



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**ESTUDIO SOBRE CAMBIOS BIOQUÍMICOS DE LA PROTEÍNA
TAU QUE CONLLEVAN A LA FORMACIÓN DE LOS FILAMENTOS
HELICOIDALES APAREADOS. IMPLICACIONES PARA LA
DEMENCIA DE ALZHEIMER**

QUE PARA OBTENEREL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

BIOL. OCTAVIO FABIÁN MERCADO GÓMEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ



**COMITÉ TUTORAL:
DR. JESÚS CHIMAL MONROY
DR. JULIO ROQUE MORÁN ANDRADE**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

***"La ciencia puede descubrir lo que es cierto, pero no
lo que es bueno, justo y humano."***

Marcus Jacobson (1930-2001), neurocientífico estadounidense.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de manera muy especial a mi familia, a mis padres el Sr. Evaristo Mercado Cruz y la Sra. Gertrudis Gómez de Mercado, a mis hermanas Laura Angélica Mercado y Aida Bernstein y a mis sobrinos Dan y Laura Fernanda por todo ese cariño y apoyo recibido todo este tiempo, ya que ustedes fueron mi motor para llegar hasta donde estoy, los quiero mucho familia!!!

Agradezco a la Dra. Clorinda Arias Álvarez por haberme recibido en su laboratorio hace 9 años, por el apoyo recibido tanto en lo académico como en los recursos materiales para la realización de este trabajo de tesis doctoral.

A los miembros del comité tutorial, el Dr. Jesús Chimal y Dr. Julio Morán por todas las aportaciones académicas durante los “Tutorales” que tuve en el doctorado.

A mis sinodales, la Dra. Magda Giordano, Dra. Gloria Benítez King, Dra. Lourdes Massieu Trigo y Dr. Raúl Mena por todas sus sugerencias y comentarios que enriquecieron esta tesis doctoral.

A los compañeros del laboratorio tanto del presente: QFB Patricia Ferrera, Ricardo, Karina, Diana, Perla, David, Pamela como del pasado, Brenda, Michael, Rigoberto por aguantarme todos estos años de locura, en especial al “Comandante” Xavier Mungarro y Rosa María Rodríguez por todos esos años de buenos momentos, por las borracheras, los viajes y las aventuras que vivimos.

A mis alumnas Alexa, Susana Gabriela y Paulette por tener la oportunidad de transmitir un poco de mis conocimientos aunque de una manera poco ortodoxa (lo siento por no ser un buen profesor).

A esa grandiosa facultad de donde soy egresado, la triple H. Facultad de Ciencias cuyo lema es “Tierra Libre y Rebelde” por todas esas ideas subversivas y porque tuve la oportunidad de conocer a los que hoy son mi camaradas: Alfredo (alias el Gordo, Marrano, Sexoso), Arturo (alias Mente, Dr. Cerebro), Pavka, Tonatiuh (alias el Dubois), Alejandro (Kalusha), Ángeles, Chucho (Doctor), Roberto (Trompas), Gustavo, Miriam, en fin, a toda la banda borracha de Ciencias donde pasamos buenos momentos.

A mis compas de Biomédicas: a los Rojos: Pablo, Martín, Naum, Brenda, Paola, Vicente, a los Monteros: Víctor, Luis, Javier, a los Espinoza, Ana, Conny, Sandra, a los Chimal, René (alias el Metal), Marcia, Carlos, Rodrigo, Hindira, en fin a toda esa pandilla que conocí durante mi estancia en ese instituto.

A mis comaradas del Instituto de Fisiología Celular, los Drs. Alberto Camacho y Juan Carlos Corona, Ana Estrada, a la Biol. Tere Montiel, Blanca, Luis, Ilse, Alicia por todos esos buenos momentos.

A mi jefa y amigos de la Facultad de Medicina: Dra. Rosalinda Guzmán por darme trabajo, a Vicky, Carmen, Adriana, Carlos, Elena, Enrique, Ximena, Xochil, otra vez el Alfredo, Rebeca, a las Anas, a don Robert y don Humbert, a todos gracias por su apoyo y amistad.

A un amigo de la secundaria, Javier que ya es todo un padre de familia.

Y sobre todo gracias a ese equipo de futbol, los gloriosos campeones Pumas de la Universidad Nacional Autónoma de México por esas alegrías y tristezas. Pumas hasta la Muerte. “El día que yo me muera yo quiero mi cajón, pintado Azul y Oro, como mi corazón”. México PUMAS, Universidad “Gooya Gooya, Cachún Cachún ra ra, Cachún Cachún ra ra, Gooya Universidad Pública y Gratuita”

ÍNDICE

I. ABREVIATURAS	1
II. RESUMEN	2
III. ABSTRACT	3
IV. INTRODUCCIÓN	4
La enfermedad de Alzheimer.....	4
El citoesqueleto neuronal.....	5
Microtúbulos.....	6
<i>Nucleación de los microtúbulos</i>	7
<i>Dinámica de los microtúbulos</i>	7
<i>Drogas que alteran la dinámica de los microtúbulos</i>	8
<i>Drogas que inhiben el ensamble de los MTs</i>	8
<i>Drogas que promueven la polimerización y estabilización de los MTs</i>	9
<i>Estructura de la tubulina</i>	11
Proteínas Asociadas a Microtúbulos (MAPs).....	13
MAP2.....	13
Tau.....	16
<i>Modificaciones post-traduccionales de la proteína tau</i>	19
<i>Glicosilación</i>	20
<i>Fosforilación</i>	20
<i>Cambios conformacionales</i>	22
<i>Truncación</i>	23
<i>Distribución celular</i>	23

Alteraciones del citoesqueleto en la enfermedad de Alzheimer.....	24
Estructura de los filamentos helicoidales apareados y mecanismos de ensamble..	28
Vías de señalización involucradas en la enfermedad de Alzheimer.....	31
<i>Función de la vía de señalización Wnt.....</i>	<i>31</i>
<i>Relación de Wnt con diferentes patologías.....</i>	<i>33</i>
<i>Función de la vía de señalización de la cinasa de fosfatidilinositol 3 (PI3K/Akt).....</i>	<i>34</i>
<i>Relación de PI3K/Akt con la enfermedad de Alzheimer.....</i>	<i>36</i>
V. HIPOTÉISIS.....	37
VI. OBJETIVO GENERAL.....	37
VII. OBJETIVOS PARTICULARES.....	38
VIII. MATERIAL Y MÉTODOS.....	38
<i>Preparación de los fármacos.....</i>	<i>38</i>
<i>Inyecciones estereotáxicas.....</i>	<i>38</i>
<i>Cultivos primarios.....</i>	<i>39</i>
<i>Rebanadas de hipocampo metabólicamente activas.....</i>	<i>39</i>
<i>Inmunohistoquímica e inmunocitoquímica.....</i>	<i>40</i>
<i>Electrotransferencia.....</i>	<i>40</i>
<i>Morfología nuclear.....</i>	<i>41</i>
<i>Microscopia electrónica.....</i>	<i>41</i>
<i>Estadística.....</i>	<i>42</i>
IX. RESULTADOS.....	42
<i>Efectos neurotóxicos del Taxol en la región de CA1 del hipocampo.....</i>	<i>42</i>
<i>Efectos del Taxol en la ultraestructura celular.....</i>	<i>46</i>

<i>Efectos del Taxol sobre proteínas del citoesqueleto.....</i>	<i>47</i>
<i>Activación de GSK-3β mediante la inhibición de Wnt y PI3K/Akt y su relación con la fosforilación de la proteína tau en cultivos corticales primarios.....</i>	<i>52</i>
<i>La activación de GSK-3β mediante la inhibición de Wnt incrementa la fosforilación de la proteína tau en rebanadas de hipocampo metabólicamente activas.....</i>	<i>56</i>
<i>La inhibición de las vías Wnt y PI3K/Akt induce cambios morfológicos y aumento en la inmunoreactividad de PHF-1 en cultivos corticales primarios.....</i>	<i>57</i>
X. DISCUSIÓN.....	61
XI. CONCLUSIONES.....	70
XII. BIBLIOGRAFÍA.....	70
XIII. APÉNDICE.....	95

- ❖ Mercado-Gómez O, Ferrera P, Arias C. 2004. Histopathologic changes induced by the microtubule-stabilizing agent Taxol in the rat hippocampus in vivo. *Journal of Neuroscience Research* 78(4):553-562.
- ❖ Mercado-Gómez O, Hernández-Fonseca K, Villavicencio-Queijeiro A, Massieu L, Chimal-Monroy J, Arias C. 2008. Inhibition of Wnt and PI3K signaling modulates GSK-3 β activity and induces morphological changes in cortical neurons: role of tau phosphorylation. *Neurochemical Research* 33(8):1599-1609.

I. ABREVIATURAS

ADP: Difosfato de adenosina
ATP: Trifosfato de adenosina
APC: Proteína supresora de tumores de pólipos adenomatosos de colon
ARNm: Mensajero de ácido ribonucleico
 β A: Péptido beta amiloide
CA1: Cornus Ammonis 1
CA3: Cornus Ammonis 3
DAPI: 4,6-Diamino-2-fenilindol diclorhidrato
Dkk-1: Proteína Dickkopf-1
DMSO: Dimetil sulfóxido
Dsh: Dishevelled
Dvl: Homólogo de Dishevelled
EA: Enfermedad de Alzheimer
FHA: Filamentos helicodales apareados
GAGs: Glicosaminoglicanos
GFAP: Proteína ácida fibrilar de glia
GDP: Difosfato de guanosina
GTP: Trifosfato de guanosina
GSK-3 β : Cinasa sintasa de glucógeno 3 beta
 γ -TuRC: complejo circular que contiene gama-tubulina
IGF: Factor de crecimiento semejante a insulina
i.p: Intra peritoneal
LRP5/6: Proteínas relacionadas con el receptor de lipoproteína de baja densidad
MT: Microtúbulo
MTs: Microtúbulos
MAPs: Proteínas asociadas a microtúbulos
MAP2: Proteína asociada a microtúbulos 2
MNF: Marañas neurofibrilares
MTOCS: Centro de organización de los microtúbulos
nmolas: Nanomolas
PDK: Cinasa dependiente de fosfoinositidos
PI3K: Cinasa de fosfatidilinositol 3
PKB: Proteína cinasa B
PIP₂: Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato
PIP₃: Fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato
PP1: Proteína fosfatasa 1
PP2A: Proteína fosfatasa 2 A
PP2B: Proteína fosfatasa 2 B
RAPG: Receptores acoplados a proteínas G
RTC: Receptor tirosina cinasa
sFRP: Proteínas solubles relacionadas con Frizzled
SNC: Sistema nervioso central
Wnt: Proteínas wingless

II. RESUMEN

En el sistema nervioso central (SNC), los microtúbulos participan en diversas funciones vitales de la neurona. En la enfermedad de Alzheimer (EA), la acumulación de formas hiperfosforiladas de la proteína asociada a microtúbulos tau, constituye las llamadas marañas neurofibrilares. Poco se sabe de las anormalidades neuronales que inducen cambios en la proteína tau y la consecuente desestabilización de los microtúbulos (MTs), lo que impide el transporte axonal y lleva a la muerte celular. En función de lo anterior, en el presente trabajo estudiamos 1) los efectos *in vivo* de un droga estabilizadora de los microtúbulos (Taxol), sobre su efecto en los microtúbulos y sus proteínas asociadas tau y MAP2 y en elementos de citoesqueleto no neuronales (GFAP), y 2) si alteraciones en vías de señalización como Wnt y PI3K/Akt podrían inducir cambios en el estado de fosforilación de la proteína tau mediados por la cinasa sintasa de glucógeno (GSK-3 β), en modelos *in vitro*. En la primera parte, se utilizaron ratas Wistar de 250 g en el cual, se inyectaron con una dosis de 25, 50 y 100 nmolas de Taxol. Después de 3, 12, 24 h y 7 días, posteriores a la inyección, los animales se sacrificaron para el análisis histológico e inmunohistoquímico de las proteínas tau, MAP2 y GFAP. Nuestros resultados demuestran que el Taxol indujo daño neuronal en la región de CA1 del hipocampo de manera dosis dependiente que correlaciona con un aumento en la inmunoreactividad de tau y MAP2. Asimismo, se observó un aumento en la inmunoreactividad del anticuerpo pair helical filaments 1 (PHF-1), contra tau fosforilada y un aumento en la muerte celular probablemente de tipo apoptótica con alteraciones ultraestructurales en los MTs y mitocondrias en hipocampos de ratas inyectados con Taxol. En la segunda parte, se utilizaron cultivos corticales primarios, los cuales fueron tratados con diferentes moduladores negativos e inhibidor de las vías de señalización Wnt y PI3K/Akt (sFRP2/3, Dkk1 y wortmanina respectivamente). Los resultados de la segunda parte, mostraron un aumento en el contenido de proteína tau fosforilada en el epítipo del anticuerpo PHF-1 (Ser^{396/404}) en cultivos corticales expuestos con los diferentes inhibidores por 24 h. Concomitante a este incremento en la fosforilación de tau, se observó una sobre activación de la GSK-3 β medido por una reducción en la inmunoreactividad de la p-Ser⁹ indicativo de la activación de la enzima. Estos cambios en la fosforilación de tau fueron revertidos por el cloruro de litio, un inhibidor de GSK-3 β co-incubado con los inhibidores de Wnt y PI3K/Akt. Además, este incremento en la fosforilación se observó en rebandas metabólicamente activas junto con una ligera reducción en la inmunoreactividad de Tau-1. Por otra parte, se observaron posibles cambios del citoesqueleto, en los cuales consistieron en

acumulaciones de α -tubulina cerca del soma, junto con acumulación de proteína tau fosforilada en neuritas.

III. ABSTRACT

Microtubules and their associated proteins (MAPs), play an important role in neuronal physiology. In Alzheimer disease (AD), accumulation of hyperphosphorylated forms of tau constitutes the intracellular neurofibrillary tangles, one of the neuropathological hallmarks of this devastating disease. It remains unknown the neuronal abnormalities which induce biochemical alterations in tau, which in turn, produce MTs destabilization, loss of axonal transport and eventually neuronal death. In the present work, we studied the effects of Taxol a MTs stabilizing drug, on neuronal morphology and cell viability as well as the changes in several cytoskeletal proteins such as tau, MAP2 and GFAP in the rat hippocampus *in vivo*. We also analyzed the signaling transduction pathways that may be associated with alterations in tau phosphorylation, particularly the canonical Wnt and PI3K signaling pathways through regulation of GSK-3 β activity. Our results showed that Taxol induces dose-dependent neuronal death (100 nmoles) accompanied by loss of MAP2 protein and the presence of dystrophic neurites. Interestingly, PHF-1 immunoreactivity was present in the damaged hippocampus. Furthermore, we observed alteration in MTs and mitochondria morphology after Taxol injection.

On the other hand, we have analyzed the effects of different negative modulators of two signaling pathways that regulate GSK-3 β activation and their effects in tau protein phosphorylation. Cortical cell cultures were incubated with either Wnt or PI3K/Akt signaling pathways negative modulators (sFRP2/3, Dkk1, wortmannin) for 24 h. Our results showed an increased PHF-1 (Ser^{396/404}) immunoreactivity after treatment. Concomitantly to this increase in tau phosphorylation, we observed decreased p-Ser⁹ immunoreactivity, indicating GSK-3 β activation. Interestingly, lithium chloride reverted both increased tau phosphorylation and p-Ser⁹ decreased immunoreactivity. Moreover, an increased tau phosphorylation was also observed in metabolically active rat brain slices together with a slight decrease in Tau-1 immunoreactivity. Furthermore, we observed cytoskeletal alterations with both Wnt and PI3K/Akt inhibitors plus an accumulation phosphorylated tau protein in the neurites.

IV. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer.

Con el progreso de la ciencia y la tecnología, se ha podido aumentar la expectativa de vida durante el siglo XXI (de 49 a más de 76 años) en los países industrializados, generando que el número de individuos se aproximen a una edad crítica en donde los desórdenes neurodegenerativos llegan a ser comunes.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más común de demencia en adultos mayores de 65 años. Su incidencia (el número de nuevos “casos” en un periodo de tiempo) y prevalencia (proporción de individuos de una población que presentan el evento en un período de tiempo determinado), aumenta a partir de los 65 años de edad. La incidencia se encuentra entre el 1% (65 a 70 años de edad) y 4% (a partir de los 85 años) al año. Aunque la prevalencia de la EA ha sido motivo de discusión (Corrada y cols., 1995), la mayoría de los estudios han encontrado que la prevalencia se duplica con cada aumento de entre 4 y 5 años (Jorm y Jolley, 1998). En México la prevalencia difiere según los distintos grupos que han estudiado dicha demencia. Por ejemplo el estudio DSM-IV implementado por la asociación psiquiátrica americana (American Psychiatric Association) obtuvo resultados de 3.2 y 2.4 % en áreas urbanas y rurales, respectivamente. Sin embargo, el grupo 10/66 obtuvo cifras que oscilan de 7.4 y 7.3 en áreas urbanas y rurales, sugiriendo que existe una alta tasa de prevalencia de la EA en países en vías de desarrollo (Libre-Rodriguez y cols., 2008).

En la EA existe una importante pérdida neuronal y sináptica. La neuropatología se caracteriza por la presencia de marañas neurofibrilares (MNF), y de placas neuríticas, en cerebros de pacientes afectados por esta enfermedad. Las placas neuríticas son agregados extracelulares compuestas principalmente de un núcleo o “core” de un péptido de 4 kDa denominado, β amiloide (β A), en forma fibrilar, asociado a su vez, por astrocitos reactivos, células de la microglia y neuritas distróficas cuyas anomalías estructurales incluyen lisosomas alargados, numerosas mitocondrias y filamentos helicoidales apareados (Selkoe 2000, Selkoe, 2001). Las MNF son cúmulos citoplasmáticos de filamentos helicoidales apareados (FHA), compuestos de proteína tau con diferentes modificaciones post-traduccionales (fosforilación, cambios conformacionales, truncación, etc), cuya acumulación se presenta en etapas iniciales de la enfermedad (Vincent y cols., 1998; Wischik y cols., 1988; Brandt, 2001; Gamblin y cols., 2003; Iqbal y Grundke-Iqbal, 2006).

El Citoesqueleto neuronal.

El citoesqueleto juega un papel muy importante en cada proceso biológico dentro de la célula eucarionte, desde la división celular y la motilidad hasta el tráfico intracelular de organelos. Esta red está compuesta por tres tipos de filamentos proteínicos (microfilamentos, microtúbulos y filamentos intermedios), cada uno de los cuales, posee propiedades bioquímicas y biofísicas únicas. El remodelamiento de esos filamentos por múltiples señales intrínsecas y extrínsecas, le confiere al citoesqueleto la propiedad de controlar las diversas formas de la célula y modificar su comportamiento dinámico (Dillon y Goda, 2005), (Fig. 1).

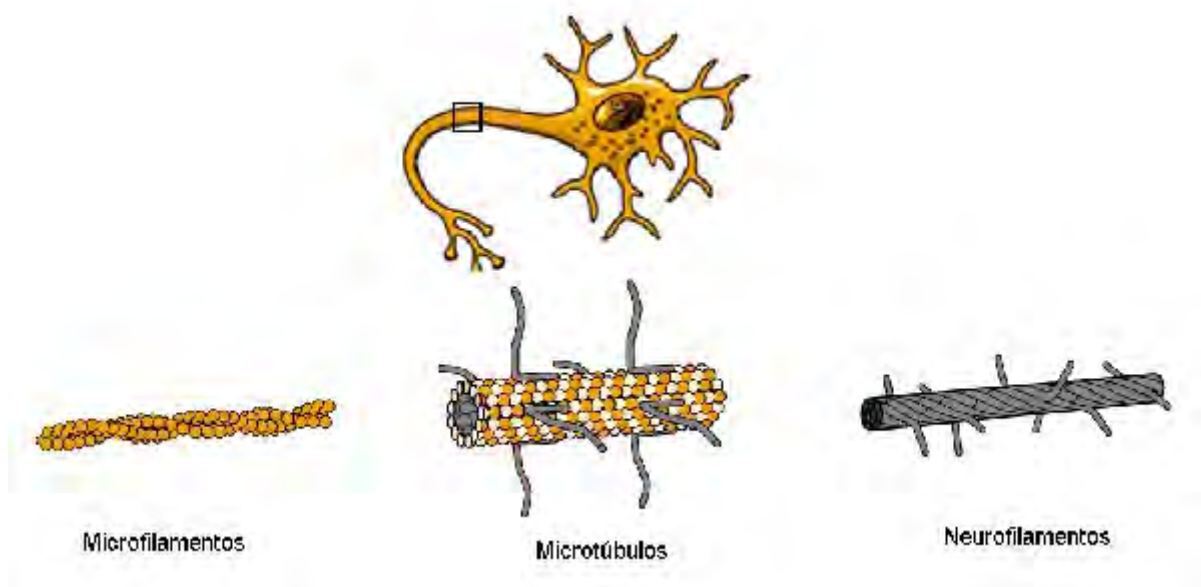


Figura 1. Esquema que representa los diferentes componentes del citoesqueleto neuronal. El arreglo y distribución de los microtúbulos, neurofilamentos y microfilamentos de actina le confieren estabilidad y soporte para el mantenimiento de la citoarquitectura neuronal. (Modificada de Alberts, 2000).

En las células neuronales, el citoesqueleto juega un papel importante en la formación del axón y las dendritas. Los filamentos de actina determinan la forma de la superficie celular y son necesarios para la locomoción. Estos microfilamentos están formados por monómeros de 43 kDa, los cuales espacialmente se presentan en una disposición de dos hebras de retorcidas entre sí, cuyo diámetro oscila entre 4 y 6 nanómetros (Theriot, 1994). En sistema nervioso central (SNC), se presenta una mezcla de isotipos de β - y γ -actina. Por otro lado, los filamentos intermedios proporcionan fuerza mecánica y ayudan al mantenimiento de la morfología celular. Los neurofilamentos y otras proteínas que pertenecen al grupo de los filamentos intermedios tales como la periferina y la α -internexina, están presentes en todo el proceso de axogénesis en

mamíferos. Una función ampliamente descrita de los neurofilamentos es su papel en el control del crecimiento del calibre de los axones mielinizados, una importante característica que gobierna señales de velocidad de conducción (Julien, 1999). Las tres subunidades de neurofilamentos denominadas neurofilamentos de cadena ligera (NF-L, 61 kDa), de cadena mediana (NF-M, 90 kDa), y de cadena pesada (NF-H, 115 kDa), junto con la nestina, α -internexina, syncoilina y sinemina, forman la cuarta clase de filamentos intermedios (Oshima, 2007).

Microtúbulos.

Los microtúbulos (MTs) son componentes esenciales del citoesqueleto de las células eucariontes. En las células nerviosas, tienen una gran importancia en la formación de axones y dendritas, en el transporte axonal, plasticidad y muerte celular (Sánchez, y cols., 2001). Muchas de esas funciones están asociadas con una reestructuración dinámica del citoesqueleto, como por ejemplo el alargamiento y acortamiento de MTs individuales, formación de mallas de MTs dentro de la célula, o aún el completo desensamble y reconstrucción de arreglos de los MTs (inestabilidad dinámica). En todas esas actividades, los MTs interactúan con una serie de proteínas y ligandos que se mueven a través de ellos, estabilizando o desestabilizando y regulando procesos dinámicos de diferentes maneras de acuerdo al tipo celular y más aún, dentro de un tiempo determinado del ciclo celular. Algunos ejemplos de estas proteínas son las pertenecientes a la familia de las proteínas asociadas a microtúbulos o MAPs que han sido objeto de gran interés, ya que su principal función es promover la polimerización con una subsecuente estabilización de los MTs (Lee, 1990). Otro ejemplo de las interacciones entre MTs y proteínas se refiere a una familia de motores moleculares llamadas cinesinas y dineínas que están involucradas en el transporte de elementos del citoesqueleto (proteínas del bajo peso molecular, vesículas y organelos subcelulares, etc). En virtud de una intensa investigación, el conocimiento de ambas familias de proteínas ha ido creciendo hasta permitir entender con mayor detalle su función e interacción con los MT (Hirokawa y cols., 1998).

Nucleación de los microtúbulos.

Un fenómeno crucial para el comportamiento dinámico y la propia función de los MT, es la nucleación de los mismos en la célula a partir de los centros organizadores de los MT (MTOCs). Se sabe que en la nucleación la γ -tubulina juega un papel muy importante ya que de acuerdo con estudios de microscopía electrónica, se ha mostrado que la γ -tubulina forma estructuras en anillo que sirven como templado para

el crecimiento de los MTs (Moritz y cols., 1995). La evidencia directa del papel de la γ -tubulina en la nucleación, ha sido demostrada en estudios *in vitro* usando complejos circulares que contiene γ -tubulina (γ -TuRC), (Zheng y cols., 1995). Se han descrito dos modelos para explicar la nucleación de la tubulina. El primero se basa en la forma y el tamaño del γ -TuRC, en el cual, el anillo forma la primera vuelta para el crecimiento del MT sirviendo como templado para las interacciones longitudinales con los dímeros α/β -tubulina. El segundo es el modelo lateral, donde la γ -tubulina forma una estructura semejante a un protofilamento por auto-asociación longitudinal y este sirve como templado para las interacciones laterales con los protofilamentos de α/β -tubulina (Nogales, 2000).

Dinámica de los microtúbulos.

El extremo positivo del MT que termina con β -tubulina es más dinámico que el extremo negativo libre. El ensamble y desensamble puede ocurrir en ambos extremos, pero es más rápido en el extremo positivo. Los MT pueden continuar creciendo mientras la concentración libre de tubulina sea mayor que el nivel crítico. Aún cuando la concentración de tubulina esté arriba que el nivel crítico, puede observarse que los MT pueden de manera repentina detener su crecimiento y encogerse rápidamente (Amos y Schlieper, 2005). Este comportamiento es un proceso estocástico, ya que MT individuales se retraen de manera rápida mientras que otros aún crecen. El cambio del crecimiento al encogimiento se le ha denominado “catástrofe”. Después de un tiempo, el encogimiento del MT puede pausarse y empezar a crecer de nuevo, este proceso se le conoce como “rescate” y en su conjunto es conocida como inestabilidad dinámica (Desai y Mitchinson, 1999).

Otra manera de regular este dinamismo en la organización espacial del sistema de los MTs, es mediante proteínas accesorias denominadas proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs), regulándose por medio de la fosforilación. En todos los casos las formas más fosforiladas inhiben su habilidad de unirse y por ende de estabilizar a los MTs (Trinczek y cols., 1995). La unión de las MAPs a los MTs es a través de interacciones electrostáticas, involucrando los dominios ácidos C-terminal cargados negativamente en ambos monómeros y a las cargas positivas de las MAPs (Rodionov y cols., 1990).

Drogas que alteran la dinámica de los microtúbulos.

En años recientes, se han descubierto un numeroso grupo de ligandos de tubulina con propiedades antimetabólicas y con potencial anticarcinógeno, debido a su acción de alterar la dinámica de los MTs, estos suelen ser utilizados como herramientas para entender dicho dinamismo y más aún, para conocer procesos celulares en los cuales

los MTs son dispensables. Funcionalmente hablando, estos ligandos antimitóticos pueden ser divididos en dos grupos: 1) los que inhiben el ensamble de los MTs (colchicina o vinblastina), y 2) los que promueven su ensamble y estabilización (miembros de la familia del Taxol). No obstante estas diferencias, la principal acción de estos agentes es alterar el proceso mitótico mediante la inhibición de la inestabilidad dinámica de los MT a bajas concentraciones (Nogales, 2000).

Drogas que inhiben el ensamble de los MTs.

En el caso de los agentes que inhiben el ensamble de los MT, la colchicina fue la primera droga que se conoció que ejercía este tipo de acción. La colchicina inhibe la formación de los MTs y en concentraciones altas, los despolimeriza. Evidencia experimental indica que la colchicina interactúa con ambos monómeros de tubulina apuntando que el posible sitio de unión se encuentra entre la interfase del monómero-monómero del dímero (Uppuluri y cols., 1993; Downing y Nogales, 1998). De esta manera, se sugiere que la colchicina induce cambios conformacionales lo que explica su mecanismo de acción, ya que al unirse su sitio, causa distorsión en la estructura del dímero inhibiendo la polimerización (Nogales, 2000; Downing, 2000).

Por otra parte, la vinblastina como la colchicina, detiene la inestabilidad dinámica a concentraciones bajas, más que romper a los MT (Wilson y cols., 1999). Sin embargo, a altas concentraciones, sí puede romperlos. Su sitio de unión se ha caracterizado y comprende los residuos 177-215 del monómero β -tubulina (Rai y Wolf, 1996). Este sitio de unión se encuentra en una pequeña región en la superficie del dímero y está expuesto al extremo positivo del MT lo que indica que el mecanismo de acción es que al unirse a su sitio, inhibe la elongación del protofilamento evitando de esta manera, la polimerización (Nogales, 2000).

Drogas que promueven la polimerización y estabilización de los MTs.

El Paclitaxel (Taxol), ha sido utilizado como una droga antimitótica contra una amplia gama de tumores, en los que destaca el cáncer de mama, ovario, pulmón y cuello. Es un miembro de la clase de los taxanos diterpenoides de los que en la actualidad hay más de 300 miembros descritos (Fig. 2 A).

El efecto que produce esta droga es promover la polimerización y excesiva estabilización de los MTs (Schiff y Horwitz, 1980), lo que resulta en un huso mitótico no funcional, y una acumulación de paquetes o "haces" de MTs en el soma, y de esta manera evita la división de las células tumorales (Rowinsky y Donehower, 1995). El Taxol preferentemente se une a los MTs, más que a los dímeros de tubulina, en sitios distintos a otras drogas antimitóticas como la colchicina y la vinblastina (Sackett y

Fojo, 1997). Los modelos cristalográficos de la tubulina, muestran un sitio de unión por heterodímero afectando la interacción entre los protofilamentos (Nogales, 1999), (Fig. 2 B).

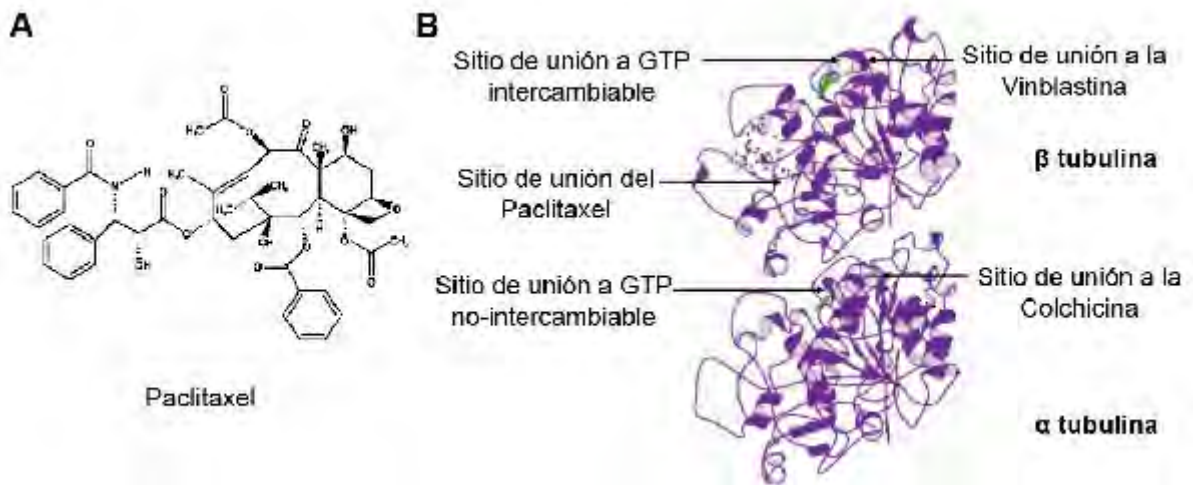


Figura 2. Modelo esquemático donde se representa la estructura química del paclitaxel (Taxol), y de los sitios de unión de algunas drogas al MT. El sitio de unión de la colchicina se encuentra entre la interfase del dímero, mientras que el sitio de unión al Taxol se encuentra en el dominio central del monómero β tubulina. El sitio del alcaloide vinca se encuentra en el extremo positivo del MT. También se puede observar los sitios intercambiables y no intercambiables de GTP en los monómeros de tubulina (Modificado de Singh y cols., 2008)

La desventaja principal de esta droga en la quimioterapia es que causa toxicidad en pacientes, dando como consecuencia la neuropatía periférica (Lipton y cols., 1989) y en algunos casos encefalopatías (Nieto y cols., 1999). Aún cuando múltiples causas pueden explicar la neuropatía inducida por Taxol, se ha sugerido que el tratamiento con este agente puede interferir con el transporte axonal, lo que alteraría el transporte y liberación de neurotransmisores y/o neuropéptidos causando la neuropatía (Boer y cols., 1995).

El mecanismo citotóxico inducido por Taxol da como resultado la apoptosis, ya que al actuar directamente en los MTs, origina una detención de la mitosis, cuya consecuencia desencadena la muerte en células somáticas y transformadas por medio de la hiperfosforilación de Bcl-2 (proteína anti-apoptótica). Al ser fosforilada en los residuos Ser 70 y Ser 87, Bcl-2 es incapaz de unirse a proteína pro-apoptótica Bax y formar complejos entre ambas proteínas (heterodímeros), resultando en un incremento de Bax libre, una situación que favorece a este tipo de muerte celular (Haldar y cols., 1996; Jordan y Wilson, 1998).

En los últimos años, se ha estudiado el efecto del Taxol sobre el citoesqueleto en células neuronales. Nuydens y cols., (2000), demostraron en células PC12 diferenciadas, una clara retracción en la longitud de las neuritas, y un incremento en la acetilación de la α tubulina modificación post-traducciona que le confiere a los MTs su estabilidad; asimismo, observaron un incremento en la muerte celular y la fragmentación nuclear, la cual se reduce por sobre expresión de Bcl-2 (Nuydens y cols., 2000).

Existen reportes sobre los efectos deletéreos del Taxol sobre el transporte axonal en células ganglionares dorsales de embriones de pollo en cultivo (Theiss y Meller, 2000). Asimismo, reduce dramáticamente el transporte axonal retrógrado al inyectarse en el nervio facial de ratones (Nennesmo y Reinholdt, 1988). En estos estudios se reportan severas alteraciones en la morfología celular, formándose paquetes de MTs descritos también en otros sistemas celulares (Schiff y Horwitz, 1980) y las alteraciones de la distribución de las MAPs, las cuales se concentran en los somas neuronales (MAP2 y tau). Lo anterior indica daño al transporte de las MAPs por alteraciones al sistema de MTs (Theiss y Meller, 2000).

Por otra lado, se ha sugerido que las alteraciones que induce el Taxol en la dinámica de los MTs es suficiente para inducir muerte neuronal (apoptosis), e independiente de sus efectos sobre el ciclo celular en neuronas post-mitóticas (cultivos primarios corticales), a través de la activación de la vía de la cinasa N-terminal de c-jun (JNK) y/o por una inhibición de la vía de supervivencia mediada por la cinasa fosfatidilinositol 3 (PI3K/Akt), (Figueroa-Masot y cols., 2001).

Dado lo anterior, los resultados obtenidos en estos reportes demuestran los efectos tóxicos del Taxol en sistemas celulares *in vitro*. Todos estos datos apuntan, a que la toxicidad inducida por Taxol puede ser un modelo útil de neurodegeneración, ya que está caracterizada por un gran daño al citoesqueleto, fallas en el transporte axonal y apoptosis.

Estructura de la tubulina.

Los MTs están formados por la asociación de protofilamentos que a su vez, están formados por subunidades de tubulina. Estas subunidades de tubulina son heterodímeros de dos proteínas globulares llamadas α y β tubulina, fuertemente unidos entre si por enlaces no covalentes (Alberts y cols., 2002). Cada monómero de tubulina une a un nucleótido de guanina. En el dímero de tubulina, la α -tubulina está siempre unida a un trifosfato de guanosina (GTP), en un sitio no intercambiable llamado el sitio-N, mientras que el nucleótido asociado a la β -tubulina se encuentra en

el sitio-E, ya que este último puede ser intercambiado libremente (GDP por GTP). La tubulina unida a GTP es indispensable para el ensamblaje, y la hidrólisis del GTP normalmente ocurre durante la polimerización, así que el cuerpo del MT contiene tubulina unida a GDP. En condiciones experimentales, los MTs que contienen análogos no hidrolizables de GTP son sumamente estables, sin embargo, en condiciones fisiológicas están unidos con GDP y estos últimos son inestables. Acorde con este modelo, para explicar la estabilidad en ausencia de ligandos estabilizadores endógenos, se ha propuesto que en los extremos mayor y menor, se encuentra un capuchón de dímeros con GTP aún no hidrolizados que proporcionan estabilidad al microtúbulo evitando de este modo la despolimerización (Downing, 2000), (Fig. 3 A). Cada monómero de tubulina (α y β), contiene 450 aminoácidos y entre ambos comparten una secuencia de 40 % de similitud dando un peso molecular cercano a 50 kDa (Burns, 1991).

La estructura en general de la tubulina puede ser dividida en tres dominios. El dominio amino terminal (N-terminal), comprende los aminoácidos 1-206, forman el dominio de unión a nucleótidos. Este segmento contiene un arreglo alternante de hebras β -paralelas y α -hélices formando un dominio de Rossmann del cual pueden existir variantes en proteínas de unión a nucleótidos (Nogales, 2000).

La parte media de la secuencia de tubulina o dominio central, comprende los residuos 207-384, la cual no muestra casi ninguna secuencia de similitud con otras proteínas. Este dominio está involucrado en contactos laterales. De manera importante, el asa entre las hebras 9 y 10 incluye un inserción de 8 aminoácidos dentro de la subunidad α -tubulina y en donde en la subunidad β -tubulina se une el Taxol, droga ampliamente utilizada en la quimioterapia contra una gran cantidad de neoplasias y cuyo efecto es la estabilización de los microtúbulos (Nogales, 2000).

El tercer dominio está conformado por dos hélices, el asa que las conecta y los residuos del carboxilo terminal (C-terminal). Este dominio está formado por las hélices 11 y 12, las cuales permanecen en la superficie de la molécula, la cual corresponde a la superficie externa del MT. El asa que conecta ambas hélices es importante para la interacción con el monómero siguiente a lo largo del protofilamento. Este segmento está probablemente involucrado en la unión de las proteínas asociadas a microtúbulos y a los motores moleculares (Nogales y cols., 1999).

La asociación de los protofilamentos se dispone en paralelo formando la pared cilíndrica del MT. Así, las interacciones longitudinales entre los dímeros de tubulina a lo largo de los protofilamentos son constantes en todos los polímeros. Los contactos laterales son formados por protofilamentos vecinos, en especial entre monómeros del mismo tipo (α - α y β - β) (Nogales, 2000). El número de protofilamentos en un MT puede

variar de 9 a 16 (Chrétien y Wade, 1991), lo que sugiere que hay un alto grado de flexibilidad en la asociación lateral entre protofilamentos y aún dentro de los MTs. Ya que todos los protofilamentos en un MT están dispuestos en paralelo, éstos tienen distinta polaridad. Las propiedades de los extremos positivo y negativo (*plus end*, *minus end*), difieren de muchas maneras y son importantes para su función. (Fig. 3 B).

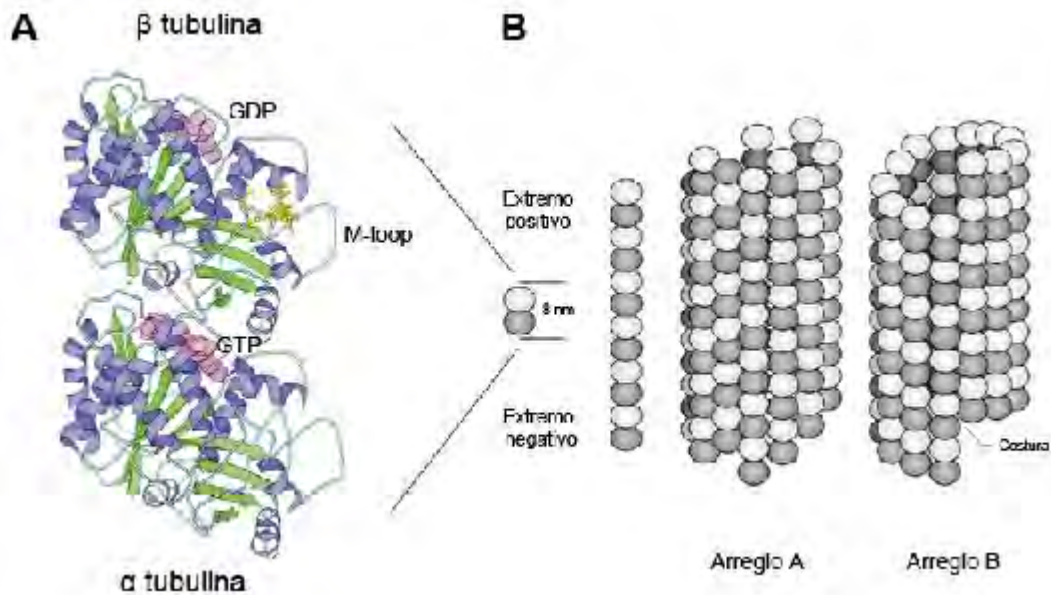


Figura 3. Modelo esquemático de la estructura tridimensional del microtúbulo (A). Los microtúbulos son polímeros formados por dímeros de α y β tubulina que se asocian linealmente dando lugar a los protofilamentos (B); éstos a su vez, se asocian lateralmente para formar a los microtúbulos y la cantidad varía de 9 a 16 en condiciones *in vitro* y 13 *in vivo*. En A se muestra la estructura tridimensional del dímero de tubulina (Modificado de Amos, 2001)

Proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs).

Como se mencionó anteriormente, la actividad dinámica de los MTs es regulada por una serie de proteínas llamadas MAPs, cuya función es promover la polimerización y estabilización a los mismos. Entre algunos ejemplos de MAPs se encuentran: MAP4, localizada en células somáticas; MAP1 A y MAP1 B, cuya localización es axonal (MAP1 A en axones maduros, mientras que MAP1 B se presenta en etapas tempranas del desarrollo), MAP2 que se encuentra en dendritas; y por último tau, que se localiza principalmente en axones. Esta última recibe especial atención, ya que se encuentra alterada dentro de la patología de Alzheimer, formando agregados intracelulares (marañas neurofibrilares) y llegando a ser una de las dos características histopatológicas de la enfermedad.

MAP2.

Las múltiples isoformas de MAP2 que se expresan en las neuronas son el resultado del empalme alternativo del ARNm transcrito de un sólo gen localizado en el cromosoma 2, el cual contiene alrededor de 20 exones (Neve y cols., 1986). La MAP2 se divide en dos grupos: 1) MAP2 de alto peso molecular, que incluye a MAP2A y MAP2B, y cuyos pesos moleculares corresponden de 280 y 270 kDa respectivamente, y 2) MAP2 de bajo peso molecular, el cual incluye a MAP2C de 70 kDa y MAP2D de 75 kDa (Sánchez y cols., 2000). Estas isoformas difieren entre sí, debido a que las isoformas de bajo peso molecular carecen de un dominio central codificado por los exones 9-11 (Kindler y cols., 1990). Ambos grupos de isoformas pueden presentar tres o cuatro dominios de unión a microtúbulos, los cuales constan de 31-32 aminoácidos (18 están conservados evolutivamente, flanqueados por una secuencia de 13-14 aminoácidos) próximos al extremo carboxilo terminal. Estos dominios repetidos son codificados por los exones 15, 17 y 18 en las isoformas de 3 dominios de unión, mientras que el exón 16 está presente en las isoformas de 4 dominios de unión, el cual se encuentra ausente en la MAP2C (Doll y cols., 1993). Todas las isoformas de MAP2 presentan una región rica en prolina que precede a los dominios de unión a microtúbulos, el cual al parecer, regula la función de afinidad para unirse a los MTs (Gustke y cols., 1994). Aparentemente, las proteínas MAP2 son moléculas no compactas, altamente flexibles, que carecen de estructura secundaria definida, lo cual explica su resistencia a la desnaturalización térmica (Hernández y cols., 1986). La región del carboxilo terminal de MAP2 (la cual incluye la región rica en prolina y los dominios de unión a MTs) está unida a los MTs, mientras que el resto de la proteína, o "dominio de proyección" (el cual comprende el dominio central y la región amino terminal), proyecta hacia afuera de la superficie del MT, formando una especie de brazo de extensión (Sánchez y cols., 2000).

Como se mencionó anteriormente, MAP2 se expresa principalmente en el sistema nervioso, siendo una de las proteínas más abundantes en cerebro (Olmsted y cols., 1986; Matus, 1988). Sin embargo, MAP2 también ha sido encontrada en ciertos tejidos no neuronales como el músculo esquelético, testículo y algunos epitelios en pequeñas cantidades (Valdivia y cols., 1982; Wiche y cols., 1984; Loveland y cols., 1996). En el sistema nervioso las MAP2 de alto peso molecular se expresan en neuronas, mientras que las de bajo peso molecular se encuentran tanto en neuronas como en células gliales (Huber y Matus, 1984; Ferhat y cols., 1998; Vouyiouklis y Brophy, 1995).

Por otro lado, las isoformas de MAP2 son reguladas durante el desarrollo, por ejemplo, MAP2C es la isoforma juvenil y es regulada a la baja después de etapas tempranas

del desarrollo neuronal (Garner y cols., 1988), mientras que MAP2B se expresa durante el desarrollo y en la edad adulta (Binder y cols., 1984). En cambio, MAP2A llega a ser expresada cuando los niveles de MAP2C empiezan a decrecer y no es detectada de manera uniforme en todas las neuronas maduras (Chung y cols., 1996).

