, Goedert M: Assembly of Alzheimer-like filaments from full-length tau protein. *FEBS Lett* 337: 135–138, 1994
- Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685, 1970
- Lucas JJ, Hernandez F, Gomez-Ramos P, Moran MA, Hen R, Avila J: Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *EMBO J* 20: 27–39, 2001
- Novak M, Jakes R, Edwards PC, Milstein C, Wischik CM: Difference between the tau protein of Alzheimer paired helical filament core and normal tau revealed by epitope analysis of monoclonal antibodies 423 and 7.51. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 5837–5841, 1991
- Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS: Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res* 38: 3751–3757, 1978
- Greenberg SG, Davies P: A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 5827–5831, 1990
- Zecca L, Zucca FA, Wilms H, Sulzer D: Neuromelanin of the substantia nigra: a neuronal black hole with protective and toxic characteristics. *Trends Neurosci* 26: 578–580, 2003



31. Clark LN, Poorkaj P, Wszolek Z, Geschwind DH, Nasreddine ZS, Miller B, Li D, Payami H, Awert F, Markopoulou K, Andreadis A, D'Souza I, Lee VM, Reed L, Trojanowski JQ, Zhukareva V, Bird T, Schellenberg G, Wilhelmsen KC: Pathogenic implications of mutations in the tau gene in pallido-ponto-nigral degeneration and related neurodegenerative disorders linked to chromosome 17. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13103–13107, 1998
32. Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F: Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev* 84: 361–384, 2004
33. Garcia-Perez J, Avila J, Diaz-Nido J: 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: 445–452, 1998
34. Duda JE, Giasson BI, Mabon ME, Miller DC, Golbe LI, Lee VM, Trojanowski JQ: Concurrence of alpha-synuclein and tau brain pathology in the Contursi kindred. *Acta Neuropathol (Berl)* 104: 7–11, 2002
35. Giasson BI, Forman MS, Higuchi M, Golbe LI, Graves CL, Kotzbauer PT, Trojanowski JQ, Lee VM: Initiation and synergistic fibrillization of tau and alpha-synuclein. *Science* 300: 636–640, 2003
36. Galloway PG, Bergeron C, Perry G: The presence of tau distinguishes Lewy bodies of diffuse Lewy body disease from those of idiopathic Parkinson disease. *Neurosci Lett* 100: 6–10, 1989
37. Perez M, Valpuesta JM, de Garcini EM, Quintana C, Arrasate M, Lopez Carrascosa JL, Rabano A, Garcia de Yébenes J, Avila J: Ferritin is associated with the aberrant tau filaments present in progressive supranuclear palsy. *Am J Pathol* 152: 1531–1539, 1998
38. Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, Jones PK, Ghanbari H, Wataya T, Shimohama S, Chiba S, Atwood CS, Petersen RB, Smith MA: Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 60: 759–767, 2001
39. Raina AK, Templeton DJ, Deak JC, Perry G, Smith MA: Quinone reductase (NQO1), a sensitive redox indicator, is increased in Alzheimer's disease. *Redox Rep* 4: 23–27, 1999
40. Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R: A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366: 461–464, 1993
41. Dillin A, Crawford DK, Kenyon C: Timing requirements for insulin/IGF-1 signaling in *C. elegans*. *Science* 298: 830–834, 2002
42. Tatar M, Bartke A, Antebi A: The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* 299: 1346–1351, 2003
43. Longo VD, Fabrizio P: Regulation of longevity and stress resistance: A molecular strategy conserved from yeast to humans? *Cell Mol Life Sci* 59: 903–908, 2002
44. Boirie Y: Insulin regulation of mitochondrial proteins and oxidative phosphorylation in human muscle. *Trends Endocrinol Metab* 14: 393–394, 2003
45. Hirai K, Aliev G, Nunomura A, Fujioka H, Russell RL, Atwood CS, Johnson AB, Kress Y, Vinters HV, Tabaton M, Shimohama S, Cash AD, Siedlak SL, Harris PL, Jones PK, Petersen RB, Perry G, Smith MA: Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21: 3017–3023, 2001

## In vitro tau fibrillization: Mapping protein regions

Ismael Santa-María<sup>a</sup>, Mar Pérez<sup>a</sup>, Félix Hernández<sup>a</sup>, Victor Muñoz<sup>b</sup>,  
Francisco J. Moreno<sup>a</sup>, Jesús Avila<sup>a,\*</sup>

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

<sup>b</sup> Department of Chemistry and Biochemistry and Center for Biomolecular Structure and Organization, University of Maryland, College Park, MD 20742, USA

Received 11 April 2006; received in revised form 23 May 2006; accepted 1 June 2006

Available online 9 June 2006

### Abstract

We have investigated the propensity to form fibrillar aggregates of a variety of fragments and variants of the tau protein under the influence of a tau fibrillization inducer: coenzyme Q<sub>0</sub>. To better identify fibrillization hotspots, we compare the polymerization propensity of tau fragments containing the sequence of putative hotspots with that of tau variants with that same sequence deleted. We also investigate the effects of biologically occurring modifications such as phosphorylation and deamidation. We found that residues 305 to 335 are essential for in vitro tau fibrillization. Residues 306 to 311 facilitate in vitro assembly, but are not sufficient to mimic the in vivo fibrillization of tau. Furthermore, the propensity of the 306–311 sequence to form fibrils is highly decreased by chemical modifications of tyrosine 310 that are commonly found in vivo.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Tau; Polymerization; Coenzyme Q<sub>0</sub>; Tau variant

### 1. Introduction

Alzheimer's disease is characterized by the appearance of two aberrant structures in the brain of patients: senile plaques (SP) and neurofibrillary tangles (NFTs) [1]. NFTs are intracellular inclusions made of clumps of protein fibers termed paired helical filaments (PHFs) [2]. About 20 years ago it was found that the microtubule associated protein tau is a major component of PHFs [3–9] and that purified tau was able to assemble in vitro into fibrillar polymers that resemble the morphology of ex vivo PHFs (from here on we use the term PHF exclusively to denote in vivo produced material) [10]. Subsequent studies revealed that PHFs were rich in a phosphorylated protein [11], which turned out to be a hyperphosphorylated form of tau [12,13]. Aberrant phosphotau polymers also appear associated with other neurological diseases like Pick's disease, frontotemporal dementia linked

to chromosome 17, corticobasal degeneration, and progressive supranuclear palsy [14]. Interestingly, all these disorders are characterized by the presence of dementia symptoms [15].

Intriguingly, and in contrast to the  $\beta$ -amyloid peptides [16], tau protein has very low propensity to aggregate. This property has made difficult the development of in vitro procedures that faithfully mimic PHF formation. For instance, the hanging drop assay, as used for protein crystallization, renders tau fibrils with PHF-like ultra-structure, but requires extremely high protein concentrations [17]. Such limitation is often overcome by enzymatically modifying tau, or with the addition of compounds that facilitate tau assembly (i.e., inducers). Protein phosphorylation [18], glycation [19,20], deamination [10,21] and truncation by protein cleavage [22], have all been reported to increase the propensity of tau to fibrillize in vitro. Some examples of molecules that act as inducers are sulfated glycosaminoglycans (e.g., heparin [23,24]), other polyanions [25], fatty acids such as arachidonic acid [26,27], or products resulting from the oxidation of arachidonic acid like hydroxynonenal (HNE) [28]. More recently, Coenzyme Q<sub>0</sub> and other

\* Corresponding author. Tel.: +34 91 497 8460; fax: +34 914974799.

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

quinones have been reported to act as inducers of tau fibrillization [29]. In all these cases the concentration of tau required for its assembly is dramatically decreased (for a review see [30]).

Tau is also a large protein (i.e., 441 residues for the human full-length tau) with 6 different isoforms produced by alternative splicing [31,32], thus suggesting that only a fraction of the molecule should be involved in its fibrillization. Indeed, analysis of the PHF core showed that only a fragment of ~100 residues from the tubulin binding domain of tau is involved in forming the PHF scaffold [33]. The tubulin binding domain of tau comprises three (tau 3R) or four (tau 4R) repeated regions with similar aminoacid sequences [34,35]. It has later been proposed that it is the third repeat region of the tubulin binding domain the one primarily involved in tau fibrillization, with the second repeat playing a surrogate role in the assembly reaction [24]. Following these ideas, in this work we investigate the in vitro fibrillization of tau using Coenzyme Q<sub>0</sub>, as inducer for polymerization of different tau fragments and/or variants with the goal of identifying the regions of tau that participate in PHF formation.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone (coenzyme Q<sub>0</sub>, ref no. D-9150), p-Benzoquinone (Ref. B-1266) was obtained from Aldrich (Steinheim, Germany). Acrylamide/bisacrylamide solution was supplied by Bio-Rad. Synthetic oligonucleotides were purchased from Isogen (Belgium) and peptides were obtained from NeoMPS (Strasbourg, France).

### 2.2. Construction of expression plasmids of three different tau deletion mutants

The plasmid pRKT42 [24], which encodes a human 4-repeat tau isoform with two N-terminal exons, was used a template. To obtain other constructs, mutagenesis was carried out in the parent plasmid pRKT42 using the polymerase chain reaction (PCR). Oligonucleotides R2D1 (AAACACGTCCCGGGAGGCGCCAGGTGGAAGTAAAATCTGAGAAGCTTGACGTCAAGCTTCTCAGATTTACTTCCACCTGGCCGCTCCCGGGACGTGTTT), R2D2 (AAACACGTCCCGGGAGGCGCCAGTTGACCTGAGCAAGGTGACCTCCGAGGTCACTTGCTCAGGTCAACTGGCCGCTCCCGGGZCGTGTTT) and R2D3 (TACAAACCAGTTGACCTGAGCCAGGTGGAAGTAAAATCTGAGAAGCTTGACGTCAAGCTTCTCAGATTTACTTCCACCTGGCTCAGGTCAACTGGTTTGTGA) were used as 3' primers.

Oligonucleotide A6 (CGGGATCCATAATGGCTGAGCCC), which includes the initiation codon as well as *Bam*HI and *Nde*I sites for a proper cloning onto the vector, was used as 5' primer. The obtained fragment was used as template for a second PCR. Oligonucleotide A8 (GCGAATTCTCACAAACCCTGCTTGG), which includes a stop codon as well an *Eco*RI site downstream, was used as the 3' primer. The fragments generated by PCR amplification were digested with *Nde*I and *Eco*RI and the ligated into *Nde*I–*Eco*RI-digested pRK172. A similar approach was done to isolate tau deletion mutants using the plasmid pRKT30, which encodes a human three-repeat tau isoform.

### 2.3. Protein and peptide preparation

Recombinant human tau (whole molecule), tau fragment 1 (containing the amino-terminal half of tau protein), tau fragment 2 (containing the four tubulin binding motifs and the carboxyl-terminal region), tau fragment 3 (containing the four tubulin binding motifs), tau fragment 4 (containing the second and third

tubulin binding motifs), and tau fragment 5 (containing the carboxy-terminal region), were isolated as previously described, [29] (see Fig. 7 for a scheme of the tau fragments used here). Among, tau variants we have used tau protein with the four tubulin binding repeats (tau 4R) but lacking residues 306–311 (tau 4R $\Delta$ <sub>306–311</sub>), or tau protein with three tubulin binding repeats (tau 3R), lacking the equivalent residues (first six residues located at the 3rd repeat) of tau 4R (tau3R $\Delta$ <sub>275–281</sub>). Also, we have used those tau proteins lacking the whole 3<sup>rd</sup> repeat (tau 4R $\Delta$ <sub>305–335</sub>) or residues 321–335 (tau 4R $\Delta$ <sub>321–335</sub>). In this work, also we use the following peptides, which have been synthesized with solid-phase methods and purified as previously reported [36]. Peptide I (first repeat): QTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGK; peptide II (second repeat): VQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPPGGGS; peptide IIa: VQIINK; peptide IIb: NVQSKCGSKDNIKHVPPGGGS; peptide III (third repeat): VQI-VYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQ; peptide IIIa: VQIVYK (also tested with tyrosine in phosphorylated form, or replaced by phenylalanine); peptide IIIi: PVDLSKVTS; peptide IIIb: KCGSLGNIHHKPGGGQ and peptide IV (four repeat): VEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPPGGGN.

### 2.4. Assembly of Tau peptides into filaments

Filaments were grown by vapor diffusion in hanging drops, as previously described [24]. For assembly of peptides in the presence of quinones, tau protein (0.5–2 mg/ml) in final volume between 20  $\mu$ l and 1 ml, was incubated at 4 °C, in a buffer containing 0.1 M MES pH 6.4, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EGTA (buffer A) plus 50 mM NaCl, in the absence, or the presence, of 0.25 mM to 4 mM of

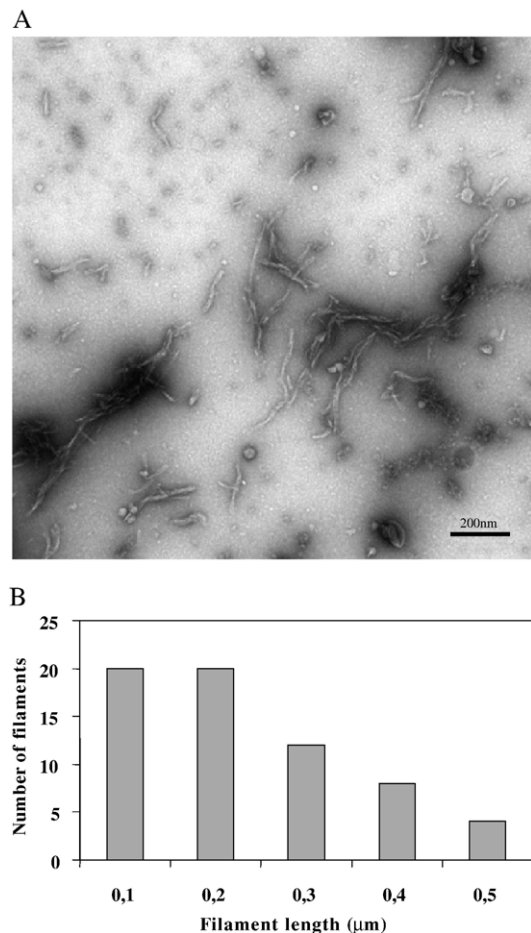


Fig. 1. Assembly of tau in the presence of quinones. Tau protein (1 mg/ml) was mixed with Coenzyme Q<sub>0</sub> (1 mM) and the assembled polymers from tau were visualized by electron microscopy (A). The length distribution of the polymers is shown in panel B.

coenzyme Q<sub>0</sub>. The reservoir for the hanging drop assay [37] contained 0.2 M NaCl in buffer A.

### 2.5. Measurements of aggregated or polymerized protein

To quantify the amount of polymerized protein, samples were centrifuged for 30 min at maximum speed in an Airfuge (Beckman). The protein present in supernatant and pellet was analyzed by gel electrophoresis followed by western blot using tau antibody 7.51 (a kind gift of Dr. C. Wischik, UK). The amount of protein was quantified by densitometry.

### 2.6. Electron microscopy

The samples were prepared and visualized under the transmission electron microscope as previously indicated [24].

### 2.7. Immunofluorescence studies

Tau fibrillar polymers were visualized by immunofluorescence, using a variation of the technique employed for microtubule visualization [38,39], by a novel technique [40]. Briefly, a suspension of tau polymers was placed in a corex tube containing a glass coverslip. After centrifugation at 1500 rpm in a HB4 rotor for 60 min at room temperature, the protein sedimented on the coverslip was fixed with 4% paraformaldehyde, and processed for double immunofluorescence [38] using an antibody raised against tau (T14)(1:500) and 0.01% thioflavin S. With this technique, tau filaments, that cannot be seen under the optic microscopy, can be visualized under a fluorescent microscope. Fluorescence microscopy was used to measure fluorescence intensity. Fibrillar polymers were observed with a Zeiss Axiovert200 fluorescent microscope. T14 antibody (obtained from Zymed, CA, USA) and thioflavin-S fluorescence images were captured through a 100× objective

on a high-resolution CCD camera (SPOT RT Slider, Diagnostic). The images were saved for later analysis and quantification. Camera exposure and light settings were kept constant during each experiment.

The fluorescence intensity measurements were carried out using the image analysis software Metamorph 6.1 r6 (Universal Imaging).

### 2.8. Iodination of tau peptide IIIa

The peptide was labeled with iodine using the chloramine T technique. The peptide was further purified by gel filtration as described previously (Antibodies. A laboratory manual. Chapter 9. by Ed. Harlow and D Lane. Cold Spring Harbor Laboratory).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Tau fibrillization induced by quinones

As we have described previously [29], tau readily fibrillizes *in vitro* in the presence of quinones (see Fig. 1A). The length distribution of these polymers is shown in Fig. 1B. An average length of 0.23 μm was found. This average length was different to that described for heparin-promoted tau polymers (around 0.8 μm), using similar assembly conditions to those used in the presence of quinones [24]. Also, assembly of longer polymers was found in the presence of heparin but using a different assembly buffer [37]. In that case also very tiny filaments (“dashed minifilaments”) were observed together with the long filaments. About the diameter of the filaments, a range from

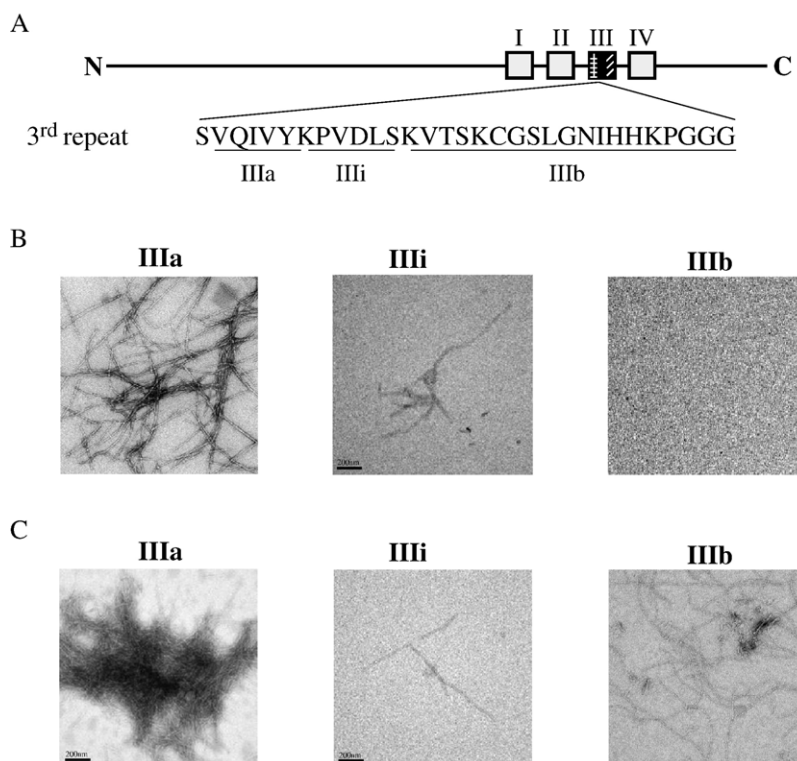


Fig. 2. Assembly of the different peptides comprising the 3rd tubulin binding repeat, in the presence of quinones. (A) A scheme of tau molecule showing the 3rd tubulin binding repeat, divided in three peptides, IIIa, IIIi, IIIb, is shown. (B) Assembly of the three peptides (1 mg/ml) in the absence of any added compound. (C) Assembly of the three peptides in the presence of Coenzyme Q<sub>0</sub> (see Materials and methods).

9 nm to 20 nm was described for heparin-induced tau filaments [24,37], and range from 10 nm to 15 nm was observed for quinone-induced filaments.

### 3.2. The role of the tubulin binding repeats II and III in tau assembly

Several reports have shown that peptides corresponding to the isolated sequences of repeats II or III can fibrillize in vitro [17,24,41,42]. Here, we perform a complementary experiment. The experiment consists in investigating the fibrillization ability of a variant of tau with repeats II and III deleted. If repeats II and III are, indeed, the hotspots for fibrillization of full-length tau, a variant with both repeats deleted should prove unable to fibrillize in vitro. To thoroughly test this idea, we

attempted to fibrillize this tau variant with quinones. Quinones failed to induce fibrillization of the tau variant without repeats II and III even at relatively high concentrations (i.e., 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) (data not shown). These results indicate that, in addition to being able to fibrillize independently, repeats II and III comprise the sequence critical for inducing tau fibrillization in vitro. Interestingly, a tau isoform that naturally lacks repeat II is able to fibrillize in vitro [17], thus suggesting that the fibrillization hotspot can be mapped more precisely as part of repeat III. To analyze this region of the whole tau (tau 4R) we divided it in three short segments: peptide IIIa (residues 306 to 311), peptide IIIi (residues 312 to 320) and peptide IIIb (residues 321 to 335) (see Fig. 2A). Peptides encompassing each of these three sequences were able to fibrillize in the presence of quinones (Fig. 2C). However, peptide IIIi

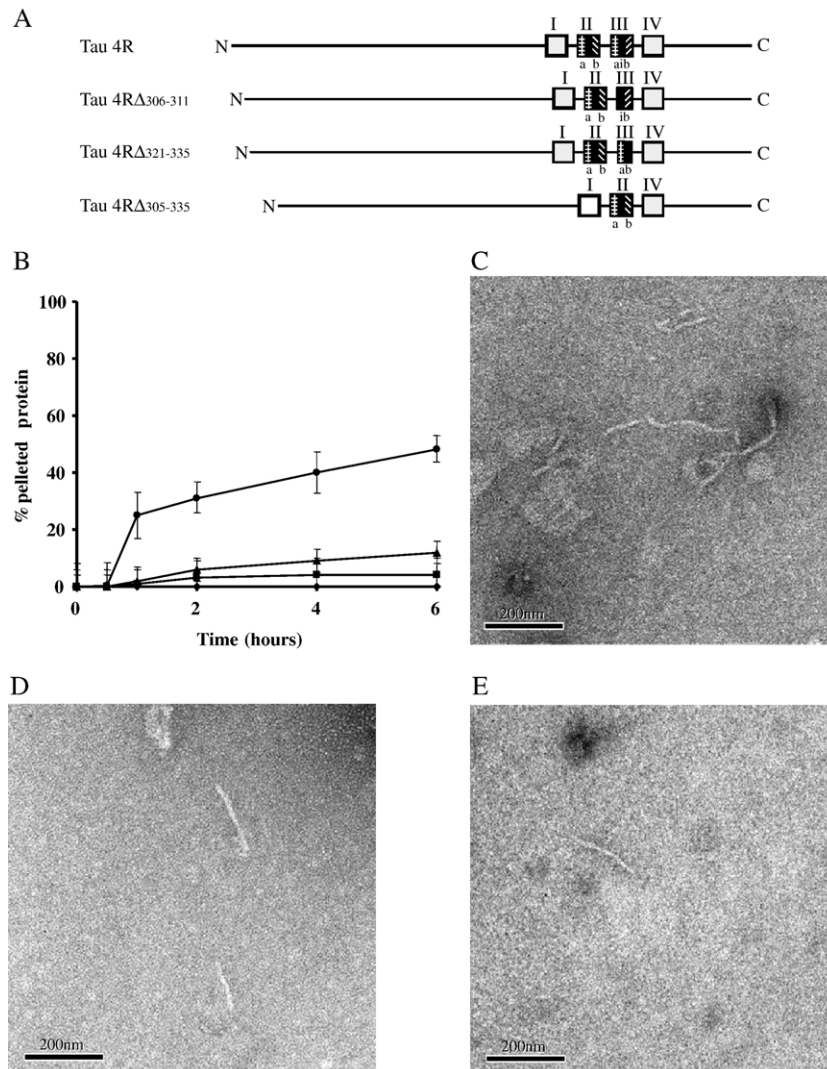


Fig. 3. Assembly of tau protein variants lacking some residues from the 3rd tubulin binding region. (A) Scheme of tau 4R protein and its variants tested in this experiment. (B) The whole tau protein (●) or variants lacking the whole third tubulin binding repeat (residues 305–335) (◆), lacking the residues comprising peptide IIIb (317–335) (■), or lacking the residues comprising peptide IIIa (306–311) (▲) were mixed at a concentration of 1 mg/ml with Coenzyme Q<sub>0</sub> (2 mM), and the amount of assembled polymers was measured after their centrifugation (see Materials and methods). Panel B shows a decrease in protein polymerization when tau lacks segments IIIa, or IIIb and it is not found in the absence of the whole repeat. Panels C–E show examples of the fibrils assembled from tau, tau lacking peptide IIIa and tau lacking peptide IIIb, respectively.

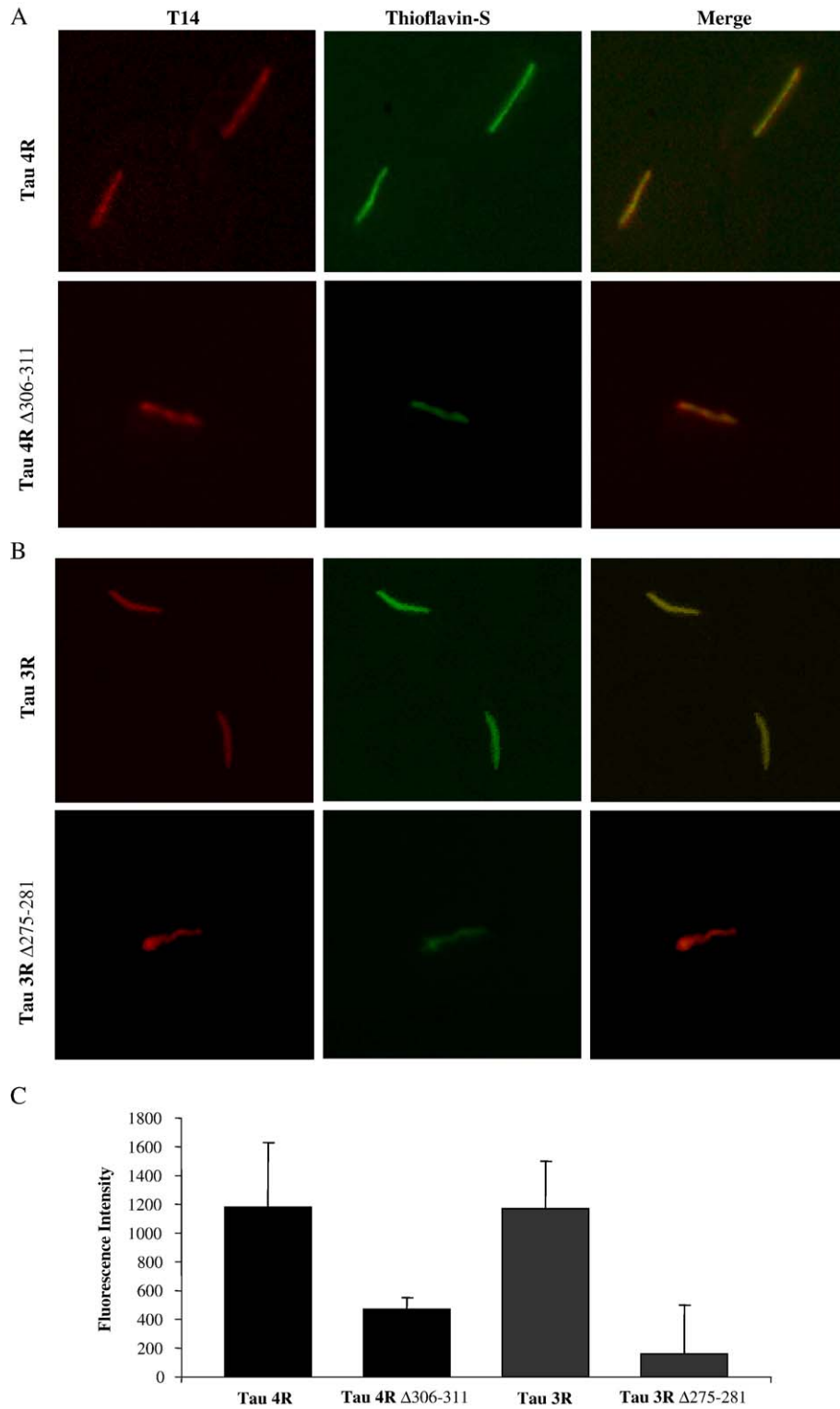


Fig. 4. Thioflavin-S fluorescence of tau and tau (lacking peptide IIIa) polymers. (A) The whole tau containing the four tubulin binding repeats (tau 4R) and tau 4R variant lacking peptide IIIa (residues 306–311 in tau 4R)(tau 4R $\Delta_{306-311}$ ) were assembled and visualized by immunofluorescence (see Materials and methods) using tau antibody T14 and/or thioflavin-S. The obtained results and the merge of T14 plus thioflavin-S images are shown. (B) As in (A) but testing tau 3R and tau 3R variant lacking the equivalent peptide IIIa (residues 275–281)(tau 3R $\Delta_{275-281}$ ) from tau 4R. (C) Quantification of the thioflavin fluorescence observed by fluorescence microscopy. The fluorescence intensity of the filament area was obtained by background subtraction. Tau variants lacking peptide IIIa show a significantly reduced fluorescence intensity ( $n=10$ ,  $P<0.01$  as compared with tau 4R or with tau 3R).

fibrillized with significantly lower efficiency than the other two. Peptide IIIa, which is only 6 residues long, fibrillizes readily even in the absence of any added inducer (Fig. 2B). The high intrinsic tendency to fibrillize of peptide IIIa could indicate that this short sequence contains the fibrillization hotspot for tau. At this level of dissection (from over 400 residues down to 6) it is important to exert caution, however, because short unstructured peptides have high intrinsic propensity to aggregate into  $\beta$ -amyloid fibrils [43]. Indeed, a tau variant lacking this segment of six residues displays a reduced propensity to fibrillize in the presence of quinones, but

fibrillar polymers can still be found. Fig. 3A shows the polymers from tau 4R and Fig. 3B, those assembled from tau variant lacking those six residues (tau 4R $\Delta_{306-311}$ ). Additionally, Fig. 3C and D shows two examples of those polymers assembled from tau variant lacking residues 317–335 (tau 4R $\Delta_{317-335}$ ). The few fibrils observed are comprised of tau molecules, as observed by immunofluorescence with tau antibody T14 (Fig. 4A), and display decreased thioflavin-S fluorescence (Fig. 4A, and C for the quantitative analysis). This result was found by testing both tau 4R (Fig. 4A) or tau 3R (Fig. 4B) variants lacking that segment of six residues.

