

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR Y GENÉTICA



ESTRÉS OSMÓTICO, INFLAMACIÓN Y
DEGENERACIÓN NEURONAL EN LA ENFERMEDAD
DE ALZHEIMER: IMPLICACIÓN DE LA PROTEÍNA
ASOCIADA A MICROTÚBULOS TAU

Tesis Doctoral presentada por
MONTAÑA CABALLERO BERMEJO
para optar al grado de **Doctor con Mención Europea** por la
Universidad de Extremadura

Cáceres, 2015



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR Y GENÉTICA
FACULTAD DE VETERINARIA
Avda de la Universidad s/n.
10003 Cáceres
Tlfn: 927257100 ext. 1332

Dña. MARÍA JESÚS LORENZO BENAYAS, Profesora Titular de Universidad
y D. FRANCISCO CENTENO VELÁZQUEZ, Profesor Titular de Universidad, ambos
del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética de la UEX,

INFORMAN:

Que la Tesis Doctoral presentada por Dña. MONTAÑA CABALLERO BERMEJO, con
el título: **“ESTRÉS OSMÓTICO, INFLAMACIÓN Y DEGENERACIÓN
NEURONAL EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER: IMPLICACIÓN DE LA
PROTEÍNA ASOCIADA A MICROTÚBULOS TAU”**, ha sido realizada bajo nuestra
dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética de la
Universidad de Extremadura, y reúne todos los requisitos para obtener el grado de
Doctor.

Y para que así conste, firmamos el presente documento en Cáceres, a 21 de
Octubre de 2015.

Dra. María Jesús Lorenzo Benayas

Dr. Francisco Centeno Velázquez

Agradecimientos

En este momento, en la tranquilidad del laboratorio delante del ordenador y escribiendo estas líneas, siento que finaliza una etapa de mi vida. A la mente me viene el recuerdo de todas las vivencias, emociones y sentimientos vividos aquí. Esta Tesis Doctoral es el resultado de la ilusión, el esfuerzo, la paciencia y la confianza que han volcado sobre mí las personas que han estado siempre a mi lado, tanto en el ámbito científico como en el personal. Tengo que agradecer especialmente mis directores de tesis María Jesús Lorenzo Benayas y Francisco Centeno Velázquez, por supervisar y ayudarme con este trabajo. También a todos los que están o han pasado por el departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética de la facultad de Veterinaria.

Me gustaría mostrar mi agradecimiento al doctor Alberto Álvarez Barrientos, por su ayuda en la ejecución e interpretación de los experimentos de microscopía y citometría.

Mención especial al doctor Roland Brandt, de la Universidad de Osnabrück, quien me acogió en su laboratorio durante mi estancia en Alemania, y a todos los que formaban su equipo, gracias.

Por supuesto, a mis amigos y a mi familia, por estar siempre ahí.

Esta Tesis ha sido realizada con una beca de Formación de Personal Investigador de la Junta de Extremadura y una beca para estancias breves de la Organización Europea de Biología Molecular (EMBO), y financiada con proyectos de la Junta de Extremadura PRI06A202, GRU08018, PRIS0933, GRU09056, PRIS10018 y GRU10046 y del Ministerio de Ciencia e Innovación (actual Ministerio de Economía y Competitividad) BFU2007-67577-CO2-02/BMC.



“Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.”

Marie Skłodowska Curie

Resumen

La enfermedad de Alzheimer es un desorden neurodegenerativo que se caracteriza por la presencia de los denominados ovillos neurofibrilares que son depósitos intraneuronales compuestos principalmente por la proteína asociada a microtúbulos Tau hiperfosforilada y proteolizada. En el presente trabajo hemos estudiado los mecanismos que regulan las modificaciones postraduccionales de Tau inducidas por el estrés hiperosmótico e inflamatorio. Nuestros resultados muestran que sólo el estrés hiperosmótico induce la proteólisis de Tau y la apoptosis en las células SH-SY5Y y que estos efectos están mediados por, al menos, la activación de las caspasas 6 y 3, través de un mecanismo en el que están implicadas las quinasas JNKs.

En este trabajo también estudiamos el efecto del estrés hiperosmótico y de la neuroinflamación sobre los niveles y la fosforilación de Tau y las vías de señalización intracelular implicadas en este proceso. Nuestros resultados muestran que sólo el tratamiento con TNF- α induce la expresión génica de Tau, que ambos tipos de estreses promueven la fosforilación de Tau en los residuos Thr-50, Thr-181 y Thr-205 y que este proceso está regulado principalmente las quinasas p38 y las JNKs.

Adicionalmente, analizamos la distribución de la proteína Tau fosforilada y sin fosforilar y comprobamos que ambos tipos de estreses promueven la acumulación de Tau en el soma de la célula (citoplasma y núcleo) y que modifican la localización de las formas fosforiladas de Tau de una manera específica del residuo fosforilado. También pudimos comprobar que las modificaciones en la fosforilación y la localización de Tau en respuesta al estrés hiperosmótico se acompañan de la desorganización del citoesqueleto y que las promovidas por el estrés inflamatorio producen una disminución en el transporte a través del axón.

Por último, el análisis funcional de Tau mutada en los residuos Thr-50 y Thr-69 realizado en las células HEK-293 y PC-12 diferenciadas nos indica que ambos residuos son esenciales para la función de la proteína.

Abstract

Alzheimer's disease is a degenerative brain disorder characterized neuropathologically by the presence of neurofibrillary tangles, which are intracellular aggregates of hyperphosphorylated and proteolyzed Tau, a protein associated to microtubules. In this work we studied the mechanisms that regulate the posttranslational modifications of Tau induced by hyperosmotic stress and neuroinflammation. Our results show that only the hyperosmotic stress promotes Tau proteolysis and apoptosis in SH-SY5Y cells. These effects are mediated by the activation of caspases 6 and 3 through a mechanism that involves JNKs.

We also studied the effect of hyperosmotic stress and neuroinflammation on Tau expression and phosphorylation and the signaling pathways involved. Our results show that only TNF- α treatment increases Tau expression and that both stimuli induce Tau phosphorylation at Thr-50, Thr-181 and Thr-205. This last process is regulated mainly by p38s and JNKs.

Additionally, we analyzed Tau distribution and we observed that both stresses promote Tau accumulation in soma (in cytoplasm and nucleus), and also modify the location of phosphorylated Tau in a site-specific manner. We show also that modifications of Tau phosphorylation and distribution in response to hyperosmotic stress are associated to cytoskeleton disorganization and that inflammation impairs axonal transport.

Finally, the functional analysis of Thr-50 and Thr-69 Tau mutants in HEK-293 and differentiated PC-12 cells suggests that both sites are important for Tau functionality.

Índice

Índice

Lista de abreviaturas	IX
I. Introducción	1
1. La neurona y su citoesqueleto	3
1.1. Proteínas asociadas a microtúbulos	5
2. La proteína asociada a microtúbulos Tau	6
2.1. Isoformas de Tau	6
2.2. Estructura de Tau	7
2.3. Distribución y localización intracelular de Tau	8
2.4. Funciones de Tau	10
2.4.1. Interacción de Tau con el citoesqueleto	10
2.4.2. Tau y señalización celular	11
2.4.3. Función de Tau en núcleo	12
2.5. Modificaciones postraduccionales de Tau	12
2.5.1. Fosforilación de Tau	13
2.5.1.1. Familia de las MAPKs	13
2.5.1.1.1. p38 MAPKs	15
2.5.1.1.2. ERK 1/2	16
2.5.1.1.3. JNKs	17
2.5.2. Proteólisis de Tau	18
2.5.2.1. Caspasas	18
2.6. Patologías asociadas a Tau	21
3. Enfermedad de Alzheimer	21
3.1. Etiopatogénesis	22
3.2. Bases moleculares de la enfermedad de Alzheimer	21
3.2.1. Hipótesis de la cascada β -amiloide	23
3.2.2. Hipótesis metabólica y de cambios en la señalización celular	25
3.3. Tau y la enfermedad de Alzheimer	26
3.3.1. Hiperfosforilación de Tau y degeneración neurofibrilar	27
3.3.1.1. Sitios de fosforilación de Tau y Tau quinasas	28
3.3.2. Proteólisis de Tau por caspasas y degeneración neurofibrilar	30
4. Neuroinflamación y Enfermedad de Alzheimer	32
4.1. Mediadores celulares de la neuroinflamación en la EA	32
4.2. Mediadores moleculares de la neuroinflamación en la EA	33
4.3. Neuroinflamación y Tau en la EA	35
5. La hipótesis de Tau en la Enfermedad de Alzheimer	37
II. Objetivos	39

III. Materiales y Métodos	45
A. Materiales	47
A.1. Productos y reactivos generales	47
A.2. Materiales, reactivos y productos utilizados en los cultivos celulares	48
B. Métodos	49
1. Líneas celulares	49
1.1. Línea celular SH-SY5Y	49
1.1.1. Mantenimiento y división de las células para los experimentos	49
1.1.2. Diferenciación de las células SH-SY5Y inducida por ácido retinoico	50
1.2. Línea celular U937	52
1.2.1. Mantenimiento y preparación de experimentos	53
1.2.2. Activación de las células U937 y preparación de los medios condicionados	53
1.2.3. Contenido de los medios condicionados	54
1.3. Línea celular HEK-293	54
1.3.1. Mantenimiento y división de las células para los experimentos	55
1.4. Línea celular PC-12	55
1.4.1. Mantenimiento y división de las células para los experimentos	55
1.4.2. Diferenciación de las células PC-12	56
1.4.3. Preparación de las placas de cultivo para los ensayos de FDAP	56
2. Tratamientos celulares	56
2.1. Tratamiento con sorbitol	57
2.2. Tratamiento con TNF- α	57
2.3. Tratamiento con medios condicionados procedentes de las células U937	57
2.4. Tratamiento con los inhibidores farmacológicos	58
2.4.1. Preparación de los inhibidores	58
2.4.2. Inhibidor de caspasa 3	58
2.4.3. Inhibidor de caspasa 6	58
2.4.4. Inhibidor general de caspasas	58
2.4.5. Inhibidor de p38 MAPKs	58
2.4.6. Inhibidores de ERK 1/2	59
2.4.7. Inhibidor de JNKs	59
2.4.8. Procedimiento experimental con los inhibidores	59
3. Estudio de la morfología celular	60
4. Ensayos de actividad enzimática	60
4.1. Obtención de lisados celulares	60
4.2. Medida de la actividad de caspasa 3/7	60
4.3. Medida de la actividad de caspasa 6	61

5. Estudio de los niveles de proteínas por Western Blot	61
5.1. Obtención de extractos celulares totales de las células HEK-293 y SH-SY5Y	61
5.2. Obtención de extractos de proteínas citosólicas y nucleares de las células SH-SY5Y	62
5.3. Obtención de extractos celulares totales de las células PC-12	62
5.4. Determinación de la concentración de proteínas	63
5.5. Electroforesis de proteínas	63
5.6. Electrotransferencia de proteínas a membranas	63
5.6.1. Electrotransferencia en semi-seco	63
5.6.2. Electrotransferencia en húmedo	64
5.7. Detección de la eficiencia de la transferencia	64
5.8. Detección de las proteínas	64
5.9. Reutilización de la membrana o <i>stripping</i>	66
6. Técnicas de estudio de la viabilidad y la muerte celular	67
6.1. Ensayos de viabilidad celular	67
6.1.1. Determinación de la viabilidad celular mediante el ensayo colorimétrico del MTT	67
6.1.2. Determinación de la viabilidad celular mediante el colorante azul de tripano	67
6.2. Análisis de apoptosis por citometría de flujo	68
6.3. Análisis de la fragmentación internucleosomal del ADN	68
7. Inmunofluorescencia	69
8. Transfección transitoria de la proteína Tau en células de mamífero	71
8.1. Construcciones de DNA	71
8.1.1. pCMV5-HA-Tau, -T50A, -T50E, -T69A y -T69E	71
8.1.2. pCMV5-PAGFP-Tau, -T50A, -T50E, -T69A y -T69E	71
8.2. Transformación, crecimiento bacteriano y extracción del ADN plasmídico	71
8.3. Transfección transitoria mediada por lípidos: lipofección	72
8.3.1. Transfección de las células SH-SY5Y y HEK-293	72
8.3.2. Transfección de las células PC-12	73
9. Ensayo de asociación al citoesqueleto	73
9.1. Tratamiento con nocodazol	74
10. Ensayo de unión a los microtúbulos <i>in situ</i>	74
11. Ensayo de polimerización de tubulina <i>in vitro</i>	75
11.1. Expresión de las proteínas de fusión GST-Tau	75
11.2. Purificación de las proteínas recombinantes	75
11.3. Desfosforilación de las proteínas recombinantes	76
11.4. Medida de la polimerización de tubulina por turbidez	76
12. Fraccionamiento celular con sarcosil	77

13. Ensayo de pérdida de fluorescencia después de la fotoactivación (FDAP)	77
14. Ensayo de aislamiento de membrana	78
15. Análisis estadístico	78
IV. Resultados	79
Capítulo 1. Estudio del efecto del estrés hiperosmótico sobre Tau en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y	81
1. Proteólisis de Tau y muerte celular por apoptosis	82
1.1. El estrés hiperosmótico induce proteólisis de Tau	82
1.2. El tratamiento con sorbitol promueve la activación de caspasa 6 en las células SH-SY5Y	84
1.3. La inhibición de la actividad caspasa-6 previene parcialmente la proteólisis de Tau	86
1.4. La proteína Tau es proteolizada en el extremo N-terminal por caspasa 6 y caspasa 3	88
1.5. El estrés hiperosmótico promueve cambios en la morfología y la muerte por apoptosis en las células SH-SY5Y	90
1.6. La inhibición conjunta de las caspasas 6 y 3 previene la apoptosis de las células SH-SY5Y inducida por estrés osmótico	94
2. Fosforilación de la proteína Tau	96
2.1. El estrés hiperosmótico induce la fosforilación de Tau	96
2.2. Activación de las MAPKs en respuesta al estrés hiperosmótico	98
2.3. Papel de las p38 MAPKs en la fosforilación de Tau inducida por estrés osmótico	99
2.4. La ruta de las ERK 1/2 no regula la fosforilación de Tau en respuesta a sorbitol en los residuos estudiados	100
2.5. La ruta de señalización de las JNKs está implicada en la fosforilación de Tau inducida por sorbitol en los residuos estudiados	102
2.6. Cambios en la localización de Tau en respuesta al estrés hiperosmótico	103
2.7. El estrés hiperosmótico provoca desorganización de los microtúbulos	109
2.8. La ruta de señalización de las JNKs media la apoptosis de las células SH-SY5Y inducida por sorbitol	110
Capítulo 2. Estudio del efecto de la neuroinflamación sobre la proteína asociada a microtúbulos Tau en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y diferenciadas	113
2.1. Efecto de la citoquina proinflamatoria TNF-α sobre Tau en células de neuroblastoma diferenciadas	114
2.1.1. El TNF- α produce cambios morfológicos en células diferenciadas	114
2.1.2. Efecto del TNF- α sobre la viabilidad celular	116
2.1.3. La expresión de Tau es modificada por el tratamiento con TNF- α	116
2.1.4. TNF- α promueve la fosforilación de la proteína Tau	118
2.1.5. Las MAP quinasas se activan en respuesta a TNF- α	119

2.1.6. La fosforilación de los residuos Thr-50 y Thr-205 de Tau está regulada por la vía de las p38 MAPKs	120
2.1.7. La ruta de señalización de las ERKs está implicada en la fosforilación de los residuos Thr-50 y Thr-205 de Tau inducida por TNF- α	122
2.1.8. La cascada de señalización de las JNKs participa en la fosforilación del residuo Thr-50 de Tau	123
2.1.9. El TNF- α produce cambios en la localización intracelular de Tau en las células SH-SY5Y diferenciadas	125
2.1.10. Efecto del TNF- α sobre el transporte neuronal y la organización de los microtúbulos	130
2.1.11. Efecto del TNF- α sobre la proteína asociada a los microtúbulos MAP-2	132
2.2. Estudio del efecto de medios condicionados sobre la expresión, la fosforilación y la localización intracelular de Tau en las células SH-SY5Y diferenciadas	135
2.2.1. Efecto de los medios condicionados sobre la morfología de las células SH-SY5Y diferenciadas	135
2.2.2. Los medios condicionados afectan a la viabilidad celular de diferente manera	136
2.2.3. Los niveles de Tau son modificados por los medios condicionados	137
2.2.4. Los medios condicionados promueven la fosforilación de Tau	138
2.2.5. Las MAPKs son activadas por el tratamiento con los medios condicionados	141
2.2.6. Regulación de la fosforilación de Tau inducida por los medios condicionados por las p38 MAPKs	144
2.2.7. La ruta de las ERKs regula la fosforilación de Tau inducida por los medios condicionados	147
2.2.8. La vía de señalización de las JNKs está implicada en la fosforilación de Tau en respuesta a los medios condicionados	150
2.2.9. Los medios condicionados modifican la localización intracelular de Tau	154
2.2.10. Efecto de los medios condicionados sobre el transporte axonal y la organización de los microtúbulos	160
2.2.11. La distribución de MAP-2 no se modifica por los medios condicionados	164
Capítulo 3. Efecto de la fosforilación residuo-específica de Tau en su función y localización	167
3.1. Efecto de la fosforilación residuo-específica de Tau en las células HEK-293	168
3.1.1. Expresión de las construcciones de Tau en las células HEK-293	168
3.1.2. Las mutaciones puntuales de Tau modifican su capacidad de asociación al citoesqueleto, así como su capacidad de unión y estabilización de los microtúbulos	168
3.1.3. La pseudofosforilación de Tau en el residuo Thr-69 favorece la agregación de la proteína	172
3.1.4. Efecto de las mutaciones puntuales de Tau y el estado de fosforilación de la proteína en la velocidad de polimerización de tubulina <i>in vitro</i>	173

3.2. Efecto de la fosforilación residuo-específica de Tau en las células PC-12 diferenciadas	174
3.2.1. Expresión de las construcciones de Tau en las células PC-12 diferenciadas	174
3.2.2. Efecto de las mutaciones puntuales de Tau sobre su capacidad de unión a los microtúbulos <i>in vivo</i>	175
3.3. El patrón de fosforilación de la proteína Tau se modifica por los cambios en el estado de fosforilación de los residuos Thr-50 o Thr-69	177
3.4. Efecto de las mutaciones puntuales de Tau sobre su capacidad de unión a la membrana plasmática	178
V. Discusión	181
Capítulo 1. Estudio del efecto del estrés hiperosmótico sobre Tau en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y	183
1.1. Proteólisis de Tau y muerte celular por apoptosis	183
1.2. Fosforilación, localización de Tau y muerte celular por apoptosis	186
Capítulo 2. Estudio del efecto de la neuroinflamación sobre la proteína asociada a microtúbulos Tau en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y diferenciadas	189
2.1. Efecto de la inflamación sobre Tau	189
2.2. Localización intracelular y transporte celular	194
Capítulo 3. Efecto de la fosforilación residuo-específica de Tau en su función y localización	199
VI. Conclusiones	207
VII. Bibliografía	213

Lista de abreviaturas

Aa: Aminoácido.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AMC: Aminometilcumarina.

Aminoácidos:

Asn (N): Asparagina.

Asp (D): Ácido aspártico.

Cys (C): Cisteína.

Gln (Q): Glutamina.

Glu (E): Ácido glutámico.

Gly (G): Glicina.

His (H): Histidina.

Ile (I): Isoleucina.

Lys (K): Lisina.

Pro (P): Prolina.

Ser (S): Serina.

Thr (T): Treonina.

Tyr (Y): Tirosina.

Val (V): Valina.

APP: gen de la Proteína Precursora del Péptido β -Amiloide (PPA).

Apo-E: Apolipoproteína E.

APS: Persulfato amónico.

AR: Ácido retinoico.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARN_m: Ácido ribonucleico mensajero.

ARN_r: Ácido ribonucleico ribosómico.

ASK-1 y 2: del inglés, *Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 and 2*, quinasa reguladora de la señal de apoptosis 1 y 2.

ATF-2: del inglés, *Activating Transcription Factor 2*, factor de transcripción activador 2.

ATP: Adenosina trifosfato.

Bcl-2: del inglés, *B-Cell Lymphoma 2*, linfoma de células B 2.

BSA: Albúmina de suero bovina, del inglés *Bovine Serum Albumin*.

CAPS: Ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propano sulfónico.

CARD: del inglés, *Caspase Recruitment Domain*, dominio de reclutamiento de caspasas.

CCL-2: Ligando de quimiocina CC 2, del inglés *Chemokine C-C Motif Ligand 2*, también conocida como MCP-1.

CCR 3/5: Receptor de quimiocina CC 3 ó 5, del inglés *Chemokine (C-C Motif) Receptor 3/5*.

Cdc-25: Fosfatasa de especificidad dual (del inglés *Cell Division Cycle 25*).

Cdk-5: del inglés, *Cyclin-Dependent Kinase 5*, quinasa dependiente de ciclina 5.

- c-fos:** del inglés, *Finkel-Biskis-Jinkins Murine Osteosarcoma Virus*, oncogén aislado del virus FJB de osteosarcoma murino.
- c-jun:** Oncogén aislado de un sarcoma aviar (*Avian Sarcoma Virus 17*, su nombre viene de “ju-nana”, 17 en japonés).
- c-myc:** Protoncogén homólogo de la mielocitomatosis aviar, del inglés, *Avian Myelocytomatosis Virus*.
- DAPK:** Quinasa asociada a muerte, del inglés *Death-Associated Protein Kinase*.
- DAPI:** 4,6-diamidino-2-fenilindol, colorante fluorescente para la detección de ácidos nucleicos.
- DED:** del inglés, *Death-Effector Domain*, dominio efector de muerte.
- DLK:** del inglés, *Dual Leucine-Zipper Bearing Kinase*, quinasa con doble cadena de leucina.
- DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, medio *Eagle* modificado por *Dulbecco*.
- DMEM/F-12:** *Dulbecco's Modified Eagle's Medium nutrient mixture F-12 Ham*, medio *Eagle* modificado por *Dulbecco* y mezcla de nutrientes *Ham F-12*.
- DMSO:** Dimetilsulfóxido.
- DOC:** Dexosicolato sódico.
- DTT:** Ditiotreitól.
- EA:** Enfermedad de Alzheimer.
- EEM:** Error estándar de la media.
- EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético.
- EGTA:** Ácido etilenglicol-bis (β -aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético.
- EGF:** del inglés *Epidermal Growth Factor*, factor de crecimiento epidérmico.
- Elk:** del inglés, *E twenty-six (Ets)-like Transcription Factor*, factor de transcripción similar a *Ets*.
- ERK 1/2:** del inglés, *Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 and 2*, proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2.
- ERK-5:** del inglés, *Extracellular Signal-Regulated Kinase 5*, proteína quinasa regulada por señales extracelulares 5.
- FBS:** Suero fetal bovino, del inglés *Fetal Bovine Serum*.
- Fc:** Fracción constante.
- FDAP:** Técnica que cuantifica la pérdida de fluorescencia tras la fotoactivación de una proteína, (*Fluorescence Decay After Photoactivation*).
- FI:** Fracción insoluble.
- FIS:** Fracción insoluble a sarcosil.
- FITC:** Isotiocinato de fluoresceína, fluorocromo cuyo espectro de excitación tiene un pico máximo a 492 nm y a pico mínimo de 320 nm. La emisión máxima a 518 nm, emite en la región verde-azulada del espectro.
- FNUM:** Fracción no unida a microtúbulos.