La localización de las MAP2 de alto peso molecular se encuentra básicamente en soma y dendritas donde se encuentra asociada con los MTs (Bernhardt y Matus, 1982; Fletcher y cols., 1994); además, estas pueden co-localizar con actina en las espinas dendríticas y en la densidad post-sináptica (Cáceres y cols., 1983; Fifkova y Morales, 1992). Sin embargo, pequeñas cantidades de MAP2 pueden estar presentes en axones (Papasozomenos y cols., 1985; Meichsner y cols., 1993). En contraste, las isoformas de bajo peso molecular se distribuyen ampliamente en todos los compartimentos de la neurona (Meichsner y cols., 1993; Albala y cols., 1995).

Dado que las diferentes isoformas se distribuyen de manera diferencial en la célula neuronal, se han sugerido muchos mecanismos sobre la compartimentalización:

- 1) Compartimentalización de sus ARN mensajeros: Ciertos mensajeros son transportados desde los somas a las dendritas por mecanismos dependientes de citoesqueleto durante el desarrollo (Steward y Wallace, 1995; Kleiman y cols., 1994). Uno de estos ARNm codifica para la proteína MAP2 de alto peso molecular, en contraste con el mensajero de la proteína MAP2 de bajo peso molecular que se encuentra en el soma neuronal (Tucker y cols., 1989; Kleiman y cols., 1994). Por otra parte, la presencia temprana del ARNm de MAP2 de alto peso molecular en los conos de crecimiento dendríticos sugiere que su distribución puede atribuirse a la polarización neuronal. En algunos casos, la diferente localización de los RNA mensajeros se debe a la presencia de regiones no traducidas (UTRs), 3' y 5' (Wilhelm y Vale, 1993); sin embargo, estos UTRs de los mensajeros de ambas isoformas son similares (Kalcheva y cols., 1995), sugiriendo que las regiones codificantes pueden ser responsables para su diferente compartimentalización en la célula neuronal.
- 2) Entrada selectiva. Experimentos de transfección han demostrado que las MAP2 de alto peso molecular son incapaces de transportarse hacia el axón debido a la presencia de su dominio central (Kanai y Hirokawa, 1995). Esto sugiere la existencia de mecanismos selectivos en el segmento inicial del axón que impide específicamente el acceso. Este mecanismo podría ser dependiente de secuencia ya que otras proteínas pesadas como MAP1B son abundantes dentro de los axones. En contraste con las isoformas de alto peso molecular, experimentos de transfección de MAP2C etiquetada con la secuencia de myc en cultivos primarios de hipocampo, muestran que ésta se encuentra presente en todos los

compartimentos neuronales, apoyando la existencia de un mecanismo de selectividad en la compartimentalización de las isoformas de MAP2 (Meichsner y cols., 1993).

- 3) Estabilidad proteínica en compartimentos neuronales. Gracias a experimentos de microinyección, se conoce que las isoformas de MAP2 de alto peso molecular pueden ser localizadas en axones pero desaparecen de manera rápida, llegando a estar presentes en somas y en dendritas. Esta desaparición de las MAP2 de alto peso molecular microinyectadas en los axones podría ser debido a su proteólisis dentro de este compartimiento (Okabe y Hirokawa, 1989).

La proteína MAP2 se ha implicado en el crecimiento y polaridad en cultivos neuronales y no neuronales (Matus. 1988; Craig y Banker, 1994). Así, no existe crecimiento de las neuritas en cultivos corticales neuronales cuando la expresión de MAP2 se suprime con oligonucleótidos específicos (Dinsmore y Salomón, 1991; Cáceres y cols., 1992). Además, el crecimiento de alargamientos citoplasmáticos similares a las neuritas se observa cuando MAP2 se sobre-expresa en cultivos de células no-neuronales (Edson y cols., 1993; Kalcheva y cols., 1998). Acorde con estos datos, se puede sugerir que MAP2 puede ser esencial durante los primeros pasos del crecimiento neurítico.

Por otra parte, la proteína MAP2 interactúa con los MTs a través de sus dominios de unión a MTs, los cuales se asocian principalmente con la región ácida del carboxilo terminal de la tubulina (Serrano y cols., 1984; Cross y cols., 1991); asimismo, las regiones que flanquean a los dominios de unión, particularmente la región rica en prolinas, puede también favorecer su unión a los MTs (Gustke y cols., 1994, Goode y cols., 1997). Como una consecuencia de la asociación de MAP2 con los MTs, éstos se estabilizan y su rigidez se incrementa, dando lugar a largos polímeros (Kowalski y Williams, 1993; Kalcheva y cols., 1998). Sin embargo, los MTs aún preservan sus propiedades dinámicas en la presencia de MAP2, lo cual puede proporcionar la base molecular para la plasticidad morfológica (Pryer y cols., 1992; Kaech y cols., 1996).

Aparte de su unión a la tubulina, la proteína MAP2 puede unirse también a los filamentos de actina (F-actina), modificando su estabilidad (Selden y Pollard, 1983; Correas y cols., 1990; Ferhat y cols., 1996), de hecho, una co-localización de ambas proteínas se observa en espinas dendríticas (Cáceres y cols., 1983; Fifkova y Morales, 1992). Esta interacción entre MAP2 y actina ocurre por medio de su dominio unión a MT, de hecho, MAP2 pueden empaquetar los filamentos de actina *in vitro* (Roger y cols., 2004).

Finalmente, MAP2 puede unirse también a los neurofilamentos por medio de un dominio de unión a neurofilamentos, el cual parece ser diferentes del dominio de unión a MT (Bloom y Vallee, 1983; Heimann y cols., 1985; Bigot y Hunt, 1991).

Tau.

La proteína tau se encuentra conservada evolutivamente, ya que varios grupos tales como nemátodos, moscas, roedores, bovinos, monos y el ser humano la presentan (Goedert y cols., 1996; Kosik y cols., 1987; Himmler y cols., 1989; Goedert y cols., 1989). Concretamente en el ser humano, la proteína se localiza en neuronas y aún en células no neuronales como astrocitos y oligodendrocitos usualmente en cantidades apreciables, sobre todo en condiciones patológicas (Binder y cols., 1985; LoPresti y cols., 1995; Chin y Goldman, 1996).

Las isoformas de tau son codificadas por un sólo gen, el cual se localiza en el brazo largo del cromosoma 17q21 (Neve y cols., 1986). El primer transcrito de tau contiene 16 exones; sin embargo, tres de ellos (exones 4A, 6 y 8), nunca se encuentran presentes en los ARNm de cerebros de humanos. Estos exones son específicos de proteínas tau del sistema nervioso periférico (tau de alto peso molecular). El exón 4A se encuentra en tejido nervioso periférico de bovino, humano y roedor con alto grado de homología (Couchie y cols., 1992). En cambio, los exones 2, 3 y 10 son alternativamente procesados y son específicos de cerebros de adultos (Goedert y cols., 1989; Sawa y cols., 1994). Así, el empalme alternativo de esos tres exones permite seis combinaciones de tau, esto significa que el transcrito primario da origen a seis ARNm (Goedert y cols., 1989; Himmler y cols., 1989; Andreadis y cols., 1992) y por lo tanto a seis isoformas cuya longitud oscila entre 352 a 441 aminoácidos, y sus pesos moleculares se encuentran entre 45 y 65 kDa (Buée y cols., 2000). Cada variante de tau difiere una de la otra por la presencia de tres (3R), o cuatro (4R), regiones de dominios repetidos (igualmente llamados dominios de unión a microtúbulos) de 31 o 32 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal de la molécula codificados por los exones 9,10,11 y 12, y la ausencia o presencia de dos insertos de 29 o 58 aminoácidos en la parte amino terminal (Goedert y cols., 1989; Himmler y cols., 1989; Kosik y cols., 1989). Cada una de esas isoformas es probable que tenga diferentes roles fisiológicos ya que se expresan de manera diferencial durante el desarrollo. Por ejemplo, sólo una isoforma de tau, caracterizada por la ausencia de insertos del amino terminal y la presencia de tres dominios de unión, está presente durante etapas fetales; mientras que las seis isoformas se presentan en etapas postnatales (Goedert y cols., 1990; Kosik y cols., 1989). Estos datos muestran que las

isoformas de tau pueden estar diferencialmente distribuidas en subpoblaciones neuronales (Fig. 4).

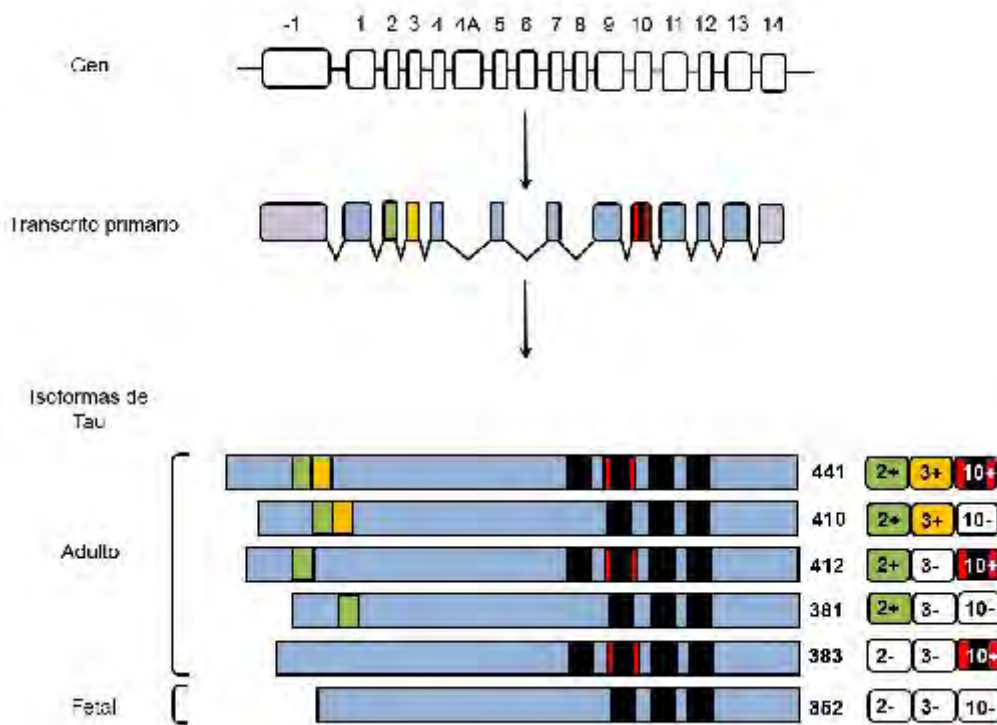


Figura 4. Representación esquemática del gen, transcrito y de las 6 isoformas de la proteína tau. El gen se localiza en el cromosoma 17, el cual contiene 16 exones de los cuales el exón -1 es parte del promotor. El transcrito primario contiene 13 exones, pero el exón 4A, 6 y 8 no son transcritos en el SNC (sólo se expresan en sistema periférico dando lugar a isoformas de proteína tau de alto peso molecular). Los exones 1, 4, 5, 7, 8, 11, 12 y 13 son constitutivos y los exones 2, 3 y 10 sufren empalme alternativo dando origen a los 6 transcritos de ARNm que al ser traducidos, producen a 6 diferentes isoformas de la proteína tau (Modificado de Buée y cols., 2000)

En ratones “knock out” que carecen del gen de tau, un incremento de la proteína asociada a los microtúbulos 1A (MAP1A) puede compensar su función de estabilizar a los MTs (Harada y cols., 1994), aunque, el diámetro del axón de algunas neuronas se encuentre particularmente afectado. Esto puede estar relacionado al largo particular del dominio amino terminal (conteniendo o no secuencias codificadas por los exones 2 o 3) de la proteína tau que es específica y sólo se encuentra en axones. De hecho, los dominios de proyección de tau determinan el espacio entre los microtúbulos del axón y pueden incrementar el diámetro del axón (Chen y cols., 1992), (Fig. 5).

Desde su descubrimiento hace más de 25 años, un número de funciones definidas de la proteína tau han sido descritas y caracterizadas (Buée y cols., 2000). La proteína

tau promueve la polimerización de los microtúbulos (MTs), y cuando se une a ellos, los estabiliza (Cleveland y cols., 1977). Como se mencionó anteriormente, estos dominios de unión se encuentran localizados en el extremo carboxilo terminal y están compuestos de 18 aminoácidos altamente conservados y separados por secuencias de interrepetición flexibles de 13-14 aminoácidos menos conservadas (Butner y Kirschener, 1991). La unión de tau a los MTs es un proceso complejo mediado en parte por arreglos flexibles de sitios de unión a MT débiles que están distribuidos por todo el dominio de unión a MTs (Lee y cols., 1989; Butner y Kirschner 1991). Aunado a esto, las secuencias que flanquean los dominios de unión contribuyen a la unión a los MTs (Gustke y cols., 1994). Las isoformas con 4R son más eficientes en promover el ensamble de los MTs y presentan mayor afinidad que las isoformas con 3R esto es debido posiblemente, a que en la secuencia del primer y segundo dominio repetido de unión tiene mayor afinidad (más de dos veces), que los dominios de unión individuales, la cual es única en las isoformas con 4R (Goedert y Jakes, 1990; Goode y Feinstein, 1994; Goode y cols., 1997), (Fig. 5).



Figura 5. Representación esquemática de los dominios funcionales de la isoforma más larga (441 aminoácidos), de la proteína tau. El dominio de proyección incluye la región acídica y la región rica en prolina, interactuando entre los elementos del citoesqueleto para determinar el espaciamiento entre los microtúbulos de los axones. El extremo C-terminal está involucrado en la unión a los MTs regulando la tasa de polimerización (Modificado de Buée y cols., 2000).

Modificaciones post-traduccionales de la proteína tau.

La proteína tau puede presentar diferentes modificaciones post-traduccionales, como la glicosilación, truncación (se especula que sólo ocurre en condiciones patológicas), pero la más importante es la fosforilación.

Glicosilación: La O-glicosilación es una modificación post-traducciona l dinámica y abundante, la cual consiste en adicionar residuos de N-acetilglucosamina en los

aminoácidos serina o treonina cerca del residuo prolina (Haltiwanger y cols., 1992). Esta modificación es a menudo recíproca a la fosforilación (Haltiwanger y cols., 1997; Lefebvre y cols., 2003). El número de sitios O-glicosilados es mucho menor que el número de sitios fosforilados y los cambios en sitios específicos o en la estequiometría pueden modular la función de tau. De hecho, la O-glicosilación y la fosforilación pueden tener efectos opuestos. Por ejemplo, el efecto de esta modificación en la proteína tau y en otras proteínas asociadas a MTs sugiere un papel en mediar su interacción con la tubulina, o jugar un papel muy importante en la localización subcelular y en su degradación (Arnold y cols., 1996).

Fosforilación: Existen 79 sitios potenciales de residuos serina y treonina para su fosforilación en la isoforma más larga de tau, pero sólo alrededor de 30 de esos sitios se han reportado en la proteína normal (Billingsley y Kincaid, 1997, Buée y cols., 2000). Casi todos los sitios están localizados fuera de los dominios de unión a los MT, y la mayoría de esos sitios son motivos Ser-Pro o Thr-Pro, con la excepción de la Ser262 (R1), Ser285 (inter-repetición R1-R2), Ser305 (inter-repetición R2-R3), Ser324 (3R), Ser352 (R4) y Ser356 (R4) (Goedert y cols., 1989; Roder y cols., 1997) (Fig. 6).

Los diferentes estados de fosforilación de tau son el resultado de la actividad de cinasas específicas y fosfatasa, ya que modulan el grado y patrón de fosforilación de la proteína tau. Entre estas cinasas se pueden mencionar a dos grandes grupos: 1) las cinasas no dirigidas por prolinas (NPPDK), como la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA), la proteína cinasa C (PKC), la proteína cinasa reguladora de la afinidad de los microtúbulos (MARK), la proteína cinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina II (CaMPK II), (Jicha y cols., 1999; Correas y cols. 1992; Drewes y cols., 1997; Johnson, 1992), y 2) las cinasas dirigidas por prolinas (PDPK), como las cinasas dependientes de ciclinas (cdc2 y Cdk5), la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), la cinasa sintasa de glucógeno (GSK-3 β) (Hanger y cols., 1992). Esta última, es una cinasa que fosforila residuos de serina y treonina, la cual es muy abundante en el cerebro y se asocia a los MTs (Mandelkow y cols., 1992). Estudios de co-transfección de genes de tau y de GSK-3 β en células no neuronales, demostraron que esta cinasa induce hiperfosforilación de tau y una pérdida de unión a los MTs (Lovestone y cols., 1996). En cultivos corticales neuronales la fosforilación de la proteína tau mediada por GSK-3 β es inhibida por la insulina o por el factor de crecimiento semejante a insulina 1 (IGF-1), debido a la activación de la vía de señalización de la cinasa de fosfatidilinositol 3 (PI3K/Akt) (Hong y Lee, 1997). Asimismo, la inhibición de GSK-3 β con sales de litio inhibidores competitivos de ATP (paullones), reduce la fosforilación de tau y afecta la estabilidad de los MTs (Muñoz-Montano y cols., 1997; Lovestone y cols., 1999, Leost y cols., 2000). Estos datos apuntan a que GSK-3 β es una de la cinasas candidatas que

median la fosforilación de la proteína tau en tejidos cerebrales de pacientes con EA (Pei y cols., 1997; Lovestone y Reynolds, 1997; Pei y cols., 1999), aún cuando los mecanismos (posibles alteraciones en vías de señalización como Wnt o PI3K/Akt, ver más adelante), por las cuales ésta cinasa se encuentra desregulada están por esclarecerse.

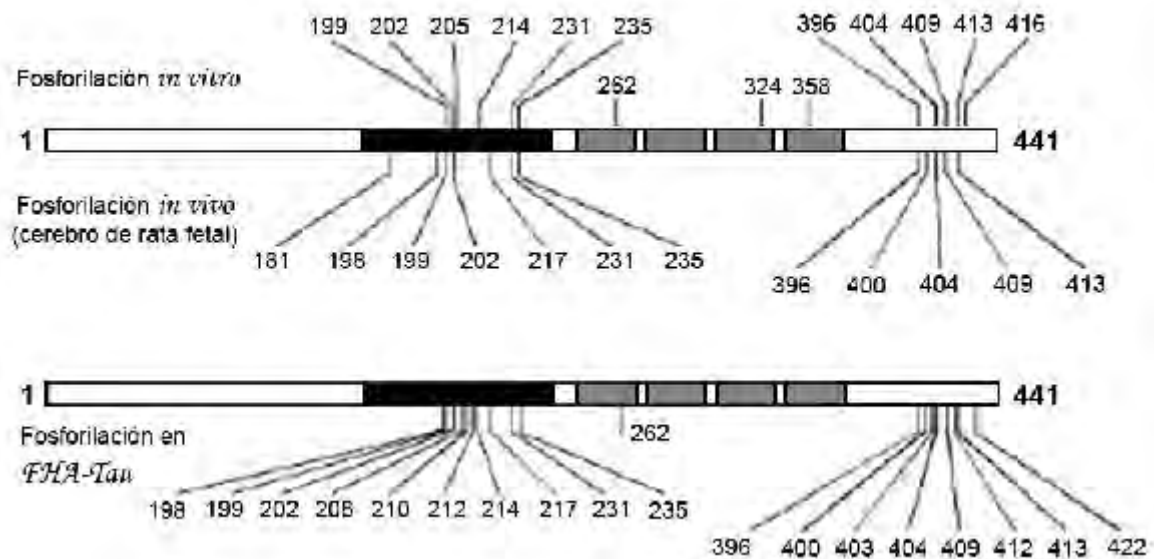


Figura 6. Sitios de fosforilación de la proteína tau. Se pueden observar los sitios específicos de fosforilación de la proteína tau (isoforma más larga de 441 residuos), tanto en condiciones *in vitro* e *in vivo* y de proteína tau proveniente de tejido cerebral postmortem de pacientes con demencia de Alzheimer. Nótese que algunos sitios se encuentran fosforilados de manera similar en la proteína tau de cerebros de rata fetal y de proteína tau (*FHA-tau*), (Modificado de Lovestone y Reynolds, 1997).

Por otra parte, la fosforilación de la proteína tau es regulada durante el desarrollo, ya que la proteína tau fetal se encuentra altamente fosforilada durante el estado embrionario en comparación con el adulto (Kanemaru y cols., 1992; Bramblett y cols., 1993). Debido a que la proteína tau se une a los MT por medio de los dominios de unión, el ensamble de los mismos depende parcialmente de su estado de fosforilación, ya que la proteína tau fosforilada es menos efectiva que la proteína desfosforilada para estabilizar a los MTs (Biernat y cols., 1993; Bramblett y cols., 1993). La importancia de sitios individuales en regular la unión de tau a los MTs ha sido materia de controversia. Por ejemplo, se ha descrito que la fosforilación en la Ser²⁶² (presente en el primer dominio de unión), reduce dramáticamente la afinidad de tau por la tubulina *in vitro*, y de igual manera, un papel similar puede ser considerado para la fosforilación de la Ser³⁵⁶ (presente en el cuarto dominio de unión) (Biernat y cols., 1993). En contraste, Seubert y cols., (1995), sugieren que la fosforilación de ambos sitios es suficiente para

eliminar la unión de la proteína tau a los MTs. Ambos sitios se encuentran fosforilados en la proteína tau fetal y sobre todo, hiperfosforilada en las seis isoformas de tau que forman los filamentos helicoidales apareados de las MNF en cerebros con EA (Seubert y cols., 1995).

Debido a que las proteínas fosfatasas son importantes en llevar un equilibrio de los efectos de las cinasas, un número de estudios han implicado el papel de estas enzimas en la regulación de fosforilación de tau. Tal es el caso como de la proteína fosfatasa 1 (PP1), la proteína fosfatasa 2A (PP2A), la proteína fosfatasa 2B (PP2B, calcineurina), y proteína fosfatasa 2C (PP2C), ya que todas ellas desfosforilan a la proteína tau *in vitro*, aún que *in vivo* su papel no es muy claro (Buée y cols., 2000).

Diversos estudios han demostrado que la inhibición de PP1 y PP2A por el ácido ocadaíco en cultivos corticales primarios y en rebanadas de hipocampo, resulta en un incremento de la fosforilación de algunos sitios de tau como las serinas 199, 202 y 235 (Arias y cols., 1993; Harris y cols., 1993), o en cultivos de teratocarcinoma humano (NT2N), además de la hiperfosforilación, estos efectos son acompañados de un decremento de la unión de tau a los MTs, destrucción selectiva de los MTs estables y una rápida degeneración de los axones (Merrick y cols., 1997).

Cambios conformacionales: En la actualidad, se han desarrollado anticuerpos monoclonales tales como Alz-50, MC1 y TG3, los cuales sugieren un cambio conformacional en la proteína tau que puede representar un cambio post-traducciona l más específico de la EA. Diversos autores mostraron que la inmunoreactividad de los anticuerpos Alz-50 y MC1 reconocen a ambos extremos (amino y carboxilo terminal), de la proteína tau (Jicha y cols., 1997a). Considerando el tamaño de la región de unión del antígeno, se sugiere que esta región estaría reconociendo el amino terminal y el tercer dominio de unión a microtúbulos en una cercana proximidad una con otra, sugiriendo una estructura plegada. Esto tiene una gran implicación, ya que las pre-marañas son reconocidas por el anticuerpo Alz-50 y la especificidad ha sido ampliamente documentada (Wolozin y Davies; 1987; Hyman y cols., 1988). Por otra parte, la evidencia que apoyan un cambio conformacional en la proteína tau provienen de estudios con el anticuerpo TG3, cuyo epítipo, además, reconoce una fosforilación en la treonina 231 (Thr²³¹). Este anticuerpo reacciona de forma débil con péptidos sintéticos bifosforilados (Thr²³¹/Ser²³⁵), a menos que este alterado en su conformación (Jicha y cols., 1997b). TG3 evidencia placas neuríticas, hilos de neuropilo, MNF, pero no reacciona con proteína tau de tejidos de biopsias humanas de pacientes control, exhibiendo su alto grado de especificidad en la patología de Alzheimer (Vincent y cols., 1996, 1998).

Truncación: Otra importante modificación involucrada en el desarrollo de la patología neurofibrilar es la truncación por proteasas activas. Se ha sugerido que la truncación de tau en el carboxilo terminal es un evento inicial en la enfermedad, que favorece el auto-ensamble de la proteína permitiendo la formación del núcleo mínimo de los filamentos helicoidales apareados (FHA) y a su vez, la formación de las MNF (Wischik y cols., 1988; Mena y cols., 1996; García-Sierra y cols., 2003). El anticuerpo monoclonal MN423 producido en contra del núcleo de los FHA (el cual reconoce la truncación del ácido glutámico 391), se ha encontrado en tejido cerebral en etapas tempranas y tardías de la patología de la EA (Mena y cols., 1991; Mena y cols., 1996). Experimentos adicionales con tau truncada en el sitio E391 sugieren que esta puede causar apoptosis cuando es transfectada a células COS (Fasulo y cols., 1996). Estos datos sugieren que el estado molecular de los protómeros de tau dentro los FHA pueden modular la toxicidad de los depósitos de tau en la enfermedad de Alzheimer.

Otra evidencia del corte proteolítico que sufre la proteína tau proviene de los estudios de Canu y cols. (1998), y Fasulo y cols. (2000), donde demuestran que la proteína tau es sustrato de caspasas, principalmente la caspasa 3. En la actualidad, el anticuerpo monoclonal TauC3 reconoce este sitio de corte el cual, se ha localizado en el ácido aspártico 421 (Gamblin y cols., 2003). Así, se ha especulado que muchas modificaciones post-traduccionales se encuentran involucradas en la formación de las inclusiones neurofibrilares (Mercado-Gómez y Arias, 2007).

Distribución celular: Tau es una fosfoproteína, lo cual fue demostrado en primera instancia gracias a la utilización del anticuerpo monoclonal Tau-1 que reconoce un epítopo no fosforilado (aminoácidos 187-205). Debido a que Tau-1 marcaba preferentemente a los axones, se sugirió que tau era una proteína axonal (Binder y cols., 1985). Sin embargo, el estado de fosforilación de tau es completamente diferente de acuerdo a los compartimentos celulares (Riederer y Binder, 1994), y la inmunoreactividad de Tau-1 se observó en el compartimiento somatodendrítico de neuronas después de la desfosforilación (Papazosomenos, 1997). De hecho, el marcado de los somas y dendritas con anticuerpos independientes de sitios fosforilados tal como Alz-50, demuestran que la proteína se localiza en todos los compartimentos de las células nerviosas y no son exclusivamente proteínas axonales (Hamre y cols., 1989). Sin embargo, comparado con otras MAPs, la proteína tau está preferentemente en el axón.

Alteraciones del citoesqueleto en la enfermedad de Alzheimer.

En cerebros de pacientes con la demencia de Alzheimer, se ha observado que el citoesqueleto de un gran número de neuronas se desagrega progresivamente y se reemplaza por dos tipos de haces: 1) filamentos helicoidales apareados (FHA) y 2) filamentos rectos (FR, en menor proporción). Estos filamentos se asocian produciendo las marañas neurofibrilares que se localizan principalmente en el cuerpo neuronal y llenan casi todo el citoplasma de las células afectadas (Kosik y Greenberg, 1994). También se observan acumulaciones de FHA en las neuritas distróficas que rodean los acúmulos extracelulares de βA de las placas neuríticas. Una tercera localización ocurre en neuritas y en el neuropilo de la corteza telencefálica, donde se forman los llamados hilillos de neuropilo (Arias, 1999). Estos filamentos tiene un diámetro de 15-20 nm, y cuando son apareados, dos hebras del filamento se enrollan entre sí con una periodicidad (vuelta), promedio de 160 nm y un máximo de ancho de 24 nm (Kidd, 1963, Wiśniewski y cols., 1976).

Ambos filamentos están compuestos predominantemente de proteína tau anormalmente hiperfosforilada sin descartar otro tipo de modificación post-traducciona (Goedert y cols., 1988; Kondo y cols., 1988; Lee y cols., 1991, Mercado Gómez y Arias, 2007). Estos FHA fueron aislados originalmente utilizando detergentes iónicos fuertes como el dodecil sulfato de sodio (SDS), y el mantenimiento de su integridad estructural a través de purificaciones abrasivas, indicaron que los FHA son estructuras insolubles (Selkoe y cols., 1982). Investigaciones posteriores utilizando extracciones con sarcosil, revelaron que los FHA insolubles representan sólo una porción de la poza total de FHA (Rubinstein y cols., 1986).

Cuando estos FHA se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, el patrón de polipéptidos pareció indicar que la proteína tau aparece como el componente proteínico más abundante de los FHA, experimentos posteriores utilizando anticuerpos específicos y secuenciación proteínica confirmaron a la proteína tau como componente principal (Greenberg y Davies, 1990; Lee y cols., 1991).

Asimismo, se han podido analizar fragmentos de otras proteínas en los FHA no relacionadas con el citoesqueleto, como es el caso de la proteína ubiquitina involucrada en el sistema de degradación por el proteosoma o la α -sinucleína, cuya localización se encuentra en la sinapsis y esta proteína forma agregados intracelulares conocidos como cuerpos de Lewy, característicos de la enfermedad de Parkinson (Mori y cols., 1987; Marui y cols., 2000; Windisch y cols., 2007).

La proteína tau obtenida de estas fracciones provenientes de pacientes con EA, fue denominada también como *FHA-tau*, y ésta difiere de la proteína normal por las

siguientes características: 1) *FHA-tau* presenta una movilidad electroforética más retardada en su migración en geles de poliacrilamida, 2) no está presente en fracciones de cerebro de pacientes controles, 3) no es soluble bajo condiciones acuosas, 4) aún cuando la proteína tau co-purifica con microtúbulos de manera normal, fracciones de *FHA-tau* carecen de microtúbulos y tubulina (Kosik y Greenberg, 1994). Anteriormente, trabajos independientes habían observado *FHA-tau* basados en su reconocimiento por el anticuerpo Alz-50 y denominaron a esta proteína A68 (Wolozin y cols., 1986).

La agregación de tau no sólo se encuentra en la EA, sino que puede ser observada en otros desórdenes neurodegenerativos llamados Taupatías tales como: la degeneración corticobasal esporádica, enfermedad de Pick, parálisis supranuclear progresiva, y demencia frontotemporal y parkinsonismo asociada al cromosoma 17 (Lee y cols., 2001).

En estas estructuras filamentosas (FHA), la proteína tau que normalmente contiene 2.5 a 3.5 moles de fosfato por mol de proteína, en la patología la proteína *FHA-tau* aparece hiperfosforilada, con 10 a 12 moles de fosfato por mol de tau (Ksiezaki-Reding, y cols. 1992; Köpke y cols., 1993). Todas las isoformas de tau aisladas de cerebros de pacientes con EA contienen más fosfatos que las 6 isoformas normales. La caracterización bioquímica de *FHA-tau* por inmunotransferencia revela la presencia de un triplete de proteínas con pesos moleculares de 60, 64 y 68 kDa, y un componente menor de 72 kDa también está presente (Greenberg y Davies, 1990, Lee y cols., 1991). Cuando la *FHA-tau* se trata con fosfatasa alcalina, pueden observarse seis bandas, las cuales corresponden a la seis isoformas de tau que están presentes en cerebros de pacientes adultos (Goedert y cols., 1995, Hong y cols., 1998). Aún cuando muchos sitios fosforilados identificados en la fracción de *FHA-tau* también pueden encontrarse fosforilados en algún grado en las isoformas aisladas de biopsias de cerebros normales (Matsuo y cols., 1994), es claro que *FHA-tau* se encuentra hiperfosforilada y anormalmente fosforilada en residuos no observados en proteína tau normal (Morishima-Kawashima y cols., 1995; Hoffmann y cols., 1997, Zheng-Fischhöfer y cols., 1998). Esta fosforilación anormal puede ser observada mediante el desarrollo de anticuerpos que reconocen tres epítomos fosforilados correspondiendo a los residuos Thr²¹²/Ser²¹⁴, y Ser⁴²² (anticuerpos AT100 y AP422, respectivamente), ya que son característicos y pueden ser utilizados como marcadores de fosforilación anormal de tau, debido a que en fracciones de cerebros controles no se presenta ninguna inmunoreactividad (Buée y cols., 2000, Hasegawa y cols., 1996). Aparte de estos sitios fosforilados, se han originado otros anticuerpos TG/MC, que reconocen cambios conformacionales (ejemplos, TG3, MC1, Alz-50), estos epítomos no están

presentes en homogenados de cerebro procedentes de biopsias y autopsias en pacientes controles, pero sí tienen afinidad con la proteína *FHA-tau* y epítomos mitóticos. Además, TG3 es capaz de reconocer la fosforilación en el residuo Thr²³¹ en una conformación fosforilada particular, lo cual podría permitir un mejor entendimiento en la formación de los FHA (Vincent y cols., 1998).

La proteína *FHA-tau* disminuye extraordinariamente su capacidad para unirse a los MTs precisamente en aquellas regiones del cerebro que contienen niveles altos de esta proteína (hipocampo, corteza entorrinal) y se presenta como numerosas lesiones neurofibrilares (Ávila, 2000).

Las marañas se desarrollan en una secuencia de eventos durante la EA. La progresión de la patología neurofibrilar en cerebros afectados con demencia de Alzheimer ha sido ampliamente descrita por Braak y Braak, y se caracteriza por seis etapas (Braak y Braak, 1991). En la etapa I y II los cambios pueden no presentarse con manifestación clínica o puede existir un daño cognoscitivo leve, con presencia de marañas neurofibrilares limitadas a regiones de la corteza transentorrinal e hipocampo. El examen de tejidos de cerebro en las etapas I y II, han sido utilizadas para intentar definir cambios patológicos tempranos en la proteína tau.

Los casos en las etapas III y IV revelan menor grado de destrucción en corteza cerebral, sin atrofia macroscópica detectable. Debido a la carencia de destrucción neocortical, las etapas III y IV no son utilizadas como criterio para la diagnosis neuropatológica de la personalidad de los individuos afectados (Tierney y cols., 1988; Mirra y cols., 1991). La característica notable de la etapa III es la destrucción masiva de la capa Pre α de las regiones transentorrinal y entorrinal, acompañada con leves cambios en el hipocampo y la ausencia de lesiones neocorticales. Un gran número de células de proyección de la capa Pre α contienen marañas neurofibrilares e hilos de neuropilo. En la etapa IV, cambios adicionales se observan en el fondo de la capa Pri- α . Los protocolos clínicos notan un daño en las funciones cognoscitivas con la presencia de sutiles cambios de personalidad (Bancher y cols., 1993; Braak y cols., 1993). Debido a la presencia de síntomas clínicos y de lesiones cerebrales, los casos en las etapas III y IV son considerados como demencia de Alzheimer incipiente (Braak y Braak, 1991)

En las etapas V y VI un gran número de marañas neurofibrilares y hebras de neuropilo se encuentran en todas las subdivisiones de la corteza cerebral. La característica principal en estas etapas, es la severa destrucción de las áreas de asociación neocorticales. Estas etapas corresponden con el criterio utilizado para la confirmación neuropatológica en la diagnosis clínica de la enfermedad (Tierney y cols., 1988; Mirra y cols., 1991; Braak y Braak, 1995).

Aún cuando la presencia de MNF en diferentes regiones del cerebro (sistema límbico, áreas corticales sensoriales primarias y de asociación, etc.), se ha correlacionado con el grado de demencia (Arriagada y cols., 1992), al parecer existe en la actualidad, discrepancia si la formación de estos agregados intracelulares es neurotóxica (Rankin y cols., 2007). Por ejemplo, hay reportes en la literatura indicando que la formación de las marañas neurofibrilares correlaciona con la neurodegeneración (Lewis y cols., 2000; Jackson y cols., 2002; Lin y cols., 2003), en cambio existen otros en los que indican que hay neurodegeneración en la ausencia de marañas (Wittmann y cols., 2001; Fath y cols., 2002; Santacruz y cols., 2005) (Fig. 7).

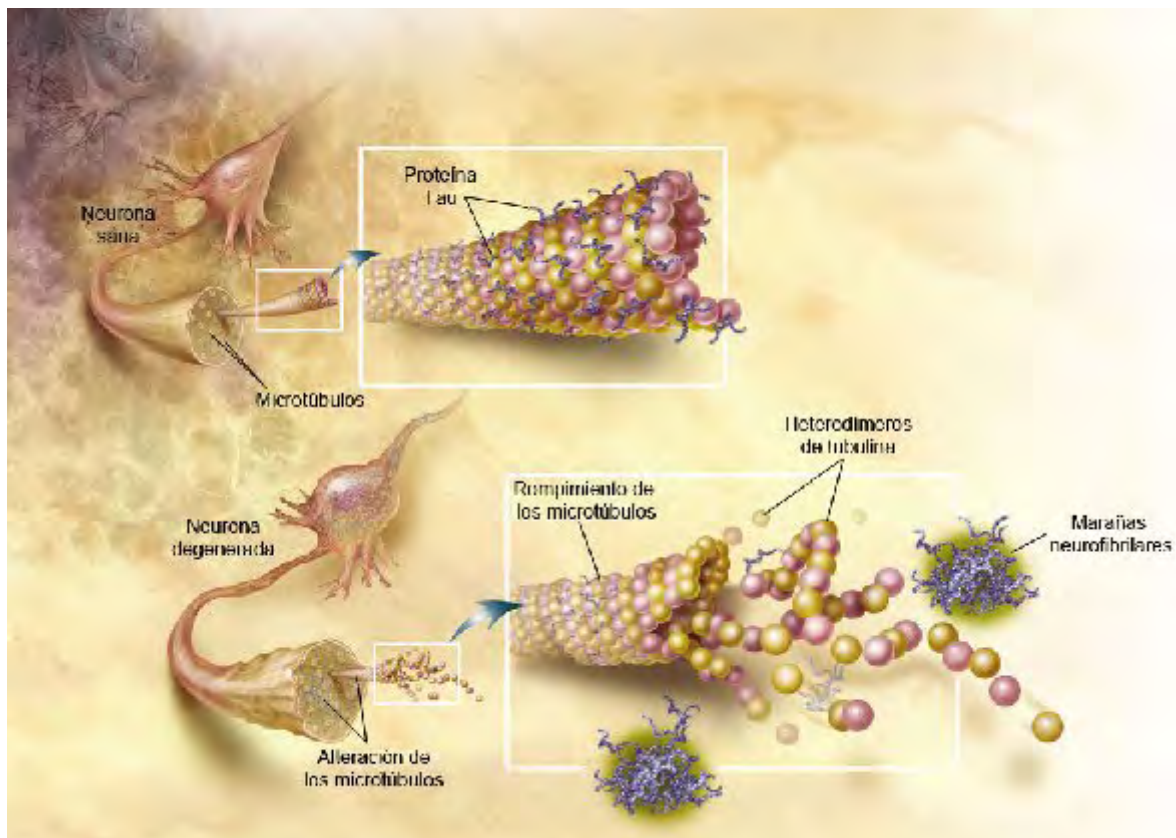


Figura 7. Esquema del citoesqueleto microtubular, de una neurona sana y de una neurona en proceso de degeneración, donde se muestra una desorganización progresiva en la patología de Alzheimer. Nótese que en esta última, la proteína tau ya no cumple su función estabilizadora la cual al disociarse de los MTs, puede sufrir diferentes modificaciones post-traduccionales llevándola a autoensamblarse y formar de manera paulatina las marañas neurofibrilares (Modificado de National Institute on Aging).

Estructura de los filamentos helicoidales apareados y mecanismos de ensamble.

Los mecanismos esenciales de la formación de los FHA en neuronas en la actualidad permanecen por elucidarse, pero es posible que la hiperfosforilación separe a la proteína tau de los MTs, incrementando la poza libre de tau. Esta proteína tau soluble puede ser más resistente a la degradación y más propensa a agregarse que a unirse a los MTs (Lee y cols., 2001). Sin embargo, no es muy claro si esta modificación post-traducciona es suficiente para el ensamble de los filamentos. Aunque no hay mucha evidencia experimental que relacione la hiperfosforilación de tau con el ensamble anormal, la proteína tau hiperfosforilada citosólica soluble proveniente de extractos de pacientes es capaz de auto-ensamblarse en filamentos helicoidales apareados de manera semejante a los FHA, dicho auto-ensamble puede inhibirse desfosforilando a la proteína. Además, la proteína tau recombinante en presencia de cinasas contenidas en extractos de cerebros de rata, promueven la hiperfosforilación de la proteína y su auto-ensamble *in vitro* (Alonso y cols., 2001, 2006). En este sentido, estudios de Rankin y cols., (2007), mostraron que la fosforilación de la proteína tau mediada por GSK-3 β promueve su auto-ensamble. Dichos autores encontraron que la fosforilación por medio de GSK-3 β es suficiente para causar que la proteína tau se ensamblen en agregados en un modelo de autoensamblaje *in vitro* y que estos, son similares a las marañas aisladas de cerebros de pacientes con EA (Rankin y cols., 2007).

Así, se ha propuesto que la hiperfosforilación de tau en la EA, puede estar relacionada con un incremento en la actividad de proteínas cinasas o con un decremento en la actividad de las fosfatasas (Trojanowski y Lee, 1995).

Aparte de la fosforilación, otras modificaciones post-traduccionales que inducen el ensamblaje de tau se han estudiado en los últimos años. Se sabe en la actualidad, que las 6 isoformas de la proteína tau están presentes en los FHA (Jakes y cols., 1991). De acuerdo con resultados provenientes por degradación proteínica y con anticuerpos específicos, se sugiere que los FHA están formados por un núcleo mínimo estructural o "core" que contiene los tres dominios repetidos proteína tau, mientras que el resto de tau (la parte N-terminal y C-terminal), forma una envoltura enmarañada o "fuzzy coat" que puede ser removida por proteasas (Wischnik y cols., 1988).

Por otra parte, se ha postulado que en el desequilibrio del potencial de óxido-reducción de la célula nerviosa puede contribuir a la formación de agregados (Buée y cols., 2000). Experimentos utilizando construcciones de proteína tau recombinante (proteína total o construcciones que sólo contienen los dominios de unión a MT), puede agregarse en FHA. Se ha demostrado que el primer paso esencial para este proceso

es la formación de dímeros antiparalelos unidos por puentes disulfuro intermoleculares (entre dos moléculas de tau), en la cisteína 322 debido a la oxidación de sus grupos tioles (Wille y cols., 1992). Asimismo, la parte media del C-terminal que incluye un dominio repetido se autoensambla formando a los FHA de manera más eficiente que toda la proteína entera, consistente con su posición en el núcleo de los FHA en la EA. Este ensamble puede ser inhibido bloqueando el grupo tiol (SH), del residuo de cisteína 322, sustituyéndolo por un residuo de alanina o manteniendo a la proteína tau en un ambiente reductor. Del mismo modo, en construcciones de la proteína tau con 4 dominios de unión a MT, los repetidos 2 y 3 pueden ser unidos vía puentes disulfuro intramolecular (entre la misma molécula de tau), involucrando los residuos de cisteína 291 y 322, respectivamente. Así, estas construcciones forman monómeros compactos sin formación de FHA, lo que explicaría que las isoformas de tau con 4 repeticiones se ensamblan muy pobremente. Lo anterior sugiere que los dímeros de cisteínas pueden probablemente ser importantes en la formación de “bloques o semillas” para la nucleación de los FHA (Schweers y cols., 1995).

Por otro lado, también se ha observado que los polianiones aumentan la eficacia de ensamble, presumiblemente por compensar las cargas positivas de tau. Los glicosaminoglicanos (GAGs), son carbohidratos unidos a proteoglicanos, los cuales son polisacáridos que contienen ácido hexurónico y hexosamina, los cuales pueden ser modificados por sulfatación y acetilación. Existen 4 clases de GAGs, los cuales incluyen sulfato de condroitina, sulfato de dermatán, sulfato de queratán y sulfato de heparán. Este último, es el más complejo GAG, ya que contiene ácido glucurónico unido a N-acetilglucosamina. En la EA, los proteoglicanos se encuentran en los depósitos amiloides y en las MNF (Snow y cols., 1992), sugiriendo una fuerte interacción entre el péptido β A y los GAGs (Buée y cols., 1993), y sobre todo en la participación del autoensamble de la proteína tau ya que se ha observado que estos pueden unirse con los dominios de unión a MT, aumentando la agregación de tau y alterar el ensamble de los microtúbulos (Goedert y cols., 1996, Pérez y cols., 1996). El ensamble de isoformas con 3 dominios de unión a MT, generan filamentos con una morfología muy semejante a los FHA, mientras que las isoformas con 4 dominios de unión a MT forman filamentos con apariencia más recta. La secuencia aminoacídica corta (VQIVYK), en el tercer dominio de unión a MT de tau se ha sugerido que es esencial en el ensamble de los filamentos inducidos por heparina (von Bergen y cols., 2000), además de que este ensamble en la presencia de GAGs ocurre después de un periodo lento y depende de su concentración (Pérez y cols., 1996)

Asimismo, otros polianiones como los glicolípidos, se han observado en asociación con los FHA (Goux y cols., 1996). Ácidos grasos como el ácido araquidónico, factores

intracelulares ARN, (el cual ha sido encontrado en las marañas neurofibrilares), o péptidos acídicos como el poliglutamato pueden aumentar *in vitro* la formación de los FHA (Kampers y cols., 1996; Wilson y Binder, 1997; Friedhoff, y cols., 1998).

Vías de señalización involucradas en la enfermedad de Alzheimer.

Función de la vía de señalización Wnt.