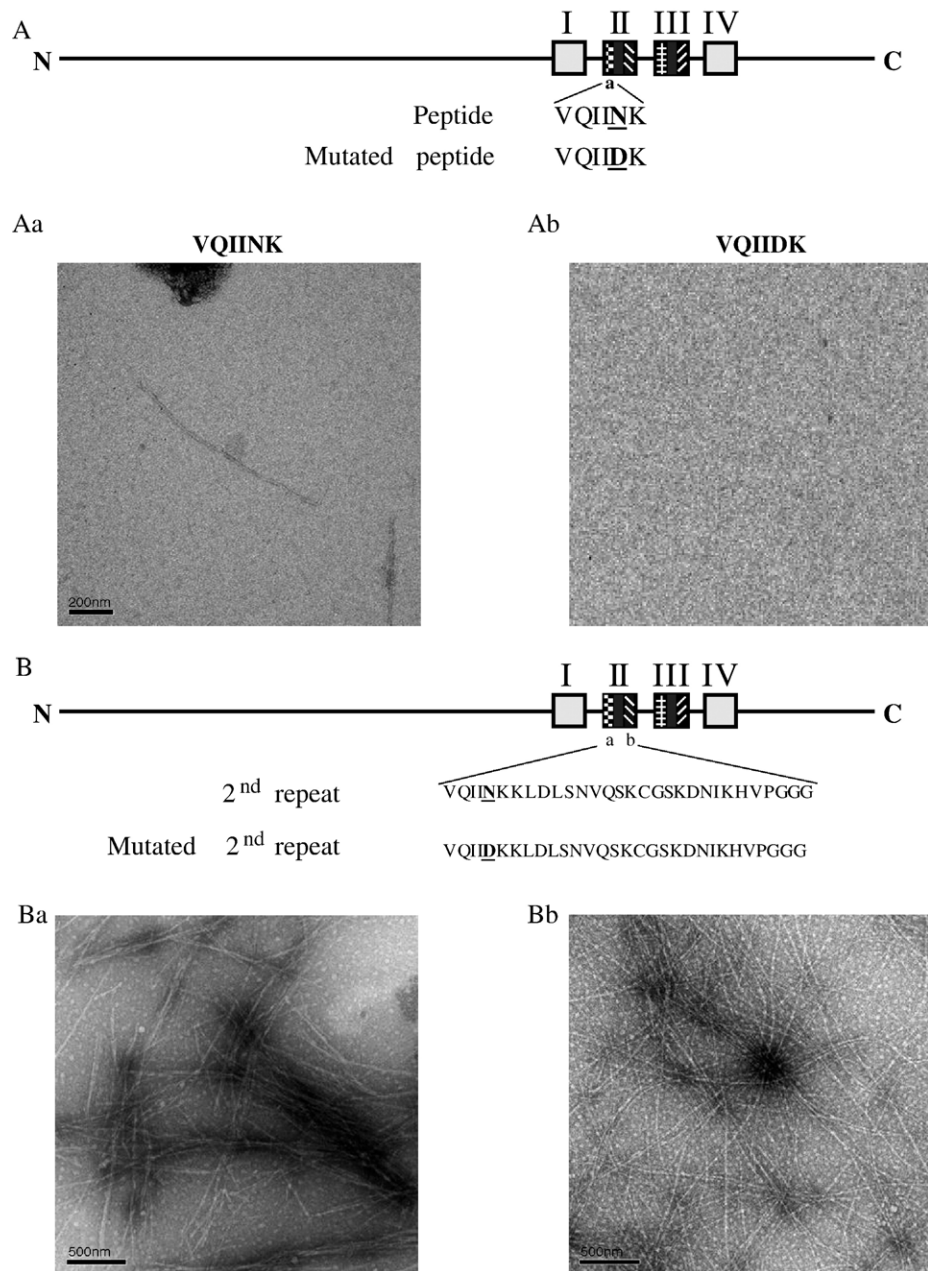


Fig. 5. Assembly of peptide VQIINK and its variants. Assembly of the second tubulin binding repeat peptide. (A) A scheme of the localization of tau peptide VQIINK in tau molecule is shown. Also, the variant of that peptide where aspartic acid replaces asparagine is indicated. (Aa) Few fibrils from VQIINK peptide were found in the absence of any added compound. (Ab) No fibrils were observed for VQIIDK. (B) Scheme of the second tubulin binding repeat peptide and its variant whose asparagine was mutated to aspartic acid. (Ba) Assembly of the second repeat peptide in the presence of quinone. (Bb) Assembly of the mutated second repeat peptide in the presence of quinone.

### 3.3. Role of chemical modifications in segments IIa and IIIa

Tau protein extracted from Alzheimer's disease patients often has the asparagine of peptide IIa (VQIINK) deamidated to aspartic acid [21]. To investigate the potential role in fibrillization of this chemical modification we first analyzed the propensity to fibrillize of 6-mer peptides of sequence VQIINK and VQIIDK. In the absence of any inducer, the original sequence (VQIINK) fibrillizes, while no fibrils are observed for the peptide mimicking the deamidation product (Fig. 5A). These results are incompatible with the frequent observation of deamidation in Alzheimer's patients [21]; once more giving a warning on the relevance of the fibrillization behavior of such short peptides. Furthermore, quite different results are obtained when the same chemical modification is investigated using peptides encompassing the complete repeat II. Repeat II requires inducers to fibrillize in vitro, and, under those conditions, no differences are observed between the

fibrillization propensity of the original sequence and the deamidated product (Fig. 5B).

The equivalent sequence in repeat III (i.e., fragment IIIa with sequence VQIVYK) is also a potential target of chemical modifications affecting its tyrosine, which could be either iodated [44] or phosphorylated. Fragment IIIa is particularly interesting because it has been postulated by other authors as the "nucleus" for the fibrillization reaction of tau [44]. In the experiments described in the previous section we find that this fragment might too small to play such a critical role, but does seem to be part of the fibrillization hotspot in vitro (see above). Following the same rationale applied above, we investigated the effect caused by the chemical modifications on the in vitro fibrillization of this short peptide. Fig. 6B and C show that iodation of peptide IIIa does not significantly affect its propensity to self-assemble into fibrils. Fig. 6D shows that the phosphorylation of tyrosine 310, on the other hand, abolishes the formation of peptide IIIa fibrils in our experimental

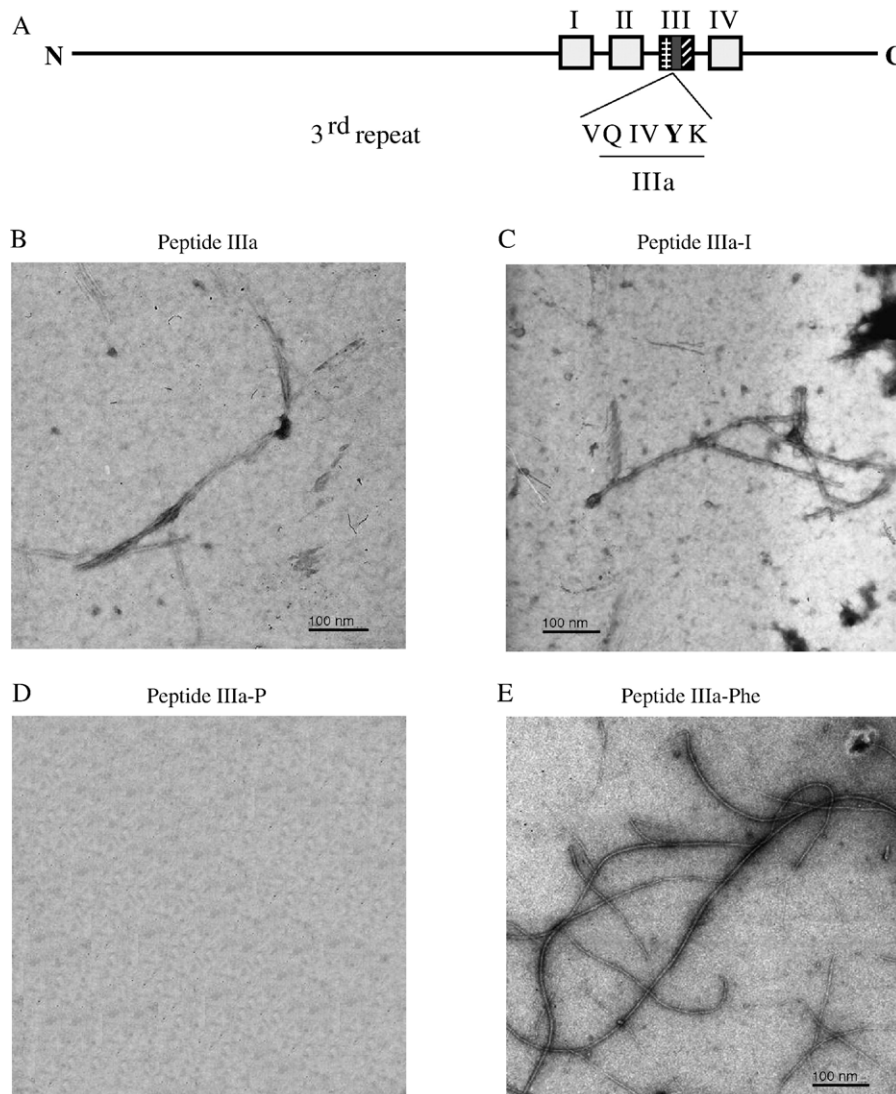


Fig. 6. Assembly of peptide VQIVYK and its variants. (A) Scheme of the localization of peptide IIIa (VQIVYK) in tau molecule. (B) Fibrils assembled from peptide IIIa in the absence of any added compound. (C) Fibrils assembled from peptide IIIa with its tyrosine iodated. (D) Absence of fibrils of peptide IIIa with its tyrosine phosphorylated. (E) Assembled fibrils of peptide IIIa with its tyrosine replaced by phenylalanine.



conditions. As a control for the specificity of the reaction, we also investigated the consequence of replacing tyrosine 310 by phenylalanine in peptide IIIa. This mutation increases the hydrophobicity of the sequence, and is not related to Alzheimer's disease. Fig. 6E shows that this peptide has a slightly higher propensity to form fibrils, which are more regular and longer. From these results it is clear that non-biological modifications that increase the hydrophobicity of the sequence also increase formation of fibrils in vitro, while potentially biological modifications, such as phosphorylation, can eliminate the formation of fibrils. This result is consistent with the previous finding of Pawar et al. [45]. The combination of these observations strongly suggests that the in vitro fibrillization of peptide IIIa is not specific of PHF formation,

but a logical consequence of its short sequence and hydrophobic character.

#### 4. Conclusions

In this work we have analyzed the specificity of tau fibrillization reaction in the presence of inducers such as quinones. Additionally, we have mapped the in vitro fibrillization hotspot of tau onto the third repeat of its microtubule binding domain.

Fig. 7 summarizes present and previous results on our efforts to map the fibrillization hotspot of tau. Looking at Fig. 7 it is possible to conclude that tau variants containing the second and third tubulin binding repeats fibrillize in vitro in the presence of



A

<u>Tau fragment (residues)</u>	<u>Assembly alone</u>	<u>Assembly + heparin</u>	<u>Assembly* + inducer</u>	<u>References</u>
<b>Whole molecule</b> (1-441)	-	+	+	(24, 29)
<b>I</b> (1-251)	-	-	-	(36)
<b>2</b> (251-441)	-	+	+	(36)
<b>3</b> (250-367)	-	+	+	(29, 36)
<b>4</b> (250-335) deleted (274-304)	-	++	++	(24, 29)
<b>5</b> (367-441)	+/-	-	-	(36)
<b>I</b> (250-273)	-	-	-	(24)
<b>II</b> (274-304)	-	+	+	(24, 29)
<b>IIa</b> (275-280)	+	+	+	(this work)
<b>IIb</b> (286-304)	-	+	+	(this work)
<b>III</b> (305-335)	-	+	+	(24, 29, 36)
<b>IIIa</b> (306-311)	++	+	+	(this work)
<b>IIIi</b> (312-320)	+/-	+/-	+/-	(this work)
<b>IIIb</b> (321-335)	-	+	+	(this work)
<b>IV</b> (336-367)	-	-	-	(24)

\* The assembly increases upon phosphorylation (see ref 29)

B

<u>Tau fragment (residues)</u>	<u>Assembly alone</u>	<u>Assembly + heparin</u>	<u>Assembly* + inducer</u>	<u>References</u>
<b>Whole molecule</b> (1-441)	-	++	++	(this work)
<b>Tau 4R Δ306-311</b> (1-441) deleted (306-311)	-	NA	+/-	(this work)
<b>Tau 4R Δ321-335</b> (1-441) deleted (321-335)	-	NA	+/-	(this work)
<b>Tau 4R Δ305-335</b> (1-441) deleted (305-335)	-	NA	+/-	(this work)

Fig. 7. Summary of the assembly characteristics of tau peptides located along tau molecule. (A) Summary of the data from this and previous works on the mapping of tau fibrillization hotspot. The propensity to fibrillize in the absence or presence of polymerization inducers is shown using a semi-quantitative scale. (B) Fibrillization propensity of tau and its variants, indicated in Fig. 3A. NA means not analyzed.

quinones. A tau fragment containing residues 305 to 335 displays a high propensity to fibrillize *in vitro*, although it requires the presence of inducers. Furthermore, deleting sections of this sequence severely hampers the ability of tau to fibrillize *in vitro*. Several experiments have also tested the fibrillization propensity of smaller fragments within this area of tau. A 6-mer peptide comprising residues 306 to 311 (VQIVYK) is able to fibrillize in the absence of any added compound. Other groups have described that even a tripeptide containing residues 309 to 311 (AcVYK) can fibrillize *in vitro* without inducers [46]. The equivalent 6-mer from repeat II, comprising residues 275 to 280 (VQIINK), can also self assemble in the absence of any added compound. Our results, however, raise serious concerns regarding whether these short peptides retain the fibrillization behavior of full-length tau, or are simply forming a non-specific cross beta sheet conformation *in vitro*. These concerns are further substantiated by the analysis of tau chemical modifications related to Alzheimer's disease. Some of these chemical modifications alter the fibrillization behavior of the short peptides in patterns that are incompatible with their biological role. In the context of the whole protein, the short fragment 306–311 (peptide IIIa) seems to facilitate tau fibrillization *in vitro*, but it is not required for fibrillization in the presence of quinones, consistently with Gamblin's model for tau fibrillization [47]. From all these observations we conclude that the region corresponding to repeat III is the minimal hotspot for tau fibrillization *in vitro*.

### Acknowledgements

We are grateful to Ignacio Tardieu de Chorro, Raquel Cuadros and Santiago Soto-Largo for skilful technical assistance. This work was supported by grants from Plan Nacional (Spain), Comunidad de Madrid, Neuropharma, FIS (04/0607), and by an Institutional Grant of Fundación R. Areces.

### References

- [1] A. Alzheimer, *Allg. Z. Psychiatr.* 64 (1907) 146–148.
- [2] M. Kidd, Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease, *Nature* 197 (1963) 192–193.
- [3] I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, M. Quinlan, Y.C. Tung, M.S. Zaidi, H.M. Wisniewski, Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 6084–6089.
- [4] J.P. Brion, H. Passasiro, J. Nuñez, J. Flament-Durand, *Arch. Biol.* 95 (1985) 229–235.
- [5] J.G. Wood, S.S. Mirra, N.J. Pollock, L.I. Binder, Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83 (1986) 4040–4043.
- [6] K.S. Kosik, C.L. Joachim, D.J. Selkoe, 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 (1986) 4044–4048.
- [7] Y. Ihara, N. Nukina, R. Miura, M. Ogawara, Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease, *J. Biochem. (Tokyo)* 99 (1986) 1807–1810.
- [8] C.M. Wischik, M. Novak, P.C. Edwards, A. Klug, W. Tichelaar, R.A. Crowther, Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85 (1988) 4884–4888.
- [9] M. Goedert, C.M. Wischik, R.A. Crowther, J.E. Walker, A. Klug, 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 (1988) 4051–4055.
- [10] E. Montejo de Garcini, L. Serrano, J. Avila, Self assembly of microtubule associated protein tau into filaments resembling those found in Alzheimer disease, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 141 (1986) 790–796.
- [11] B.L. Wolozin, A. Pruchnicki, D.W. Dickson, P. Davies, A neuronal antigen in the brains of Alzheimer patients, *Science* 232 (1986) 648–650.
- [12] V.M. Lee, B.J. Balin, L. Otvos Jr., J.Q. Trojanowski, A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau, *Science* 251 (1991) 675–678.
- [13] I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, Y.C. Tung, M. Quinlan, H.M. Wisniewski, L.I. Binder, Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83 (1986) 4913–4917.
- [14] L. Buee, T. Bussiere, V. Buee-Scherrer, A. Delacourte, P.R. Hof, Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders, *Brain Res. Brain Res. Rev.* 33 (2000) 95–130.
- [15] V.M. Lee, M. Goedert, J.Q. Trojanowski, Neurodegenerative tauopathies, *Annu. Rev. Neurosci.* 24 (2001) 1121–1159.
- [16] A. Lomakin, D.S. Chung, G.B. Benedek, D.A. Kirschner, D.B. Teplow, On the nucleation and growth of amyloid beta-protein fibrils: detection of nuclei and quantitation of rate constants, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 1125–1129.
- [17] R.A. Crowther, O.F. Olesen, R. Jakes, M. Goedert, The microtubule binding repeats of tau protein assemble into filaments like those found in Alzheimer's disease, *FEBS Lett.* 309 (1992) 199–202.
- [18] A. Alonso, T. Zaidi, M. Novak, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 6923–6928.
- [19] M.D. Ledesma, P. Bonay, C. Colaço, J. Avila, Analysis of microtubule-associated protein tau glycation in paired helical filaments, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 21614–21619.
- [20] S.D. Yan, X. Chen, A.M. Schmidt, J. Brett, G. Godman, Y.S. Zou, C.W. Scott, C. Caputo, T. Frappier, M.A. Smith, et al., Glycated tau protein in Alzheimer disease: a mechanism for induction of oxidant stress, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 7787–7791.
- [21] A. Watanabe, K. Takio, Y. Ihara, Deamidation and isoaspartate formation in smeared tau in paired helical filaments. Unusual properties of the microtubule-binding domain of tau, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 7368–7378.
- [22] M. Novak, J. Kabat, C.M. Wischik, Molecular characterization of the minimal protease resistant tau unit of the Alzheimer's disease paired helical filament, *EMBO J.* 12 (1993) 365–370.
- [23] M. Goedert, R. Jakes, M.G. Spillantini, M. Hasegawa, M.J. Smith, R.A. Crowther, Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans, *Nature* 383 (1996) 550–553.
- [24] M. Perez, J.M. Valpuesta, M. Medina, E. Montejo de Garcini, J. Avila, Polymerization of tau into filaments in the presence of heparin: the minimal sequence required for tau-tau interaction, *J. Neurochem.* 67 (1996) 1183–1190.
- [25] T. Kampers, P. Friedhoff, J. Biernat, E.M. Mandelkow, E. Mandelkow, RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments, *FEBS Lett.* 399 (1996) 344–349.
- [26] D.M. Wilson, L.I. Binder, Free fatty acids stimulate the polymerization of tau and amyloid beta peptides. *In vitro* evidence for a common effector of pathogenesis in Alzheimer's disease, *Am. J. Pathol.* 150 (1997) 2181–2195.
- [27] T.C. Gamblin, M.E. King, J. Kuret, R.W. Berry, L.I. Binder, Oxidative regulation of fatty acid-induced tau polymerization, *Biochemistry* 39 (2000) 14203–14210.
- [28] M. Perez, R. Cuadros, M.A. Smith, G. Perry, J. Avila, Phosphorylated, but not native, tau protein assembles following reaction with the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal, *FEBS Lett.* 486 (2000) 270–274.

- [29] I. Santa-Maria, F. Hernandez, C.P. Martin, J. Avila, F.J. Moreno, Quinones facilitate the self-assembly of the phosphorylated tubulin binding region of tau into fibrillar polymers, *Biochemistry* 43 (2004) 2888–2897.
- [30] J. Avila, J.J. Lucas, M. Perez, F. Hernandez, Role of tau protein in both physiological and pathological conditions, *Physiol. Rev.* 84 (2004) 361–384.
- [31] M. Goedert, M.G. Spillantini, R. Jakes, D. Rutherford, R.A. Crowther, Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease, *Neuron* 3 (1989) 519–526.
- [32] A. Himmler, Structure of the bovine tau gene: alternatively spliced transcripts generate a protein family, *Mol. Cell. Biol.* 9 (1989) 1389–1396.
- [33] C.M. Wischik, M. Novak, H.C. Thogersen, P.C. Edwards, M.J. Runswick, R. Jakes, J.E. Walker, C. Milstein, M. Roth, A. Klug, Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85 (1988) 4506–4510.
- [34] G. Lee, N. Cowan, M. Kirschner, The primary structure and heterogeneity of tau protein from mouse brain, *Science* 239 (1988) 285–288.
- [35] M. Goedert, M.G. Spillantini, N.J. Cairns, R.A. Crowther, Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms, *Neuron* 8 (1992) 159–168.
- [36] M. Perez, M. Arrasate, E. Montejo De Garcini, V. Munoz, J. Avila, In vitro assembly of tau protein: mapping the regions involved in filament formation, *Biochemistry* 40 (2001) 5983–5991.
- [37] R.A. Crowther, O.F. Olesen, M.J. Smith, R. Jakes, M. Goedert, Assembly of Alzheimer-like filaments from full-length tau protein, *FEBS Lett.* 337 (1994) 135–138.
- [38] M. Garcia-Rocha, J. Avila, J. Lozano, The zeta isozyme of protein kinase C binds to tubulin through the pseudosubstrate domain, *Exp. Cell Res.* 230 (1997) 1–8.
- [39] L. Evans, T. Mitchison, M. Kirschner, Influence of the centrosome on the structure of nucleated microtubules, *J. Cell Biol.* 100 (1985) 1185–1191.
- [40] I. Santa-Maria, M. Perez, F. Hernandez, J. Avila, F.J. Moreno, Characteristics of the binding of thioflavin S to tau paired helical filaments, *J. Alzheimer's Dis.* 9 (2006) 1–7.
- [41] H. Wille, G. Drewes, J. Biernat, E.M. Mandelkow, E. Mandelkow, Alzheimer-like paired helical filaments and antiparallel dimers formed from microtubule-associated protein tau in vitro, *J. Cell Biol.* 118 (1992) 573–584.
- [42] M. Arrasate, M. Perez, R. Armas-Portela, J. Avila, Polymerization of tau peptides into fibrillar structures. The effect of FTDP-17 mutations, *FEBS Lett.* 446 (1999) 199–202.
- [43] M. Lopez de la Paz, L. Serrano, Sequence determinants of amyloid fibril formation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 87–92.
- [44] M. von Bergen, P. Friedhoff, J. Biernat, J. Heberle, E.M. Mandelkow, E. Mandelkow, 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 (2000) 5129–5134.
- [45] A.P. Pawar, K.F. Dubay, J. Zurdo, F. Chiti, M. Vendruscolo, C.M. Dobson, Prediction of "aggregation-prone" and "aggregation-susceptible" regions in proteins associated with neurodegenerative diseases, *J. Mol. Biol.* 350 (2005) 379–392.
- [46] W.J. Goux, L. Kopplin, A.D. Nguyen, K. Leak, M. Rutkofsky, V.D. Shanmuganandam, D. Sharma, H. Inouye, D.A. Kirschner, The formation of straight and twisted filaments from short tau peptides, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 26868–26875.
- [47] T.C. Gamblin, R.W. Berry, L.I. Binder, Modeling tau polymerization in vitro: a review and synthesis, *Biochemistry* 42 (2003) 15009–15017.

# Characteristics of the binding of thioflavin S to tau paired helical filaments

Ismael Santa-María, Mar Pérez, Félix Hernández, Jesús Avila\* and Francisco J. Moreno\*  
*Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM), Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049-Madrid, Spain*

**Abstract.** Binding of histological benzothiazole dye thioflavin S (ThS) to protein aggregates has been related with the presence of amyloid  $\beta$  sheet structure in those protein aggregates. Paired helical filaments (PHF) from Alzheimer's disease (AD) patients, (whose main component is the microtubule associated protein, tau) bind to thioflavins. By using a novel immunofluorescence method, the binding of ThS to isolated tau filaments was tested. Also, the characteristics of this binding of ThS to PHF or to the *in vitro* assembled tau filaments, have been analyzed. Our results suggests that ThS binds to PHF with a higher affinity than to the straight filaments (SF), also found in AD.

Keywords: Tau, paired helical filaments, straight filaments, Alzheimer's disease, thioflavin S.

## 1. Introduction

Tauopathies, a heterogeneous group of dementias, are characterized by the presence of aberrant aggregates of a microtubule associated proteins tau protein [7]. In the most prevalent tauopathy, Alzheimer's disease (AD), these aggregates form paired helical filaments (PHF) or straight filaments (SF). The visualization of those filaments, at different levels, requires of suitable techniques, like electron microscopy, or that of binding of fluorescent dyes to the filaments, for studies with optic microscopy [12]. However, the second type of analysis has been done on tissue samples but not on isolated tau filaments. Thus, we have tested if is possible the visualization of isolated tau filaments by immunofluorescence techniques, in a way similar to that used for the study of other filamentous protein polymers like microtubules (MT) [2]. To do that, we have tested the reaction of tau filaments with specific tau antibodies, or with some dyes like thioflavin S (ThS), a dye that

binds to PHF [8] yielding a fluorescent reaction. The reaction of ThS with some protein aggregates appear to be the consequence of the interaction of the dye with  $\beta$ -sheet regions present in the aggregated protein [8]. Although, fibrillar  $\beta$ -sheet synthetic homopolymers, like polyserine or polylysine, or amyloid aggregates from amyloid peptide, does not bind to thioflavin.

In this work, we have studied and characterized the reaction of isolated tau filaments from the brain of AD patients, or *in vitro* assembled polymers with specific antibodies, or with thioflavins.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Thioflavin S (Ref. T-1892), Heparinase I (Ref. H-2519) and Coenzyme Q<sub>0</sub> (Ref. D9150) were obtained from Aldrich (Steinheim, Germany).

### 2.2. Paired helical filament isolation and treatment with heparinase

Paired helical filaments (PHF) were isolated by preparation of sarkosyl-insoluble extracts, as previ-

---

\*Corresponding authors: Francisco J. Moreno or Jesús Avila, Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Facultad de Ciencias, Campus de Cantoblanco, Universidad Autónoma de Madrid, 28049-Madrid, Spain. Tel.: +34 914978460; Fax: +34 914974799; E-mail: {javila, fmoreno}@cbm.uam.es.

ously described [5]. The isolated PHF were characterized by electron microscopy as previously indicated [6]. Protein content was measured by the BCA (bicinchoninic acid) method at 37°C.

A solution of PHFs (0.5 mg/ml) was incubated in the presence of heparinase (100 U/ml) for 2 h at room temperature. After the treatments, the PHF samples were visualized by fluorescence microscopy as described below.

### 2.3. Tau purification

The expression and purification of recombinant tau protein, and its variant (tau- $\Delta_{306-311}$ ), was performed as previously described [10]. The isolation of tau variant (tau- $\Delta_{306-311}$ ) was described elsewhere (Santa-María et al., to be published). The isolated proteins were characterized by gel electrophoresis and Western blot, using antibodies raised against tau protein (7.51). Tau peptide comprising residues 306–311 was obtained from NeomPS (Strasbourg, France).

### 2.4. In vitro tau polymerization

The procedure, in the presence of heparin, previously indicated [4,10] was followed. The isolated filaments were characterized by electron microscopy as described [10]. In some experiments tau protein was polymerized in the presence of Coenzyme Q<sub>0</sub> [11].

### 2.5. Antibodies

The antibodies used to detect tau were ab7.51 (a kind gift of Dr. Wischik, UK) [9] and abT14 (antibody against a peptide containing aa83-120 of human tau), which was obtained from Zymed (Ca, USA).

### 2.6. Immunofluorescence analysis for isolated PHF

A suspension of isolated PHF, or tau polymers was placed in a corex tube (see scheme Fig. 1 [2]) containing a glass coverslip. After centrifugation at 1500 rpm in a HB4 rotor for 60 min at room temperature, the protein sedimented on the coverslip was fixed with 4% paraformaldehyde, and processed for double immunofluorescence using an antibody raised against tau (T14) (1:500) [3] and 0.01 % thioflavin S.

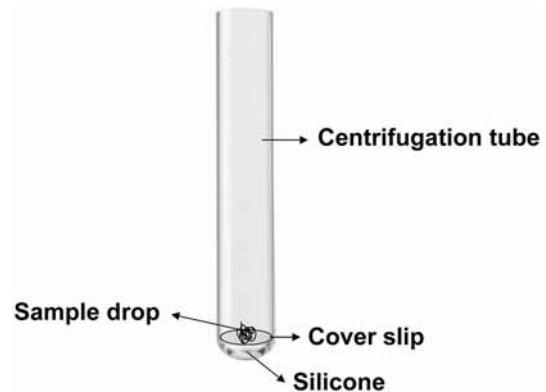


Fig. 1. Scheme of the method used to sediment and visualize isolated PHFs or tau polymers. A solution containing PHF or *in vitro* assembled tau polymers were added on a coverslip. The coverslip is placed on the bottom of the centrifugation tube and after sedimentation the coverslip is removed and processed for immunofluorescence analysis (see methods).

### 2.7. Immunofluorescence studies

Fluorescence microscopy was used to measure fluorescence intensity. Fibrillar polymers were observed with a Zeiss Axiovert200 fluorescent microscope. T14 antibody (obtained from Zymed, CA, USA) and thioflavin-S fluorescence images were captured through a 100 X objective on a high-resolution CCD camera (SPOT RT Slider, Diagnostic). The images were saved for later analysis and quantification. Camera exposure and light settings were kept constant during each experiment.

The fluorescence intensity measurements were carried out using the image analysis software Metamorph 6.1 r6 (Universal Imaging).

## 3. Results

### 3.1. Characterization of PHF and in vitro tau polymers by electron microscopy

PHF were isolated from AD patients, as indicated by Greenberg and Davies [5] and characterized by electron microscopy. Figure 2(A) shows an example of those analyses, where PHF are shown.

In addition, tau filaments, assembled *in vitro*, in the presence of heparin, were also characterized by electron microscopy (Fig. 2B).

These different tau polymers were also characterized by fluorescence analysis using optical microscopy.

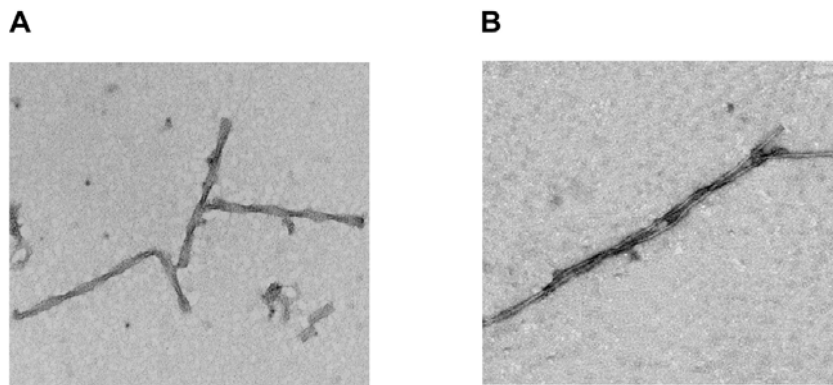


Fig. 2. Transmission electron microscopy of negatively stained PHFs and tau polymers. PHFs (A) and heparin induced tau polymers (B) were visualized by electron microscopy, after their isolation and purification.