- FPN:** Fracción postnuclear.
- FS:** Fracción soluble.
- FSS:** Fracción soluble a sarcosil.
- FTDP-17:** Demencia frontotemporal y parkinsonismo ligado al cromosoma 17.
- FUM:** Fracción unida a microtúbulos.
- GM-CSF:** Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, del inglés *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*.
- Grb-2** del inglés, *Growth Factor Receptor-Bound Protein 2*, proteína asociada al receptor del factor de transcripción 2.
- GSK-3 β :** del inglés, *Glycogen Synthase Kinase 3 β* , glucógeno sintasa quinasa 3 β .
- GST:** Glutación S-transferasa.
- GTP:** Guanosina trifosfato.
- HA:** Hemaglutinina.
- HRP:** del inglés, *Horseradish Peroxidase*, peroxidasa de rábano.
- Hsp:** del inglés, *Heat Shock Protein*, proteína de choque térmico.
- IgG:** Inmunoglobulina G.
- IL:** Interleuquina.
- IFN- γ :** Interferón γ .
- IP:** Inmunoprecipitación.
- IPTG:** Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido.
- JNK:** del inglés, *c-jun N-terminal Kinase*, quinasa del extremo N-terminal de c-jun.
- LB (medio):** Medio de Luria-Bertani.
- LPS:** Lipopolisacárido.
- MKK-4 y 7:** del inglés, *MAPK Kinase 4 and 7*, quinasa de MAPK 4 y 7.
- MA:** Microfilamentos de actina.
- MAP:** del inglés, *Microtubule-Associated Protein*, proteína asociada a microtúbulos.
- MAPK:** del inglés, *Mitogen-Activated Protein Kinase*, proteína quinasa activada por mitógenos.
- MAPKAPK:** del inglés, *Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinase*, proteína quinasa activada por MAPK.
- MAPKK:** Quinasa de MAPK, del inglés, *MAPK Kinase*.
- MAPKKK:** Quinasa de MAPKK, del inglés, *MAPK KinaseKinase*.
- MARK:** del inglés, *Microtubule Affinity Regulating Kinase*, proteína que regula la afinidad por los microtúbulos.
- MCP-1:** Proteína quimioatrayente de monocitos 1 (*Monocyte Chemoattractant Protein 1*).
- MEF-2C:** del inglés, *Myocyte Enhancer Fator-2C*, factor promotor de miocitos-2C.
- MEK 1 y 2:** Quinasa 1 y 2 de ERK, del inglés *Mitogen-activated protein kinase kinase 1 and 2*.

MLK-1, 2 y 3: del inglés, *Mixed-Lineage Kinase 1, 2 and 3*, quinasas de linaje mixto 1, 2 y 3.

MNK: del inglés, *MAPK Signal-Integrating Kinase 1*, quinasa integradora de las señales de las MAPKs.

MSK: del inglés, *Mitogen and Stress Activated Protein Kinase*, proteína quinasa activada por mitógenos y estrés.

MTT: 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2H bromuro de tetrazolio.

NF: Neurofilamentos, L:ligeros, M: medios y H: de alto peso molecular.

NFATc-1: del inglés, *Nuclear Factor of Activated T-cells cytoplasmic-1*, factor nuclear de células-T activadas citoplasmático-1.

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, (del inglés *Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of Activated B cells*).

NFTs: del inglés, *Neurofibrillary Tangles*, ovillos neurofibrilares.

NGF: del inglés, *Nerve Growth Factor*, factor de crecimiento nervioso.

NMDA: N-metil-D-aspartato (receptor de glutamato).

NORs: Regiones organizadoras nucleolares, del inglés *Nucleolus Organizer Regions*.

PAGFP: Proteína verde fluorescente fotoactivable (del inglés *Photoactivable Green Fluorescence Protein*).

PARP: del inglés, *Poly (ADP-Ribose) Polymerase*, poli-ADP ribosa-polimerasa.

PBS: Tampón fosfato salino.

PEI: Polietilenimina.

PHFs: del inglés, *Paired Helical Filaments*, filamentos apareados trenzados.

PKA: Proteína Quinasa dependiente de AMPc.

PLC- γ : Fosfolipasa C- γ .

PMA: Forbol de miristato acetato.

PPA: Proteína Precursora del Péptido β -Amiloide, del inglés *Amyloid Precursor Protein (APP)*.

PP2A: Fosfatasa 2A.

PS-1 y 2: Presenilina 1 y 2, del inglés *Presenilin 1 and 2*.

PSD-95: Proteína de densidad postsináptica 95, (*Postsynaptic Density Protein 95*).

p90RSK: del inglés, *90 kDa Ribosomal S6 Kinase*, proteína quinasa ribosomal S6 de 90 kDa.

p38 MAPKs: MAPKs de 38 kDa.

Raf: del inglés, *Ras-Activated Factor*, factor activado por Ras.

Ras: del inglés, *Retrovirus Associated Sequences*, oncogén aislado de sarcomas murinos inducidos por virus.

ROS / RNS: Especies reactivas de oxígeno o nitrógeno, del inglés *Reactive Oxygen/Nitrogen Species*.

- SAPKs:** del inglés, *Stress-Activated Protein Kinases*, proteínas quinasas activadas por estrés.
- SAP97/hDlg:** del inglés, *Synapse-Associated Protein 97 / human homologue of the Drosophila Disc Large*, proteína asociada a sinapsis 97 / homólogo humano de las proteínas *Disc Large* de *Drosophila*.
- SDS:** Dodecil sulfato sódico.
- SDS-PAGE:** del inglés, *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, dodecil sulfato sódico/gel de electroforesis de poliacrilamida.
- SF:** Filamentos rectos, del inglés *Straight Filaments*.
- SH-3:** del inglés, *Src-homology 3*, dominio de homología a Src-3.
- STOP:** Proteínas asociadas a microtúbulos, del inglés *Stable Tubulin Only Proteins*.
- SNC:** Sistema Nervioso Central.
- SNP:** Sistema Nervioso Periférico.
- Src:** abreviatura de *sarcoma*.
- STAB:** Servicio de Técnicas Aplicadas a la Biociencia de la Universidad de Extremadura.
- STAT:** Transductor de señal y activador de la transcripción, del inglés *Signal Transducer and Activator of Transcription*.
- SUMO:** del inglés, *Small Ubiquitin-like Modifier*, pequeño modificador metabólico de tipo ubiquitina.
- Syk:** del inglés, *Spleen Tyrosine Kinase*, tirosina quinasa derivada del bazo.
- TAK-1:** del inglés, *Transforming Growth Factor β -Activated Kinase 1*, proteína quinasa 1 activada por TGF- β .
- +TIPS:** del inglés, *Plus-End Tracking Proteins*, proteínas de asociadas al extremo + del microtúbulo.
- TGF- α :** Factor de crecimiento transformante α (*Transforming Growth Factor α*).
- TNF- α :** del inglés *Tumoral Necrosis Factor- α* , factor de necrosis tumoral α .
- TNFR:** Receptor del factor de necrosis tumoral, del inglés *Tumoral Necrosis Factor Receptor*.
- TT:** Fracción Tau total.
- UV:** del inglés *Ultra-Violet (radiation)*, radiación ultravioleta.
- Z-DEVD-fmk:** z-carbobenzoxi-aspartil-glutamil-valil-aspartil-fluorometilcetona, inhibidor de caspasa 3.
- Z-VAD-fmk:** carbobenzoxi-valil-alanil-aspartil-(O-metil)-fluorometilcetona, inhibidor general de caspasas.
- Z-VEID-fmk:** carbobenzoxi-vanil-glutamil-interleucil-aspartil-fluorometilcetona, inhibidor de caspasa 6.

I. Introducción

1. La neurona y su citoesqueleto

La neurona es un tipo celular altamente especializado del sistema nervioso cuya morfología determina, en gran medida, su función de recibir, integrar y enviar información a otras neuronas o células efectoras. Por ello, presenta una estructura polarizada en la que se distingue el cuerpo neuronal, llamado soma o pericarion, las dendritas, el axón y las terminales sinápticas. En el soma se encuentra el núcleo, que puede contener uno o dos nucléolos, y el citoplasma rico en ribosomas entre otros orgánulos. Las dendritas son prolongaciones cortas, muy ramificadas, que reciben el estímulo a través de las espinas dendríticas y lo transmiten hacia el soma celular. El axón es una prolongación larga que conduce la información desde el soma hacia otra neurona, célula u órgano diana. Éste consta de tres partes, el cono axónico, adyacente al pericarion; el segmento inicial, que es la parte más excitable de la neurona y las terminaciones sinápticas, cercanas a la sinapsis (Ramon y Cajal, 1952).

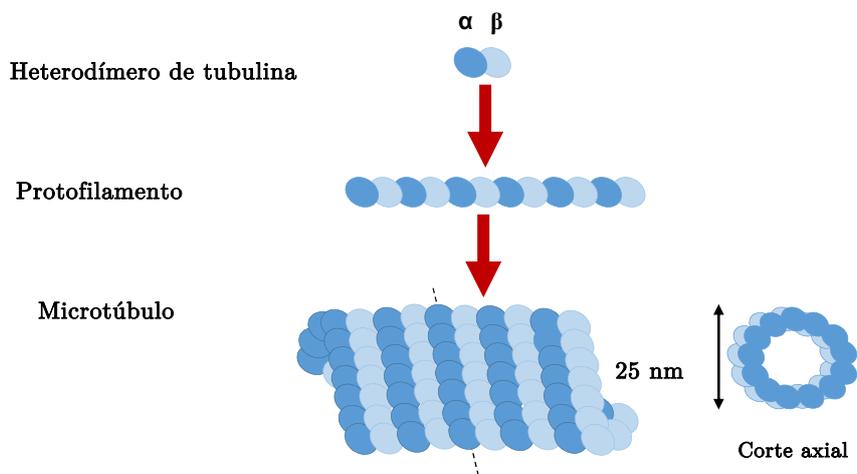
El citoesqueleto es el responsable de mantener la organización estructural y funcional de la neurona. Está compuesto por tres tipos principales de filamentos proteicos, los filamentos intermedios (FI), los microfilamentos de actina (MA) y los microtúbulos.

Los FI son los filamentos proteicos más abundantes en las neuronas y están formados por seis familias de genes (Herrmann y Aebi, 2004). Los neurofilamentos (NF) pertenecen a la clase IV de la familia de los FI y son específicos de neuronas. Los NF se clasifican en tres grupos distintos dependiendo de su peso molecular: los NF-H (NF de cadena pesada, de unos 205 kDa), los NF-M (NF de cadena mediana; de unos 160 kDa) y los NF-L (NF de cadena ligera, de unos 68 kDa), (Yuan *et al.*, 2012). La función de los NF es la de mantener la estructura de las dendritas y de los axones. También promueven el crecimiento del axón, siendo el patrón de expresión de los NF distinto en cada etapa la diferenciación neuronal, mientras los NF-L y NF-M están presentes durante todo el desarrollo, los NF-H sólo se expresan en las neuronas maduras (Shaw y Weber, 1982).

Los MA son los filamentos más finos, entre 3 y 5 nm de diámetro. Se componen de polímeros polares formados por monómeros de actina globular, unidos en una doble hélice (Carrier, 2010). Se encuentran en un estado dinámico, alternando ciclos de polimerización y

despolimerización. El estado de la actina dentro de la célula está controlado por las proteínas que se le unen, ya que facilitan la unión y la variabilidad de la longitud del polímero, permitiendo así procesos como el movimiento celular o la génesis de nuevas neuritas. Además, los microfilamentos sirven como vías para el transporte celular (Gallo y Lanier, 2010).

Los microtúbulos son esenciales para la formación y el mantenimiento de las neuritas. De hecho, la compleja morfología de las neuronas se relaciona con la cantidad de microtúbulos (Vega y Solomon, 1997). También intervienen en otros procesos celulares como son la división celular, el transporte de orgánulos y de proteínas celulares y la polarización celular (Verhey y Gaertig, 2007). El constituyente básico de los microtúbulos es la proteína globular tubulina. La tubulina es un heterodímero formado por los monómeros α y β -tubulina, que se unen “cabeza-cola” formando los protofilamentos. Trece protofilamentos se asocian de forma paralela y con la misma orientación para formar una estructura cilíndrica hueca, de unos 25 nm de diámetro exterior, que es el microtúbulo (**Esquema 1**).



Esquema 1.- Estructura básica de los microtúbulos.

Los microtúbulos son estructuras polares. Dado que todos los protofilamentos polimerizan con la misma orientación, uno de los extremos del microtúbulo está formado por un anillo de β -tubulina y es de crecimiento rápido (polo positivo), mientras que el otro, formado por un anillo de α -tubulina, es de crecimiento lento (polo negativo). Una característica propia de este tipo de estructuras es su inestabilidad dinámica, concepto que hace referencia al conjunto de fluctuaciones en la longitud de los microtúbulos derivadas de

la alternancia entre ciclos constantes de polimerización y despolimerización (Mitchison y Kirschner, 1984).

1.1. Proteínas asociadas a microtúbulos

Existe una gran variedad de proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs), unidas a los polímeros de tubulina, que contribuyen a regular sus funciones. Estas proteínas se agrupan en 2 clases: a) las proteínas motoras (quinesinas y dineínas), las cuales participan en el transporte intracelular dependiente de ATP de orgánulos y de proteínas a lo largo de los microtúbulos (Vale, 2003; Hirokawa y Takemura, 2005); y b) las MAPs estructurales (Dehmelt y Halpain, 2005).

Las MAPs estructurales se localizan a lo largo de los microtúbulos estabilizándolos y regulando su polimerización. Tienen una carga positiva que interacciona con la carga negativa del extremo carboxilo de la tubulina, facilitando que polimericen formando los microtúbulos (Fojo, 2009). Se clasifican en tres familias, la de tipo I, que incluye MAP-1A y 1B, de mayor peso molecular (aproximadamente entre 300 y 250 kDa), (Halpain y Dehmelt, 2006), la de tipo II, donde se encuentran MAP-2A, B, C y D (entre 280 y 42 kDa), MAP-4 y Tau (Dehmelt y Halpain, 2005) y un tercer grupo que engloba las nuevas MAPs como las proteínas STOP o MAP-6 (Bosc *et al.*, 1999), la encosina o MAP-7 (Faire *et al.*, 1999), las +TIPs (Akhmanova y Hoogenraad, 2005), entre otras (Jaworski *et al.*, 2008).

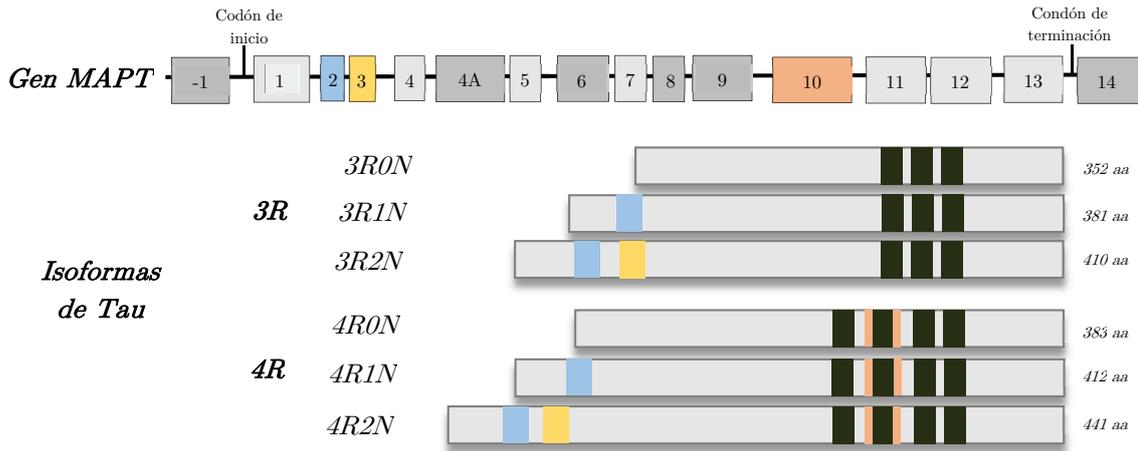
En el sistema nervioso central (SNC), las MAPs más abundantes son las MAP-2 y Tau. Las MAP-2 son proteínas implicadas en la morfogénesis neuronal y en la estabilización de los microtúbulos, aunque también interaccionan con los microfilamentos de actina y los neurofilamentos. Cuando MAP-2 se fosforila, sufre un cambio conformacional con el que la estabilidad de los microtúbulos se ve comprometida, alterando también su localización en la célula (Sanchez *et al.*, 2000).

2. La proteína asociada a microtúbulos Tau

2.1. Isoformas de Tau

La proteína asociada a microtúbulos Tau se describió por primera vez en el año 1975 como un factor proteico termorresistente que copurificaba junto con moléculas de tubulina (Weingarten *et al.*, 1975). En 1977 Cleveland y colaboradores caracterizaron la proteína bioquímicamente, destacando su susceptibilidad a ser fosforilada (Cleveland *et al.*, 1977a, 1977b).

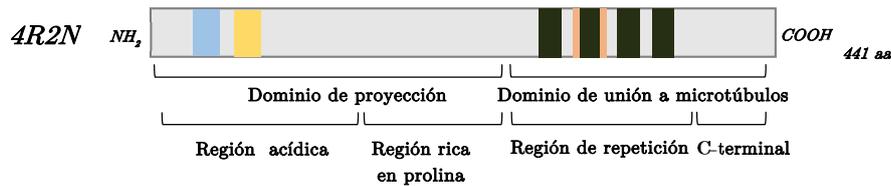
En humanos, el gen que codifica la proteína Tau, *MAPT*, se localiza en el cromosoma 17p21.31 y contiene 16 exones, incluyendo el exón 0, que es parte del promotor. En el SNC existen, al menos, seis isoformas diferentes de Tau, resultado del procesamiento alternativo de su ARN_m (Neve *et al.*, 1986; Goedert *et al.*, 1989a; Andreadis *et al.*, 1992). Las isoformas de Tau difieren en el número de dominios ácidos (N) presentes en la región amino-terminal, y en la presencia de 3 ó 4 motivos de unión a microtúbulos (R) situados en el extremo carboxilo-terminal de la proteína (**Esquema 2**). Los dominios ácidos constan de una secuencia de 29 aminoácidos codificada por los exones 2 y 3. Los motivos de unión a microtúbulos son secuencias de 18 aminoácidos altamente conservadas, codificadas por los exones 9, 10, 11 y 12, entre las que se intercalan secuencias de 13 ó 14 residuos que se denominan secuencias de interrepetición (Lee *et al.*, 1988; Gendron y Petrucelli, 2009). Todas las isoformas se expresan de manera diferencial durante el desarrollo, de tal forma que sólo una de ellas, caracterizada por la ausencia de insertos en el extremo N-terminal y la presencia de tres repeticiones en el C-terminal, está presente en estadios fetales (Kosik *et al.*, 1989). En el SNC se pueden encontrar además otras isoformas minoritarias producto del procesamiento del exón 6 (Lapointe *et al.*, 2009). En adultos impera un equilibrio entre las isoformas 3R y 4R, siendo las más abundantes las 3R1N y 4R1N (Lee y Leegers, 2012). Las isoformas 4R presentan mayor afinidad por los microtúbulos que las 3R y pueden desplazar a éstas incluso si se encuentran unidas previamente a los microtúbulos. En el SNP existe una isoforma denominada “Big Tau”, de unos 110 kDa (Boyne *et al.*, 1995), y que es el resultado de la adición de 242 residuos procedentes del exón 4a (Goedert *et al.*, 1992). Su función es similar a la de las isoformas del SNC (Nagao *et al.*, 1999).



Esquema 2.- Representación esquemática del gen que codifica la proteína Tau y de las seis isoformas expresadas mayoritariamente en el SNC. (Buee *et al.*, 2000).

2.2. Estructura de Tau

En Tau se distinguen dos dominios estructurales, el de proyección y el de unión a microtúbulos (**Esquema 3**).



Esquema 3.- Representación esquemática de los dominios funcionales de la isoforma más larga de Tau (**4R2N**). (Gendron y Petrucelli, 2009).

El dominio de proyección debe su nombre a que sobresale hasta 19 nm de los microtúbulos (Hirokawa *et al.*, 1988). Ocupa casi dos tercios de la proteína completa, ya que se extiende desde el extremo N-terminal hasta el dominio de unión a microtúbulos (Buee *et al.*, 2000) y puede dividirse en dos regiones o motivos: la región ácida (cargada negativamente debido a que contiene gran cantidad de aminoácidos ácidos) y la región rica en prolina (cargada positivamente). La región ácida, además de determinar la distancia entre los microtúbulos (Chen *et al.*, 1992), juega un papel importante en la interacción de Tau con otras proteínas del citoesqueleto, como los microfilamentos de actina (Griffith y Pollard, 1978) y los neurofilamentos, así como con componentes de la membrana plasmática (Brandt *et al.*, 1995) y de orgánulos citoplasmáticos, como las mitocondrias (Kolarova *et al.*, 2012). La región rica en prolina es la más próxima a los dominios de unión a microtúbulos.

Su carga positiva favorece la unión a microtúbulos por mecanismos todavía no bien caracterizados (Goode *et al.*, 1997). Contiene 7 motivos PXXP, donde X puede ser cualquier aminoácido, lo cual permite que esta región de Tau interaccione con proteínas con dominios de homología Src-3 (SH-3) como la tirosina quinasa Fyn, Src o Lck (Mandelkow y Mandelkow, 2012). Además, se ha visto que interacciona con otras moléculas celulares como con actina (He *et al.*, 2009) y ARN (Wang *et al.*, 2006). Por otra parte, muchas de las prolina que contiene están precedidas de una serina o una treonina, por lo que son secuencias diana de las proteínas quinasas dirigidas por prolina.