Se sabe que durante el desarrollo embrionario, la vía de señalización Wnt, juega un papel crucial en la adhesión celular, proliferación celular y la determinación del destino de la célula (Wodarz y Nusse, 1998, Chong y Maiese, 2004). Los defectos en esta vía de señalización, resulta desde anomalías en etapas tempranas del desarrollo hasta la oncogénesis (Dale y cols., 1998). Aún cuando el papel de la vía de señalización Wnt en neuronas maduras no es del todo claro, datos recientes indican que puede ser un importante regulador de la morfología neuronal, neurogénesis y plasticidad sináptica (Salinas, 1999; Yu y Malenka, 2003; Lie y cols., 2005)

Los genes Wnt presentes en el humano fueron identificados por su secuencia homóloga con los primeros miembros descritos de esta familia: Wnt-1 en el ratón y wingless en *Drosophila* (Nusse y cols., 1992). Estos genes codifican glicoproteínas, usualmente de 350 a 400 aminoácidos de longitud, con un patrón conservado de residuos de cisteína. Existen un total de 24 proteínas Wnt (Nusse, 2000). Estas proteínas interactúan con receptores de la familia Frizzled para activar señales intracelulares por medio de dos vías, la transcripción de genes (mediada por la vía canónica y la vía de polaridad celular planar), y el flujo de Ca^{2+} de pozas endógenas (Rattner y cols., 1997; Salinas, 1999). A la fecha, se han identificado 10 miembros de la familia Frizzled que codifican a receptores con 7 dominios transmembranales con dominios extracelulares ricos en cisteínas y con extremos carboxil intracelulares (Widelitz, 2005).

En la vía Wnt canónica, se conoce que la presencia extracelular de ligandos de Wnt que se unen a receptores Frizzled junto con los co-receptores denominados proteínas relacionadas con el receptor de lipoproteína de baja densidad 5 y 6 (LRP 5/6), traducirán su señal al espacio intracelular por medio del reclutamiento de la proteína Dishevelled (Dvl en mamíferos). Dicho reclutamiento resulta en la desestabilización del complejo proteínico compuesto por la proteína axina, la proteína supresora de tumores de pólipos adenomatosos de colon (APC), β -catenina y la cinasa sintasa de glucógeno (GSK-3 β), lo que resulta en una estabilización de β -catenina. La inhibición de GSK-3 β

favorece el incremento de los niveles de β -catenina en el citoplasma permitiendo a la β -catenina libre traslocarse al núcleo y formar un complejo con miembros de la familia de factor de células T y el factor aumentador linfoide (TCF/LEF), para promover la expresión de numerosos genes (Novak y Dehhar, 1998; Gordon y Nusse, 2006). En ausencia de ligandos de WNT o en la presencia de inhibidores de la vía Wnt tales como la proteína extracelular Dickkopf-1 (Dkk-1) o de las proteínas solubles relacionadas con Frizzled (sFRP 1-4), sizzled, cerberus, entre otras, la β -catenina permanece asociada al complejo antes mencionado. Esta asociación permite que la fosforilación de la β -catenina mediada por GSK-3 β , resulte en su ubiquitinización y subsecuente degradación por el proteosoma (Aberle y cols., 1997). Mientras que miembros de la familia TCF/LEF asocia a β -catenina libre, en ausencia de señal de Wnt esta familia se asocia con Groucho, un inhibidor transcripcional (Nusse, 1999), (Fig. 8). Esta inhibición de los antagonistas es debida a que estas glicoproteínas contienen dominios ricos en cisteínas, con homología a los dominios del receptor Frizzled (Kawano y Kypta, 2003), lo que permite “secuestrar” a los ligandos de Wnt (Jones y Jomary, 2002).

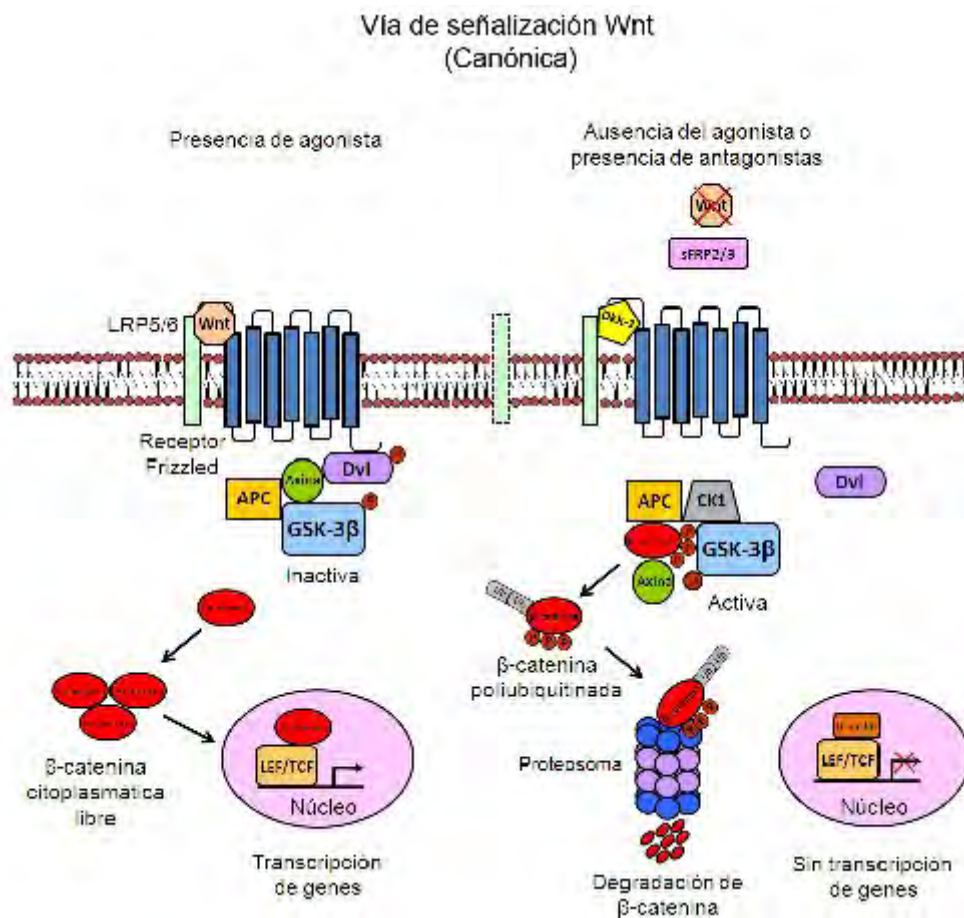


Figura 8. Modelo de la vía de señalización de Wnt canónica. Como se indica en la parte izquierda, la presencia del ligando Wnt activa el receptor Frizzled activando a su vez, a la proteína Dvl (conocida también como Dsh), la cual secuestra al complejo proteínico formado

por las proteínas APC, Axina y GSK-3 β , evitando en turno que la proteína β -catenina sea fosforilada, la cual al estabilizarse se incrementa en el citoplasma, trasladándose al núcleo y activando a los factores de transcripción LEF/TCF para promover expresión genética. Caso contrario (derecha), cuando hay ausencia de ligando o presencia de reguladores negativos (sFRP 2/3, Dkk-1), Dvl no es capaz de interactuar con el complejo proteico, permitiendo que GSK-3 β fosforile a β -catenina y dirigiéndola a vías de degradación proteínica. Esto provoca que no haya suficiente β -catenina que se trasloque al núcleo evitando así, la expresión de genes (Modificado de Inestrosa y cols., 2007).

Relación de Wnt con diferentes patologías.

Como se comentó anteriormente, alteraciones de la vía de señalización Wnt produce anomalías en el desarrollo embrionario, oncogénesis y neurodegeneración (Dale y cols., 1998; Widelitz, 2005, Caricasole y cols., 2005). Asimismo, modificaciones en la vía de señalización Wnt han sido relacionadas en desórdenes neurológicos asociados con anomalías en el desarrollo tales como la esquizofrenia (Cotter y cols., 1998), desórdenes psiquiátricos como la enfermedad bipolar de tipo 1 (Quiroz y cols., 2004), en el daño neuronal inducido por estímulos excitotóxicos o eventos isquémicos (Cappuccio y cols., 2005); la degeneración neuronal (esclerosis), relacionada con la epilepsia del lóbulo temporal (Busceti y cols., 2007); y en patologías neurodegenerativas crónicas tales como la enfermedad de Alzheimer (Anderton y cols., 2000; De Ferrari e Inestrosa, 2000; Caricasole y cols., 2003, De Ferrari y Moon, 2006; Inestrosa y cols., 2007).

La generación del péptido β A se lleva a cabo a partir de la proteólisis de la proteína precursora del amiloide (APP), por la acción de varias proteasas como la β -secretasa y la γ -secretasa (dentro del cual, la presenilina es el componente enzimático de este complejo proteínico). La función de las presenilinas (PS), se relaciona en su localización subcelular en el ER/IC (retículo endoplásmico/compartimiento intermedio), y su interacción con proteínas específicas (como la APP). La presenilina 1 (PS1), puede interactuar con α - y β -catenina. Mientras que el significado de esta interacción no se conoce para el procesamiento de APP, experimentos recientes muestran la presencia de complejos presenilina- β -catenina, que incrementa la estabilidad de β -catenina (Kang y cols., 2002). En la EA familiar, las mutaciones en PS1 causan desestabilización de β -catenina (incremento en la degradación) y daño al tráfico de proteínas membranales y este efecto podría potenciar la apoptosis en las neuronas (Zhang y cols., 1998; Nishimura y cols., 1999). Otros estudios también han mostrado que la PS1 es capaz de interactuar con GSK-3 β de manera independiente de la proteína tau (Takashima y cols., 1998). Debido a que los niveles de GSK-3 β se

encuentran predominantemente en somas neuronales y en sus procesos, y que esta cinasa fosforila a la proteína tau (ver sección tau), se ha observado que también se halla co-localizada junto con las MNF (Pei y cols., 1997, Pei y cols., 1999). Asimismo, se ha observado que la muerte neuronal y la hiperfosforilación de la proteína tau inducida por el péptido β A, puede protegerse por litio, un inhibidor ampliamente descrito de GSK-3 β o por modulación (activación) de la vía de señalización Wnt (Álvarez y cols., 1999; Álvarez y cols., 2004), sugiriendo un papel importante de GSK-3 β en la fosforilación de tau y neurodegeneración. Aunado a estos hallazgos, Caricasole y cols. (2004), demostraron que en cerebros de pacientes con EA, existe una inducción del modulador negativo de Wnt, Dkk-1, y que esta glicoproteína induce hiperfosforilación de tau a través de GSK-3 β en cultivos corticales primarios (Scali y cols., 2006).

Por esta razón, la señalización a través de la vía Wnt podría ser un nexo importante entre la generación de las placas seniles y las marañas neurofibrilares observados en cerebros de pacientes con EA (De Ferrari e Inestrosa, 2000).

Función de la vía de señalización de la cinasa de fosfatidilinositol 3 (PI3K/Akt).

Por otra parte, la vía de señalización de la cinasa de fosfatidilinositol 3 (PI3K/Akt) tiene un papel muy importante en la diferenciación y en la sobrevivencia de las células neuronales y gliales (Rodger y Theibert, 2002). Cuando un ligando apropiado (ya sea la insulina o factor de crecimiento semejante a insulina 1, IGF-1), se une a su receptor, la subunidad catalítica de PI3K (subunidad p110), fosforila el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂), en la posición de 3' del anillo de inositol, para generar fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃), activando así, a la cinasa dependiente de fosfoinositidos 1 (PDK-1). Mientras tanto, proteínas de señalización con dominios con homología de pleckstrina (PH), son reclutadas hacia la superficie interna de la membrana plasmática. Así, la cinasa de serina-treoninas Akt (también conocida como proteína cinasa B, PKB), que presenta dominios PH, es reclutada y fosforilada por PDK-1, a un residuo de treonina (Thr³⁰⁸), seguida de una segunda fosforilación en la serina (Ser⁴⁷³), por PDK-2, estimulando la actividad catalítica de Akt y a su vez, fosforilando a una serie de blancos tales como proteínas que regulan el ciclo celular (p21, p27, ciclina D1), proteínas involucradas en síntesis *de novo* de proteínas (mTOR), inhibiendo proteínas pro-apoptóticas (Bad), la inhibición de factores de transcripción (forkhead) que activan genes relacionados con apoptosis o inactivando a proteínas involucradas en el metabolismo como GSK-3 β , permitiendo la glicólisis y el transporte de glucosa (Brunet y cols., 2001; Cantley, 2002). Por otra parte, la actividad de PI3K se contrapone por la

acción de fosfatasas de lípidos, tal como la fosfatasa y homólogo de tensina suprimida del cromosoma 10 (PTEN), el cual remueve el fosfato en la posición 3' de PIP₃, regenerando PIP₂ y atenuando la señalización por debajo de la PI3K/Akt activada. Esta regulación de los niveles de PIP₃ en la célula proporciona un control que es esencial para mantener el balance fino requerido para un crecimiento celular controlado (Dillon y cols., 2007), (Fig. 9).

Vía de señalización de la cinasa Fosfatidilinositol 3/Akt

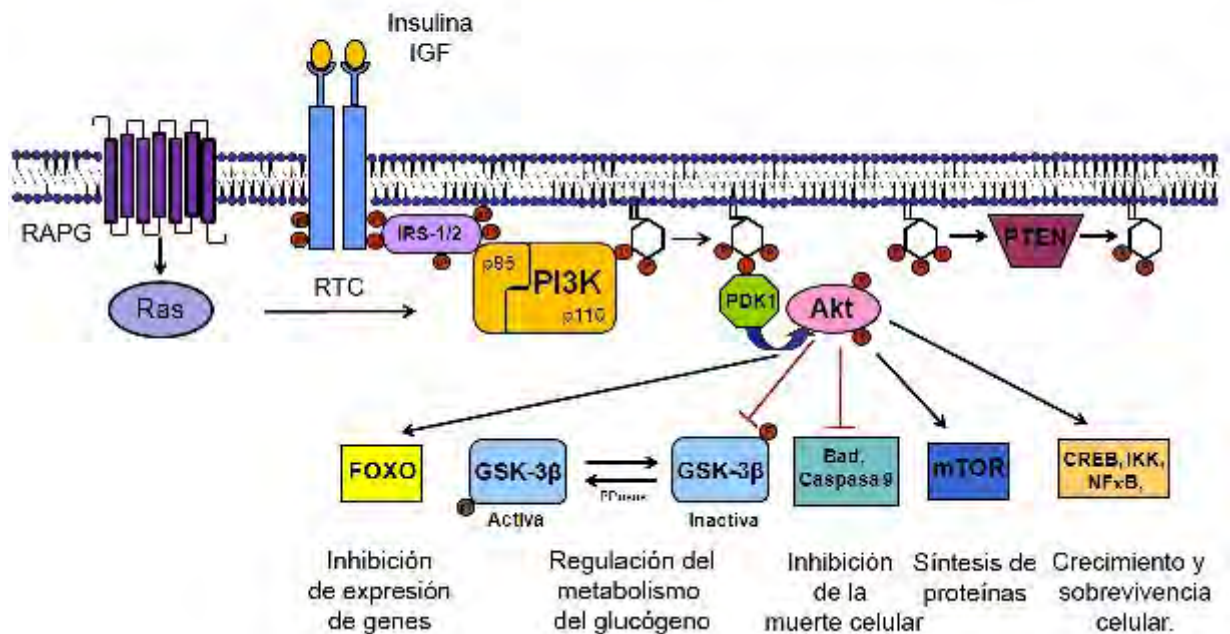


Figura 9. Esquema representando la vía de señalización de la cinasa de fosfatidilinositol 3/Akt (PI3K/Akt). Por una parte, la unión de factores de crecimiento activa a receptores acoplados a proteínas G (RAPG), o cuando se une la insulina o el factor de crecimiento semejante a insulina (IGF) que activan los receptores de tirosin cinasa (RTC), ambos estimulan la fosforilación de PI3K. Esta cinasa convierte el fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂), a fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP₃), activando la cinasa dependiente de fosfoinositidos (PDK). Mientras, Akt se transloca a la membrana celular e interactúa con PIP₃ vía su dominio PH, ésta será fosforilada por PDK. Una vez activa Akt, esta cinasa controla muchos procesos fundamentales tales como el ciclo celular o el crecimiento (Modificado de Rodger y Theibert, 2002).

Relación de PI3K/Akt con la enfermedad de Alzheimer.

En años recientes, se ha buscado el posible papel de la vía PI3K/Akt en la patología de Alzheimer. En este sentido, se sabe que la Diabetes tipo 2 (DT2), es un factor de riesgo para desarrollar la demencia de Alzheimer (Ott y cols., 1999, Janson y cols., 2004)). En el síndrome pre-clínico de la DT2, la hiperinsulinemia (aumento en la concentración de insulina en la sangre), provoca a largo plazo una insensibilidad del receptor a insulina o defectos de la transducción de señales (resistencia a la insulina) (de la Monte y Wangs, 2005). Debido a que esta vía es regulada por insulina y por IGF-1, se ha propuesto que en la EA existe daño en la señalización de la insulina, provocando una reducida utilización de la glucosa, incremento en la activación de GSK-3 β , déficit en la producción de energía, incremento en el estrés oxidativo, una reducida sobrevivencia neuronal (Hoyer, 1998; de la Monte y Wangs, 2005). Siguiendo con estas afirmaciones, Freude y cols. (2005) han demostrado que la hiperinsulinemia periférica en murinos, altera la señalización de la insulina incrementando la fosforilación del receptor, activa la cinasa activada por mitógenos (MAPK), y la vía de PI3K/Akt y aumenta la fosforilación de la proteína tau en el residuo Ser²⁰² (Freude y cols., 2005).

Como se ha dicho anteriormente, un importante regulador cascada arriba de GSK-3 β es Akt/PKB, una enzima cuya función es regular a la baja (inhibir), la actividad de la cinasa mediante la fosforilación de la Ser⁹ (Cohen y cols., 1997). Además, estudios que apoyan aún más el eslabón entre Akt/PKB y la demencia de Alzheimer han mostrado que la activación de la vía de señalización PI3K/Akt protege contra la neurotoxicidad del péptido β A *in vitro* (Martin y cols., 2001; Wei y cols. 2002), y en modelos de animales transgénicos de la EA (Stein y Johnson 2002). Aunado a esto, se ha observado que la actividad de la cinasa Akt/PKB es regulada a la baja en células de riñón humano (HEK), que sobre expresan la proteína precursora del amiloide mutada y en cultivos de linfoblastos de pacientes con EA familiar (Ryder y cols., 2004), lo que sugiere que esta importante vía de sobrevivencia podría estar alterada. Sin embargo, contrario a lo sugerido anteriormente, existen otros estudios en los que reportan que, más que una reducción en la actividad, existe una acumulación de Akt/PKB activa asociada con el desarrollo de la patología neurofibrilar. Por ejemplo, Pei y cols. (2003), investigaron si la actividad de Akt/PKB correlacionaba con la localización intraneuronal y progresión regional de la degeneración neurofibrilar, junto con una activación de GSK-3 β en cerebros de pacientes con EA. Igualmente, ellos encontraron selectivamente, inmunoreactividad de Akt/PKB activa (p-Thr³⁰⁸), en neuronas que contienen MNF (observadas con el anticuerpo AT8), de manera similar a lo observado

con GSK-3 β activa (p-Tyr²¹⁶) cuando co-localiza con las MNF (Pei y cols., 1999). También observaron que en muestras de cerebros con diferentes etapas de degeneración neurofibrilar (acorde con los estadios de Braak y Braak), la inmunotinción de Akt/PKB activa en neuronas presenta un patrón similar al observado al teñir las marañas con anticuerpos contra la proteína tau, sugiriendo así, que la acumulación de las cinasas Akt/PKB y GSK-3 β puede preceder a la hiperfosforilación anormal de la proteína tau (Pei y cols., 2003). Por otra parte, Griffin y cols. (2005), también demostraron un incremento en la cinasa Akt/PKB activa (p-Ser⁴⁷²), en homogenados de corteza temporal de pacientes con EA, e incremento en la fosforilación de sustratos de Akt/PKB, los cuales incluyen: GSK-3 β ^{Ser9}, tau^{Ser214}, y mTOR^{Ser2448}, aunado a una significativa pérdida y una distribución alterada del mayor regulador negativo de Akt/PKB, PTEN (Griffin y cols., 2005).

Dado lo anterior, el incremento en la activación de Akt/PKB podría causar hiperfosforilación de tau, ya que la proteína tau posee una secuencia consenso que fosforila en la Ser²¹⁴, lo cual con la fosforilación de un residuo de Thr²¹² (fosforilado por otra cinasa como GSK-3 β), forma el epítipo AT100 *in vitro* (Ksiezak-Reding y cols., 2003), el cual es muy específico de los FHA obtenidos de cerebros de pacientes con EA (Matsuo y cols., 1994, Zheng-Fischhöfer y cols., 1998).

V. HIPÓTESIS

La estabilización sostenida de los microtúbulos, o la inhibición de vías de señalización Wnt y PI3K/Akt, pueden inducir alteraciones post-traduccionales (fosforilación), de la proteína tau, además de alteraciones en la morfología neuronal lo que puede ser un paso previo a la formación de los filamentos helicoidales apareados y la neurodegeneración.

VI. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el papel del Taxol, sobre la viabilidad y morfología neuronal y su alteración en proteínas asociadas a microtúbulos *in vivo*, y la activación de la cinasa sintasa de glucógeno (GSK-3 β) al inhibir vías de señalización reguladoras Wnt y PI3K/Akt, sobre la fosforilación de la proteína tau en cultivos neuronales primarios.

VII. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Estudiar el efecto del Taxol sobre la viabilidad neuronal y su repercusión sobre la localización, distribución y contenido de la proteína tau y de su fosforilación, de la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2), y marcadores de glia (GFAP), *in vivo*.
- 2.- Estudiar la inhibición sobre la vía de señalización de Wnt y sus implicaciones en la fosforilación de la proteína tau tanto en cultivos corticales, como en rebanadas de hipocampo metabólicamente activas.
- 3.- Estudiar en cultivos neuronales primarios la inhibición de la vía de señalización de la cinasa de fosfatidilinositol 3 (PI3K/Akt), en la generación de cambios en la fosforilación de tau que puedan contribuir a la formación de los FHA.
- 4.- Valorar los posibles efectos producidos por la inhibición de ambas vías de señalización sobre la morfología en cultivos corticales primarios.

VIII. MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación de los fármacos:

El paclitaxel (Taxol™) se disolvió en dimetil sulfóxido (DMSO), y posteriormente se prepararon diferentes dosis (25, 50 y 100 nanomolas). Estas dosis se usaron para el estudio dosis-respuesta, mientras que para el curso temporal se utilizó la dosis más alta (100 nmolas), inyectando una sola vez y evaluando histológicamente a 3, 12, 24 h y 7 días posteriores a la inyección.

Los inhibidores de Wnt (sFRP-2/3, DKK-1 y Frizzled-8) se disolvieron en una solución 10mM de Tris-HCl, pH 7.4). La dosis utilizada fue de 100 nanogramos por mililitro.

La wortmanina (inhibidor de PI3K/Akt), se disolvió en DMSO para preparar una solución stock (10 mM), la concentración final utilizada fue de 350 nM.

Inyecciones estereotáxicas: Se utilizaron ratas de la cepa Wistar (250grs), las cuales se inyectaron en el área CA1 del hipocampo de la rata con diferentes dosis del fármaco, tomando las siguientes coordenadas: AP -3.6, L -2.0, V -2.5. Las ratas se anestesiaron con una mezcla de halotano 1% en 95% O₂/5% CO₂. El vehículo (DMSO), y el taxol se inyectaron por medio de una bomba a la velocidad de 1 µl/min. Las ratas fueron sacrificadas por medio de una sobre dosis de pentobarbital i.p., y perfundidas transcardiacamente con 250 ml de solución salina (0.9%) seguido por 200 ml de una solución de paraformaldehído (4%) en buffer de fosfatos (0.1 M, pH 7.4). Los cerebros fueron removidos y transferidos a sacarosa al 20% por 24 h y 30% por 48 horas. Posteriormente se cortaron secciones coronales de 40 µm en un crióstato y se tiñeron con violeta de cresilo para su posterior análisis. Para el caso de la dosis respuesta, se realizó el mismo procedimiento y la perfusión se llevó a cabo 24 h posteriores a la inyección con todas las dosis estudiadas. El análisis del volumen de daño, se calculó midiendo el área de lesión, haciendo la sumatoria y multiplicándolo por su grosor (40 µm).

Para el caso de la microscopia electrónica, las ratas fueron perfundidas con 200 ml de PBS, seguida de 250 ml de una solución de paraformaldehído (4%) y glutaraldehído (1%). Los cerebros fueron removidos y colocados en esta solución fijadora hasta su procesamiento.

Cultivos primarios: Los cultivos corticales primarios fueron obtenidos con el método utilizado por Brewer y cols., y modificado por Hernández-Fonseca y Massieu, 2005. Se utilizaron embriones de rata de la cepa Wistar de 17 días de gestación. Los cerebros fueron removidos y disectados libres de meninges, en una solución Krebs Ringer con albúmina y cortados en pequeñas piezas, para posteriormente ser incubados con 0.25

% de tripsina a 37° C por 10 minutos. El tejido se disoció usando una pipeta Pasteur añadiendo a la solución DNAsa e inhibidor de soya (0.08% y 0.52%, respectivamente) y la pastilla se resuspendió en medio de cultivo Neurobasal suplementado con B27, 0.5% mM de L-glutamina, 20 µg/ml de gentamicina y 0.2 mM de glutamato. Las células se cultivaron en platos de cultivo (60 mm) previamente tratados con 100 mM de poli-L-lisina a una densidad de 5×10^6 células para los estudios bioquímicos. Para el caso de la inmunocitoquímica las células se cultivaron a una densidad de 1.5×10^6 células por pozo en cajas de 12 pre-incubadas con poli-L-lisina. Los cultivos fueron mantenidos en una atmósfera húmeda (5% CO₂/95% aire) a 37° C. Después de tres días se agregó citosín arabinosido (10 µM), para inhibir la replicación de células no neuronales, se adicionó al cuarto día glucosa (5 mM). Los experimentos fueron llevados a cabo al quinto día. Los cultivos fueron tratados con los inhibidores de Wnt (sFRP 2/3, DKK-1 y Frizzled-8 100 ng/ml), y con el inhibidor de la PI3K/Akt (wortmanina 350 nM), por 24 h. Al final de la incubación, las neuronas fueron utilizadas para los estudios de inmunocitoquímica y para el análisis bioquímico de tau por electrotransferencia.

Rebanadas de hipocampo metabólicamente activas: Las rebanadas de hipocampo fueron obtenidas por el método descrito por Gong y cols. (2001), modificado por (Arias y cols., 1995). Las ratas de la cepa Wistar (230-300 gr) fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (50 mg/kg), y los cerebros fueron removidos y sumergidos rápidamente en líquido cerebrospinal artificial (LCEa), (en mM: 126 NaCl, 3.5 KCl, 1.2 NaH₂PO₄, 1.3 MgCl₂, 2 CaCl₂, 11 glucosa, 25 NaHCO₃, pH 7.4), a 4°C durante 7 min y mantenidas en constante oxigenación con una mezcla de 95% O₂ and 5% CO₂ durante todo el procedimiento. Los cerebros fueron fijados en una placa y colocados en la cámara del vibratomo sumergidas en LCEa frío. Se obtuvieron rebanadas coronales de 400 µm de espesor que rápidamente fueron colocadas en cajas de cultivo de 12 pozos. Las rebanadas fueron estabilizadas a temperatura ambiente por 1 h y después de ese periodo, fueron colocadas en un baño de incubación a 37°C e incubadas con LCEa en la presencia o ausencia del inhibidor de Wnt (Frizzled-8 100ng/ml), durante 3 h. Al final de la incubación, el hipocampo fue disectado y sonicado en 300 µl de buffer de lisis. Posteriormente, los homogenados fueron centrifugados a 14,000 rpm por 30 min y los sobrenadantes fueron colectados y almacenados a -80°C hasta su uso.

Inmunohistoquímica e inmunocitoquímica: La inmunohistoquímica se realizó para observar la organización del citoesqueleto. Los cortes de cerebro de 40µm de espesor fueron permeabilizados con una solución de 0.25% Tritón X-100 y 0.3% H₂O₂ por 30 min y bloqueadas con una solución de 5% de albumina-PBS durante toda la noche a 4°C. Después de ese tiempo, los cortes se incubaron con un anticuerpo primario anti

MAP-2, Tau-1 (independiente de fosforilación, 1:1000) GFAP y anti PHF-1 (dependiente de fosforilación 1:1000) en solución de bloqueo toda la noche a 4°C, lavados 3 veces con PBS por 5 min e inmediatamente incubados con un anticuerpo anti-ratón biotinilado (1:4000) por 1 h a temperatura ambiente. Después de 3 lavados con PBS, las células fueron procesadas con el kit de ABC-avidina-peroxidasa (Vector Laboratories), para su posterior revelado con tetrahidrocloruro de diaminobenzidina como sustrato.

Para la inmunocitoquímica los cultivos de células neuronales fueron lavadas dos veces con PBS frío y fijadas en metanol a -20°C por 5 minutos y lavadas nuevamente con PBS. Las células fueron permeabilizadas con una solución 0.25% Tritón X-100 y 0.3% H₂O₂ por 30 min y bloqueadas en solución de bloqueo (2% de suero de caballo-PBS), toda la noche a 4°C. Después de ese tiempo, se siguió el procedimiento anterior para ser reveladas.

Los controles negativos consistieron en seguir el mismo procedimiento eliminando la incubación con el anticuerpo primario.

Electrotransferencia: Los homogenados de cultivos corticales primarios y de rebanadas de hipocampo metabólicamente activas fueron utilizados para la electrotransferencia.

Las células neuronales fueron lavadas en PBS y raspadas en 100 µl de buffer de lisis consistiendo en 50 mM Tris-HCl, 1.0 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF, 0.5 µM ácido okadáico, 1.0 mM EDTA, 1% NP-40, 0.5% desoxicolato y cóctel de inhibidores de proteasas (Complete™, a pH 7.5) y sonicadas posteriormente en frío. Los homogenados fueron centrifugados a 14,000 rpm y se recolectó el sobrenadante. Se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Lowry y 40 µg de proteína fueron cargados en geles al 10% de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (PAGE), y posteriormente transferidos a membranas de nitrocelulosa por 3 h. Después de ese periodo, las membranas fueron reversiblemente teñidas con rojo de Ponceau para corroborar la aplicación de cantidades semejantes de proteína. Posteriormente, después de lavar las membranas 3 veces con PBS, se bloquearon con PBS-leche descremada al 5% toda la noche a 4°C. Las membranas se incubaron con los anticuerpos: PHF-1 (1:1000, proporcionado por el Dr. Peter Davies), anticuerpo policlonal de conejo anti fosfo-GSK-3β (p-Ser⁹, 1:1000, Sigma-Aldrich), anticuerpo monoclonal Tau-1 (1:1000, Chemicon) a 4°C durante toda la noche. Después de 3 lavados con PBS/0.1% Tween 20 durante 5 min, cada membrana fue incubada con un anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano (1:15,000, Santa Cruz Biotechnology), durante 1 h a temperatura ambiente; lavadas 3 veces con PBS-Tween por 5 min y la señal fue revelada por quimioluminiscencia (ECL

kit de Amersham) y detectada en placas X-Omat (Kodak). El mismo procedimiento se llevo a cabo con los homogenados de rebanadas de hipocampo metabólicamente activas. El control de carga se realizo utilizando un anticuerpo contra β -actina (1:1000, Sigma-Aldrich).

Morfología nuclear: Para observar la morfología nuclear se utilizo el colorante fluorescente DAPI, que se intercala específicamente en las pares de bases adenina-timina. Secciones de 20 μ m fueron teñidas con DAPI (0.1 μ g/ml de DAPI en PBS) por 20 min a temperatura ambiente y después de dos lavados subsecuentes con PBS, se observaron en un microscopio de fluorescencia.

Microscopía electrónica: Los cerebros previamente fijados fueron removidos y una vez disectados los hipocampos, se obtuvo sólo la región de CA1 (contralateral e ipsilateral). Después de ser lavados con PBS, las secciones fueron embebidas en resina (Epon), cortadas en un ultramicrotómo y teñidas con acetato de uracilo/citrato de plomo. Las muestras fueron observadas en un microscopio Jen 1200 EX II.

Estadística:

Para valorar diferencias significativas en el volumen de lesión y en el número de núcleos fragmentados y condensados, se realizó una prueba estadística de ANOVA seguida de una prueba *pos hoc* de Fisher. En el caso de diferencias significativas en el contenido de proteína tau fosforilada y fosforilación de la serina 9 de GSK-3 β , la densidad óptica fue medida con el programa NIH Image J y convertida a porcentaje con respecto al control. Los resultados fueron analizados con una prueba estadística de *t* de student no pareada.

IX. RESULTADOS

Efectos neurotóxicos del Taxol en la región de CA1 del hipocampo.

Poco se conoce sobre las anomalías neuronales que produce los cambios post-traduccionales en la proteína tau y la alteración en la estabilización de los microtúbulos, lo cual puede dañar el transporte axonal y llevar a la muerte neuronal *in vivo*.

La inyección de una dosis de 100 nmolas de Taxol indujo una serie de cambios celulares en la región CA1 del hipocampo a lo largo del tiempo. Estos cambios se presentaron desde las primeras 3 h y consistieron en un adelgazamiento de la capa de células piramidales de CA1, y cambios en la morfología de las neuronas, de forma redondeada (Fig. 10 A, control) a una forma alargada (Fig. 10 B), estos cambios se observaron con la tinción de Nissl. 12 h posteriores a la inyección del Taxol, los cambios morfológicos neuronales progresaron y los núcleos de las células aparecieron picnóticos (Fig. 10 C). 24 h después de la inyección el patrón de pérdida celular fue más evidente (Fig. 10 D).

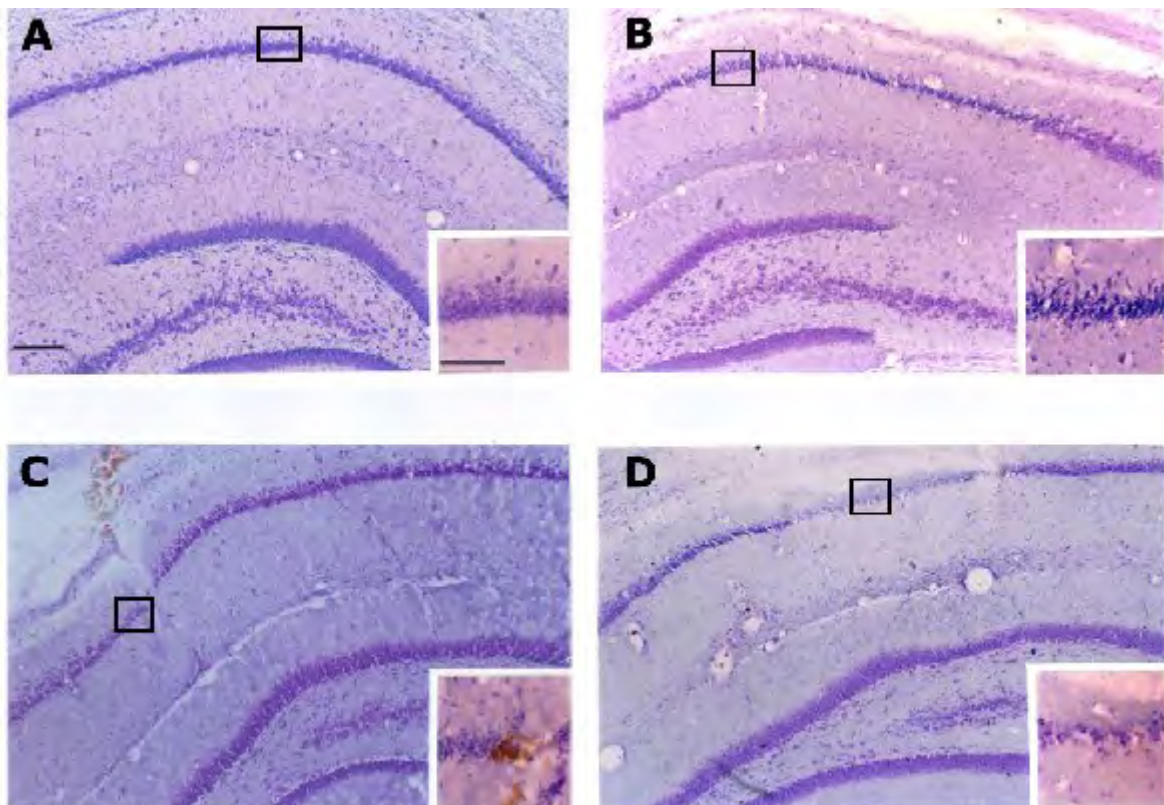


Figura 10. Curso temporal de los cambios en la morfología neuronal del hipocampo de la rata inyectado con Taxol 100 nmolas, observados con tinción de Nissl. En A se muestra un hipocampo contralateral; B, 3 h después de la inyección; C, 12 h, D, 24 h después de la

inyección. Se aprecia el daño causado por la inyección de Taxol (formación de núcleos picnóticos) a los diferentes tiempos. Los recuadros muestran la amplificación de la zona de daño. Barra = 200 μm y 100 μm (recuadro).

Con respecto a los siete días posteriores a la inyección, el Taxol también produjo daño a las células piramidales de la región de CA1 de manera muy similar al observado a las 24 horas (datos no mostrados).

Como se muestra en la figura 11, la intensidad de los efectos neurotóxicos del Taxol 24 h después de su inyección, dependieron de la dosis empleada. Prácticamente no se observó daño con la dosis menor de 25 nmolas (Fig. 11 B). La inyección de 50 nmolas de Taxol produjo un claro efecto neurotóxico que se vio incrementado con la dosis de 100 nmolas (Fig. 11 C, 11 D respectivamente). Los animales controles, inyectados con el vehículo (DMSO), presentaron un pequeño daño alrededor del tracto de la aguja de inyección muy semejante al producido con la dosis de 25 nmolas (Fig. 11 A). Cabe destacar que aunque la dosis más alta (100 nmolas), fue la única estadísticamente significativa, se pudo observar una clara tendencia de un mayor volumen de lesión a medida que se aumenta la dosis de Taxol. En la tabla 1, se muestra el volúmen de la lesión.

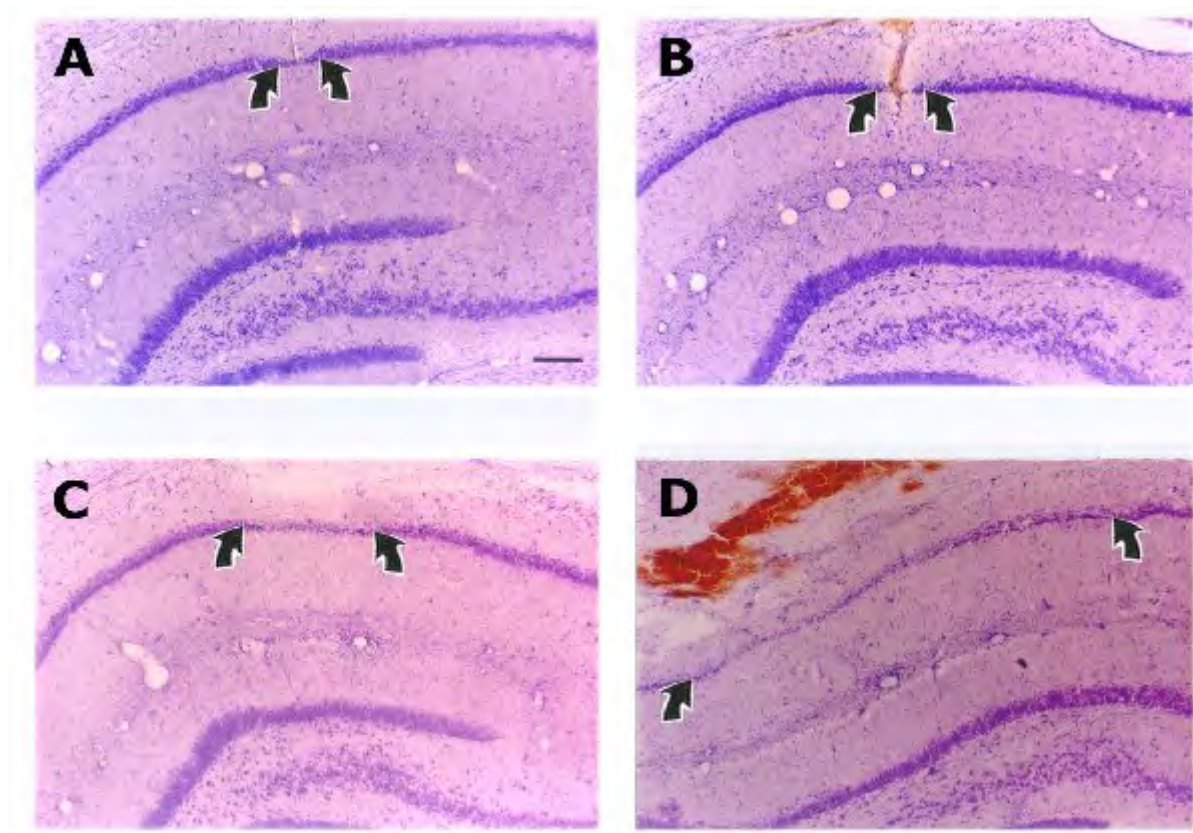


Figura 11. Dosis-respuesta de los efectos del Taxol en el hipocampo de la rata 24 h posteriores a la inyección. En A se muestra un hipocampo inyectado con vehículo (DMSO); B,

25 nmolas; C, 50 nmolas y D, 100 nmolas de Taxol. Nótese que el mayor volumen de lesión es directamente proporcional al aumento de la dosis. Imágenes representativas de 3-7 experimentos. Las flechas indican el comienzo y el final de la lesión. Barra = 200 μm .

Tabla 1.
Curva dosis respuesta de los efectos tóxicos del Taxol

Dosis de Taxol (nmolas)	Volúmen de lesión (mm^3)
0	0.28 ± 0.05 (6)
25	0.47 ± 0.20 (6)
50	0.96 ± 0.42 (7)
100	$2.62 \pm 0.84 *$ (10)

El tamaño del volumen de lesión (mm^3), fue medido en ratas inyectadas con vehículo (DMSO) comparado con diferentes dosis de Taxol. Los datos representan el promedio \pm ES del número de animales (en paréntesis), (*) $P < 0.05$ comparado con animales tratados con vehículo.

Para observar posibles cambios en la morfología nuclear, se utilizó un intercalante de bases de DNA, el 4,6-Diamino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI), 24 h después de la inyección con Taxol 100 nmolas. Muchos núcleos fueron positivos a DAPI en la región de CA1 del hipocampo. Con el uso de esta técnica, se observó la presencia de núcleos fragmentados y condensados comparados con hipocampos inyectados con el vehículo (DMSO) (Fig. 12 A), lo que sugiere una posible inducción de mecanismos apoptóticos en neuronas piramidales de CA1 y en células no neuronales en presencia de Taxol (Fig. 12 B).

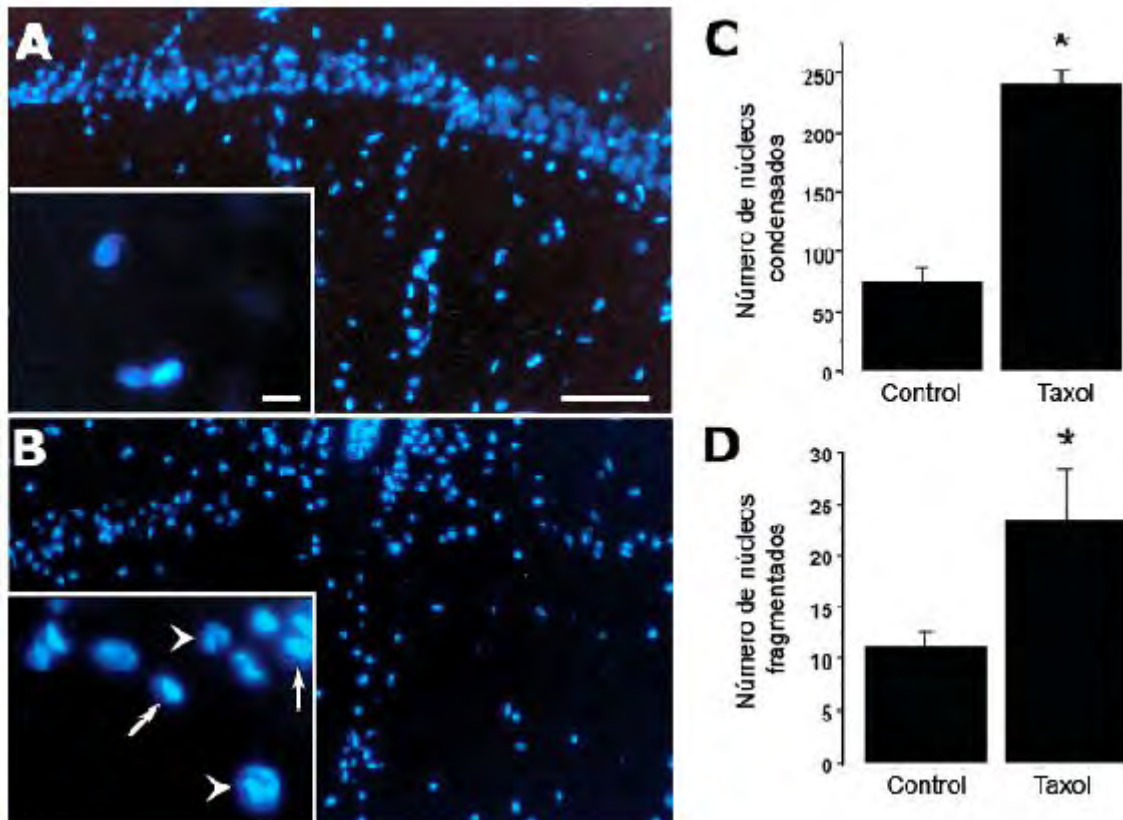


Figura 12. Fotomicrografía donde se muestra la morfología nuclear de células piramidales de CA1 al ser inyectadas con vehículo (A), o con 100 nmolas de Taxol después de 24 h. El recuadro en B muestra núcleos condensados (flechas), y núcleos fragmentados (cabeza de flecha). Los datos (C y D), son el promedio de los núcleos condensados o núcleos fragmentados \pm ES de dos cortes por rata de 3 ratas. * $p < 0.05$. Barra = $100\mu\text{m}$ y $10\mu\text{m}$ (recuadro).