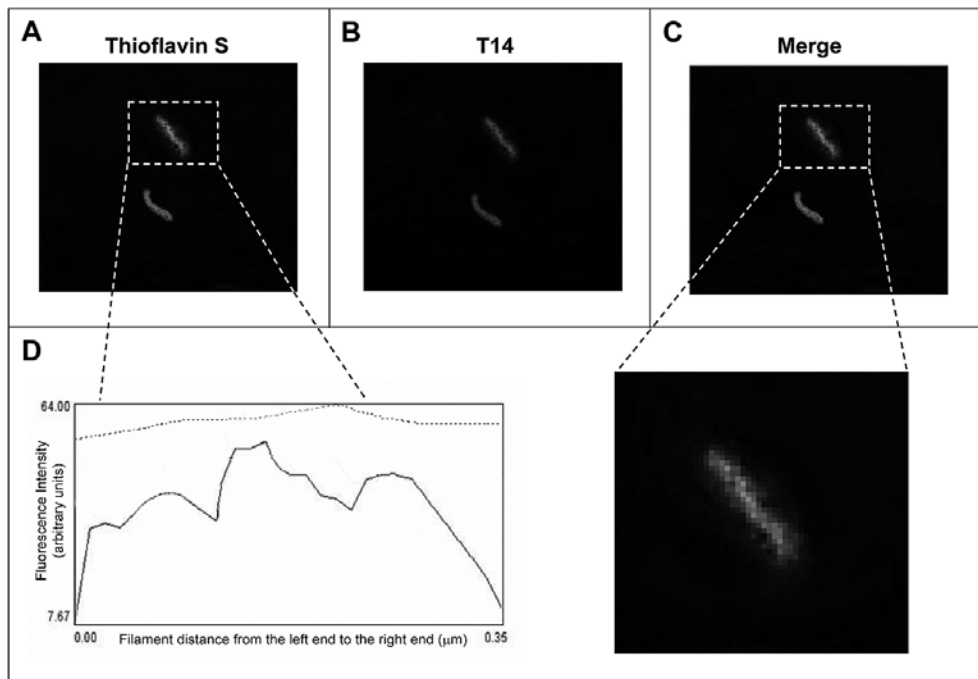


Fig. 3. Characterization of PHFs by immunofluorescence microscopy analysis. PHFs were visualized by immunofluorescence (see methods) using thioflavin-S (A) and tau antibody T14 (B). The merge of T14 plus thioflavin-S images are shown (C). ThS staining decreases at the ends of PHF polymers as we can observe in the inset of (C) and in the obtained fluorescence intensity plot (D). In this plot, the intensity for abT14 staining (---) and for ThS staining (—) are shown.

### 3.2. Visualization of isolated tau filaments by immunofluorescence analysis

To visualize isolated PHF, or other tau filaments, a method similar to that previously used to visualize microtubules [2] was used (see also Fig. 1). Figure 3 shows those fibrillar tau polymers reacting with ThS and a tau antibody (T14). Double immunofluorescence analysis indicate the colocalization of both types of

staining (Fig. 3C), due to ThS (Fig. 3A) and abT14 (Fig. 3B) in PHF isolated from AD patients. An amplification of the picture observed for one of these polymers indicate a helicity in that PHF polymer (Fig. 3C, inset). Curiously, ThS staining decreases at the ends of PHF polymers (Fig. 3D).

Tau polymers assembled *in vitro* in the presence of heparin [4,10] were also stained with ThS and abT14. An interpretation for this result is that in tau aggregates,

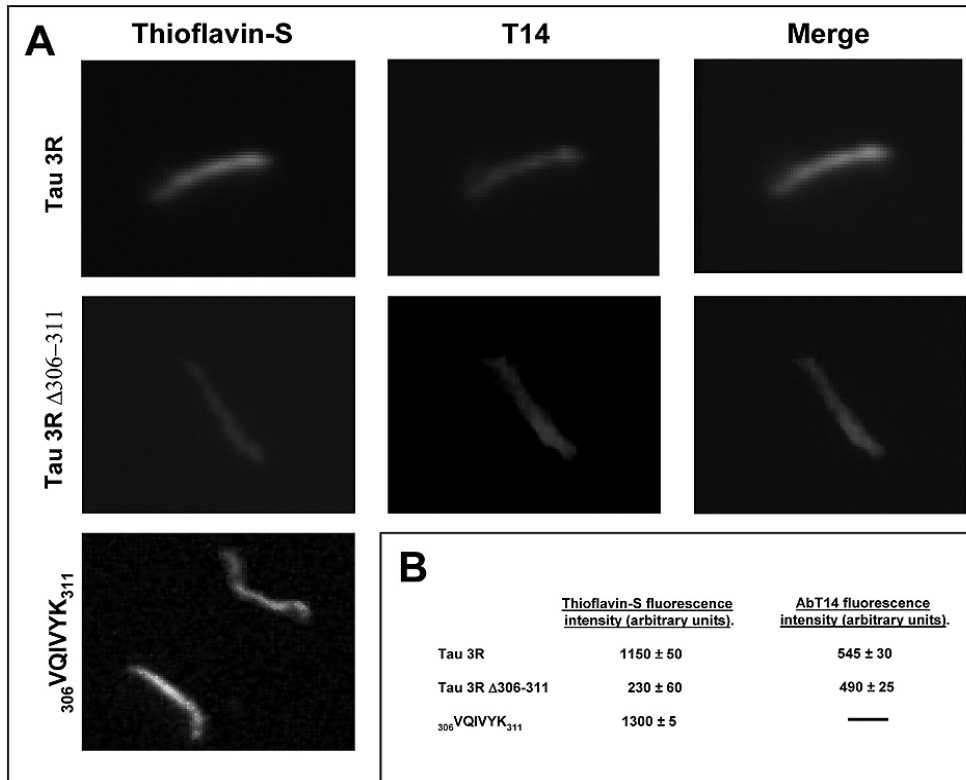


Fig. 4. Thioflavin-S fluorescence of tau 3R, tau 3R  $\Delta_{306-311}$  and tau peptide comprising residues 306–311 polymers. A) The whole tau 3R, tau 3R variant lacking peptide comprising residues 306–311 and the tau peptide comprising residues 306–311 were assembled and visualized by immunofluorescence using tau antibody T14 and/or thioflavin-S. The obtained results and the merge of T14 plus thioflavin-S images are shown for tau 3R and tau 3R  $\Delta_{306-311}$ . Tau peptide does not bind abT14. B) Quantitation of the thioflavin fluorescence observed by fluorescence microscopy. The fluorescence intensity of the filament area was obtained by background subtraction. Tau 3R variant lacking peptide comprising residues 306–311 shows a significantly reduced ThS fluorescence intensity ( $n = 10$ ,  $P < 0.01$  as compared with tau 3R or with tau peptide (residues from 306 to 311)).

part of the protein is in  $\beta$ -sheet conformation [12]. A peptide comprising residues 306–311 could have that conformation in PHF-tau [14]. Thus, we have tested a tau variant lacking those residues (Santa-Maria et al., to be published). Figure 4B indicates a decrease in ThS staining, but not that of abT14, in the tau variant compared with the whole tau (Fig. 4A).

In addition, tau peptide comprising residues 306–311 is able to polymerize, and its polymers could be also stained with ThS (Fig. 4A). Also, when some SF were observed, a decreased (compared to PHF) in ThS staining was found (Fig. 5). Thus, differences in ThS staining in these different tau polymers could be found with this method.

This result suggests a possible relation between helicity of tau polymers and ThS staining. Since the level of heparin bound to tau may also influence tau polymer helicity, we have tested ThS staining in the presence of heparinase.

### 3.3. Effect of heparinase on the ThS staining of PHF

Figure 6 shows the effect of heparinase on ThS staining. It shows that upon heparinase addition, a decrease in the staining was found. It agrees well with the previous suggestion that ThS staining correlates with the helicity of tau polymers (see also reference) [1].

### 3.4. Visualization of tau polymers assembled in the presence of quinones

The previous immunofluorescence method has been also used to detect tau polymers assembled by the addition of quinones [11]. In this case not only isolated filaments were visualized but also bundles of filaments, resembling PHF (or neurofibrillary tangles) (Fig. 7) were observed.

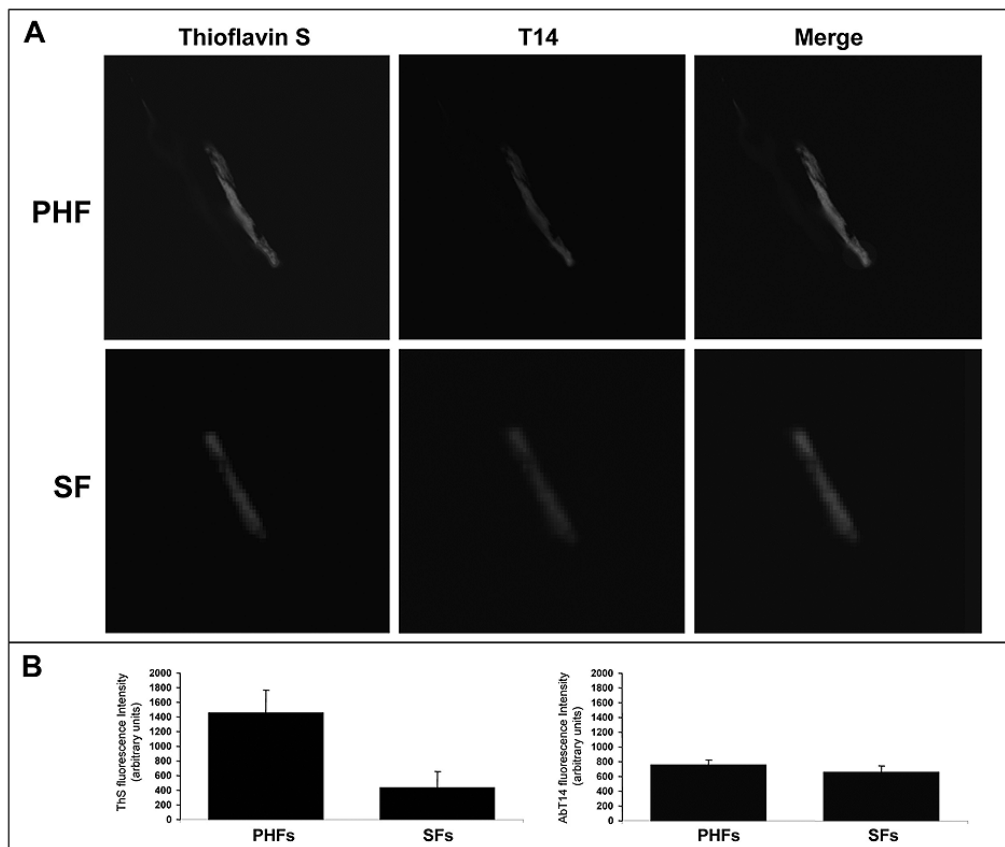


Fig. 5. Helicity and Thioflavin-S staining of PHFs and SF. A) PHFs and SF were visualized by immunofluorescence using tau antibody T14 and/or thioflavin-S. B) A decrease in the Th-S fluorescence of the Straight Filaments compared to Paired Helical Filaments is observed. AbT14 fluorescence intensity is also indicated in B) (right).

#### 4. Discussion

A fluorescent optic microscopy method used to identify cytoskeletal filaments, like microtubules [2], has been modified to visualize paired helical filaments, or *in vitro* tau polymerized filaments, after staining with ThS.

The use of this type of analysis suggests that PHF reacts with a higher affinity than SF with ThS; that ThS staining at PHF ends is lower than to that found in the middle of the polymer and that heparinase treatment decreases ThS binding to PHF. It was also previously reported [1,6] that heparinase treatment facilitates PHF detergent solubility. In addition, ThS staining in PHF has been correlated with a proportion of assembled tau in  $\beta$ -sheet conformation [12].

All of the previous results are compatible with the following model to explain PHF structure Fig. 8. PHF have a central region with a higher ThS staining suggesting a higher content of protein with  $\beta$ -sheet confor-

mation, in a helical stable form, in that PHF region. At the PHF ends, ThS staining decreases, suggesting that those ends could be more dynamic for polymerization-depolymerization, probably being the growing points for the polymer assembly. Indeed, by electron microscopy amorphous structures are found at PHF ends (see Fig. 8).

Also, our results and those previously mentioned [1, 6], suggest a possible relation among helicity in the polymer, heparin content of the polymer, ThS staining of the polymer, and detergent solubility of the polymer.

Heparinase treatment results in a decrease in the helicity of PHF [1] and in a decrease of ThS staining. This decrease, in ThS staining, could be due to a decrease in the proportion of protein with  $\beta$ -sheet conformation. In fact, a tau region containing residues 306–311 has been suggested to have  $\beta$ -sheet conformation [14] and we found a decrease in ThS staining in polymers of tau lacking residues 306–311, compared to that staining found in the polymers assembled with the whole tau protein (Santa-Maria et al., to be published).



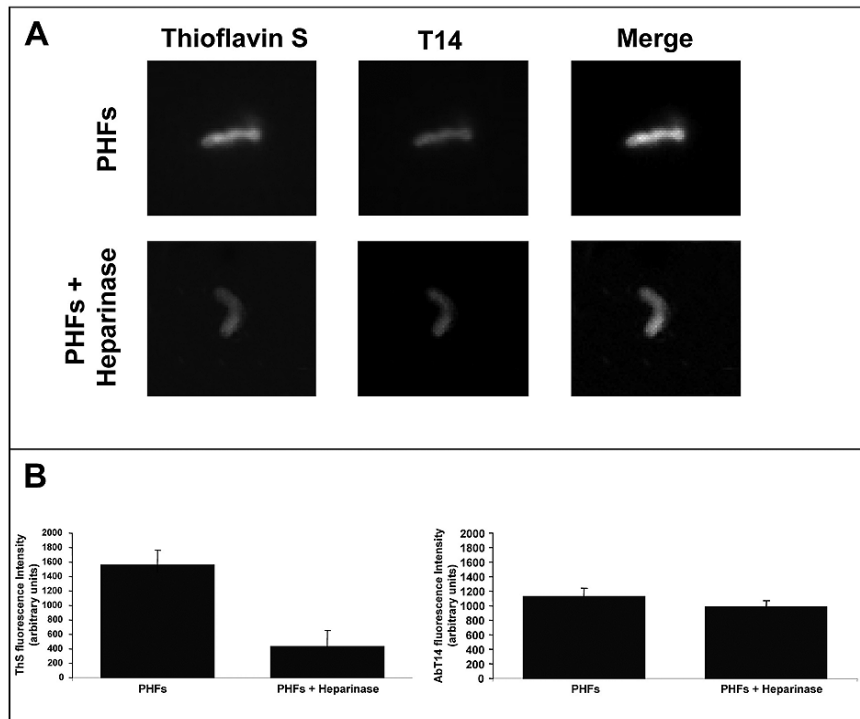


Fig. 6. Th-S staining of PHFs in the presence of heparinase. After the treatment with heparinase the PHFs were analyzed by fluorescence microscopy (A). A reduced Th-S fluorescence was observed after quantitation by fluorescence microscopy (B). AbT14 fluorescence intensity is also indicated in B) (right).

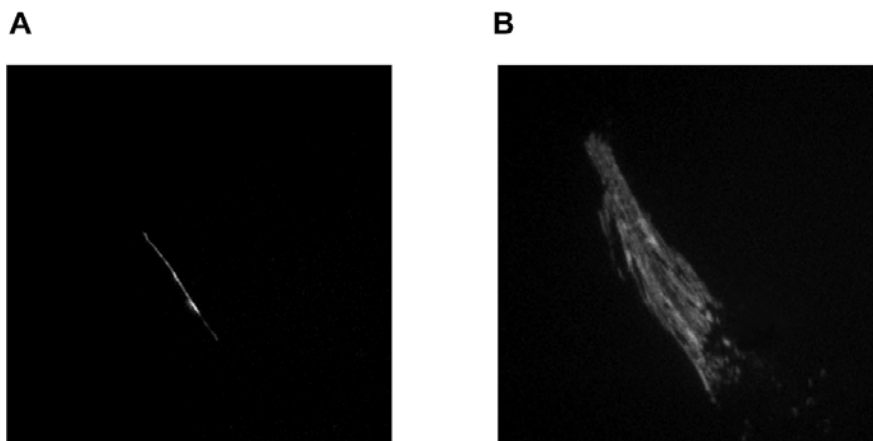


Fig. 7. Fluorescence microscopy of tau 3R polymers assembled in the presence of quinones. Visualization by Th-S staining of a tau 3R filament (A) and a bundle (B) of tau 3R filaments similar to a neurofibrillary tangle, polymerized in the presence of CoQ.

Also, an increase in detergent solubility was found in heparinase treated PHF [6] or in SF compared to untreated PHF, and our results suggest that after detergent treatments mainly ThS reacting polymers remain.

In addition, this type of ThS immunofluorescence analysis could be combined, in the future, with tau antibodies staining to further characterize the structure

of PHF [13] or that of other tau polymers assembled *in vitro*, or for filaments isolated from other tauopathies. Moreover, our preliminary experiments suggest that this immunofluorescence method could be used for the identification of other filaments like these assembled *in vitro* from amyloid- $\beta$  peptide.

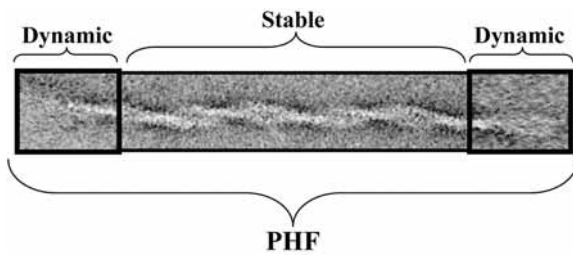


Fig. 8. Model of PHF structure. A PHF observed by transmission electron microscopy and negatively stained showing the characteristics of the different regions that forms a PHF. It is suggested the presence of a central stable region, that is preferentially stained with ThS; and two dynamic ends. (See text, for a further explanation).

### Acknowledgements

The authors thank R. Cuadros and S. Soto-Largo for their technical help. This work was supported by grants from CICYT, Comunidad de Madrid, NeuroPharma, FIS (04/0607), and by an Institutional Grant of Fundación R. Areces. Jesus Avila is a paid consultant of NeuroPharma.

### References

- [1] M. Arrasate, M. Pérez, J.M. Valpuesta and J. Avila, Role of glycosaminoglycans in determining the helicity of paired helical filaments, *Am. J. Pathol.* **151** (1997), 1115–1122.
- [2] L. Evans, T. Mitchison and M. Kirschner, Influence of the centrosome on the structure of nucleated microtubules, *J. Cell Biol.* **100** (1985), 1185–1191.
- [3] M. Garcia-Rocha, J. Avila and J. Lozano, The zeta isozyme of protein kinase C binds to tubulin through the pseudosubstrate domain, *Exp. Cell Res.* **230** (1997), 1–8.
- [4] M. Goedert, R. Jakes, M.G. Spillantini, M. Hasegawa, M.J. Smith and R.A. Crowther, Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans, *Nature* **383** (1996), 550–553.
- [5] S.G. Greenberg and P. Davies, A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** (1990), 5827–5831.
- [6] F. Hernandez, M. Perez, J.J. Lucas and J. Avila, Sulfo-glycosaminoglycan content affects PHF-tau solubility and allows the identification of different types of PHFs, *Brain Res.* **935** (2002), 65–72.
- [7] V.M. Lee, M. Goedert and J.Q. Trojanowski, Neurodegenerative tauopathies, *Annu. Rev. Neurosci.* **24** (2001), 1121–1159.
- [8] H. LeVine, 3rd, Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T, *Methods Enzymol.* **309** (1999), 274–284.
- [9] M. Novak, R. Jakes, P.C. Edwards, C. Milstein and C.M. Wischik, Difference between the tau protein of Alzheimer paired helical filament core and normal tau revealed by epitope analysis of monoclonal antibodies 423 and 7.51, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** (1991), 5837–5841.
- [10] M. Perez, J.M. Valpuesta, M. Medina, E. Montejo de Garcini and J. Avila, Polymerization of tau into filaments in the presence of heparin: the minimal sequence required for tau-tau interaction, *J. Neurochem.* **67** (1996), 1183–1190.
- [11] I. Santa-Maria, F. Hernandez, C.P. Martín, J. Avila and F.J. Moreno, Quinones facilitate the self-assembly of the phosphorylated tubulin binding region of tau into fibrillar polymers, *Biochemistry* **43** (2004), 2888–2897.
- [12] O. Schweers, E.M. Mandelkow, J. Biernat and E. Mandelkow, Oxidation of cysteine-322 in the repeat domain of microtubule-associated protein tau controls the *in vitro* assembly of paired helical filaments, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** (1995), 8463–8467.
- [13] R. Skrabana, P. Kontsek, A. Mederlyova, K. Iqbal and M. Novak, Folding of Alzheimer's core PHF subunit revealed by monoclonal antibody 423, *FEBS Lett.* **568** (2004), 178–182.
- [14] M. von Bergen, P. Friedhoff, J. Biernat, J. Heberle, E.M. Mandelkow and E. Mandelkow, 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. USA* **97** (2000), 5129–5134.

# The role of the VQIVYK peptide in tau protein phosphorylation

Mar Perez,<sup>\*,†,1</sup> Ismael Santa-María,<sup>\*,1</sup> Elena Tortosa,<sup>\*</sup> Raquel Cuadros,<sup>\*</sup> Mercedes del Valle,<sup>‡</sup> Felix Hernández,<sup>\*</sup> Francisco J. Moreno<sup>\*</sup> and Jesús Avila<sup>\*,§</sup>

<sup>\*</sup>Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” CSIC/UAM, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, Madrid, Spain

<sup>†</sup>Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

<sup>‡</sup>Servicio de Proteómica, Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” CSIC/UAM, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, Madrid, Spain

<sup>§</sup>CIBERNED, Spain

## Abstract

Although it remains unclear whether they are related to one another, tau aggregation and phosphorylation are the main pathological hallmarks of the neuronal disorders known as tauopathies. The capacity to aggregate is impaired in a variant of the tau 3R isoform that lacks residues 306–311 (nomenclature for the largest CNS tau isoform) and hence, we have taken advantage of this feature to study how phosphorylation and aggregation may be related as well as the role of this six amino acid peptide (VQIVYK). Through these analyses, we found that the phosphorylation of the tau variant was higher than that of the complete tau protein and that not only the deletion of these residues, but also the interaction of these residues, in tau 3R, with thioflavin-S augmented tau phosphorylation by glycogen synthase kinase

3. In addition, the binding of the peptide containing the residues 306–311 to the whole tau protein provoked an increase in tau phosphorylation. This observation could be physiologically relevant as may suggest that tau–tau interactions, through those residues, facilitate tau phosphorylation. In summary, our data indicate that deletion of residues VQIVYK, in tau protein produces an increase in tau phosphorylation, without tau aggregation, because the VQIVYK peptide, that favors aggregation, is missing. On the other hand, when the whole tau protein interacts with thioflavin-S or the peptide VQIVYK, an increase in both aggregation and phosphorylation occurs.

**Keywords:** aggregation, phosphorylation, tau, tauopathies, VQIVYK.

*J. Neurochem.* (2007) **103**, 1447–1460.

Alzheimer’s disease (AD) is characterized by the presence of two aberrant structures in the brain of patients: senile plaques and neurofibrillary tangles (NFTs: Alzheimer 1907). NFTs are intracellular inclusions comprised of paired helical filament aggregations (PHFs: Kidd 1963). About 20 years ago, it was discovered that the microtubule-associated protein tau was a component of PHFs (Grundke-Iqbal *et al.* 1986a; Ihara *et al.* 1986; Kosik *et al.* 1986; Wood *et al.* 1986; Binder *et al.* 2005) and that purified tau was able to assemble into fibrillar polymers resembling PHFs *in vitro* (Montejo de Garcini *et al.* 1986). As hyperphosphorylated tau protein is present in PHFs (Grundke-Iqbal *et al.* 1986b) and phosphotau was found to be the main component of isolated PHFs (Goedert *et al.* 1988; Wischik *et al.* 1988), it was assumed that a modified form of tau is an essential component of PHFs. A number of other human diseases are characterized by an age-related increase of abnormal protein deposits. This includes a group of diseases, termed ‘tauopathies’, where the microtubule-associated protein tau aggregates in a highly phosphorylated form. Nevertheless, the best-known tauopathy is still AD, where tau deposits in the brain accumulate together with aggregates of the A $\beta$  peptide (Selkoe 2004) and frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17, where mutant

forms of tau accumulate abnormally in the absence of other protein aggregates (Lee *et al.* 2001).

As indicated above, the assembly of the tau protein into fibrillar polymers resembling the PHF found in the brain of AD patients was first described *in vitro* in 1986 (Montejo de Garcini *et al.* 1986). However, a large amount of tau was required to produce polymerization *in vitro* (Montejo de Garcini *et al.* 1986; Crowther *et al.* 1992; Wille *et al.* 1992). The minimum tau concentration required for assembly could be lowered in the presence of inducers, an effect attributed to distinct elements that facilitate tau polymerization *in vitro*

Received May 8, 2007; revised manuscript received June 29, 2007; accepted July 3, 2007.

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

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

**Abbreviations used:** NFTs, neurofibrillary tangles; PDPK, proline-directed protein kinases; NPDPK, non-proline-directed protein kinases; PHFs, paired helical filament aggregations; PBS, phosphate-buffered saline; AD, Alzheimer’s disease; COS-7, African green monkey kidney fibroblast; GSK3, glycogen synthase kinase 3; PKA, protein kinase A; PS-1, presenilin-1; Th-S, thioflavin-S.

such as sulfoglycosaminoglycans (e.g. heparin: Goedert *et al.* 1996; Perez *et al.* 1996), quinones (Santa-Maria *et al.* 2004), or fatty acids (Gamblin *et al.* 2000). The minimum region required for tau self-assembly has been mapped to the third tubulin-binding motif of the tau molecule (Perez *et al.* 1996; von Bergen *et al.* 2000) and within this motif, two peptides have been implicated in self-assembly. These are a peptide containing residues 306–311 (peptide P1, VQIVKY) that is able to self-assemble in the absence of any additional compounds (von Bergen *et al.* 2000; Santa-Maria *et al.* 2005), and a peptide containing residues 317–335 (peptide P2: Perez *et al.* 1996). The characterization of tau variants lacking either of these peptides has indicated that while peptide P1 facilitates tau assembly, it is not essential for polymerization in the presence of quinones, although it appears to be important for the polymerization in the presence of heparin (Santa-Maria *et al.* 2005; Li and Lee 2006). In contrast, the presence of peptide P2 is a requisite for tau polymerization in the presence of quinones (Santa-Maria *et al.* 2005). A model to explain the influence of both peptides in promoting tau filament formation has recently been proposed (Gamblin 2005). In this model, it was suggested that tau will only assemble after these two peptides undergo a conformational change, P1 forming a  $\beta$ -sheet structure and P2 an  $\alpha$ -helix (Gamblin 2005). Accordingly, there are tau variants with a diminished capacity for self-assembly (Santa-Maria *et al.* 2005; Khlistunova *et al.* 2006; Li and Lee 2006), as well as tau variants with an increased capacity to form aggregates (Khlistunova *et al.* 2006), the expression of which is toxic to neuroblastoma cells. This toxicity is unrelated to the changes observed in tau phosphorylation, but it could be related to prior tau fragmentation (Park and Ferreira 2005; Khlistunova *et al.* 2006). In contrast, less is known about how these aggregation deficient tau variants affect phosphorylation (Khlistunova *et al.* 2006). In this work, we have studied the phosphorylation of a tau variant lacking peptide (VQIVKY) *in vitro* and in cultured cells. An increase in the phosphorylation of this variant was observed when compared with the full tau protein and more significantly, the binding of the VQIVKY peptide to the full tau protein, which mimics tau aggregation, facilitates tau phosphorylation.

## Materials and methods

### Antibodies and chemicals

The antibodies used in this study were: the phosphorylation-independent 7.51 monoclonal antibody (1 : 100; kindly provided by Dr C. M. Wischik, UK); Tau-5, a monoclonal antibody against the unphosphorylated form of tau (1 : 1000; Calbiochem, San Diego, CA, USA); T14, which recognizes an epitope in human tau in the region comprising residues 83–120 (Zymed, San Francisco, CA, USA); 12E8, a monoclonal antibody against tau phosphorylated at serine 262 (1 : 1000; Elan Pharmaceuticals, San Francisco, CA,

USA, kindly provided by Dr Seubert: Seubert *et al.* 1995); Tau-1, a monoclonal antibody against unphosphorylated tau (1 : 1000; Chemicon (Millipore Iberica S.A), Madrid, Spain); PHF-1, a monoclonal antibody against PHF tau recognizing tau phosphorylated at serine residues 396 and 404 (1 : 100; kindly provided by Dr P. Davies, USA: (Greenberg and Davies 1990); Alz-50, a conformational antibody against tau (1 : 10; a gift of Dr P. Davies, USA: Jicha *et al.* 1999); antibody 422, raised against serine 422 phosphorylated tau (obtained from Biosource International Inc., Camarillo, CA, USA); AT180, a monoclonal antibody against PHF tau (1 : 100; Innogenetics, Zwijndrecht, Belgium). The monoclonal antibodies directed against  $\alpha$ -actin and  $\beta$ -tubulin (Sigma, St Louis, MO, USA) were used as internal controls for protein quantification, and the antibody against  $\alpha$ -tubulin YL1/2 was purchased from Serotec (Oxford, UK).

Glycogen synthase kinase 3 (GSK3 $\beta$ ) and the catalytic subunit of PKA were purchased from Calbiochem (San Diego) and Sigma, respectively. Thioflavin-S (Th-S) was purchased from Sigma. The VQIVKY peptide was obtained from Neomps (Strasbourg, France) and human brain samples were from the Netherlands Brain Bank (kindly provided by Dr R. Ravid and Dr P. van't Klooster).

### Construction of tau expression plasmids

#### Nomenclature

The human tau isoforms encoding tau with three or four tubulin-binding repeats are indicated as tau 3R and tau 4R. Tau 3R protein lacking the residues VQIVKY is indicated as tau 3R  $\Delta$ VQIVKY. Mainly, tau 3R protein was used and that tau protein is indicated as Tau and if it is lacking residues VQIVKY is indicated as Tau $\Delta$ VQIVKY. Phosphorylated tau is indicated as Tau-P and phosphorylated Tau $\Delta$ VQIVKY as Tau $\Delta$ VQIVKY-P.

The human tau isoforms encoding tau with three tubulin-binding repeats (tau 3R) and the tau protein lacking the residues VQIVKY (first six residues of the third repeat) of tau (tau3R $\Delta$ VQIVKY), were cloned by PCR using: the 5' A6 primer (CGGGATCCATAATGGCTGAGCCC), which includes the initiation codon as well as *Bam*HI restriction site; and the 3' A8 primer (GCGAATTCTCACAAACCC-TGCTTGG) which includes a stop codon as well as a downstream *Eco*RI site. Plasmids pRKT30 and pRKT30 $\Delta$ V6K (Santa-Maria *et al.* 2005) were used as templates (Santa-Maria *et al.* 2006) and the resulting cDNAs were inserted into the pcDNA3 vector (Current version of pcDNA3 is pcDNA3.1 (+/-), Invitrogen, Paisley, UK). All the constructs were confirmed by DNA-sequencing analysis.