El dominio de unión a microtúbulos, que se extiende desde el final de la región rica en prolina del dominio de proyección hasta el extremo carboxilo terminal de la proteína, representa el centro de interacción de Tau con tubulina y también forma el núcleo para la formación de los filamentos helicoidales apareados o PHFs (Mukrasch *et al.*, 2009). Contiene 3 ó 4 dominios de repetición (R), dependiendo de la isoforma de Tau, además de una región ácida que cierra la proteína por el extremo carboxilo y sobresale de la superficie de los microtúbulos. La capacidad de Tau para unirse a los microtúbulos reside en estos dominios de repetición y en sus regiones adyacentes (Gustke *et al.*, 1994). Esta interacción se establece a través de uniones electrostáticas entre el dominio de unión a microtúbulos, con carga neta positiva, y los residuos de aminoácidos cargados negativamente de la tubulina (Buee *et al.*, 2000; Rosenberg *et al.*, 2008). Por otra parte, se ha demostrado que el estado de fosforilación de este dominio es clave en la asociación de Tau con los microtúbulos (Kolarova *et al.*, 2012).

En condiciones fisiológicas, Tau es una proteína “nativamente desplegada” o “intrínsecamente desordenada”, lo que significa que carece de estructura secundaria. Esta característica hace que Tau sea una proteína muy flexible y móvil lo que le permite interactuar con varias proteínas y regular múltiples funciones celulares, incluso en condiciones no favorables (Schweers *et al.*, 1994; Mandelkow y Mandelkow, 2012).

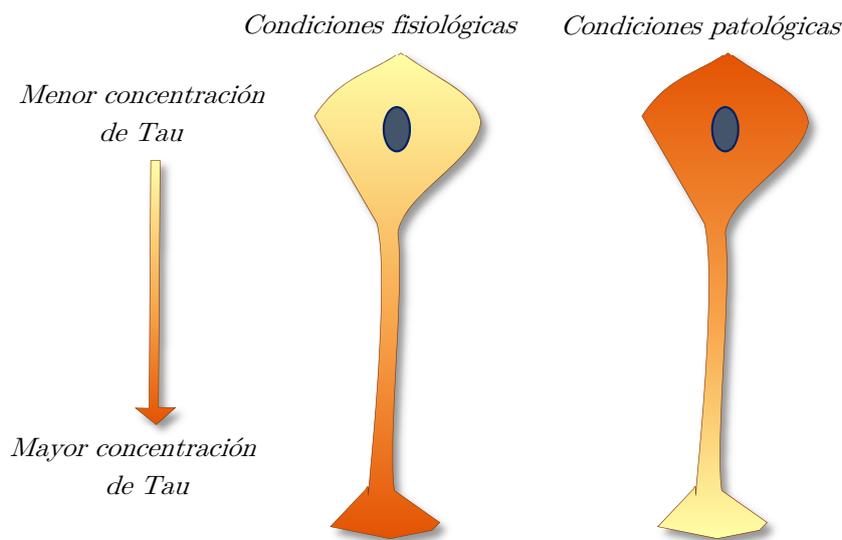
2.3. Distribución y localización intracelular de Tau

La proteína Tau se expresa principalmente en neuronas del SNC y SNP (Trojanowski *et al.*, 1989), y en menor medida en oligodendrocitos (LoPresti *et al.*, 1995; Richter-Landsberg, 2008). En cerebro humano, Tau se detecta en la corteza cerebral, en el

hipocampo, en el tálamo, en el estriado y, en menor medida, en el cerebelo (Goedert *et al.*, 1989b). Fuera del sistema nervioso, Tau se expresa, aunque de manera minoritaria, en el corazón, el riñón, el pulmón, los testículos (Gu *et al.*, 1996) y en el músculo esquelético (Askanas *et al.*, 1994). Recientemente se ha detectado en cáncer de mama, de próstata, de estómago y de páncreas (Lee y Leugers, 2012).

En la neurona, Tau se localiza principalmente en el axón (Trojanowski *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 2001), aunque también puede detectarse en el compartimento somatodendrítico (Tashiro *et al.*, 1997).

El estado de fosforilación de Tau influye en la distribución de la proteína, ya que la proteína fosforilada tiende a acumularse principalmente en el espacio somatodendrítico. Este hecho está considerado como un marcador de enfermedades neurodegenerativas (Braak *et al.*, 2011), (**Esquema 4**).



Esquema 4.- Distribución fisiológica y patológica de Tau en neuronas. (Scholz y Mandelkow, 2014).

Aunque Tau es una proteína principalmente citosólica, su presencia en el núcleo se describió en los años 90 (Loomis *et al.*, 1990). En el núcleo, la proteína Tau suele estar asociada con el componente fibrilar denso del nucleólo durante la interfase y con las regiones organizadoras nucleolares de los cromosomas mitóticos (NORs), donde se localizan los genes responsables de la biogénesis de los ribosomas (del ARN_r) durante la transcripción y la división celular, respectivamente (Sjoberg *et al.*, 2006). También se

encuentra unida a cadenas sencillas o dobles de ADN en una forma dependiente de agregación, de manera que cuando Tau se encuentra formando agregados pierde su interacción con el ADN. Esta interacción con el ADN lo protege frente a la desnaturalización *in vitro* (Hua y He, 2002, 2003).

Recientemente se ha detectado la presencia de Tau en el espacio extracelular. La posibilidad de que las patologías originadas por Tau se produzcan por difusión de la proteína o de sus agregados a células sanas cercanas, como ocurre en las enfermedades causadas por priones, está siendo objeto de numerosos estudios (Hanger *et al.*, 2014; Medina y Avila, 2014).

2.4. Funciones de Tau

Inicialmente, la única función que se atribuía a Tau era la de promover la polimerización y estabilización de los microtúbulos (Weingarten *et al.*, 1975). Pero el hecho de que Tau interactúe con gran variedad de proteínas hace que participe en la regulación de muchos procesos celulares.

2.4.1. Interacción de Tau con el citoesqueleto

En la célula, la mayor parte de Tau se encuentra unida a los microtúbulos. Esta interacción es esencial para mantener la morfología y la polaridad de la neurona (Caceres y Kosik, 1990). Las neuronas son células muy vulnerables a la inestabilidad de su citoesqueleto debido a que poseen una estructura altamente polarizada, por ello, los procesos que modifican el estado fisiológico de Tau y alteran su unión con los microtúbulos, perjudican finalmente al citoesqueleto e incluso a la viabilidad celular (Hanger *et al.*, 2014).

La asociación de Tau a los microtúbulos constituye también un mecanismo de regulación del transporte axonal. El transporte a través del axón está mediado por dos familias de proteínas motoras denominadas quinesinas y dineínas. La orientación uniforme de los microtúbulos en el axón permite la polarización del transporte de manera que las quinesinas llevan a cabo el transporte anterógrado (soma-terminal sináptica), mientras que las dineínas realizan el transporte retrógrado (terminal sináptica-cuerpo neuronal), (Vale, 2003; Welte, 2004). Tau puede interferir con la unión de las proteínas motoras a los microtúbulos, lo cual proporciona un mecanismo de regulación espacio-temporal del

transporte axonal. Mientras que las moléculas de dineína tienden a revertir el sentido de su movimiento en aquellas regiones de los microtúbulos enriquecidas en moléculas de Tau, las de quinesina son más proclives a separarse de los mismos en tales áreas (Dixit *et al.*, 2008). Esta observación, unida a la existencia de un gradiente de Tau a lo largo del axón, ha permitido proponer un modelo en el que las elevadas concentraciones de Tau en regiones próximas a la terminal sináptica facilitarían la liberación de la carga transportada por las dineínas, mientras que las menores concentraciones de Tau en el soma permitirían a las quinesinas unirse a los microtúbulos e iniciar el transporte anterógrado (Mandell y Banker, 1996). Este modelo concuerda con el hecho de que la sobreexpresión de Tau en células neuronales y no neuronales altere no sólo la morfología celular, sino también la distribución subcelular de varios orgánulos que necesitan su reparto a través del transporte axonal mediado por quinesinas (Ebner *et al.*, 1998; Trinczek *et al.*, 1999).

2.4.2. Tau y señalización celular

Numerosos estudios muestran que Tau puede actuar como proteína de anclaje postsináptico, regulando la localización y la actividad de la familia de las proteínas tirosina quinasas Src, c-Src y Fyn, y facilitando los reordenamientos con actina mediados por c-Src. En el caso de Fyn, se ha sugerido que Tau une esta quinasa al complejo de señalización compuesto por el receptor NMDA y PSD-95 (Mietelska-Porowska *et al.*, 2014).

Tau también puede regular cascadas de señalización intracelular implicadas en el desarrollo neuronal. Se ha mostrado que facilita la señalización mediada por los receptores de NGF y EGF en células PC-12, incrementando la actividad de la ruta de las MAPKs, y favoreciendo así las etapas de iniciación y elongación de las neuritas en este modelo (Leugers y Lee, 2010). Puesto que se desconoce la capacidad de interacción directa de Tau con los receptores de factores de crecimiento anteriormente citados, se ha propuesto que la activación de esta ruta podría estar mediada por la interacción de Tau con los dominios SH-3 de proteínas adaptadoras del tipo de Grb-2 (Reynolds *et al.*, 2008).

2.4.3. Función de Tau en núcleo

Estudios realizados en células no neuronales atribuyen a Tau un importante papel en la conformación de la estructura del nucleólo y en la heterocromatización de los genes ribosomales (Sjoberg *et al.*, 2006; Rossi *et al.*, 2008). Pero la función de Tau en el núcleo de la neurona se desconoce, aunque se ha sugerido que puede tener un papel protector del ADN (Sultan *et al.*, 2011).

Por otra parte se ha sugerido que Tau podría participar en la biogénesis de los ribosomas y la transcripción del ARN ribosómico (Thurston *et al.*, 1996).

2.5. Modificaciones postraduccionales de Tau

El conjunto de cambios químicos que tienen lugar en una proteína una vez sintetizada se conoce con el nombre de modificación postraducciona. Estas modificaciones tienen importantes efectos moduladores y pueden conllevar a la ganancia o pérdida de la función biológica de la proteína, alterar su localización celular y su capacidad para interactuar con otras proteínas o determinar que la proteína debe ser degradada (Hunter, 2007).

Tau puede sufrir varias modificaciones postraduccionales, algunas de las cuales serían las responsables de provocar la pérdida de su función fisiológica y la ganancia de sus características patológicas (Martin *et al.*, 2011; Kolarova *et al.*, 2012). La modificación postraducciona de Tau más estudiada es la fosforilación, fundamentalmente en residuos de serina y treonina, aunque también se ha descrito este tipo de modificación en residuos de tirosina (Lee *et al.*, 2004; Togo *et al.*, 2004). Además, Tau puede ser modificada por acetilación (Min *et al.*, 2010; Cohen *et al.*, 2011), glicación (Ledesma *et al.*, 1994), isomerización (Miyasaka *et al.*, 2005), nitración (Horiguchi *et al.*, 2003; Reyes *et al.*, 2008) SUMOilación (Dorval y Fraser, 2006), glicosilación por N-acetil glucosamina (O-GlcNAc) (Arnold *et al.*, 1996), ubiquitinación (Cripps *et al.*, 2006) y proteólisis (Liu *et al.*, 2011; Reifert *et al.*, 2011).

2.5.1. Fosforilación de Tau

Tau es una fosfoproteína (Cleveland *et al.*, 1977b) y su función biológica está regulada por fosforilación. Aproximadamente una quinta parte de los aminoácidos de Tau son susceptibles de ser fosforilados, ya que contiene 45 residuos de serina, 35 de treonina y 5 de tirosina (Goedert *et al.*, 1989a), y aproximadamente 30 de ellos se han encontrado fosforilados en condiciones fisiológicas (Lee *et al.*, 2001). La fosforilación fisiológica de Tau cambia con el estado de desarrollo. Así, la forma fetal de Tau se encuentra más fosforilada en el embrión que en el SNC de adulto, y el grado de fosforilación de las seis isoformas decrece con la edad, probablemente debido a una mayor activación de fosfatasa (Wang y Liu, 2008).

Las proteínas quinasas que fosforilan a la proteína Tau se pueden dividir en tres grupos:

- Las quinasas dirigidas por prolina: que reconocen y fosforilan residuos de serina o treonina seguidos de prolina. Sus dianas en Tau se encuentran principalmente en la región rica en prolina. En este grupo se encuentra la GSK-3 (Ishiguro *et al.*, 1993; Godemann *et al.*, 1999), la cdk-5 (Dhavan y Tsai, 2001) o las MAPKs (Roux y Blenis, 2004).
- Las quinasas no dirigidas por prolina: no requieren reconocimiento de ninguna secuencia y fosforilan a Tau fundamentalmente en el dominio de unión a microtúbulos. Entre ellas se distinguen la PKA (Raghuveer y Ingram, 1995) y las MARKs (Matenia y Mandelkow, 2009).
- Las tirosina quinasas: que fosforilan los residuos de tirosina presentes principalmente en la región N-terminal de Tau. Entre ellas encontramos a Fyn, Abl y Syk (Noble *et al.*, 2013).

2.5.1.1. Familia de las MAPKs

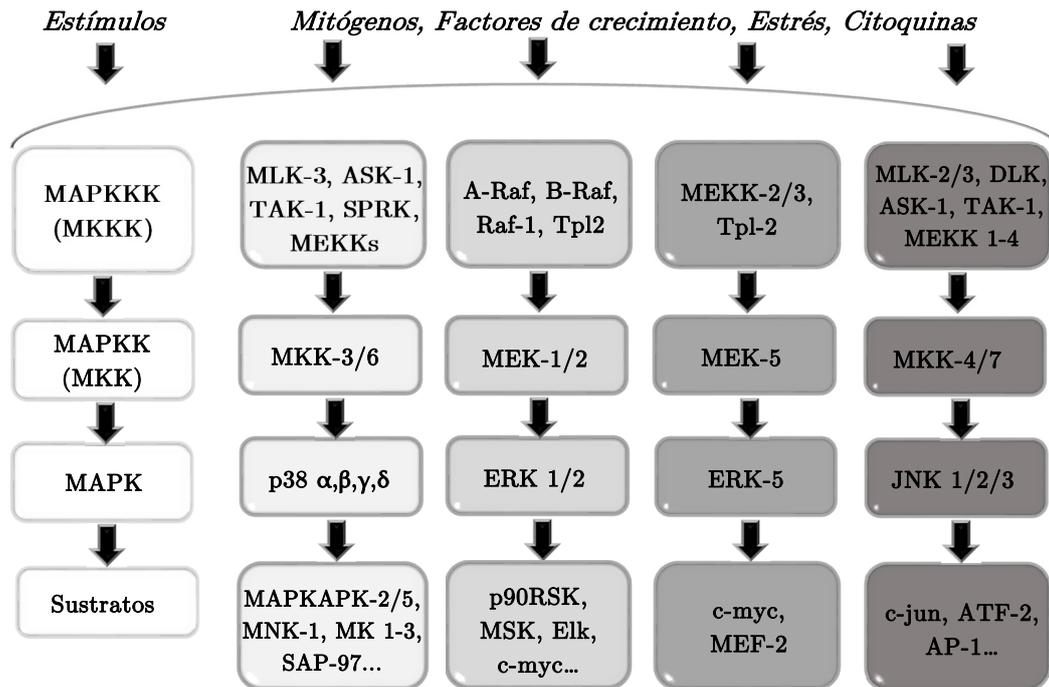
Las células reconocen y responden a cambios tanto físicos como químicos que se producen en el ambiente mediante las distintas vías de señalización que poseen. Las proteínas quinasas que ayudan a transferir las señales desde el exterior al interior celular son las quinasas activadas por mitógenos (MAPKs). Esta familia de quinasas está involucrada en la regulación de la expresión génica, la mitosis, la diferenciación, la supervivencia y la muerte celular (Brown y Sacks, 2008). Hasta la fecha se han caracterizado 4 subfamilias de

MAPKs en mamíferos (**Esquema 5**):

- 1) Las quinasas activadas por mitógenos de 38 kDa o p38 MAPK α , β , δ , γ .
- 2) Las quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 o ERK 1/2.
- 3) La quinasa regulada por señales extracelulares 5 o ERK-5.
- 4) Las quinasas del extremo N-terminal de c-Jun 1, 2 y 3 o JNK-1/ 2 / 3.

Todas ellas comparten la misma estructura de señalización consistente en 3 módulos conservados que se activan de manera secuencial, las MAPKK quinasas (MAPKKKs), las MAPK quinasas (MAPKKs) y finalmente las MAP quinasas (Pimienta y Pascual, 2007). Las MAPKKKs son serina/treonina quinasas que se activan en respuesta a un estímulo extracelular, normalmente a través de la fosforilación y/o por su interacción con las proteínas asociadas a GTP de las familias de Ras o Rho, (Dan *et al.*, 2001). También pueden activarse por fosforilación de una MAPKKKK anterior, por oligomerización y por redistribución celular (Zhang y Dong, 2007). Las MAPKKs se activan por fosforilación de la MAPKKK correspondiente y una vez activa fosforila al siguiente módulo, el de las MAPKs. Estas MAPKKs son treonina/tirosina quinasas de especificidad dual que reconocen y fosforilan a las MAPKs (Gartner *et al.*, 1992; Raman *et al.*, 2007). Una vez activadas, las MAPKs fosforilan a sus sustratos en las serinas y treoninas seguidas por prolinas, que son en su mayoría factores de transcripción, aunque también actúan sobre otras quinasas o proteínas asociadas al citoesqueleto (Goedert *et al.*, 1997a).

Las MAPKs pueden ser activadas por una gran variedad de estímulos diferentes, pero en general, las ERKs se activan preferentemente en respuesta a factores de crecimiento y ésteres de forbol, mientras que las JNKs y las p38 quinasas responden a estímulos de estrés que van desde el choque osmótico y la radiación ionizante a la estimulación por citoquinas (Pearson *et al.*, 2001).



Esquema 5.- Ruta de las proteínas quinasas activadas por mitógenos o MAPKs. (Sabio y Davis, 2014).

2.5.1.1.1. p38 MAPKs

La subfamilia p38 MAPKs (a partir de ahora se denominarán como p38s) está formada por al menos, cuatro proteínas homólogas diferentes: la p38 α o SAPK-2A (Lee *et al.*, 1994), la p38 β o SAPK-2B (Cuenda *et al.*, 1995), la p38 γ , conocida también como SAPK-3 o ERK-6 (Cuenda *et al.*, 1997) y la p38 δ o SAPK-4 (Kumar *et al.*, 1997; Goedert *et al.*, 1997b). Esta subfamilia se puede dividir, a su vez, en dos grupos, por una parte p38 α y p38 β y por otra parte p38 γ y p38 δ . Esto se debe en primer lugar, a la identidad de su secuencia de aminoácidos: p38 α y p38 β son idénticas en un 75 %, mientras que p38 γ y p38 δ son un 70 % análogas entre ellas y un 62 % y 61 % idénticas a p38 α , respectivamente (Cuenda y Rousseau, 2007); y en segundo lugar, por sus susceptibilidades a los compuestos SB203580 y SB202190, las p38 α y p38 β son inhibidas por ellos, mientras que p38 γ y p38 δ no se ven afectadas (Cuenda y Rousseau, 2007). Estas quinasas son muy ubicuas, ya que todas las isoformas se expresan en la mayoría de los tejidos (Goedert *et al.*, 1997a).

Junto a las JNKs, las p38s forman un grupo de quinasas conocidas como proteínas quinasas activadas por estrés (SAPKs), ya que como su nombre indica, se activan por diferentes tipos de estreses celulares, como el estrés ambiental, el choque osmótico, el choque térmico, la radiación ultravioleta, entre muchos otros. También se activan en

respuesta a lipopolisacáridos bacterianos, inhibidores de síntesis proteica o de citoquinas inflamatorias (Cuenda y Rousseau, 2007).

Una vez activadas, las p38s pueden fosforilar a un gran número de sustratos entre los que se encuentran proteínas quinasas, como MAPKAPK-2 y 3 (Sudo *et al.*, 2005); factores de transcripción como ATF-2, MEF2C o p53 (Wu, 2004); proteínas del citoesqueleto, componentes de la maquinaria de síntesis de proteínas (Cuenda y Rousseau, 2007); y a otras proteínas entre las que se encuentran cdc25 y la propia proteína Tau (Reynolds *et al.*, 1997; Goedert *et al.*, 1997a; Risco y Cuenda, 2012). Por lo tanto, entre las funciones principales de las p38s figuran la regulación transcripcional, la progresión del ciclo celular, la remodelación de la cromatina, el procesamiento y la estabilidad del ARN_m, la reorganización del citoesqueleto o la diferenciación y migración celular.

2.5.1.1.2. ERK 1/2

La ruta de las proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares o ERKs fue la primera vía de las MAPKs de mamíferos que se descubrió (Marshall, 1995; Kyriakis y Avruch, 2001) y, por ello, es también conocida como la ruta clásica de las quinasas activadas por mitógenos. Se han descrito cinco proteínas ERK (1-5) a las que se han clasificado en tres subfamilias diferentes, ERK 1/2, ERK 3/4 y ERK-5 (Raman *et al.*, 2007).

Las ERK 1/2, de 44 y 42 kDa respectivamente, comparten un 83 % de homología en su secuencia de aminoácidos y se expresan en todos los tejidos (Roux y Blenis, 2004). Se activan por distintos estímulos entre los que se encuentran los factores de crecimiento, las citoquinas, la insulina, el estrés osmótico, los ésteres de forbol y la desorganización de los microtúbulos (Roux y Blenis, 2004).

Muchas proteínas citoplasmáticas son sustratos de estas quinasas, como la p90^{rsk}, la fosfolipasa A-2, el receptor de EGF, además de las proteínas asociadas a microtúbulos MAP- 1 y 2 y Tau (Buee *et al.*, 2000). Por otra parte también fosforilan a factores de transcripción como Elk-1, c-myc o las proteínas STAT (Brown y Sacks, 2008). Por ello, estas quinasas están implicadas en procesos de crecimiento y proliferación celular a través de su papel como regulador génico (Wang, 2007a) y del centro organizador de microtúbulos durante la fase M del ciclo celular (Verlhac *et al.*, 1993). Esta ruta de señalización participa igualmente en la respuesta al estrés celular y en procesos de muerte

celular inhibiendo la activación de proteínas proapoptóticas como Bcl-2 y la quinasa asociada a muerte DAPK (Roskoski, 2012).