Efectos del Taxol en la ultraestructura celular.

Con el fin conocer cambios ultraestructurales después de la inyección con Taxol, se analizaron muestras cercanas al sitio de inyección (CA1), por microscopia electrónica. Los hipocampos inyectados con Taxol revelaron la presencia de daño en el tejido, caracterizado principalmente por dendritas y mitocondrias hinchadas comparadas con el tejido control (Fig. 13 A), y más notable aún, la ausencia de sinapsis y una visible alteración en la red de microtúbulos de manera discontinua (Fig. 13 B).

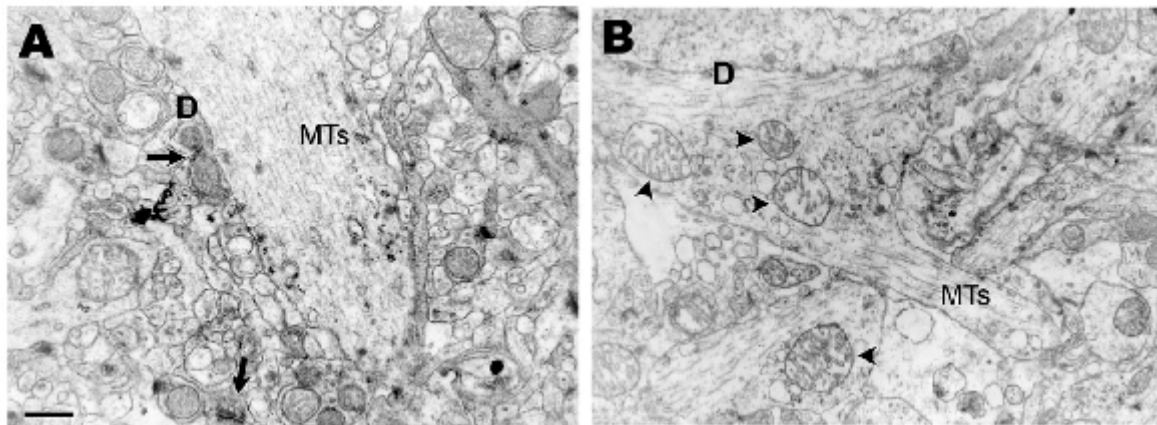


Figura 13. Micrografía representativa ilustrando dendritas de la región de CA1 del hipocampo de la rata. En A se muestra el tejido inyectado con vehículo (control), observando microtúbulos intactos y continuos (MTs), sinapsis (flechas) y mitocondrias sanas. 24 h después de la inyección de Taxol (100 nmolas), se observa un aparente cambio en la disposición de los microtúbulos (apariencia discontinua), y cambios morfológicos en dendritas y mitocondrias hinchadas (cabeza de flecha). Barra = 0.5 μm .

Efectos del Taxol sobre proteínas del citoesqueleto.

De acuerdo con varios reportes de la literatura (De Camilli y cols., 1984; Arias y cols., 1997), la localización principal de MAP2 es en la zona del *stratum radiatum* (dendritas), y prácticamente ausente en somas de células piramidales (Fig. 14 A y E). Después de la inyección de Taxol 100 nmolas, se observaron cambios notables consistiendo en una acumulación de la proteína a lo largo de la dendrita. El cambio en la distribución de esta proteína en el *stratum radiatum* de CA1 se evidenció desde las 3 h posteriores a la inyección (Fig. 14 B y F), siendo más evidente a las 12 h (datos no mostrados), y persistiendo después de 24 h. Además del cambio en su distribución, se observó una redistribución hacia los somas neuronales y presencia de neuritas distróficas (Fig. 14 C y G). En cambio, a partir de los 7 días se pudo observar una ausencia del patrón dendrítico normal, posiblemente causado por la pérdida de neuronas hipocampales (Fig. 14 D y H).

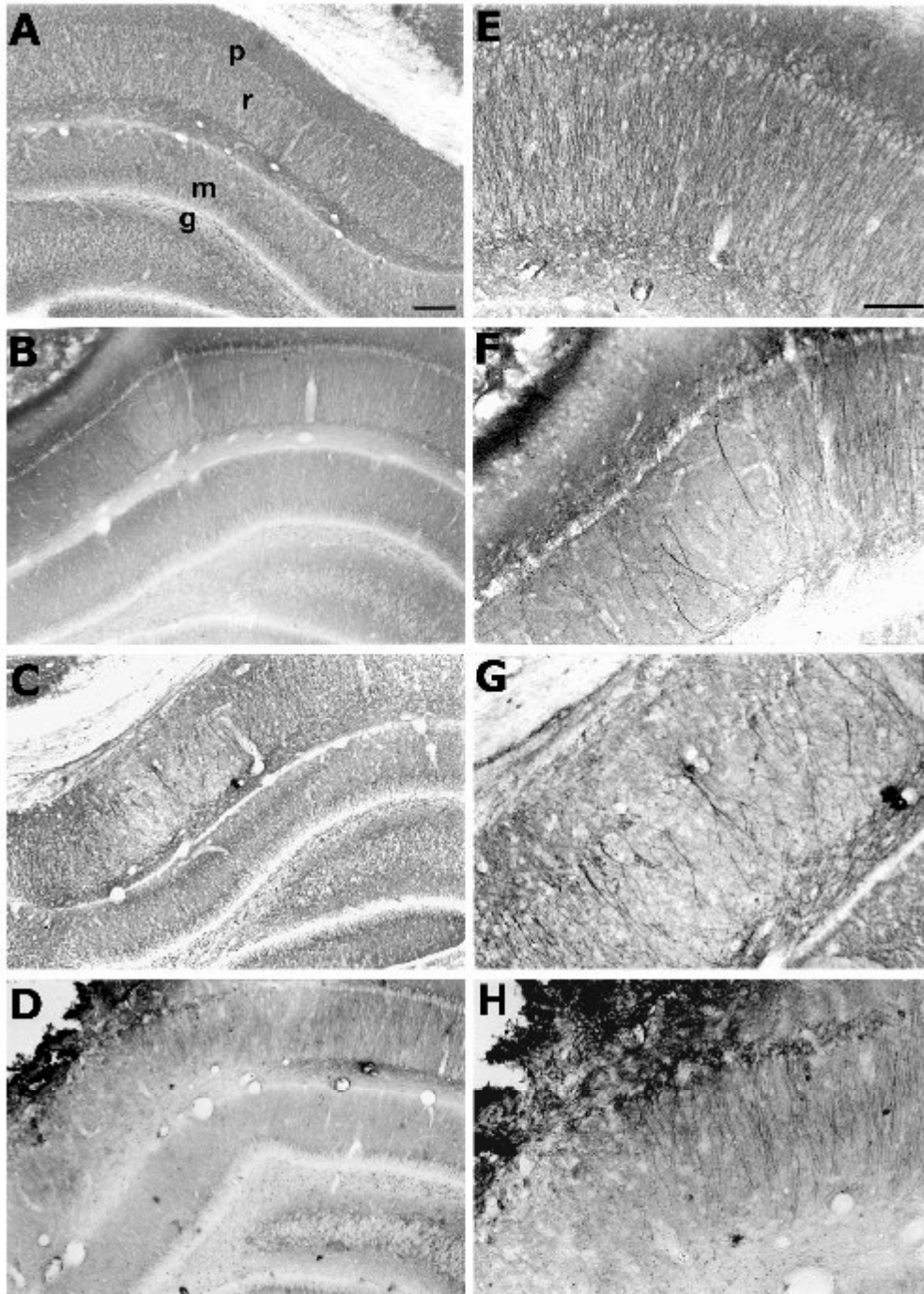


Figura 14. Análisis inmunohistoquímico del patrón de distribución de la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2), 3, 24 h y 7 días después de la inyección intrahipocámpal de 100 nmolas de Taxol. A, patrón de distribución normal de MAP2; E, amplificación del patrón normal de MAP2; B y F, cambios en el contenido y distribución de MAP2 a las 3 h después de la inyección, C y G muestran cambios marcados en distribución y contenido de MAP2 a las 24h. A los 7 días se observa daño y una pérdida del patrón dendrítico (D y H). Los paneles de la derecha (E, F, G y H), muestran un aumento de 100x de los cambios observados en MAP2. Imágenes representativas de 4 experimentos. p= *stratum pyramidale*; r= *stratum radiatum*; m= *stratum lacunosum-moleculare*. Aumentos 40x (barra = 200 μ m) y 100x (barra = 100 μ m).

Con respecto a la distribución de la proteína tau, ésta se observó en hipocampos controles de forma muy similar al reportado por Dotti y cols. (1987). La inmunotinción fue evidente en el neuropilo, pero no en los somas neuronales. Dentro de la capa molecular, la inmunoreactividad fue intensa en la capa molecular interna y media y relativamente ligera en la capa externa. A través de la fisura hippocampal de CA1, la inmunotinción fue uniforme en el *stratum lacunosum-moleculare*, *stratum radiatum* y *stratum oriens*. Los somas neuronales en el *stratum pyramidale* no se observó inmunotinción de tau (Fig. 15 A).

Los animales inyectados a los 7 días mostraron un rebrote de axones localizado en el *stratum oriens* de la región de CA3 en ambos lados del hipocampo (con mayor inmunoreactividad en el lado ipsilateral), correspondiente a la vía de fibras musgosas que comunica a las células granulares del giro dentado hacia CA3 (Fig. 15 B). Después de 7 días posteriores a la inyección, la aparición de fibras inmunopositivas a PHF-1 (Ser^{396/Ser404}) (Fig. 15 C recuadros), en el *stratum moleculare*, *oriens* y principalmente en la zona del hilus (giro dentado) fueron notables. Algunos somas presentaron inmunoreactividad al anticuerpo PHF-1 en el lado inyectado, particularmente en la zona subgranular del giro dentado (Fig. 15 D y E).

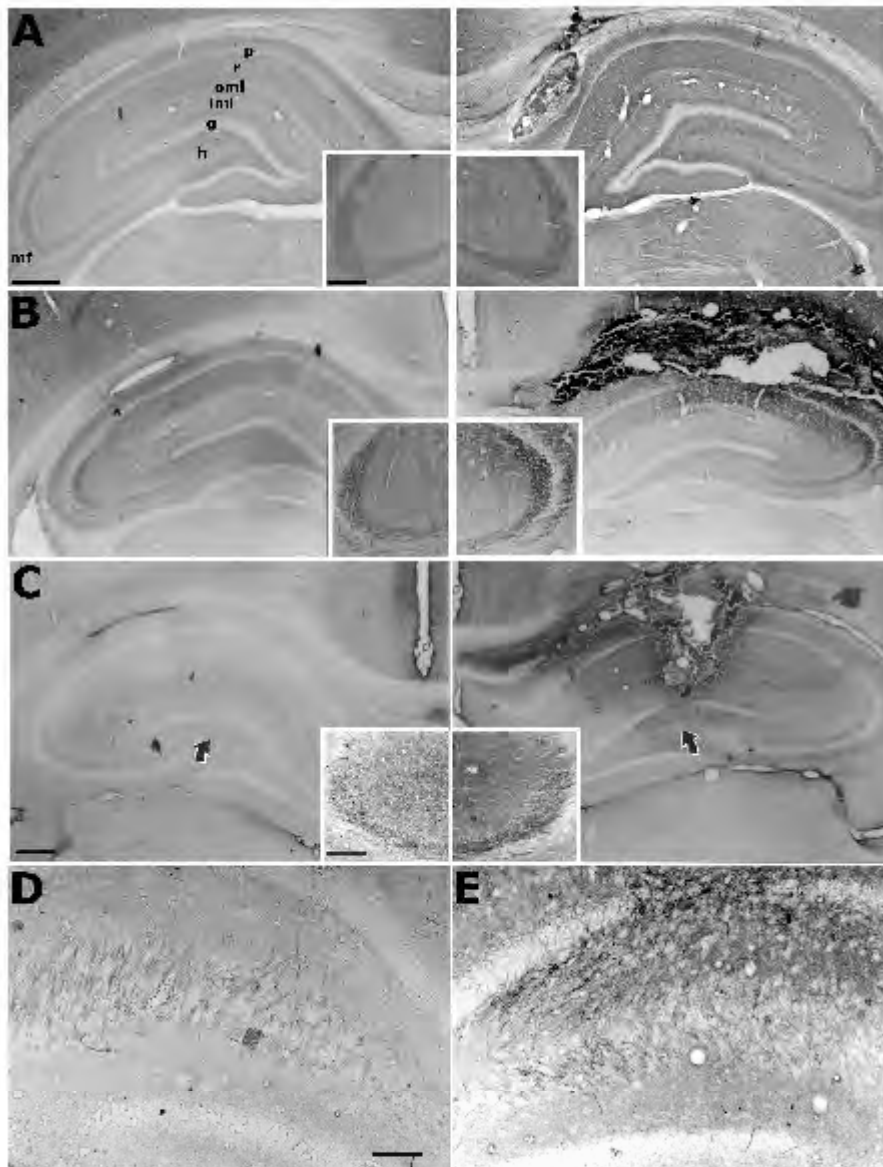


Figura 15. Curso temporal de los cambios en la inmunoreactividad para Tau-1, 24 h (A), y 7 días (B), y PHF-1 siete días después de la inyección de Taxol (100 nmolas, C y D). 24 h después de la inyección, la tinción con Tau-1 se incrementó ligeramente en la capa molecular interna y en el *stratum radiatum* (A). Después de 7 días, hay una pérdida en la inmunoreactividad en la capa molecular interna y externa (B), pero un incremento en nuevas fibras musgosas del *stratum oriens* (B recuadros). Además, 7 días posteriores a la inyección con taxol se observó la presencia de fibras musgosas positivas para PHF-1 en la región de CA3 (C recuadros). La presencia de fibras y somas inmunopositivas para PHF-1 en la región del hilus son más evidentes del lado ipsilateral que del contralateral (E comparado con D). p= *stratum pyramidale*, r = *stratum radiatum*, oml = capa molecular externa, iml = capa molecular interna, g = capa granular, h = hilus, mf = fibras musgosas. Barra = 500 μ m y 200 μ m (recuadros).

Para conocer el efecto del Taxol sobre células no neuronales, se utilizó el anticuerpo GFAP que reconoce un elemento del citoesqueleto (filamento intermedio) de

astrocitos. La figura 16 A y E muestran el patrón de distribución y forma de las células positivas a GFAP. Después de 3 y 24 h de la inyección con la dosis más alta (100 nmolas), se observó una gliosis reactiva en el hipocampo ipsilateral rodeando el sitio de lesión mientras un número reducido de astrocitos con procesos delgados fue visto (Fig. 16 B, C, F y G). Después de 7 días, la gliosis reactiva persistió y de manera particular, la morfología de los astrocitos cambió de una forma estrellada con varios procesos y soma pequeño, a una forma con un soma prominente, redondo y con pocos procesos (Fig. 16 E comparado con H). Estos cambios morfológicos no se presentaron en hipocampos inyectados con vehículo (datos no mostrados).

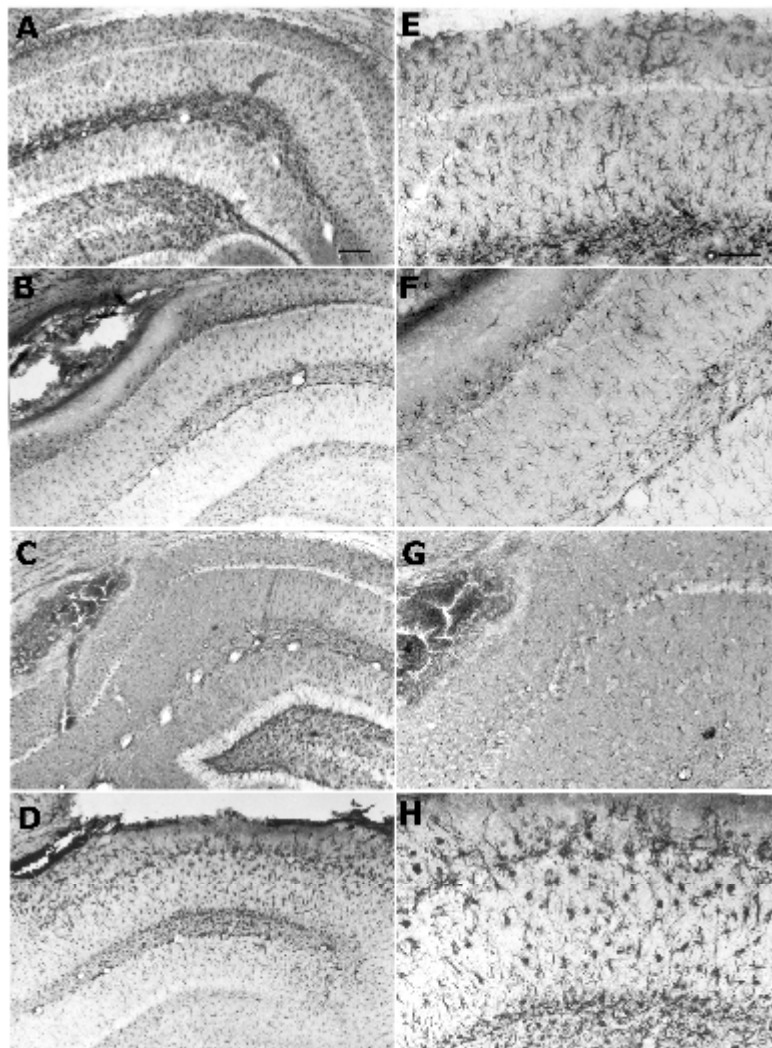


Figura 16. Análisis inmunohistoquímico de los cambios en el patrón de distribución de la glía utilizando el anticuerpo contra GFAP 3 h, 24 h y 7 días después de la inyección de 100 nmolas de Taxol. A y E muestran una distribución normal de astrocitos en el hipocampo contralateral, mientras que B y F, muestran un hipocampo inyectado a las 3 h, donde claramente se muestra cambios tempranos en la morfología celular. 24 h después de la inyección con Taxol 100 nmolas, se observa una completa destrucción de las glía (C y G). D y H muestran un hipocampo inyectado a los 7 días donde se observa cambios morfológicos mas pronunciados

de astrocitos (somas grandes y pocos procesos celulares). Los paneles de la derecha (E, F, G y H), muestran la zona de amplificación. Barra = 200 μm (panel izquierdo) y 100 μm (panel derecho).

Activación de GSK-3 β mediante la inhibición de Wnt y PI3K/Akt y su relación con la fosforilación de la proteína tau en cultivos corticales primarios.

En cultivos primarios y rebanadas metabólicamente activas de cerebro de rata, se valoró la fosforilación de tau, mediante la inhibición de la vías de señalización (Wnt y PI3K/Akt), donde la evidencia indica la participación de ambas vías, en la cascada de eventos que permite el inicio y desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (Anderton y cols., 2000; De Ferrari e Inestrosa, 2000, Caricasole y cols., 2003; Martin y cols., 2001; Xu y cols., 2005)

Para estudiar si la activación sostenida de GSK-3 β por la inhibición de la vía de señalización canónica de Wnt induce hiperfosforilación de la proteína tau, cultivos primarios de corteza fueron incubados con diferentes proteínas recombinantes tales como sFRP2, sFRP3 y Frizzled-8 para antagonizar los ligandos endógenos.

La exposición de los inhibidores de la vía de señalización Wnt (sFRP2 y sFRP3) por 24 h en cultivos corticales primarios, indujeron un incremento estadísticamente significativo en la fosforilación de un epítipo relacionado con la patología de Alzheimer, como es el epítipo del anticuerpo PHF-1 (Ser^{396/404}) (Otvos y cols., 1994) (Fig. 17 A y B), ($p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectivamente), el cual, está descrito como un sitio blanco de fosforilación de GSK-3 β (Sperber y cols., 1995; Hong y cols., 1997; Muñoz-Montano y cols., 1997; Hernández y cols., 2003; Plattner y cols., 2006). Para determinar si este incremento en la fosforilación del epítipo PHF-1 era realmente mediado por GSK-3 β , se utilizó un inhibidor de la cinasa ampliamente descrito como lo es el cloruro de litio (LiCl), (Muñoz-Montano y cols., 1997; Quiroz y cols., 2004). Los cultivos corticales expuestos con ambos inhibidores de la vía de señalización canónica de Wnt (sFRP2/3), junto con el tratamiento simultáneo de LiCl 10 mM en un periodo de incubación de 24 h, disminuyó la inmunoreactividad de manera significativa ($p < 0.001$, $p < 0.05$ respectivamente), del epítipo PHF-1 a su nivel basal, sugiriendo que la desregulación de la cinasa por alteraciones en la vía Wnt, podría tener un papel importante en la aparición de este epítipo fosforilado de la proteína tau (Fig. 17 A y B).

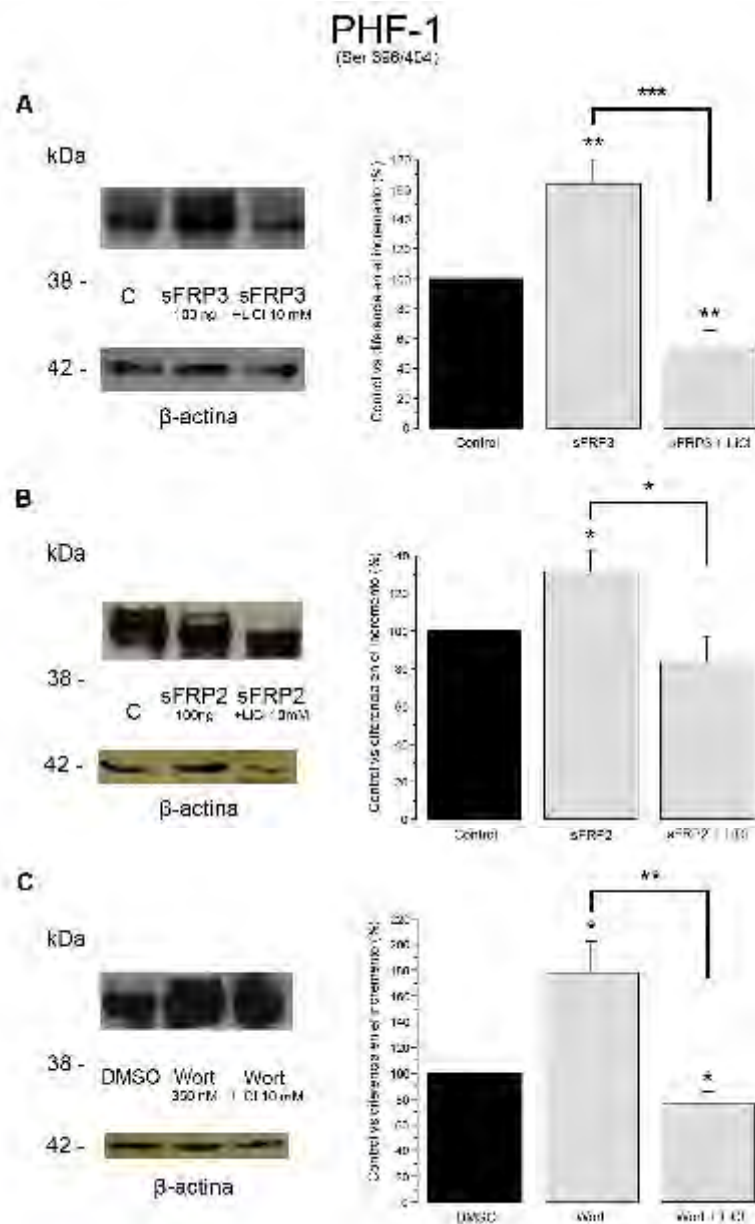


Figura 17. Análisis de la inhibición de las vías Wnt y PI3K/Akt y su consecuencia en la fosforilación de la proteína tau. Cultivos corticales fueron expuestos 24 h con inhibidores de la vía Wnt sFRP2 y sFRP3 (A y B), y con un inhibidor de la vía PI3K/Akt wortmanina (C), los cuales producen un incremento significativo en la fosforilación del epítipo PHF-1 (Ser^{393/404}), con respecto al control. Este efecto en la fosforilación es revertido por el inhibidor de la GSK-3β (LiCl, 10 mM) cuando es tratado simultáneamente con la presencia de los inhibidores de las vías Wnt y PI3K/Akt. Los datos muestran la media ± ES representativos de 3 experimentos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Prueba de *t* no-pareada).

Debido a que otras vías de señalización como la vía de la cinasa de fosfatidilinositol 3 (PI3K/Akt), regulan la actividad a la baja, de la cinasa GSK-3β, y que no existe un activador directo de la cinasa, se utilizó la wortmanina, la cual es empleada para mantener activa a GSK-3β por inhibición de PI3K/Akt (Frame y Cohen, 2001; Grimes, y cols., 2001; Bath y cols., 2004). Cultivos primarios corticales incubados con

wortmanina por 24 horas a una concentración de 350 nM, provocó un incremento significativo ($p < 0.05$), en la fosforilación de las serinas^{396/404} (epitopo PHF-1), en comparación con el control (DMSO), de forma similar al observado con los inhibidores de la vía Wnt. Utilizando de nueva cuenta el LiCl, este inhibidor revirtió la fosforilación del epitopo PHF-1, sugiriendo que la fosforilación en este sitio (si no en su mayor parte), es mediada por la actividad de GSK-3 β (Fig. 17 C). Como datos complementarios, la adición del receptor soluble Frizzled-8 (100 ng/ml), que une a la proteína WNT de una manera similar a sFRP 2 y 3, también se incrementa la inmunoreactividad del anticuerpo PHF-1 24 h después de su incubación en células corticales comparadas con el control (datos no mostrados).

Hasta este momento, los resultados obtenidos sugerían de manera indirecta que el aumento en la fosforilación de la proteína tau del sitio PHF-1 era mediado por GSK-3 β , debido al hecho que esta fosforilación era revertida por la acción del litio. Para corroborar si la sobre activación de GSK-3 β por la inhibición de ambas vías era responsable del incremento en la fosforilación de tau, se analizó el estado de fosforilación de la cinasa mediante la disminución del fosfoepitopo localizado en la serina 9 (p-Ser⁹), el cual es indicativo del estado de activación de GSK-3 β (Shaw y cols., 1997). Como se aprecia en la figura 18, existe una reducción significativa en la fosforilación de la Ser⁹ en la presencia de ambos inhibidores de la vía de señalización (sFRP2/3, $p < 0.05$, $p < 0.001$, respectivamente), comparados con el control (Fig. 18 A y B), la cual es revertida de manera estadísticamente significativa ($p < 0.05$ para sFRP2/3), en la presencia del LiCl.

Resultados similares fueron observados en la presencia del inhibidor de la vía de señalización PI3K/Akt, ya que se observa un decremento en la inmunoreactividad de la Ser⁹ en la presencia de la wortmanina ($p < 0.05$), y de manera inversa, un incremento en fosfoepitopo en presencia de litio indicativo de la inactivación de la cinasa (Fig. 18 C, $p < 0.01$).

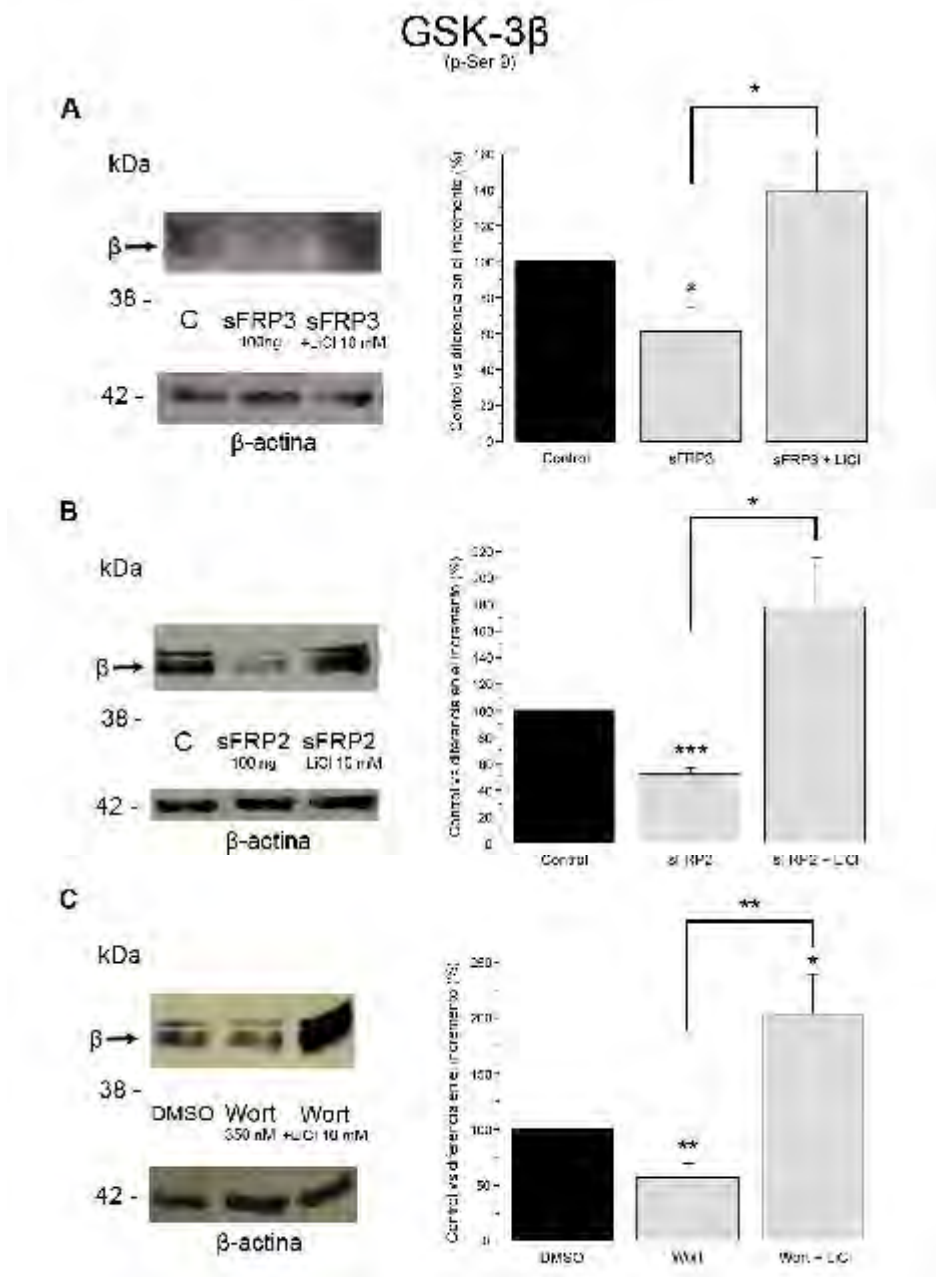


Figura 18. Efecto de la inhibición de las vías de señalización Wnt y PI3K/Akt sobre la activación de GSK-3 β . Cultivos corticales fueron incubados por 24h con inhibidores de la vía Wnt sFRP 2 y sFRP3 (A y B) y con wortmanina, un inhibidor de la PI3K/Akt (C), La exposición de los inhibidores de ambas vías producen una reducción en la fosforilación de la Ser 9 de GSK-3 β , la cual, es indicativa de la activación de la cinasa. Al utilizar el LiCl, se observa un incremento en la fosforilación de GSK-3 β indicando inactivación de la cinasa. Los datos muestran el promedio de la densidad óptica convertida a porcentaje \pm ES representativos de 3 experimentos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Prueba de t no-pareada).

La activación de GSK-3 β mediante la inhibición de Wnt incrementa la fosforilación de la proteína tau en rebanadas de hipocampo metabólicamente activas.

Una vez que se encontraron efectos en la fosforilación de tau en cultivos corticales primarios, se procedió a investigar si otro inhibidor de la vía Wnt tenía efectos similares en otro paradigma. Rebanadas de cerebro metabólicamente activas de hipocampo fueron incubadas con el inhibidor Frizzled-8 durante 3 h de incubación. Después de ese tiempo, se observó un incremento en la inmunoreactividad del epitópo PHF-1 con respecto al control, el cual de manera concomitante, se observa una ligera reducción de la inmunoreactividad del anticuerpo Tau-1, el cual reconoce varios residuos de serina (Ser^{199,202}) y treonina (Thr²⁰⁵) sin fosforilar (Fig. 19 A y B). Estos resultados obtenidos en rebanadas de hipocampo metabólicamente activas son similares a los observados en cultivos corticales primarios con respecto al epitópo fosforilado de la proteína tau (PHF-1), lo cual podría indicar que la desregulación de GSK-3 β a través de la inhibición de la vía señalización Wnt, es capaz de inducir hiperfosforilación aún en neuronas maduras. Con respecto a esta desregulación de GSK-3 β , de manera reciente se ha reportado, que la inhibición de la vía de señalización de PI3K/Akt con wortmanina incrementa el epitópo PHF-1, junto con una reducción en la inmunotinción del epitópo Tau-1 por un mecanismo dependiente de GSK-3 β en rebanadas de cerebro metabólicamente activas (Li y cols., 2006).

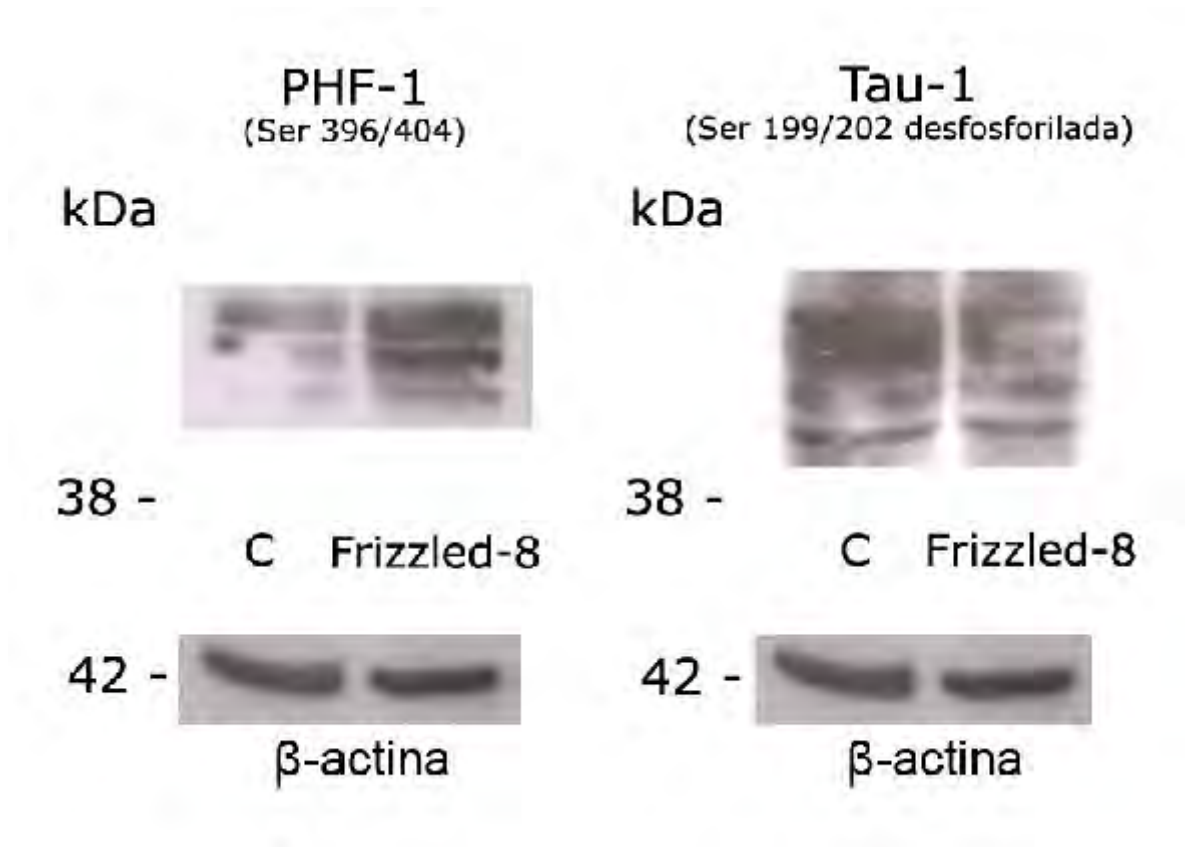


Figura 19. Efecto de la inhibición de la vía de señalización de Wnt en la fosforilación de la proteína tau en rebanadas hipocampales de rata metabólicamente activas. Rebanadas de hipocampo fueron incubadas con un inhibidor de la vía Wnt (Frizzled-8) por 3 h observando un ligero incremento en la fosforilación de tau (epítipo PHF-1) y una reducción en la inmunoreactividad del epítipo Tau-1 (no fosforilado). Datos representativos de 3 experimentos.

La inhibición de las vías Wnt y PI3K/Akt induce cambios morfológicos y aumento en la inmunoreactividad de PHF-1 en cultivos corticales primarios.

Para determinar si el aumento en la fosforilación de la proteína tau mediada por la activación de GSK-3 β podría tener consecuencia en el citoesqueleto neuronal, experimentos subsecuentes fueron realizados en cultivos corticales primarios tratados con distintos inhibidores de las vías de señalización Wnt y PI3K/Akt. En la figura 20 se aprecia el efecto de los diferentes inhibidores (sFRP2, Dkk-1 y wortmanina), en la morfología neuronal 24 h después de su exposición. En las células control, la mayoría de las neuronas muestra una inmunoreactividad a la α -tubulina, la cual se localiza en el soma y las neuritas (Fig. 20 A y E). Por el contrario, cultivos corticales expuestos a los inhibidores la vía Wnt (sFRP2 y Dkk-1), producen alteraciones en le citoesqueleto

neuronal (Fig. 20 B y F, C y G, respectivamente). Estos cambios consistieron en el engrosamiento de las neuritas y en algunos casos la morfología llegó a ser arrosariada (ver cabeza de flecha). Un patrón similar en inmunotinción y alteraciones morfológicas se observaron en neuronas expuestas con la wortmanina (Fig. 20 D y H).

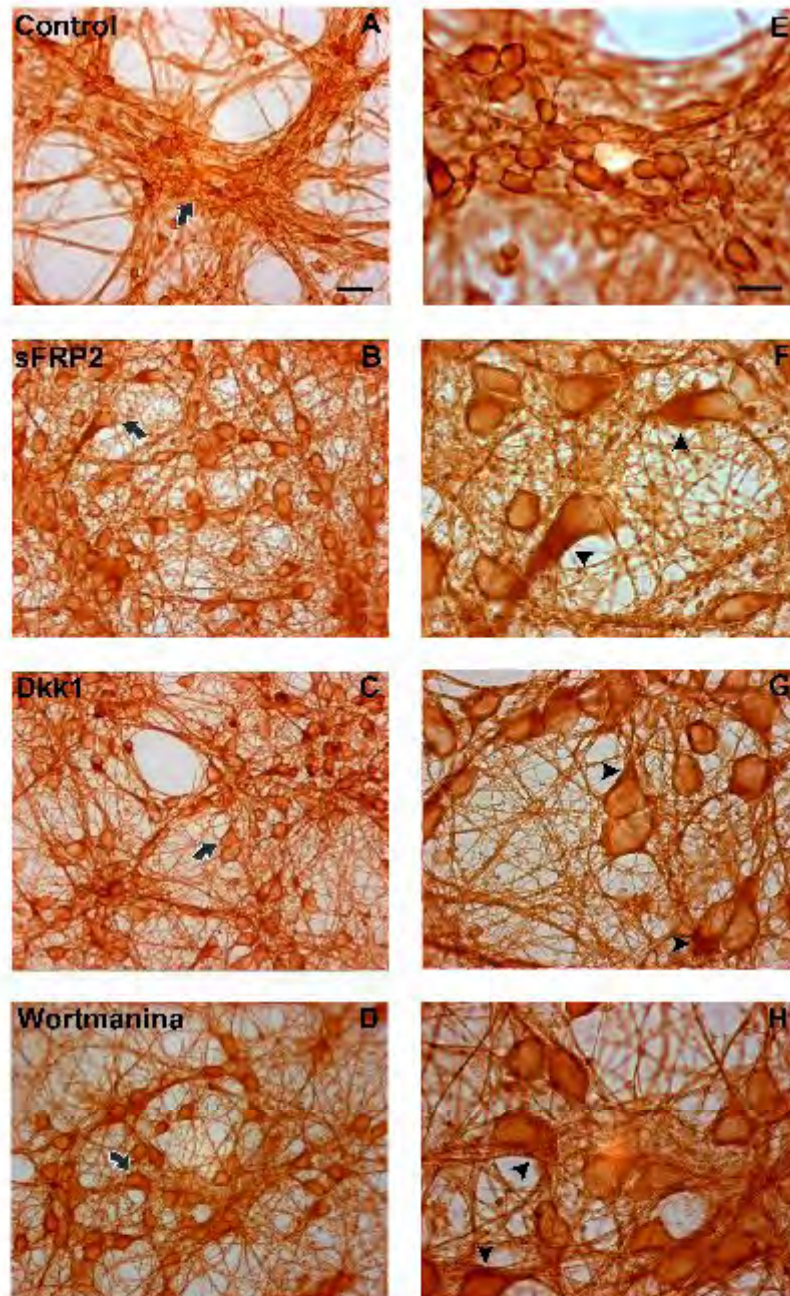


Figura 20. Cambios morfológicos inducidos por la inhibición de las vías de señalización Wnt y PI-3K/Akt evaluadas a través de la inmunotinción con α -tubulina. Neuronas expuestas por 24h con los inhibidores sFRP2 (B), Dkk-1 (C) y wortmanina (D) muestran profundos cambios morfológicos consistiendo en expansión de procesos neuríticos y alargamiento de los somas neuronales comparados con el control (A). Una notable acumulación de α -tubulina se observa

en la parte apical de la neurita (cabeza de flecha). Las ampliaciones son de la zona marcada con las flechas. Escala de barra equivale 20 μm y para la ampliación 10 μm .

Una vez que se demostraron alteraciones en la morfología neuronal, como siguiente paso se exploró con mayor detenimiento los posibles cambios en la distribución de la proteína tau fosforilada dentro de la célula neuronal. Para esto, se realizaron experimentos de inmunocitoquímica utilizando el anticuerpo contra los residuos de Ser^{396/404} (epítipo PHF-1). En cultivos corticales primarios controles, se observó inmunoreactividad del anticuerpo PHF-1 en las neuronas, principalmente en los procesos neuronales (dicho patrón de teñido se apreció en forma de fibras a lo largo de los procesos axonales), y en algunos casos en los somas, (Fig. 21 A y D). En cambio, cultivos corticales expuestos por 24 h con los inhibidores de las vías de señalización Wnt y PI3K/Akt (sFRP2 y wortmanina), el patrón de la inmunotinción fue diferente, ya que se observó un ligero incremento en la inmunoreactividad de la proteína tau fosforilada en los somas neuronales (flechas), y sobre todo, un hinchamiento en ciertas zonas del axón (cabeza de flecha), debido a la acumulación de proteína tau fosforilada (Fig. 21 B, E, C, F).