#### Cell culture and transfection

African green monkey kidney fibroblast (COS-7) cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (GibcoBRL, Invitrogen), Carlsbad, CA, USA), supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum, in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. Cells at 50–70% confluency were transiently transfected with the different constructs using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions (Invitrogen).

#### Immunofluorescence microscopy

Cells plated on polylysine-coated coverslips were fixed with 4% formaldehyde or methanol at  $-20^{\circ}\text{C}$ , permeabilized with 0.1% Triton X-100 and then blocked with 1% bovine serum albumin for

15 min. The cells were labeled with the primary antibodies diluted in phosphate-buffered saline (PBS) containing 1% bovine serum albumin for 1 h and the coverslips were then rinsed three times with PBS and incubated for 30 min with Oregon Green- or Texas Red-conjugated secondary antibodies (diluted 1 : 400; Molecular Probes, (Invitrogen), Madrid, Spain). After a final rinse with PBS the coverslips were mounted with FluorSave (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) and the cells were analyzed using a Zeiss epifluorescence microscope. Th-S staining was performed as reported previously (Santa-Maria *et al.* 2006).

#### *Binding of tau to microtubules in cultured cells*

Cells were incubated in buffer (80 mmol/L Pipes, pH 6.8, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 5 mmol/L EGTA, and 0.5% Triton X-100) for 30 s, which is sufficiently brief to avoid altering the cells during the extraction procedure. The detergent-soluble fraction with the proteins that were not bound to the cytoskeleton was harvested first and the detergent-insoluble components, corresponding to cytoskeleton-bound proteins, were subsequently resuspended in buffer (80 mmol/L Pipes, pH 6.8, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 5 mmol/L EGTA). Equal volumes of Triton-soluble and Triton-insoluble fractions, were then analyzed by immunoblotting with  $\beta$ -tubulin (Sigma) and Tau-5 antibodies.

#### *Biochemical analysis*

Cells were harvested in ice-cold PBS, resuspended, and homogenized in buffer containing 50 mmol/L HEPES (pH 7.4), 10 mmol/L EDTA, 0.1% Triton X-100, 10 mmol/L NaF, 0.1 mmol/L sodium orthovanadate, 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, and protease inhibitors cocktail (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Lysed cells were centrifuged at 10 000 g for 10 min at 4°C and boiled for 5 min in electrophoresis sample buffer. The protein concentration in each homogenate was determined using the bicinchoninic acid protein assay (Pierce, Rockford, IL, USA). Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis was carried out using 10% gels, which were subsequently transferred to nitrocellulose. Immunoreactive proteins were probed with peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse antibodies (DAKO, Glostrup, Denmark) and visualized by chemiluminescence (ECL kit; Pierce).

For Dot Blot analysis, samples were applied to nitrocellulose using a Bio-Dot microfiltration unit (Bio-Rad, Madrid, Spain) prior to antibody detection. All nitrocellulose bound samples were incubated in 5% non-fat milk-T-PBS (T-PBS: mixture of PBS and 0.05% Tween 20) to block non-specific binding for 1 h at 25°C. Primary antibodies were then added [Alz-50 (1 : 10), Tau-5 (1 : 1000)] in blocking solution and incubated for 1 h. Unbound primary antibodies were removed by washing in several changes of T-PBS. Peroxidase-conjugated secondary antibodies were then added at 1 : 1000 dilution in blocking solution and incubated for 1 h. The blots were then washed as above and visualized by chemiluminescence (ECL kit).

Recombinant tau proteins were purified and characterized as previously described (Perez *et al.* 1996). For a further quantitation of tau protein, the reaction of the isolated protein, by western blot, with ab Tau-5 was achieved. For biochemical analysis the same amount of tau and its variant were used.

#### *Measurement of aggregated or polymerized protein*

Polymerization of tau protein in the presence of quinones was previously reported (Santa-Maria *et al.* 2004). Assembly of tau

protein in the presence of Th-S was carried out by incubation of tau protein (0.4 mg/mL) at 37°C for 24 h in the presence of 100  $\mu$ mol/L Th-S. In some experiments, the assembly conditions as previously indicated (Chirita *et al.* 2005) were used, yielding similar results.

To quantify the amount of polymerized protein, samples were centrifuged for 30 min at maximum speed in an Airfuge (Beckman (GMI, Inc.), Ramsey, MN, USA). The protein present in the supernatant and pellet was analyzed by western blotting using the 7.51 tau antibody. The amount of protein was quantified by densitometry.

#### *In vitro microtubule-binding assay*

Temperature-dependent assembly of tubulin from mouse brain was performed by the procedure of Shelanski *et al.* (1973) using one polymerization cycle in the absence of 20% glycerol but adding 5  $\mu$ mol/L of taxol (Scheele and Borisy 1976). The recombinant tau proteins were expressed in the *Escherichia coli* strain BL21 (DE3: Perez *et al.* 1996) and the polymerized protein was separated from the unpolymerized protein by centrifugation for 20 min in a Beckman Airfuge at maximum speed at 25°C. The polymerized protein as well as the supernatant was further analyzed by western blotting with  $\beta$ -tubulin and tau antibodies, or by direct Coomassie blue staining in the case of tubulin.

#### *Tau phosphorylation by PKA and by GSK3*

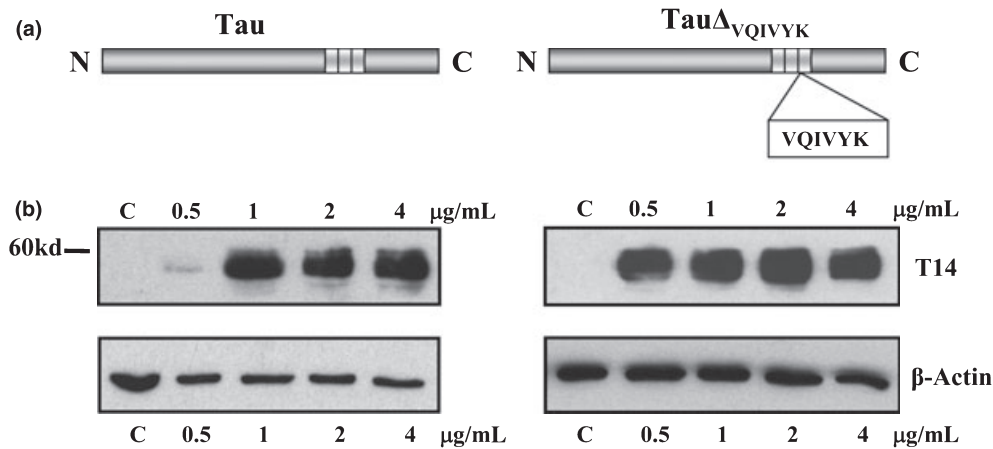
The phosphorylation of Tau and the Tau variant (Tau $\Delta$ VQIVKY) by PKA and GSK3 was performed as described previously (Stambolic and Woodgett 1994; Arrasate *et al.* 1997; Martin *et al.* 2002). Protein phosphorylation by PKA kinase (25 units/assay) or GSK3 (5 units/assay) was performed in 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L EDTA, and 1  $\mu$ mol/L okadaic acid buffer at 37°C. Briefly, PKA or GSK3 and 1–4  $\mu$ g of substrate (Tau or Tau $\Delta$ VQIVKY) were mixed for the times indicated in a 15  $\mu$ L total volume of buffer solution containing 20  $\mu$ mol/L ATP and 0.2  $\mu$ Ci of ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P) ATP.

The presence of similar amounts for tau protein and its variant, for the tests, was confirmed by western blot using ab Tau-5. For PKA, p24 was also used as substrate (Martin *et al.* 2002), whereas the GS-1 peptide was used as an additional GSK3 substrate (Stambolic and Woodgett 1994). In other experiments, phosphorylation was carried out for 30 min in the presence of variable concentration of ATP (up to 200  $\mu$ mol/L). The modified protein was characterized by gel electrophoresis followed by autoradiography. <sup>32</sup>P incorporation, was determined by densitometry of the labeled proteins bands in autoradiographs. The assays performed in the presence of Th-S or VQIVYK peptide were carried out with 20  $\mu$ mol/L ATP for 1 h. The phosphorylation sites in the tau protein were identified by mass spectrometry following the method of Reynolds *et al.* (2000).

## Results

### **Expression of Tau and its Tau $\Delta$ VQIVYK variant in COS-7 cells**

The tau constructs expressed in COS-7 cells were the human tau cDNA containing three repeats (tau 3R) and the human



**Fig. 1** Expression of Tau and Tau $\Delta$ VQIVYK variant in African green monkey kidney fibroblast (COS-7) cells. (a) A schematic representation of the human tau cDNA constructs used in this experiment. The tubulin-binding domain is indicated in the boxes and the location of the VQIVYK peptide in the tau molecule is shown. (b) Tau wild-type (Tau,

left) and tau variant (Tau $\Delta$ VQIVYK, right) were transfected at increasing concentrations in COS-7 cells and, 48 h after transfection, cell lysates were prepared. The extracts were analyzed by immunoblotting and probed with the T14 ab (that recognizes only with human tau) and actin as protein-loading control.

Tau cDNA of tau 3R variant lacking the VQIVYK residues (Tau  $\Delta$ VQIVYK; Fig. 1a). We have chosen the tau 3R isoform, because it is the simplest of the tau isoforms and thus, the possible function of peptides like VQIVYK cannot be complemented by other similar peptides present in tau 4R (like VQIINK) but not in tau 3R. The VQIVYK residues correspond to residues 306–311 in the tau molecule containing four repeats (tau 4R) or residues 275–281 in the tau containing three repeats (tau 3R) and potential roles for these residues have been indicated previously (von Bergen *et al.* 2000; Santa-Maria *et al.* 2005; Li and Lee 2006). The expression of the tau proteins was determined in western blots (Fig. 1b) after transfecting  $10^5$  cells with 0.5, 1, 2, and 4  $\mu$ g of either cDNA and waiting for 48 h. Accordingly, all the following experiments were performed by transfecting 2  $\mu$ g of human Tau cDNA and 1  $\mu$ g of Tau $\Delta$ VQIVYK cDNA, and the transfected cells were collected 48 h after transfection.

#### Microtubule network in transfected cells

To examine the interaction of tau with microtubules, both full tau and its Tau $\Delta$ VQIVYK variant, we expressed the corresponding cDNAs in COS-7 cells as these cells lack endogenous tau protein. The microtubule network was visualized in untransfected (control) and transfected cells by staining the cells with the tubulin YL1/2 (Ab Tb) or tau antibody (Ab Tau, Fig. 2). A higher proportion of cells bearing microtubule bundles were found in those cells transfected with tau than those transfected with its variant (see arrow in Fig. 2b). This difference could be due to less binding of the tau variant to microtubules than the full tau protein, which could either be due to a conformational change of the variant, to its modification (e.g. phosphoryla-

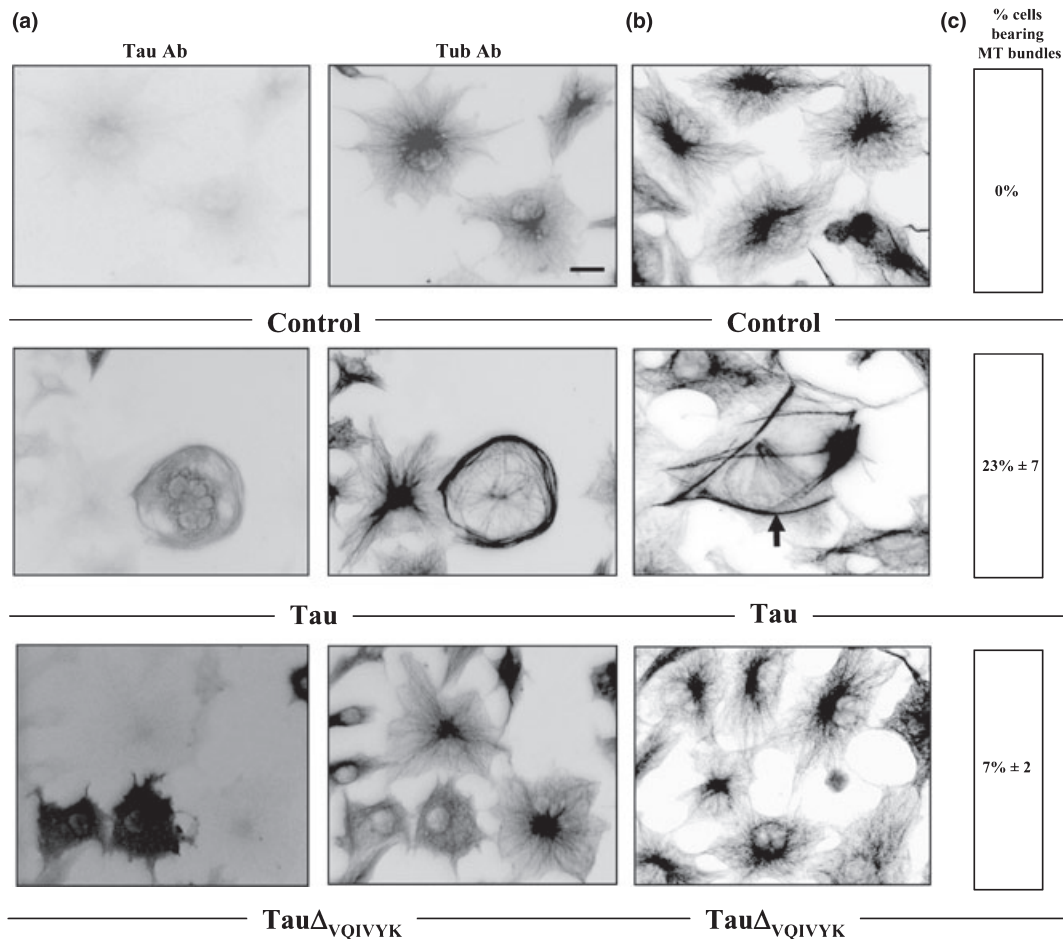
tion), or both. To test for the first possibility, we further studied the binding of each tau isoform to microtubules.

#### Changes in microtubule binding of tau and its variant

Soluble (S) or microtubule-bound tau protein (P) was isolated from COS-7 cells transfected with tau (Tau) or with its variant (Tau $\Delta$ VQIVYK; Fig. 3a). There was a similar proportion of polymerized tubulin in both types of cells, but a higher proportion of the full tau protein was associated to microtubules when compared with the tau variant (Tau $\Delta$ VQIVYK; Fig. 3b). In addition, we found that the full tau protein (Tau) shows a higher capacity to bind to microtubules *in vitro* than the tau variant (Tau $\Delta$ VQIVYK) when these tau isoforms were mixed with taxol-induced polymerized microtubules (Fig. 3c). After incubation with the assembled microtubules, 95% ( $\pm$ 10%) of tau was associated to microtubules (Tau) compared with only 65% ( $\pm$ 7%) of the tau variant (Tau $\Delta$ VQIVYK). As tau phosphorylation may also prevent the binding of the modified protein to microtubules, we tested whether the degree of phosphorylation differed for the tau variant.

#### The tau variant (Tau $\Delta$ VQIVYK) is expressed as a hyperphosphorylated isoform in COS-7 cells

The levels of phosphorylation of Tau and its variant Tau $\Delta$ VQIVYK, were assessed at different sites in the molecule that can be recognized by specific antibodies (Fig. 4a). These antibodies recognize sites modified by proline-directed protein kinases (PDPK) or by other non-proline-directed protein kinases (NPPDK). The sites recognized by antibodies PHF-1, AT180, and 422 are among those modified by PDPK (PDPK sites), while the Tau-1 antibody recognizes one such epitope in its unphosphorylated state. On the other hand, the



**Fig. 2** The microtubule network in tau transfected cells. (a) African green monkey kidney fibroblast (COS-7) cells were transfected with mock (control), wild-type tau cDNA (TAU) or variant tau cDNA (Tau $\Delta_{VQIVYK}$ ), and the microtubule network was visualized using the YL1/2 antibody (anti-tubulin antibody; Tub Ab) or with a Tau-1 antibody (anti-tau antibody; Tau Ab). In the same field transfected (stained for tau) or untransfected (only stained for tubulin) cells can be

observed. Bar indicates 10  $\mu$ m. (b) Control (upper right image), Tau (middle right image) and tau variant Tau $\Delta_{VQIVYK}$  (lower right image) transfected cells were stained with tubulin antibody. Bar indicates 10  $\mu$ m. (c) A total of 50 cells were counted and the proportion of cells bearing microtubule bundles is indicated (see the arrow indicating one of these bundles). The experiment was repeated three times and the average from those experiments is shown.

antibody 12E8 recognizes tau phosphorylated sites modified by NDPK.

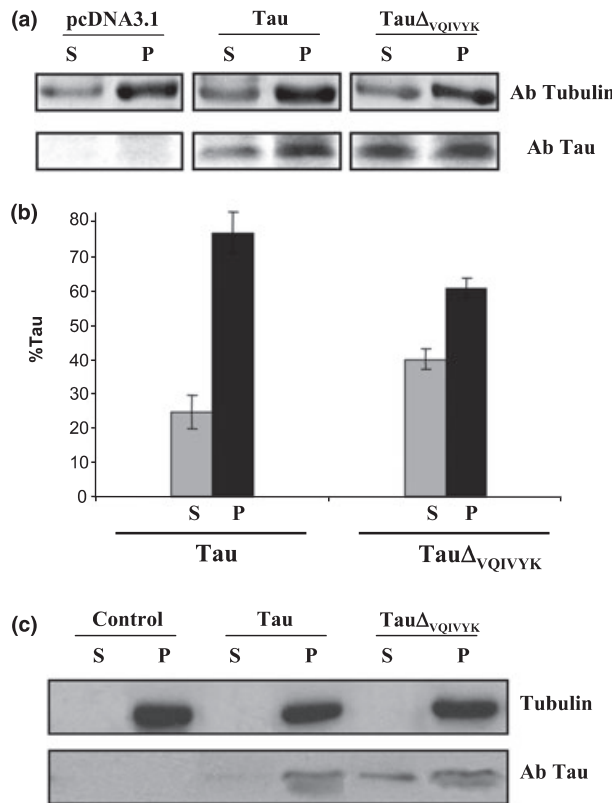
Different levels of tau phosphorylation were observed at the sites recognized by these antibodies in the full Tau protein and in its variant (Tau $\Delta_{VQIVYK}$ ; Fig. 4b–f). Furthermore, other antibodies were used as controls such as Tau-5 to determine the total tau expression independent of phosphorylation (Fig. 4g), or against actin as a control for protein loading (Fig. 4h). Figure 4i shows the quantitative results of the data shown in Fig. 4b–f, normalized by the reaction of the samples with ab Tau-5.

These results might suggest that the hyperphosphorylated tau variant in the transfected cells may affect the organization of the microtubule network (Fig. 2). Indeed, it has been shown that phosphorylation of tau by PDPK and NDPK diminishes its binding to microtubules (For a

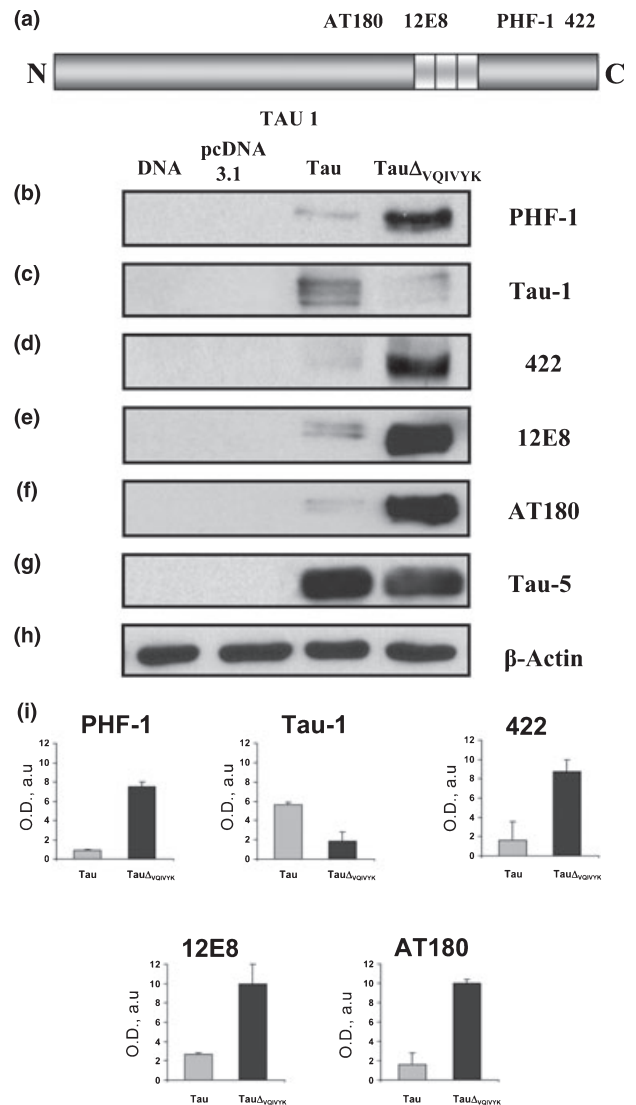
review, see Avila *et al.* 2004). Moreover, NDPK modification at phosphoserine 262, as recognized by the 12E8 antibody (Seubert *et al.* 1995), clearly impairs the interaction of tau with microtubules (Biernat *et al.* 2002). Thus, the increased phosphorylation of the tau variant could affect its binding to microtubules, as indicated in Figs 2 and 3.

#### The Tau variant is a better *in vitro* substrate than Tau protein for PDPK (GSK3) or NDPK (PKA) phosphorylation

To determine if the increase in the phosphorylation of the tau variant when compared with the full tau protein, was due to possible conformational changes in the protein promoted by the deletion of the VQIVYK residues, and to test whether this change facilitates phosphorylation, the

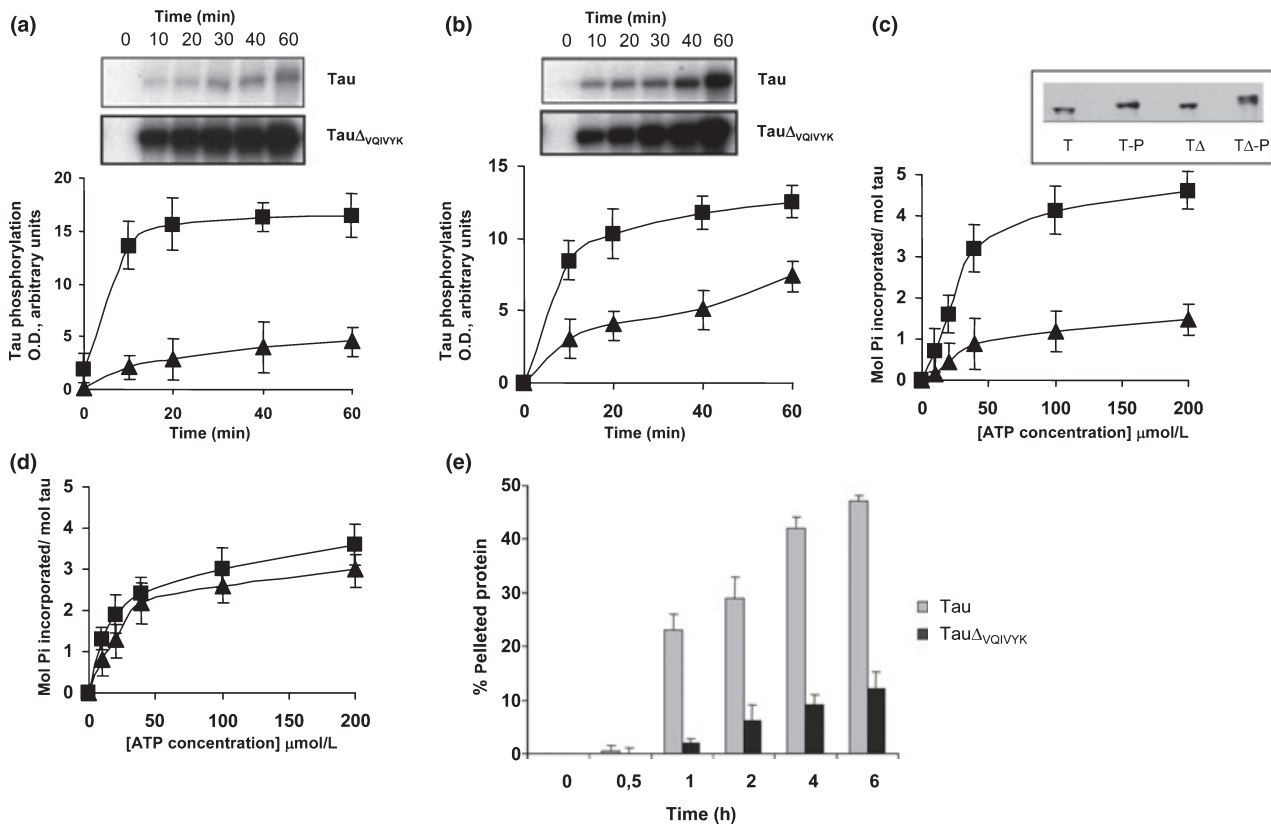


**Fig. 3** Tau $\Delta$ VQIVYK expressed in African green monkey kidney fibroblast (COS-7) cells binds to microtubules with a lower affinity than Tau expressed in COS-7 cells. (a) COS-7 cells were transfected with either an empty plasmid (pcDNA3.1), tau cDNA (Tau) or variant tau cDNA (Tau $\Delta$ VQIVYK) and after 2 days, the cells were incubated for 30 s with an extraction buffer containing 0.5% Triton X-100 (see Materials and methods for details). Homogenates were fractionated into the detergent-soluble supernatant fraction (S), and the pellet (P) containing polymerized cytoskeletal proteins and associated components. After sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) and western blotting, each protein extract was probed with the Tau-5 antibody, a tau-specific antibody that measures the total tau (Ab Tau), and with a tubulin antibody (Ab Tubulin) as a control of protein loading. (b) The proportion of tau protein found in the supernatant (S) and in the pellet (P) was quantified ( $n = 3$ ). Error bars represent standard deviations of the mean value. Asterisks (\*) indicate statistical significance ( $p < 0.05$ ). (c) Assembled microtubules were obtained by incubating (20 min/37°C) phosphocellulose-purified tubulin (5 mmol/L) with 10  $\mu$ mol/L of taxol and they were then incubated with 0.2 mmol/L tau (Tau) or tau variant (Tau $\Delta$ VQIVYK; 5 min/37°C). After centrifugation to fractionate the assembled and unassembled protein, the presence of tubulin in the pellet (P) and supernatant (S), was determined by Coomassie blue staining (Tubulin) after copolymerization in the presence or absence (control) of tau protein (Tau) and in the presence of its variant (Tau $\Delta$ VQIVYK). Again, the presence of tau proteins in the supernatant and pellet was determined by the interaction of the Tau-5 antibody (Ab Tau).



**Fig. 4** Tau expression and phosphorylation state in transfected African green monkey kidney fibroblast (COS-7) cells. (a) Scheme of the tau molecule and the phosphorylation sites analyzed in this work. Untransfected COS-7 cells and COS-7 cells transfected with wild-type (Tau) or tau variant (Tau $\Delta$ VQIVYK) were collected, and the protein lysates were probed in western blots with: Tau-5 antibodies to determine total tau (g); Tau-1 that recognizes unphosphorylated tau (c); or the phospho-dependent tau antibodies paired helical filament aggregations-1 (PHF-1) (b), 422 (d), 12E8 (e), AT180 (f). Actin is shown as a loading control (h). The variant Tau $\Delta$ VQIVYK is more heavily phosphorylated in transfected COS-7 cells at the PHF-1, 422, AT180, and 12E8 epitopes and there is less phosphorylation at the site recognized by Tau-1 than in Tau expressing COS-7 cells. (i) Shows the data from Fig. 4b–f quantified by densitometry, after being normalized by the reaction of the samples with ab tau 5. The units for the ordinate are optical density arbitrary units. The quantitation ( $n = 3$ ) of the reaction of tau antibodies with Tau and its variant Tau $\Delta$ VQIVYK is shown.





**Fig. 5** *In vitro* tau phosphorylation, but not aggregation, augments after deletion of residues 306–311 from the tau molecule. Tau ( $\blacktriangle$ ) or Tau $\Delta_{VQIVYK}$  ( $\blacksquare$ ) phosphorylated by glycogen synthase kinase 3 (GSK3) (a and c) or protein kinase A (PKA) (b and d), in the presence of  $^{32}\text{P}\gamma\text{ATP}$  was separated by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) and characterized by densitometry of the bands obtained in autoradiographs (a and b, densitometry values are presented as arbitrary units). Also, the effect of the ATP

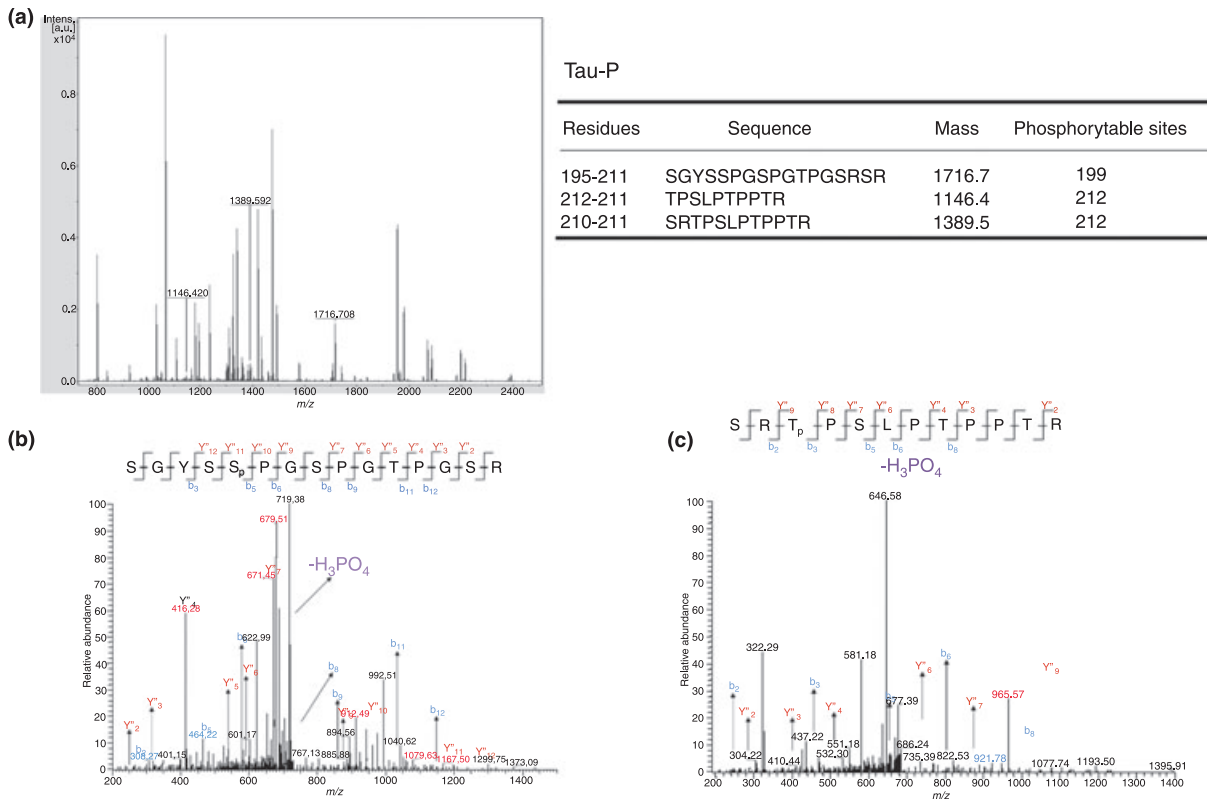
concentration on the phosphorylation by GSK3 or PKA was measured (c and d). (e) Tau protein ( $\blacksquare$ ) or Tau $\Delta_{VQIVYK}$  ( $\blacksquare$ ) were mixed at a concentration of 1 mg/mL with coenzyme  $\text{Q}_0$  (2 mmol/L), and the amount of assembled polymers was measured after centrifugation (see Materials and methods). Panel (e) shows the decrease in protein polymerization when tau lacks residues VQIVYK, when compared with the full tau protein.

phosphorylation of tau by GSK3 and by PKA was assayed *in vitro*.