2.5.1.1.3. JNKs

Las proteínas quinasas JNKs, también conocidas como SAPKs (*stress-activated protein kinases*), constituyen una subfamilia de MAPKs cuyo primer miembro fue identificado en 1990 como una nueva Ser/Thr quinasa activada por cicloheximida (Kyriakis y Avruch, 1990). Algunos años más tarde, se descubrió que esta quinasa se unía al extremo amino terminal del factor de transcripción c-jun y lo fosforilaba en los residuos Ser-63 y Ser-73, aumentando su actividad transcripcional (Hibi *et al.*, 1993; Derijard *et al.*, 1994). Están codificadas por tres genes diferentes denominados *jnk1*, *jnk2* y *jnk3*. El procesamiento alternativo de estos tres genes produce 10 o más isoformas distintas de las JNKs. Las isoformas caracterizadas son la JNK-1, JNK-2 y JNK-3, que comparten una homología de aminoácidos de hasta el 85 % en mamíferos (Pearson *et al.*, 2001). Estas proteínas tienen pesos moleculares de 46 kDa (JNK-1 α , JNK-2 α) y 54 kDa (JNK-1 β , JNK-2 β), mientras que las isoformas de JNK-3 tienen pesos moleculares de 48 kDa la JNK-3 α y 57 kDa la JNK-3 β . Las JNK-1 y JNK-2 se expresan de forma ubicua mientras que la expresión de la JNK-3 tiene lugar principalmente en el cerebro (Davis, 2000).

La ruta de las JNKs se activa en respuesta a diferentes estímulos externos como estrés oxidativo y osmótico, la radiación ultravioleta, el choque térmico, las citoquinas inflamatorias, ausencia de factores de crecimiento, agentes que dañan al ADN e inhibidores de la síntesis de proteínas (Widmann *et al.*, 1999).

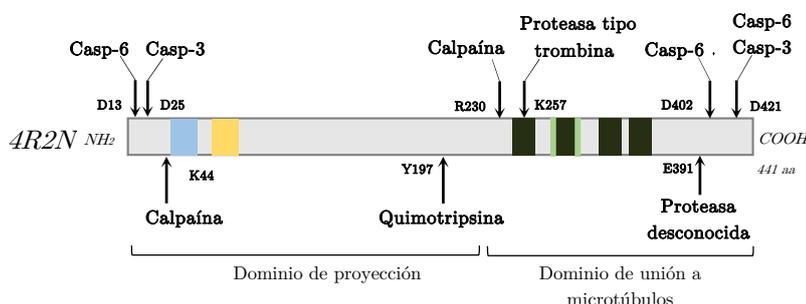
El principal sustrato de las JNKs es el factor de transcripción inducible c-jun, aunque también fosforilan a otros factores de transcripción como son ATF-2, NFATc1, STAT-3 y Elk-1. La fosforilación de estos factores de transcripción por las JNKs afecta a su actividad transcripcional y a la expresión de aquellas proteínas cuyo nivel de transcripción regulan (Roux y Blennis, 2004). Además, las JNKs fosforilan sustratos no nucleares, como a Tau (Goedert *et al.*, 1997a; Yoshida *et al.*, 2004), a la ligasa E3 (Gao *et al.*, 2004) y proteínas mitocondriales como los miembros de la familia Bcl-2 (Bogoyevitch, 2006), indicando que las acciones de las JNKs se extienden más allá de la regulación de la transcripción.

Las JNKs participan en muchos y diferentes procesos celulares e incluso su función puede depender del contexto celular. Así, las JNKs regulan tanto la proliferación y supervivencia celular (Zhang y Liu, 2002), como la apoptosis (Wada y Penninger, 2004), participan en la organogénesis durante el desarrollo embrionario, controlan la respuesta inmune al regular la expresión de citoquinas (Sabapathy *et al.*, 1999), la migración celular (Nishina *et al.*, 2003) y la integridad del citoesqueleto (Huang *et al.*, 2004).

En el sistema nervioso se ha demostrado su implicación en procesos como la plasticidad y la formación de neuritas, la regeneración neuronal y en los procesos de excitación neuronal, aprendizaje y memoria (Haeusgen *et al.*, 2009).

2.5.2. Proteólisis de Tau

Al estar nativamente desplegada, Tau es diana de varias proteasas como tripsina, quimiotripsina u otras proteasas endógenas, entre las que destacan las calpaínas y las caspasas (Wang *et al.*, 2010), (**Esquema 6**).



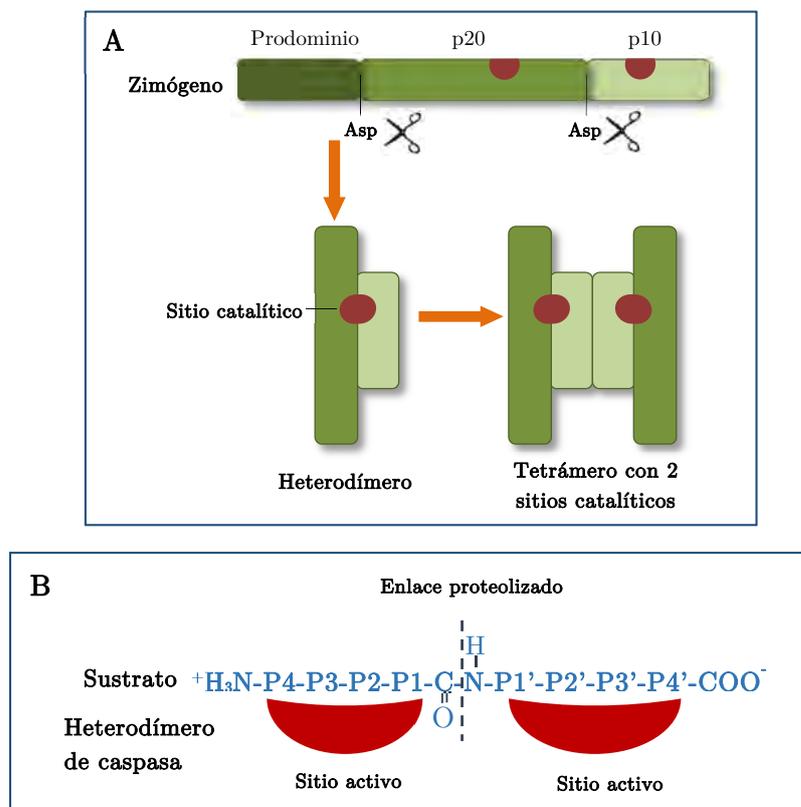
Esquema 6.- Representación esquemática de los sitios de corte de las distintas proteasas que actúan sobre la proteína Tau. (Wang *et al.*, 2007b). (D: residuo de aspártico, K: lisina, Y: tirosina, R: arginina y E: glutámico).

2.5.2.1. Caspasas

Las caspasas pertenecen a una familia altamente conservada de cisteín proteasas que proteolizan sus sustratos después de un residuo de ácido aspártico. Las caspasas son sintetizadas como zimógenos inactivos, los cuales contienen un prodominio en el extremo N-terminal, una subunidad grande (denominada p20) y otra más pequeña (denominada p10). La activación requiere el procesamiento proteolítico entre los dominios, seguido de la asociación entre las subunidades grande y pequeña para formar un heterodímero. Este procesamiento tiene lugar en los sitios de corte para caspasas, es decir, a continuación de

un residuo de ácido aspártico, lo cual permite que sea llevado a cabo por otras caspasas. Todas las especies de caspasas activas conocidas están formadas por la unión de dos heterodímeros, con dos sitios catalíticos que parecen funcionar de manera independiente (Khan y James, 1998; Crawford y Wells, 2011), (**Esquema 7-A**).

Además del residuo de aspártico, las caspasas utilizan el reconocimiento de cuatro aminoácidos en la zona amino terminal al sitio de corte (**Esquema 7-B**). Este tetrapéptido de reconocimiento difiere sustancialmente entre las caspasas, lo cual explica en gran parte su enorme versatilidad funcional (Crawford y Wells, 2011).



Esquema 7.- Representación de la activación de las caspasas y del reconocimiento del sitio de corte en el sustrato por el centro activo de las caspasas.

Hasta la fecha se han identificado 15 caspasas en mamíferos, de las cuales 11 se han encontrado en humanos (Venero *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta su función y la posición que ocupan en la cascada apoptótica, las caspasas se dividen en:

- **Caspasas inflamatorias:** se trata de caspasas implicadas en procesos de activación de citoquinas. Se caracterizan por la presencia de largos prodominios que contienen dominios de reclutamiento de caspasas o dominios CARD. Tienen preferencia por triptófano o leucina en la posición P4. Entre ellas, se encuentran las caspasas inflamatorias

1, 4, 5, 11, 12, 13 y 14.

- **Caspasas iniciadoras:** al igual que las anteriores, contienen largos prodominios, pero tienen preferencia por residuos de leucina o valina en la posición P4. Pueden contener bien un dominio efector de muerte o dominio DED como es el caso de las caspasas 8 y 10, o bien un dominio de tipo CARD, como las caspasas 2 y 9. Este tipo de dominios posibilitan su interacción con moléculas adaptadoras.

- **Caspasas ejecutoras:** se caracterizan por presentar prodominios cortos y tienen preferencia por ácido aspártico en la posición P4. Los integrantes clásicos de este grupo son las caspasas 3, 6 y 7.

Las caspasas iniciadoras procesan las formas inactivas de las ejecutoras y éstas, una vez activadas, procesan diversos sustratos celulares, que conducen a las distintas vías de la apoptosis (Crawford y Wells, 2011).

Además de mediar en la respuesta inmune (Chowdhury *et al.*, 2008) y de participar en los procesos de muerte celular por apoptosis, las caspasas también regulan el desarrollo embrionario, la homeostasia y la diferenciación celular, los procesos de nucleación asociados a tipos celulares concretos o la espermatogénesis (Yi y Yuan, 2009). Debido a esta diversidad funcional, los sustratos de caspasas son también muy variados (más de 1000). La proteólisis de los mismos hace que puedan perder, ganar o modificar su función o participar en mecanismos de retroalimentación positiva o negativa de la actividad de estas proteasas (Crawford y Wells, 2011).

Tau es sustrato de las caspasas 3 y 6 (Kolarova *et al.*, 2012). Aunque no está claro todavía dónde cortan, innumerables evidencias señalan a la caspasa 3 como la responsable principal de la proteólisis de Tau en el residuo aspártico-421 (Asp-421) (Canu *et al.*, 1998; Fasulo *et al.*, 2000), sitio donde también cortan las caspasas 1, 6, 7 y 8 *in vitro* (Gamblin *et al.*, 2003; Guillozet-Bongaarts *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007b). Caspasa 3 también parece que proteoliza a Tau en su extremo N-terminal, en la posición Asp-25 (Rohn *et al.*, 2002). Por otra parte, caspasa 6 parece cortar a Tau tanto en su extremo N-terminal (Asp-13) como en el C-terminal (Asp-402 y/o Asp-421), (Wang *et al.*, 2007b; Wang *et al.*, 2010; Kolarova *et al.*, 2012).

2.6. Patologías asociadas a Tau

Desde su descubrimiento como proteína asociada a microtúbulos, Tau ha despertado un creciente interés en la comunidad científica. Esto se debe a que esta proteína está implicada en la patogenia de diversos trastornos neurodegenerativos (Avila *et al.*, 2004). Estas enfermedades, denominadas de manera general como tauopatías (**tabla 1**), se caracterizan por el depósito patológico de Tau en células nerviosas como resultado de un metabolismo alterado de la proteína. De entre todas, la tauopatía más estudiada, por su elevada prevalencia en la población, es la enfermedad de Alzheimer, en la que Tau se deposita en forma de agregados intracelulares conocidos como ovillos neurofibrilares (NFTs), cuyo componente fundamental es la proteína hiperfosforilada y proteolizada.

Enfermedad	Isoforma de Tau implicada	Trastorno neurodegenerativo asociado
Enfermedad de Pick	3R	Demencia y síndrome cortical focal
Parálisis supranuclear progresiva	4R	Parkinsonismo atípico
Degeneración corticobasal	4R	Síndrome cortical focal y parkinsonismo
Demencia frontotemporal y parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17)	3R y 4R	Demencia y psicosis
Enfermedad de Alzheimer	3R y 4R	Demencia

Tabla 1. Clasificación de las principales tauopatías.

3. Enfermedad de Alzheimer

En 1906, el psiquiatra y neurólogo alemán Alois Alzheimer expuso de manera pública el primer caso de lo que hoy se conoce, en su honor, como la enfermedad de Alzheimer (EA) (Alzheimer *et al.*, 1907; Alzheimer *et al.*, 1995). La EA es un complejo proceso neurodegenerativo que provoca el deterioro de las células de cerebro, produciendo pérdida de memoria y de las funciones cognitivas del individuo sin que afecte a su estado de consciencia. Es la forma más común de demencia y se caracteriza por un desarrollo lento y gradual que empeora con el envejecimiento, presentándose mayoritariamente en personas de mediana y avanzada edad. Las lesiones específicas de la enfermedad se localizan en

neuronas de áreas bien definidas del cerebro, fundamentalmente en el hipocampo y en la amígdala, aunque pueden extenderse a otras zonas de la corteza cerebral, en particular a los lóbulos frontales (Holtzman *et al.*, 2011). Estas lesiones convergen en un daño oxidativo e inflamatorio, un fallo energético neuronal y en la pérdida de sinapsis.

Desde un punto de vista patológico, la EA se caracteriza por la presencia de placas seniles o amiloides, de NFTs y degeneración axonal en las regiones cerebrales afectadas. Las placas seniles son depósitos extracelulares del péptido β -amiloide que se producen por la proteólisis de la proteína precursora de β -amiloide (PPA). Los NFTs son agregados intracelulares, altamente insolubles, formados principalmente por Tau hiperfosforilada y proteolizada. Por otra parte, aunque la EA claramente produce una pérdida de neuronas en regiones específicas del cerebro, la gran pérdida en el peso y el volumen del cerebro, que se observa en los pacientes con Alzheimer, parece ser debida a la contracción y la pérdida de los procesos neuronales. De hecho, la pérdida de sinapsis y de espinas dendríticas se correlaciona mejor con la pérdida cognitiva observada en la EA, que la pérdida de las neuronas (Querfurth y LaFerla, 2010; Huang y Mucke, 2012).

3.1. Etiopatogénesis

La EA es una enfermedad multifactorial y heterogénea (Iqbal y Grundke-Iqbal, 2008). En la gran mayoría de los casos, la enfermedad probablemente se debe a una combinación de varios factores, como la edad, la genética y factores ambientales que afectan a una o más rutas de señalización celular específicas (Glenner y Wong, 1984; Blennow *et al.*, 2006; Iqbal y Grundke-Iqbal, 2008).

La edad es el principal factor de riesgo. En función de la edad a la que se inicia la enfermedad, la EA se clasifica en presenil o de inicio precoz y la senil o inicio tardío. La EA presenil es extremadamente rara, representa sólo el 2 % de los casos. Se desarrolla entre los 30 y 60 años, tiene una evolución rápida y más de la mitad de los casos tienen un carácter genético. La EA senil aparece después de los 65 años, es la más frecuente, se desarrolla lentamente y en la mayoría de los casos es esporádica.

Desde un punto de vista genético, la EA se divide en EA familiar y esporádica. La EA familiar es rara, sólo está presente entre un 5-10 % de los casos, y en menos del 1 % de los casos la enfermedad está asociada a mutaciones en el gen del precursor de la proteína

amiloide (*APP*), en el gen de la presenilina-1 (*PSEN1* o *PS1*), en el gen de la presenilina-2 (*PSEN2* o *PS2*) y en el gen de la apolipoproteína-E (*APOE*). Se hereda de forma autosómica dominante y produce alteraciones que en la mayoría de los casos coinciden con las encontradas en la EA presenil (Maccioni *et al.*, 2001). La EA esporádica, la cual comienza en personas mayores de 65 años, es el tipo más común.

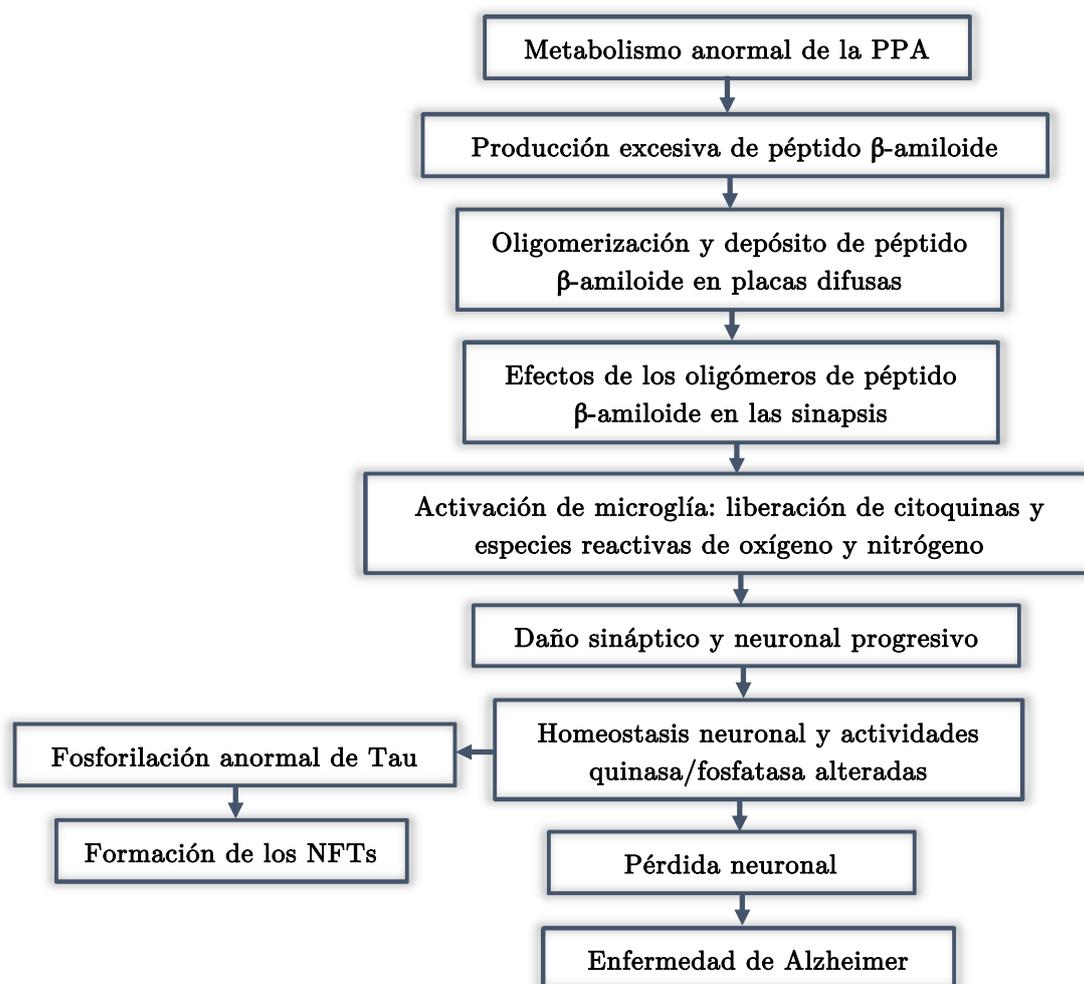
Por otra parte, los factores ambientales y el estilo de vida que afecten al metabolismo cerebral, como por ejemplo, la glucosa, el colesterol y las especies reactivas del oxígeno pueden aumentar el riesgo de desarrollar esta enfermedad (Iqbal y Grundke-Iqbal, 2008).

3.2. Bases moleculares de la enfermedad de Alzheimer

Independientemente de la etiología, de si están implicados factores genéticos o no, la EA se caracteriza por la presencia de placas amiloides en el espacio extracelular y de NFTs en el interior de la neurona. Y en torno a estos agregados proteicos se han propuesto dos hipótesis que tratan de explicar las bases moleculares de la aparición y del desarrollo de la EA.

3.2.1. Hipótesis de la cascada β -amiloide

La cascada β -amiloide fue la primera hipótesis que se propuso para explicar las bases moleculares de la EA. Esta hipótesis postula que el aumento en los niveles y la subsiguiente agregación del péptido β -amiloide es el suceso primario que conduce a la patogénesis de la EA. El resto de los procesos que participan en el desarrollo de la enfermedad, incluida la formación de los NFTs, resultarían del desequilibrio entre la producción y la degradación del péptido β -amiloide (Hardy y Selkoe, 2002), (**Esquema 8**).



Esquema 8.- Hipótesis de la proteína β-amiloide. (Irvine et al., 2008).

Entre las evidencias que apoyan esta hipótesis podemos destacar las siguientes:

- La localización del gen *APP* en el cromosoma 21. Esta evidencia se basa en el hecho de que las personas con síndrome de Down (trisomía del cromosoma 21) desarrollan la EA (Glennner y Wong, 1984).
- La presencia de mutaciones en los genes *APP*, *PS-1* y *PS-2* (Alonso Vilatela et al., 2012; Gerrish et al., 2012).
- Estudios utilizando péptidos β-amiloide sintéticos, han demostrado que éstos son tóxicos en neuronas de hipocampo y corticales *in vivo* e *in vitro* (revisado en Carrillo-Mora et al., 2014).
- Los ratones transgénicos que expresan la proteína PPA mutada humana presentan elevados niveles del péptido β-amiloide en el espacio extracelular y desarrollan cambios neuropatológicos y de comportamiento similares a los vistos en la EA (Schmitz et al., 2004).