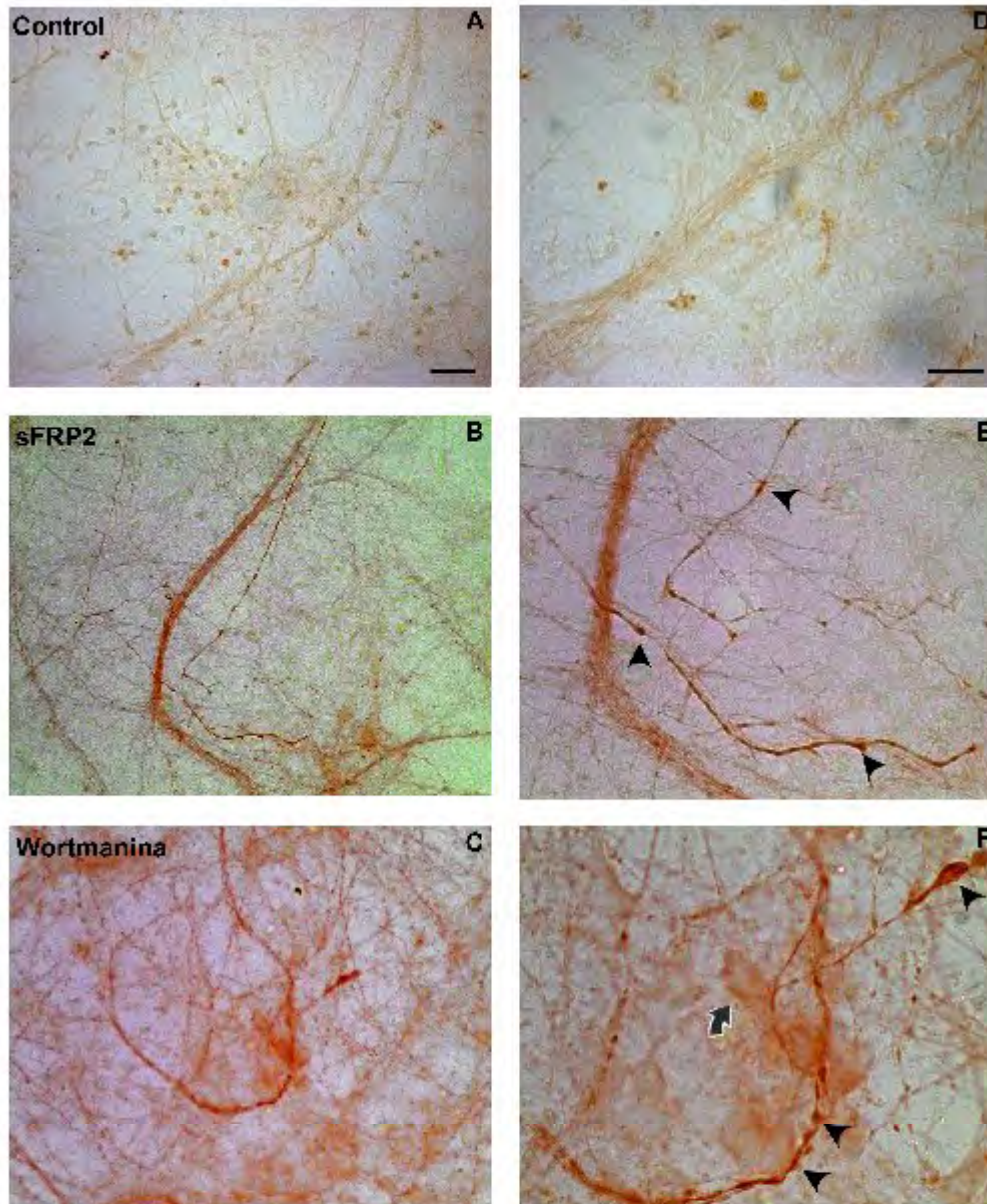


Figura 21. Aumento de la inmunoreactividad de la proteína tau fosforilada en cultivos corticales primarios por la inhibición de las vías de señalización Wnt y PI3K/Akt. Las neuronas expuestas 24h con el inhibidor de la vía Wnt sFRP2 (B, E), y con el inhibidor de la vía PI3K/Akt wortmanina (C, F), mostraron un incremento en el patrón de inmunoreactividad del anticuerpo PHF-1 con respecto al control (A, D). Por otra parte, se observa una mayor acumulación en los somas de las neuronas (flecha en F), y sobre todo en los axones, provocando cierto abultamiento a lo largo de este (cabezas de flechas). Barra=20 μ m, y en los aumentos 10 μ m (panel izquierdo).

X. DISCUSIÓN

En lo concerniente a la primera parte del proyecto, nuestros resultados demuestran que el Taxol induce muerte neuronal, al ser inyectado en la región de CA1 del hipocampo, además de inducir efectos en los niveles y distribución de MAP2, tau y en alteraciones morfológicas en células no neuronales (astrocitos).

Aún cuando los efectos tóxicos del Taxol son muy controversiales en la actualidad, debido a que ciertos trabajos sugieren un efecto protector en la toxicidad inducida por el péptido β -amiloide en cultivos corticales primarios (Michaelis y cols., 1998; Li y cols., 2003; Spooner y cols., 2003), otros demuestran a su vez, los efectos citotóxicos del Taxol tanto en cultivos celulares como en células transformadas, principalmente alterando la dinámica de los microtúbulos y produciendo una subsecuente estabilización interfiriendo en la formación del huso mitótico y no permitiendo la división celular (Schiff y Horwitz, 1981; Rowinsky y cols., 1995; Haldar y cols., 1996; Jordan y Wilson, 1998).

En cultivos neuronales, los efectos del Taxol también se han podido observar sobre cambios morfológicos, en especial con acortamiento de las neuritas (Nuydens y cols. 2000), y sobre alteraciones en el transporte axonal en células de ganglio dorsal (Theiss y Meller, 2000).

Estos cambios pueden ser explicados como el resultado de la actividad del Taxol hacia la dinámica de los MTs. Se sabe que la acción estabilizadora del Taxol es debida a que esta droga se une con mayor afinidad a los MTs que a los dímeros de tubulina con una estequiometría de 1:1 (molécula de Taxol por subunidad β tubulina), (Díaz y Andreu, 1993), lo cual, promueve la polimerización y la formación de MTs no funcionales.

En el presente trabajo se muestran los efectos citotóxicos del Taxol en el SNC, induciendo cambios en la morfología y produciendo muerte neuronal de manera dosis-dependiente lo que apoya la noción de que la alteración en la dinámica de los MT es capaz de inducir neurodegeneración en neuronas postmitóticas *in vivo*. Esta muerte asemeja aspectos de muerte apoptótica caracterizada por la presencia de núcleos fragmentados y condensados como los observados en cultivos primarios al ser tratados con Taxol (Figueroa-Másot y cols., 2001).

Existe poca evidencia sobre la relación entre la dinámica de los MT *in vivo* y cambios en las MAPs, lo cual podría ser relevante en el entendimiento de aspectos sobre alteraciones del citoesqueleto tal como la EA o en otras enfermedades neurodegenerativas (ejemplo: la demencia frontotemporal, enfermedad de Pick,

demencia cortico basal, etc). Se sabe que utilizando otras drogas que alteran a los MT, como la colchicina que actúa de manera inversa al Taxol (ya que despolimeriza a los MT), produce cambios antigénicos de tau similares a los observados en la EA (Mattson, 1992). Por otra parte, se ha demostrado que los cambios en la fosforilación de la proteína tau dependen del estado en la dinámica de los MT, esto en cultivos de células de neuroblastoma (Xie y cols., 1998).

Se ha postulado a las MAPs como reguladoras del grado de estabilización que sufren los MT en condiciones fisiológicas, y bajo este contexto, la inyección con Taxol altera la distribución de MAP2 y un ligero incremento en la inmunoreactividad de tau, así como cambios en los estados de fosforilación observados con el anticuerpo PHF-1.

La distribución de MAP2 es principalmente somato-dendrítica (Matus, 1990), los hipocampos inyectados con Taxol mostraron indicios tempranos de cambios en el patrón normal de árbol dendrítico a partir de las 3 horas mientras que a las 24 horas, estos cambios son notables observándose una distribución anormal hacia el soma del contenido de la proteína, al igual que una alteración en la morfología de la dendrita observándose neuritas distróficas. Siete días posteriores a la inyección, existe una pérdida evidente del patrón dendrítico, al igual que cambios similares en zonas aledañas a la lesión, por lo cual, se sugiere que el Taxol tiene efectos sobre el patrón de arborización y sobre la distribución de MAP2 debida a la alteración del transporte axonal y a una posible muerte neuronal.

No obstante los cambios notables observados sobre MAP2, ligeros cambios se pudieron advertir con la inmunotinción del anticuerpo Tau-1 en hipocampos inyectados en comparación con su contralateral a las 24 h. A los 7 días posteriores a la inyección, se observó mayor inmunoreactividad en fibras musgosas de CA3. Es posible que después del daño producido por el Taxol en células piramidales de la región de CA1, ocurra un cambio en la organización de los axones (rebrote axonal), como mecanismo compensatorio a la alteración en la comunicación entre ambas regiones del hipocampo debida la citotoxicidad del Taxol. Resultados similares fueron observados en ratas 7 días posteriores a la inyección y vistas con el anticuerpo PHF-1 que reconoce un fosfoepítipo de tau (Ser^{396/404}). Por otro lado, se observó inmunoreactividad de algunos somas y sus procesos en la región subgranular del giro dentado, siendo más fuerte la inmunoreactividad en el lado inyectado.

Recientemente, se ha demostrado que el Taxol reduce la asociación de tau hacia los MT, reduciendo la afinidad entre la proteína tau y la tubulina (Kar y cols., 2003). Si correlacionamos este resultado, se podría sugerir que un incremento en la poza libre de tau mediada por Taxol, podría conducir a una mayor susceptibilidad de la tau para

presentar cambios bioquímicos, como serían alteraciones en el equilibrio entre fosforilación y desfosforilación.

Con respecto a las células no neuronales, nuestros resultados muestran un cambio en la citoarquitectura de la glía (astroglia), observada con el anticuerpo GFAP, ya que en células sanas, estas exhiben somas pequeños con gran cantidad de ramificaciones, y al inyectar Taxol, ésta morfología cambia a partir de las 3 primeras horas, y un completo barrido de la células se presenta a las 24 horas después de la inyección. Siete días posteriores a la inyección, la población de glia se recupera, pero su morfología cambia drásticamente observando un soma prominente redondo y una disminución de sus proyecciones producto de efecto tóxico del Taxol en células mitóticas.

Los datos provenientes de la tinción con el intercalante de ADN (DAPI), mostraron cambios en la morfología nuclear y aparición de núcleos fragmentados y condensados sugiriendo mecanismos apoptóticos presumiblemente producidos por Taxol en células piramidales de CA1. Estos resultados se pueden relacionar con datos provenientes de sistemas *in vitro*, tanto de células tumorales o líneas celulares, como en cultivos primarios corticales donde se muestra claramente su acción apoptótica (Nuydens y cols., 2000; Figueroa-Másot, 2001).

Por otra parte, el análisis ultraestructural mostró cambios en la continuidad y forma de los MT, así como alteraciones en la morfología de la dendrita y mitocondrias con aspecto hinchado. Estos datos se correlacionan muy bien con los resultados obtenidos en mitocondrias aisladas de neuroblastoma donde al ser expuestas con Taxol, éstas presentan un incremento en el diámetro de la mitocondria (indicativo de hinchamiento) y liberación de citocromo c, características indicativas de procesos apoptóticos (André y cols., 2000; Carré y cols., 2002).

Además de ser un potente agente estabilizador de los MTs, de manera reciente, se ha podido demostrar los efectos del Taxol en otros blancos de la propia célula que son independientes a la estabilización de los MT, como por ejemplo, la activación de la cinasa N-terminal c-Jun (JNK) involucrada en eventos apoptóticos mediados por transcripción génica, al igual que una subsecuente inhibición de la vía de la cinasa 3-fosfatidilinositol (PI3K/Akt) que es importante para la sobrevivencia y crecimiento celular en cultivos primarios corticales (Figueroa-Másot y cols., 2001), o más aún, liberación de citocromo c de la mitocondria por el poro de transición mitocondrial (André y cols., 2000), por lo que podemos sugerir que podrían estar ocurriendo eventos similares en este modelo experimental.

Aún cuando, sea propuesto que el Taxol puede ser utilizado como herramienta terapéutica en enfermedades neurodegenerativas donde existe alteración con el

citoesqueleto, como por ejemplo la demencia de Alzheimer, nuestros hallazgos demuestran que el Taxol puede producir toxicidad en células maduras post-mitóticas en la región hipocampal, por lo cual se necesita mayor investigación antes de aplicarse en el clínica.

Por otra parte, en la segunda parte del proyecto se trató de investigar si alteraciones en vías de señalización que regulan (regulación inhibitoria) a la cinasa sintasa de glucógeno (GSK-3 β), podrían producir cambios en el estado de fosforilación de la proteína tau. Como es ampliamente conocido, la GSK-3 β es un componente que regula una infinidad de procesos celulares. Se ha propuesto que alteraciones en vías de señalización que regulan la actividad GSK-3 β podría relacionarse con una variedad de enfermedades neurodegenerativas y cáncer (Bath y cols., 2004). A diferencia de otras cinasas, GSK-3 β se encuentra constitutivamente activa en la célula y diferentes vías de señalización modulan de manera inhibitoria su actividad sostenida (Sugden y cols., 2008).

Aún cuando el mecanismo por el cual GSK-3 β se encuentra sobre activada en neuronas de cerebros de pacientes con la enfermedad de Alzheimer se desconoce, existen dos principales vías de señalización que podrían estar alteradas, tal es el caso de la vías de señalización Wnt y PI3K/Akt.

La vía canónica Wnt juega un papel importante durante la embriogénesis ya que funciona como regulador de la proliferación, diferenciación, adhesión celular, sobrevivencia y apoptosis celular (Wodarz y Nusse, 1988; Chong y Maiese, 2004; Li y cols., 2005).

Aún no se conoce del todo su papel en el adulto, estudios recientes sugieren que la desregulación de dicha vía puede tener un papel muy importante en desórdenes neurológicos asociadas con anomalías en el desarrollo tales como la esquizofrenia (Cotter y cols., 1998), desórdenes psiquiátricos como el desorden bipolar de tipo 1 (Quiroz y cols., 2004), en daño neuronal inducido por pulsos excitotóxicos o eventos isquémicos, degeneración de neuronal (esclerosis), relacionada con la epilepsia del lóbulo temporal y en patologías neurodegenerativas crónicas tales como la enfermedad de Alzheimer (Anderton y cols., 2000; De Ferrari e Inestrosa, 2000; Caricasole y cols., 2003; Cappuccio y cols., 2005; Busceti y cols., 2007), ya que existe una estrecha relación entre los efectos del péptido β A y la fosforilación anormal de la proteína tau, a través de alteraciones de la vía de señalización Wnt (Caricasole y cols., 2004; Inestrosa y cols., 2007)

De acuerdo con lo anterior, Scali y cols., (2006) reportaron que el tratamiento de cultivos primarios corticales con un inhibidor endógeno de la vía Wnt como la glicoproteína Dkk-1, incrementa la fosforilación de la proteína tau en el sitio PHF-1. Se

conoce en la actualidad, que Dkk-1 es un regulador negativo de la vía canónica Wnt (Kawano y Kypta, 2003), y también, esta proteína se encuentra expresada en tejido cerebral de corteza temporal provenientes de pacientes con EA en asociación con la proteína tau hiperfosforilada, sugiriendo una estrecha relación entre el daño de la vía Wnt y la fosforilación anormal de tau (Caricasole y cols., 2004). En este sentido, se ha observado que la apolipoproteína E, en especial el polimorfismo $\epsilon 4$, la cual es un factor de riesgo en la incidencia de la EA, es capaz de inhibir a dicha vía (Caruso y cols., 2006).

Los datos presentados muestran que el bloqueo de la vía de señalización Wnt tanto en cultivos corticales, como posiblemente en rebanas metabólicamente activas de hipocampo, causan una desregulación en la actividad de GSK-3 β , produciendo un incremento significativo en la fosforilación de epítomos relacionados con la EA, como lo es el sitio de PHF-1 (Ser^{396/404}). Esta observación se sustenta debido a que la utilización del litio un inhibidor ampliamente descrito de esta cinasa pudo prevenir dicho incremento en el sitio de PHF-1. En concordancia con estos resultados, se reportó un importante incremento significativo en la fosforilación del epítomo PHF-1 en cultivos primarios corticales tratados con Dkk-1 (Scali y cols., 2006).

En rebanadas metabólicamente activas de hipocampo, se observó un incremento en la fosforilación del sitio PHF-1 en presencia de otro inhibidor de Wnt (Frizzled-8), además de este efecto, produjo una pequeña reducción en la inmunoreactividad del epítomo Tau-1 (Ser^{199/202}, Thr²⁰⁵) otro blanco de fosforilación de GSK-3 β (Sperber y cols., 1995; Morishima-Kawashima y cols., 1995), por lo que se podría sugerir que dicha cinasa se encuentra involucrada tanto en la fosforilación del sitio de Tau-1 en adición al sitio de PHF-1. Además se han reportado resultados similares en la fosforilación de estos epítomos al utilizar wortmanina en rebanadas metabólicamente activas de hipocampo (Li y cols., 2006).

La utilización de la wortmanina (un inhibidor de la vía de señalización PI3K/Akt), desregula bajo otros mecanismos la actividad GSK-3 β , pero asemeja el mecanismo de inhibición de la vía Wnt, incrementando la fosforilación del sitio de PHF-1, tanto en cultivos corticales, como en rebanadas metabólicamente activas de hipocampo (Li y cols., 2006). Debido a que la activación PI3K/Akt implica varios estímulos celulares como el factor de crecimiento semejante a insulina, insulina, entre otros (Welsh y cols., 1994), se podría pensar que en el envejecimiento, una reducción de dichos factores podrían contribuir a una activación sostenida de GSK-3 β , lo que provocaría en turno un incremento en la fosforilación anormal de la proteína tau (Figura 22). En este sentido, se ha propuesto que la Diabetes tipo 2 es un factor de riesgo para desarrollar la demencia de Alzheimer (Ott y cols., 1999; Janson y cols., 2004). En la patología se

presenta aumento en la concentración de insulina (hiperinsulinemia), provocando resistencia a la insulina (de la Monte y Wangs, 2005). Se han demostrado que la hiperinsulinemia periférica en murinos altera la señalización de la insulina incrementando la fosforilación del receptor, activación de la cinasa activada por mitógenos y la vía de PI3K/Akt e incrementa la fosforilación de la proteína tau en el residuo Ser²⁰² (Freude y cols., 2005). Debido a que la vía de señalización PI3K/Akt es regulada por insulina y por IGF-1, se ha propuesto que en la EA existen alteraciones en la señalización de la insulina, provocando una serie de eventos anormales como reducida utilización de la glucosa, incremento en la activación de GSK-3 β , déficit en la producción de energía, incremento en el estrés oxidativo y una reducida sobrevivencia neuronal, eventos que comparte con la Diabetes Tipo 1 y 2, sugiriendo por algunos autores, el término de diabetes tipo 3 a la enfermedad de Alzheimer (de la Monte y cols., 2006).

Posibles alteraciones en las vías de señalización Wnt y PI3K/Akt en la enfermedad de Alzheimer

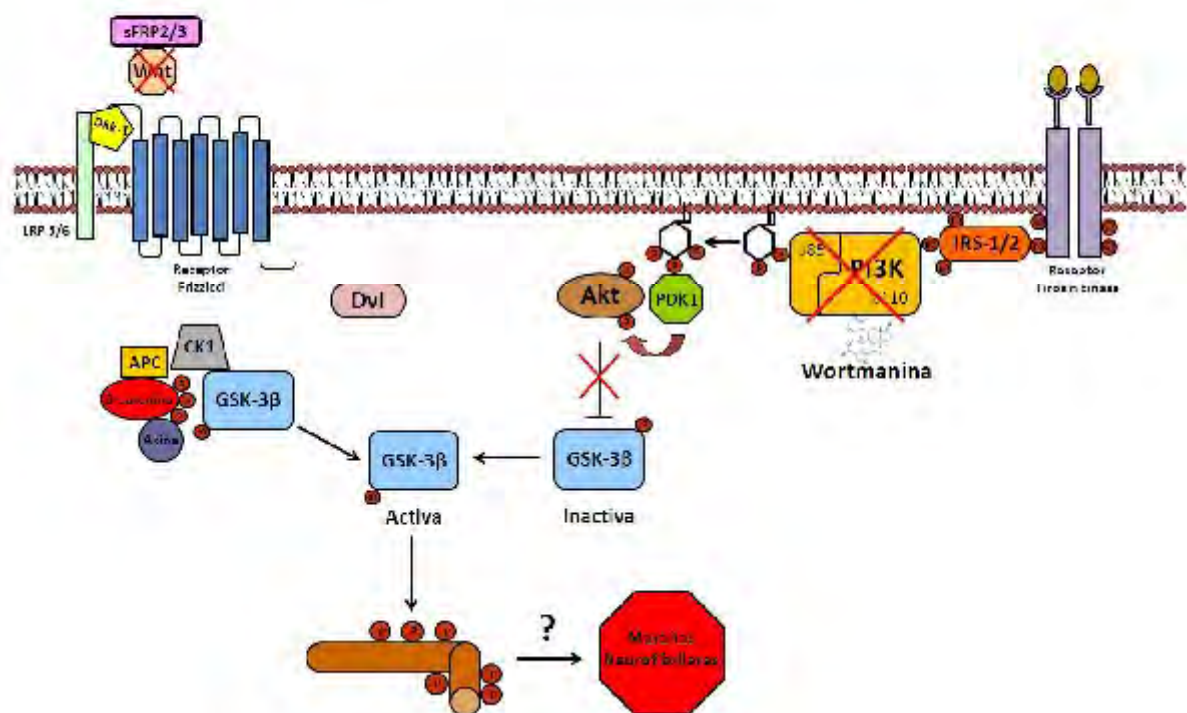


Figura 22. Modelo esquemático de los eventos que ocurren en la fosforilación anormal de la proteína tau en alteraciones de vías de señalización. La inhibición de ambas vías de señalización (Wnt y PI3K-Akt), con inhibidores específicos (sFRP2/3, Dkk-1 y wortmanina), producen una desregulación de GSK-3 β , lo que resulta en una sobreactivación de la cinasa, la cual es capaz de hiperfosforilar a la proteína tau provocando alteraciones en su función

estabilizadora de los MTs y quizá su posible autoensamble en la formación de la patología neurofibrilar.

El litio ha sido descrito como un potente inhibidor selectivo de ambos isotipos de GSK-3 (α y β), debido a la habilidad de competir con el sitio de magnesio de la enzima (Ryves y Harwood, 2001). Se han descrito algunos efectos adicionales del litio como la inhibición de la monofosfatasa de inositol (Atack, 1997), o la inducción de los niveles de la proteína Bcl-2 (Chen y cols., 1999), no obstante, este ión ha sido utilizado ampliamente para inhibir a la GSK-3 β , mimetizando la activación de la vía Wnt en modelos tanto *in vitro* como *in vivo* (Klein y Melton, 1996; Stambolic y cols., 1996). Los datos presentados muestran que, el litio es capaz de reducir significativamente la inmunoreactividad del epítipo PHF-1 inducido por la inhibición tanto de la vía Wnt como de la vía PI3K/Akt, asemejándose a la reducción de este epítipo en paradigmas de incremento en la fosforilación de la proteína tau inducido por el β A (Muñoz-Montano y cols., 1997; Álvarez y cols., 1999, Álvarez y cols., 2002). Aún cuando se observa una reducción en la fosforilación de las Ser^{396/404}, este epítipo no es completamente disminuido, lo que da la posibilidad de que la acción de otras cinasas dirigidas por prolinas tales como Cdk5, Erk 1/2, o cinasas activadas por estrés (SAPK), tengan acción en fosforilar este sitio independiente de la activación de GSK-3 β (Buée y cols., 2000). Asimismo, la acción de ese ión incrementa de manera significativa la inmunoreactividad de la Ser⁹ de GSK-3 β en cultivos corticales expuestos a sFRP2/3 y wortmanina, sugiriendo que la desregulación de la cinasa mediante la inhibición de ambas vías induce fosforilaciones en la proteína tau que son encontradas en cerebros de pacientes con demencia de Alzheimer.

Además del incremento en la fosforilación de la proteína tau, se demuestra que la desregulación de GSK-3 β puede tener consecuencias en la citoarquitectura celular, ya que altera de manera drástica la morfología neuronal. Debido a que la proteína tau tiene un papel importante en la formación y estabilización de procesos neuríticos, las alteraciones observadas en el citoesqueleto, las cuales consistieron en el incremento en el calibre de las neuritas, acumulación de α -tubulina en la zona apical y alargamiento de los somas celulares, pudiesen haber sido directamente asociadas con la hiperfosforilación de tau mediante la desregulación de GSK-3 β por ambas vías de señalización. En este sentido, Sánchez y cols. (2001), reportaron que la wortmanina induce alteraciones en el citoesqueleto, consistiendo básicamente en retracción de las neuritas asociados a la activación de GSK-3 β , fosforilación de proteínas asociadas a microtúbulos (MAP1B, tau), y reducción en el contenido de la destirosinación junto con un aumento en la tirosinación de la tubulina (modificaciones post-traducionales que le

confieren estabilidad a los MTs), en cultivos de neuroblastoma SH-SY5Y. Hay que destacar que estos datos no concuerdan con los datos presentados debido tal vez a las diferencias en los modelos utilizados, no obstante se puede sugerir que la sobre activación de GSK-3 β mediante la inhibición de sus vías reguladoras es *per se*, capaz de producir alteraciones en el citoesqueleto neuronal. Asimismo, se ha demostrado un papel de PI3/Akt en el crecimiento neurorítico en neuronas de la retina de la carpa dorada (Lavie y cols., 1997).

La distribución de la proteína tau en los compartimientos subcelulares ha sido descrita de la siguiente manera, una parte de la proteína tau fosforilada se encuentra en el compartimiento somatodendrítico, mientras que proteína tau menos fosforilada es encontrada básicamente en axones (Papasozomenos y Binder, 1987; Arias y cols. 1993). Además, se ha sugerido que la acumulación de proteína tau con diferentes modificaciones post-traduccionales (entre ellas la fosforilación) puede presentarse de manera temprana (etapa pre-formación de marañas) siendo un paso relevante en la evolución de la formación de las marañas neurofibrilares (Braak y cols., 1994). En este sentido, el presente trabajo muestra acumulación de proteína tau fosforilada tanto en somas neuronales, como en neuritas debidos a la sobre activación de GSK-3 β , lo que pudiese ser un mecanismo que esté ocurriendo en la EA. Esto puede basarse en parte, a que se ha demostrado un incremento en la actividad de GSK-3 β en la EA y que la acumulación en el comportamiento somatodendrítico y su activación, son eventos tempranos que preceden la formación de marañas y de otras inclusiones de tau (Leroy y cols., 2007).

Debido a que la inhibición sostenida en las vías de señalización Wnt y PI3K/Akt produce alteraciones muy semejantes en nuestro modelo, se pensaría que dichas alteraciones son debidos a mecanismos independientes cuyo efector común es GSK-3 β . En la actualidad existe reportes en los se demuestra que un componente de la vía Wnt como lo es la proteína Dvl, es capaz de asociarse con la forma activa de Akt formando un complejo con la axina, lo que permite la fosforilación de GSK-3 β en su sitio regulador (Ser⁹) en células PC12 que sobre-expresan Wnt (Fukumoto y cols., 2001). Este resultado apunta a una importante inter-comunicación (cross-talk), entre ambas vías de señalización para la regulación de GSK-3 β , la cual sería importante en el mantenimiento de la homeostasis neuronal.

Así, en el presente trabajo queda asentado que la alteración en la dinámica de los microtúbulos mediante drogas que los estabilizan (Taxol), puede producir aparte de daño citotóxico y morfológico, cambios post-traduccionales de la proteína tau (fosforilación), lo que sería un buen modelo para el estudio de mecanismos de neurodegeneración. Por otra parte, los datos presentados de la segunda parte de

proyecto, muestran que la inhibición de vías de señalización (Wnt y PI3K/Akt), ejerce una desregulación en la actividad (actividad sostenida), de GSK-3 β , lo que provoca un incremento en epítomos fosforilados de la proteína tau (PHF-1), y sobre todo, que esta hiperfosforilación puede tener consecuencias en el citoesqueleto neuronal junto con la acumulación de tau fosforilada en varias partes de la neurona semejando así, a la observada en la enfermedad de Alzheimer. Asimismo, aunque falta mucho por investigar, en el presente trabajo se sugiere que el uso del litio o inhibidores más específicos pueden ser utilizados como blanco terapéutico para inhibir a la GSK-3 β y así evitar la hiperfosforilación de la proteína tau modificación post-traducciona que parece ser importante en eventos de auto-ensamble, y a la vez, atenuar la formación neurofibrilar en la EA.

XI. CONCLUSIONES

La proteína tau sufre alteraciones post-traduccionales (tales como truncación, glicosilación, oxidación, fosforilación) que pueden ser eventos previos a la agregación neurofibrilar en la Enfermedad de Alzheimer.

En el presente trabajo, demostramos que una sólo inyección de Taxol en la región de CA1 del hipocampo indujo daño neuronal de manera dosis-dependiente y teniendo mucho mayor efecto citotóxico a las 24 h. Además, se observó daño en los microtúbulos y mitocondrias, muerte celular posiblemente de tipo apoptótica, junto con alteraciones en las dendritas, redistribución de MAP2 y fosforilación de tau reconocidos por el anticuerpo PHF-1 y cambios en la morfología de los astrocitos.

Por otra parte, en modelos *in vitro*, demostramos que una cinasa relevante para fosforilar a la proteína tau en el epítipo reconocido por el anticuerpo PHF-1 es la cinasa sintasa de glucógeno (GSK-3 β), produciendo aumento en la fosforilación de tau, junto con sobreactivación de la cinasa, variaciones morfológicas en las neuronas y acumulación de proteína tau fosforilada en neuritas mediante de el uso inhibidores de vías de señalización como Wnt y PI3K/Akt (sFRP2/3, Dkk1, Frizzled-8 y wortmanina, respectivamente).

Las alteraciones en ambas vías de señalización que modulación de esta cinasa, pueden tener un papel importante en la etiología de la enfermedad de Alzheimer. Asimismo, el incremento en la en la fosforilación de la proteína tau mediada por la GSK-3 β es atenuada por el cloruro litio, un inhibidor utilizado en desórdenes psiquiátricos, por lo que el uso de este fármaco puede tener efectos benéficos posiblemente evitando o retrasando la formación de las marañas neurofibrilares

XII. BIBLIOGRAFÍA

- Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. 1997. β -catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 16:3797-37804.
- Alberts B, Jonson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. Molecular biology of the cell. 4ª Edición. Ed. Garland Science. Nueva York. pp. 1463.
- Albala JS, Kress Y, Liu WK, Weidenheim K, Yen SH, Shafit-Zagardo B. 1995. Human microtubule-associated protein-2c localizes to dendrites and axons in fetal spinal motor neurons. *J Neurochem.* 64:2480-2490.
- Álvarez G, Muñoz-Montaño JR, Satrústegui J, Avila J, Bogóñez E, Díaz-Nido J. 1999. Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. *FEBS Lett.* 453:260-264.
- Álvarez G, Muñoz-Montaño JR, Satrústegui J, Avila J, Bogóñez E, Díaz-Nido J. 2002. Regulation of tau phosphorylation and protection against beta-amyloid-induced neurodegeneration by lithium. Possible implications for Alzheimer's disease. *Bipolar Disord.* 4:153-165.
- Álvarez AR, Godoy JA, Mullendorff K, Olivares GH, Bronfman M, Inestrosa NC. 2004. Wnt-3a overcomes beta-amyloid toxicity in rat hippocampal neurons. *Exp Cell Res.* 297:186-196.
- Amos LA. 2001. Tubulin and Microtubules. Enciclopedia of Life science. Ed John Wiley. pp 1-7.
- Amos LA y Schlieper D. 2005. Microtubules and maps. *Adv Protein Chem.* 71:257-298.
- Anderton BH, Dayanandan R, Killick R, Lovestone S. 2000. Does dysregulation of the Notch and wingless/Wnt pathways underlie the pathogenesis of Alzheimer's disease? *Mol Med Today.* 6:54-59.
- André N, Braguer D, Brasseur G, Goncalves A, Lemesle-Meunier D, Guise S, Jordan MA, Briand C. 2000. Paclitaxel induces release of cytochrome c from mitochondria isolated from human neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 60:5349-5353.
- Andreadis A, Brown WM, Kosik KS. 1992. Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry.* 31: 3585-3593.
- Arias C, Sharma N, Davies P, Shafit-Zagardo B. 1993. Okadaic acid induces early changes in microtubule-associated protein 2 and tau phosphorylation prior to neurodegeneration in cultured cortical neurons. *J Neurochem.* 61:673-682.

- Arias C, Arrieta I, Tapia R. 1995. beta-Amyloid peptide fragment 25-35 potentiates the calcium-dependent release of excitatory amino acids from depolarized hippocampal slices. *J. Neurosci. Res.* 41:561-566.
- Arias C, Arrieta I, Mássieu L, Tapia R. 1997. Neuronal damage and MAP2 changes induced by the glutamate transport inhibitor dihydrokainate and by kainate in rat hippocampus *in vivo*. *Exp. Brain Res.* 116:467-476.
- Arnold CS, Johnson GV, Cole RN, Dong DL, Lee M, Hart GW. 1996. The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine. *J Biol Chem.* 271:28741-2874.
- Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT. 1992. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology.* 42:631-639.
- Avila J. 2000. Tau aggregation into fibrillar polymers: Tauopathies. *FEBS Lett.* 476: 89-92.
- Bancher C, Braak H, Fischer P, Jellinger KA. 1993. Neuropathological staging of Alzheimer lesions and intellectual status in Alzheimer's and Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett.* 162:179-182.
- Bernhardt R y Matus A. 1982. Initial phase of dendrite growth: evidence for the involvement of high molecular weight microtubule-associated proteins (HMWP) before the appearance of tubulin. *J Cell Biol.* 92:589-593.
- Bhat RV, Budd Haeberlein SL, Avila, J. 2004. Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies. *J Neurochem.* 89:1313-1317.
- Biernat J, Gustke N, Drewes G, Mandelkow EM, Mandelkow E. 1993. Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron.* 11:153-163.
- Bigot D y Hunt SP. 1991. The effects of quisqualate and nocodazole on the organization of MAP2 and neurofilaments in spinal cord neurons *in vitro*. *Neurosci Lett.* 131:21-26.
- Billingsley ML, Kincaid RL. 1997. Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein: effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration. *Biochem J.* 323:577-591.
- Binder LI, Frankfurter A, Kim H, Caceres A, Payne MR, Rebhun LI. 1984. Heterogeneity of microtubule-associated protein 2 during rat brain development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81:5613-5617.
- Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI, 1985. The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J. Cell. Biol.* 101:1371-1378.

- Bloom GS y Vallee RB. 1983. Association of microtubule-associated protein 2 (MAP 2) with microtubules and intermediate filaments in cultured brain cells. *J Cell Biol.* 96:1523-1531.
- Boer HH, Moorer-van Delft CM, Müller LJ, Kiburg B, Vermorcken JB, Heimans JJ. 1995. Ultrastructural neuropathologic effects of Taxol on neurons of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *J. Neurooncol.* 25:49-57.
- Braak H y Braak E. 1991. Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. *Brain Pathol.* 1:213-216.
- Braak H, Braak E, Bohl J. 1993. Staging of Alzheimer-related cortical destruction. *Eur Neurol.* 33:403-408.
- Braak E, Braak H, Mandelkow EM. 1994. A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathol.* 87:554-567.
- Braak H y Braak E. 1995. Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiol Aging.* 16:271-28;
- Bramblett GT, Goedert M, Jakes R, Merrick SE, Trojanowski JQ, Lee VMY. 1993. Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron.* 10:1089-1099.
- Brand R. 2001. Cytoskeletal mechanism of neuronal degeneration. *Cell. Tissue Res.* 305:255-265.
- Brunet A, Datta SR, Greenberg ME. 2001. Transcription-dependent and - independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol.* 11:297-305.
- Buée L, Bussièrè T, Buée-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. 2000. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Rev.* 33:95-130.
- Burns RG. 1991. Alpha-, beta-, and gamma-tubulins: sequence comparisons and structural constraints. *Cell Motil Cytoskeleton.* 20:181-189.
- Busceti CL, Biagioni F, Aronica E, Rizzo B, Storto M, Battaglia G, Giorgi FS, Gradini R, Fornai F, Caricasole A, Nicoletti F, Bruno V. 2007. Induction of the Wnt inhibitor, Dickkopf-1, is associated with neurodegeneration related to temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 48:694-705.
- Butner KA, Kirschner MW. 1991. Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites. *J. Cell Biol.* 115:717-730.

- Caceres A, Payne MR, Binder LI, Steward O. 1983. Immunocytochemical localization of actin and microtubule-associated protein MAP2 in dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80:1738-1742.
- Caceres A, Mautino J, Kosik KS. 1992. Suppression of MAP2 in cultured cerebellar macroneurons inhibits minor neurite formation. *Neuron* 9:607-618.
- Calabrese EJ. 2001. Apoptosis: biphasic dose responses. *Crit Rev Toxicol.* 31:607-613.
- Cantley LC. 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296:1655-1657.
- Canu N, Dus L, Barbato C, Ciotti MT, Brancolini C, Rinaldi AM, Novak M, Cattaneo A, Bradbury A, Calissano P. 1998. Tau cleavage and dephosphorylation in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis. *J Neurosci.* 18:7061-7074.
- Cappuccio I, Calderone A, Busceti CL, Biagioni F, Pontarelli F, Bruno V, Storto M, Terstappen GT, Gaviraghi G, Fornai F, Battaglia G, Melchiorri D, Zukin RS, Nicoletti F, Caricasole A. 2005. Induction of Dickkopf-1, a negative modulator of the Wnt pathway, is required for the development of ischemic neuronal death. *J Neurosci.* 25:2647-2657.
- Caricasole A, Copani A, Caruso A, Caraci F, Iacovelli L, Sortino MA, Terstappen GC, Nicoletti F. 2003. The Wnt pathway, cell-cycle activation and beta-amyloid: novel therapeutic strategies in Alzheimer's disease? *Trends Pharmacol Sci.* 24:233-238.
- Caricasole A, Copani A, Caraci F, Aronica E, Rozemuller AJ, Caruso A, Storto M, Gaviraghi G, Terstappen GC, Nicoletti F. 2004. Induction of Dickkopf-1, a negative modulator of the Wnt pathway, is associated with neuronal degeneration in Alzheimer's brain. *J Neurosci.* 24:6021-6027.
- Caricasole A, Bakker A, Copani A, Nicoletti F, Gaviraghi G, Terstappen GC. 2005. Two sides of the same coin: Wnt signaling in neurodegeneration and neuro-oncology. *Biosci Rep.* 25:309-327.
- Carré M, Carles G, André N, Douillard S, Ciccolini J, Briand C, Braguer D. 2002. Involvement of microtubules and mitochondria in the antagonism of arsenic trioxide on paclitaxel-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol* 63:1831-1842.
- Chen J, Kanai Y, Cowan N.J, Hirokawa N. 1992. Projection domain of MAP2 and tau determine spacing between microtubules in dendrites and axons. *Nature.* 360:674-677.

- Chrétien D y Wade 1991. New data on the microtubule surface lattice. *Biol. Cell.* 71:161-174. Erratum *Biol. Cell.* 72:284.
- Chin SS y Goldman JE. 1996. Glial inclusions in CNS degenerative diseases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55:499-508
- Chong ZZ y Maiese K. 2004. Targeting WNT, protein kinase B, and mitochondrial membrane integrity to foster cellular survival in the nervous system. *Histol Histopathol.* 9:495-504.
- Chung WJ, Kindler S, Seidenbecher C, Garner CC. 1996. MAP2a, an alternatively spliced variant of microtubule-associated protein 2. *J Neurochem.* 66:1273-1281.
- Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW. 1977. Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J. Mol. Biol.* 116:227-247.
- Cohen P, Alessi DR, Cross DA. 1997. PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction. *FEBS Lett.* 410:3-10.
- Corrada M, Brookmeyer R, Kawas C. 1995. Sources of variability in prevalence rates of Alzheimer's disease. *Int J. Epidemiol* 24:1000-1005.
- Correas I, Padilla R, Avila J. 1990. The tubulin-binding sequence of brain microtubule-associated proteins, tau and MAP-2, is also involved in actin binding. *Biochem J.* 269:61-64.
- Correas I, Díaz-Nido J, Ávila J. 1992. Microtubule-associated protein tau is phosphorylated by protein kinase C on its tubulin binding domain. *J. Biol. Chem.* 267:15721-15728.
- Cotter D, Kerwin R, al-Sarraj S, Brion JP, Chadwich A, Lovestone S, Anderton B, Everall I. 1998. Abnormalities of Wnt signalling in schizophrenia-evidence for neurodevelopmental abnormality. *Neuroreport* 9:1379-1383.
- Couchie D, Mavilia C, Georgieff IS, Liem RK, Shelanski ML, 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.
- Craig AM y Banker G. 1994. Neuronal polarity. *Annu Rev Neurosci.* 17:267-310.
- Cross D, Farías G, Domínguez J, Avila J, Maccioni RB. 1994. Carboxyl terminal sequences of beta-tubulin involved in the interaction of HMW-MAPs. Studies using site-specific antibodies. *Mol Cell Biochem.* 16;132:81-90.
- Dale TC. 1998. Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem J.* 329:209-223.

- DeCamilli P, Miller EP, Navone F and Vallee RB. 1984. Distribution of microtubule-associated protein MAP2 in the nervous system of the rat studied by immunofluorescence. *Neurosci.* 11:819-846.
- De Ferrari GV e Inestrosa NC. 2000. Wnt signaling function in Alzheimer's disease. *Brain Res Rev.* 33:1-12.
- De Ferrari GV y Moon RT. 2006. The ups and downs of Wnt signaling in prevalent neurological disorders. *Oncogene* 25:7545-7553.
- De la Monte SM y Wands JR. 2005. Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 7:45-61.
- De la Monte SM, Tong M, Lester-Coll N, Plater M Jr, Wands JR. 2006. Therapeutic rescue of neurodegeneration in experimental type 3 diabetes: relevance to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 10:89-109.
- Desai A y Mitchinson TJ. 1997. Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13:83-117.
- Diaz JF, Andreu JM. 1993. Assembly of purified GDP-tubulin into microtubules induced by Taxol and taxotere: reversibility, ligand stoichiometry, and competition. *Biochemistry.* 32:2747-2755.
- Dillon C y Goda Y. 2005. The actin cytoskeleton: integrating form and function at the synapse. *Annu Rev Neurosci.* 28:25-55.
- Dillon RL, White DE, Muller WJ. 2007. The phosphatidylinositol 3-kinase signaling network: implications for human breast cancer. *Oncogene.* 26:1338-1345.
- Dinsmore JH y Solomon F. 1991. Inhibition of MAP2 expression affects both morphological and cell division phenotypes of neuronal differentiation. *Cell* 64:817-826
- Doll T, Meichsner M, Riederer BM, Honegger P, Matus A. 1993. An isoform of microtubule-associated protein 2 (MAP2) containing four repeats of the tubulin-binding motif. *J Cell Sci.* 106:633-639.
- Dotti, C.G., Banker, G.A., Binder, L.I., 1987. The expression and distribution of the microtubule-associated proteins tau and microtubule-associated protein 2 in hippocampal neurons in the rat in situ and in cell culture. *Neuroscience* 23, 121-130.
- Downing KH y Nogales E. 1998. Tubulin and microtubule structure. *Curr Opin Cell Biol.* 10:16-22.

- Downing KH. 2000. Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 16:89-111.
- Drewes G, Ebner A, Preuss U, Mandelkow EM, Mandelkow E. 1997. MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell.* 89:297-308.
- Edson K, Weisshaar B, Matus A. 1993. Actin depolymerisation induces process formation on MAP2-transfected non-neuronal cells. *Development* 117:689-700.
- Evans DB, Rank KB, Bhattacharya K, Thomsen DR, Gurney ME, Sharma SK. 2000. Tau phosphorylation at serine 396 and serine 404 by human recombinant tau protein kinase II inhibits tau's ability to promote microtubule assembly. *J Biol Chem.* 2000 275:24977-24983
- Fasulo L, Visitrin M, Novak M, Cattaneo A. 1996. Overexpression of Alzheimer's PHF core tau fragments: implications for the tau truncation hypothesis. *Alzheimers Res.* 2:195-200.
- Fasulo L, Ugolini G, Visintin M, Bradbury A, Brancolini C, Verzillo V, Novak M, Cattaneo A. 2000. The neuronal microtubule-associated protein tau is a substrate for caspase-3 and an effector of apoptosis. *J Neurochem.* 75:624-633.
- Fath T, Eidenmüller J, Brandt R. 2002. Tau-mediated cytotoxicity in a pseudohyperphosphorylation model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 22:9733-9741.
- Ferhat L, Represa A, Bernard A, Ben-Ari Y, Khrestchatisky M. 1996. MAP2d promotes bundling and stabilization of both microtubules and microfilaments. *J Cell Sci.* 109:1095-1103.
- Ferhat L, Represa A, Ferhat W, Ben-Ari Y, Khrestchatisky M. 1998. MAP2d mRNA is expressed in identified neuronal populations in the developing and adult rat brain and its subcellular distribution differs from that of MAP2b in hippocampal neurones. *Eur J Neurosci.* 10:161-171.
- Fletcher TL, De Camilli P, Banker G. 1994. Synaptogenesis in hippocampal cultures: evidence indicating that axons and dendrites become competent to form synapses at different stages of neuronal development. *J Neurosci.* 14:6695-6706.
- Figueroa-Másot XA, Hetman M, Higgins MJ, Kokot N, Xia Z. 2001. Taxol induces apoptosis in cortical neurons by a mechanism independent of Bcl-2 phosphorylation. *J. Neurosci.* 21:4657-4667.

- Fifková E y Morales M. 1992. Actin matrix of dendritic spines, synaptic plasticity, and long-term potentiation. *Int Rev Cytol.* 139:267-307.
- Frame S y Cohen P. 2001. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J.* 359:1-16.
- Freude S, Plum L, Schnitker J, Leeser U, Udelhoven M, Krone W, Bruning JC, Schubert M. 2005. Peripheral hyperinsulinemia promotes tau phosphorylation in vivo. *Diabetes.* 54:3343-3348.
- Friedhoff P, von Bergen M, Mandelkow EM, Davies P, Mandelkow E. 1998. A nucleated assembly mechanism of Alzheimer paired helical filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:15712-15717.
- Gamblin TC, Chen F, Zambrano A, Abraha A, Lagalwar S, Guillozet AL, Lu M, Fu Y, Garcia-Sierra F, LaPointe N, Miller R, Berry RW, Binder LI, Cryns VL. 2003. Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 19;100:10032-10037.
- García-Sierra F, Ghoshal N, Quinn B, Berry RW, Binder LI. 2003. Conformational changes and truncation of tau protein during tangle evolution in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 5:65-77.
- Garner CC, Tucker RP, Matus A. 1988. Selective localization of messenger RNA for cytoskeletal protein MAP2 in dendrites. *Nature* 336:674-677.
- Griffin RJ, Moloney A, Kelliher M, Johnston JA, Ravid R, Dockery P, O'Connor R, O'Neill C. 2005. Activation of Akt/PKB, increased phosphorylation of Akt substrates and loss and altered distribution of Akt and PTEN are features of Alzheimer's disease pathology. *J Neurochem.* 93:105-117.
- Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA. 1989. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron.* 3:519-526.
- Goedert M y 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, Baur CP, Ahringer J, Jakes R, Hasegawa M, Spillantini M.G, Smith M.J, Hill F. 1996. PTL-1 a microtubule-associated protein with tau-like repeats from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell. Sci.* 2661-2672.
- Gong CX, Lidsky T, Wegiel J, Grundke-Iqbal I, Iqbal, K.. 2001. Metabolically active rat brain slices as a model to study the regulation of protein phosphorylation in mammalian brain. *Brain Res Protoc.* 6:134-140.