Accordingly, Tau $\Delta_{VQIVYK}$  proved to be a better substrate for both GSK-3 and PKA than the full tau protein (Fig. 5a and b). Indeed, the incubation of Tau and Tau $\Delta_{VQIVYK}$  with increasing amounts of ATP did not change the  $K_m$  values for ATP with both kinases (about 25  $\mu\text{mol/L}$  for GSK-3 and PKA with both tau forms), while a 68% reduction in  $V_{\text{max}}$  was detected for GSK-3 and 20% for PKA (Fig. 5c and d). These data suggest that Tau $\Delta_{VQIVYK}$  is a better substrate for both kinases than Tau while the affinity of the kinases for ATP is not altered in the presence of Tau or Tau $\Delta_{VQIVYK}$ . Also, a decrease in electrophoretic mobility was observed for both tau isoforms upon phosphorylation by GSK3 (inset Fig. 5c).

We defined the sites modified by GSK3 after 5 h in the presence of the kinase by mass spectrometry. Some of the tryptic peptides detected augmented their molecular mass by

80 upon phosphorylation, suggesting that these tryptic peptides were phosphorylated only once. In other cases, the mass of the peptides increased by 160, indicative of the incorporation of two phosphates into the peptide. Thus, the primary sequences of some of the modified peptides from the Tau protein and its variant, and the number of phosphates incorporated into the peptides upon incubation with GSK3 was examined (Figs 6 and 7). In agreement with previous data (Reynolds *et al.* 2000), we found that the peptide containing residues 195–209/211 (following the numeration for the largest tau isoform), is modified in both Tau and its variant (Tau $\Delta_{VQIVYK}$ ), although an extra phosphorylation site was observed in the variant in the used conditions. In addition, phosphorylation of the peptide containing residues 210–212/221 was detected in both proteins (Figs 6 and 7). Using nano-electrospray mass spectrometry we identified Ser199 and Thr212 as the sites of phosphorylation, which correspond to some GSK3-phosphorylated tau sites



**Fig. 6** Identification of phosphorylation sites on glycogen synthase kinase 3 (GSK3) phosphorylated tau. (a) The molecular mass of the peptides of tau modified by GSK3 in the tau protein, together with their sequence. The phosphopeptides of the major protein peaks were

(Reynolds *et al.* 2000). Furthermore, in the tau variant the peptide 386/406 was also modified (Fig. 7).

Thus, some extra sites are phosphorylated by GSK3 in the tau variant when compared to those modified in the full tau protein. In contrast, after exhaustive phosphorylation with PKA the same numbers of sites were modified in both tau proteins, one of which is Ser262 (Fig. 4).

These results suggest a possible conformational change in the tau protein upon deletion of residues VQIVYK that may facilitate its phosphorylation by tau kinases like GSK3 or PKA. Curiously, the capacity for self-aggregation (induced by quinones: Santa-Maria *et al.* 2005) is impaired by this deletion (Fig. 5e), suggesting that this tau variant adopts a conformation that facilitates its phosphorylation but avoids its aggregation, because of the lack of the interacting peptide VQIVKY.

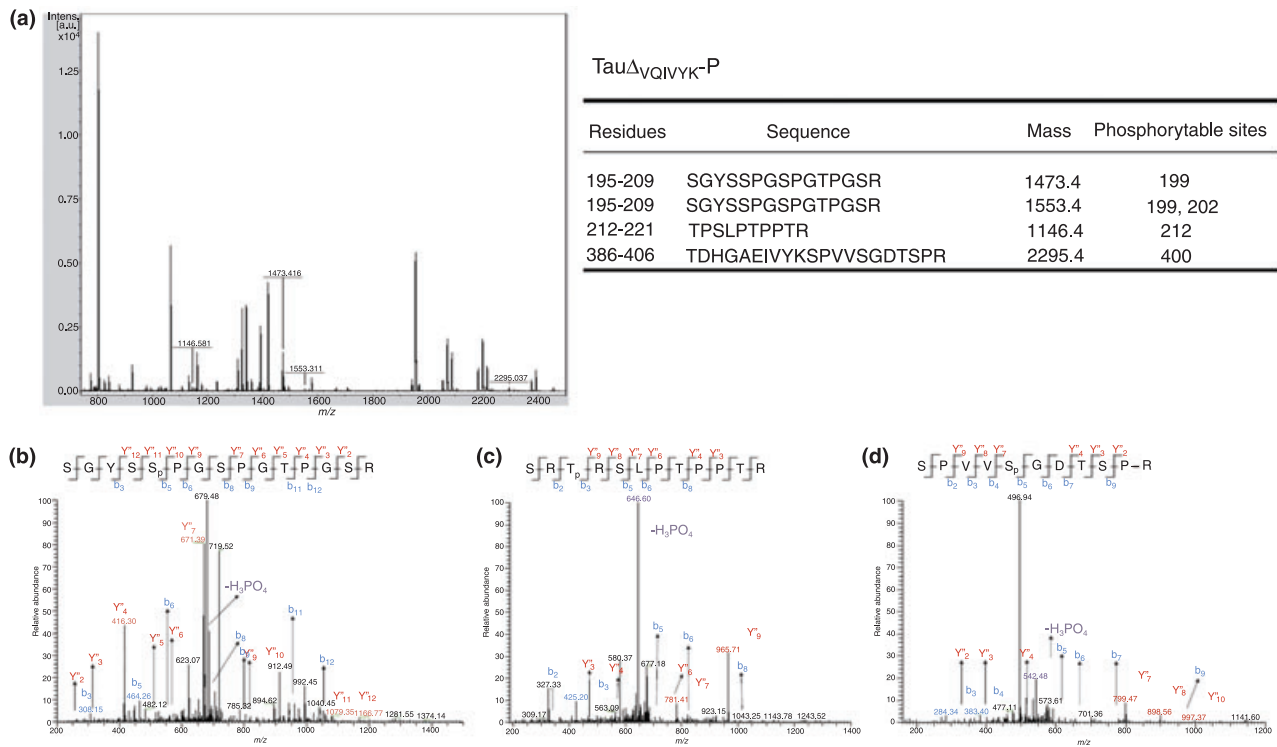
The conformational change that may occur upon deletion of the VQIVKY peptide could be identified by a conformational antibody like Alz-50 (Carmel *et al.* 1996; Jicha *et al.* 1999). Alz-50 only binds efficiently to tau when its N-terminal end comes into contact with the microtubule-binding region (Brion *et al.* 1985; Carmel *et al.* 1996; Jicha *et al.* 1999). Furthermore, the Alz-50 conformation of tau

analyzed further, by nano-electrospray (b and c) confirming the phosphorylation of serine 199 and threonine 212. These results support those shown in Fig. 4 as the phosphorylation at residue 199 could affect the interaction of tau protein with Tau-1 Ab.

appears first in pre-tangle neurons, although it is also present in neurons containing NFTs as well (Tabaton *et al.* 1988). In fact, Alz-50 binds to PHF tau (Carmel *et al.* 1996) or to other tau aggregates in other tauopathies (Tabaton *et al.* 1988). When we performed experiments with this antibody we observed that Alz-50 binds with a higher affinity to recombinant tau lacking the VQIVYK peptide than to the full tau protein (Fig. 8b). As control we also tested extracts from the brain of AD patients or from a non-demented control (Fig. 8a).

### The presence of Th-S facilitates tau phosphorylation

It is thought that the peptide comprising residues VQIVYK is able to bind to Th-S or related compounds (Santa-Maria *et al.* 2005). In this way, there was less staining with Th-S of polymers assembled from the tau variant  $\text{Tau}_{\Delta\text{VQIVYK}}$  lacking the peptide, while polymers assembled from the isolated VQIVYK peptide are indeed heavily stained with Th-S (Santa-Maria *et al.* 2006). It has also been suggested that binding of Th-S or related compounds to unpolymerized tau protein may favor tau fibrillization (Chirita *et al.* 2005). Thus, the interaction of Th-S with the VQIVYK peptide in the tau molecule may favor tau aggregation,



**Fig. 7** Identification of phosphorylation sites on glycogen synthase kinase 3 (GSK3) phosphorylated Tau $\Delta$ VQIVYK. (a) The molecular mass of the peptides of Tau $\Delta$ VQIVYK modified by GSK3 in the tau protein, together with their sequence. The phosphopeptides of the major protein peaks were analyzed further, by nano-electrospray (b–d) con-

firming the phosphorylation of serine 199, threonine 212, and serine 400. These results support those shown in Fig. 4 as the phosphorylation at residue 199 could affect the interaction of tau protein with Tau-1 antibody and that phosphorylation at residue 400 could favor the interaction of this tau variant with the PHF-1 antibody.

although little is known about its effect on tau phosphorylation.

We tested whether the interaction of Th-S with tau might affect phosphorylation of the tau protein. First, we examined the effect of Th-S on tau phosphorylation by adding different concentrations of the dye. The effect of Th-S on GSK3 activity was measured using the GS1 peptide as substrate and that on PKA activity was evaluated using the p24 protein as a substrate (see Materials and methods). Below 30  $\mu$ Mol/L, Th-S slightly diminished GSK3 activity (inset Fig. 9), whereas <10% of the initial PKA activity remained in the presence of 10  $\mu$ Mol/L Th-S (data not shown), indicating that Th-S is more toxic to PKA than to GSK3. After determining the effect of Th-S on GSK3 activity, the phosphorylation of the tau protein by GSK3 in the presence of increasing concentrations of Th-S was measured. In the presence of Th-S, there is a clear increase in Tau phosphorylation by GSK3 (Fig. 9) while, no such increase was found for Tau $\Delta$ VQIVYK phosphorylation by GSK3. Hence, the interaction of the tau VQIVYK peptide, with Th-S produces a similar effect on tau phosphorylation as deleting that peptide from tau molecule.

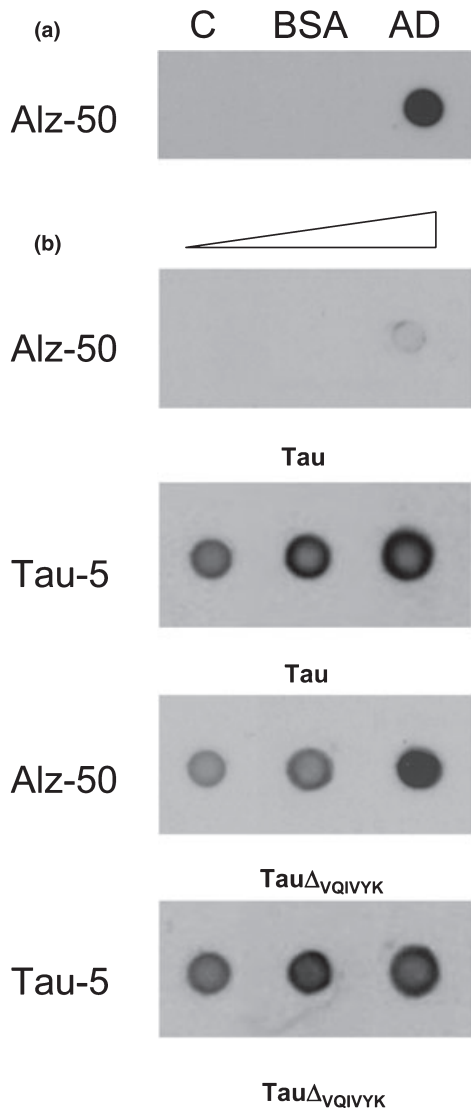
In addition, we have tested for a possible effect of Th-S on the binding of tau to microtubules. A slight decrease (15%) was found for the binding of tau to microtubules in the

presence of Th-S (data not shown). This is not surprising, as the sequence of tau with the highest capacity to bind to microtubules is that contained within the first repeat, the following inter region, and the second repeat (Goode *et al.* 1997).

It should be also indicated that the addition of 100  $\mu$ Mol/L Th-S, as also previously indicated by Chirita *et al.* (2005), results in the aggregation of tau protein 15%  $\pm$  2 of the total protein was sedimented by centrifugation, in the presence of 100  $\mu$ M Th-S (Fig. 10c). Tau aggregation was confirmed by electron microscopy (Fig. 10a and b).

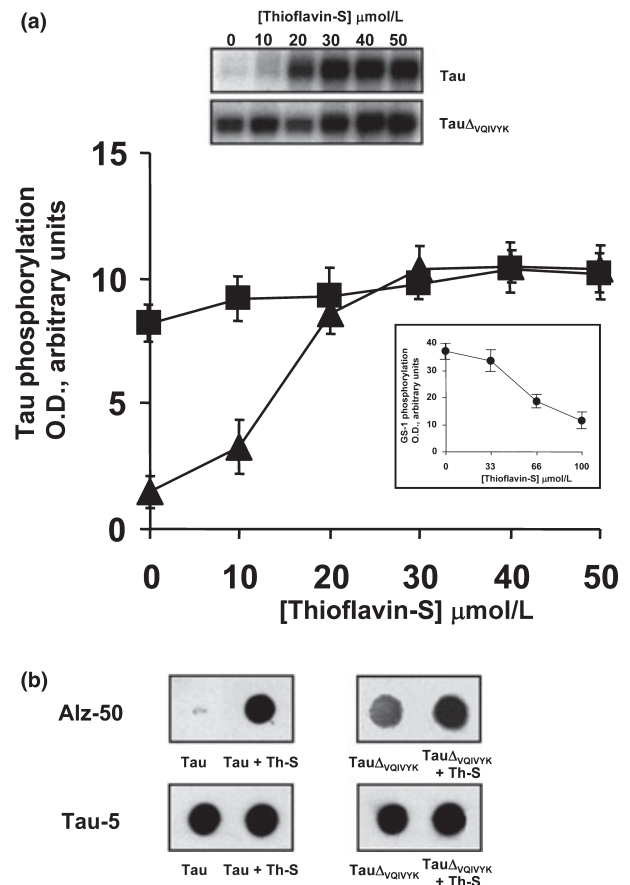
### The addition of the VQIVYK peptide to tau protein favors tau phosphorylation

It was previously suggested that two molecules of tau could interact with each other, in part through their VQIVYK motifs (von Bergen *et al.* 2000). Thus, the interaction of tau with tau peptide VQIVYK may also modulate tau phosphorylation. When we carried out experiments to confirm this, we observed that tau phosphorylation increased in the presence of increased amounts of VQIVYK peptide (Fig. 11). As this interaction may take place through the binding of VQIVYK peptide with its counterpart present in tau molecule, the experiment was performed with the tau variant lacking that



**Fig. 8** Interaction of Tau $\Delta$ VQIVYK with the Alz-50 Ab. Equal amounts of an extract from the brain of Alzheimer's patient (AD) or a health control (C), or 2  $\mu$ g of bovine serum albumin (BSA) were dot blotted together with increasing amounts (0.01, 0.1, and 1  $\mu$ g) of Tau protein and Tau $\Delta$ VQIVYK, and probed with ab Alz-50. As indicated, the Ab reacted more strongly with Tau $\Delta$ VQIVYK than the full Tau protein. Similar loading of each protein was confirmed by the reaction with the Tau-5 antibody.

peptide. The addition of the peptide VQIVYK to the tau variant Tau $\Delta$ VQIVYK did not provoke any increase in GSK3 phosphorylation of this isoform (Fig. 11). Thus, the deletion of VQIVYK from the tau molecule, or an interaction of tau protein with Th-S or VQIVYK, resulted in an increase of tau phosphorylation. The peptide VQIVYK, or peptide P1, is involved in a type of tau–tau interaction. However, peptide P2 may also play a role in that tau self-assembly. Thus, we tested the role of peptide P2 in tau phosphorylation. In this case, we have found that, at difference of the effect found for



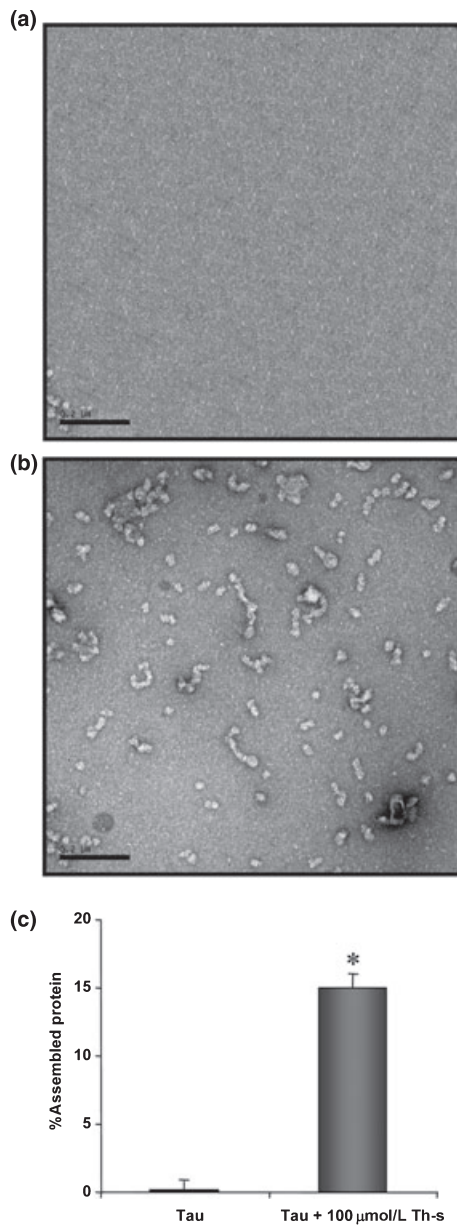
**Fig. 9** Tau and Tau $\Delta$ VQIVYK phosphorylation in the presence of thioflavin-S (Th-S). (a) Tau ( $\blacktriangle$ ) or Tau $\Delta$ VQIVYK ( $\blacksquare$ ) phosphorylation *in vitro* by GSK3 in the presence of  $^{32}$ P $\gamma$ -ATP and different concentrations of Th-S was characterized by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) and densitometry of the bands obtained in autoradiograms (densitometry values presented as arbitrary units). The inset indicates the phosphorylation of the peptide GS-1 at increasing Th-S concentrations. (b) The interaction of Alz-50 and Tau-5 antibodies with Tau and Tau $\Delta$ VQIVYK in the absence or presence of Th-S, analyzed by Dot Blot, are shown.

VQIVYK peptide, peptide P2 does not increase tau phosphorylation (Fig. 11b).

To analyze if the differences observed for peptides P1 and P2 are due to differences in tau conformation promoted or not for these peptides, the reaction of tau with antibody Alz-50, in the presence of either peptide, was studied. Figure 11(c and d) shows that peptide VQIVYK, but not peptide P2, favors the conformational change of tau protein, allowing its reaction with Alz-50 antibody.

## Discussion

The abnormal aggregation and hyperphosphorylation of tau are hallmarks of different tauopathies including AD. Although a possible relationship between these features has



**Fig. 10** Assembly of tau in the presence of thioflavin-S (Th-S). Tau protein (1 mg/mL) was incubated in the absence (a) or presence (b) of 100  $\mu\text{mol/L}$  Th-S and the assembled polymers were visualized by electron microscopy and quantitated ( $n = 3$ ) (c) after centrifugation (see Materials and methods). Error bars represent standard deviations of the mean value. Asterisks (\*) indicate statistical significance ( $p < 0.01$ ).

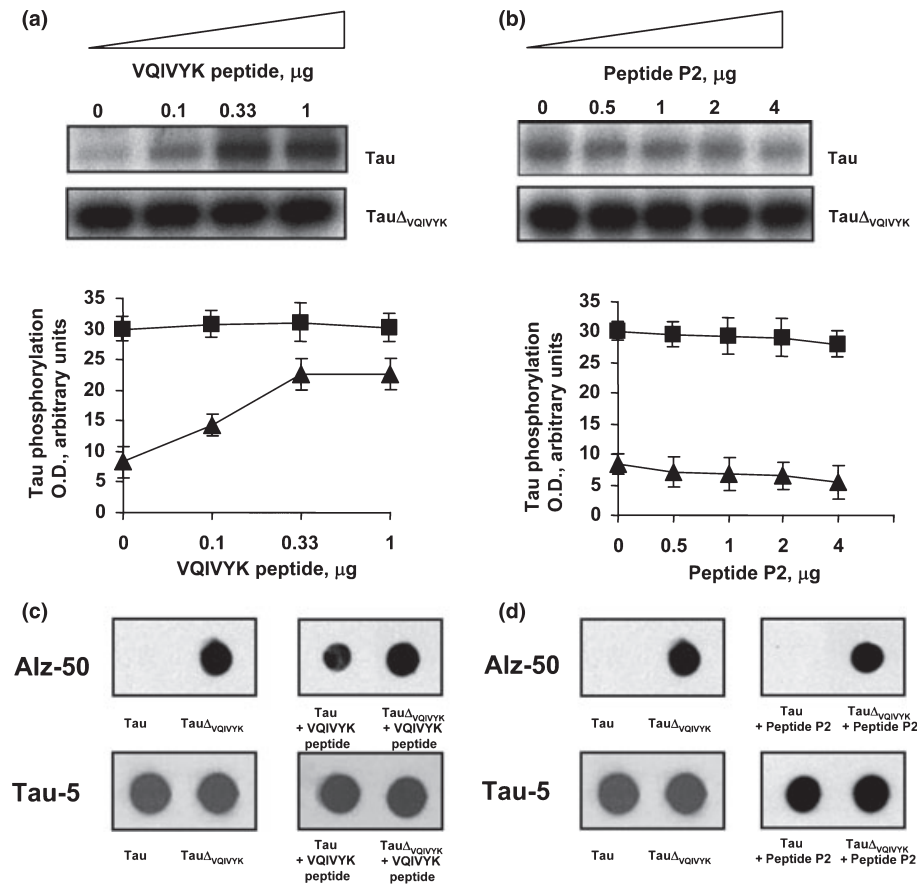
been suggested in some models (Perez *et al.* 2003; Noble *et al.* 2005), it is not clear whether tau phosphorylation is necessary for the latter and thus, it would be of interest to have models to analyze both these physiological processes. In this work, we have characterized the unexpected observation that a tau variant showing diminished capacity for aggregation (von Bergen *et al.* 2000; Santa-Maria *et al.*

2005; Khlistunova *et al.* 2006; Li and Lee 2006), can be readily hyperphosphorylated by tau PDPK (such as GSK3) and by NPPDK (such as PKA). Thus, in this model tau phosphorylation can occur in the absence of tau aggregation, although the failure to aggregate could be due to the lack of VQIVYK peptide. Indeed, this peptide appears to be needed for tau assembly in the presence of heparin (Li and Lee 2006) and it facilitates tau polymerization in the presence of quinones (Santa-Maria *et al.* 2005). Significantly, this phosphorylated tau protein bound less to microtubules (see also Alonso *et al.* 1996).

Tau phosphorylation has been extensively studied because it could be toxic *in vivo* (Jackson *et al.* 2002; Engel *et al.* 2006b; Fulga *et al.* 2007), a toxicity that could be manifested before tau aggregation (Lucas *et al.* 2001; Perez *et al.* 2003; Noble *et al.* 2005; Santacruz *et al.* 2005; Engel *et al.* 2006a). In our studies an increased phosphorylation of the tau variant by GSK3 when compared with that of the full tau protein was observed, and it could be due to the exposure of additional sites that are modified in the variant but not in tau protein. Several sites are phosphorylated by GSK3 or PKA in tau protein (Morishima-Kawashima *et al.* 1995). While few residues phosphorylated by PKA have been well characterized, like residues 214 or 409 and serine 262 (see for example Liu *et al.* 2006), at least 10 sites modified by GSK3 have been identified in tau protein (Reynolds *et al.* 2000). Indeed, some of these residues phosphorylated by GSK3 were seen to be modified in tau and in the tau variant by mass spectrometry.

Recently, it was indicated that tau aggregation could be toxic to cultured cells (Khlistunova *et al.* 2006), and that such aggregation might be unrelated to the changes observed in tau phosphorylation (Khlistunova *et al.* 2006). Thus, tau phosphorylation and tau aggregation could be independently toxic to cells. However, in the case of tau aggregation this toxicity could be related to the fact that tau fragmentation precedes tau aggregation in that model, and some of the resulting tau fragments could be toxic to the cell (Park and Ferreira 2005; Khlistunova *et al.* 2006).

Our experiments show that different events could induce tau phosphorylation: (i) deletion of the VQIVYK peptide, which would lead to phosphorylation but not tau aggregation; and (ii) interaction of Th-S or VQIVYK with tau protein producing both aggregation and tau phosphorylation. The latter might be suggestive of a relationship between both events, as observed in some animal models (Perez *et al.* 2003; Noble *et al.* 2005). In this way, our results suggest that binding of the VQIVYK peptide to tau mimics tau aggregation and will facilitate tau phosphorylation. Thus, deletion of VQIVYK or the interaction of this peptide in the tau molecule with other molecules like Th-S or the peptide itself, will result in an increase in phosphorylation and it may be the consequence of a previous conformational change. However, aggregation is facilitated when the peptide VQIVYK is not actually deleted, as it plays an important role in tau



**Fig. 11** Tau phosphorylation in the presence of the VQIVYK peptide and in the presence of peptide P2. Tau ( $\blacktriangle$ ) or Tau $\Delta$ VQIVYK ( $\blacksquare$ ) modified by glycogen synthase kinase 3 (GSK3) in the presence of different amounts of VQIVYK peptide (peptide P1) (a) or peptide P2 (b) were isolated by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis

(SDS–PAGE) and characterized by densitometry of the bands obtained by autoradiography (densitometry values presented as arbitrary units). The interaction of Alz-50 and Tau-5 antibodies with tau (c) and its variant (d), analyzed by Dot Blot, in the presence of P1 or P2 peptides are shown.

aggregation (von Bergen *et al.* 2000; Santa-Maria *et al.* 2005). Thus, a model for the events that occur in tau pathologies could be proposed in which a conformational change will occur that results in subsequent, tau phosphorylation, aggregation, or both. In this conformational change peptide VQIVYK plays an important role. This conformational change could be induced *in vivo* by different signals, an example could be oxidative stress, that is known to induce a conformational change that makes tau accessible to the Alz-50 antibody (Takeda *et al.* 2000). According to our model, this conformational change recognized by Alz-50 antibody (Binder *et al.* 2005) would pre-dispose tau to phosphorylation, aggregation or both, depending on the different affinities of tau for the different kinases present in the neuron, or on the concentration of modified tau. These differences will explain the different types of tau pathologies occurring in different neurons.

At present, we do not know if the expression of phosphotau $\Delta$ VQIVYK is more toxic than that of the tau

protein. However, it is noteworthy that while we have isolated stable transfectants of Tau cDNAs, we have not yet been able to repeat this with Tau $\Delta$ VQIVYK cDNA. Thus, while it is possible that the permanent expression of this tau variant could be toxic to the cell, more work must be carried out to study this phenomenon further.

It will also be of interest to search for compounds like Th-S or the VQIVYK peptide that facilitates tau phosphorylation by interacting with the tau protein through VQIVYK peptide. Interestingly, it is known that presenilin-1 associates with tau through, or close to the region containing the VQIVYK peptide leading to an increase in tau phosphorylation by GSK3. Indeed, such phosphorylation increases in the presence of presenilin-1 (PS-1) that bears some mutations found in AD (Takashima *et al.* 1998). This might explain the effect of these PS-1 mutations on tau phosphorylation in AD. However, it has not yet been tested whether the binding of PS-1 to tau protein could change the conformation of tau. In addition, the increase in GSK3 phosphorylation of tau,

induced by PS-1 mutations also could be due to an alternative mechanism (Baki *et al.* 2004).

Also, further studies should analyze whether there are some tau-associated proteins in different tauopathies that influence pathological tau phosphorylation, or that interact with the tau molecule through VQIVYK peptide (or close to it), producing a similar effect on tau phosphorylation to that of PS-1. In any case, much work remains to be carried out to identify the causes of the increase in tau phosphorylation in different tauopathies.

In summary, deletion of the VQIVYK peptide in tau results in a conformational change that decreases the binding of tau to microtubules and favors tau phosphorylation. The interaction of the VQIVYK peptide with tau, mimicking a type of tau aggregation, also favors tau phosphorylation, suggesting that tau aggregation could favor the phosphorylation of tau at certain specific sites.

### Acknowledgements

We are grateful to Santiago Soto-Largo for his skillful technical assistance. This work was supported by grants from the 'Plan Nacional' (Ministerio de Educación y Ciencia, Spain), the Comunidad de Madrid, the Fundación Botin, and by an Institutional Grant from the Fundación R. Areces. Also, this work is part to our contribution to CIBER Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED, Ministerio de Sanidad y Consumo).