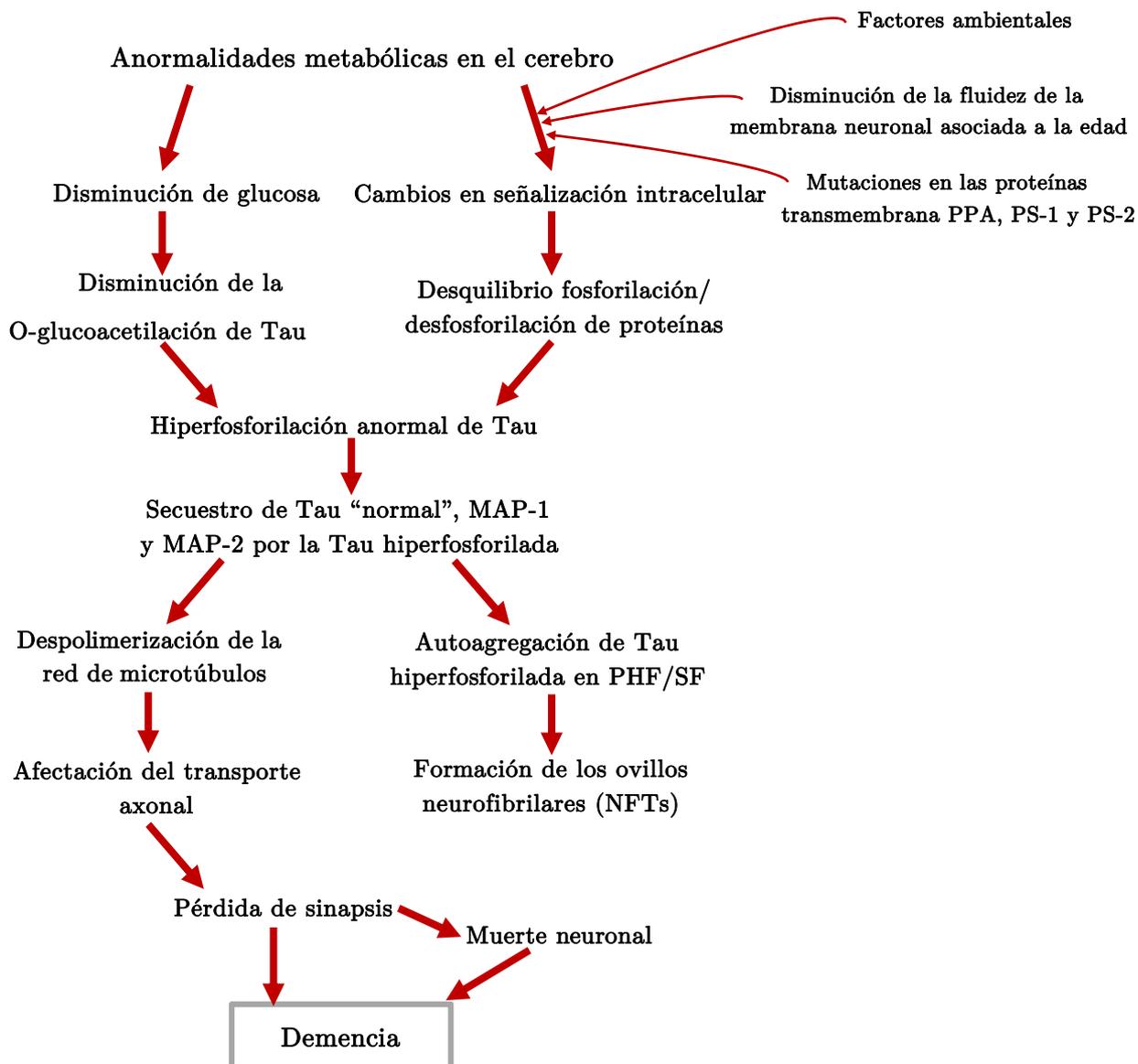
Esta hipótesis podría explicar el origen de la forma familiar y temprana de la EA pero no puede explicar la aparición de la forma esporádica y tardía de la misma. Por otra parte, esta hipótesis es inconsistente con varios hechos, entre los que cabe destacar que cerebros procedentes de autopsias de personas de avanzada edad sanas, contienen placas amiloides similares a las observadas en la EA y que ratones transgénicos que expresan formas mutadas de las proteínas PPA, PS-1 y 2 acumulan múltiples placas amiloides pero no presentan NFTs ni síntomas neurodegenerativos. Además, el déficit cognitivo y los cambios en la plasticidad sináptica se observan en los pacientes mucho antes de la formación de las placas amiloides (Jacobsen *et al.*, 2006) y su reducción con inmunoterapia no mejora los síntomas de la enfermedad de Alzheimer (Spires-Jones y Hyman, 2014).

Por todo ello, varios investigadores sugieren que la cascada del péptido β -amiloide no tiene un papel central en los procesos neurodegenerativos observados en la EA y sostienen que éstos se desencadenan como consecuencia de la toxicidad producida por Tau (Rapoport *et al.*, 2002; Roberson *et al.*, 2007).

3.2.2. Hipótesis metabólica y de cambios en la señalización celular

La EA es una enfermedad multifactorial que puede requerir una predisposición genética y la presencia de uno o más factores ambientales. Por ello, muchos investigadores piensan que la hipótesis de la cascada β -amiloide es muy simplista para explicar el inicio y desarrollo de la EA.

Iqbal y Grundke-Iqbal propusieron la hipótesis metabólica y de señalización celular para explicar las bases moleculares de la EA. Esta hipótesis es consistente con las características patológicas que se observan en la enfermedad, las placas amiloides y los NFTs, y con todos los estudios experimentales realizados en animales transgénicos. Brevemente, esta hipótesis postula que la fluidez de la membrana de la neurona se reduce con la edad. Esto hace que la neurona sea más sensible a cambios metabólicos o ambientales que pueden modificar diferentes rutas de señalización celular y provocar, en última instancia, la hiperfosforilación de Tau. Tau hiperfosforilada es capaz de secuestrar a la proteína Tau fisiológica y a las proteínas MAP-1 y 2 lo que provoca la desestabilización de los microtúbulos, la degeneración progresiva de las neuronas y finalmente la demencia (Alonso *et al.*, 1997; Iqbal y Grundke-Iqbal, 2005, 2008), (**Esquema 9**).

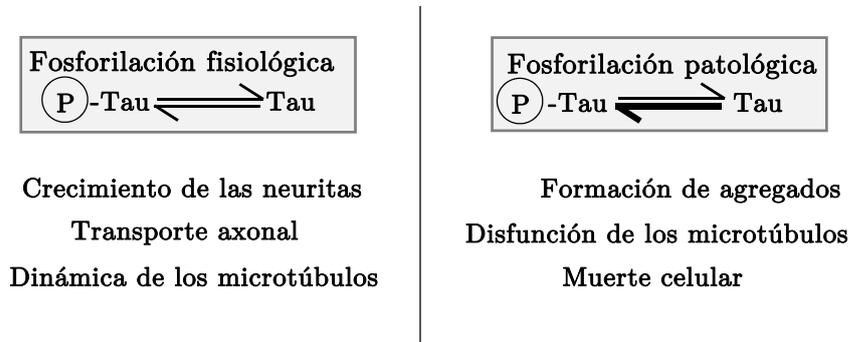


Esquema 9.- Hipótesis de degeneración neurofibrilar. (Iqbal y Grundke-Iqbal, 2008).

3.3. Tau y la enfermedad de Alzheimer

La fosforilación de Tau, en aminoácidos específicos, regula tanto la función fisiológica como la patológica de la proteína. Cuando los niveles de fosforilación de Tau son los adecuados, ésta regula la estabilidad y dinámica de los microtúbulos, el transporte axonal y el crecimiento de las neuritas, entre otros procesos (de Ancos y Avila, 1993; Morris *et al.*, 2011). Sin embargo, en condiciones patológicas, en las que existe un desequilibrio entre la fosforilación y desfosforilación de Tau (se aumenta la actividad de las proteínas quinasas y se reduce la actividad de las proteínas fosfatasas), la hiperfosforilación de Tau promueve la pérdida de unión a los microtúbulos, con la consecuente desorganización de los

mismos y la formación de agregados filamentosos de Tau, e incluso la muerte celular (Johnson y Stoothoff, 2004), (**Esquema 10**).



Esquema 10.- Funciones fisiológicas y patológicas de la fosforilación de Tau. (Johnson y Stoothoff, 2004).

3.3.1. Hiperfosforilación de Tau y degeneración neurofibrilar

La primera descripción de Tau hiperfosforilada como componente mayoritario de los ovillos neurofibrilares se realizó en el año 1986 (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986; Ihara *et al.*, 1986). Hoy en día, aunque se ha avanzado mucho en el conocimiento de estos agregados proteicos, se desconocen los mecanismos moleculares exactos que conducen a su formación, aunque se sabe que es un proceso multietapa que dura varios años.

Las primeras especies anómalas de Tau que se forman en la neurona se corresponden con pequeños agregados proteicos no fibrilares (Maeda *et al.*, 2007). Estas estructuras evolucionan infiltrándose por el soma, y ocasionalmente por el árbol dendrítico proximal, dando lugar a una mezcla de filamentos helicoidales apareados (PHF) y filamentos rectos (SF), que se entrecruzan entre sí para constituir los ovillos neurofibrilares (NFTs), (Iqbal *et al.*, 2010). El núcleo de NFTs está constituido por los dominios de unión a microtúbulos, mientras que la periferia se compone de una capa difusa desestructurada que comprende las regiones amino y carboxilo terminal de las moléculas de Tau (Wischnik *et al.*, 1988a; Wischnik *et al.*, 1988b).

Como se ha mencionado anteriormente, dos de las funciones principales de Tau son promover y mantener la estructura de los microtúbulos, las cuales están reguladas por su grado de fosforilación. Los niveles de Tau total en cerebros sanos o con Alzheimer son prácticamente los mismos, pero los cerebros de los pacientes con Alzheimer contienen del

orden de 4 a 8 veces más proteína Tau anormalmente hiperfosforilada. Aproximadamente el 40 % de Tau hiperfosforilada está presente en el citosol y no formando parte de los PHFs o de los NFTs (Iqbal *et al.*, 2010).

Tau polimerizada en los NFTs es aparentemente inerte, sin embargo, la Tau hiperfosforilada presente en el citosol no sólo es incapaz de unirse a tubulina y de promover el ensamblaje de los microtúbulos, sino que también inhibe el ensamblaje y desorganiza los microtúbulos ya formados. Este efecto se debe a la capacidad que tiene Tau hiperfosforilada de interaccionar y secuestrar a otras moléculas de Tau no hiperfosforiladas y a otras proteínas asociadas a microtúbulos como las MAP-1 y MAP-2 (Iqbal y Grundke-Iqbal, 2008), impidiendo, de esta forma, su función. Estas funciones patológicas de Tau sólo son atribuibles a que la proteína está anormalmente hiperfosforilada, ya que cuando se desfosforila adquiere sus funciones fisiológicas normales. Por otra parte, cuando los NFTs se desfosforilan *in vitro* se produce la disgregación de los mismos y la liberación de una proteína Tau funcional capaz de promover el ensamblaje de los microtúbulos (Wang *et al.*, 1995).

En conclusión, las dos características que posee la proteína Tau anormalmente hiperfosforilada en la EA son su capacidad de secuestrar a las MAPs funcionales y desorganizar los microtúbulos y su capacidad de autoensamblarse para formar los PHFs y los NFTs.

3.3.1.1. Sitios de fosforilación de Tau y Tau quinasas

En la EA, al menos 38 residuos de serina/treonina de Tau están fosforilados. La mayoría se encuentran en la región rica en prolina presente en el dominio de proyección (Thr-181, Ser-199, Ser-202, Thr-205, Thr-231 y Ser-235, entre otros), aunque también se encuentran en la región de unión a microtúbulos (Ser-262) y en las regiones N-terminal (Thr-50 y Thr-69, entre otros) y C-terminal de Tau (Ser-396, la Ser-404 y la Ser-422, entre otros), (Morishima-Kawashima *et al.*, 1995; Hanger *et al.*, 1998; Gong *et al.*, 2005; Wang y Liu, 2008; Hanger *et al.*, 2009). Estudios realizados *in vitro* han mostrado que la fosforilación de Tau en los residuos Ser-262, Thr-231 y Ser-235 inhiben su unión a microtúbulos en un 35 %, 25 % y 10 %, respectivamente (Sengupta *et al.*, 1998). Otras investigaciones señalan que los aminoácidos Thr-181, Ser-199, Ser-202, Thr-205, Thr-212, Thr-231, Ser-235, Ser-356 y Ser-422 son los sitios claves de fosforilación que convierten a

Tau es una molécula inhibitoria que secuestra otras MAPs para formar los depósitos insolubles y que los residuos Ser-396 y Ser-404 fosforilados promueven la agregación en filamentos (Alonso *et al.*, 2001).

Todavía no se sabe muy bien qué proteínas quinasas contribuyen a la fosforilación patológica de Tau, aunque pueden ser las mismas que producen su fosforilación fisiológica (Morishima-Kawashima *et al.*, 1995, Hanger *et al.*, 1998). Entre estas quinasas, la GSK-3, la cdk-5 y las MAPKs son las grandes candidatas ya que se encuentran en elevadas concentraciones en cerebros con EA, están presentes en todas las fases de la patología neurofibrilar (Drewes *et al.*, 1992; Pei *et al.*, 1998; Pei *et al.*, 1999) y colocalizan con las placas de amiloide y con los NFTs (Allen *et al.*, 2002; Savage *et al.*, 2002). Algunos autores han relacionado la activación de las ERK 1/2 con la hiperfosforilación de la proteína Tau (Buee *et al.*, 2000; Ferrer *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2011). Tau es un sustrato *in vitro* de estas quinasas (Drewes *et al.*, 1992) y se sabe que el residuo Ser-422 puede ser fosforilado *in vitro* por ERK-2, pero no por GSK-3 β (Hasegawa *et al.*, 1996). Las ERK 1/2 fosforiladas, y por tanto activas, colocalizan con los depósitos tempranos neurofibrilares en regiones específicas de cerebros de pacientes de Alzheimer (Pei *et al.*, 2002). Por otra parte, se ha sugerido que uno de los mecanismos que explicaría la acción toxica del péptido β -amiloide en neuronas del hipocampo estaría mediado por la activación secuencial de ERK 1/2 y de la caspasa 3 (Chong *et al.*, 2006). Además, en el mismo modelo celular y en respuesta al mismo estímulo, la fosforilación de los residuos Ser-199/Ser-202 de Tau está mediada por la ruta de ERK 1/2 y es parcialmente responsable de los fenómenos de degeneración que se observan en las células tratadas con el péptido β -amiloide (Rapoport y Ferreira, 2000).

La proteína Tau es sustrato de las p38 MAPKs, y se fosforila *in vitro* por los miembros de esta familia de quinasas en residuos que se encuentran hiperfosforilados en los PHFs (Reynolds *et al.*, 1997; Goedert *et al.*, 1997a). Además de ser mejor sustrato de las isoformas p38 γ y p38 δ , la fosforilación mediada por estas dos quinasas reduce la capacidad de Tau para promover el ensamblaje de microtúbulos *in vitro* (Goedert *et al.*, 1997a). Existen trabajos en los que se demuestra que en modelos celulares transfectados con Tau y con las correspondientes quinasas activas, éstas fosforilan a Tau en respuesta a estrés hiperosmótico (Jenkins *et al.*, 2000; Buee-Scherrer y Goedert, 2002). En células de neuroblastoma, la

sobreexpresión de p38 γ , pero no de las demás isoformas, induce la fosforilación de Tau, a la vez que disminuye la cantidad de Tau unida al citoesqueleto y aumenta la soluble (Jenkins *et al.*, 2000). Adicionalmente, se ha descrito que el residuo Thr-50 de Tau es fosforilado por la isoforma p38 δ en respuesta a estrés hiperosmótico, resultando esta modificación en un incremento de la capacidad de Tau para promover la polimerización de tubulina tanto *in vitro* como *in vivo* (Feijoo *et al.*, 2005).

Se ha puesto de manifiesto en diversos estudios que la implicación de la ruta de JNK en la regulación de la fosforilación de Tau. Se sabe que Tau es susceptible de ser fosforilada *in vitro* por diferentes isoformas de esta familia de proteínas (Reynolds *et al.*, 1997; Goedert *et al.*, 1997a; Yoshida *et al.*, 2004). El resultado funcional de este fenómeno es la disminución de su capacidad de promoción del ensamblaje de los microtúbulos (Yoshida *et al.*, 2004). Trabajos realizados tanto en modelos celulares de neuronas de hipocampo como en un modelo de ratón de EA *in vivo* han demostrado que estas quinasas están implicadas en la fosforilación de los residuos Ser-202/205 y Ser-422 de Tau (Vogel *et al.*, 2009; Ploia *et al.*, 2011).

3.3.2. Proteólisis de Tau por caspasas y degeneración neurofibrilar

Aunque el principal componente antigénico presente en los PHFs es la proteína Tau hiperfosforilada (Iqbal *et al.*, 2010), diversos estudios muestran que los NFTs también contienen a Tau proteolizada o truncada (Gamblin *et al.*, 2003; Garcia-Sierra *et al.*, 2008). Las moléculas proteolizadas de Tau aumentan la capacidad de ésta para agregarse (Berry *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2011), lo que sugiere que la proteólisis de Tau podría representar un mecanismo para acelerar la formación de este tipo de agregado protéico en la neurona.

Los mecanismos moleculares responsables de la proteólisis de Tau en la EA todavía no han sido dilucidados pero varias investigaciones muestran que las caspasas, principalmente la caspasa 3 y la caspasa 6, juegan un papel muy importante en este proceso (Troy *et al.*, 2011; LeBlanc, 2013). La caspasa 3 corta a Tau en los residuos Asp-25 y Asp-421 (Canu *et al.*, 1998; Fasulo *et al.*, 2000), mientras que la caspasa 6 lo hace principalmente en los residuos Asp-13 y Asp-402 (Guo *et al.*, 2004; Rohn *et al.*, 2008) aunque también puede cortar a Tau en el residuo Asp-421 (Gamblin *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007b).

Pero más importante que los sitios de corte, es el hecho de que la activación de las caspasas y la proteólisis de Tau es un evento temprano del proceso neurodegenerativo que puede explicar la patofisiología de la EA (Gamblin *et al.*, 2003; Rissman *et al.*, 2004; Troy *et al.*, 2011; LeBlanc, 2013). De hecho, se ha hipotetizado que la activación de las caspasas, en respuesta al péptido β -amiloide, puede inducir la proteólisis de Tau en el residuo Asp-421 y la formación de los NFTs en pacientes con EA (Gamblin *et al.*, 2003; Rissman *et al.*, 2004).

Diferentes estudios realizados en modelos animales apoya el papel que juegan las caspasas en la formación de los agregados de Tau. Así, la sobreexpresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 en neuronas del SNC de ratones 3xTg-AD (modelo animal que se caracterizan por la formación secuencial de lesiones del tipo de los depósitos del péptido β -amiloide, seguida por alteraciones en el estado de fosforilación de Tau) previene la activación de caspasas, la proteólisis de Tau a la vez que mejora la memoria espacial en los ratones (Rohn *et al.*, 2008). Por otra parte, utilizando ratones rTg4510 (modelo animal de tauopatía que cursa con el depósito de NFTs) se ha visto que la activación de las caspasas es previa a la proteólisis de Tau y al desarrollo de los NFTs (de Calignon *et al.*, 2010). En el mismo artículo, estos autores también encontraron que la forma truncada de Tau promovía la nucleación de agregados de la proteína, tras expresar ésta en ratones silvestres. Estos trabajos, junto con el hecho de que las neuronas que contienen NFTs son viables por largos periodos de tiempo (de Calignon *et al.*, 2009), sugiere que la formación de agregados de Tau es más una consecuencia que una causa de la neurodegeneración.

Si se tiene en cuenta que las neuronas que presentan NFTs son perfectamente viables, y que los agregados permanecen a pesar de la inactivación de las caspasas, no es arriesgado aventurar que la aparición de este tipo de estructuras en la neurona tiene una función protectora más que tóxica. El efecto tóxico sucedería con el paso del tiempo, al alcanzar estados celulares en que los agregados proteicos ocuparan gran parte del citoplasma y dejaran poco espacio para el desarrollo adecuado de las funciones de los diferentes orgánulos.

4. Neuroinflamación y Enfermedad de Alzheimer

La neuroinflamación se define como la activación del sistema inmune innato en el cerebro. Suele ser una respuesta secundaria, ya que en la mayoría de las ocasiones se desencadena después de haberse producido un daño en el cerebro, y su función principal es la de proteger al SNC de agentes infecciosos, de daños e incluso de enfermedades (Akiyama *et al.*, 2000; Zhang y Jiang, 2015). Está bien establecido que la neuroinflamación participa en el desarrollo de varias enfermedades neurológicas y neurodegenerativas. En estas últimas, el daño se produce principalmente como consecuencia de una respuesta inflamatoria que se vuelve crónica (Amor *et al.*, 2010).

Existe una amplia bibliografía que evidencia que la neuroinflamación, junto con los depósitos amiloides y los NFTs, contribuye activamente a la progresión de la EA y a su cronicidad. En esta enfermedad, la neuroinflamación se caracteriza por ser una respuesta compleja que implica una serie de cambios celulares y moleculares, el reclutamiento de células inmunes periféricas, la inducción de varias rutas de señalización intracelular y la liberación de diferentes mediadores inflamatorios en el cerebro (Akiyama *et al.*, 2000; Heneka *et al.*, 2010; Hensley, 2010; Zilka *et al.*, 2012; Meraz-Rios *et al.*, 2013; Zhang y Jiang, 2015).

4.1. Mediadores celulares de la neuroinflamación en la EA

La respuesta inflamatoria en la EA se caracteriza por la presencia de microglía activada y de astrocitos reactivos que se encuentran localizados principalmente alrededor de las placas amiloides (Kitazawa *et al.*, 2005; Heneka *et al.*, 2010; Meraz-Rios *et al.*, 2013). Por ello se piensa que estas placas son las que desencadenan la respuesta inmune al ser consideradas como sustancias extrañas en el cerebro.

El papel que juega la activación de la microglía en la EA es controvertido. Por una parte, algunos estudios muestran que la microglía activada, y también los astrocitos reactivos, contienen fragmentos del péptido β -amiloide, lo que sugiere que estas células podrían fagocitar el péptido amiloide y contrarrestar, de esta forma, el depósito del mismo (Bolmont *et al.*, 2008). Pero otras publicaciones sugieren que la presencia de los fragmentos de amiloide en la microglía activada es consecuencia del propio procesamiento de la PPA, por lo que la microglía podría facilitar la formación, el depósito y la maduración de las placas

amiloides (Wegiel *et al.*, 2001). Por ello, y teniendo en cuenta todos los estudios, se ha propuesto una hipótesis que sugiere que la activación de la microglía puede tener un papel dual en la EA. Así, en etapas tempranas de la enfermedad, la activación de la microglía podría tener un papel beneficioso, ya que retrasaría la progresión de la enfermedad por su capacidad de eliminar a los péptidos β -amiloide antes de que se formen las placas amiloides, y en etapas tardías, la activación crónica de la microglía causaría un efecto perjudicial por promover el depósito de las placas amiloides y la formación de los NFTs, como se describirá más adelante.