- Goode BL y Feinstein SC. 1994. Identification of a novel microtubule binding and assembly domain in the developmentally regulated inter-repeat region of tau. *J Cell Biol.* 124:769-782.
- Goode BL, Denis PE, Panda D, Radeke MJ, Miller HP, Wilson L, Feinstein SC. 1997. Functional interactions between the proline-rich and repeat regions of tau enhance microtubule binding and assembly. *Mol Biol Cell.* 8:353-365.
- Gordon MD, Nusse R. 2006. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem.* 281:22429-22433.
- Goux WJ, Rodriguez S, Sparkman DR. 1996. Characterization of the glycolipid associated with Alzheimer paired helical filaments. *J Neurochem.* 67:723-733.
- Grimes CA y Jope RS. 2001. CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 beta and facilitated by lithium. *J Neurochem.* 78:1219-1232.
- Gustke N, Trinczek B, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E. 1994. Domains of tau protein and interactions with microtubules. *Biochemistry* 33:9511-9522.
- Haldar S, Chintapalli J, and Croce CM. 1996. Taxol induces bcl-2 phosphorylation and death of prostate cancer cells. *Cancer Res.* 56:1253-1255.
- Haltiwanger RS, Blomberg MA, Hart GW. 1992. Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins. Purification and characterization of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine polypeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase. *J Biol Chem.* 267:9005-9013.
- Haltiwanger RS, Busby S, Grove K, Li S, Mason D, Medina L, Moloney D, Philipsberg G, Scartozzi R. 1997. O-glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins: regulation analogous to phosphorylation?. *Biochem Biophys Res Commun.* 231:237-242.
- Hanger DP, Hughes K, Woodgett JR, Brion JP, Anderton BH. 1992. Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localization of the kinase. *Neurosci. Lett.* 147:58-62.
- Harada A, Oguchi K, Okabe S, Kuno J, Terada S, Ohshima R, Hirokawa N. 1994. Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature.* 364:488-491.
- Harris KA, Oyler GA, Doolittle GM, Vincent I, Lehman RA, Kincaid RL, Billingsley ML. 1993. Okadaic acid induces hyperphosphorylated forms of tau protein in human brain slices. *Ann Neurol.* 33:77-87.

- Hasegawa M, Jakes R, Crowther RA, Lee VM, Ihara Y, Goedert M. 1996. Characterization of mAb AP422, a novel phosphorylation-dependent monoclonal antibody against tau protein. *FEBS Lett.* 384:25-30.
- Heimann R, Shelanski ML, Liem RK 1985. Microtubule-associated proteins bind specifically to the 70-kDa neurofilament protein. *J Biol Chem.* 260:12160-12166.
- Hernández F, Lucas JL, Cuadros R, Avila J. 2003. GSK-3 dependent phosphoepitopes recognized by PHF-1 and AT-8 antibodies are present in different tau isoforms. *Neurobiol Aging* 24:1087-1094.
- Hernández MA, Avila J, Andreu JM. 1986. Physicochemical characterization of the heat-stable microtubule-associated protein MAP2. *Eur J Biochem.* 154:41-48.
- Hernández F, Lucas JJ, Cuadros R, Avila J. 2003. GSK-3 dependent phosphoepitopes recognized by PHF-1 and AT-8 antibodies are present in different tau isoforms. *Neurobiol Aging.* 24:1087-1094.
- Hernández-Fonseca K,, Massieu L. 2005. Disruption of endoplasmic reticulum calcium stores is involved in neuronal death induced by glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons. *J Neurosc. Res.* 82:196-205.
- Himmler A, Drechsel D, Kirschner MW, Martin DW 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.
- Hirokawa N, Noda Y, Okada Y. 1998. Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10:60-73.
- Hisanaga S y Hirokawa N. 1989. The effects of dephosphorylation on the structure of the projections of neurofilament. *J Neurosci.* 9:959-966.
- Hoffmann R, Lee VM, Leight S, Varga I, Otvos L Jr. 1997. Unique Alzheimer's disease paired helical filament specific epitopes involve double phosphorylation at specific sites. *Biochemistry* 36:8114-8124.
- Hong M y Lee VM. 1997. Insulin and insulin-like growth factor-1 regulate tau phosphorylation in cultured human neurons. *J Biol Chem.* 272:19547-19553.
- Hong M, Chen DC, Klein PS, Lee VM. 1997. Lithium reduces tau phosphorylation by inhibition of glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem.* 272:25326-25332.
- Hoyer S. 1998. Is sporadic Alzheimer disease the brain type of non-insulin dependent diabetes mellitus? A challenging hypothesis. *J Neural Transm.*105:415-422.

- Huber G, Matus A. Differences in the cellular distributions of two microtubule-associated proteins, MAP1 and MAP2, in rat brain. *J Neurosci.* 4:151-160.
- Iqbal K y Grundke-Iqbal I. 2006. Discoveries of tau, abnormally hyperphosphorylated tau and others of neurofibrillary degeneration: a personal historical perspective. *J Alzheimers Dis.* 9 (3 Suppl):219-242.
- Inestrosa NC, Varela-Nallar L, Grabowski CP, Colombres M. 2007. Synaptotoxicity in Alzheimer's disease: the Wnt signaling pathway as a molecular target. [JUBMB Life.](#) 59:316-321.
- Jackson GR, Wiedau-Pazos M, Sang TK, Wagle N, Brown CA, Massachi S, Geschwind DH. 2002. Human wild-type tau interacts with wingless pathway components and produces neurofibrillary pathology in *Drosophila*. *Neuron.* 34:509-519.
- Jakes R, Novak M, Davison M, Wischik CM. 1991. Identification of 3- and 4-repeat tau isoforms within the PHF in Alzheimer's disease. *EMBO. J.* 10:2725-2729.
- Janson J, Laedtke T, Parisi JE, O'Brien P, Petersen RC, Butler PC. 2004. Increased risk of type 2 diabetes in Alzheimer's disease. *Diabetes.* 53:474-481.
- Jicha GA, Bowser R, Kazam IG, Davies P. 1997a. Alz-50 and MC-1, a new monoclonal antibody raised to paired helical filaments, recognize conformational epitopes on recombinant tau. *J Neurosci Res.* 48:128-132.
- Jicha GA, Lane E, Vincent I, Otvos L Jr, Hoffmann R, Davies P. 1997b. A conformation- and phosphorylation-dependent antibody recognizing the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 69:2087-2095.
- Jicha GA, Weaver C, Lane E, Vianna C, Kress Y, Rockwood J, Davies P. 1999. cAMP-dependent protein kinase phosphorylations on tau in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 19:7486-7494.
- Johnson GV. 1992. Differential phosphorylation of tau by AMP-dependent protein kinase and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II: metabolic and functional consequences. *J. Neurochem.* 59:2056-2062.
- Jones SE y Jomary C. 2002. Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. *Bioessays* 24:811-820.
- Jordan MA y Wilson L. 1998. Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10:123-130.
- Jorm AF y Jolley D. 1998. The incidence of dementia: a meta-analysis. *Neurology* 51:728-733.
- Julien JP. 1999. Neurofilament functions in health and disease. *Curr Opin Neurobiol.* 9:554-560.

- Kaech S, Ludin B, Matus A. 1996. Cytoskeletal plasticity in cells expressing neuronal microtubule-associated proteins. *Neuron* 17:1189-1199.
- Kalcheva N, Albala J, O'Guin K, Rubino H, Garner C, Shafit-Zagardo B. 1995. Genomic structure of human microtubule-associated protein 2 (MAP-2) and characterization of additional MAP-2 isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:10894-10898.
- Kalcheva N, Rockwood JM, Kress Y, Steiner A, Shafit-Zagardo B. 1998. Molecular and functional characteristics of MAP-2a: ability of MAP-2a versus MAP-2b to induce stable microtubules in COS cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* 40:272-285.
- Kanemaru K, Takio K, Miura R, Titani K, Ihara Y. 1992. Fetal-type phosphorylation of the tau in paired helical filaments. *J Neurochem.* 58:1667-1675.
- Kang DE, Soriano S, Xia X, Eberhart CG, De Strooper B, Zheng H, Koo EH. 2002. Presenilin couples the paired phosphorylation of beta-catenin independent of axin: implications for beta-catenin activation in tumorigenesis. *Cell.* 110:751-762
- Kampers T, Friedhoff P, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E. 1996. RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments. *FEBS. Lett.* 399:344-349.
- Kanai Y y Hirokawa N. 1995. Sorting mechanisms of tau and MAP2 in neurons: suppressed axonal transit of MAP2 and locally regulated microtubule binding. *Neuron* 14:421-432.
- Kar S, Fan J, Smith MJ, Goedert M, Amos LA. 2003. Repeat motifs of tau bind to the insides of microtubules in the absence of taxol. *EMBO J.* 22:70-77.
- Kawano Y y Kypta R. 2003. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci.* 116:2627-2634.
- Kidd M. 1963. Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature.* 197:192-193.
- Kindler S, Schulz B, Goedert M, Garner CC. 1990. Molecular structure of microtubule-associated protein 2b and 2c from rat brain. *J Biol Chem.* 265:19679-19684.
- Kleiman R, Banker G, Steward O. 1994. Development of subcellular mRNA compartmentation in hippocampal neurons in culture. *J Neurosci.* 14:1130-1140.
- Klein PS y Melton DA. 1996. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:8455-8459.

- Kosik KS y Finch EA. 1987. MAP2 and tau segregate into dendritic and axonal domains after the elaboration of morphologically distinct neurites: a immunocytochemical study. *J. Neurosci.* 7:3142-3153.
- Kosik KS, Orecchio LD, Bakalis S, Neve RL. 1989. Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron.* 2:1389-1397.
- Kosik KS y Greengerg SM. 1994. Tau protein and Alzheimer disease. En Alzheimer disease. Ed. Raven Press New York USA. pp 335-344.
- Köpke E, Tung Y.C, Shaikh S, Alonso A del C, Iqbal K and Grundke-Iqbal. 1993. Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem* 268, 24374-24384.
- Kowalski RJ y Williams RC Jr. 1993. Microtubule-associated protein 2 alters the dynamic properties of microtubule assembly and disassembly. *J Biol Chem.* 268:9847-9855.
- Ksiezak-Reding H, Liu WK, Yen SH.1992. Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments. *Brain. Res.* 597:209-219.
- Ksiezak-Reding H, Pyo HK, Feinstein B, Pasinetti GM. 2003. Akt/PKB kinase phosphorylates separately Thr212 and Ser214 of tau protein in vitro. *Biochim Biophys Acta.* 1639:159-168.
- Lavie Y, Dybowski J, Agranoff BW. 1997. Wortmannin blocks goldfish retinal phosphatidylinositol 3-kinase and neurite outgrowth. *Neurochem Res.* 22:373-378.
- Lee G. 1990. Tau protein: an update on structure and function. *Cell Motil Cytoskeleton.* 15:199-203.
- Lee G, Neve RL, Kosik KS. 1989. The microtubule binding domain of tau protein. *Neuron* 2:1615-1624.
- Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ. 2001. Neurodegenerative Tauopathies. *Annu Rev Neurosci.* 24:1121-1159.
- Leost M, Schultz C, Link A, Wu YZ, Biernat J, Mandelkow EM, Bibb JA, Snyder GL, Greengard P, Zaharevitz DW, Gussio R, Senderowicz AM, Sausville EA, Kunick C, Meijer L. 2000. Paullones are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3beta and cyclin-dependent kinase 5/p25. *Eur J Biochem.* 267:5983-5994.
- Lefebvre T, Ferreira S, Dupont-Wallois L, Bussi re T, Dupire MJ, Delacourte A, Michalski JC, Caillet-Boudin ML 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.

- Leroy K, Yilmaz Z, Brion JP. 2007 Increased level of active GSK-3beta in Alzheimer's disease and accumulation in argyrophilic grains and in neurones at different stages of neurofibrillary degeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 33:43-55.
- Lewis J, McGowan E, Rockwood J, Melrose H, Nacharaju P, Van Slegtenhorst M, Gwinn-Hardy K, Paul Murphy M, Baker M, Yu X, Duff K, Hardy J, Corral A, Lin WL, Yen SH, Dickson DW, Davies P, Hutton M. 2000. Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat Genet*. 25:402-405.
- Li G, Faibushevich A, Turunen BJ, Yoon SO, Georg G, Michaelis ML, Dobrowsky RT. 2003. Stabilization of the cyclin-dependent kinase 5 activator, p35, by paclitaxel decreases beta-amyloid toxicity in cortical neurons. *J Neurochem* 84:347–362.
- Li X, Lu F, Tian Q, Yang Y, Wang Q, Wang, JZ. 2006. Activation of glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer-like tau hyperphosphorylation in rat hippocampus slices in culture. *J Neural Transm*. 113, 93-102.
- Lie DC, Colamarino SA, Song HJ, Désiré L, Mira H, Consiglio A, Lein ES, Jessberger S, Lansford H, Dearie AR, Gage FH. 2005. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature* 437:1370-1375.
- Llibre Rodriguez JJ, Ferri CP, Acosta D, Guerra M, Huang Y, Jacob KS, Krishnamoorthy ES, Salas A, Sosa AL, Acosta I, Dewey ME, Gaona C, Jotheeswaran AT, Li S, Rodriguez D, Rodriguez G, Kumar PS, Valhuerdi A, Prince M. 2008. Prevalence of dementia in Latin America, India, and China: a population-based cross-sectional survey. *The Lancet* 372: 464-474.
- Lin WL, Lewis J, Yen SH, Hutton M, Dickson DW. 2003. Filamentous tau in oligodendrocytes and astrocytes of transgenic mice expressing the human tau isoform with the P301L mutation. *Am J Pathol*. 162:213-218.
- Lipton RB, Apfel SC, Dutcher JP, Rosenberg R, Kaplan J, Berger A, Einzig AI, Wiernik P, Schaumburg HH. 1989. Taxol produces a predominantly sensory neuropathy. *Neurology*. 39:368-373.
- LoPresti P, Szuchet S, Papasozomenos SC, Zinkowski RP, Binder LI. 1995. Functional implications for the microtubule-associated protein tau: localization in oligodendrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:10369-10373.

- Loveland KL, Hayes TM, Meinhardt A, Zlatic KS, Parvinen M, de Kretser DM, McFarlane JR. 1996. Microtubule-associated protein-2 in the rat testis: a novel site of expression. *Biol Reprod.* 54:896-904.
- Lovestone S, Hartley CL, Pearce J, Anderton BH. 1996. Phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase-3 beta in intact mammalian cells: the effects on the organization and stability of microtubules. *Neuroscience.* 73:1145-1157.
- Lovestone S y Reynolds CH. 1997. The phosphorylation of tau: a critical stage in neurodevelopment and neurodegenerative processes. *Neuroscience.* 78:309-324.
- Lovestone S, Davis DR, Webster MT, Kaech S, Brion JP, Matus A, Anderton BH. 1999. Lithium reduces tau phosphorylation: effects in living cells and in neurons at therapeutic concentrations. *Biol Psychiatry.* 45:995-1003.
- Marui W, Iseki E, Uéda K, Kosaka K. 2000. Occurrence of human alpha-synuclein immunoreactive neurons with neurofibrillary tangle formation in the limbic areas of patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci.* 174:81-84.
- Martín D, Salinas M, López-Valdaliso R, Serrano E, Recuero M, Cuadrado A. 2001. Effect of the Alzheimer amyloid fragment Abeta (25-35) on Akt/PKB kinase and survival of PC12 cells. *J Neurochem.* 78:1000-1008.
- Mattson MP. 1992. Effects of microtubule stabilization and destabilization on tau immunoreactivity in cultured hippocampal neurons. *Brain Res.* 582:107-118.
- Matsuo ES, Shin RW, Billingsley ML, Van deVoorde A, O'Connor M, Trojanowski JQ, Lee VM. 1994. Biopsy-derived adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filament tau. *Neuron.* 13:989-1002.
- Matus A. 1988. Microtubule-associated proteins: their potential role in determining neuronal morphology. *Annu Rev Neurosci.* 11:29-44.
- Matus A. 1990. Microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 2:10-14
- Meichsner M, Doll T, Reddy D, Weisshaar B, Matus A. 1993. The low molecular weight form of microtubule-associated protein 2 is transported into both axons and dendrites. *Neuroscience* 54:873-880.
- Mena R, Wischik CM, Novak M, Milstein C, Cuello AC. 1991. A progressive deposition of paired helical filaments (PHF) in the brain characterizes the evolution of dementia in Alzheimer's disease. An immunocytochemical study with a monoclonal antibody against the PHF core. *J Neuropathol Exp Neurol.* 50:474-490.

- Mena R, Edwards PC, Harrington CR, Mukaetova-Ladinska EB, Wischik CM. 1996. Staging the pathological assembly of truncated tau protein into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.*;91:633-641.
- Mercado-Gómez O y Arias C. 2007. Neurodegenerative foldopathies: From aberrant folding to failure in degradative pathways. En *The Neurochemistry of Neuronal Death* Editorial Research Signpost Kerala, India.
- Merrick SE, Trojanowski JQ, Lee VM. 1997. Selective destruction of stable microtubules and axons by inhibitors of protein serine/threonine phosphatases in cultured human neurons. *J Neurosci.* 17:5726-5737.
- Michaelis ML, Ranciat N, Chen Y, Bechtel M, Ragan R, Hepperle M, Liu Y, Georg G. 1998. Protection against beta-amyloid toxicity in primary neurons by paclitaxel (Taxol). *J Neurochem* 70:1623–1627.
- Mirra SS, Heyman A, McKeel D, Sumi SM, Crain BJ, Brownlee LM, Vogel FS, Hughes JP, van Belle G, Berg L. 1991. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 41:479-486.
- 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, Ijbara Y. 1995. Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau. *J. Biol. Chem.* 270 823-829.
- Muñoz-Montano JR, Moreno FJ, Avila J, Diaz-Nido J. 1997. Lithium inhibits Alzheimer's disease-like tau protein phosphorylation in neurons. *FEBS Lett.* 411:183-188.
- Nennesmo I y Reinholt FP. 1988. Effects of intraneural injection of Taxol on retrograde axonal transport and morphology of corresponding nerve cell bodies. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 55:241-246.
- Neve R. L, Harris P, Kosik K.S, Kurnit D.M, Donlon T.A. 1986. A cDNA for a human microtubule associated protein 2 epitope in the Alzheimer neurofibrillary tangle. *Brain Res.* 387:271-280.
- Nieto Y, Cagnoni PJ, Bearman SI, Shpall EJ, Matthes S, DeBoom T, Baron A, Jones RB. 1999. Acute encephalopathy: a new toxicity associated with high-dose paclitaxel. *Clin Cancer Res.* 5:501-6.
- Nishimura M, Yu G, Levesque G, Zhang DM, Ruel L, Chen F, Milman P, Holmes E, Liang Y, Kawarai T, Jo E, Supala A, Rogaeva E, Xu DM, Janus C, Levesque L, Bi Q, Duthie M, Rozmahel R, Mattila K, Lannfelt L, Westaway D, Mount HT, Woodgett J, St George-Hyslop P, et al. 1999. Presenilin mutations

associated with Alzheimer disease cause defective intracellular trafficking of beta-catenin, a component of the presenilin protein complex. *Nat Med.* 5:164-169.

- Nogales E. 1999. A structural view of microtubule dynamics. *Cell Mol Life Sci.* 56:133-142.
- Nogales E. 2000. Structural insights into microtubule function. *Annu. Rev. Biochem.* 69:277-302.
- Novak A, Hsu SC, Leung-Hagesteijn C, Radeva G, Papkoff J, Montesano R, Roskelley C, Grosschedl R, Dedhar S. 1998. Cell adhesion and the integrin-linked kinase regulate the LEF-1 and beta-catenin signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:4374-4379.
- Nuydens R, Dispersyn G, Van Den Kleboom, Connors R, Borger M and Geerts H. 2000.
- Bcl-2 protects against apoptosis-related microtubule alterations in neuronal cells. *Apoptosis* 5: 43-51.
- Nusse R, Varmus HE. 1992. Wnt genes. *Cell* 69:1073-1087.
- Nusse R, 2000. Nusse Laboratorio <http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>
- Olmsted JB. 1986. Microtubule-associated proteins. *Annu Rev Cell Biol.* 2:421-457.
- Okabe S y Hirokawa N. 1989. Rapid turnover of microtubule-associated protein MAP2 in the axon revealed by microinjection of biotinylated MAP2 into cultured neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:4127-4131.
- Oshima RG. 2007. Intermediate filaments: a historical perspective. *Exp Cell Res.* 313:1981-1994.
- Ott A, Stolk RP, van Harskamp F, Pols HA, Hofman A, Breteler MM.. 1999. Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. *Neurology.* 53:1937-1942.
- Otvos L Jr, Feiner L, Lang E, Szendrei GI, Goedert M, Lee VM. 1994. Monoclonal antibody PHF-1 recognizes tau protein phosphorylated at serine residues 396 and 404. *J Neurosci Res.* 39:669-673.
- Papasozomenos SC, Binder LI, Bender PK, Payne MR. 1985. Microtubule-associated protein 2 within axons of spinal motor neurons: associations with microtubules and neurofilaments in normal and beta,beta'-iminodipropionitrile-treated axons. *J Cell Biol.* 100:74-85.

- Papasozomenos SC, Binder LI. 1987. Phosphorylation determines two distinct species of tau in the central nervous system. *Cell Motil Cytoskeleton*. 8:210-226.
- Papasozomenos SC 1997. The heat shock-induced hyperphosphorylation of tau is estrogen-independent and prevented by androgens: implications for Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:6612-6617.
- Parr BA, McMahon AP. 1994. Wnt genes and vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev*. 4:523-528.
- Pei JJ, Tanaka T, Tung YC, Braak E, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. 1997. Distribution, levels, and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol*. 56:70-78.
- Pei JJ, Braak E, Braak H, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Winblad B, Cowburn RF. 1999. Distribution of active glycogen synthase kinase 3beta (GSK-3beta) in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes. *J Neuropathol Exp Neurol*. 58:1010-1019.
- Pei JJ, Khatoon S, An WL, Nordlinger M, Tanaka T, Braak H, Tsujio I, Takeda M, Alafuzoff I, Winblad B, Cowburn RF, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. 2003. Role of protein kinase B in Alzheimer's neurofibrillary pathology. *Acta Neuropathol*. 105:381-392.
- Pérez M, Valpuesta JM, Medina M, Montejo de Garcini E, Ávila 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.
- Plattner F, Angelo M, Giese KP. 2006. The roles of cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 in tau hyperphosphorylation. *J Biol Chem*. 281:25457-25465.
- Pryer NK, Walker RA, Skeen VP, Bourns BD, Soboeiro MF, Salmon ED. 1992. Brain microtubule-associated proteins modulate microtubule dynamic instability in vitro. Real-time observations using video microscopy. *J Cell Sci*. 103 :965-976.
- Quiroz JA, Gould TD, Manji HK. 2004. Molecular effects of lithium. *Mol Interv*. 4:259-272.
- Rai SS y Wolff J. 1998. Localization of critical histidyl residues required for vinblastine-induced tubulin polymerization and for microtubule assembly. *J Biol Chem*. 273:31131-31137.
- Rankin CA, Sun Q, Gamblin TC. 2007. Tau phosphorylation by GSK-3beta promotes tangle-like filament morphology. *Mol Neurodegener*. 2:12.

- Rattner A, Hsieh JC, Smallwood PM, Gilbert DJ, Copeland NG, Jenkins NA, Nathans J. 1997. A family of secreted proteins contains homology to the cysteine-rich ligand-binding domain of frizzled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:2859-2863.
- Riederer BM, Binder LI. 1994. Differential distribution of tau proteins in developing cat cerebellum. *Brain Res Bull*. 33:155-161.
- Roder HM, Fracasso RP, Hoffman FJ, Witowsky JA, Davis G, Pellegrino CB, 1997. Phosphorylation-dependent monoclonal tau antibodies do not reliably report phosphorylation by extracellular signal-regulated kinase 2 at specific sites. *J. Biol. Chem*. 272:4509-4515.
- Rodgers EE y Theibert AB. 2002. Functions of PI 3-kinase in development of the nervous system. *Int J Dev Neurosci*. 20:187-197.
- Rodionov VI, Gyoeva FK, Kashina AS, Kuznetsov SA, Gelfand VI. 1990. Microtubule-associated proteins and microtubule-based translocators have different binding sites on tubulin molecule. *J Biol Chem*. 265:5702-5707.
- Roger B, Al-Bassam J, Dehmelt L, Milligan RA, Halpain S. 2004. MAP2c, but not tau, binds and bundles F-actin via its microtubule binding domain. *Curr Biol*. 14:363-371.
- Rowinsky EK y Donehower RC. 1995 Paclitaxel (Taxol) *N Engl J Med*. 332:1004-1014.
- Ryder J, Su Y, Ni B. 2004. Akt/GSK3beta serine/threonine kinases: evidence for a signalling pathway mediated by familial Alzheimer's disease mutations. *Cell Signal*. 16:187-200.
- Sackett D y Fojo T. 1997. Taxanes. *Cancer Chemother Biol Response Modif*. 17:59-79.
- Salinas PC. 1999. Wnt factors in axonal remodelling and synaptogenesis. *Biochem Soc Symp*. 65:101-109.
- Sánchez C, Díaz-Nido J, Avila J. 2000. Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Prog Neurobiol*. 61:133-168
- Sánchez MP, Álvarez-Tallada V, Ávila J. 2001. The microtubule-associated protein tau in neurodegenerative diseases. Tauopathies. *Rev Neurol*. 33:169-177.
- Santacruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, Guimaraes A, DeTure M, Ramsden M, McGowan E, Forster C, Yue M, Orne J, Janus C, Mariash A, Kuskowski M, Hyman B, Hutton M, Ashe KH. 2005. Tau

suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 309:476-481

- Sawa A, Oyama F, Matsushita M, Ihara Y, 1994. Molecular diversity at the carboxyl terminus of human and rat tau. *Brain Res Mol Brain Res.* 27:111-117.
- Scali C, Caraci F, Gianfriddo M, Diodato E, Roncarati R, Pollio G, Gaviraghi G, Copani A, Nicoletti F, Terstappen GC, Caricasole A. 2006. Inhibition of Wnt signaling, modulation of tau phosphorylation and induction of neuronal cell death by DKK1. *Neurobiol Dis.* 24:254-265.
- Schweers O, Mandelkow EM, 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. USA.* 92:8463-8467.
- Schiff, PB y Horwitz SB. 1980. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 77:1561-1565.
- Selden SC y Pollard TD. 1983. Phosphorylation of microtubule-associated proteins regulates their interaction with actin filaments. *J Biol Chem.* 258:7064-7071.
- Selkoe D.J, 2000. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid β -protein. *Ann NY Acad Sci* 924:17-25.
- Selkoe DJ. 2001. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.* 81:741-766.
- Serrano L, Avila J, Maccioni RB. 1984. Controlled proteolysis of tubulin by subtilisin: localization of the site for MAP2 interaction. *Biochemistry.* 23:4675-4681.
- Seubert P, Mawal-Dewan M, Barbour R, Jakes R, Goedert M, Johnson GV, Litsky JM, Schenk D, Lieberburg I, Trojanowski JQ. 1995. Detection of phosphorylated Ser262 in fetal tau, adult tau, and paired helical filament tau. *J. Biol. Chem.* 270:18917-18922.
- Shaw M, Cohen P, Alessi DR. 1997. Further evidence that the inhibition of glycogen synthase kinase-3beta by IGF-1 is mediated by PDK1/PKB-induced phosphorylation of Ser-9 and not by dephosphorylation of Tyr-216. *FEBS Lett.* 416:307-311.
- Singh P, Rathinasamy K, Mohan R, Panda D. 2008. Microtubule assembly dynamics: an attractive target for anticancer drugs. *IUBMB Life* 60:368-375.

- Sperber BR, Leight S, Goedert, M, Lee VM. 1995. Glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylates tau protein at multiple sites in intact cells. *Neurosci Lett.* 197:149-153.
- Sponne I, Fifre A, Drouet B, Klein C, Koziel V, Pincon-Raymond M, Olivier JL, Chambaz J, Pillot T. 2003. Apoptotic neuronal cell death induced by the non-fibrillar amyloid-beta peptide proceeds through an early reactive oxygen species-dependent cytoskeleton perturbation. *J Biol Chem* 278:3437–3445.
- Stambolic V, Ruel L, Woodgett JR. 1996. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr Biol.* 6:1664-1668.
- Stein TD y Johnson JA. 2002. Lack of neurodegeneration in transgenic mice overexpressing mutant amyloid precursor protein is associated with increased levels of transthyretin and the activation of cell survival pathways. *J Neurosci.* 22:7380-7388.
- Steward O y Wallace CS. 1995. mRNA distribution within dendrites: relationship to afferent innervation. *J Neurobiol.* 26:447-449.
- Sugden PH, Fuller SJ, Weiss SC, Clerk A. 2008. Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) in the heart: a point of integration in hypertrophic signalling and a therapeutic target? A critical analysis. *Br J Pharmacol.* 153 Suppl 1:137-153.
- Takashi M, Tomizawa K, Ishiguro M, Takamatsu S.C, Fujita K, Imahori K. 1995. *J. Neurochem.* 64 1759-1768.
- Takashima A, Murayama M, Murayama O, Kohno T, Honda T, Yasutake K, Nihonmatsu N, Mercken M, Yamaguchi H, Sugihara S, Wolozin B. 1998. Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3beta and its substrate tau. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:9637-9641.
- Theriot JA. 1994. Regulation of the actin cytoskeleton in living cells. *Semin Cell Biol.* 5:193-199.
- Theiss C y Meller K. 2000. Taxol impairs anterograde axonal transport of microinjected horseradish peroxidase in dorsal root ganglia neurons *in vitro*. *Cell Tissue Res.* 299:213-224.
- Tierney MC, Fisher RH, Lewis AJ, Zorzitto ML, Snow WG, Reid DW, Nieuwstraten P. 1988. The NINCDS-ADRDA Work Group criteria for the clinical diagnosis of probable Alzheimer's disease: a clinicopathologic study of 57 cases. *Neurology* 38:359-364.
- Tögel M, Wiche G, Propst F. 1998. Novel features of the light chain of microtubule-associated protein MAP1B: microtubule stabilization, self

- interaction, actin filament binding, and regulation by the heavy chain. *J. Cell Biol.* 143:695-707.
- Trinczek B, Biernat J, Baumann K, Mandelkow EM, Mandelkow E. 1995. Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules. *Mol Biol Cell.* 6:1887-1892.
 - Trojanowski JQ y Lee VM. 1995. Phosphorylation of paired helical filament tau in Alzheimer's disease neurofibrillary lesions: focusing on phosphatases. *FASEB. J.* 9:1570-1576.
 - Tucker RP, Garner CC, Matus A. 1989. In situ localization of microtubule-associated protein mRNA in the developing and adult rat brain. *Neuron* 2:1245-1256.
 - Uppuluri S, Knipling L, Sackett DL, Wolff J. 1993. Localization of the colchicine-binding site of tubulin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:11598-11602.
 - Valdivia MM, Avila J, Coll J, Colaço C, Sandoval IV. 1982. Quantitation and characterization of the microtubule associated MAP2 in porcine tissues and its isolation from porcine (PK15) and human (HeLa) cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 105:1241-1249.
 - Vincent I, Rosado M, Davies P. 1996. Mitotic mechanisms in Alzheimer's disease?. *J Cell Biol.* 132:413-425.
 - Vincent I, Zheng JH, Dickson DW, Kress Y, Davies P. 1998. Mitotic phosphoepitopes precede paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 19:287-296.
 - von Bergen M, Friedhoff P, Biernat J, Heberle J, Mandelkow EM, 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.
 - Vouyiouklis DA y Brophy PJ. 1995. Microtubule-associated proteins in developing oligodendrocytes: transient expression of a MAP2c isoform in oligodendrocyte precursors. *J Neurosci Res.* 142:803-817.
 - Wei W, Wang X, Kusiak JW. 2002. Signaling events in amyloid beta-peptide-induced neuronal death and insulin-like growth factor I protection. *J Biol Chem.* 277:17649-17656.
 - Welsh GI, Foulton EJ, Young SW, Tavaré JM, Proud CG. 1994. Wortmannin inhibits the effects of insulin and serum on the activities of glycogen synthase kinase-3 and mitogen-activated protein kinase. *Biochem J.* 303:15-20.

- Wiche G, Briones E, Koszka C, Artlieb U, Krepler R. 1984. Widespread occurrence of polypeptides related to neurotubule-associated proteins (MAP-1 and MAP-2) in non-neuronal cells and tissues. *EMBO J.* 3:991-998.
- Widelitz R. 2005. Wnt signaling through canonical and non-canonical pathways: recent progress. *Growth Factors* 23:111-116.
- Wilhelm JE y Vale RD. 1993. RNA on the move: the mRNA localization pathway. *J Cell Biol.* 123:269-274.
- Wille H, Drewes G, Biernat J, Mandelkow EM, 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.
- Wilson DM y Binder LI. 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.
- Windisch M, Wolf HJ, Hutter-Paier B, Hofmeister A, Wronski R. 2007. Is alpha-synuclein pathology a target for treatment of neurodegenerative disorders? *Curr Alzheimer Res.* 4:446-457.
- Wischik CM, Novak M, Thøgersen HC, Edwards PC, Runswick MJ, Jakes R, Walker JE, Milstein C, Roth M, Klug A. 1988. 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.* 85:4051-4055.
- Wischik CM, Novak M, Edwards PC, Klug A, Tichelaar W, Crowther RA. 1988. Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:4884-4888.
- Wiśniewski HM, Narang HK, Terry RD. 1976. Neurofibrillary tangles of paired helical filaments. *J Neurol Sci.* 27:173-181.
- Wittmann CW, Wszolek MF, Shulman JM, Salvaterra PM, Lewis J, Hutton M, Feany MB. 2001. Tauopathy in *Drosophila*: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science* 293:711-714.
- Wodarz A, Nusse R. 1998. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev. Biol.* 14:59-88.
- Xie H, Litersky JM, Hartigan JA, Jope RS, Johnson GV. 1998. The interrelationship between selective tau phosphorylation and microtubule association. *Brain. Res.* 798:173-183.
- Xu GG, Deng YQ, Liu SJ, Li HL, Wang JZ. 2005. Prolonged Alzheimer-like tau hyperphosphorylation induced by simultaneous inhibition of phosphoinositol-3 kinase and protein kinase C in N2a cells. *Acta Biochim Biophys Sin.* 37:349-354.

- Yu X y Malenka RC. 2004. Multiple functions for the cadherin/catenin complex during neuronal development. *Neuropharmacology* 47:779-786.
- Zhang J, Kang DE, Xia W, Okochi M, Mori H, Selkoe DJ, Koo EH. 1998. Subcellular distribution and turnover of presenilins in transfected cells. *J Biol Chem.* 273(20):12436-12442.
- Zheng-Fischhöfer Q, Biernat J, Mandelkow EM, Illenberger S, Godemann R, Mandelkow E. 1998. Sequential phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase-3beta and protein kinase A at Thr212 and Ser214 generates the Alzheimer-specific epitope of antibody AT100 and requires a paired-helical-filament-like conformation. *Eur J Biochem.* 252:542-552.

XIII. APÉNDICE

Histopathologic Changes Induced by the Microtubule-Stabilizing Agent Taxol in the Rat Hippocampus In Vivo

Octavio Mercado-Gómez, Patricia Ferrera, and Clorinda Arias*

Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México

Microtubules and their associated proteins play a prominent role in neuronal morphology, axonal transport, neuronal plasticity, and neuronal degeneration. It has been proposed that microtubule damage is sufficient to induce neuronal death. In this regard, the microtubule-stabilizing agent Taxol could be a useful tool to reproduce some aspects of neurodegenerative diseases associated with disturbances of the cytoskeleton and alterations in axonal transport. Although differential effects of Taxol on neuronal viability have been found in vitro, Taxol toxicity in the central nervous system remains to be addressed. We studied the effects of Taxol on neuronal morphology and viability as well as changes in microtubule-associated proteins MAP2 and tau in rat hippocampus. Our results show that Taxol induces dose-dependent neuronal death accompanied by the loss of MAP2 and the presence of dystrophic neurites. Interestingly paired helical filament (PHF)-1 immunoreactivity, which is associated with a phosphorylated epitope of tau proteins, was induced in the damaged hippocampus. Our results suggest that microtubule dynamics have a role in maintenance of neuronal morphology and survival in vivo, and that modifications in microtubule dynamics, may alter the content and neuronal distribution of MAP2 and promote alterations in the phosphorylation state of tau.

© 2004 Wiley-Liss, Inc.

Key words: microtubules; MAP2; neuronal death; tau; Taxol

Microtubules (MTs) and microtubule-associated proteins (MAPs) play a prominent role in the promotion of neurite extension (Dismore and Solomon, 1991), the induction of distinctive morphologies between axons and dendrites (Baudet et al., 1985; Manis, 1990), axonal transport (Vale et al., 1985), neuronal plasticity (Aoki and Siekevitz, 1985), and neuronal degeneration (Matsuyama and Juvik, 1989; Arias et al., 1993). Neuronal MAPs interact with tubulin and, in an in vitro system, promote the assembly of MTs by lowering the critical concentration of tubulin required for polymerization (Muepley and Borisy, 1975). Among different MAPs, MAP2 and tau are of great interest because of the findings that they are

located mainly in dendrites and axons, respectively and tau is the major component of paired helical filaments (PHFs), found in Alzheimer's disease brains.

It has been proposed that MT damage is sufficient to induce neuronal death (Bonfoco et al., 1996; Nuydens et al., 2000) and some evidence supports the notion that alterations in MTs or upregulation of tau synthesis are involved in the pathophysiology of PHF formation (Ackmann et al., 2000).

Paclitaxel (Taxol) is used as an antineoplastic drug and was isolated from the Western yew, *Taxus brevifolia* (for review see Blagosklonny and Fojo, 1999; Kingston, 2000). The intense interest on this drug is a consequence of the demonstration that it promotes the polymerization of tubulin and the formation of undesirable stable MTs by affecting the tubulin/microtubule equilibrium (Schiff et al., 1979; Schiff and Horwitz, 1980). Taxol induces apoptosis in cancer and in nonneurological cell lines, presumably by causing cell cycle arrest at the G₂/M phase (Jordan et al., 1996). It has been demonstrated recently that Taxol effects on nonneurological cell death is mediated by activation of N-terminal c-Jun protein kinase and phosphorylation of Bcl-2 (Srivastava et al., 1999). Taxol treatment is associated with serious side effects such as peripheral neuropathy in humans and animal models (Postma et al., 1999). More recently, it has been reported that Taxol induces apoptosis in postmitotic cortical neurons and it was suggested that it may be a useful model for neurodegenerative diseases associated with disturbances in the cytoskeleton and alterations in axonal transport (Figueroa-Masot et al., 2003). The toxicity of Taxol, however, has not been determined in the central nervous system (CNS). The aim of the present work was evaluate the effects of Taxol on neuronal morphology and eventually on neuronal survival as well as

Contract grant sponsor: CONACYT; Contract grant number: 26250-M.

*Correspondence to: Clorinda Arias, Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, AP 70-228, CP 04510, México D.F., México. E-mail: carias@servidor.unam.mx

Received 24 March 2004; Revised 18 June 2004; Accepted 6 July 2004

Published online 24 September 2004 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jnr.20264

© 2004 Wiley-Liss, Inc.

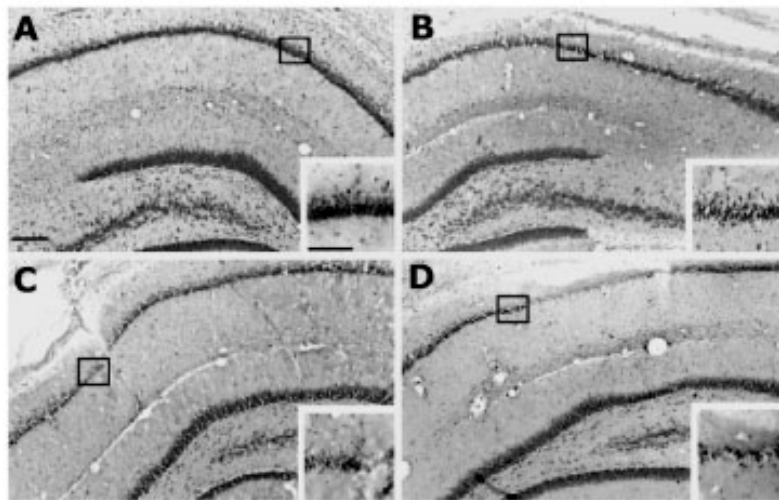


Fig. 1. Time course of neurodegeneration induced by the microinjection of 80 μg Taxol in the CA1 hippocampal region, as assessed by cresyl violet staining. **A**: Control contralateral hippocampus of the 24-hr rat; **B**), 12 (**C**) and 24 hr (**D**) after Taxol administration, respectively. Insets are higher magnifications of the corresponding zones marked by a square. Each micrograph is representative of four to eight rats. Scale bar = 200 μm ; 100 μm (insets).

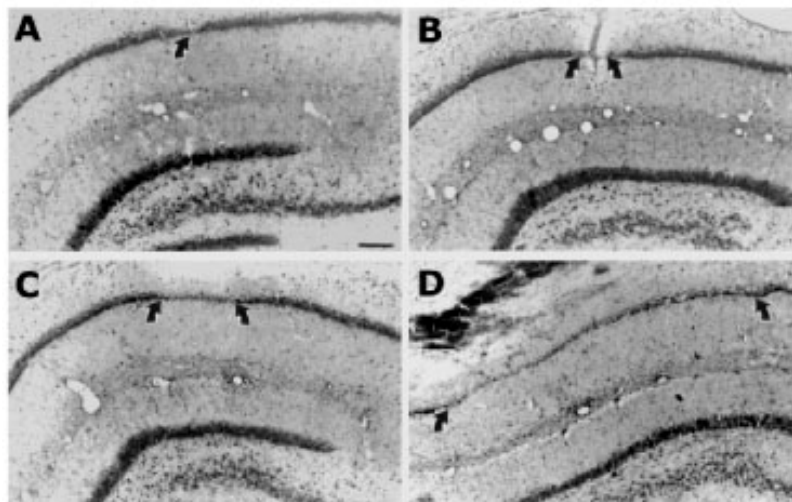


Fig. 2. Taxol-induced dose-dependent increase in lesion volume (**B–D**) in the CA1 region at 24 hr after microinjection (cresyl violet staining). **A**: With vehicle (1 μl of DMSO), the only visible lesion corresponds to the needle tract; 20 (**B**), 40 (**C**), and 80 μg (**D**) Taxol, respectively. Number of rats and quantitative estimate of lesioned areas are shown in Table I. Scale bar = 200 μm .

on cytoskeletal alterations in rat hippocampus *in vivo* based on excessive microtubule stabilization.

MATERIALS AND METHODS

Stereotaxic Injections

Male Wistar rats (220–250 g body weight) were used throughout, and were handled with all precautions necessary to minimize the number of animals used and their suffering, in accordance with the Rules for Research in Health Matters (México), with approval of the local Animal Care Committee. Animals were anesthetized with 3–4% halothane in 95% O_2 /5% CO_2 mixture and secured in a stereotaxic frame with the nose bar positioned at -0.3 mm. Unilateral injections

were made into the right CA1 hippocampal region, according to the following coordinates, with reference to bregma (Paxinos and Watson, 1982): A -3.6 , L 2.0 , and V 2.5 . Taxol (paclitaxel; Sigma-Aldrich) was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich) at a final concentration of 250 mM and 20, 40, and 80 μg (25, 50, and 100 nmol, respectively) were infused in a 1 μl volume at a rate of 0.5 $\mu\text{l}/\text{min}$, using a microsyringe mounted in a microinjection pump (Stoelting, Wood Dale, IL). Control animals received 1 μl DMSO. After the stereotaxic injection, the skin was sutured, anesthesia was discontinued, and the rats returned to individual cages and provided with food and water *ad lib* until the time of perfusion.

Nissl Staining and Immunohistochemistry

After 3 hr, 12 hr, 24 hr, and 7 days of intrahippocampal injections, control and treated rats were anesthetized with pentobarbital sodium and perfused transcardially with 200 ml of 0.9% saline followed by 200 ml of 4% formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). Brains were removed and left in fixative for additional 24 hr. Brains were then transferred successively to 20% and 30% sucrose (24 hr each) and 40 μ m coronal sections were cut in a cryostat and stained with cresyl violet. The lesion size was calculated by examination of all brain sections where neuronal damage was evident in each one of the experimental animals. Tissue was considered damaged when intensively stained pyknotic nuclei were present. The damaged area in each tissue section was delineated manually and measured with the aid of an image analyzer (NIH Image v.1.6 for Macintosh). The lesion volume was calculated by adding the measured areas in all sections and multiplying the sum by the distance between the first and the last sections where damage was visible, as described previously (Arias et al., 2002). Results are expressed as means \pm standard error of the mean (SEM) of the lesion volume per each animal group.