### References

- Alonso A. C., Grundke-Iqbal I. and Iqbal K. (1996) Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat. Med.* **2**, 783–787.
- Alzheimer A. (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Z. Psychiatr.* **64**, 146–148.
- Arrasate M., Perez M., Valpuesta J. M. and Avila J. (1997) Role of glycosaminoglycans in determining the helicity of paired helical filaments. *Am. J. Pathol.* **151**, 1115–1122.
- 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.
- Baki L., Shioi J., Wen P., Shao Z., Schwarzman A., Gama-Sosa M., Neve R. and Robakis N. K. (2004) PS1 activates PI3K thus inhibiting GSK-3 activity and tau overphosphorylation: effects of FAD mutations. *EMBO J.* **23**, 2586–2596.
- von Bergen M., Friedhoff P., Biernat J., Heberle J., Mandelkow E. M. and 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. USA* **97**, 5129–5134.
- Biernat J., Wu Y. Z., Timm T., Zheng-Fischhofer Q., Mandelkow E., Meijer L. and Mandelkow E. M. (2002) Protein kinase MARK/ PAR-1 is required for neurite outgrowth and establishment of neuronal polarity. *Mol. Biol. Cell* **13**, 4013–4028.
- Binder L. I., Guillozet-Bongaarts A. L., Garcia-Sierra F. and Berry R. W. (2005) Tau, tangles, and Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1739**, 216–223.
- Brion J. P., Passareiro E., Nunez J. and Flament-Durand J. (1985) Mise en évidence immunologique de la protéine tau au niveau des lésions dégénératives neurofibrillaires de la maladie d'Alzheimer. *Arch. Biol.* **95**, 229–235.
- Carmel G., Mager E. M., Binder L. I. and Kuret J. (1996) The structural basis of monoclonal antibody Alz50's selectivity for Alzheimer's disease pathology. *J. Biol. Chem.* **271**, 32789–32795.
- Chirita C. N., Congdon E. E., Yin H. and Kuret J. (2005) Triggers of full-length tau aggregation: a role for partially folded intermediates. *Biochemistry* **44**, 5862–5872.
- Crowther R. A., Olesen O. F., Jakes R. and Goedert M. (1992) The microtubule binding repeats of tau protein assemble into filaments like those found in Alzheimer's disease. *FEBS Lett.* **309**, 199–202.
- Engel T., Goni-Oliver P., Lucas J. J., Avila J. and Hernandez F. (2006a) Chronic lithium administration to FTDP-17 tau and GSK-3beta overexpressing mice prevents tau hyperphosphorylation and neurofibrillary tangle formation, but pre-formed neurofibrillary tangles do not revert. *J. Neurochem.* **99**, 1445–1455.
- Engel T., Lucas J. J., Gomez-Ramos P., Moran M. A., Avila J. and Hernandez F. (2006b) Coexpression of FTDP-17 tau and GSK-3beta in transgenic mice induce tau polymerization and neurodegeneration. *Neurobiol. Aging* **27**, 1258–1268.
- Fulga T. A., Elson-Schwab I., Khurana V., Steinhilb M. L., Spires T. L., Hyman B. T. and Feany M. B. (2007) Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo. *Nat. Cell Biol.* **9**, 139–148.
- Gamblin T. C. (2005) Potential structure/function relationships of predicted secondary structural elements of tau. *Biochim. Biophys. Acta* **1739**, 140–149.
- Gamblin T., King M. E., Kuret J., Berry R. W. and Li B. (2000) Oxidative regulation of fatty acid-induced tau polymerization. *Biochemistry* **39**, 14203–14210.
- Goedert M., Wischik C. M., Crowther R. A., Walker J. E. and 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. USA* **85**, 4051–4055.
- Goedert M., Jakes R., Spillantini M. G., Hasegawa M., Smith M. J. and Crowther R. A. (1996) Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature* **383**, 550–553.
- Goode B. L., Denis P. E., Panda D., Radeke M. J., Miller H. P., Wilson L. and Feinstein S. C. (1997) Functional interactions between the proline-rich and repeat regions of tau enhance microtubule binding and assembly. *Mol. Biol. Cell* **8**, 353–365.
- 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.
- Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Quinlan M., Tung Y. C., Zaidi M. S. and Wisniewski H. M. (1986a) 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. and Binder L. I. (1986b) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **83**, 4913–4917.
- Ihara Y., Nukina N., Miura R. and Ogawara M. (1986) Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J. Biochem. (Tokyo)* **99**, 1807–1810.
- Jackson G. R., Wiedau-Pazos M., Sang T. K., Wagle N., Brown C. A., Massashi S. and 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. and 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.
- Khlistunova I., Biernat J., Wang Y., Pickhardt M., von Bergen M., Gazova Z., Mandelkow E. and Mandelkow E. M. (2006) Inducible expression of Tau repeat domain in cell models of tauopathy: aggregation is toxic to cells but can be reversed by inhibitor drugs. *J. Biol. Chem.* **281**, 1205–1214.
- Kidd M. (1963) Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* **197**, 192–193.
- Kosik K. S., Joachim C. L. and 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. USA* **83**, 4044–4048.
- Lee V. M., Goedert M. and Trojanowski J. Q. (2001) Neurodegenerative tauopathies. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 1121–1159.
- Li W. and Lee V. M.-Y. (2006) Characterization of two VQIXXK motifs for Tau fibrillization in vitro. *Biochemistry* **45**, 15692–15701.
- Liu F., Liang Z., Shi J., Yin D., El-Akkad E., Grundke-Iqbal I., Iqbal K. and Gong C. X. (2006) PKA modulates GSK-3beta- and cdk5-catalyzed phosphorylation of tau in site- and kinase-specific manners. *FEBS Lett.* **580**, 6269–6274.
- Lucas J. J., Hernandez F., Gomez-Ramos P., Moran M. A., Hen R. and Avila J. (2001) Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *EMBO J.* **20**, 27–39.
- Martin C. P., Vazquez J., Avila J. and Moreno F. J. (2002) P24, a glycogen synthase kinase 3 (GSK 3) inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta* **1586**, 113–122.
- 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.
- Morishima-Kawashima M., Hasegawa M., Takio K., Suzuki M., Yoshida H., Titani K. and Ihara Y. (1995) Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau. *J. Biol. Chem.* **270**, 823–829.
- Noble W., Planel E., Zehr C. *et al.* (2005) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 6990–6995.
- Park S. Y. and Ferreira A. (2005) The generation of a 17 kDa neurotoxic fragment: an alternative mechanism by which tau mediates beta-amyloid-induced neurodegeneration. *J. Neurosci.* **25**, 5365–5375.
- 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.
- Perez M., Hernandez F., Lim F., Diaz-Nido J. and Avila J. (2003) Chronic lithium treatment decreases mutant tau protein aggregation in a transgenic mouse model. *J. Alzheimers Dis.* **5**, 301–308.
- Reynolds C. H., Betts J. C., Blackstock W. P., Nebreda A. R. and Anderton B. H. (2000) Phosphorylation sites on tau identified by nano-electrospray mass spectrometry: differences in vitro between the mitogen-activated protein kinases ERK2, c-Jun N-terminal kinase and P38, and glycogen synthase kinase-3beta. *J. Neurochem.* **74**, 1587–1595.
- Santacruz K., Lewis J., Spire T. *et al.* (2005) Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* **309**, 476–481.
- Santa-Maria I., Hernandez F., Martin C. P., Avila J. and Moreno F. J. (2004) Quinones facilitate the self-assembly of the phosphorylated tubulin binding region of tau into fibrillar polymers. *Biochemistry* **43**, 2888–2897.
- Santa-Maria I., Smith M. A., Perry G., Hernandez F., Avila J. and Moreno F. J. (2005) Effect of quinones on microtubule polymerization: a link between oxidative stress and cytoskeletal alterations in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1740**, 472–480.
- Santa-Maria I., Perez M., Hernandez F., Avila J. and Moreno F. J. (2006) Characteristics of the binding of thioflavin S to tau paired helical filaments. *J. Alzheimers Dis.* **9**, 279–285.
- Scheele R. B. and Borisy G. G. (1976) Comparison of the sedimentation properties of microtubule protein oligomers prepared by two different procedures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **70**, 1–7.
- Selkoe D. J. (2004) Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat. Cell Biol.* **6**, 1054–1061.
- Seubert P., Mawal-Dewan M., Barbour R. *et al.* (1995) Detection of phosphorylated Ser262 in fetal tau, adult tau, and paired helical filament tau. *J. Biol. Chem.* **270**, 18917–18922.
- Shelanski M. L., Gaskin F. and Cantor C. R. (1973) Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **70**, 765–768.
- Stambolic V. and Woodgett J. R. (1994) Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta in intact cells via serine 9 phosphorylation. *Biochem. J.* **303** (part 3), 701–704.
- Tabaton M., Whitehouse P. J., Perry G., Davies P., Aulilio-Gambetti L. and Gambetti P. (1988) Alz 50 recognizes abnormal filaments in Alzheimer's disease and progressive supranuclear palsy. *Ann. Neurol.* **24**, 407–413.
- Takashima A., Murayama M., Murayama O. *et al.* (1998) Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3beta and its substrate tau. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 9637–9641.
- Takeda A., Smith M. A., Avila J., Nunomura A., Siedlak S. L., Zhu X., Perry G. and Sayre L. M. (2000) In Alzheimer's disease, heme oxygenase is coincident with Alz50, an epitope of tau induced by 4-hydroxy-2-nonenal modification. *J. Neurochem.* **75**, 1234–1241.
- Wille H., Drewes G., Biernat J., Mandelkow E. M. and Mandelkow E. (1992) Alzheimer-like paired helical filaments and antiparallel dimers formed from microtubule-associated protein tau in vitro. *J. Cell Biol.* **118**, 573–584.
- Wischik C. M., Novak M., Edwards P. C., Klug A., Tichelaar W. and Crowther R. A. (1988) Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **85**, 4884–4888.
- Wood J. G., Mirra S. S., Pollock N. J. and Binder L. I. (1986) Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau). *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **83**, 4040–4043.



Research article

Open Access

## Tramiprosate, a drug of potential interest for the treatment of Alzheimer's disease, promotes an abnormal aggregation of tau

Ismael Santa-Maria<sup>1</sup>, Félix Hernández<sup>1</sup>, Joaquín Del Rio<sup>2,3</sup>,  
Francisco J Moreno<sup>1</sup> and Jesús Avila\*<sup>1,3</sup>

Address: <sup>1</sup>Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" CSIC/UAM, Fac. Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain, <sup>2</sup>Division of Neurosciences, CIMA, School of Medicine, University of Navarra, Av. PioXII, 55, 31008 Pamplona, Spain and <sup>3</sup>CIBERNED, Spain

Email: Ismael Santa-Maria - [isantamaria@cbm.uam.es](mailto:isantamaria@cbm.uam.es); Félix Hernández - [fhernandez@cbm.uam.es](mailto:fhernandez@cbm.uam.es); Joaquín Del Rio - [jdellrio@unav.es](mailto:jdellrio@unav.es); Francisco J Moreno - [fmoreno@cbm.uam.es](mailto:fmoreno@cbm.uam.es); Jesús Avila\* - [javila@cbm.uam.es](mailto:javila@cbm.uam.es)

\* Corresponding author

Published: 6 September 2007

Received: 18 April 2007

*Molecular Neurodegeneration* 2007, 2:17 doi:10.1186/1750-1326-2-17

Accepted: 6 September 2007

This article is available from: <http://www.molecularneurodegeneration.com/content/2/1/17>

© 2007 Santa-Maria et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### Abstract

Alzheimer's disease (AD) is characterized by the presence of two histopathological hallmarks; the senile plaques, or extracellular deposits mainly composed of amyloid- $\beta$  peptide ( $A\beta$ ), and the neurofibrillary tangles, or intraneuronal inclusions composed of hyperphosphorylated tau protein.

Since  $A\beta$  aggregates are found in the pathological cases, several strategies are under way to develop drugs that interact with  $A\beta$  to reduce its assembly. One of them is 3-amino-1-propane sulfonic acid (Tramiprosate, 3-APS, Alzhemed™), that was developed as a sulfated glycosaminoglycan mimetic, that could interact with  $A\beta$  peptide, preventing its aggregation.

However, little is known about the action of 3-APS on tau protein aggregation. In this work, we have tested the action of 3-APS on cell viability, microtubule network, actin organization and tau aggregation. Our results indicate that 3-APS favours tau aggregation, in tau transfected non-neuronal cells, and in neuronal cells. We also found that 3-APS does not affect the binding of tau to microtubules but may prevent the formation of tau-actin aggregates. We like to emphasize the importance of testing on both types of pathology (amyloid and tau) the potential drugs to be used for AD treatment.

### Background

Alzheimer's disease is characterized by the presence of two histopathological hallmarks; the senile plaques or extracellular deposits mainly composed of amyloid- $\beta$  peptide ( $A\beta$ ) and the neurofibrillary tangles or intraneuronal inclusions composed of hyperphosphorylated tau protein [1].

It has been proposed that some compounds like sulfated glycosaminoglycans (sGAG) [2] could promote the aggre-

gation of  $A\beta$  and tau [3-5], and it has been even suggested that in Alzheimer's disease sGAG may provide a common link for  $A\beta$  and tau polymerization [3-8].

sGAG including heparan, keratan and chondroitin sulfates strongly favor  $A\beta$  polymerization *in vitro* [5,8,9]. Different sGAG also facilitate the assembly *in vitro* of tau [3,4,10]. In addition  $A\beta$  [7,11] and tau aggregates [12] associate to sGAG *in vivo*. On the other hand, the binding of sGAG to  $A\beta$  has been found to decrease  $A\beta$  degradation

[13]. The interaction of the sulfated GAG appear to be through basic residues of the interacting proteins like A $\beta$  [14], supporting previous studies demonstrating the importance of the sulfate moieties of sGAG for the formation of amyloid fibrils [15].

Since A $\beta$  aggregates are found in Alzheimer's disease, several strategies to develop drugs that interact with A $\beta$  to reduce its assembly are under way. A $\beta$  peptide has been taken as a suitable target to develop a therapy against Alzheimer's disease as, at present, the prevalent theory of Alzheimer's disease pathophysiology, the amyloid cascade, hypothesizes that a reduction of A $\beta$  may not only improve amyloid pathology, but also tau pathology [16]. In this way, the action of some compounds have been only tested on amyloid but not on tau pathology [17,18]. One of these compounds is 3-amino-1-propane sulfonic acid (tramiprosate, 3-APS), also known as Alzhemed™ (the use of its trade name is only for identification purposes) [19,20], that was developed as a sGAG mimetic [21,22] that could interact with A $\beta$  peptide, preventing its aggregation.

Not only the contribution of the different forms of A $\beta$  to Alzheimer's disease pathology is uncertain and recent evidence rather implicates soluble oligomers [23], but it is generally accepted that blocking tau pathology could have therapeutic benefit. In this work, we have tested the action of 3-APS on tau aggregation. Our results indicate that 3-APS favours tau aggregation, but with a different mechanism to that found for other tau assembly inducers, like heparin. We also found that 3-APS does not affect the binding of tau to microtubules but may prevent the formation of tau-actin aggregates.

## Results

### **Effect of 3-APS on tau stably transfected HEK 293 cells**

To study the direct effect of 3-APS on tau protein without the interference of other neuronal proteins, non neuronal cells, HEK 293, lacking tau were stably transfected with human tau cDNA. The tau-expressing cells were identified by immunofluorescence using an antibody raised against tau. Figure 1 indicates that upon tau expression the transfected cells show some microtubules bundles (see arrows and inset in Figure 1A), and that the actin-stress fibers disappear. Moreover, some aggregates, where tau and actin colocalize, were found at the cell membrane (see below). These aggregates could be similar to those recently reported in *Drosophila* cells [24]. In addition, the presence and quantitation of tau mRNA by RT-PCR, (Figure 1B) was determined, and the expression of tau protein was also analyzed by Western blot (Figure 1C).

Quantitation of tau protein expressed in these cells, indicated that tau was about 0.1 % of the total soluble cell

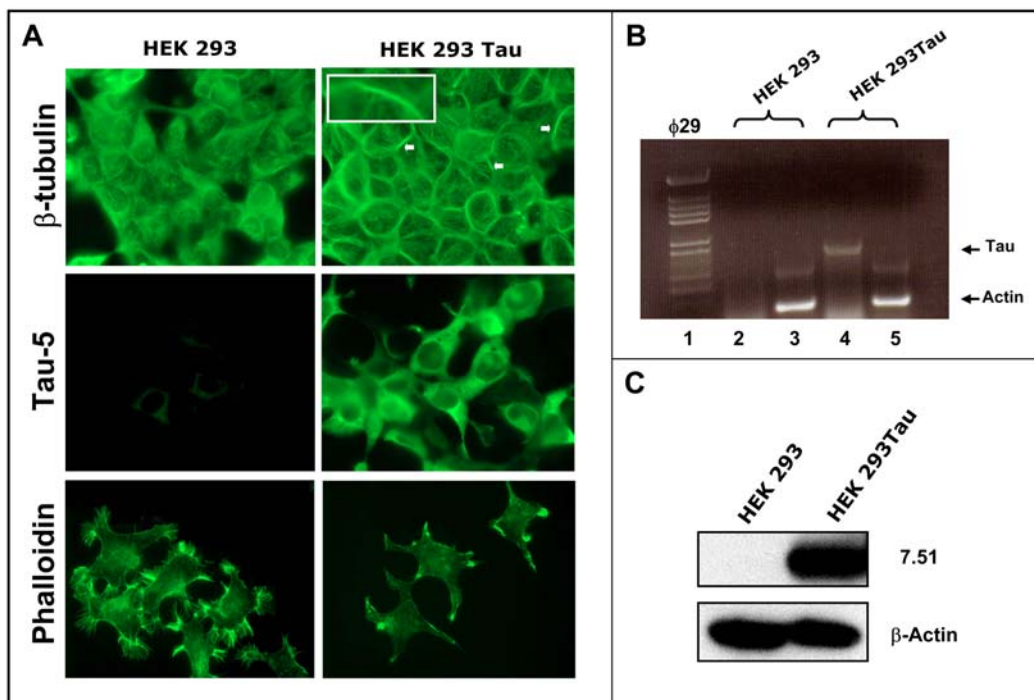
protein. Since the content of tubulin in these cells was about 2 %, the ratio tau/tubulin was in line to that described for neuronal cells [25].

Increasing amounts of 3-APS were added to untransfected or transfected HEK 293 cells. Figure 2 indicates that upon addition of increasing amounts of 3-APS, a slight increase in tau staining was observed in tau transfected cells (see Figures 2A, 2C). This was not due to an increase in the amount of tau, as determined by Western blot (not shown), but probably, to an increase in tau aggregation in treated cells. Since tau aggregates are usually stained with Thioflavin S (Th-S) [26], Th-S staining was performed on the transfected cells after adding increasing amounts of 3-APS. Figure 2B also shows that there was a clear increase in Th-S staining dependent upon addition of increasing amounts of 3-APS (see also Figure 2D).

To confirm the increase in tau aggregates in 3-APS-treated cells, detergent insoluble aggregates were isolated and the presence of tau protein in those aggregates was determined. Western blot analysis revealed the presence of tau in the detergent insoluble fraction, and also showed that the amount of tau in the aggregates increased with the concentration of added 3-APS (Figure 3). When the same experiments, shown in Figures 2 and 3, were done in the presence of a sGAG, like heparin, instead of 3-APS, no differences were found with respect to controls (absence of heparin or 3-APS), when tau aggregation was tested. It can be explained by the fact that 3-APS, but not heparin, can enter into the cell.

### **3-APS facilitates tau assembly in vitro**

To test if 3-APS directly facilitated the assembly of tau protein, purified recombinant tau protein was mixed with 3-APS and, after incubation of the mixture (in the conditions described in Materials and Methods), the aggregates were visualized under electron microscopy. Figure 4A shows the presence of short fibrillar polymers, upon addition of 3-APS; together with fewer but longer and larger fibrillar polymers (inset of the figure). No polymers were found in the absence of added tau. Some of the longer and larger 3-APS induced polymers were similar to those assembled in the presence of heparin (Figure 4B). When tau protein was mixed with both 3-APS and heparin both types of polymers were observed (Figure 4C). In addition, we studied the formation of these aggregates by immunofluorescence analysis [27], and we found that they could be identified by Th-S staining (Figure 4D). The result shown in Figure 4D suggests that the increased Th-S staining found upon 3-APS addition could be due to the presence of tau aggregates.



**Figure 1**

**Levels of Tau in HEK 293 expressing Tau cell line.** A) Immunofluorescence analysis of both HEK 293 and HEK 293 expressing Tau cell lines using antibodies against  $\beta$ -tubulin, tau protein (Tau-5) and phalloidin to identify actin polymers. The results obtained for untransfected (left) and tau-transfected (right) cells are shown. In the presence of Tau, tubulin bundles were observed (see arrows). Inset shows a microtubule bundle inside HEK 293 tau expressing cells. B) RNA was isolated from previously mentioned cell lines as described in Materials and methods and a quantitative RT/PCR analysis using actin RNA, as internal control, was done. The size of the amplified DNA was determined by gel electrophoresis; Tau DNA, lanes 2 and 4 and actin DNA (lanes 3 and 5) are shown. In lane 1, are Hind III fragments of  $\phi$ 29 DNA used as electrophoretic markers. The quantitation of the ratio Tau/actin in arbitrary units is shown. C) Total protein extract from HEK 293 and HEK 293 expressing tau was obtained and Western blot analysis using an antibody against  $\beta$ -actin and an antibody (ab 7.51) against Tau, was done.

**3-APS is not affecting to microtubule network, but it could affect to tau-actin interaction**

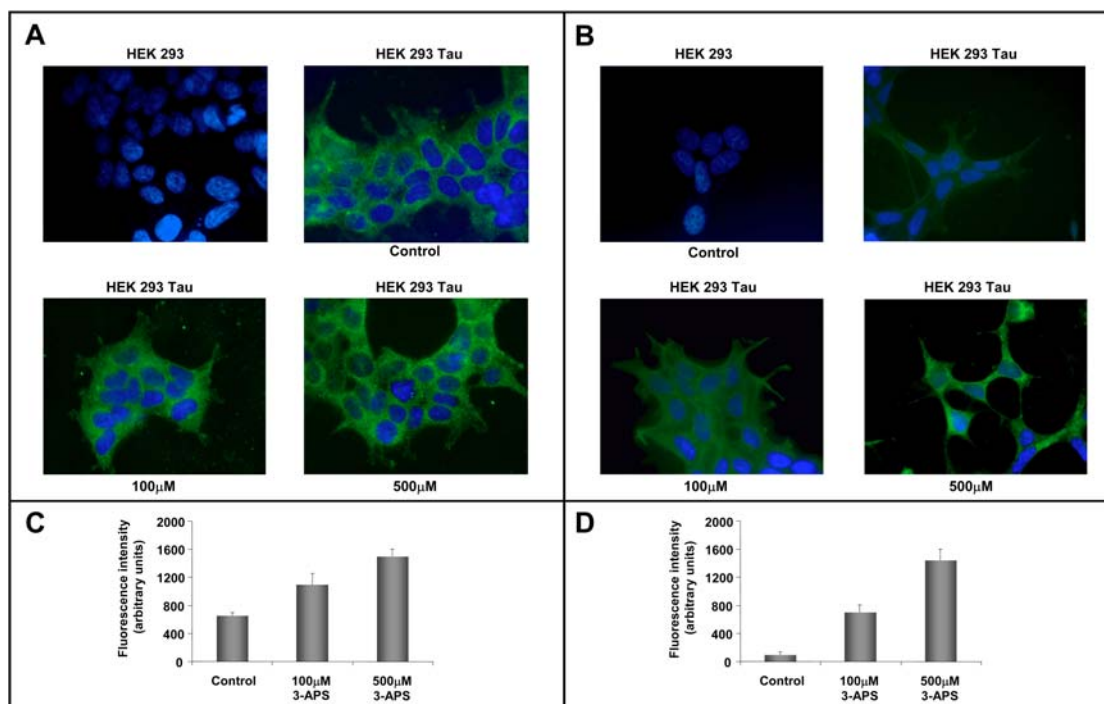
The previous observation suggests that 3-APS binds to tau. This binding could affect the interaction of tau with microtubules and could result in a disorganization of microtubule network. To test this possibility, immunofluorescence analyses to visualize tubulin and tau were carried out. No main differences were found upon addition of 3-APS in microtubule network. Moreover, the *in vitro* binding of tau to microtubules was studied in the absence or presence of 3-APS. Our results indicated that in the presence of 0.5 mM 3-APS there is a slight decrease of *in vitro* tau binding to microtubules (Additional File 1).

Although the presence of 3-APS does not affect to the organization of microtubule cytoskeleton, it seems to alter some aspects related to tau-actin aggregates. In Figure 1, it was shown that tau expression in HEK 293 cells resulted, in keeping with previously reported data [28], in the loss

of actin stress fibers and in the presence of some aggregates in lamellipodia-like structures that are stained with phalloidin (aggregated actin) and tau antibodies (recently, in PC12 cells, tau has been localized to lamellipodia-like structures, where it associates with actin [29]). These aggregates are shown in Figure 5A. Upon addition of 3-APS these aggregates disappeared (Figure 5B) suggesting that addition of 3-APS could result in the disassembly of tau-actin aggregates.

**3-APS is bound to tau when the C-terminal region of the protein is present**

Since 3-APS is not affecting to the microtubule network and to the binding of tau to microtubules, it is possible that it does not bind directly to the microtubule binding sites, found in tau molecule that are needed for tau-tau interaction [4]. To look for the binding site of 3-APS that results in tau aggregation we used different tau fragments (see Figure 6A). Figure 6B shows that tau aggregates were

**Figure 2**

**Effect of 3-APS on Tau transfected cell line.** HEK 293 expressing Tau cells were treated with 100 μM and 500 μM of 3-APS and stained using an antibody against human Tau (ab T14) (A) or with 0.01 % thioflavin S (Th-S) (B). Quantitation of both T14 (C) and Thioflavin S (D) fluorescence observed by fluorescence microscopy is shown. The fluorescence intensity of each sample was obtained by background subtraction. A significant fluorescence intensity increase ( $P < 0.05$  as compared with untreated cells) is shown for both T14 and Thioflavin S staining. The average of at least three separate determinations is indicated. DAPI was used for nuclei staining.

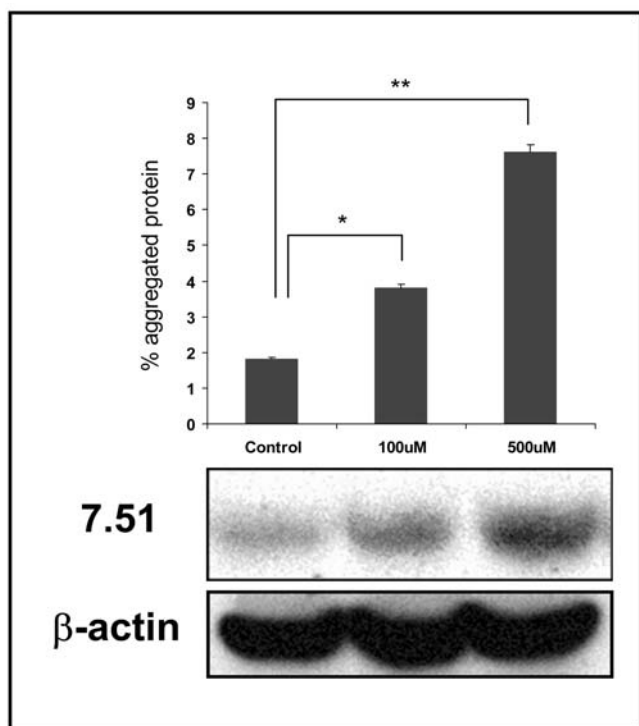
mainly found when tau 3RC peptide was mixed with 3-APS. Very few polymers were found when tau 3R peptide was tested and no polymers were observed for tau peptide containing the amino-terminal half region of tau protein. As can be seen also in the figure, larger polymers were found for the tau variant in which the N-terminal region was missing (tau 3RC) compared to the polymers found when the whole tau was assembled. These data suggest that 3-APS could bind to the C-terminal half region of tau protein, explaining the lack of interference of 3-APS addition with tau binding to microtubules, since tau may remain bound to microtubules and, also may bind to 3-APS through to a more distal C-terminal region. It should be indicated that tau binding to microtubules is mainly through the first and second tubulin binding repeats present in tau molecule [30].

It has been proposed that amyloid beta peptide fragment  $A\beta_{1-28}$  binds to 3-APS [19]. The sequence of this peptide being DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSN K. The bold motif has been suggested to be the binding site for 3-APS [19]. Thus, we have looked for a similar motif in tau

molecule and it has been found a related motif NIHHK in tau 3RC peptide. Thus, we have analyzed the polymerization of a tau peptide containing the residues 317–335, being NIHHK the residues 327 to 331 present in that peptide. Figure 6B (inset) shows that the indicated tau peptide (317–335) is able to assemble in the presence of 3-APS. This experiment suggests a possible direct interaction between tau peptide (residues 317–335) and 3-APS.

#### **The presence of 3-APS-tau aggregates is not toxic for cultured non neuronal cells**

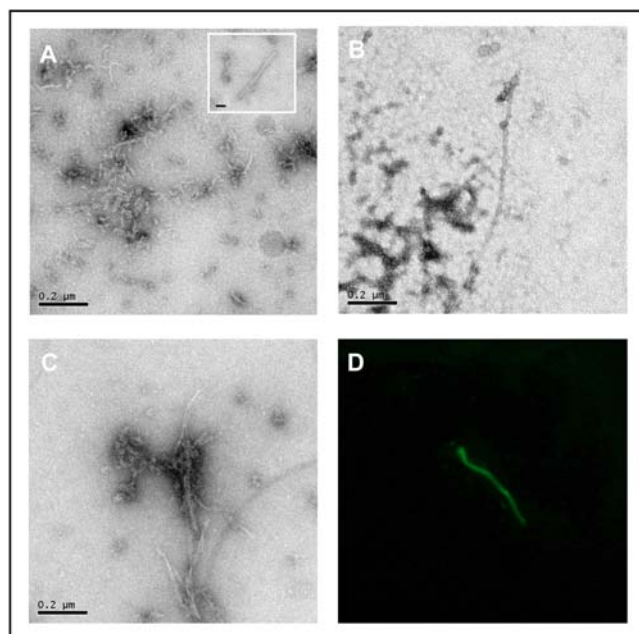
To HEK 293 cells stably transfected with tau, increasing amounts of 3-APS were added, and the cell viability was measured. The data from Figure 7 show that, after four days of 3-APS addition, the number of surviving cells was similar at the different 3-APS concentrations tested in the cell cultures and in controls without 3-APS. In every cell culture, the presence of cells containing tau aggregates was calculated based on Th-S staining, as previously shown in Figure 2D for HEK 293 cells expressing tau protein.



**Figure 3**  
**Tau aggregation in HEK 293 Tau expressing cells treated with 3-APS.** Detergent insoluble aggregates of Tau were isolated from HEK 293 tau cells untreated (control) or treated with 3-APS. The detergent insoluble material (see methods) was analyzed by western blot using an antibody against Tau (ab 7.51). Reaction of the unfractionated cell extract with  $\beta$ -actin antibody, was used as loading control. The average of at least three separate determinations is indicated. \*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$  compared with control (Student's t test).