Aunque la activación de la microglía ocurra, sin lugar a dudas, en respuesta a la formación de las placas de amiloide, se cree que los péptidos β -amiloide, e incluso la propia PPA son potentes activadores de la microglía (Dickson *et al.*, 1993; Barger y Harmon, 1997), y que el bloqueo del gen *APP* y de sus productos proteolíticos retrasa y disminuye la activación de la misma (DeGiorgio *et al.*, 2002). Además, se ha demostrado que la activación de la microglía en ratones transgénicos precede a la formación de las placas amiloides (Heneka *et al.*, 2005). Por lo tanto, todavía se desconoce si el depósito de las placas amiloide es un requisito imprescindible para la activación de la microglía o si ésta puede ser inducida por moléculas β -amiloide solubles y tóxicas.

4.2. Mediadores moleculares de la neuroinflamación en la EA

Una vez estimulada, la microglía produce y libera una gran variedad de mediadores inflamatorios entre los que cabe destacar los factores del complemento, las quimioquinas y las citoquinas (Heneka *et al.*, 2010; Meraz-Rios *et al.*, 2013).

El sistema del complemento es un importante efector de la respuesta inmune innata y adaptativa. Está formado por varias proteínas y proteasas que se activan en cascada y su función principal es la de destruir a agentes extraños y asistir al proceso de fagocitosis (McGeer y McGeer, 2002). En la EA, existe una asociación entre las proteínas del complemento con las placas amiloide y los NFTs (Webster *et al.*, 1997). Su función puede ser protectora, como ya se ha explicado antes, puesto que su activación protege de la toxicidad inducida por el péptido β -amiloide y promueve la eliminación de las placas amiloides o perjudicial ya que promueve la inflamación crónica pudiendo afectar la integridad de las neuronas (Meraz-Rios *et al.*, 2013).

Las quimioquinas son proteínas pequeñas cuya función principal es la de atraer células inflamatorias (monocitos, macrófagos y linfocitos, entre otros) a los sitios en los que se requiere una respuesta inflamatoria. Entre las evidencias que muestran la participación de las quimioquinas en la EA se encuentra la presencia de proteínas quimiotácticas MCP-1 o CCL-2 y de los receptores de quimioquinas CCR-3 y CCR-5 en la microglía activada que rodea a las placas amiloide en pacientes con EA (Ransohoff, 2009). Distintos trabajos muestran que las quimioquinas pueden contribuir a la inflamación crónica asociada a las placas amiloides y a la progresión de la neurodegeneración, ya que contribuye a la formación de los NFTs (Zilka *et al.*, 2012).

Las citoquinas son pequeñas proteínas solubles que median la respuesta inflamatoria. Ensayos realizados con cerebros y líquidos cefalorraquídeos de pacientes con EA ponen de manifiesto la presencia de elevados niveles de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , la IL-1 α , la IL-6, el TNF- α y el TGF- β (Akiyama *et al.*, 2000; Amor *et al.*, 2010; Solito y Sastre, 2012). El aumento en los niveles de estas citoquinas está fuertemente relacionado con la activación de la microglía en respuesta a agregados del péptido β -amiloide (Meda *et al.*, 1999).

Aunque son numerosas las citoquinas proinflamatorias presentes en la EA, cada una de ellas tiene una función patológica diferente. IL-1 β puede regular el procesamiento de la proteína PPA y promover la formación del péptido β -amiloide y la degeneración neuronal (Goldgaber *et al.*, 1989; Rogers *et al.*, 1999; Blasko *et al.*, 2000; Liao *et al.*, 2004). Además, induce la fosforilación de Tau y la formación de los NFTs (Sheng *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2003). Al igual que la IL-1 β , la IL-6 induce la expresión de la PPA (Ringheim *et al.*, 1998), y contribuye a la formación de los NFTs induciendo la fosforilación de Tau (Quintanilla *et al.*, 2004). Sin embargo, estudios realizados en modelos animales sugieren que la sobreexpresión de IL-6 promueve la eliminación del péptido β -amiloide (Chakrabarty *et al.*, 2010). Por último, TNF- α es una citoquina que puede tener efectos beneficiosos y perjudiciales para las neuronas. Esta citoquina estimula el factor de transcripción NF- κ B, que induce la expresión de moléculas inflamatorias y promueve la síntesis de factores de supervivencia neuronal (Wajant *et al.*, 2003; Chu, 2013). Por otra parte, puede estimular la liberación de glutamato que induce excitotoxicidad y, en consecuencia, el desarrollo de

enfermedades neurodegenerativas (Takeuchi *et al.*, 2006). En la EA, el efecto directo de esta citoquina dual no se ha definido, aunque podría promover el procesamiento de la PPA y activar las vías de señalización que fosforilan a Tau (Blasko *et al.*, 2000; Liao *et al.*, 2004; Sabio y Davis, 2014).

Además de los mediadores inflamatorios descritos anteriormente, la microglía activada libera especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ROS/RNS). Este proceso puede agravar aún más el proceso neurodegenerativo, ya que el estrés oxidativo contribuye a la neuropatología inducida por el péptido β -amiloide (Kitazawa *et al.*, 2005; Solito y Sastre, 2012).

4.3. Neuroinflamación y Tau en la EA

La relación entre la neuroinflamación y la patología asociada con la proteína Tau está ampliamente aceptada, dado que la distribución de la microglía activada coincide con la presencia de los NFTs (Cras *et al.*, 1991; Overmyer *et al.*, 1999; Sheffield *et al.*, 2000; Zilka *et al.*, 2012). Además, el número de astrocitos reactivos aumenta de forma paralela al de los NFTs. Estos hallazgos sugieren que la activación de la microglía y la presencia de los astrocitos reactivos pueden estar implicadas en la respuesta inmune dirigida por la patología de Tau (Sheng *et al.*, 1997). Asimismo es importante señalar que estas células inmunes están presentes en los NFTs extracelulares, lo que apunta a que puedan estar relacionadas con la degradación de los filamentos de Tau (Cras *et al.*, 1991). Por otra parte, la relación que existe entre la microglía activada y los depósitos de Tau también ha sido claramente establecida en modelos de ratones transgénicos que expresan diferentes versiones mutadas de Tau humana (Zilka *et al.*, 2012).

Pero a pesar de estas pruebas, las relaciones precisas que existen entre Tau y la neuroinflamación están aún por determinar. La presencia de microglía activada asociada a los NFTs indica que éstos podrían causar la neuroinflamación. Pero algunos autores muestran que la presencia de microglía activada precede a la formación de los NFTs, lo que podría indicar que estas células favorecerían el desarrollo de los NFTs (Akiyama *et al.*, 2000; Yoshiyama *et al.*, 2007; Eikelenboom *et al.*, 2010; Maphis *et al.*, 2015). La presencia de elevadas concentraciones de citoquinas en los cerebros de pacientes con EA puede responder, en parte, a qué proceso ocurre primero: la neuroinflamación o la patología

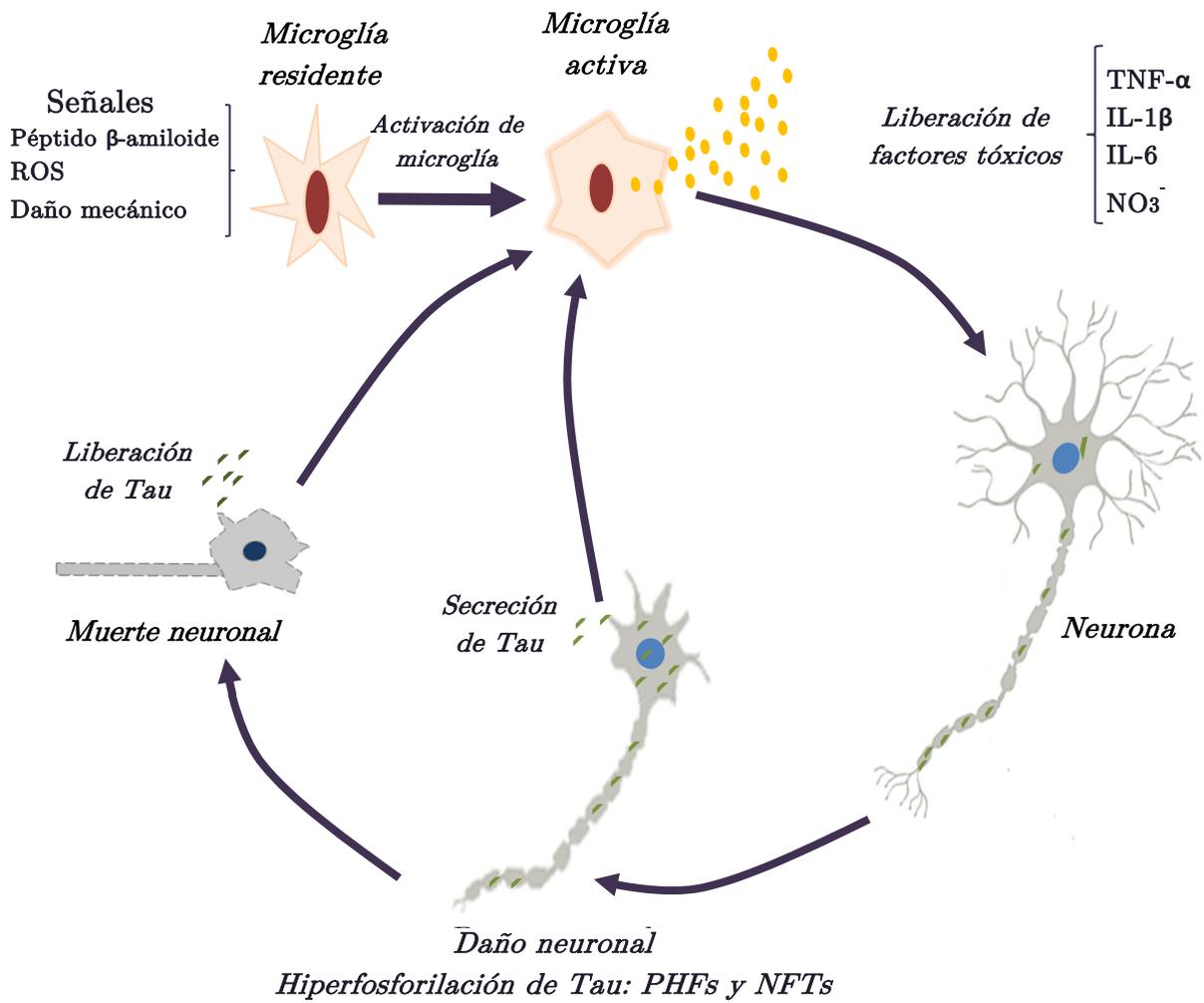
asociada a Tau. Trabajos *in vivo* y *ex vivo* han demostrado que las citoquinas pueden inducir, de forma significativa, las modificaciones patológicas que sufre la proteína Tau. Este hecho fue puesto de manifiesto por primera vez por Li y colaboradores que mostraron que la IL-1 inducía la fosforilación de Tau en cultivos primarios de neuronas corticales (Li *et al.*, 2003). Investigaciones posteriores mostraron que el óxido nítrico y la IL-6 también inducen la fosforilación de Tau en cultivos de neuronas (Quintanilla *et al.*, 2004; Saez *et al.*, 2004). Por otra parte, estudios *in vivo* muestran que, tanto la inyección de lipopolisacárido (LPS) en la corteza frontal y el hipocampo de ratones transgénicos rTg4510 (Kitazawa *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2010), como la expresión de TNF- α en el cerebro de ratones 3xTg-AD (Janelins *et al.*, 2008), inducen la activación de la microglía y la hiperfosforilación de Tau. En base a estos y otros estudios se ha propuesto que la respuesta inmune proinflamatoria puede amplificar la fosforilación de Tau y en consecuencia acelerar la formación de los NFTs.

Se ha postulado que la proteína Tau intracelular puede ser liberada al espacio extracelular cuando la neurona degenera (Gomez-Ramos *et al.*, 2006). Sin embargo, recientemente se ha indicado que Tau puede ser liberada al fluido intersticial cerebral en ausencia de neurodegeneración (Yamada *et al.*, 2011). Diversas investigaciones sugieren que la proteína Tau extracelular soluble puede promover neurotoxicidad (Gomez-Ramos *et al.*, 2006; Gomez-Ramos *et al.*, 2008; Gomez-Ramos *et al.*, 2009), aumentar los niveles de calcio intracelular a través de los receptores muscarínicos M1 y M3 (Gomez-Ramos *et al.*, 2008), causar deterioro sináptico (Moe *et al.*, 2009) e inducir daño en la barrera hematoencefálica (Kovac *et al.*, 2009). Además, se ha mostrado que formas truncadas de Tau son capaces de activar la respuesta inmune innata a través de la activación de la ruta de las MAPKs, ya que induce la liberación de óxido nítrico y de citoquinas proinflamatorias en cultivos mixtos de astrocitos y microglía (Kovac *et al.*, 2011).

En conjunto, y a la vista de todos los estudios publicados hasta el momento, se puede decir que la proteína Tau soluble es capaz de inducir una respuesta inmune innata a través de la activación de la ruta de las MAPKs y que, de forma simultánea, la transformación patológica de Tau puede ser regulada por la microglía activada a través de las mismas rutas de señalización celular.

5. La hipótesis de Tau en la Enfermedad de Alzheimer

Basados en diferentes trabajos, Maccioni y colaboradores han propuesto una hipótesis que puede explicar las bases moleculares de la enfermedad de Alzheimer. Esta hipótesis está construida sobre la base de que Tau es el efector final de la ruta. Estos autores postulan que diferentes señales que causan daño celular, entre las que se puede encontrar a los péptidos β -amiloide, agentes oxidativos, trastornos del metabolismo lipídico, hiperglicemia, desregulación de los niveles de insulina, infecciones crónicas o trauma cerebral, pueden activar el sistema inmune innato. Las células gliales activadas sintetizan y liberan moléculas inflamatorias, como las citoquinas, que conducen, por una parte a la inflamación del cerebro y a graves alteraciones en los patrones de interacción neurona-glía y, por otra, a la activación anómala de rutas de señalización celular que conducen a la hiperfosforilación de Tau. Esta modificación en Tau promueve su oligomerización y la producción, a largo plazo, de los NFTs. Como resultado de la muerte neuronal, las formas oligoméricas de Tau y los filamentos de Tau se liberan al espacio extracelular contribuyendo a la activación de la microglía (inflamación crónica) que conduce a la progresiva degeneración neuronal (Maccioni, *et al.*, 2010). Esta hipótesis se podría completar con los estudios recientes que indican que la proteína Tau soluble puede ser secretada por las neuronas y promover la activación de la microglía (**Esquema 11**).



Esquema 11.- Hipótesis de Tau en la enfermedad de Alzheimer. (Maccioni et al., 2010).

II. Objetivos

Tal y como se ha expuesto en la Introducción, diferentes estreses celulares y la neuroinflamación juegan un papel importante en el inicio y el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, ya que, entre otros cambios, provocan modificaciones postraduccionales en la proteína Tau y en consecuencia, alteran su función fisiológica normal. Pero, el efecto directo que tiene el estrés osmótico y el inflamatorio en las células neuronales ha sido poco estudiado.

El objetivo general del presente trabajo ha sido profundizar en el estudio de los efectos que tienen los estreses osmótico e inflamatorio sobre la proteína Tau y su posible relación con la muerte neuronal.

Bajo esta perspectiva, los objetivos concretos que se plantearon fueron:

- Analizar el mecanismo implicado en la proteólisis de Tau y en la muerte neuronal inducida por el estrés hiperosmótico en las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.
- Estudiar el efecto del estrés hiperosmótico e inflamatorio sobre la expresión, fosforilación, localización intracelular y función de Tau en las células SH-SY5Y.
- Determinar las vías de señalización intracelular implicadas en la fosforilación residuo-específica de la proteína Tau en las células SH-SY5Y.
- Caracterizar los efectos de la fosforilación específica de los residuos Thr-50 y Thr-69 en la función de Tau en células HEK-293 y PC-12 diferenciadas.

Objectives

We have already described that different cellular stresses and neuroinflammation play a key role in the onset and development of Alzheimer's disease by promoting posttranslational modifications in the Tau protein and, consequently, its malfunction. Though, the direct effects of osmotic stress and inflammation on neurons are little known.

The aim of this work was to study the effects of osmotic stress and inflammation on Tau protein and their likely association with cell death.

Under this perspective, the specific objectives were:

- To analyze the mechanism involved in Tau proteolysis and neuronal death induced by hyperosmotic stress in SH-SY5Y neuroblastoma human cells.
- To study the effect of both hyperosmotic stress and inflammation on expression, phosphorylation, intracellular location and function of Tau protein in SH-SY5Y cells.
- To determine the intracellular signaling pathways implicated in Tau specific-site phosphorylation in SH-SY5Y cells.
- To characterize the effects of the phosphorylation at Thr-50 and Thr-69 on Tau functions in HEK-293 cells and PC-12 differentiated cells.

III. Materiales y Métodos

A. Materiales

A.1. Productos y reactivos generales

- El compuesto inductor de estrés D-sorbitol se obtuvo de *Sigma-Aldrich*, TNF- α (Factor de Necrosis Tumoral- α) de *Prepo-Tech*, PMA (forbol 12-miristato13-acetato) de *Calbiochem* y LPS (lipopolisacárido prodecente de *E. coli* 055:B5) y AR (ácido retinioco *all-trans*) también de *Sigma Aldrich*.

- Los inhibidores farmacológicos, U0126 (que inhibe la MEK 1/2) y el Péptido Inhibidor I forma (L) de las JNKs fueron suministrados por *Calbiochem* (La Jolla, CA, USA) o por *Selleck Chemicals*. El inhibidor de las p38 MAPKs BIRB0796 fue amablemente cedido por la Dr. Ana Cuenda (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid).

- Los inhibidores farmacológicos Z-DEVD-fmk (que inhibe caspasa 3), Z-DEIV-fmk (inhibidor de caspasa 6) y Z-VAD-fmk se obtuvieron de *Calbiochem* o *Bio Vision*.

- Los sustratos fluorogénicos Ac-DEVD-AMC (sustrato de caspasa 3) y el Ac-DEIV-AFC (sustrato de caspasa 6) fueron administrados por *BD Biosciences*.

- Los anticuerpos primarios y secundarios fueron suministrados por diferentes casas comerciales, ver detalles en las tablas 2.2-2.5.

- El resto de los reactivos y productos utilizados (sales, ácidos y bases inorgánicos, solventes orgánicos, detergentes, etc.) fueron de la máxima pureza disponible y se adquirieron de diferentes casas comerciales.

A.2. Materiales, reactivos y productos utilizados en los cultivos celulares

- Los medios de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) y RPMI 1640 se obtuvieron de *Sigma-Aldrich*. El medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) sin rojo fenol fue de *Gibco, Life Technologies*.

- Material de plástico estéril para cultivos celulares: frascos de 75 cm², placas de cultivo de 10, 35, 60 y 100 mm de diámetro y placas de microscopía “Lab-Tek II Chamber Slide System, Glass, 4-Well”, fue proporcionado por *Nunc Thermo Fischer*.

- Material de plástico de uso rutinario: tubos estériles de 1, 5, 2, 15 y 50 ml, puntas de pipetas, espátulas, guantes, etc. fue suministrado por *Thermo Fisher Scientific*.

- Las soluciones empleadas se esterilizaron por filtración (filtros Millex[®]-6S de 0,22 µm de *Millipore*), mientras que el material sólido se esterilizó en autoclave Selecta Presoclave 75 de *P-SELECTA*.

B. Métodos

1. Líneas celulares

1.1. Línea celular SH-SY5Y

La línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y es una sub-línea celular derivada de la triple clonación de las células SK-N-SH procedentes de una biopsia de médula espinal de un paciente con neuroblastoma (Biedler *et al.*, 1973). Estas células conservan propiedades bioquímicas y funcionales propias de las neuronas, como las actividades enzimáticas tirosina- y dopamina-hidroxilasa, la expresión de proteínas de los neurofilamentos o receptores de factores de crecimiento nervioso (Ciccarone *et al.*, 1989). Además, como proceden de células inmaduras neoplásicas presentan características de células madre, pudiéndose diferenciar a neuronas maduras con ácido retinoico (Sidell, 1982; Redfern *et al.*, 1995), ésteres de forbol (Pahlman *et al.*, 1981), factores neurotróficos (Jensen, 1987) o estaurosporina (Jalava *et al.*, 1992), entre otros compuestos (Jalava *et al.*, 1990; Xie *et al.*, 2010). La diferenciación por ácido retinoico *all-trans* (AR) provoca que las SH-SY5Y detengan su proliferación en la fase G1 del ciclo celular, induce la extensión y prolongación de neuritas, la formación de sinapsis con células próximas, la expresión de proteínas específicas de neuronas y de genes asociados a ciclo y morfología celulares (LoPresti *et al.*, 1992; Encinas *et al.*, 2000). Dado que las células de neuroblastoma diferenciadas *in vitro* presentan un fenotipo neural, tanto morfológicamente como funcionalmente, son consideradas como un modelo útil para estudiar la fisiología y patología nerviosa (Pahlman *et al.*, 1995; Jamsa *et al.*, 2004).

1.1.1. Mantenimiento y división de las células para los experimentos

Las células, que crecen en monocapa, se cultivaron en el medio comercial Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient mixture F-12 Ham (DMEM/F12-Ham), suplementado con un 15 % de suero fetal bovino (FBS), 2 mM glutamina, 100 U/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomycin y 1 % una solución de aminoácidos no esenciales. Se mantuvieron en frascos de cultivo de 75 cm² en un incubador a 37 °C y una atmósfera humidificada con el 5 % de CO₂. Cuando alcanza una densidad cercana al 80-90 %, cada 48-72 h, se procedió a la división de los cultivos. La división comenzó retirando el medio de

de cada frasco y lavando las células con tampón fosfato salino (PBS: Na_2HPO_4 9,1 mM, NaH_2PO_4 1,7 mM y NaCl 150 mM). A continuación se añadió 1 ml de una solución de tripsina-EDTA (tripsina 0,05 % y EDTA 0,02 % en PBS). La tripsina es una serínproteasa utilizada para separar las células del frasco e individualizarlas, ya que proteoliza las proteínas de adhesión celular implicadas en las interacciones célula-sustrato y célula-célula. Una vez despegadas las células, se neutraliza el efecto de la tripsina incorporando 10 ml de medio completo. La suspensión celular se centrifugó durante 5 minutos a temperatura ambiente a 150 g. Terminada la centrifugación, se retiró el sobrenadante y las células se disgregaron en medio completo. Para el mantenimiento de la línea celular, la suspensión celular se diluyó a la mitad con medio completo y se permitió su propagación en frascos nuevos hasta que volvieron a alcanzar la densidad crítica para su división.