TABLE I. Dose-Dependent Increase in Lesion Volume Induced by Taxol in CA1⁺

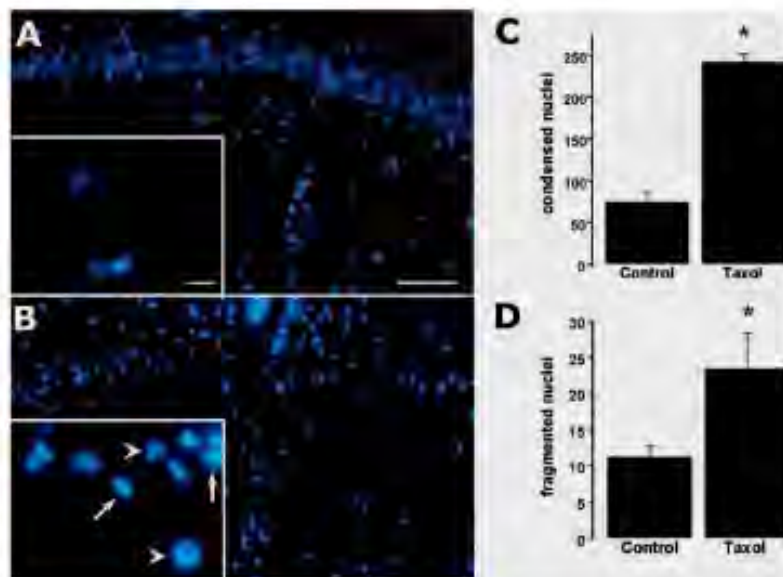
Taxol dose (μ g)	Lesion volume (μ m ³)	n
0	0.28 \pm 0.05	6
20	0.47 \pm 0.20	6
40	0.96 \pm 0.42	7
80	2.62 \pm 0.84*	10

Data represent means \pm SEM of the number of animals (n). **P* < 0.05 relative to vehicle-treated animals.

For immunohistochemistry, free-floating sections were incubated at room temperature for 30 min in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.25% Triton X-100 and 0.3% H₂O₂ and left overnight at 4°C in 5% albumin-PBS. Slices were then exposed for 24 hr at 4°C in a 5% albumin-PBS solution containing either MAP2 primary monoclonal antibody (3 μ g/ml, clone AP20; Boehringer Mannheim), tau-1 monoclonal antibody (2 μ g/ml, clone PC1C6; Boehringer Mannheim), PHF-1 (1:100), which is a monoclonal antibody that recognizes a phosphorylated epitope in a population of tau proteins that are associated with PHFs isolated from extracts of Alzheimer's disease brain homogenates (generously provided by Dr. Peter Davies), or glial fibrillary acidic protein (GFAP) monoclonal antibody (0.2 μ g/ml, clone G-A-5; Boehringer Mannheim). At the end of this period, slices were incubated twice with PBS (5 min each) and processed using the anti-mouse immunoglobulin (IgG) (1:500) and the ABC-biotin-avidin-peroxidase kit, with diaminobenzidine tetrahydrochloride as substrate. Negative controls consisted of eliminating primary antibodies in the procedure.

Fluorescent dye, DAPI (Boehringer Mannheim), which intercalates specifically into the adenine-thymine base pairs of DNA, was used to identify nuclear morphology. Frozen sections were immersed with 0.1 μ g/ml DAPI in PBS for 20 min at room temperature. The sections were then observed using an epifluorescence microscope. A quantitative estimate of Taxol-induced condensed or fragmented nuclei in the CA1 region was analyzed for two slices per rat for two rats in each group (Taxol-injected compared to DMSO-injected groups). Data are means \pm SEM. Paired Student's *t*-test was carried out for statistical analysis.

Fig. 3. Representative DAPI-stained nuclear morphology of pyramidal CA1 neurons treated with vehicle (A) or 80 μ g Taxol (B) after 24 hr. Insets show high magnification of A and B. Arrowheads identify fragmented nuclei and arrows show condensed nuclei after Taxol treatment. Each micrograph is representative of two experiments; a quantitative estimate of Taxol-induced condensed or fragmented nuclei is shown in bars (C, D). Data are means \pm SEM for two slices per rat for two rats in each group. Scale bar = 100 μ m; 10 μ m (high magnification). **P* < 0.05 relative to DMSO-treated (control) animals.



Electron Microscopy

Male Wistar rats (250 g) were injected into the right hippocampus with 80 μ g Taxol or vehicle (DMSO). After 24 hr, rats were anesthetized with pentobarbital sodium and perfused transcardially with 250 ml PBS followed by 250 ml of 4% paraformaldehyde and 1% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). After perfusion, brains were removed from the skull. Blocks from injected and contralateral dorsal hippocampus, containing the CA1 subfield, were dissected and washed in 0.1 M PBS. Sections were embedded in resina (Epon), cut with a diamond knife and stained with uranyl acetate/lead citrate. Samples were analyzed on a Jen 1200 EX II microscope.

RESULTS

Taxol-Induced Neurotoxicity

Intrahippocampal administration of 80 μ g Taxol induced cellular changes as observed by Nissl staining. Changes were apparent as early as 3 hr after injection, particularly in the CA1 area but also involving some granular cells of dentate gyrus (Fig. 1B). At this time, the cellular layer of CA1 was reduced in thickness and the shape of neurons changed from the normal round (Fig. 1A) to stellate form. At 12 hr, morphologic changes progressed and neurons seemed pyknotic (Fig. 1C), and at 24 hr a pattern of cell loss was evident (Fig. 1D).

As shown in Figure 2 and Table 1, a dose-dependent increase in lesion volume elicited by Taxol was observed 24 hr after injection. Practically no damage was observed with 20 μ g Taxol in any hippocampal region (Fig. 2B), 40 μ g induced a clear damage in CA1 and some lesion in the dentate gyrus (Fig. 2C), whereas the damage produced by 80 μ g was more intense and occurred more frequently (Fig. 2D). Control animals injected with DMSO presented a small damaged area near the needle track that was very similar to that observed with the 20 μ g dose of Taxol (Fig. 2A). Lesioned areas in CA1 at different doses 24 hr after Taxol administration were 0.47 ± 0.20 , 0.96 ± 0.42 , and 2.6 ± 0.84 mm³ for the doses of 20, 40 and 80 μ g, respectively (Table 1).

Animals injected with 80 μ g of Taxol showed many DAPI-positive DNA fluorescent nuclei after 24 hr in hippocampal CA1 region. Using this technique, it was possible to observe the presence of shrunken and fragmented nuclei (compared to DMSO-injected hippocampus) that denotes neurons undergoing apoptosis (Fig. 3).

After 24 hr, ultrastructural analysis of Taxol-treated hippocampus revealed the presence of highly disturbed tissue with many damaged mitochondria. The absence of synapses compared to control tissue was marked and swollen dendrites with an altered MT network that seemed discontinuous (Fig. 4) were observed.

Effects of Taxol on MAP2, Tau and GFAP Immunoreactivity

The distribution pattern of MAP2 immunoreactivity in the hippocampus has been described extensively (Bernhardt and Matus, 1984; De Camilli et al., 1984; Arias et al.,

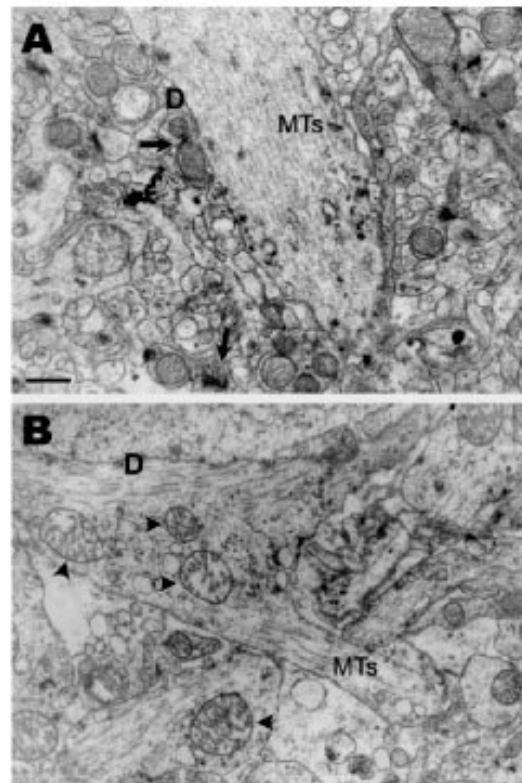


Fig. 4. Representative electron micrographs illustrating dendrites of the hippocampal CA1 region from vehicle-injected (A) and Taxol-treated rats (80 μ g) (B). Control hippocampus shows a healthy dendrite (D) with abundant straight microtubules (MTs) and many synapses (arrows), whereas in Taxol-injected hippocampus, dendrites and mitochondria (arrowheads) seemed swollen and MTs discontinuous. Original magnification 15,000 \times . Scale bar = 0.5 μ m.

1997). Consistent with these reports, we observed that it was located mainly in the dendritic field of the stratum radiatum and practically absent in pyramidal neuronal somata (Fig. 5A,E). Notable changes in this pattern were observed in MAP2 immunoreactivity after 80 μ g Taxol injection. A loss of protein in the stratum radiatum of CA1 was evident as early as 3 hr after Taxol injection (Fig. 5B,F). This loss was more notable at 12 hr (data not shown) and persisted after 24 hr (Fig. 5C,G) and 7 days (Fig. 5D,H). After 24 hr or 7 days of drug administration, a few neuronal somata in CA1 showed MAP2 immunostaining, and many dystrophic neurites were observed clearly (Fig. 5G,H). At 7 days, however, the injected tissue became fragile and some fragments were lost during the histologic manipulation.

The distribution of tau-1 immunoreactivity in control rats was similar to that reported previously (Dotti et

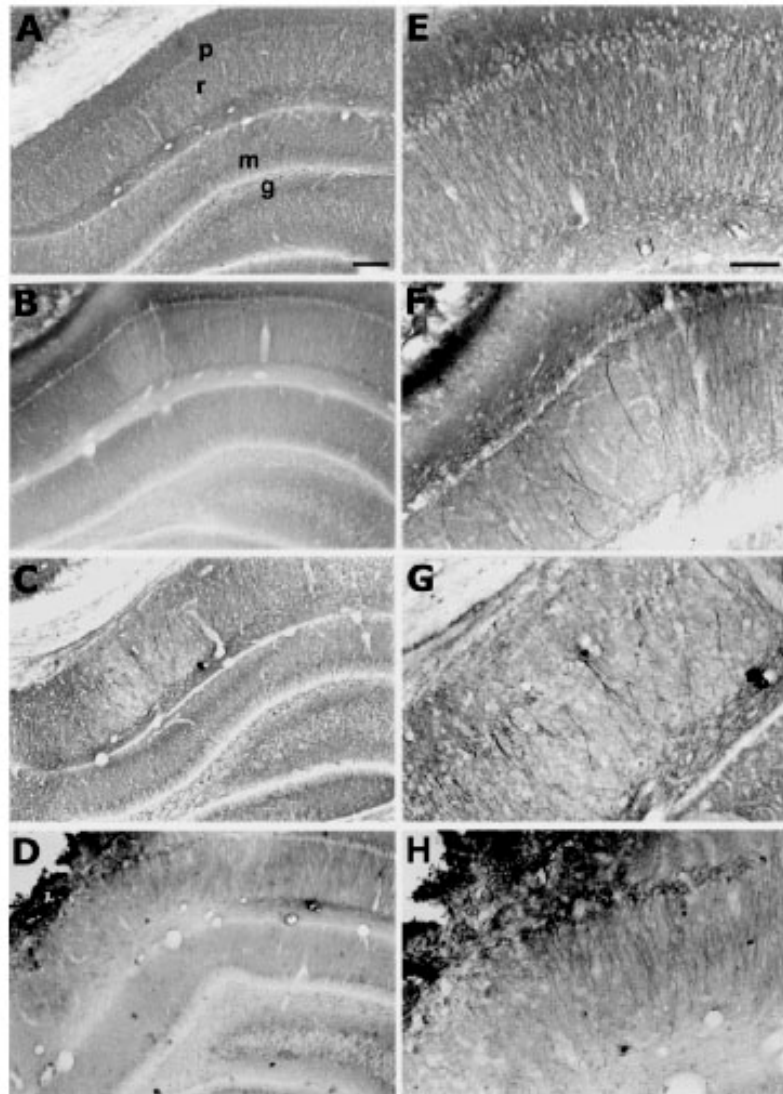


Fig. 5. Temporal course of changes in MAP2 immunostaining (A–D) and its respectively high magnifications (E–H) in the CA1 region after 80 μ g taxol. Non-injected contralateral hippocampus shows a normal pattern of MAP2 distribution (A, E). At 3 hr after Taxol injection, a loss of dendritic MAP2 is observed in stratum radiatum (B) and is accompanied by altered dendritic morphology (F). At 24 hr, a more pronounced loss of MAP2 is observed (C) and in some neurons MAP2 is concentrated in neuronal somata (G). At 7 days, the loss of MAP2 is more evident (D) and the presence of the protein in some neuronal somata and in some dystrophic neurites persisted (H). Each micrograph is representative of four to eight rats; p, stratum pyramidale; r, stratum radiatum; m, stratum moleculare; g, granular cell layer. Scale bar = 200 μ m; 100 μ m (high magnification).

al., 1987). Staining was evident in the neuropil but not in neuronal cell bodies. Within the molecular layer of the dentate gyrus, tau immunoreactivity was greatest in the inner and middle molecular layers and relatively light in the outer molecular layer. Across the hippocampal fissure in CA1, staining was relatively uniform in the stratum lacunosum moleculare, stratum radiatum, and stratum oriens. Neuronal cell bodies in stratum pyramidale were unstained but were surrounded by tau immunoreactivity (Fig. 6A contralateral to Taxol-injected hippocampus).

After 24 hr, animals treated with 80 μ g Taxol showed a slightly increase in tau-1 immunoreactivity (Fig. 6A). After 7 days of Taxol injection, however, the appearance of new tau-1-positive mossy fibers was evident (Fig. 6B, ipsilateral compared to the contralateral hippocampus). Hippocampal sections stained with PHF-1 antibody showed the same immunoreactivity distribution as tau-1 antibody did but the staining was scarce in the contralateral hippocampus (Fig. 7A). Interestingly, after 7 days of Taxol injection, the appearance of PHF-1-immunopositive fibers of CA3 (Fig. 7C

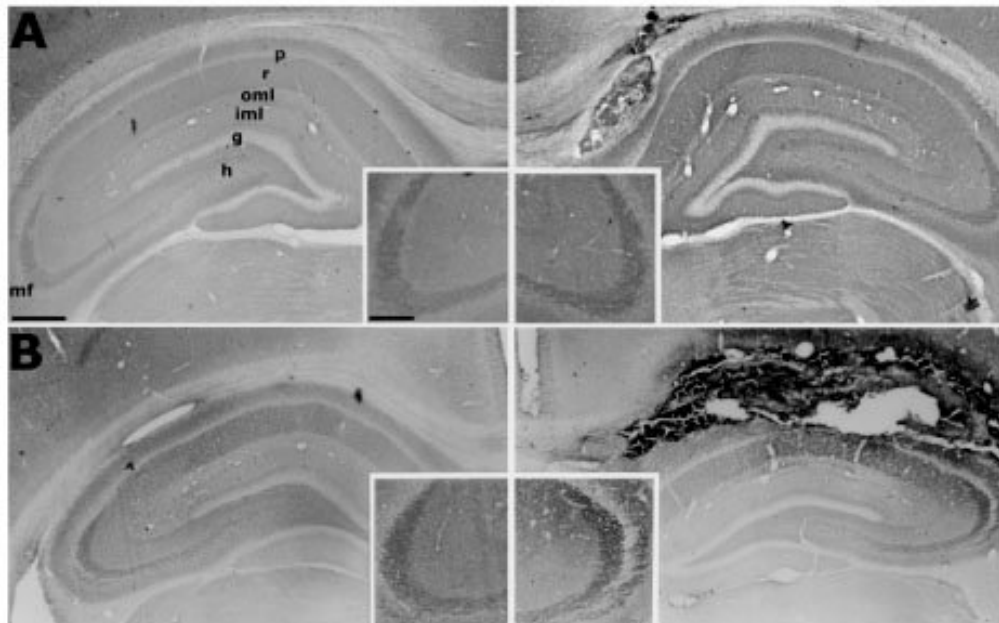


Fig. 6. Temporal course of changes in tau-1 immunoreactivity after Taxol injection (80 μ g) compared to that in the contralateral hippocampus. Insets show high magnification of the CA3 region. At 24 hr after Taxol injection, tau-1 staining slightly increases in the inner molecular layer and in CA1 stratum radiatum (A). At 7 days after Taxol

injection, there is a loss of tau immunostaining in the inner and outer molecular layer (B) but a remarkable increase in new mossy fibers that appeared in stratum oriens (B, inset) in Taxol-injected hippocampus compared to that in contralateral hippocampus. Each micrograph is representative of four to six rats. Scale bars = 500 μ m; 100 μ m (insets).

compared to 7B) and in the hilar zone of dentate gyrus was noteworthy. In addition, PHF-1 immunoreactivity was observed also in some cell bodies along the injected hippocampus, particularly in the subgranular zone of dentate gyrus (Fig. 7E compared to 7D).

Figure 8 shows the pattern of distribution (Fig. 8A) and shape of GFAP-positive cells (Fig. 8E), which is consistent with previous reports (Dugar et al., 1998). After 3 and 24 hr of Taxol injection, reactive gliosis in the ipsilateral hippocampus was observed surrounding the lesion site whereas the core displayed a reduced number of GFAP-positive astrocytes with thin processes (Fig. 8B,C,F,G). After 7 days of Taxol-induced neurotoxicity, reactive gliosis was demonstrated by the upregulation of GFAP-immunopositive cells, which were distributed evenly in the injected hippocampus (Fig. 8D). At this time, the presence of hypertrophic astrocytes was evident (Fig. 8D,H).

Changes in MAP-2-, PHF-1- and GFAP-positive cells were observed only near the needle track in vehicle-injected rats (data not shown).

DISCUSSION

We examined the *in vivo* effects of Taxol on neuronal morphology, survival, and distribution of MAP2 and

tau proteins in the rat hippocampus. Taxol stabilizes MTs by binding to assembled tubulin with an exact 1:1 stoichiometry (Díaz and Andreu, 1993). This drug is used as an anticancer drug against multiple types of cancer and several reports suggest that Taxol cytotoxicity involves a signaling common to all MT-active drugs (Haldar et al., 1997). It has been suggested that Taxol-induced MT damage is sufficient to produce neuronal death independent of its cell cycle effects in cell culture (Figuroa-Masot et al., 2001). Recent findings, however, also suggest a protective effect of Taxol on neurotoxicity induced by the β -amyloid peptide in primary neuronal culture (Michaelis et al., 1998; Li et al., 2003; Sponne et al., 2003). Differential effects of Taxol in *in vitro* models remains poorly understood. At present, relevant effects of Taxol should be assumed to result from its MT-binding activity (Blagosklonny and Fojo, 1999), which in turn promotes the polymerization of tubulin monomers and the formation of stable, nonfunctional MTs (Gotaskie and Andreassi, 1994).

We demonstrated that in an early phase, Taxol induces changes in neuronal morphology and in time, neuronal death. These results support the notion that stabilization of MT dynamics, as triggered by Taxol, is capable to induce neurodegeneration in postmitotic neurons in

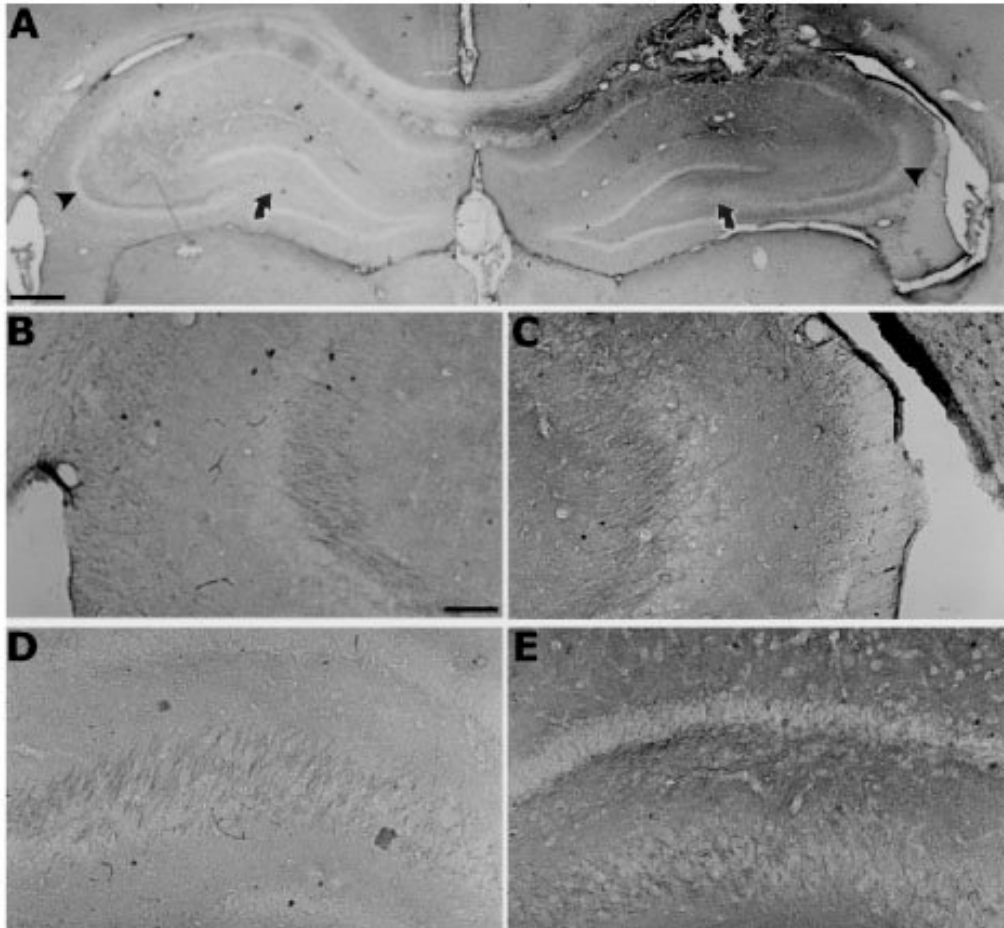


Fig. 7. Photomicrographs showing PHF-1 immunoreactivity from contralateral and ipsilateral hippocampus 7 days after 80 μ g Taxol (A). High magnification of CA3 region from the corresponding zone marked by arrowheads in A demonstrates an increase of PHF-1-immunopositive fibers from Taxol-injected (C) compared to contralateral hippocampus (B). D, E: Higher magnification of the area marked

by arrows in A. The presence of many PHF-1-positive fibers and some neuronal somata in the hilar region and subgranular cell layer of the injected hippocampus (E) compared to contralateral (D) is remarkable. Each micrograph is representative of five rats. Scale bars = 500 μ m; 100 μ m (insets).

vivo. In our *in vivo* model, neuronal death induced by Taxol resembled an aspect of apoptotic death that has been characterized previously by the presence of fragmented nuclei in cultured neurons (Figueroa-Masot et al., 2001). In addition to the presence of fragmented nuclei, ultrastructural analysis of Taxol-treated hippocampus revealed the presence of highly disturbed and swelled mitochondria, another feature of apoptotic cells. In agreement with this finding, previous reports have shown that Taxol induces mitochondrial swelling and cytochrome c release in neuroblastoma isolated mitochondria (André et al., 2000;

Carré et al., 2002). In addition, an increase of reactive oxygen species (ROS) in intact neuroblastoma cells has been described recently (André et al., 2002). Taken together, this evidence suggests that Taxol has additional effects on cellular integrity other than the modifications caused by MT dynamics, and we therefore cannot exclude that these or similar processes may contribute to neuronal death observed in the present model.

It has been reported that in hippocampal slice cultures, Taxol induced selective degeneration of dentate granule cells similar to that induced by the MT-disrupting

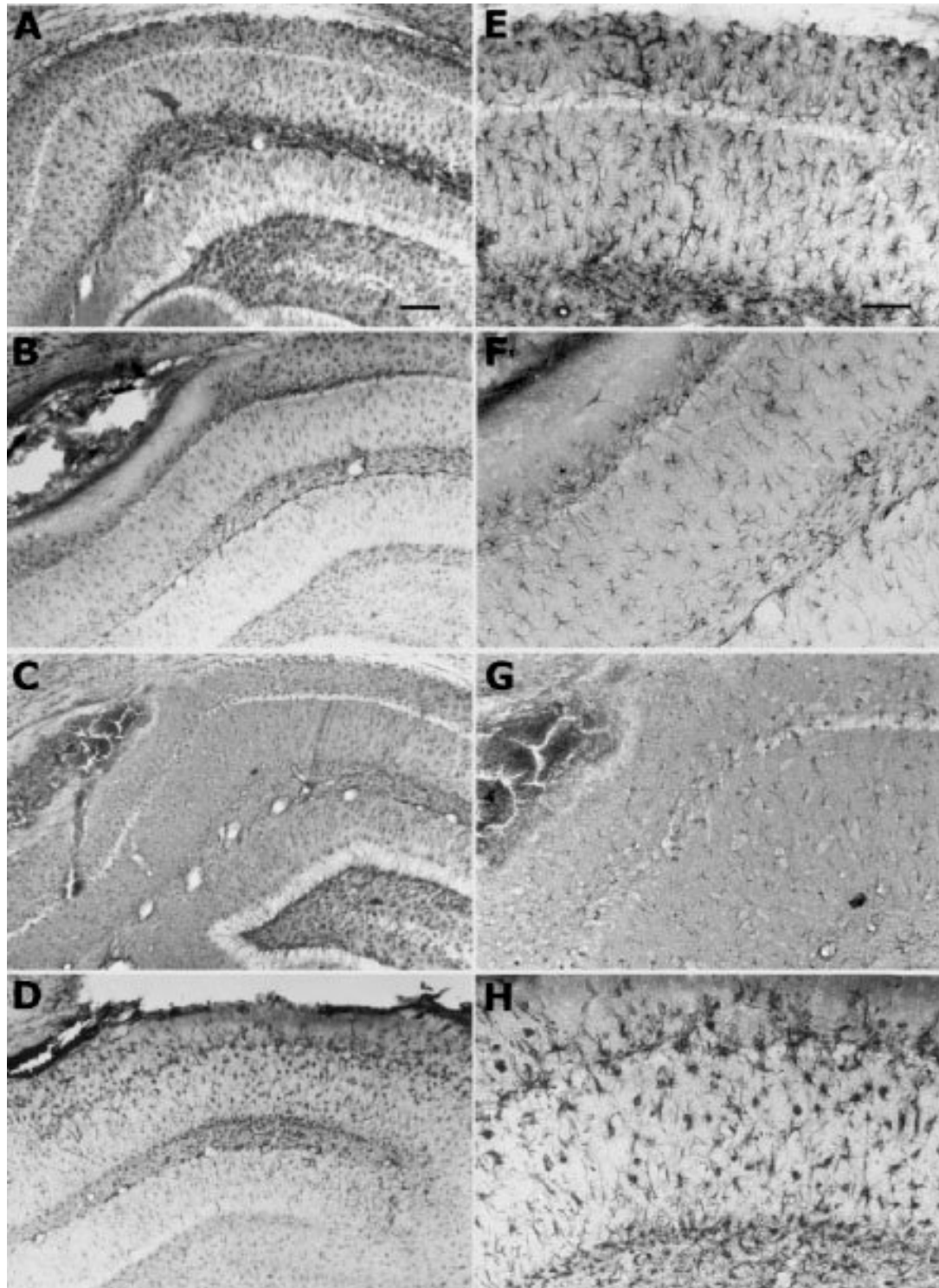


Fig. 8. Temporal course of changes in GFAP-positive astrocytes from contralateral (A) and Taxol-injected hippocampus (B- D) and its respectively high magnifications (E-H). Note the reduced number of GFAP-immunoreactive astrocytes at 3 and 24 hr after Taxol injection (B and C compared to A) and the presence of astrocytes with very thin processes (F and G compared to E). At 7 days after Taxol administration, reactive gliosis was distributed generally in the injected hippocampus (D) and many hypertrophic astrocytes are observed surrounding the lesion (H). Each micrograph is representative of four rats. Scale bar = 200 μ m; 100 μ m (higher magnification).

agent colchicine (Kim et al., 2002). In the present work, however, we observed neuronal death mainly in the CA1 region and to some degree in dentate gyrus cells. Given that our injection was targeted mainly to the CA1 region, greater damage to his region was to be expected. The drug dose used may well contribute to the observed regional damage, as has been suggested previously for colchicine in vivo injections (Goldschmidt and Steward, 1980).

At present, little is known about the relationships between MT disruption in vivo and changes in MAPs, which could be relevant to understand a few aspects of cytoskeletal alterations that occur in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease. In this respect, the MT-destabilizing agent colchicine in neuronal cultures can cause antigenic changes in tau similar to those observed in Alzheimer's disease (Mattson, 1992). It has been demonstrated changes in tau phosphorylation depending on the state of MTs dynamics in neuroblastoma cells treated with nocodazole or Taxol (Xie et al., 1998).

MAP2 and tau have long been postulated as regulators of MT stability and in this context it was interesting to find that Taxol induced changes in hippocampal content and redistribution of MAP2, as well as the appearance of the tau-related PHFs recognized by the PHF-1 antibody.

MAP2 is a susceptible target of Taxol-induced neurotoxicity. This susceptibility manifests itself as an intraneuronal redistribution and a loss of normal dendritic localization, which was similar to changes observed during ischemia or excitotoxicity (Pettigrew et al., 1996; Arias et al., 1997). Changes in MAP2 neuronal redistribution may be secondary to Taxol inhibition of MT stabilization. In agreement with this interpretation, it has been found that axonal transport hampered by Taxol is accompanied by MAP2 accumulation in the soma in neuronal culture (Theiss and Meller, 2000).

Interestingly, our results also showed that Taxol produces profound changes in the MAP2-labeled processes of the dendritic tree located mainly in stratum radiatum of the CA1 region as early as 3 hr before neuronal death. These changes consisted of large unstained spaces and processes of varied length, which often seemed beaded and swollen, pointing to the role of MT dynamics in preservation of dendritic morphology. Despite intense changes in MAP2-labeled processes, total amount of tau, as observed through staining with tau-1 antibody, seemed without significant changes. An increase in phosphorylation of sites recognized by the PHF-1 antibody (Ser396/404; Orvos et al., 1994), however, appeared after 7 days of Taxol injection.

It has been shown recently that Taxol decreases the amount of tau bound to MTs by reducing the affinity between tau and tubulin (Kar et al., 2003). If this was the case in the present model, an increase in the pool of tau unbound to MTs could make tau more vulnerable to biochemical changes, possibly related to the appearance of the PHF-1 phosphorylated site. Taken together, these results may indicate that Taxol effects on MT stability may alter the rate of tau phosphorylation/dephosphorylation.

Interestingly, 7 days after Taxol treatment, sprouting of mossy fibers in the stratum oriens of the CA3 region of the hippocampus was evident in samples stained with tau-1 antibody, and to a lesser degree with PHF-1. It is possible that after Taxol damage of the pyramidal neurons in the CA1 region, a reorganization of hippocampal cytoarchitecture, particularly of axonal fibers, may occur similarly to that reported after a brief period of seizures (Represa and Ben-Ari, 1997). These new projections may have an influence over the remaining pyramidal cell firing as a compensatory mechanism.

After a neuronal lesion, the formation of a glial scar is not surprising; however, 24 hr after Taxol administration, a clear loss of GFAP-positive astrocytes surrounding the injected site was observed. Astroglial reaction in response to CNS damage involves mobilization and mitotic activation of this type of cells leading to the development of the glial scar. The absence of glial cells 24 hr after Taxol administration may be due to the well-known toxic effects of Taxol on mitotic cells. After 7 days of Taxol injection, however, an intense glial reaction was observed and the presence of alterations of astrocyte morphology was evident. There is strong evidence showing that reactive gliosis varies qualitatively and quantitatively depending on both the nature of the injury and the microenvironment of the lesion area (Ridet et al., 1997). We found a delayed astroglial response and subsequent vigorous activation of the anisomorphic astrocytes, suggesting highly disturbed tissue architecture.

Although Taxol has been proposed as an alternative therapeutic tool in some neurodegenerative diseases in which cytoskeletal alterations are prominent, our findings suggest that Taxol could be toxic to mature neurons in the hippocampus in vivo. The present work also suggests that neurodegeneration elicited by Taxol in mature neurons may provide a useful model to study changes in MAPs, which in turn may help to elucidate some of the events that underlie the formation of PHFs in Alzheimer's disease.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. P. Davies for his generous gift of PHF-1 antibody. We also thank Dr. A. Zepeda for her helpful comments and I. Pérez-Montfort for revision of the English in this study.

REFERENCES

- Ackmann M, Wiech H, Mandelkow E. 2000. Nonsaturable binding indicates clustering of tau on the microtubule surface in a paired helical filament-like conformation. *J Biol Chem* 275:30335-30343.
- André N, Braguer D, Brasseur G, Goncalves A, Lemesle-Meunier D, Guise S, Jordan MA, Briand C. 2000. Paclitaxel induces release of cytochrome c from mitochondria isolated from human neuroblastoma cells. *Cancer Res* 60:5349-5353.
- André N, Carré M, Brasseur G, Poutroy B, Kovacic H, Briand C, Braguer D. 2002. Paclitaxel targets mitochondria upstream of caspase activation in intact human neuroblastoma cells. *FEBS Lett* 532:256-260.

- Aoki C, Siekevitz P. 1985. Ontogenic changes in the cyclic adenosine 3'5'-monophosphate-stimulatable of rat visual cortex proteins, particularly of microtubule-associated protein 2 (MAP 2): effects of normal and dark rearing and the exposure to light. *J Neurosci* 5:2465-2483.
- Arias C, Arrieta I, Massieu L, Tapia R. 1997. Neuronal damage and MAP2 changes induced by the glutamate transport inhibitor dihydrokainate and by kainate in rat hippocampus in vivo. *Exp Brain Res* 116:467-476.
- Arias C, Montiel T, Quiroz-Báez R, Massieu L. 2002. β -Amyloid neurotoxicity is exacerbated during glycolysis inhibition and mitochondrial impairment in the rat hippocampus in vivo and in isolated nerve terminals: implications for Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 176:163-174.
- Arias C, Sharma N, Davies P, Shafiq-Zagardo B. 1993. Okadaic acid induces early changes in microtubule-associated protein 2 and tau phosphorylation prior to neurodegeneration in cultured cortical neurons. *J Neurochem* 61:673-682.
- Bernhardt R, Matus A. 1984. Light and electron microscopic studies of the distribution of microtubule-associated protein 2 in rat brain: a difference between dendritic and axonal cytoskeletons. *J Comp Neurol* 226:203-221.
- Binder LI, Frankfurter A, Rehbenk LE. 1985. The distribution of tau polypeptides in the mammalian nervous system. *J Cell Biol* 101:1371-1378.
- Blagosklonny MV, Fojo T. 1999. Molecular effects of paclitaxel: myths and reality (a critical review). *Int J Cancer* 83:151-156.
- Bonfoco E, Leist M, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P. 1996. Cytoskeletal breakdown and apoptosis elicited by NO donors in cerebellar granule cells require NMDA receptor activation. *J Neurochem* 67:2484-2493.
- Caré M, Carles G, André N, Douillard S, Ciccolini J, Briand C, Brague D. 2002. Involvement of microtubules and mitochondria in the antagonism of arsenic trioxide on paclitaxel-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol* 63:1831-1842.
- De Camilli P, Miller PE, Navone F, Theurkauf WE, Vallee RB. 1984. Distribution of microtubule-associated protein 2 in the nervous system of the rat studied by immunofluorescence. *Neuroscience* 11:817-846.
- Diaz JF, Andreu JM. 1993. Assembly of purified GDP-tubulin into microtubules induced by taxol and taxotene: reversibility, ligand stoichiometry, and competition. *Biochemistry* 32:2747-2755.
- Dinsmore JH, Solomon F. 1991. Inhibition of MAP2 expression affects both morphological and cell division phenotypes of neural differentiation. *Cell* 64:817-826.
- Doti CG, Banker GA, Binder LI. 1987. The expression and distribution of the microtubule-associated proteins tau and microtubule-associated protein 2 in hippocampal neurons in the rat in situ and in cell culture. *Neuroscience* 23:121-130.
- Dugar A, Patanow C, O'Callaghan JP, Lakoski JM. 1998. Immunohistochemical localization and quantification of glial fibrillary acidic protein and synaptosomal-associated protein (mol. wt 25000) in the ageing hippocampus following administration of 5,7-dihydroxytryptamine. *Neuroscience* 85:123-133.
- Figueras-Masot XA, Hetman M, Higgins MJ, Kokot N, Xia Z. 2001. Taxol induces apoptosis in cortical neurons by a mechanism independent of Bcl-2 phosphorylation. *J Neurosci* 21:4657-4667.
- Goldschmidt RB, Steward O. 1980. Preferential neurotoxicity of colchicine for granule cells of the dentate gyrus of the adult rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:3047-3051.
- Gotaskie GE, Andreassi BF. 1994. Paclitaxel: a new antimetabolic chemotherapeutic agent. *Cancer Pract* 2:27-33.
- Haldar S, Basu A, Croce CM. 1997. Bcl2 is the guardian of microtubule integrity. *Cancer Res* 57:229-233.
- Jordan MA, Wendell K, Gardiner S, Derry WB, Copp H, Wilson L. 1996. Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer Res* 56:816-825.
- Kar S, Fan J, Smith MJ, Goedert M, Amos L. 2003. Repeat motifs of tau to the insides of microtubules in the absence of taxol. *EMBO J* 22:70-77.
- Kim JA, Mitukawa K, Yamada MK, Nishiyama N, Matsuki N, Ikegaya Y. 2002. Cytoskeleton disruption causes apoptotic degeneration of dentate granule cells in hippocampal slice cultures. *Neuropharmacology* 42:1109-1118.
- Kingston DG. 2000. Recent advances in the chemistry of taxol. *J Nat Prod* 63:726-734.
- Li G, Faltschevich A, Turunen BJ, Yoon SO, Georg G, Michaelis ML, Dobrowsky RT. 2003. Stabilization of the cyclin-dependent kinase 5 activator, p35, by paclitaxel decreases beta-amyloid toxicity in cortical neurons. *J Neurochem* 84:347-362.
- Matsuyama SS, Jarvik LF. 1989. Hypothesis: microtubules, a key to Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:8152-8156.
- Mattson MP. 1992. Effects of microtubule stabilization and destabilization on tau immunoreactivity in cultured hippocampal neurons. *Brain Res* 582:107-118.
- Matus A. 1990. Microtubule-associated proteins and the determination of neuronal form. *J Physiol (Paris)* 84:134-137.
- Michaelis ML, Ranciat N, Chen Y, Bechtel M, Ragan R, Hepperle M, Liu Y, Georg G. 1998. Protection against beta-amyloid toxicity in primary neurons by paclitaxel (taxol). *J Neurochem* 70:1623-1627.
- Murphy DB, Borisy GG. 1975. Association of high-molecular-weight proteins with microtubules and their role in microtubule assembly in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:2696-2700.
- Nuydens R, Dipensyn G, Van Den Keiboom G, de Jong M, Connors R, Ramaekers F, Borgers M, Geerts H. 2000. Bcl-2 protects against apoptosis-related microtubule alterations in neuronal cells. *Apoptosis* 5:43-51.
- Ottoo L Jr, Feiner L, Lang E, Szendrei GI, Goedert M, Lee VM. 1994. Monoclonal antibody PHF-1 recognizes tau protein phosphorylated at serine residues 396 and 404. *J Neurosci Res* 39:669-673.
- Paxinos G, Watson C. 1982. The rat brain stereotaxic coordinates. Sidney: Academic Press.
- Pettigrew LC, Holtz ML, Craddock SD, Minger SL, Hall N, Geddes JW. 1996. Microtubular proteolysis in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:1189-1202.
- Postma TJ, Hoekman K, van Riel JM, Heimans JJ, Vermorken JB. 1999. Peripheral neuropathy due to biweekly paclitaxel, epirubicin and cisplatin in patients with advanced ovarian cancer. *J Neurooncol* 45:241-246.
- Reprea A, Ben-Ari Y. 1997. Molecular and cellular cascades in seizure-induced neosynapse formation. *Adv Neurol* 72:25-34.
- Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH. 1997. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* 20:570-577.
- Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. 1979. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 277:665-667.
- Schiff PB, Horwitz SB. 1980. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:1561-1565.
- Sponne I, Fife A, Drouet B, Klein C, Koziel V, Pincon-Raymond M, Olivier JL, Chambaz J, Pillot T. 2003. Apoptotic neuronal cell death induced by the non-fibrillar amyloid-beta peptide proceeds through an early reactive oxygen species-dependent cytoskeleton perturbation. *J Biol Chem* 278:3437-3445.
- Srivastava RK, Mi QS, Hardwick JM, Longo DL. 1999. Deletion of the loop region of the Bcl-2 completely blocks paclitaxel-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:3775-3780.
- Theiss C, Meller K. 2000. Taxol impairs anterograde axonal transport of microinjected horseradish peroxidase in dorsal root ganglia neurons in vitro. *Cell Tissue Res* 299:213-224.
- Vale RD, Reese TS, Sheetz MP. 1985. Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* 42:39-50.
- Xie H, Litersky JM, Hartigan JA, Jope RS, Johnson GV. 1998. The interrelationship between selective tau phosphorylation and microtubule association. *Brain Res* 798:173-183.

Inhibition of Wnt and PI3K Signaling Modulates GSK-3 β Activity and Induces Morphological Changes in Cortical Neurons: Role of Tau Phosphorylation

Octavio Mercado-Gómez · Karla Hernández-Fonseca ·
Alexa Villavicencio-Quejreiro · Lourdes Massieu ·
Jesús Chimal-Monroy · Clorinda Ariás

Accepted: 9 April 2008 / Published online: 7 May 2008
© Springer Science+Business Media, LLC 2008

Abstract Glycogen synthase kinase GSK-3 β has been identified as one of the major candidates mediating tau hyperphosphorylation at the same sites as those present in tau protein in brain from Alzheimer's disease (AD) patients. However, the signal transduction pathways involved in the abnormal activation of GSK-3 β , have not been completely elucidated. GSK-3 β activity is repressed by the canonical Wnt signaling pathway, but it is also modulated through the PI3K/Akt route. Recent studies have suggested that Wnt signaling might be involved in the pathophysiology of AD. On the other hand, modulators of the PI3K pathway might be reduced during aging leading to a sustained activation of GSK-3 β , which in turn would increase the risk of tau hyperphosphorylation. The role of Wnt and PI3K signaling inhibition on the extent of tau phosphorylation and neuronal morphology has not been completely elucidated. Thus, in the present investigation we analyzed the effects of different negative modulators of the Wnt and the PI3K pathways on GSK-3 β activation and phosphorylation of tau at the PHF-1 epitope in cortical cultured neurons and hippocampal slices from adult rat brain. Changes in the microtubule network were also studied. We found that a variety of Wnt and PI3K

inhibitors, significantly increased tau phosphorylation at the PHF-1 site, induced the disarrangement of the microtubule network and the accumulation of tau within cell bodies. These changes correlated with alterations in neuronal morphology.

Keywords PHF-1 · Wnt inhibitors · Cortical neurons · Wortmannin · GSK-3 β · Lithium · Cytoskeleton

Introduction

Alzheimer disease (AD) is an age-related pathology characterized by synaptic loss followed by massive neuronal death. Two main histopathological hallmarks have been found in AD brain: senile plaques composed by an extracellular core of the insoluble form of the 4 kDa β -amyloid peptide (A β) [1, 2]; and the intracellular neurofibrillary tangles (NFT), containing accumulations of anomalous filamentous structures composed mainly by abnormal hyperphosphorylated forms of tau protein [3, 4]. Hence, numerous studies have focused on the identification of the protein kinases and protein phosphatases regulating tau phosphorylation *in vivo*. The proline-directed serine/threonine kinase, glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), also known as tau protein kinase I [5] has been identified as one of the major candidates mediating tau hyperphosphorylation at the same residues as those found in brain tissues from patients showing neurodegenerative tauopathies, including AD [6, 7]. However, the signal transduction pathways involved in the abnormal activation of GSK-3 β , resulting in tau phosphorylation at AD-related sites, have not been completely elucidated. GSK-3 β activity is regulated through the canonical Wnt signaling pathway, but it is also modulated by the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt (PI3K/Akt)

Special issue article in honor of Dr. Ricardo Tapia.

O. Mercado-Gómez · A. Villavicencio-Quejreiro ·
J. Chimal-Monroy · C. Ariás (✉)
Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental,
Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional
Autónoma de México, P.O. Box AP 70-228, México, DF 04510,
México
e-mail: carias@servidor.unam.mx

K. Hernández-Fonseca · L. Massieu
Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México AP 70-253, México,
DF 04510, México

route [8]. Wnt signaling is essential during the development of the central nervous system because it behaves as a regulator of the embryonic cell patterning, proliferation, differentiation, cell adhesion, cell survival and apoptosis [9–11]. Although the role of Wnt proteins in mature neurons remains largely unexplored, recent data indicate that Wnt-dependent pathways are important regulators of neuronal function, neuronal morphology, neurogenesis and synaptic plasticity [12–15]. Interestingly, Wnt signaling has also been implicated in neurological disorders associated with developmental abnormalities such as schizophrenia [16, 17], as well as in chronic neurodegenerative diseases as AD [18]. Extracellular secreted Wnt proteins activate Frizzled receptor and/or the low-density lipoprotein-related protein 5 and 6 (LRP5/6) receptors, leading to the characteristic activation of the Wnt canonical pathway [19]. As a result of Frizzled activation, a Dishevelled mammal homolog (Dvl) is recruited inducing the destabilization of the protein complex composed by axin, adenomatous polyposis coli (APC) protein, β -catenin and GSK-3 β , resulting in the inactivation of this enzyme [20, 21]. Inhibition of GSK-3 β favors the increase in unphosphorylated β -catenin levels, allowing its interaction with members of the LEF/TCF family of transcription factors, and as a consequence, promoting the expression for cell survival genes [22–24]. Conversely, in the absence of the Wnt stimulation, because of the lack of Wnt ligands or by the presence of Wnt negative modulators, such as the extracellular protein Dickkopf-1 (DKK1, which regulates the canonical Wnt signaling) or the secreted Frizzled-related protein (sFRP, which modulates both canonical and non-canonical Wnt signaling), GSK-3 β is activated and able to induce the phosphorylation of its target proteins such as tau.