#### Effect of 3-APS on neuronal cells

After looking at the effect of 3-APS in tau-expressing non neuronal cells, we have tested the effect of 3-APS in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. These neuroblastoma cells express a very little amount of tau protein in undifferentiated cells state. However, upon differentiation (see methods), a high increase of tau protein was found in those cells (Figure 8A). When undifferentiated neuroblastoma cells were treated with 3-APS, no differences in phalloidin staining (actin cytoskeleton) were found (Figure 8B). In fact, stress fibers were observed (probably due to the low expression of tau protein). In addition, a very weak Th-S staining was observed in the absence or presence of 3-APS. Upon differentiation of SH-SY5Y cells with dibutyryl cyclic AMP, stress fibers disappear (Figure 8C) and very few actin-tau membrane complexes, compared to those found in HEK 293 cells stably transfected with tau, were observed. When these differentiated neuroblast-



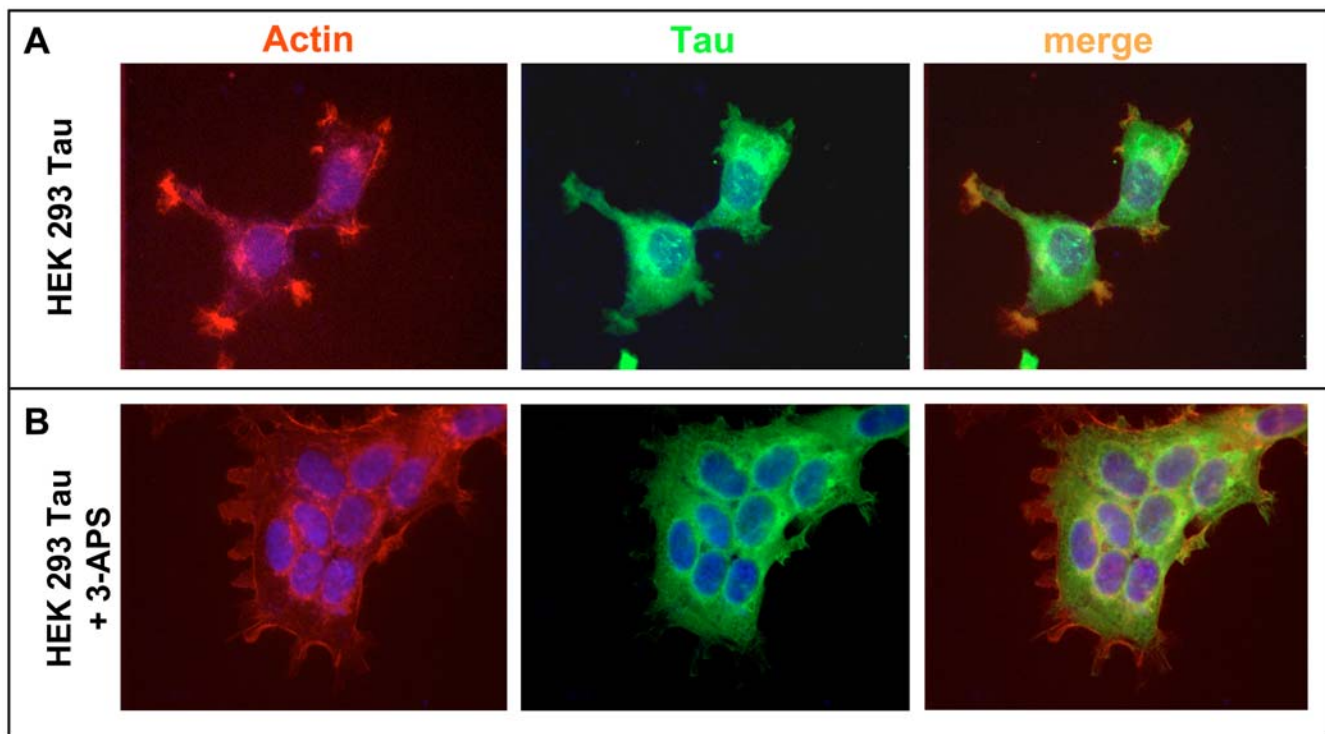
**Figure 4**  
**Polymerization of Tau in the presence of 3-APS.** Fibrillar Tau polymers assembled in the presence of 3-APS were observed by Electron Microscopy. Mainly, short fibrillar and occasionally longer and wider filaments (inset) were found (A). These polymers are not identical to those found in the presence of heparin (B). An increase in both types was found in the presence of both heparin and 3-APS (C). Bars indicate 0.2  $\mu$ m. 3-APS induced tau polymerization stained with Th-S and visualized by immunofluorescence (see methods) (D).

oma cells were treated with 3-APS none of those actin-tau complexes were found (Figure 8C). Moreover, in 3-APS treated cells an increase in Th-S staining was observed (Figure 8D). Also, an increase in detergent insoluble tau aggregates was found upon treatment of the differentiated SH-SY5Y cells with 3-APS (Figure 8E).

In addition, the effect of 3-APS on primary cultures of mouse hippocampal neurons was analyzed. Figure 8F shows an increase in Th-S staining in 3-APS treated neurons. The effect of 3-APS addition in neurons viability was also studied, but no changes in cell viability were found in the absence or presence of 3-APS (Figure 8G). Finally, no differences in morphology of hippocampal neurons were observed, upon 3-APS addition.

#### Discussion

The presence of amyloid deposits and tau aggregates are the main characteristics of Alzheimer's disease, and could be related to the neurodegenerative process. Usually, amyloid and tau pathologies are analyzed in an independent way, and it is not known if drugs preventing amyloid

**Figure 5**

**Effect of 3-APS on tau-actin complexes.** As indicated in Figure 1, tau expressing HEK cells show some lamellipodia regions that are stained by both, phalloidin (aggregated actin) and tau antibodies. The merged picture is also indicated. DAPI was used for nuclei staining (A). In the presence of 200  $\mu$ M 3-APS, the phalloidin and Tau staining clearly decreases (B).

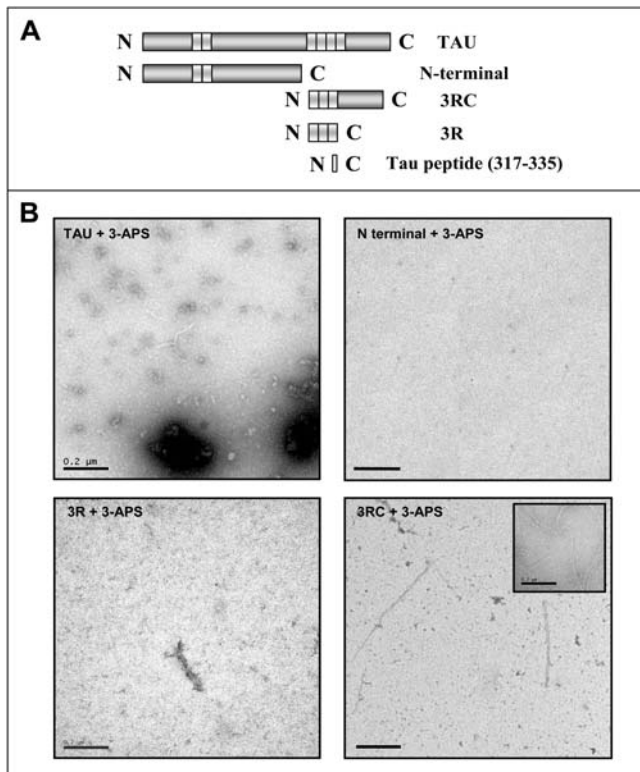
pathology may also affect tau pathology. One example is 3-amino-1-propane sulfonic acid (3-APS), that maintains beta amyloid peptide in non fibrillary form [19], whose possible action on tau protein was unknown.

The aggregation of amyloid peptide, or tau protein, can be induced by sGAG, like heparin. However, in the case of amyloid peptide, low molecular weight heparin may reduce the accumulation of beta amyloid aggregates in a mouse model [17] and compounds, like 3-APS, that mimic the binding of sGAG, can bind to soluble non-fibrillar amyloid peptide, preventing amyloid aggregation [21]. It has been also suggested that the sulfate moieties of sGAG are sufficient to favour the formation of amyloid fibrils [15], 3-APS has a sulfate moiety, but it appears that this is not enough to induce amyloid aggregation.

In this work, we have found that 3-APS favours tau polymerization into fibrillar aggregates. The appearance of these tau aggregates was not toxic in our cell model, and the addition of 3-APS did not either result in toxicity to cultured neurons. A possible explanation is that 3-APS binds to tau protein through its C-terminal half region and, in this way, it is not affecting to the microtubule binding region present in tau protein, and therefore is not affecting

to the microtubule binding function of tau. 3-APS has both a positively and a negatively charged regions. The positively charged region of 3-APS could bind to the negatively charged regions of tau protein, like those present at the C-terminal region of tau, and in consequence, the negative influence of the C-terminal region of tau on its selfassembly, would decrease upon 3-APS binding, allowing tau polymerization [31]. On the other hand the negative charge region of 3-APS could bind to the positive charges residues present in tau, in the C-terminal half of the molecule, residues that are involved in the binding of tau to actin. If it the case 3-APS and actin should compete for the same tau-binding site. Also, it has been indicated that tau binding to actin is through a region closed to the C-terminal of tau molecule [29]. This region contains the NIHHK motif, similar to the VHHQK motif that it has been suggested to be required for the binding of 3-APS to A $\beta$  peptide [19].

Thus, in the presence of 3-APS, the binding of tau to actin could be decreased if 3-APS overlaps its tau binding site with that of actin. We can not exclude that 3-APS may also bind to the negative charged N-terminal region of tau, with a similar effect on tau assembly [32], since we did not test a tau variant containing the N-terminal and the tubu-

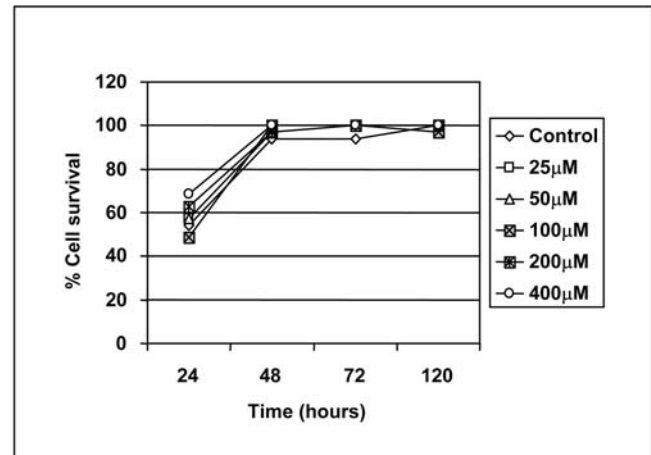


**Figure 6**  
**Polymers found when 3-APS was added to tau protein and some tau fragments.** A) Scheme of tau and its fragments used in this analysis. B) Polymer formation after incubation of tau protein, N-terminal tau region, 3R tau fragment and 3RC tau fragment, with 3-APS. Inset shows the polymers found after incubation of tau peptide (residues 317–335) with 3-APS. Bars indicate 0.2 μm

lin binding regions. Indeed, that possible binding of 3-APS to the N-terminal region of tau may influence the binding of tau to membrane-actin aggregates [33].

The proposed mechanism to explain the assembly of tau in the presence of 3-APS could not be very different to that suggested for heparin-induced tau assembly. In both cases a tau peptide comprising residues 317 to 335 is enough to form aggregates [34]. In addition, 3-APS could act as a sequestering molecule for tau, but it could not be essential for cell viability. In this way it has been described that the mice lacking tau could develop and live like their wild type counterparts [35].

There is evidence for a role of sGAG in the formation of amyloid and tau aggregates [36] and, as indicated in the introduction, a possible toxic effect by promoting amyloid peptide aggregation was suggested for sGAG, but, conversely, it has been described that sGAG like heparan or chondroitin sulfate attenuate the neurotoxic effect of



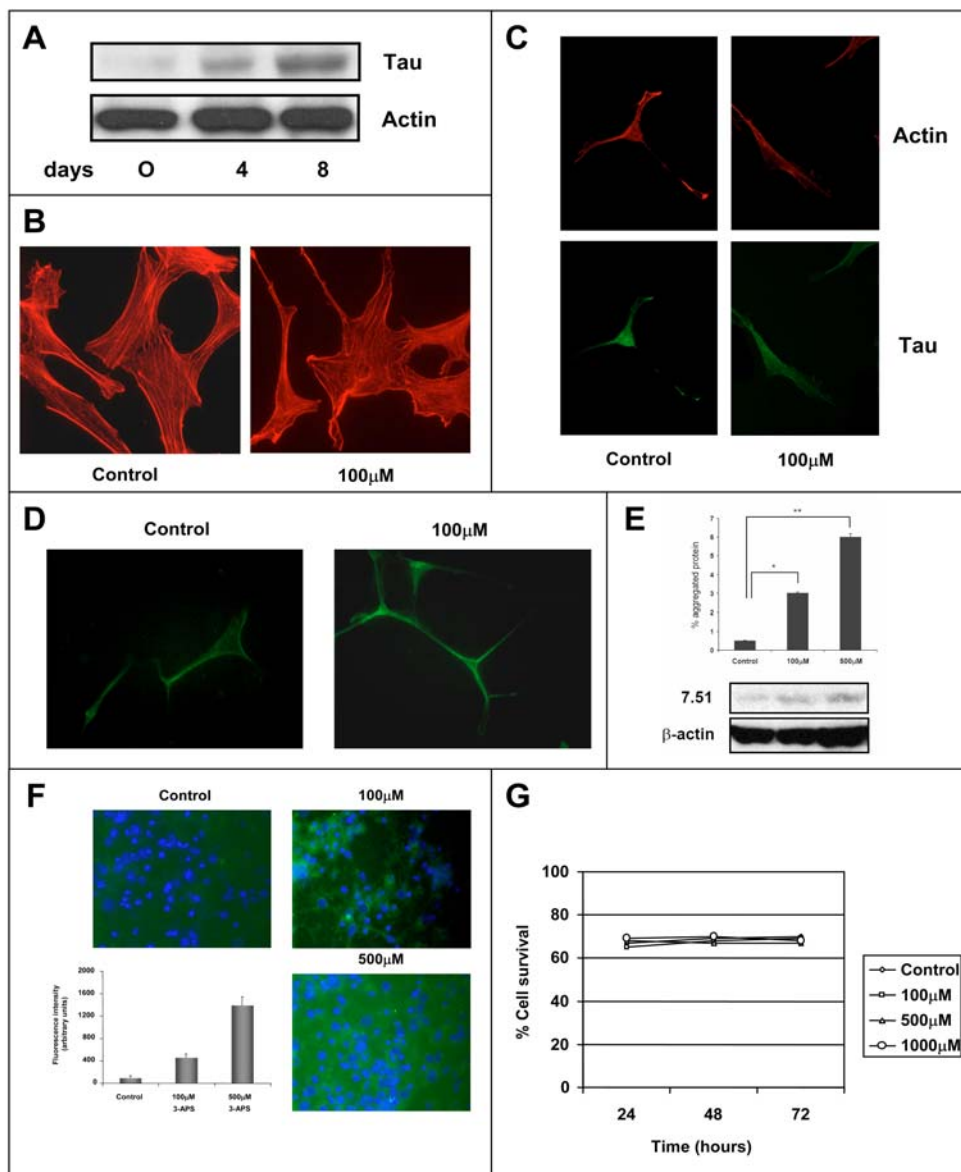
**Figure 7**  
**3-APS treatment is not affecting cell survival.** Non neuronal (HEK 293 Tau cells) were treated with 3-APS. Viable and dead cells were stained with calcein AM and propidium iodide as described in "methods" and photographed at a fluorescence microscope. Percentages of specific cell survival were determined as described in "methods".

amyloid peptide in primary neuronal cultures [37], and a role for heparan sulfate as a modulator of Aβ formation, through beta secretase, has been suggested [38]. It will be of interest in further studies, to test for a possible effect of 3-APS on beta secretase activity.

Regarding tau protein, it has been reported that the chondroitin sulfate content inversely correlates with the amount of hyperphosphorylated tau in cortical areas of Alzheimer's disease patients [39]. Thus, a possible neuroprotective role of sGAG in Alzheimer's disease could not be excluded, and the neuroprotective role could be extended to some related compounds like 3-APS, because 3-APS could be used for decreasing Aβ pathology and, although it aggregates tau protein, it is not toxic for cultured cells. Moreover, 3-APS promotes the decrease of tau-actin complexes [28,29] that could be toxic for the cells [24].

## Conclusion

We suggest that drugs of potential interest for the treatment of Alzheimer's disease should be tested not only on one of the proteins involved in Alzheimer's disease pathology, like amyloid peptide, but also on the component of the other pathological hallmark of Alzheimer's disease, tau protein. Our data, although support the lack of effect of 3-APS in cell viability, indicate that 3-APS could promote tau aggregation, probably reducing the amount of available functional tau inside of a cell. This relevant aspect should be taken into account for a possible future use of Tramiprosate in human beings.



**Figure 8**

**The effect of 3-APS in neuronal cells.** A) Expression of tau protein was determined by western blot in non differentiated (0 days) and after starting differentiation for four days (4) or after eight days (8) with 2 mM dibutyryl cyclic cAMP (cAMP) in SH-SY5Y neuroblastoma cells. Actin was taken as a control of loading protein. B) Effect of 3-APS on undifferentiated SH-SY5Y cells. In the absence (control) of 3-APS, or in the presence of 100 μM 3-APS. Cells were stained with phalloidin to label actin cytoskeleton. C) Effect of 3-APS on differentiated SH-SY5Y cells. SH-SY5Y cells differentiated for 8 days were untreated (control) or treated with 100 μM 3-APS. The cells were stained with antibodies raised against tau protein and with phalloidin to label polymerized actin. D) In the presence of 3-APS there is an increase, in differentiated SH-SY5Y cells, in Th-S staining. Untreated, or cells treated with 100 μM 3-APS were stained with Th-S and visualized by an immunofluorescence microscopy (see methods). An increase in Th-S staining upon 3-APS treatment was found. E) Detergent insoluble tau aggregates were isolated from neuroblastoma cells untreated or treated with 100 μM and 500 μM 3-APS. The amount of tau in detergent insoluble material was measured by testing its reaction with tau antibody 7.5I. Actin was used as a loading control (see methods). F) Th-S staining in hippocampal neurons treated with 3-APS. Primary cultures of hippocampal neurons were stained with Th-S in the absence (control) or the presence of 100 μM 3-APS or 500 μM 3-APS. The quantitation of the fluorescent intensity is shown. (G) Effect of 3-APS in hippocampal neurons viability. Primary hippocampal cultures were incubated in the absence (control) or the presence of 100 μM, 500 μM and 1000 μM, for 24, 48 or 72 hours and the percentage of cell survival was determined.



## Methods

### Materials

3-Amino-1-propanesulfonic acid (3-APS) (Ref. A4147), Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), EDTA, EGTA, 2-Mercaptoethanol, MES, HEPES, Trizma Base, NaF, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and SDS were purchased from Sigma. Triton X-100, Tween-20, NaCl and MgCl<sub>2</sub> were obtained from Merck. Acrylamide/bisacrylamide solution and Bradford reagent was supplied by Bio-Rad. Protran Nitrocellulose Transfer Membrane was from PerkinElmer. The chemiluminescent detection kit (Western Light) was purchased from Tropix. DAPI (Ref. 268298) was obtained from Calbiochem. Thioflavin S (Th-S) (Ref. T-1892) was purchased from Sigma.

### Antibodies

For immunoblot analysis, we used anti-β-tubulin (1/2000; Sigma), anti-β-actin (1/2500; Sigma), and 7.51 (anti-tau antibody; a gift from Dr. C. M. Wischik, UK) antibodies followed by relevant secondary antibodies (1/2000; DAKO).

For immunofluorescence, we used anti-β-tubulin (1/500; Sigma), Tau-5 (1/500; Chemicon) and T14 (1/500; Zymed Laboratories). The secondary antibodies (Molecular Probes) were used at 1/1000.

Actin staining was done by using phalloidin TRITC (1/300; Sigma). 0,01% Thioflavin S in PBS 1× was used for staining of treated or untreated cell cultures.

### Reverse transcription of RNA and polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA from HEK 293 and HEK 293 tau expressing cells were prepared using the reagent TRIzol (Invitrogen) and following the supplier's protocol. Reverse transcription was performed using the first cDNA synthesis kit (Roche Applied Science) on 5 μg of RNA with oligo(dT) primers. PCR was performed with the primers for tau R1 (5'-GGCGAATTCGGATCCATGCCAGACCTGAAGAATG-3') and R2 (5'-GGCCTGC AGTTACTCGCGGAAGGT-CAGCTTGTTGGG-3'). The amplifications were performed basically with the following protocol: 30 cycles of 94°C for 45s, 55°C for 1 min, and 72°C for 1 min. The PCR products were resolved on a 1% agarose gel and stained with ethidium bromide. As a loading control, RT-PCR for actin was performed for each sample. The used primers for murine actin were H1 (5'-GCATGGAGTCCTG TGGCATC-CACG-3') and H2 (5'-GGGTGTAACGCAACTAAGT-CATAG-3'). Differences among groups were analysed by Student's unpaired *t*-test to determine significant differences between means.

### Cell culture

#### HEK 293 tau cells

HEK 293 tau expressing cells (expressing tau 3R isoform, a kind gift from Dr. Miguel Medina) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM Glutamine, 1 mM Piruvate, 100 U/ml penicillin, 100 U/mL streptomycin, and 0.2 mg/ml Zeocin in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/95% air at 37°C. Proliferating HEK 293 tau expressing cells were plated on glass cover slips coated with 1 mg/ml poly-L-lysine, maintained in the same culture medium during 24 hours and treated with 3-APS for 24, 48 and 72 hours, at 100 μM, 500 μM 3-APS.

#### SH-SY5Y cells

Human neuroblastoma SH-SY5Y cells [40] were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM Glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 U/mL streptomycin in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/95% air at 37°C. For differentiation, proliferating SH-SY5Y cells were plated and then cultured in Neurobasal-B27 medium (Gibco, Grand Island, NY) supplemented with 2 mM dibutyryl cyclic AMP and 1 mM glutamine for 7 days. At this time, about 90% of the cells has extended long neurites and became postmitotic (showing no significant incorporation of tritiated thymidine into DNA).

After 7 days differentiated SH-SY5Y cells were treated during 48 hours with 100 μM, 500 μM 3-APS.

#### Primary culture

Hippocampal neurons were cultured as described by Banker and Cowan [41]. Pregnant wild type females were sacrificed at gestational day 18, and the embryos were removed in sterility. Dissociated hippocampal neurons were plated on glass cover slips coated with 1 mg/ml poly-L-lysine and then 20 μg/ml laminin. After incubating in medium containing 10% horse serum (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) for 24 hours, the medium was changed and supplemented with N2 and B27 (Gibco-BRL). At this point, neurons were treated with 3-APS for 24, 48 and 72 hours, at 100 μM, 500 μM 3-APS.

#### Cell Lysis and Western Blot Analysis

HEK 293 and HEK 293 tau expressing cells were washed once with phosphate-buffered saline (PBS), placed on ice, and then homogenized in a buffer containing: 20 mM HEPES, pH 7.4; 100 mM sodium chloride (NaCl); 100 mM sodium fluoride (NaF); 1% Triton X-100; 1 mM sodium orthovanadate (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>); 5 mM EDTA; and the Complete protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain). After determination of the protein content via Bradford assay, samples containing the same amount of protein were mixed with electrophoresis buffer

containing sodium dodecyl sulfate (SDS), boiled for 5 min, and separated by gel electrophoresis in the presence of SDS on 10% acrylamide gels. The proteins were then transferred to nitrocellulose membranes by following standard procedures, and the membranes were blocked with 10% nonfat dried milk in PBS, 0.2% Tween-20 (PBST). The blocked membranes were incubated overnight with primary antibodies diluted in blocking solution at 4°C. The membranes were then rinsed three times in PBST and incubated with the corresponding peroxidase-conjugated secondary antibody for 1 hr at room temperature. The immunoreactive proteins were visualized by using an enhanced chemiluminescence detection system (Amersham), and subsequent densitometric analysis was performed with an imaging densitometer (GS-710 model; Bio-Rad, Hercules, CA). Western blot analysis were also done using an antibody raised against actin (Sigma) as loading control. Protein extracts prepared from differentiated SH-SY5Y cells were processed and analysed by Western Blot using tau antibody 7.51 (1/100) as previously indicated.

#### **Immunoblot analysis of aggregated Tau**

Treated HEK 293 tau expressing cells, or SH-SY5Y neuroblastoma cells, were homogenized in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0.25% sodium deoxycholate, 1% SDS, 5 mM 4-(2-aminoethyl) benzene-sulfonyl fluoride hydrochloride, 1 µg/ml proteases inhibitors (Complete protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain)), 1 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, and 1 mM β-glycerophosphate) without thawing by using a polytron homogenizer (Kinematica, Kriens, Switzerland) at its highest speed for 30 s. Before centrifugation to fractionate the detergent soluble from detergent insoluble material, an aliquot from each sample was taken to determine if each sample contains, or not, a similar amount of actin (loading control). To do that we have used an antibody raised against actin. Tau protein aggregates from homogenates were isolated by centrifugation (4°C) for 20 min at 20000–30000 g (table-top centrifuge at 15000 rpm). One fourth of the supernatant volume, after centrifugation, was taken to characterize the protein present in that fraction. The whole aggregated protein present in the insoluble fraction was then diluted in O+ buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 7.0, 10% (w/v) glycerol, 5% (v/v) β-mercaptoethanol, 2.3 % (w/v) SDS, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF (phenylmethyl-sulfonyl fluoride), 1 µg/ml proteases inhibitors (Complete protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain))), boiled for 5 min, and separated by gel electrophoresis in the presence of SDS on 10% acrylamide gels. Then, the protein content was analyzed by western blot as previously described.

#### **Immunofluorescence analysis**

After treatments, HEK 293 and HEK 293 tau expressing cells were fixed with either cooled methanol (-20°C) (tubulin immunofluorescence) or 4% paraformaldehyde (actin and tau immunofluorescence) for 20 min at 4°C or 37°C, respectively, and then washed with buffer A (0.1 M MES; 2 mM EGTA; 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>) or with phosphate buffered saline (PBS), respectively. Fixed cells were incubated with 1 M glycine 30 min then permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS or buffer A for 5 min at room temperature. The cover slips were blocked with 1% BSA/PBS or Buffer A for 1 h at room temperature and incubated in primary antibodies in 1% BSA, in PBS, or in buffer A, for 1 h at room temperature. After washing three times with PBS or with buffer A, the secondary antibodies were incubated for 1 h, at room temperature. DAPI (1 µg/ml) staining was performed 10 minutes before finishing secondary antibody incubation. Finally, the covers lips were washed three times with PBS or with buffer A and once with H<sub>2</sub>O, and mounted with FluorSave Reagent (Calbiochem).

Fluorescence microscopy was used to measure fluorescence intensity. After staining with 0.01 % Th-S and T14 antibody cell were observed on a Zeiss Axiovert200 fluorescent microscope. T14 antibody and thioflavin-S fluorescence images were captured through a 100× objective on a high resolution CCD camera (SPOT RT Slider, Diagnostic). The images were saved for later analysis and quantitation. Camera exposure and light settings were kept constant during each experiment. The fluorescence intensity measurements were carried out using the image analysis software Metamorph 6.1 r6 (Universal Imaging).

A similar protocol was followed for SH-SY5Y neuroblastoma cells and primary cultures of hippocampal neurons.

#### **Binding of tau to microtubules**

For *in vitro* assembly of tau protein with microtubules, purified tubulin was assembled in the presence of taxol [42] and mixed with tubulin, after incubation of the mixture, the polymerized protein was isolated by centrifugation in Airfuge (Beckman) at room temperature, for 15 min at 100000 g. The protein present in supernatant and pellet was analyzed by gel electrophoresis followed by western blot using anti-tau and anti-tubulin antibodies.

#### **Determination of Cell Viability**

Cell viability was assessed by calcein-propidium iodide uptake [43]. Calcein/acetoxymethyl ester is taken up and cleaved by esterases present in living cells, yielding yellowish-green fluorescence. In contrast, propidium iodide is taken up only by dead cells, which then exhibit orange-red fluorescence. Briefly, cells were incubated for 30 min with 8 µM propidium iodide (Sigma) and 1 µM calcein/

acetoxymethyl ester (Molecular Probes). The cultures were then rinsed once with Hanks balanced salt solution containing 2 mM CaCl<sub>2</sub>, and the cells were visualized by fluorescence microscopy with a Zeiss Axiovert 135 microscope. Three randomly selected fields were analyzed per well (100–200 cells/field) in at least three independent experiments. Cell viability was expressed as the percentage of calcein-positive cells with respect to the total number of cells.

#### Protein and peptide preparation

Recombinant human tau (whole molecule), N-terminal tau (residues 1–251), peptide 3RC (containing three tubulin binding motifs and the carboxyl-terminal region), peptide 3R (containing three tubulin binding motifs), have been synthesized and purified as previously reported [4]. Tau peptide containing residues 317–335 was obtained as previously indicated (meter referencia 33).

#### Assembly of Tau Peptides into Filaments

Filaments were grown by vapor diffusion in hanging drops in the standard way used for protein crystallization as previously indicated [44]. In a typical experiment, 0.5–2 µg of peptide was resuspended in 10–15 µL of buffer A (0.1 M MES (pH 6.4), 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 2 mM EGTA) containing 50 mM NaCl and 3-APS at concentrations ranging from 1 to 4 mM. In other assays, a similar amount of tau (0.5–2 µg) but in the presence of 0.5 mg/mL heparin was resuspended in buffer A [4]. The reservoir in this case contained 0.2 M NaCl in buffer A. Filaments were obtained after incubation for 4 days at 4 °C. The samples were revisualized by electron microscopy as described [4]. Electron micrographs were obtained at a magnification of 80000 on Kodak SO-163 film. Micrographs were digitized using an Eikonix IEEE-488 camera with a pixel size equivalent to 7 Å in the specimen plane. Processing and measurements were performed using the Digital micrograph 2.1 software from Gatan. Several standards were used for the control of the measurements. Alternatively, tau polymers were stained with Th-S and visualized by immunofluorescence [27].

#### Abbreviations

Aβ : amyloid-β-peptide; sGAG: sulfated glycosaminoglycans; 3-APS: 3-amino-1-propanesulfonic acid; Th-S: Thioflavin S.

#### Competing interests

The author(s) declare that they have no competing interests.

#### Authors' contributions

IS did the main experimental work, helped and with the advice of FH and FJM. JDR advised in some aspects of the work. JA is responsible in designing and overseeing the

experiments and, together with IS, wrote the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

#### Additional material

##### Additional file 1

**Tau binding to microtubules in the presence of 3-APS.** Tubulin (2 µM) was incubated in the presence of 10 mM Taxol for 30 min at 37 °C; and, afterwards; 0.2 µM tau and increasing amounts of 3-APS were added to different aliquots. After 10 min of incubation at 37 °C, the polymerized and unpolymerized protein fractions were isolated by centrifugation and the amount of tau protein and tubulin in the unpolymerized (S) and polymerized (P) protein was determined by western blot, using antibodies against those proteins. The percentage of tau protein present in the polymerized protein, at different 3-APS concentrations, respect to that found in the absence of 3-APS, was determined. Error bars, from three different experiments, are shown.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1750-1326-2-17-S1.pdf>]

#### Acknowledgements

We are grateful to Raquel Cuadros for expert technical support. This work was supported by grants from Plan Nacional (Ministerio de Educación y Ciencia, Spain), Comunidad de Madrid, Fundación Botin, and by an Institutional Grant of Fundación R. Areces. Also, this work is part to our contribution to CIBER Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED) (Ministerio de Sanidad y Consumo).