Para la realización de los experimentos, se calculó las células utilizando para ello el contador de células automático, y se sembraron a una densidad de 8.000-10.000 células/cm² por placa. Se utilizaron placas de diferente tamaño en función del experimento que se iba a realizar.

1.1.2. Diferenciación de las células SH-SY5Y inducida por ácido retinoico

Los experimentos que se presentan en el segundo capítulo de este trabajo se realizaron en células SH-SY5Y diferenciadas con ácido retinoico (AR).

Con objeto de fijar las condiciones experimentales, las células se trataron con 10 μM AR durante diferentes períodos de tiempo (24-96 horas). Al final de cada exposición, la morfología de las células se observó a través de un microscopio invertido de contraste de fases haciendo, a continuación, fotografías de las mismas. Por otra parte, también se analizaron los niveles de expresión y de fosforilación de los neurofilamentos pesados (NF-H) y medios (NF-M) mediante Western blot, ya que el aumento de los mismos marca la diferenciación neuronal (Carden *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1987).

Como se puede observar en la figura 0.1, el AR indujo la diferenciación de las células a un fenotipo neuronal que se puso de manifiesto por la aparición y el aumento de la longitud de las neuritas/prolongaciones celulares (Pahlman *et al.*, 1995). El efecto del AR se observó a partir de las 24 h y se hizo más patente y máximo a las 48 h.

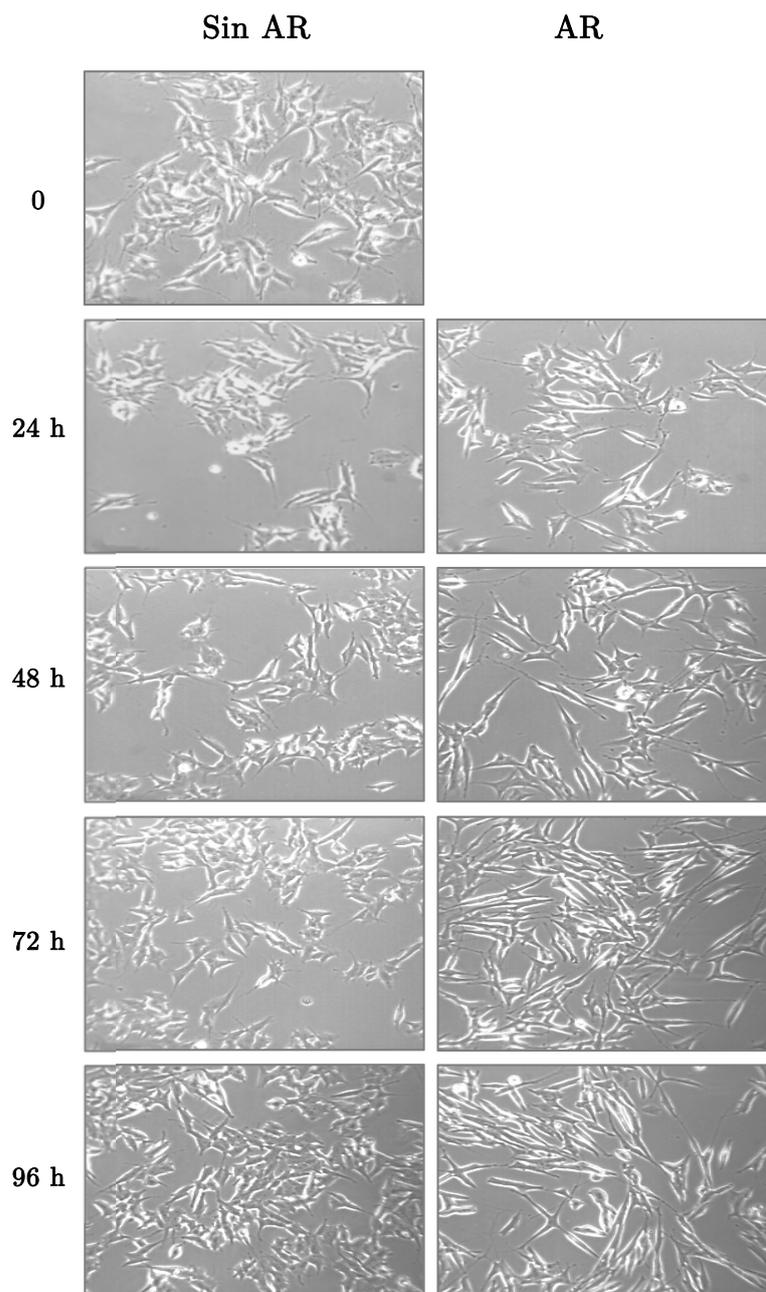


Figura 0.1.- Diferenciación de las células SH-SY5Y inducida por ácido retinoico. Las células SH-SY5Y se crecieron en DMEM medio completo durante 24 h, tras lo cual se incubaron en ausencia o presencia de 10 μ M de AR durante 24, 48, 72 y 96 h. El medio se renovó cada 48 h. La morfología celular se observó a través de un microscopio óptico de contraste de fases, tras lo cual se realizaron fotografías. Las células se observaron bajo una ampliación de 100x.

En la figura 0.2 se puede observar que los niveles de expresión y de fosforilación de NF-H aumentan en función del tiempo de exposición a AR, llegando a ser máximos después de 48-72 horas de tratamiento.

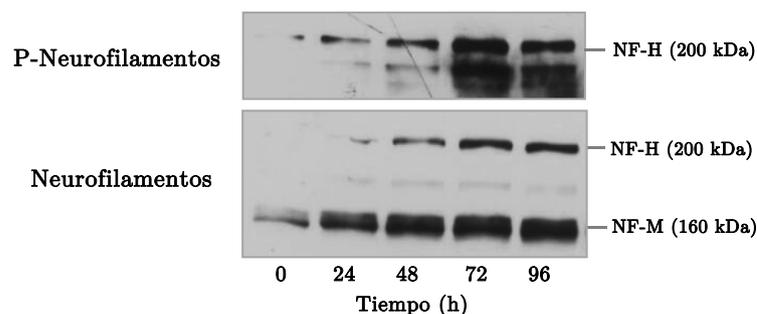


Figura 0.2.- La expresión y la fosforilación de los neurofilamentos pesados (NF-H) y medios (NF-M) depende del estado de diferenciación de las neuronas. Las células SH-SY5Y se trataron con 10 μ M de ácido retinoico durante los tiempos indicados en la figura. Tras el experimento, las células se lisaron y cantidades iguales de proteína se analizaron mediante Western blot. En la figura se muestra un blot representativo de 2 experimentos independientes. P-Neurofilamentos: fosfo-neurofilamentos.

A la vista de estos resultados, se decidió realizar los experimentos después de tratar a las células durante 48 h con AR.

1.2. Línea celular U937

En el segundo capítulo de la tesis también se ha utilizado la línea celular U937 para obtener los medios condicionados ricos en citoquinas. Esta línea se estableció a partir de una efusión (acumulación de líquido) pleural de un hombre de mediana edad con linfoma histiocítico difuso. De linaje mielomonocítico, estas células se han utilizado como modelo para estudiar el comportamiento y la diferenciación de los monocitos. Además, las U937 pueden madurar y diferenciarse en respuesta a diversos estímulos y adoptar una morfología y características propias de los macrófagos maduros (Sundstrom y Nilsson, 1976). Los agentes capaces de inducir la diferenciación de estas células son compuestos como los ésteres de forbol (TPA, PMA, etc), ácido retinoico, adenosina cíclica monofostafo o derivados del calciferol (Minafra *et al.*, 2011). Una vez diferenciadas pueden adherirse al sustrato, se reduce el ratio de proliferación y de expresión de c-myc y manifiesta las propiedades de típicas de macrófagos, tales como la presencia en la membrana plasmática del receptor de unión a LPS, CD14, o la secreción de citoquinas proinflamatorias, entre ellas el TNF- α (Hass *et al.*, 1989).

1.2.1. Mantenimiento y preparación de experimentos

Las células U937, que crecen en suspensión, se mantuvieron en el medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) suplementado con 10 % (v/v) de FBS, 2 mM de

glutamina, 100 U/ml de penicilina, y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomina. Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada al 5 % de CO_2 .

1.2.2. Activación de las células U937 y preparación de los medios condicionados

Las células U937 se sembraron en frascos cultivo a una densidad de 5×10^5 células/ml y se incubaron en presencia de 40 nM de forbol 12-miristato13-acetato (PMA) durante 24 horas. Este tratamiento indujo la adhesión celular y la diferenciación de las células a macrófagos. A continuación, los macrófagos se incubaron en presencia de 40 nM de PMA (medio PMA), 1 mg/ml de LPS (medio LPS) o 40 nM de PMA y 1 mg/ml de LPS (medio PMA + LPS) durante 48 h (figura 0.3). Transcurrido ese tiempo, los medios de cultivo (medios condicionados) se filtraron y guardaron en alícuotas a -80 °C hasta su utilización.

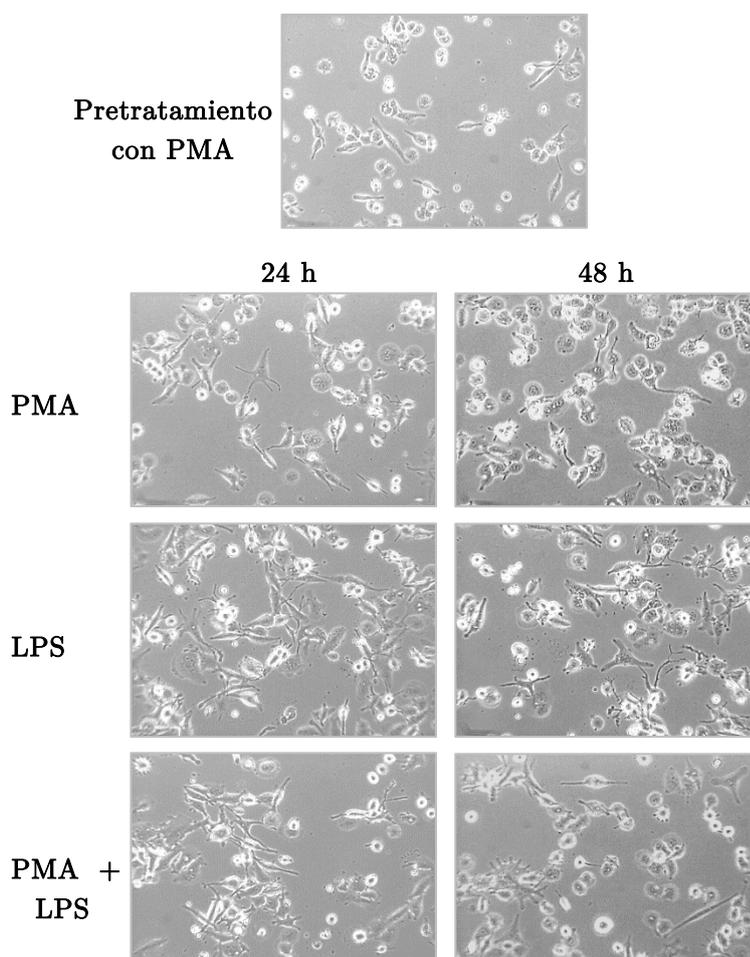


Figura 0.3.- La activación de las células U937 con distintos agentes produce cambios morfológicos. Las células se preincubaron con 40 nM de PMA durante 24 h, tras lo cual se trataron con 40 nM de PMA (medio PMA), 1 mg/ml de LPS (medio LPS) o 40 nM de PMA y 1 mg/ml de LPS (medio PMA + LPS) durante los tiempos indicados en la figura.

1.2.3. Contenido de los medios condicionados

Los niveles de citoquinas presentes en los medios condicionados se determinaron mediante un análisis multiplexado, utilizando para ello un kit comercial distribuido por la casa comercial *Bio-Rad*. Este análisis se llevó a cabo en el Servicio de Técnicas Aplicadas a la Biociencia (STAB), que es un servicio de apoyo a la investigación de la Universidad de Extremadura. En la tabla 2.1 se muestra la concentración de las citoquinas presentes en cada uno de los medios condicionados. Como se puede ver, además de las citoquinas características de la respuesta inmune innata (como IL-1, IL-6 y TNF- α) se encontraron citoquinas representativas de la respuesta adaptativa (como el IFN- γ). El medio condicionado producido por PMA contenía la menor concentración de casi todas las citoquinas, siendo particularmente bajas las de TNF- α , IL-1 β , IL-6 o IL-8, con respecto a los otros medios. En el otro extremo, el medio producido por la mezcla de PMA y LPS fue el que presentó los valores más altos de citoquinas, aunque el medio LPS destacó por la alta concentración de IL-1 β e IL-10.

Medio	pg/ml	IL-1 β	IL-2	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	GM-CSF	IFN- γ	TNF- α
PMA		65,61	5,32	7	11,4	78981	15,4	1923,3	228,23	20,12
LPS		103,25	4,84	7	35,6	95329	21,34	1807,7	168,14	129
PMA+LPS		82,57	6	6	36,21	97970	14,5	1925,42	300	152,9

Tabla 2.1. Niveles de citoquinas presentes en los medios condicionados procedentes de las células U937 estimuladas con PMA, LPS o con la mezcla de ambos.

1.3. Línea celular HEK-293

La línea celular HEK-293 procede de células embrionarias humanas de riñón transformadas con fragmentos de DNA del adenovirus 5 (Graham *et al.*, 1977).

Estas células exhiben algunas características asociadas al linaje neuronal, como ser capaces de expresar algunos neurofilamentos (Thomas y Smart, 2005), por esta razón, se utilizan mucho para estudiar diferentes procesos neurobiólogos (Shaw *et al.*, 2002). Estas cualidades, junto con el hecho de que no expresan la proteína Tau, han convertido a esta línea celular en el modelo idóneo para realizar parte de los experimentos que contiene el tercer capítulo.

1.3.1. Mantenimiento y división de las células para los experimentos

Las células, que crecen en monocapa, se cultivaron en el medio comercial Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM), suplementado con un 10 % FBS, 2 mM glutamina, 100 U/ml de penicilina y 0,1 mg/ml de estreptomycin. Se mantuvieron en frascos de cultivo de 75 cm² en un incubador a 37 °C y una atmósfera humidificada con el 5 % de CO₂. El mantenimiento es similar al descrito para las células SH-SY5Y. Para la realización de experimentos, se sembraron a una densidad de 30.000 células/cm² por placa. Se utilizaron placas de diferente tamaño en función del experimento que se iba a realizar.

1.4. Línea celular PC-12

Esta línea celular se estableció a partir de un feocromocitoma de rata en el año 1976. En presencia del factor de crecimiento nervioso (NFG) estas células interrumpen su ciclo mitótico y adquieren, desde un punto de vista morfológico y bioquímico, un fenotipo neuronal. Estas células son capaces de sintetizar dopamina y norepinefrina y acetilcolina. Los cambios provocados por el NFG son rápidos y reversibles (Greene y Tischler, 1976). Esta línea celular se utiliza ampliamente para investigar los mecanismos celulares y moleculares que se producen en la diferenciación neuronal y en las patologías del sistema nervioso y, por ello, la hemos utilizado para realizar parte de los experimentos que se describen en el último capítulo de este trabajo.

1.4.1. Mantenimiento y división de las células para los experimentos

Las células se cultivaron en Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM), suplementado con 10 % de FBS, 5 % de suero de caballo (SC), 0,2 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina y 0,1 mg/ml de estreptomycin. Se mantuvieron placas de 10 cm en un incubador a 37 °C y una atmósfera humidificada con el 10 % de CO₂.

Cuando las células alcanzaron una densidad cercana al 80-90 %, cada 48-72 h, se procedió a la división de los cultivos. Para lo cual, se eliminó el medio de las placas de mantenimiento y se añadieron 5 ml de DMEM completo con el que se despegaron las células de la placa mediante acción mecánica. Con este tipo celular no fue necesario utilizar tripsina. Para mantener la línea celular, 1 ml de la suspensión celular se añadió a una placa de 10 cm de diámetro junto con 9 ml de DMEM completo. Si la suspensión celular se utilizaba para

realizar los experimentos, las células se contaban mediante el método del azul de tripano y se sembraban a diferentes densidades en función del estudio que a realizar: 15.000 células/cm² para los experimentos de fotoactivación, 100.000 células/cm² para los experimentos de detección de proteínas y 500.000 células/cm² para los de aislamiento de membrana.

1.4.2. Diferenciación de las células PC-12

Las células PC-12 se diferenciaron en presencia de 100 ng/ml de NFG en DMEM sin rojo fenol suplementado con 1 % FBS y 1 % de suero de caballo durante 96 horas. El medio de diferenciación se renovó a las 48 horas.

1.4.3. Preparación de las placas de cultivo para los ensayos de FDAP

Antes de sembrar las células sobre las placas destinadas a los experimentos de pérdida de fluorescencia tras la fotoactivación (FDAP), éstas se trataron con poli-L-lisina (100 µg/ml en un tampón con ácido bórico y tetraborato sódico, pH 8,5) durante, al menos, 6 horas. Transcurrido ese tiempo, la poli-L-lisina se eliminó y las placas se lavaron, dos veces, con agua destilada durante una hora a 37 °C. A continuación, las placas se incubaron durante 45 min con colágeno (50 µg/ml en 20 mM ácido acético), quedando listas para ser utilizadas.

2. Tratamientos celulares

El medio de crecimiento de las células está suplementado con suero, que es muy rico en péptidos muy activos, en cuanto a su actividad biológica, que pueden interferir en el efecto que producen los agentes objeto de estudio. Por ello, todos los experimentos se han realizado en medio sin sueros, suplementado con glutamina y la mezcla de antibióticos. El cambio de medio se realizó al menos 12 horas antes de la exposición al estímulo.

2.1. Tratamiento con sorbitol

El sorbitol es un polialcohol cuya fórmula empírica es C₆H₁₄O₆. Se utiliza ampliamente en investigación, ya que en disolución se comporta como un agente osmótico, produciendo hiperosmolaridad en el medio. Es un potente inductor de la activación distintas respuestas en la célula para compensar dicho cambio osmótico.

Todos los experimentos se realizaron con una concentración final de D-sorbitol de 0,5 M preparada a partir de una solución madre de concentración 3 M. Esta concentración experimental ha sido previamente utilizada por otros grupos de investigación para inducir estrés hiperosmótico en diferentes tipos celulares (Stoothoff y Johnson, 2001; Sabio *et al.*, 2004; Inesta-Vaquera *et al.*, 2009).

La solución madre de D-sorbitol se preparó en medio sin sueros y se sometió a ciclos de agitación y calentamiento a 37 °C en un baño termostatzado para conseguir su disolución total. Esta solución se filtró y se conservó a 4 °C. En el momento de su uso, la solución 3 M de sorbitol se atemperó a 37 °C y el volumen necesario para alcanzar una concentración final de 0,5 M, se añadió directamente sobre el medio de incubación de las células.

Las células se incubaron con 0,5 M sorbitol durante diferentes periodos de tiempo (experimentos tiempo-respuesta) o durante 1 hora para el resto de los experimentos. Al final de cada experimento, las células se procesaron de forma diferente, dependiendo del objetivo final del estudio y de acuerdo con las técnicas que se detallan en este capítulo.

2.2. Tratamiento con TNF- α

Una vez diferenciadas, las células se incubaron en presencia de diferentes concentraciones de TNF- α durante 24 horas (experimentos concentración-respuesta). En los estudios en función del tiempo, las células se incubaron en presencia de 10 ng/ml de TNF- α durante diferentes periodos de tiempo. En los demás experimentos se utilizó una concentración de 10 ng/ml de TNF- α durante 24 h.

2.3. Tratamiento con medios condicionados procedentes de las células U937

Una vez diferenciadas, las células se incubaron en presencia de diferentes porcentajes de los medios condicionados (PMA, LPS y PMA + LPS) durante 24 h (experimentos concentración-respuesta). En los estudios en función del tiempo, las células se incubaron en presencia de 10 % de los medios condicionados durante diferentes periodos de tiempo. En los demás experimentos se utilizó un porcentaje del 10 % de cada uno de los medios condicionados durante 24 h.

2.4. Tratamiento con los inhibidores farmacológicos

2.4.1. Preparación de los inhibidores

Todos los inhibidores utilizados en este estudio se reconstituyeron en el solvente recomendado por el fabricante. Se prepararon como soluciones madre de distinta concentración (10 ó 25 mM dependiendo del inhibidor) y se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

2.4.2. Inhibidor de caspasa 3

El inhibidor Z-DEVD-fmk inhibe fuertemente y de manera irreversible la activación de caspasa 3 y, por tanto, su actividad. La secuencia Z-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-fluorometilcetona, está basada en el sitio donde caspasa 3 proteoliza a PARP-1. Se utilizó a concentraciones de 2, 5, 10 y 25 μ M según el experimento.

2.4.3. Inhibidor de caspasa 6

El compuesto seleccionado para inhibir la caspasa 6 fue el Z-VEID-fmk. Este péptido inhibidor cuya secuencia es Z-Val-Glu(OMe)-Ile-Asp(OMe)-fluorometilcetona, reprime la actividad de caspasa 6, 8 y 10 de manera irreversible. Las concentraciones utilizadas fueron 2, 5 y 10 μ M.

2.4.4. Inhibidor general de caspasas

El péptido inhibidor Z-VAD-fmk, cuya secuencia es benziloxycarbonil Z-Val-Ala-Asp-(OMe)-fluorometilcetona, se une irreversiblemente al sitio catalítico de los 14 miembros de la familia caspasa (Van Noorden, 2001). Se utilizó a 25 y 50 μ M.

2.4.5. Inhibidor de p38 MAPKs

El inhibidor de las p38 MAPKs empleado ha sido el BIRB0796. Este compuesto inhibe todas las isoformas de manera dependiente a la concentración empleada: las isoformas α y β se inhiben a una concentración de 0,1 μ M, y todas las p38s (α , β , γ y δ) se inhiben a una concentración de 1 μ M del inhibidor (Kuma *et al.*, 2005; Bain *et al.*, 2007).

2.4.6. Inhibidores de ERK 1/2

La inhibición de las ERK 1/2 se lleva a cabo usando el inhibidor farmacológico U0126, el cual inhibe la actividad de MEK 1/2, la quinasa responsable de la fosforilación de las ERK 1/2 (Favata *et al.*, 1998). Las concentraciones finales utilizadas fueron 1 y 10 μM .