On the other hand, PI3K/Akt pathway exerts a crucial role during differentiation and survival of neuronal and glial cells [25]. When an appropriate ligand binds to the respective receptor, the catalytic subunit of PI3K phosphorylates phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) to phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP₃) and activates the phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK-1). Meanwhile, signaling proteins with pleckstrin-homology (PH) domains accumulate at sites of PI3K activation in the inner surface of the plasma membrane, through the interaction between the PH domains and the phospholipids products of PI3K. Then, the serine-threonine kinase, Akt/protein kinase B, is recruited and phosphorylated by PDK-1 stimulating the catalytic activity of Akt, which in turn phosphorylates GSK-3 β down-regulating its activity [26, 27].

At present, Wnt proteins are the focus of several studies on the control of neuronal cytoskeleton dynamics in view of its participation in axonal remodeling, synapse formation and dendritic development [28–30]. Recent studies have suggested that Wnt signaling may provide the main

signal transduction pathway involved in the pathophysiology of AD [18]. In fact $A\beta$ -induced neuronal death is protected by lithium, a well-known GSK-3 β inhibitor [31] and by modulation of the Wnt signaling [32, 33]. Furthermore, in AD brains the induction of the negative modulator of Wnt, DKK1, has been recently found [34] and in cultured neurons it has been observed that the presence of DKK1 induces tau hyperphosphorylation through GSK-3 β activity [35].

The same effect on tau phosphorylation by GSK-3 β was observed during inhibition of the PI3K/Akt pathway in hippocampal brain slices [36].

However, a comparative study on the extent of tau phosphorylation and its consequences on neuronal morphology, induced by the inhibition of these two different routes, has not been performed to date.

Thus, the aim of the present investigation was to analyze the effects of different negative modulators of the Wnt, sFRP 2 and 3 (sFRP2/3), DKK1 and Frizzled-8 (as a soluble receptor) and the PI3K (wortmannin) signaling on GSK-3 β activation, and tau phosphorylation at the PHF-1 epitope in cortical cultured neurons and hippocampal slices from adult rat brain. The effect of these modulators on microtubule organization and neuronal integrity was also studied.

The present results extend the knowledge on the different routes involved in GSK-3 β -mediated tau phosphorylation and its relation to the maintenance of neuronal morphology. In addition, results support the rationality for the use of lithium as a potentially therapeutic tool for AD.

Experimental Procedures

Cortical Neuronal Cultures

Primary cortical neurons were obtained as described previously by Hernández-Fonseca and Massieu [37]. Briefly, cultured neurons were prepared from Wistar rat embryos from 17 to 18 days of gestation as described by Brewer et al. [38] with some modifications. Animals were handled according to the NIH guide for animal care with approval of the local Animal Care Committee. Briefly, after dissection 6 cortices were chopped into 300- μ m cubes, incubated in 0.25% trypsin solution, and dissociated by titration in a DNase and soybean inhibitor containing solution (0.08% and 0.52%, respectively). Neurons were suspended in Neurobasal culture medium supplemented with B27, 0.5 mM α -glutamine, 20 μ g/ml gentamicin, 0.2 mM glutamate, and plated at a density of 290×10^3 /Cm² (1.5×10^6 cells per well) on sterile 12-well dishes (Cambridge, MA) precoated with poly-L-lysine (5 μ g/ml). Cells were cultured in a humidified 5% CO₂/95% air atmosphere and after 4 days, glucose (5 mM) and cytosine

arabinoxide (10 μ M) were added. Experiments were carried out after 5 days in vitro (DIV). Neurons were exposed to Wnt inhibitors, sFRP2, sFRP3, DKK1, Frizzled-8 (100 ng/ml, R&D System Inc, Minneapolis, MN) and wortmannin (350 nM, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) for 24 h. At the end of the incubations neurons were used for morphological studies by immunocytochemistry or for protein analysis by Western-blot.

Metabolically Active Rat Brain Slices

Metabolically active rat brains slices were obtained as described by Gong et al. [39] with slight modifications [40]. Briefly, male Wistar rats (230–250 g) were deeply anesthetized with sodium pentobarbital anesthesia (50 mg/kg, i.p.) and brains removed. They were immersed in cold artificial cerebrospinal fluid (aCSF, in mM: 126 NaCl, 3.5 KCl, 1.2 NaH₂PO₄, 1.3 MgCl₂, 2 CaCl₂, 11 glucose, 25 NaHCO₃, pH 7.4) at 4°C during 5 min and oxygenated with a mixture of 95% O₂ and 5% CO₂ during the entire procedure. Brains were fixed in a plate and placed in a vibraslice chamber (Campden Instruments) immersed in ice cold aCSF. Coronal cerebral slices (400 μ m thick) were obtained and three slices were placed per 12-well plate. Slices were equilibrated at room temperature for 1 h. After a 60 min recovering period, slices were placed in a 37°C water bath, and incubated in aCSF in the presence or absence of Wnt inhibitors, Frizzled-8 (100 ng/ml) during 3 h. At the end of the incubation, the hippocampus was dissected and sonicated (Somics, Vibra Cell) in 300 μ l lysis buffer containing: 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1.0 mM Na₂VO₄, 50 mM NaF, 0.5 μ M okadaic acid, 10 mM β -mercaptoethanol, 1.0 mM EDTA, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate and the protease inhibitor cocktail Complete™ (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Homogenates were centrifuged at 14,000 rpm during 30 min and supernatants were collected and stored at –80°C until use.

Western Blotting

Homogenates from hippocampal slices or neuronal cultures were used for protein blotting. Neuronal cultures were washed twice with chilled PBS, scrapped in 100 μ l lysis buffer as described above and sonicated. Homogenates were centrifuged 14,000 rpm for 30 min and supernatants were collected. 40 μ g of protein were loaded in 10% SDS-PAGE. After electrophoresis, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane. Ponceau's reversible staining was performed to confirm loading of comparable amounts of protein. Then, membranes were washed twice with PBS, blocked with solution containing PBS/5% non-fat dry milk overnight at 4°C and then incubated with the same blocking solution with the following antibodies: mouse

monoclonal antibody PHF-1 (1:100, kindly provided by Dr. Peter Davies, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY), rabbit polyclonal phospho GSK-3 β (p-Ser 9, 1:1000) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), mouse monoclonal Tau-1 (1:1000) (Chemicon International, Temecula, CA) overnight at 4°C. After three washes with PBS/0.1% Tween 20, 5 min each, membranes were incubated with either, goat anti-mouse IgG or goat anti-rabbit horseradish peroxidase coupled secondary antibody (1:15,000) Santa Cruz, Biot-echnology, Inc.), during 1 h at room temperature and detected by chemiluminescence (ECL kit from Amersham, Arlington Heights, IL) on Kodak X-Omat films. The same procedure was carried out for homogenates of metabolically rat hippocampal slices. Monoclonal antibody against β -actin (1:1000 clone AC-74, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was used as an internal loading control.

Immunocytochemistry

Neuronal cultures were washed with cold PBS twice and fixed with methanol at –20°C for 5 min and washed again with PBS. Cells were permeabilized with PBS containing 0.3% Triton X-100 and 0.3% H₂O₂ solution for 30 min and left with blocking solution (PBS+2% normal horse serum) overnight at 4°C. Then, cells were incubated with mouse monoclonal α -tubulin (1:1000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) or with PHF-1 (1:20) overnight at 4°C and washed three times for 5 min with PBS. Immediately cells were incubated with an anti-mouse biotinylated secondary antibody (1:4000, Vector Laboratories, Burlingame, CA) for 1 h at room temperature, and washed again with PBS. Afterwards cells were processed with the ABC-biotin-avidin peroxidase kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) and revealed with diaminobenzidine tetrahydrochloride as substrate. Negative controls consisted of eliminating the primary antibodies for the procedure.

Statistics

Densitometric analysis of the Western-blot bands was carried out with a NIH ImageJ software. Values were examined via Unpaired Student's *t*-test carried out on the Statview software (Abacus Concepts Inc).

Results

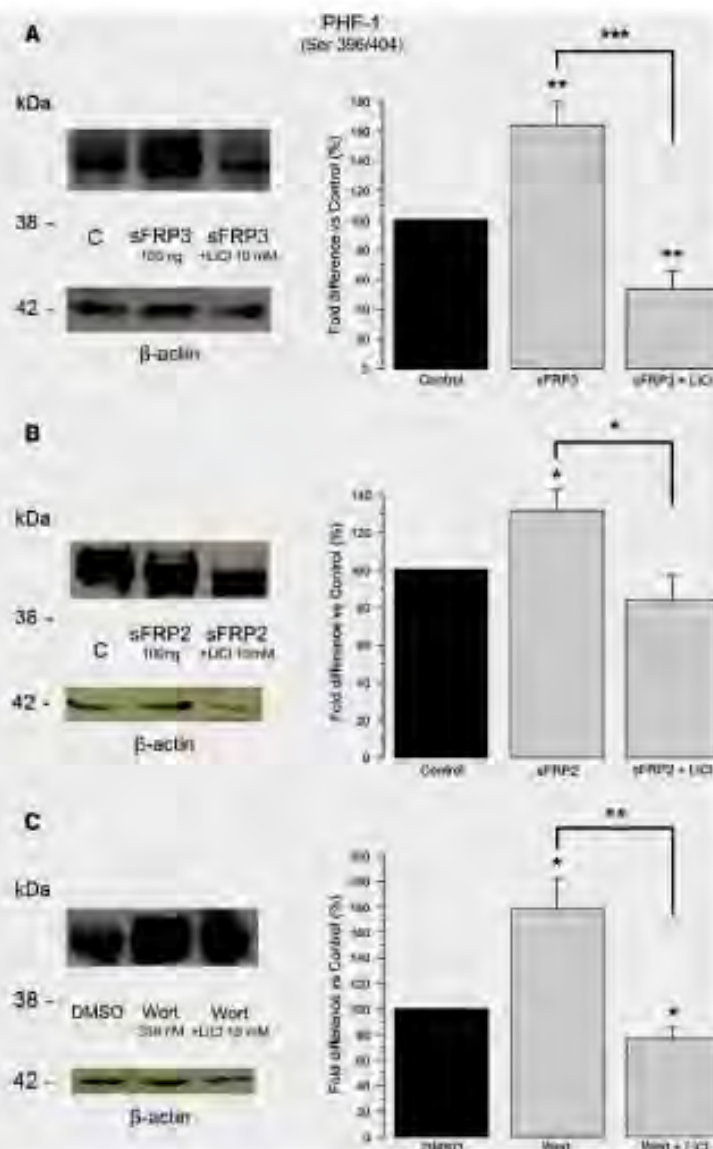
GSK-3 β Activation by Inhibition of Both Wnt and PI3K/Akt Signaling Induces Tau Phosphorylation in Cortical Neurons

To study if GSK-3 β activation by inhibition of canonical Wnt signaling induces tau hyperphosphorylation, cultured

neurons were incubated with different recombinant proteins, sFRP2/3 and Frizzled-8 to antagonize endogenous Wnt ligands. The secreted FRP2/3 proteins, containing a cysteine-rich domain, highly homologous to the extracellular ligand-binding domain of Frizzled receptors [41], antagonize the signaling of Wnt ligands through competition with Frizzled membrane bound receptors [42]. Exposure of cortical neurons to these Wnt negative modulators induced a significantly increase in tau phosphorylation at the Alzheimer-related epitope PHF-1 (Ser^{396/404}) which is known to be susceptible to phosphorylation by GSK-3 β [43] (Fig. 1a, b,

$p \leq 0.01$ and $p \leq 0.001$, respectively). To determine if PHF-1 induction is GSK-3 β dependent, lithium chloride (LiCl) 10 mM was added to cultures in the presence of both sFRP2/3 proteins. Interestingly, it was observed that PHF-1 immunoreactivity was significantly decreased below the basal levels ($p \leq 0.001$, $p \leq 0.05$, respectively) suggesting that modulation of this kinase by Wnt inhibitors might be involved in the appearance of PHF-1 epitope. Recombinant Frizzled-8 as a soluble receptor, binds to endogenous secreted Wnt proteins in a similar manner than sFRP2/3, and also promoted PHF-1 induction (data not shown).

Fig. 1 Effect of sFRP2, sFRP3 and wortmannin on tau phosphorylation. Cultured neurons exposed to inhibitors of Wnt (a, b) and PI3K (c) pathways increases tau phosphorylation at the PHF-1 epitope. This effect is reversed in the presence of the wide range inhibitor of GSK-3 β , LiCl (10 mM). When LiCl is co-incubated with sFRP 2/3, PHF-1 immunoreactivity returned below control levels. Representative Western-blots from 3 to 5 experiments are shown. Data are presented as the mean \pm SEM from each determination. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ (Unpaired Student's *t* test)



Since PI3K/Akt pathway also down-regulates GSK-3 β activity [44, 45], we used wortmannin to block PI3K/Akt activity and allow up-regulation of GSK-3 β . After 24 h of wortmannin exposure a significant increase in the content of PHF-1 epitope was detected ($p \leq 0.05$), and this effect was significantly reversed ($p \leq 0.01$) in the presence of the wide range inhibitor of GSK-3 β , LiCl (see Fig. 1c).

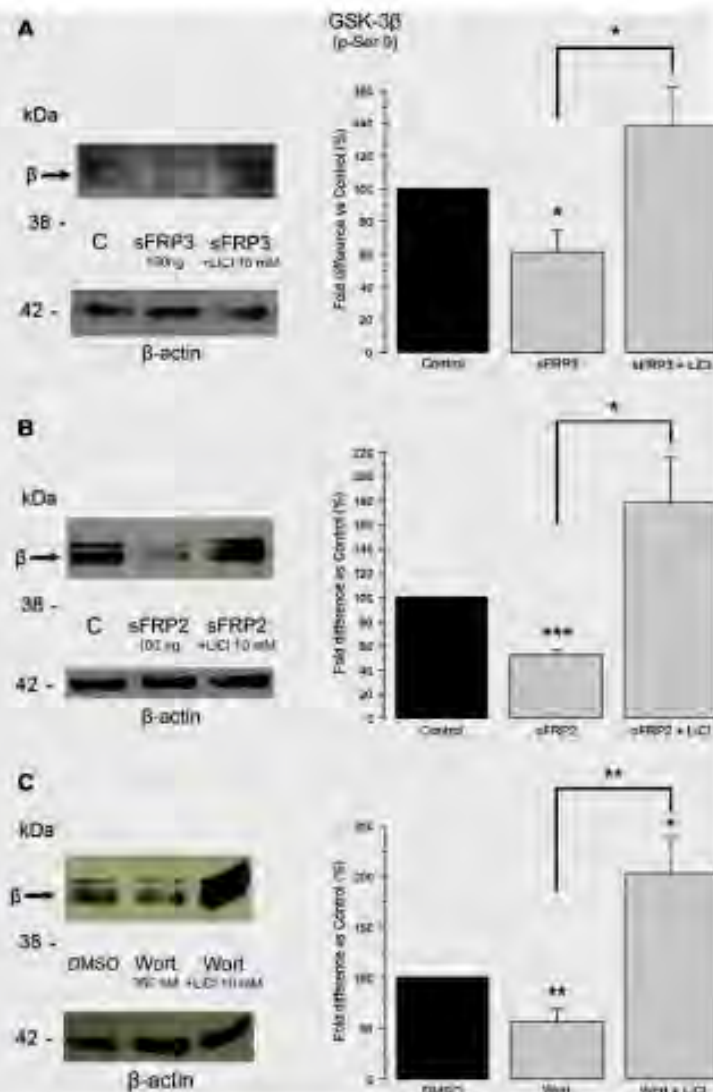
To further examine whether sFRP2/3 and wortmannin are able to induce tau phosphorylation through a positive modulation of GSK-3 β activity, we analyzed the decrease of the phosphoepitope located at Ser⁹ of GSK-3 β , which is indicative of GSK-3 β activation [46]. Figure 2 shows a significant down-regulation of p-Ser⁹-GSK-3 β

immunoreactivity induced by incubation of sFRP 2/3 ($p \leq 0.05$, $p \leq 0.001$, respectively) (Fig. 2a, b) and wortmannin ($p \leq 0.01$) (Fig. 2c), which was significantly reversed in the presence of LiCl ($p \leq 0.05$ for sFRP2/3, $p \leq 0.01$ for wortmannin).

GSK-3 β Activation by Inhibition of Wnt Signaling Induces Tau Phosphorylation in Hippocampal Slices

Hippocampal slices obtained as described above are known to be metabolically active for electrophysiological, pharmacological and biochemical studies, [39, 40, 47]. After 3 h incubation with Frizzled-8 an increase in PHF-1 occurs

Fig. 2 Effect of Wnt and PI3K inhibitors on GSK-3 β activation. Treatment of cultured neurons with sFRP2/3 (a, b) or wortmannin (c) significantly decreases the phosphoepitope located at Ser⁹ of GSK-3 β , which is indicative of GSK-3 β activation. A reversion of this effect is observed when LiCl (10 mM) is co-incubated with sFRP2/3 and wortmannin. Representative Western blots from 3 to 5 independent experiments are shown. Data are presented as the mean \pm SEM from each determination. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ (Unpaired Student's *t* test).



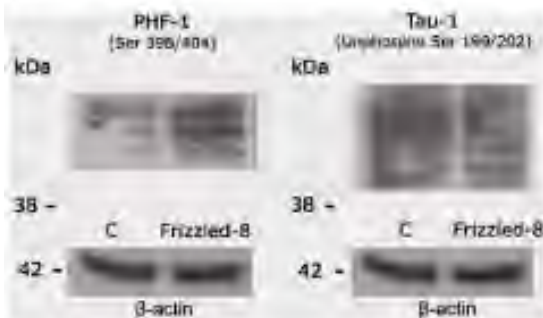


Fig. 3 Effect of inhibition of Wnt signaling on tau phosphorylation in hippocampal slices of adult rat. PHF-1 and Tau-1 immunoblots of homogenates from adult hippocampal slices after 24 h incubation with Frizzled-8. A slightly increase of PHF-1 (a) and a decrease of tau-1 immunoreactivity (b) is observed. Representative blots from 3 independent experiments

concomitantly with a slightly decrease of tau-1 immunoreactivity, as determined using an antibody recognizing the unphosphorylated Ser^{199/202} residue (Fig. 3). These results were similar to that observed in cultured neurons, indicating that positive modulation of GSK-3 β activity through inhibition of Wnt pathway is able to induce tau hyperphosphorylation even in mature neurons. These results are in agreement with a recent study showing that blocking PI3K/Akt signaling with wortmannin increases the PHF-1 epitope and decrease the tau-1 epitope by a GSK-3 β -dependent mechanism in hippocampal slices [36].

Inhibition of Wnt and PI3K/Akt Signaling Induces Morphological Changes in Cultured Neurons

To determine whether tau hyperphosphorylation produced by GSK-3 β activation results in changes in the neuronal cytoskeleton, rat primary cultures were treated with sFRP2, DKK1 or wortmannin during 24 h and subsequently stained with an α -tubulin antibody. In Fig. 4 we show the effect of the different modulators on neuronal morphology, 24 h after the exposure. In untreated cortical cultures, most of the neurons showed immunoreactivity to α -tubulin located in the cell body and neurites (Fig. 4a, c). Major morphological modifications were observed when cultures were exposed to Wnt inhibitors, sFRP2 (Fig. 4b, d) and DKK1 (Fig. 4c, g). Many neurons showed an expansion of neurite tree and some neurites became beading and thickening, cell bodies were visibly enlarged, and an intense staining was notably present in apical processes and somata (see arrow-heads in Fig. 4). A similar pattern of staining and morphological alterations were observed when neurons were exposed to wortmannin (Fig. 4d, h). To further explore changes in neuronal distribution of phosphorylated tau we conducted experiments with anti-PHF-1 antibody.

PHF-1 immunoreactivity was present in almost all neurons and was seen mainly in neuronal processes. The pattern of staining was different from that of α -tubulin, as PHF-1 stained axonal processes and bundles of fibers that connected groups of neurons, while only sparse staining was observed in neuronal somata (Fig. 5a, d). Following 24-h incubation with sFRP2 and wortmannin, the pattern of PHF-1 staining was clearly different. A slight accumulation of PHF-1 within cell bodies was observed (arrow). In addition neuronal branches and bundles exhibited increased PHF-1 staining and alternating swollen and shrunken segments (resembling degenerating axons (Fig. 5b, c, e and f arrowheads).

Discussion

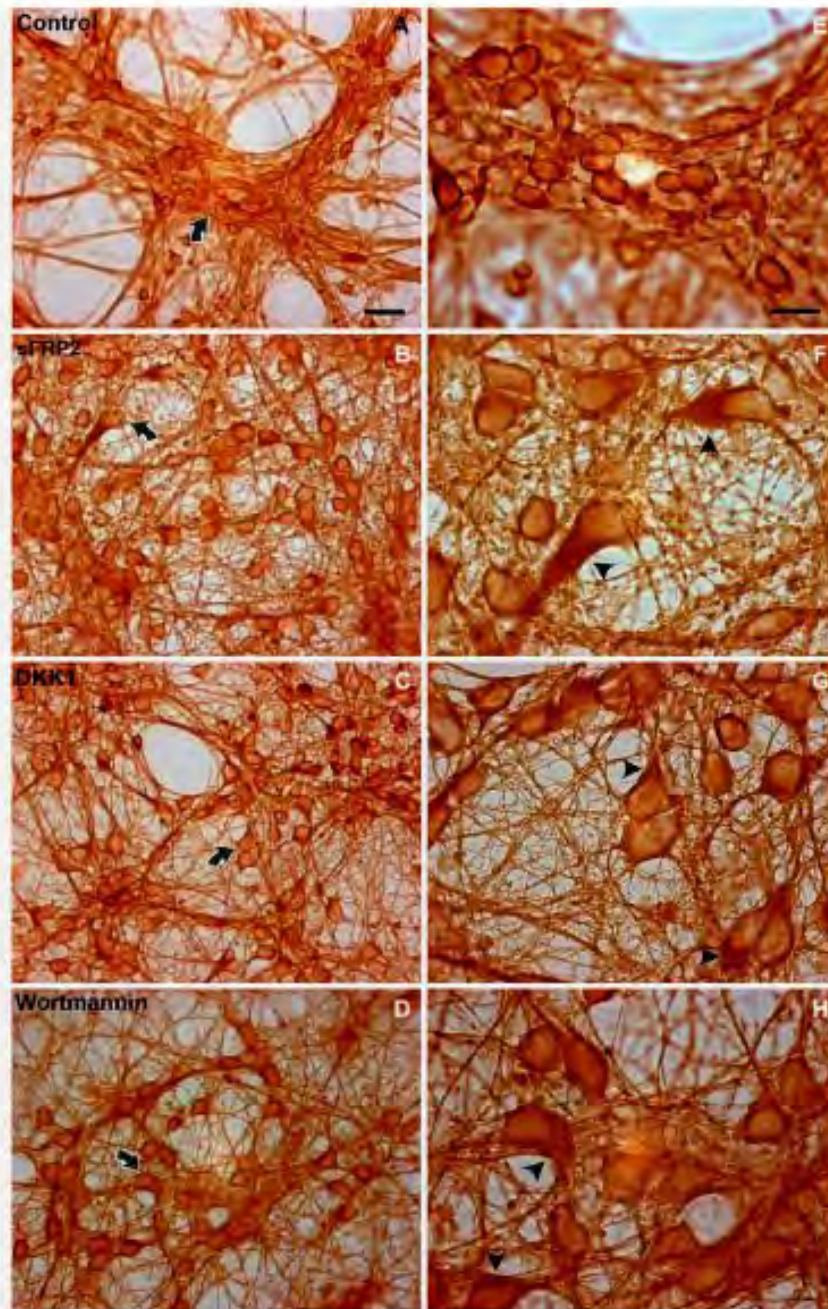
GSK-3 β is a key regulatory component of a large number of cellular processes. Aberrant control of GSK-3 β -regulated pathways plays a role in a variety of human diseases, including diabetes, AD and cancer [45]. Unlike many other kinases, GSK-3 β is constitutively active in cells and the upstream signaling pathways may modulate GSK-3 β sustained activation. Although the mechanism for GSK-3 β modulation in AD brain is not well understood, two main signaling pathways could be implicated in its overactivation, the Wnt/wingless and the PI3K/Akt pathways.

The canonical Wnt pathway has been described to play an important role during embryonic development because it is a key regulator of cell patterning, proliferation, differentiation, cell adhesion, cell survival and apoptosis [9–11]. Recently, an impairment of Wnt signaling has been proposed as one of the mechanism implicated in the AD pathology, and a relationship between the neuronal effects of β -amyloid protein and the hyperphosphorylation of tau has been strongly suggested [18, 34, 48]. On the other hand, apolipoprotein E ϵ 4, which is a well-known risk factor for AD, is able to inhibit Wnt signaling [49].

In this context, the present data show that blocking Wnt pathway in cortical cultures and hippocampal slices, released GSK-3 β activity and significantly increased tau phosphorylation at the AD-related epitope, PHF-1. Since levels of PHF-1 immunoreactivity returned below control levels in the presence of the GSK-3 β inhibitor, LiCl, we suggest that tau hyperphosphorylation in the PHF-1 epitope strongly depends of GSK-3 β activity through the inactivation of the canonical Wnt pathway.

In accordance with the present results, it has been reported that treatment of cultured neurons with DKK1 also increases tau phosphorylation at the PHF-1 site through increased GSK-3 β activity [35]. It has been suggested that DKK1 may be a specific inhibitor of canonical Wnt pathway [41] and interestingly DKK1 is present in the

Fig. 4 Morphological changes in cultured neurons induced by inhibition of Wnt and PI3K/Akt signaling. After 24 h incubation neurons exposed to sFRP2 (b), DKK1 (c) and wortmannin (d) show expansion of neurites and enlargement of cell bodies. A notable accumulation of tubulin staining is observed in apical processes (arrowheads). High magnifications of the zone marked by arrows from each photomicrograph are depicted in E to H. Control neurons are shown in A and E. Scale bar = 20 μ M and for high magnifications = 10 μ m. Representative immunocytochemistry from 4 independent experiments

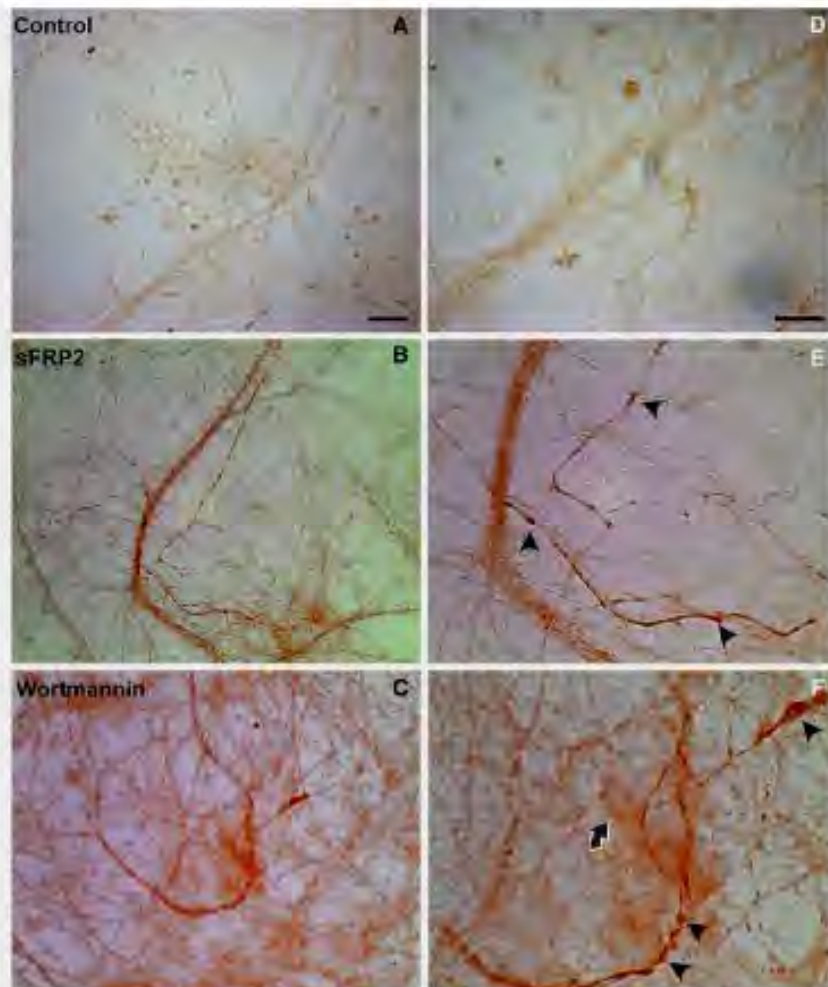


temporal cortex from AD patients in association with hyperphosphorylated tau [34], supporting a link between Wnt signaling impairment and tau hyperphosphorylation.

On the other hand, we observed that the PI3K inhibitor, wortmannin, also activates GSK-3 β leading to tau

phosphorylation, to a similar extent as that observed with Wnt inhibitors, both in cultured cortical neurons and hippocampal brain slices from adult rats. PI3K has been implicated in a variety of cellular responses to growth factors, insulin and estrogens [50]. An aging-associated

Fig. 5 Increased PHF-1 immunostaining by inhibition of Wnt and PI3K/Akt signaling. After 24 h exposure to sFRP2 (b, e) and wortmannin (c, f) the pattern of PHF-1 staining is highly increased and slight accumulation within enlarged cell bodies is observed (arrow). The degeneration of fiber bundles and neuronal branches is evident (arrowheads). High magnifications from each photomicrograph are depicted in (d–f). Control neurons are shown in (a) and (d). Scale bar = 20 μ M and for high magnifications = 10 μ m. Representative immunocytochemistry from 3 independent experiments performed in duplicate



decrease in some of these factors might contribute to a sustained activation of GSK-3 β , which would in turn increase the risk of tau hyperphosphorylation.

In the present work, we described for first time that in hippocampal slices Wnt inhibitors induce the increase in tau phosphorylation at the PHF-1 site, concomitantly with a decrease in tau-1 epitope immunoreactivity. Tau-1 epitope (Ser^{199/202}, Thr²⁰⁵) can be phosphorylated by proline-directed protein kinases [43–51], resulting in a decrease in its immunoreactivity. Thus, the present results suggest that the activation of GSK-3 β could be also involved in tau phosphorylation at the Ser^{199/202} (Tau-1 site) in addition to the Ser^{396/404} (PHF-1 site) in mature neurons. Similar results were obtained when GSK-3 β activation was achieved by wortmannin incubation, as reported by Li et al. [36].

Lithium has been extensively described as a potent and relatively specific inhibitor of both GSK-3 α and GSK-3 β

because of its ability to compete with the magnesium-binding site located in a different position to that of ATP-binding site [52]. Albeit, additional effects of lithium have been described such as inhibition of the enzyme inositol monophosphatase [53, 54], or the induction of the anti-apoptotic protein Bcl-2 [55]. Lithium has been widely used for inhibiting GSK-3 β mimicking Wnt signaling activation in vitro and in vivo models [56, 57]. The present results show that LiCl is able to significantly decrease tau phosphorylation at the Ser^{396/404} site induced by sFRP2/3 and wortmannin in cultured cortical neurons. Furthermore, LiCl incubation in the presence of Wnt or PI3K inhibitors reduces PHF-1 epitope even below control levels although it does not disappear completely. This observation suggests that tau phosphorylation at Ser^{396/404} might be modulated in a lesser extent by the activity of other proline-directed protein kinases, such as Cdk5, ERK1/2 or stress-activated

protein kinase (SAPK), which are able to phosphorylate tau at the PHF-1 site [58]. In addition, we show that LiCl significantly increases the immunostaining of p-Ser²⁰² of GSK-3 β in cortical neurons exposed to both sFRP 2/3 and wortmannin, supporting the role of GSK-3 β activation on the induction of AD-related phosphorylation. These results are in agreement and expand previous findings [35, 59].

The present data also show that tau hyperphosphorylation mediated by GSK-3 β activation, is associated with major morphological changes of cortical neurons. In view of the role of tau in neurite formation and stabilization, the observed alterations of the neuronal cytoskeleton, consisting in neurite beading and progressive widening of the neurite network; accumulation of tubulin immunostaining in apical dendrites and enlargement of cell bodies, might be directly associated with the hyperphosphorylation state of tau, regulated by intracellular pathways linked to Wnt and PI3K. A role of PI3K/Akt in stabilization of microtubules in mature neurons has been suggested [60]. Interestingly, the morphological changes associated with the disarrangement of the microtubule network were more intense when sFRP2 and DKK1 were added to the cultures, suggesting that in addition to canonical Wnt signaling the non-canonical Wnt signaling may play a role in the maintenance and stabilization of tubulin cytoskeleton. A previous study by Sanchez et al. [61] reported that wortmannin induces neurite retraction in cAMP differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cells, which is associated with activation of GSK-3 β and phosphorylation of microtubule associated proteins. The distribution of tau in two subcellular compartments has been suggested in neurons: a highly phosphorylated tau mainly located in the somatodendritic compartment, while less phosphorylated tau in axons [62, 63]. The accumulation of non-aggregated forms of tau constitutes an early pre-tangle stage in the evolution of the neurofibrillary pathology [64]. It is conceivable that in our model of cultured neurons, the PHF-1 immunoreactivity accumulation in neuronal bodies observed after GSK-3 β activation would resemble this early pre-tangle stage. If this is the case, the change in subcellular distribution of tau induced by GSK-3 β activation may be a useful system to study the evolution of tangle formation. It is of interest the recent finding showing that the activity of GSK-3 β is increased in AD and that the somatodendritic accumulation and activation of this enzyme is an early event preceding and accompanying the formation of tangles and other tau-positive inclusions [65].

It has recently been reported that a component of the Wnt signaling pathway, the Dvl protein is able to associate with the activated form of Akt in the axin complex, which leads to the phosphorylation of GSK-3 β at Ser²⁰² in Wnt-overexpressing PC12 cells [66]. These results suggest an important cross-talk between Wnt and PI3K/Akt pathways in the regulation of neuronal function and morphology.

In summary our results demonstrate that inhibition of both Wnt and PI3K/Akt signaling pathways increases GSK-3 β activity, which correlates with tau phosphorylation at the PHF-1 site and the induction of changes in the neuronal cytoskeleton and tau accumulation, as observed in AD. Moreover, results support the therapeutic use of lithium as a specific inhibitor of the common target of Wnt and PI3K/Akt routes, the GSK-3 β enzyme, to attenuate the formation of neurofibrillary pathology in AD.

Acknowledgements The authors thank P. Davies for the generous gift of PHF-1 antibody and Patricia Ferrerá for excellent technical assistance. This work was supported by CONACYT (48663), and DGAPA (IN217806) grants to C. Arias, CONACYT (48645-Q) grant to L. Mussari and CONACYT (42568-Q) and 53484) and DGAPA (IN200205) grants to J. Climal. O. Meriade-Gómez was supported by 169/33 CONACYT and DGEF (UNAM) fellowships, and K. Hernández-Fonseca by 167146 CONACYT and DGEF (UNAM) fellowships.

References

- Selkoe DJ (2000a) The genetics and molecular pathology of Alzheimer's disease: roles of amyloid and the presenilins. *Neurobiol Aging* 18:903–922
- Selkoe DJ (2000b) Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid β -protein. *Ann NY Acad Sci* 924:17–25
- Jéchal K, Grunlike-Jéchal I (2006) Discoveries of tau, abnormally hyperphosphorylated tau and others of neurofibrillary degeneration: a personal historical perspective. *J Alzheimers Dis* 9:219–242
- Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ (2001) Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci* 24:121–1159
- Idaguro K, Shimizuuchi A, Sato S et al (1993) Glycogen synthase kinase 3 β is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments. *FEBS Lett* 525:167–172
- Lovestrom S, Reynolds CH (1997) The phosphorylation of tau: a critical stage in neurodevelopment and neurodegenerative processes. *Neuroscience* 78:309–324
- Pei JL, Tianka T, Tang YC et al (1997) Distribution, levels, and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:70–78
- Grimes CA, Igoe RS (2001) CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 β and facilitated by lithium. *J Neurochem* 76:1219–1232
- Wodarz A, Nüsse R (1998) Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14:59–88
- Chong ZZ, Mäiese K (2004) Targeting WNT, protein kinase B, and mitochondrial membrane integrity to foster cellular survival in the nervous system. *Histol Histopathol* 19:495–504
- Li F, Chong ZZ, Mäiese K (2005) Vital elements of the Wnt/ Frizzled signaling pathway in the nervous system. *Curr Neurovasc Res* 2:351–360
- Salinas PC (1999) Wnt factors in axonal remodeling and synaptogenesis. *Biochem Soc Symp* 65:101–109
- Lie DC, Colamarino SA, Song HJ et al (2005) Wnt signaling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature* 437:1370–1375
- Chen J, Park CS, Tang SJ (2006) Activity-dependent synaptic Wnt release regulates hippocampal long term potentiation. *J Biol Chem* 281:11910–11916

15. Speese SD, Budnik V (2007) Wnts: up-and-coming at the synapse. *Trends Neurosci* 30:268–275
16. Cotter D, Kerwin R, al-Sarraj S et al (1998) Abnormalities of Wnt signalling in schizophrenia -evidence for neurodevelopmental abnormality. *Neuroreport* 9:1379–1383
17. Miyaoka T, Seno H, Ishino H (1999) Increased expression of Wnt-1 in schizophrenic brains. *Schizophr Res* 38:1–6
18. De Ferrari GV, Inestrosa NC (2000) Wnt signaling function in Alzheimer's disease. *Brain Res Rev* 33:1–12
19. Wehrli M, Dougan ST, Caldwell K et al (2000) *arrow* encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signaling. *Nature* 407:527–530
20. Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H et al (1998) Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3 β and beta-catenin and promotes GSK-3 β -dependent phosphorylation of β -catenin. *EMBO J* 17:1371–1384
21. Willert K, Nusse R (1998) β -catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr Opin Genet Dev* 8:95–102
22. Dale TC (1998) Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem J* 329:209–223
23. Novak A, Dodhar S (1999) Signaling through β -catenin and *Leif* Tcf. *Cell Mol Life Sci* 56:523–537
24. van Noort M, Clevers H (2002) TCF transcription factors, mediators of Wnt-signaling in development and cancer. *Dev Biol* 244:1–8
25. Rodgers EE, Theibert AB (2002) Functions of PI 3-kinase in development of the nervous system. *Int J Dev Neurosci* 20:187–197
26. Brunet A, Datta SR, Greenberg ME (2001) Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol* 11:297–305
27. Cantley LC (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296:1655–1657
28. Lucas FR, Salinas PC (1997) WNT-7a induces axonal remodeling and increases synapsin I levels in cerebellar neurons. *Dev Biol* 192:31–44
29. Hall AC, Lucas FR, Salinas PC (2000) Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling. *Cell* 100:525–535
30. Rosso SB, Sussman D, Wynshaw-Boris A et al (2005) Wnt signaling through Dishevelled, Rac and JNK regulates dendritic development. *Nat Neurosci* 8:34–42
31. Alvarez G, Muñoz-Montaño JR, Sotrústegui J et al (1999) Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. *FEBS Lett* 453:260–264
32. Garrido JL, Godoy JA, Alvarez A et al (2002) Protein kinase C inhibits amyloid β peptide neurotoxicity by acting on members of the Wnt pathway. *FASEB J* 16:1982–1984
33. Alvarez AR, Godoy JA, Mullendorff K et al (2004) Wnt-3a overcomes β -amyloid toxicity in rat hippocampal neurons. *Exp Cell Res* 297:186–196
34. Caricasole A, Copani A, Caraci F et al (2004) Induction of Dickkopf-1, a negative modulator of the Wnt pathway, is associated with neuronal degeneration in Alzheimer's brain. *J Neurosci* 24:6021–6027
35. Scali C, Caraci F, Gianfriddo M et al (2006) Inhibition of Wnt signaling, modulation of tau phosphorylation and induction of neuronal cell death by DKK1. *Neurobiol Dis* 24:254–265
36. Li X, Lu F, Tian Q et al (2006) Activation of glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer-like tau hyperphosphorylation in rat hippocampus slices in culture. *J Neural Transm* 113:93–102
37. Hernández-Fonseca K, Massieu L (2005) Disruption of endoplasmic reticulum calcium stores is involved in neuronal death induced by glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 82:196–205
38. Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK et al (1993) Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented neurobasal, a new serum-free combination. *J Neurosci Res* 35:567–576
39. Gong CX, Lidsky T, Wegiel J et al (2001) Metabolically active rat brain slices as a model to study the regulation of protein phosphorylation in mammalian brain. *Brain Res Protoc* 6:134–140
40. Arias C, Arrieta I, Tapia R (1995) β -Amyloid peptide fragment 25–35 potentiates the calcium-dependent release of excitatory amino acids from depolarized hippocampal slices. *J Neurosci Res* 41:561–566
41. Kawano Y, Kypta R (2003) Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 116:2627–2634
42. Jones SE, Jomary C (2002) Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. *Bioessays* 24:811–820
43. Sperber BR, Leight S, Goedert M et al (1995) Glycogen synthase kinase-3 β phosphorylates tau protein at multiple sites in intact cells. *Neurosci Lett* 197:149–153
44. Frame S, Cohen P (2001) GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* 359:1–16
45. Bhat RV, Budd Haeberlein SL, Avila J (2004) Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies. *J Neurochem* 89:1313–1317
46. Shaw M, Cohen P, Alessi DR (1997) Further evidence that the inhibition of glycogen synthase kinase-3 β by IGF-1 is mediated by PDK1/PKB-induced phosphorylation of Ser-9 and not by dephosphorylation of Tyr-216. *FEBS Lett* 416:307–311
47. Alger BE, Nicoll RA (1982) Feed-forward dendritic inhibition in rat hippocampal pyramidal cells studied in vitro. *J Physiol* 328:105–123
48. Inestrosa NC, Varela-Nallar L, Grabowski CP et al (2007) Synaptotoxicity in Alzheimer's disease: the Wnt signaling pathway as a molecular target. *IUBMB Life* 59:316–321
49. Caruso A, Motelese M, Iacovelli L et al (2006) Inhibition of the canonical Wnt signaling pathway by apolipoprotein E4 in PC12 cells. *J Neurochem* 98:364–371
50. Welsh GL, Foulstone EJ, Young SW et al (1994) Wortmannin inhibits the effects of insulin and serum on the activities of glycogen synthase kinase-3 and mitogen-activated protein kinase. *Biochem J* 303:15–20
51. Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K et al (1995) Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau. *J Biol Chem* 270:823–829
52. Ryves WJ, Harwood AJ (2001) Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium. *Biochem Biophys Res Commun* 280:720–725
53. Atack JR (1997) Inositol monophosphatase inhibitors-lithium mimetics? *Med Res Rev* 17:215–224
54. Quiroz JA, Gould TD, Manji HK (2004) Molecular effects of lithium. *Mol Interv* 4:259–272
55. Chen G, Zeng WZ, Yuan PX et al (1999) The mood-stabilizing agents lithium and valproate robustly increase the levels of the neuroprotective protein bcl-2 in the CNS. *J Neurochem* 72:879–882
56. Stambolic V, Ruel L, Woodgett JR (1996) Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr Biol* 6:1664–1668
57. Klein PS, Melton DA (1996) A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci* 93:8455–8459
58. Buée L, Bussi ere T, Bu e-Scherrer V et al (2000) Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Rev* 33:95–130
59. Liu SJ, Zhang AH, Li HL et al (2003) Overactivation of glycogen synthase kinase-3 by inhibition of phosphoinositide-3 kinase and

- protein kinase C leads to hyperphosphorylation of tau and impairment of spatial memory. *J Neurochem* 87:1333–1344
60. Lavie Y, Dybowski J, Agranoff BW (1997) Wortmannin blocks goldfish retinal phosphatidylinositol 3-kinase and neurite outgrowth. *Neurochem Res* 22:373–378
 61. Sanchez S, Sayas CL, Lim F et al (2001) The inhibition of phosphatidylinositol-3-kinase induces neurite retraction and activates GSK3. *J Neurochem* 78:468–481
 62. Papasozomenos S, Binder LI (1987) Phosphorylation determines two distinct species of tau in the central nervous system. *Cell Motil Cytoskeleton* 8:210–226
 63. Arias C, Sharma N, Davies P et al (1993) Okadaic acid induces early changes in microtubule-associated protein 2 and tau phosphorylation prior to neurodegeneration in cultured cortical neurons. *J Neurochem* 61:673–682
 64. Braak E, Braak H, Mandelkow EM (1994) A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathol (Berl)* 87:554–567
 65. Leroy K, Yilmaz Z, Brion JP (2007) Increased level of active GSK-3 β in Alzheimer's disease and accumulation in argyrophilic grains and in neurones at different stages of neurofibrillary degeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33:43–55
 66. Fukumoto S, Hsieh CM, Maemura K et al (2001) Akt participation in the Wnt signaling pathway through Dishevelled. *J Biol Chem* 276:17479–17483