#### References

1. Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K: **Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1985, **82**:4245-9. M Goedert: **Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases: tauopathies and alpha-synucleinopathies.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1999, **354**:1101-18
2. Kjellen L, Lindahl U: **Proteoglycans: structures and interactions.** *Annu Rev Biochem* 1991, **60**:443-75.
3. Goedert M, Jakes R, Spillantini MG, Hasegawa M, Smith MJ, Crowther RA: **Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans.** *Nature* 1996, **383**:550-3.
4. Perez M, Valpuesta JM, Medina M, Montejo de Garcini E, Avila J: **Polymerization of tau into filaments in the presence of heparin: the minimal sequence required for tau-tau interaction.** *J Neurochem* 1996, **67**:1183-90.
5. Snow AD, Sekiguchi R, Nochlin D, Fraser P, Kimata K, Mizutani A, Arai M, Schreier WA, Morgan DG: **An important role of heparan sulfate proteoglycan (Perlecan) in a model system for the deposition and persistence of fibrillar A beta-amyloid in rat brain.** *Neuron* 1994, **12**:219-34.
6. Snow AD, Lara S, Nochlin D, Wight TN: **Cationic dyes reveal proteoglycans structurally integrated within the characteristic lesions of Alzheimer's disease.** *Acta Neuropathol (Berl)* 1989, **78**:113-23.
7. Snow AD, Mar H, Nochlin D, Sekiguchi RT, Kimata K, Koike Y, Wight TN: **Early accumulation of heparan sulfate in neurons and in the beta-amyloid protein-containing lesions of Alzheimer's disease and Down's syndrome.** *Am J Pathol* 1990, **137**:1253-70.
8. Small DH, Williamson T, Reed G, Clarriss H, Beyreuther K, Masters CL, Nurcombe V: **The role of heparan sulfate proteoglycans in the pathogenesis of Alzheimer's disease.** *Ann N Y Acad Sci* 1996, **777**:316-21. J Avila, ALS Colaço: **The role of sulfated glycosaminoglycans in Alzheimer's disease: a hypothesis.** *Alzheimer's Research* 1997, **3**:77-81

9. Castillo GM, Lukito W, Wight TN, Snow AD: **The sulfate moieties of glycosaminoglycans are critical for the enhancement of beta-amyloid protein fibril formation.** *J Neurochem* 1999, **72**:1681-7.
10. Arrasate M, Perez M, Valpuesta JM, Avila J: **Role of glycosaminoglycans in determining the helicity of paired helical filaments.** *Am J Pathol* 1997, **151**:1115-22.
11. DeWitt DA, Silver J, Canning DR, Perry G: **Chondroitin sulfate proteoglycans are associated with the lesions of Alzheimer's disease.** *Exp Neurol* 1993, **121**:149-52. DH Small, SS Mok, TG Williamson, V Nurcombe: **Role of proteoglycans in neural development, regeneration, and the aging brain.** *J Neurochem* 1996, **67**:889-99.
12. Perry G, Siedlak SL, Richey P, Kawai M, Cras P, Kalaria RN, Galloway PG, Scardina JM, Cordell B, Greenberg BD, et al.: **Association of heparan sulfate proteoglycan with the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease.** *J Neurosci* 1991, **11**:3679-83.
13. Gupta-Bansal R, Frederickson RC, Brunden KR: **Proteoglycan-mediated inhibition of A beta proteolysis. A potential cause of senile plaque accumulation.** *J Biol Chem* 1995, **270**:18666-71.
14. McLaurin J, Fraser PE: **Effect of amino-acid substitutions on Alzheimer's amyloid-beta peptide-glycosaminoglycan interactions.** *Eur J Biochem* 2000, **267**:6353-61.
15. Fraser PE, Nguyen JT, Chin DT, Kirschner DA: **Effects of sulfate ions on Alzheimer beta/A4 peptide assemblies: implications for amyloid fibril-proteoglycan interactions.** *J Neurochem* 1992, **59**:1531-40.
16. Hardy J, Selkoe DJ: **The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics.** *Science* 2002, **297**:353-6. JA Hardy, GA Higgins: **Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis.** *Science* 1992, **256**:184-5. S Oddo, V Vasilevko, A Caccamo, M Kitazawa, D Cribbs, F Laferla: **Reduction of soluble Abeta and tau, but not soluble Abeta alone, ameliorates cognitive decline in transgenic mice with plaques and tangles.** *Journal of Biological Chemistry* 2006.
17. Bergamaschini L, Rossi E, Storini C, Pizzimenti S, Distaso M, Perego C, De Luigi A, Vergani C, De Simoni MG: **Peripheral treatment with enoxaparin, a low molecular weight heparin, reduces plaques and beta-amyloid accumulation in a mouse model of Alzheimer's disease.** *J Neurosci* 2004, **24**:4181-6.
18. Aisen PS: **The development of anti-amyloid therapy for Alzheimer's disease : from secretase modulators to polymerisation inhibitors.** *CNS Drugs* 2005, **19**:989-96.
19. Gervais F, Paquette J, Morissette C, Krzyzkowski P, Yu M, Azzi M, Lacombe D, Kong X, Aman A, Laurin J, et al.: **Targeting soluble Abeta peptide with Tramiprosate for the treatment of brain amyloidosis.** *Neurobiology of Aging* 2006.
20. Aisen PS, Mehran M, Poole R, Lavoie I, Gervais F, Laurin J, Briand R, Garceau D: **Clinical data on Alzhemed after 12 months of treatment in patients with mild to moderate Alzheimer's disease.** *Neurobiology of Aging* 2004, **25**:.
21. Gervais F: **Glycosaminoglycans mimetics: Potential to modify underlying disease process in Alzheimer's disease.** *Neurobiology of Aging* 2004, **25**(S1):S11-S12.
22. Gervais F, Chalifour R, Garceau D, Kong X, Laurin J, McLaughlin R, Morissette C, Paquette J: **Glycosaminoglycan mimetics: a therapeutic approach to cerebral amyloid angiopathy.** *Amyloid* 2001, **8**(Suppl 1):28-35.
23. Walsh DM, Selkoe DJ: **Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease.** *Neuron* 2004, **44**:181-93.
24. Fulga TA, Elson-Schwab I, Khurana V, Steinhilb ML, Spires TL, Hyman BT, Feany MB: **Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo.** *Nat Cell Biol* 2007, **9**:139-48.
25. Avila J, Dominguez J, Diaz-Nido J: **Regulation of microtubule dynamics by microtubule-associated protein expression and phosphorylation during neuronal development.** *Int J Dev Biol* 1994, **38**:13-25.
26. Arrasate M, Mitra S, Schweitzer ES, Segal MR, Finkbeiner S: **Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death.** *Nature* 2004, **431**:805-10.
27. Santa-Maria I, Perez M, Hernandez F, Avila J, Moreno FJ: **Characteristics of the binding of thioflavin S to tau paired helical filaments.** *J Alzheimers Dis* 2006, **9**:279-85.
28. Sharma VM, Litersky JM, Bhaskar K, Lee G: **Tau impacts on growth-factor-stimulated actin remodeling.** *J Cell Sci* 2007, **120**:748-57.
29. Yu JZ, Rasenick MM: **Tau associates with actin in differentiating PC12 cells.** *FASEB J* 2006, **20**:1452-61.
30. Goode BL, Denis PE, Panda D, Radeke MJ, Miller HP, Wilson L, Feinstein SC: **Functional interactions between the proline-rich and repeat regions of tau enhance microtubule binding and assembly.** *Mol Biol Cell* 1997, **8**:353-65.
31. Abraha A, Ghoshal N, Gamblin TC, Cryns V, Berry RW, Kuret J, Binder LI: **C-terminal inhibition of tau assembly in vitro and in Alzheimer's disease.** *J Cell Sci* 2000, **113**(Pt 21):3737-45.
32. Gamblin TC, Berry RW, Binder LI: **Tau polymerization: role of the amino terminus.** *Biochemistry* 2003, **42**:2252-7.
33. Brandt R, Leger J, Lee G: **Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain.** *J Cell Biol* 1995, **131**:327-40.
34. Perez M, Arrasate M, Montejó De Garcini E, Muñoz V, Avila J: **In vitro assembly of tau protein: mapping the regions involved in filament formation.** *Biochemistry* 2001, **40**:5983-91.
35. 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* 1999, **399**:488-91.
36. Diaz-Nido J, Wandosell F, Avila J: **Glycosaminoglycans and beta-amyloid, prion and tau peptides in neurodegenerative diseases.** *Peptides* 2002, **23**:1323-32.
37. Woods AG, Cribbs DH, Whittemore ER, Cotman CW: **Heparan sulfate and chondroitin sulfate glycosaminoglycan attenuate beta-amyloid(25-35) induced neurodegeneration in cultured hippocampal neurons.** *Brain Res* 1995, **697**:53-62. SJ Pollack, Sadler, II, SR Hawtin, VJ Tailor, MS Shearman: **Sulfated glycosaminoglycans and dyes attenuate the neurotoxic effects of beta-amyloid in rat PC12 cells.** *Neurosci Lett* 1995, **184**:113-6.
38. Leveugle B, Ding W, Laurence F, Dehouck MP, Scameo A, Cecchelli R, Fillit H: **Heparin oligosaccharides that pass the blood-brain barrier inhibit beta-amyloid precursor protein secretion and heparin binding to beta-amyloid peptide.** *J Neurochem* 1998, **70**:736-44. Z Scholefield, EA Yates, G Wayne, A Amour, W McDowell, JE Turnbull: **Heparan sulfate regulates amyloid precursor protein processing by BACE1, the Alzheimer's beta-secretase.** *J Cell Biol* 2003, **163**:97-107.
39. Bruckner G, Hausen D, Hartig W, Drlicek M, Arendt T, Brauer K: **Cortical areas abundant in extracellular matrix chondroitin sulphate proteoglycans are less affected by cytoskeletal changes in Alzheimer's disease.** *Neuroscience* 1999, **92**:791-805.
40. Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS: **Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones.** *Cancer Res* 1978, **38**:3751-7.
41. Banker GA, Cowan WM: **Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture.** *Brain Res* 1977, **126**:397-42.
42. Vallee RB: **A taxol-dependent procedure for the isolation of microtubules and microtubule-associated proteins (MAPs).** *J Cell Biol* 1982, **92**:435-42.
43. Mattson MP, Barger SV, Begley JG, Mark RJ: **Calcium, free radicals, and excitotoxic neuronal death in primary cell culture.** *Methods Cell Biol* 1995, **46**:187-216.
44. Crowther RA, Olesen OF, Smith MJ, Jakes R, Goedert M: **Assembly of Alzheimer-like filaments from full-length tau protein.** *FEBS Lett* 1994, **337**:135-8.

## Taurine, an inducer for tau polymerization and a weak inhibitor for amyloid- $\beta$ -peptide aggregation

Ismael Santa-María<sup>a</sup>, Felix Hernández<sup>a</sup>, Francisco J. Moreno<sup>a</sup>, Jesús Avila<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM), Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain  
<sup>b</sup> CIBERNED, Spain

Received 14 September 2007; received in revised form 26 September 2007; accepted 27 September 2007

### Abstract

Taurine is an abundant amino acid present in brain. Its concentration is decreased in the brain of Alzheimer's disease (AD) patients. The chemical structure of taurine is similar to 3-amino-1-propanesulfonic acid, a known compound which interferes with beta-amyloid peptide aggregation. Here, we have tested if taurine shows similar properties. Taurine slightly decreases beta-amyloid peptide aggregation at a millimolar concentration. At that concentration, taurine favours the assembly of tau protein into fibrillar polymers. Thus, it is proposed that the negative charge present in taurine may be involved in the binding to tau protein, facilitating its assembly. In addition, the possible role of taurine in Alzheimer disease is commented.

© 2007 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Taurine; Tau polymerization; Alzheimer disease

Taurine, 2-aminoethane sulfonic acid, is one of the most abundant free amino acids in the brain [10] where it may play a role as an osmoregulator, antioxidant, neuromodulator or may control calcium influx [12]. It has been also described that taurine may induce an increase in  $\text{Cl}^-$  conductance upon binding to  $\text{GABA}_A$  receptors [7]. More recently, it has been indicated that taurine prevents the neurotoxicity of beta-amyloid peptide and that the neuroprotection is related to the activation of  $\text{GABA}_A$  receptors [16].

Beta-amyloid peptide ( $\text{A}\beta$ ) is the main component of the senile plaques, one of the aberrant structures, together with the neurofibrillary tangles, found in the brain of Alzheimer's disease (AD) patients. In AD a decrease in taurine concentration has been observed in the brain or in the cerebrospinal fluid of the AD patients [4,3]. On the other hand, neurofibrillary tangles are present inside taurine-expressing neurons, in AD patients [15].

Beta-amyloid peptide is toxic for neurons, in aggregated form [11]. Although, the type of aggregates showing a higher toxic effect remains under discussion [14], a proposed ther-

apy for amyloid pathology in AD has been the search for inhibitors of amyloid aggregation or compounds that could interfere with those factors that facilitate amyloid aggregation. One of those factors that facilitates amyloid aggregation is heparin, a glycosaminoglycan. High molecular weight heparin, could associate to  $\text{A}\beta$  and facilitate the formation of amyloid fibrils [20], although heparin (or heparan sulfate) could also inhibit  $\beta$ -secretase activity [17]. On the other hand, it has been found that a low molecular weight form of heparin, enoxaparin, could reduce amyloid accumulation in a mouse model of AD [6]. In addition specific low molecular weight compounds, which mimic the anionic properties of glycosaminoglycans (GAG), could interfere with the binding of those GAGs with amyloid peptide. One of those compounds is Tramiprosate (3-amino-1-propane sulfonic acid), also known as 3-APS or Alzhemed<sup>TM</sup>. This compound interferes with the aggregation of amyloid peptide, and it has been considered as a promising drug for the treatment of AD [8], being at the present a phase II study to target amyloid-beta with 3-APS in mild to moderate AD [1]. A large phase III for this compound has been already announced [2].

However, taurine is a compound structurally related to 3-APS. Indeed 3-APS is also named as homotaurine (Fig. 1), and although, it has been suggested that taurine has not antifibrillogenic activity [8], a direct experiment showing that, has not

\* Corresponding author at: Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Facultad de Ciencias, Campus de Cantoblanco, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain. Tel.: +34 914978460; fax: +34 914974799.

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

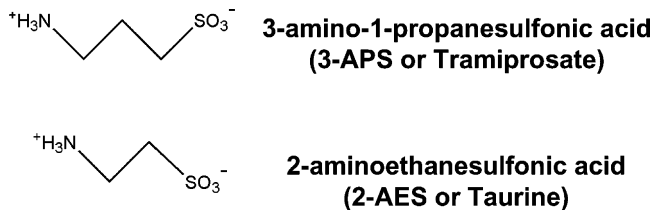


Fig. 1. Structure of 3-amino-1-propanesulfonic acid (3-APS or Tramiprosate), an 2-amino-ethanesulfonic acid (2-AES or taurine). The chemical structure of the compounds used in this study, 3-APS and 2-AES, is shown.

been yet carried out. In fact, taurine binds to beta-amyloid peptide in a similar way to that of 3-APS although, unlike 3-APS, taurine does not prevent the transition to  $\beta$ -sheet conformation of amyloid peptide [8].

To test if, indeed, taurine prevents or not the polymerization into fibrils of amyloid peptide, we have used amyloid peptide (0.1 mg/ml) comprising the residues 25–35, containing the region of beta-amyloid peptide with a higher capacity for self

assembly; we have mixed it with taurine. Fig. 2 shows that in the absence of taurine (Fig. 2A), amyloid peptide aggregates, whereas in the presence of taurine (Fig. 2B) the aggregation decreases, as determined by electron microscopy. A higher decrease in amyloid aggregation was observed when the 3-APS (used as positive control [19]) was added (Fig. 2C). To quantify the amount of polymer in the absence or presence of taurine, measurement of turbidity (absorbance at 310 nm) of the aggregated protein was achieved. By taking as 100% the turbidity of aggregated amyloid peptide, in the absence of any added compound, we found a value for that turbidity of  $66 \pm 21\%$  in the presence of taurine and a value of  $38 \pm 7\%$ , in the presence of 3-APS. Nevertheless, it could be argued that a turbidity measurement could not be a suitable method to determine the amount of aggregated beta-amyloid peptide. Thus, the polymerized fractions were centrifugated in an Airfuge at  $100,000 \times g$  for 60 min. After centrifugation the amount of protein in non-polymerized form was determined by measuring the absorbance (at 230 and 260 nm) of the protein remaining in the

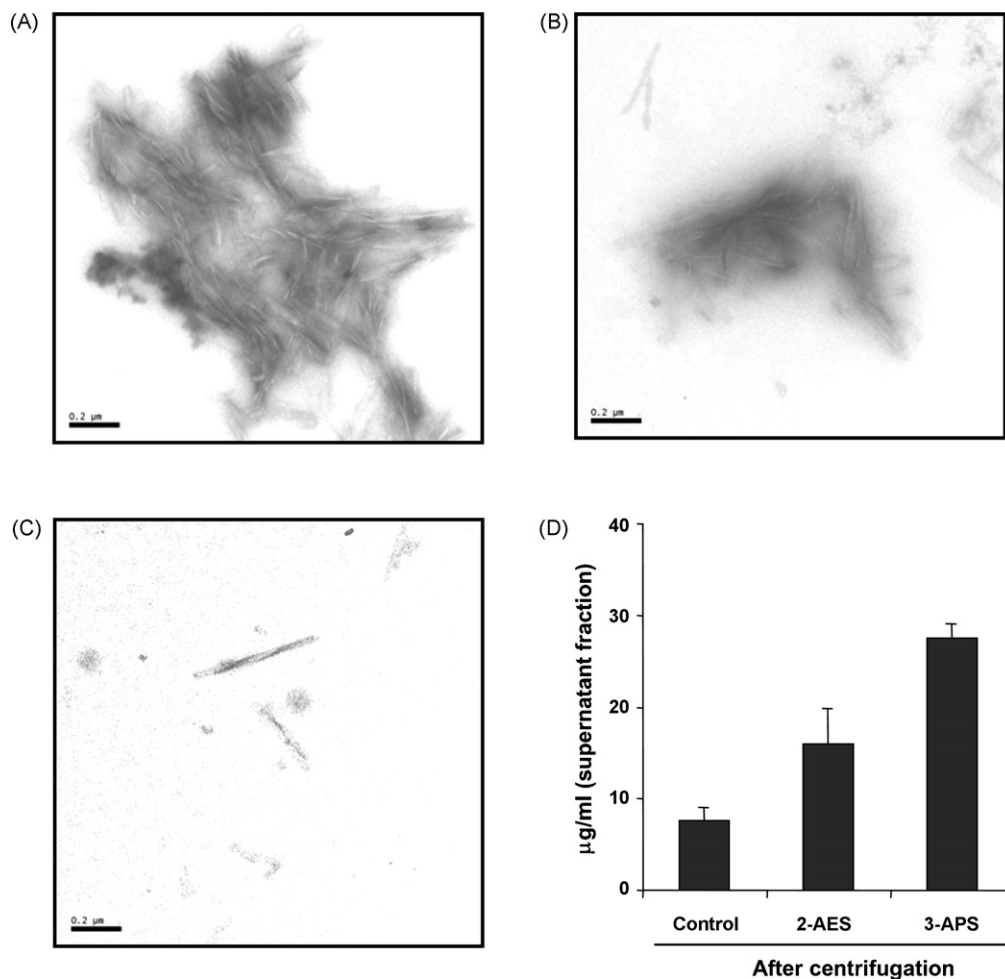


Fig. 2. Effect of taurine on amyloid peptide assembly. (A) Electronmicrograph of beta amyloid aggregates; (B) beta-amyloid aggregates incubated in the presence of 1 mM 2-AES; (C) beta-amyloid aggregates incubated in the presence of 1 mM 3-APS; (D) measurement of the protein remaining in unpolymerized form after incubation of beta amyloid peptide to aggregate. The absorbance at 230 nm of a solution of 0.1 mg/ml of beta amyloid peptide was measured (total protein). An absorbance of about 0.5, similar to that of other proteins at the same concentration, was obtained. This protein solution was incubated (48 h at 37 °C) to form aggregates in the absence (control) or the presence of 1 mM taurine (2-AES) or 3-APS. After the incubation, the mixtures were centrifuged in an Airfuge at  $100,000 \times g$  for 60 min and the protein amount present in the supernatant was measured by absorbance at 230 and 260 nm, and the amount of protein was calculated by  $\mu\text{g/ml} = 183A_{230} - 75.8A_{260}$ , as indicated in Ref. [13].

supernatant fraction. We have previously observed a linear relationship between amount of protein (using serum albumin) and absorbance at 230 and 260 nm, by doing the following calculation:  $\mu\text{g/ml} = 183A_{230} - 75.8A_{260}$  [13]. Fig. 2D shows that in the presence of taurine an increase, compared to the control, of amyloid peptide in unpolymerized form was found, being that increase higher in the presence of 3-APS (used as a positive control) [19].

It has been previously described [8] that 3-APS, but not taurine, prevents the transition to a beta sheet conformation of amyloid peptide. Thus, our results suggest that although taurine does not prevent that conformational change, it slightly interferes with amyloid aggregation.

Taurine is a natural occurring  $\beta$ -aminoacid, that can cross the blood brain barrier, and it is a normal component of the brain [12], although its concentration is decreased in AD patients [4]. Thus, it cannot be ruled out the use of taurine as a possible therapeutic agent to avoid amyloid peptide aggregation.

However, AD is characterized by the presence of two hallmarks; amyloid aggregates (previously commented), and tau aggregates, components of neurofibrillary tangles (NFTs). These NFTs are clusters of filamentous polymers of tau protein,

in phosphorylated form [9]. Since GSK-3 has been described like one of the main tau kinases [5], the effect of taurine on tau modification by GSK-3 was tested in vitro. However, no differences in tau phosphorylation were observed in the presence or absence of taurine (data not shown). When, the effect of taurine on tau aggregation was studied (using recombinant tau protein corresponding to the longest human tau isoform [18]), it was found (Fig. 3), that taurine facilitates that aggregation, since fibrillar tau polymers were observed in the presence of taurine (Fig. 3B), whereas no filaments were observed in the absence of taurine (Fig. 3A). In previous experiments [19], it was described that 3-APS also acts like an inducer for tau assembly. In this way, 3-APS was used as a positive control for tau aggregation (Fig. 3C). A quantitation of the amount of tau polymers was done by looking at a sample of the protein remaining in the supernatant fraction after centrifugation to remove the assembled protein, by using the same criteria, determination of the absorbance at 230 and 260 nm, indicated for amyloid peptide. The analysis was done in the absence or in the presence of taurine (2-AES) or 3-APS. Tau protein, in the absence of any polymerization inducers, remains in unpolymerized form (unlike A $\beta$  peptide). Thus, essentially all the protein remains in the supernatant fraction, whereas a

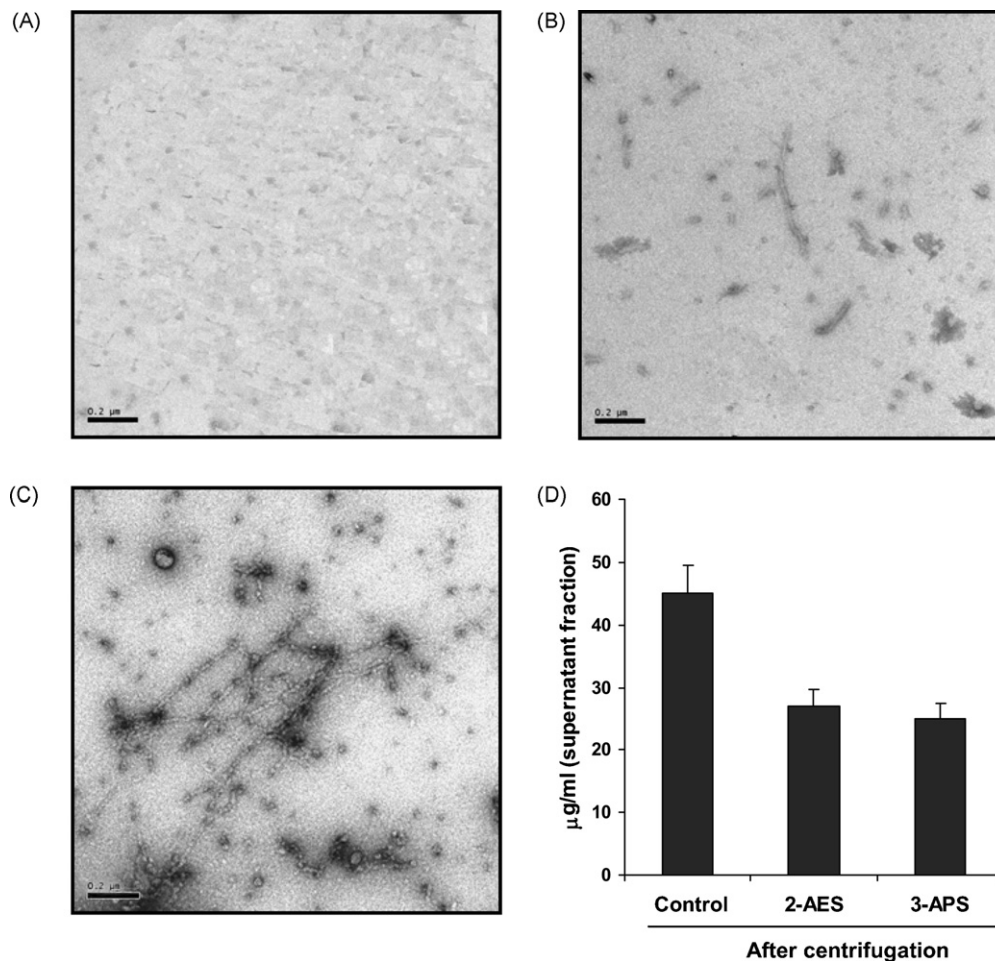


Fig. 3. Taurine as an inducer for tau polymerization. Tau protein was incubated, as indicated [18], in the absence (A), or the presence of 1 mM taurine (B) or 1 mM 3-APS (C). In addition, the amount of tau aggregates in the absence (control), or the presence of taurine (2-AES) or 3-APS, measured as indicated for amyloid peptide aggregation (by testing the amount of protein that remains in non-polymerized form after centrifugation) is shown (D).

decrease in that fraction was found in the presence of taurine (2-AES) or 3-APS. Fig. 3D shows that both, taurine (2-AES) and 3-APS, facilitates tau aggregation in a similar fashion.

Since, those molecules also induce the assembly of a tau protein fragment containing the basic region involved in microtubule binding (not shown), it can be suggested that the negative charge of taurine (or 3-APS) could bind to the residues of that tau peptide, inducing its assembly. In summary, taurine and 3-APS share some common characteristics like prevention of amyloid peptide aggregation (although at different extent), and the formation of tau polymers. In addition, since taurine prevents the neurotoxicity of beta amyloid peptide, this natural  $\beta$ -aminoacid could be a promising molecule for that pathological feature related to Alzheimer disease. However, its effect on tau aggregation deserves a further analysis.

### Acknowledgements

This work was supported by grants from Plan Nacional (Ministerio de Educación y Ciencia, Spain), Comunidad de Madrid (NEURODEGMODELS-CM), Fundación Botin, and by an Institucional Grant of Fundación R. Areces. Also, this work is part to our contribution to CIBER Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED) (Ministerio de Sanidad y Consumo).

### References

- [1] P.S. Aisen, D. Saumier, R. Briand, J. Laurin, F. Gervais, P. Tremblay, D. Garceau, A Phase II study targeting amyloid-beta with 3APS in mild-to-moderate Alzheimer disease, *Neurology* 67 (2006) 1757–1763.
- [2] P.S. Aisen, The development of anti-amyloid therapy for Alzheimer's disease: from secretase modulators to polymerisation inhibitors, *CNS Drugs* 19 (2005) 989–996.
- [3] J. Alom, J.N. Mahy, N. Brandi, E. Tolosa, Cerebrospinal fluid taurine in Alzheimer's disease, *Ann. Neurol.* 30 (1991) 735.
- [4] H. Arai, K. Kobayashi, Y. Ichimiya, K. Kosaka, R. Iizuka, A preliminary study of free amino acids in the postmortem temporal cortex from Alzheimer-type dementia patients, *Neurobiol. Aging* 5 (1984) 319–321.
- [5] J. Avila, J.J. Lucas, M. Perez, F. Hernández, Role of tau protein in both physiological and pathological conditions, *Physiol. Rev.* 84 (2004) 361–384.
- [6] L. Bergamaschini, E. Rossi, C. Storini, S. Pizzimenti, M. Distaso, C. Perego, A. De Luigi, C. Vergani, M.G. De Simoni, Peripheral treatment with enoxaparin, a low molecular weight heparin, reduces plaques and beta-amyloid accumulation in a mouse model of Alzheimer's disease, *J. Neurosci.* 24 (2004) 4181–4186.
- [7] N. del Olmo, J. Bustamante, R.M. del Rio, J.M. Solis, Taurine activates GABA(A) but not GABA(B) receptors in rat hippocampal CA1 area, *Brain Res.* 864 (2000) 298–307.
- [8] F. Gervais, J. Paquette, C. Morissette, P. Krzywkowski, M. Yu, M. Azzi, D. Lacombe, X. Kong, A. Aman, J. Laurin, W.A. Szarek, P. Tremblay, Targeting soluble Abeta peptide with Tramiprosate for the treatment of brain amyloidosis, *Neurobiol. Aging* 28 (2007) 537–547.
- [9] I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, Y.C. Tung, M. Quinlan, H.M. Wisniewski, L.I. Binder, Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 4913–4917.
- [10] A. Guidotti, G. Badiani, G. Pepeu, Taurine distribution in cat brain, *J. Neurochem.* 19 (1972) 431–435.
- [11] 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.
- [12] R.J. Huxtable, Taurine in the central nervous system and the mammalian actions of taurine, *Prog. Neurobiol.* 32 (1989) 471–533.
- [13] V.F. Kalb Jr., R.W. Bernlohr, A new spectrophotometric assay for protein in cell extracts, *Anal. Biochem.* 82 (1977) 362–371.
- [14] S.H. Kim, Y.P. Tang, S.S. Sisodia, Abeta star: a light onto synaptic dysfunction? *Nat. Med.* 12 (2006) 760–761 (discussion 761).
- [15] N.W. Kowall, M.F. Beal, Glutamate-, glutaminase-, and taurine-immunoreactive neurons develop neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease, *Ann. Neurol.* 29 (1991) 162–167.
- [16] P.R. Louzada, A.C. Lima, D.L. Mendonca-Silva, F. Noel, F.G. De Mello, S.T. Ferreira, Taurine prevents the neurotoxicity of beta-amyloid and glutamate receptor agonists: activation of GABA receptors and possible implications for Alzheimer's disease and other neurological disorders, *FASEB J.* 18 (2004) 511–518.
- [17] S.J. Patey, The role of heparan sulfate in the generation of Abeta, *Drug News Perspect.* 19 (2006) 411–416.
- [18] M. Perez, J.M. Valpuesta, M. Medina, E. Montejo de Garcini, J. Avila, Polymerization of tau into filaments in the presence of heparin: the minimal sequence required for tau-tau interaction, *J. Neurochem.* 67 (1996) 1183–1190.
- [19] I. Santa-María, F. Hernández, J. del Rio, F. Moreno, J. Avila, Tramiprosate, a drug of potential interest for the treatment of Alzheimer's disease, promotes an abnormal aggregation of tau, *Mol. Neurodegen.* 2 (2007) 17.
- [20] A.D. Snow, R. Sekiguchi, D. Nochlin, P. Fraser, K. Kimata, A. Mizutani, M. Arai, W.A. Schreier, D.G. Morgan, An important role of heparan sulfate proteoglycan (Perlecan) in a model system for the deposition and persistence of fibrillar A beta-amyloid in rat brain, *Neuron* 12 (1994) 219–234.