2.4.7. Inhibidor de JNKs

Para inhibir las JNKs se utiliza el inhibidor I isómero-L de JNK, un péptido que se une al extremo C-terminal de las JNKs e impide la fosforilación de sus sustratos. Está compuesto por 32 aminoácidos cuya secuencia polipeptídica es: H-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-Pro-Pro-Arg-Pro-Lys-Arg-Pro-Thr-Thr-Leu-Asn-Leu-Phe-Pro-Gln-Val-Pro-Arg-Ser-Gln-Asp-Thr-NH₂ (Davis y Dickens, 2000). Las concentraciones finales empleadas fueron 10 y 20 μM .

2.4.8. Procedimiento experimental con los inhibidores

Los inhibidores se adicionaron directamente sobre los medios de incubación en los que se encontraban las células, en los volúmenes necesarios para alcanzar las concentraciones finales utilizadas. Las células se preincubaron con cada inhibidor durante al menos 1 h antes de añadir los agentes objeto de estudio. En caso de los inhibidores resuspendidos en DMSO, la concentración final del vehículo no superó en ningún caso el 0,1 %. Al final de cada experimento, las células se procesaron de forma diferente, dependiendo del objetivo final del estudio y de acuerdo con las técnicas que se detallan en este capítulo.

3. Estudio de la morfología celular

Una vez finalizado el tratamiento correspondiente, los cambios morfológicos producidos en las células se observaron en un microscopio invertido de contraste de fases y fotografían con la cámara CCD de alta calidad Photometrics Cool Snap cf de *Roper Scientific* acoplada al microscopio. Las imágenes se tomaron con los objetivos de 10x y 20x aumentos.

4. Ensayos de actividad enzimática

4.1. Obtención de lisados celulares

Al final de cada experimento, las células se lisaron en presencia del tampón de lisis para actividad proteasa (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 130 mM, NaH₂PO₄ 10 mM, pirofosfato sódico 10 mM y Triton X-100 1 %). Este tampón se añadió directamente sobre las células. Con ayuda de un raspador se arrastraron las células y se recogieron en un tubo de 1,5 ml. Se mantuvieron en hielo durante 5 minutos y seguidamente se centrifugaron a 19.000 g durante 5 minutos a 4 °C. Se descartaron los precipitados y las proteínas presentes en los sobrenadantes se determinaron mediante el método de Bradford (Brandford, 1976). Las muestras se conservaron a -20 °C hasta su uso.

4.2. Medida de la actividad de caspasa 3/7

La medida de la actividad de la caspasa 3/7 se realizó utilizando el sustrato fluorogénico Ac-DEVD-AMC (ácido N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-metilcumarina) que contiene la secuencia aminoacídica del sitio de corte de caspasa 3 en el residuo Asp-216 de la proteína PARP (poli-ADP-ribosa polimerasa). La caspasa 3/7 activa presente en los lisados celulares hidrolizó el tetrapéptido entre el residuo de ácido aspártico (D) y la metilcumarina (AMC). De esta manera, se liberó la molécula AMC que, al ser fluorogénica, se detectó por fluorometría.

Los ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos utilizando el lector de placas Infinite M200 de *Tecan*. A cada pocillo se incorporó 50 µl del tampón de lectura 2x (HEPES 40 mM pH 7,5, glicerol 20 %, 2 mM DTT y 0,1 mM CaCl₂), el lisado celular (20-30 µg de proteína), el sustrato hasta alcanzar la concentración final de 20 µM y agua hasta completar los 100 µl del ensayo. A continuación se introdujo la placa en el fluorímetro, previamente atemperado, y se midieron las longitudes de onda de excitación y de emisión de 380 y 440 nm, respectivamente. Las medidas se tomaron en intervalos de 10 minutos hasta los 60 minutos.

4.3. Medida de la actividad de caspasa 6

La actividad de caspasa 6 se cuantificó en los lisados celulares utilizando el sustrato sintético Ac-VEID-AFC (ácido N-acetil-Val-Glu-Ile-Asp-7-amino-4-trifluorometil-cumarina)

que contiene la secuencia de aminoácidos del sitio de corte de caspasa 6 en la proteína lamina A/C.

El procedimiento seguido fue igual al llevado a cabo para la medida de la actividad de caspasa 3/7, pero utilizando una concentración final de sustrato de 50 μ M. Las longitudes de ondas de excitación y de emisión que se midieron fueron a 400 y 505 nm, respectivamente.

5. Estudio de los niveles de proteínas por Western Blot

La técnica del Western blot (también llamado “immunoblot” debido a que se utiliza anticuerpos para detectar el antígeno o los antígenos específicos de interés) fue descrita por primera vez por Towbin en 1979 (Towbin *et al.*, 1979). Es una técnica que se utiliza de rutina en todos los laboratorios que realizan análisis de proteínas. La especificidad de la unión antígeno-anticuerpo permite la detección de una única proteína dentro de una mezcla compleja de otras proteínas. Con esta técnica se pueden obtener datos cualitativos y semicuantitativos de la proteína de interés.

5.1. Obtención de extractos celulares totales de las células HEK-293 y SH-SY5Y

Tras los diferentes tratamientos se retiró el medio de cada placa y se añadieron directamente sobre las células, 100 μ l de tampón de lisis celular [Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EGTA 1 mM, EDTA 1 mM, NaF 10 mM, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 5 mM, sucrosa 0,27 M, PMSF 0,1 mM y Triton X-100 1 % (v/v), Na_3VO_4 1 mM, β -mercaptoetanol 0,1 % (v/v) e inhibidores de proteasas de Roche (*Complete, EDTA-free*)]. Los lisados celulares se pasaron a un tubo de 1,5 ml y se mantuvieron en hielo durante 5 minutos. Tras lo cual se centrifugaron a 19.000 g durante 5 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes obtenidos se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

5.2. Obtención de extractos de proteínas citosólicas y nucleares de las células SH-SY5Y

Después de cada experimento, el medio de cultivo se eliminó, las células se lavaron con PBS a 4 °C y se recogieron por rascado. Posteriormente se centrifugaron a 20.000 g durante 60 segundos. El precipitado celular se disgregó en el tampón de extracción de

proteínas citosólicas (HEPES-KOH 10 mM, pH 7,9; MgCl₂ 1,5 mM, ClK 10 mM, DTT 0,5 mM, PMSF 0,2 mM, 0,1 % NP-40 e inhibidores de proteasas). Tras agitar la muestra en un agitador de tubos durante 15 segundos, se incubó 10 minutos en hielo. A continuación se centrifugó a 20.000 g durante 10 segundos a 4 °C. El sobrenadante (extracto de proteínas citosólicas) se guardó a -20 °C hasta su utilización. El precipitado nuclear se disgregó en el tampón de extracción de proteínas nucleares (HEPES-KOH 20 mM, pH 7,9, glicerol 20 %, NaCl 420 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA 0,2 mM, DTT 0,5 mM, PMSF 0,2 mM e inhibidores de proteasas) y se mantuvo en agitación durante 20 minutos a 4 °C. Tras este periodo, la muestra se centrifugó a 20.000 g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante (extracto de proteínas nucleares) se recogió y se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

5.3. Obtención de extractos celulares totales de las células PC-12

Una vez finalizada la diferenciación celular, se retiró el medio de las placas y se lavaron las células con PBS frío. A continuación, dependiendo del experimento y el tipo de placa, las células se lisaron en un volumen conocido (entre 100 y 300 µl) del tampón de lisis para extractos celulares completos II o RIPA [Tris-HCl 100 mM pH 8, NaCl 300 mM, EDTA 2 mM, NP-40 2 %, deoxicolato (DOC) 1 %, SDS 0,2 %, PMSF 1 mM, leupeptina 10 µg/ml, pepstatina 10 µg/ml, pirofosfato sódico 1 mM, ortovanadato sódico 1 mM y NaF 20 mM]. Las células se despegaron con ayuda de un raspador y se incubaron en agitación fuerte durante 30 minutos a 4 °C antes de ser centrifugadas a 10.000 g durante 10 minutos a 4 °C. El precipitado se descartó y el sobrenadante se dividió en alícuotas. Finalmente, estas alícuotas fueron sumergidas unos segundos en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C.

5.4. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas en los diferentes extractos celulares se determinó utilizando el reactivo “ensayo de proteínas” de la casa comercial *Bio-Rad*, siguiendo el protocolo descrito por el proveedor y utilizando albúmina de suero bovino (BSA) para construir la curva patrón.

5.5. Electroforesis de proteínas

Las proteínas presentes en los extractos celulares (10-30 µg/muestra) se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 8, 10 ó 12 % en condiciones reductoras

y desnaturalizantes (SDS-PAGE), según el método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). La electroforesis se llevó a cabo en presencia de Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM y SDS 0,01 %, a un voltaje constante de 200 V durante 50 minutos a temperatura ambiente.

Las muestras se prepararon mezclándose con tampón Laemmli (Tris 60 mM pH 6,8, SDS 2 %, glicerol 10 %, ditioneitol (DTT) 100 mM % y azul de bromofenol 0,001 %), y se calentaron a 95 °C durante 5 min.

5.6. Electrotransferencia de proteínas a membranas

Una vez completada la electroforesis, las proteínas se transfirieron desde el gel de acrilamida hasta una membrana de nitrocelulosa (tamaño de poro 0,45 µm) mediante electrotransferencia. En este trabajo se han empleado dos técnicas de electrotransferencia: en semi-seco y en húmedo.

5.6.1. Electrotransferencia en semi-seco

La electrotransferencia en semi-seco se realizó en el equipo de transferencia Transblot SD de *Bio-Rad* siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Se empleó un gradiente de fuerza iónica mediante la utilización de tres tampones diferentes: SDB-1 (ácido aminocaproico 40 mM, Tris/Base 25 mM y metanol 20 %), SDB-2 (Tris/Base 25 mM y metanol 20 %) y SDB-3 (Tris/Base 300 mM y metanol 20 %). La transferencia se realizó mediante el paso de corriente eléctrica a 20 V durante 15 minutos.

Esta técnica se utilizó principalmente para detectar proteínas abundantes y sin fosforilar.

5.6.2. Electrotransferencia en húmedo

La electrotransferencia de las proteínas en húmedo se llevó a cabo utilizando una cubeta de transferencia Mini-Trans Blot de *Bio-Rad*. Su utilizó un tampón de transferencia en húmedo compuesto por CAPS 10 mM pH 11 y metanol 20 %. La electrotransferencia se realizó a un amperaje constante de 295 mA, durante 90 minutos.

5.7. Detección de la eficiencia de la transferencia

Una vez finalizada la transferencia y para comprobar que ésta se había realizado de manera correcta, la membrana se sumergió en una solución de rojo ponceau 0,1 % y ácido acético 5 %. Para eliminar el colorante, la membrana se lavó varias veces con PBS.

5.8. Detección de las proteínas

La detección de las proteínas se realizó mediante el uso de anticuerpos específicos (Tabla 2.2).

En primer lugar, la membrana se incubó con una solución de bloqueo (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 100 mM, 0,5 % Tween-20 y leche desnatada 5 % o BSA 0,3 %), durante 1 hora a temperatura ambiente con el fin de evitar la unión inespecífica de los anticuerpos a la membrana. Posteriormente la membrana se incubó durante una hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C, con el anticuerpo primario diluido en Tris-HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 100 mM, Tween-20 0,05 % y leche desnatada 5 % o BSA 0,3 %.

Anticuerpo	Peso Molecular	Origen	Dilución	Casa Comercial
Actina	42 kDa	Conejo	1:2.000	<i>Sigma-Aldrich</i>
Fosfo-c-jun	39 kDa	Ratón	1:500	<i>Upstate Biotechnology</i>
ERK 1/2	42/44 kDa	Conejo	1:1.000	<i>Cell Signalling</i>
Fosfo-ERK 1/2	42/44 kDa	Conejo	1:1.000	<i>Cell Signalling</i>
Fragmento activo de caspasa 3	17 kDa	Conejo	1:1.000	<i>Cell Signalling</i>
Fragmento activo de caspasa 6	18 kDa	Conejo	1:1.000	<i>Cell Signalling</i>
Hemoglobulina (HA)	70 kDa	Ratón	1:500	<i>Cell Signalling</i>
JNK	46/55 kDa	Conejo	1:1.000	<i>Cell Signalling</i>
Fosfo-JNK	46/55 kDa	Conejo	1:1.000	<i>Cell Signalling</i>
MAPKAPK-2	43/45 kDa	Conejo	1:1.000	<i>Cell Signalling</i>
Neurofilamentos	160/200 kDa	Ratón	1:1.000	<i>Sigma-Aldrich</i>
Fosfo-Neurofilamentos	160/200 kDa	Ratón	1:1.000	<i>Santa Cruz Biotechnology, Inc</i>
p38 MAPKs	38 kDa	Conejo	1:1.000	<i>Cell Signalling</i>

Fosfo-p38 MAPKs	38 kDa	Conejo	1:1.000	<i>Cell Signalling</i>
Fragmento PARP-1	89 kDa	Conejo	1:2.000	<i>Cell Signalling</i>
Tau $\frac{\text{endógena}}{\text{exógena}}$	55-62 kDa 70/72 kDa	Conejo	1:5.000	Purificado por <i>Biomedal</i>
Tau-5	50-70 kDa	Ratón	1:5.000	<i>BD Biosciences</i>
Fosfo-Tau AT8	60 kDa	Ratón	1:500	<i>Innogenetics</i>
Fosfo-Tau Thr-50	60 kDa	Oveja	1:1.000	Cedido por la Dra. Cuenda
Fosfo-Tau Thr-69	60 kDa	Oveja	1:500	Cedido por la Dra. Cuenda
Fosfo-Tau Thr-181	60 kDa	Ratón	1:1.000	<i>Thermo Fisher Scientific</i>
Fosfo-Tau Thr-181 (Alemania)	60 kDa	Conejo	1:5.000	<i>Biosource</i>
Fosfo-Tau Thr-205	60 kDa	Conejo	1:1.000	<i>Genscript</i>
Fosfo-Tau PHF-1	60 kDa	Ratón	1:10.000	Cedido por el Dr. Brandt
Tubulina	55 kDa	Ratón	1:5.000	<i>Sigma-Aldrich</i>

Tabla 2.2. Lista de anticuerpos primarios empleados en Western blot para células SH-SY5Y, HEK-293 y PC-12.

Tras esta incubación se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno en una solución de lavado, (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 100 mM y Tween-20 0,05 %), y a continuación, se procedió a la incubación de la membrana durante 45 minutos a temperatura ambiente, con el anticuerpo secundario específico (tabla 2.3) conjugado con peroxidasa de rábano y diluido en la misma solución que el anticuerpo primario. A continuación, las membranas se lavaron tres veces durante 5 minutos, tras lo cual se secaron suavemente y se pusieron sobre un recipiente adecuado para proceder a la detección de proteínas específicas. La detección de las proteínas se realizó incubando las membranas durante 5 minutos con luminol y el sustrato de la peroxidasa que se encuentra unida al anticuerpo secundario, de este modo se produce una reacción de quimioluminiscencia y la luz emitida es capaz de impresionar una película sensible a ella (Hyperfilm, *Amersham Biosciences*). Como sustrato de la reacción de luminiscencia se utilizó el reactivo SuperSignal West Pico Chemiluminescent de *Pierce* (Rockford, IL, USA). En algunas ocasiones se utilizaron los reactivos Immun-Star™

WesternC™ Kit de *Bio-Rad*, Supersignal West Dura Extended Duration Substrate y Supersignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, de *Pierce*.

Anticuerpo	Origen	Dilución	Casa Comercial
Anti-conejo	Burro	1:10.000	<i>Thermo Fisher Scientific</i>
Anti-oveja	Conejo	1:5.000	<i>Thermo Fisher Scientific</i>
Anti-ratón	Cabra	1:2.000	<i>Thermo Fisher Scientific</i>

Tabla 2.3. Lista de anticuerpos secundarios conjugados con la peroxidasa de rábano picante (HRP) utilizados.

Para la cuantificación de las proteínas, las películas impresionadas se escanearon y se efectuó la densitometría correspondiente utilizando el programa informático *Image J*.

5.9. Reutilización de la membrana o *stripping*

En algunos casos, una misma membrana se utilizó para detectar 2 proteínas diferentes. Para evitar interferencias entre las distintas señales, y una vez finalizada la detección de la primera proteína, se llevó a cabo el proceso de *stripping*, con el que se consigue eliminar los anticuerpos previamente utilizados. Para ello, se sumergió la membrana en la “solución de *stripping*” que consiste en una solución 20 mM de tris-2-carboxietil- clorhidrato de fosfina en agua bidestilada. Se dejó en agitación continua durante 1 h a 37 °C o toda la noche a 4 °C. A continuación se bloqueó durante 2 h a temperatura ambiente o se incubó toda la noche a 4 °C. Posteriormente, la detección de la segunda proteína se realizó en presencia de su anticuerpo primario específico siguiendo el protocolo descrito en el apartado anterior.

6. Técnicas de estudio de la viabilidad y la muerte celular

6.1. Ensayos de viabilidad celular

El crecimiento de la población celular se determinó utilizando el método colorimétrico del MTT [3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2H bromuro de tetrazolio] y el colorante vital azul tripano, obteniéndose en ambos casos resultados similares.

6.1.1. Determinación de la viabilidad celular mediante el ensayo colorimétrico del MTT

Este método se basa en el hecho de que las células viables expresan la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, que es capaz de reducir el MTT [3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2H bromuro de tetrazolio] a cristales insolubles de formazán (Mosmann, 1983). El formazán, de color púrpura, es un producto que absorbe luz a una longitud de onda de 570 nm y esta absorbancia puede ser cuantificada en un espectrofotómetro. Dado que la reducción sólo tiene lugar cuando las enzimas están activas, la conversión de MTT (de color amarillo) a formazán (de color púrpura) se usa habitualmente como una medida de la viabilidad celular.

Para realizar estos experimentos, se utilizaron placas de cultivo de 35 mm de diámetro. Al final de cada tratamiento, se añadió 0,5 mg/ml de MTT (a partir de una solución concentrada de 5 mg/ml de MTT en PBS) directamente en el medio de cultivo. Después de 45 minutos de incubación a 37 °C, se retiró el medio y el formazán precipitado se disolvió en una solución ácida de isopropanol (HCl 0,04-0,1 N en isopropanol absoluto). La cantidad de formazán presente en cada muestra se determinó midiendo la absorbancia a 570 nm. Cada tratamiento se realizó por triplicado y la media de los resultados obtenidos se expresó como porcentaje de células viables con respecto al grupo control, el cual se estableció como el 100 %.

6.1.2. Determinación de la viabilidad celular mediante el colorante azul de tripano

El azul de tripano, es un colorante azoico que se utiliza en ensayos de viabilidad ya que permite diferenciar las células vivas de las células muertas. Se basa en el hecho de que este colorante no puede atravesar la membrana plasmática de las células vivas, por lo tanto éstas no se colorean en su presencia. Por el contrario, sí que atraviesa la membrana de las células muertas por lo que se colorean de color azul. Debido a que las células vivas excluyen al colorante y no se tiñen, este método también se llama método de tinción por exclusión.

Después del experimento, las células se recogieron con la ayuda de una espátula de goma y se disgregaron mediante acción mecánica. Se cogieron 10 µl de la suspensión celular a los que se agregaron 100 µl de una solución de azul de tripano. Se agitó bien y 10 µl de

esta mezcla se incorporaron en la cámara de contaje. El porcentaje de células viables se obtuvo directamente a través de su lectura en el contador automático (TC 10TM Automated Cell Counter de *Bio-Rad*).

6.2. Análisis de apoptosis por citometría de flujo

Este método de análisis del contenido de ADN permite identificar y cuantificar las células apoptóticas, ya que como consecuencia de la fragmentación del ADN aparece un tipo hipodiploide característico (sub-G0), correspondiente a las células con un contenido de ADN inferior a 2n (Darzynkiewicz *et al.*, 1992). Al final de cada experimento se recogieron tanto las células en suspensión como las adheridas a las placas. Las células se despegaron de la placa incubándolas con una solución de tripsina/EDTA (0,05 % de tripsina y 0,002 % de EDTA en PBS), se lavaron con PBS frío y se centrifugaron a 3.000 g durante 5 minutos. Posteriormente, se lavaron dos veces con PBS frío y se fijaron durante 5 minutos con 70 % de etanol. Tras eliminar el etanol por centrifugación, las células se disgregaron en PBS y se incubaron en presencia de ARNasa (10 mg/ml) durante 30 minutos a 37 °C, con objeto de degradar el ARN celular. A continuación, las células se tiñeron con 50 µg/ml de yoduro de propidio durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. El contenido de ADN por célula se analizó en un citómetro de flujo FC500 (*Beckman Culter*) en la unidad de citometría del STAB, utilizando un láser de argón con una longitud de onda de emisión de 488 nm.

6.3. Análisis de la fragmentación internucleosomal del ADN

Las células que mueren por apoptosis presentan cambios bioquímicos muy característicos. Uno de ellos es la degradación del ADN genómico como consecuencia de la activación de endonucleasas endógenas dependientes de Ca²⁺ y Mg²⁺. Estas enzimas cortan el ADN por la región internucleosomal, dando lugar a fragmentos múltiples de 180 pares de bases que pueden salir al citoplasma. Estos fragmentos dan lugar a la característica escalera de ADN cuando se resuelven por electroforesis en geles de agarosa. Para la realización de estos experimentos se utilizaron placas de cultivo de 100 mm de diámetro. Las células adheridas a la placa y en suspensión se recogieron y se lavaron dos veces con PBS a 4 °C. A continuación las células se incubaron con tampón de lisis (Tris 5 mM pH 7.5, EDTA 20 mM pH 8 y el 0,5 % de Triton X-100) durante 1 hora a 4 °C y en agitación constante. El lisado

celular se centrifugó a 20.000 g durante 30 minutos y el sobrenadante se incubó en presencia de 100 µg/ml de ARNasa A durante 45 minutos a 37 °C, seguida de otra incubación con 0,5 % de SDS y 200 µg/ml de proteinasa K durante 45 minutos a 37 °C. Después de dos extracciones con fenol-cloroformo-isoamílico, el ADN se precipitó con etanol en presencia de 0,3 M de acetato sódico a -80 °C. El ADN presente en cada muestra se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 %, preparados en una solución tampón de TBE (Tris-ácido bórico 90 mM y EDTA 2mM) y conteniendo 0,1 µg/ml de bromuro de etidio. La electroforesis se llevó a cabo a 80 V durante 2 horas, tras lo cual los geles se observaron bajo una fuente de luz ultravioleta y se fotografiaron mediante la utilización de un equipo Chemic Doc de *Bio Rad*.

7. Inmunofluorescencia

Para estos experimentos, las células se sembraron en placas de cultivo Lab-Tek II (*Thermo Scientific Nunc*). Al final de cada experimento, las células se lavaron con PBS y se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4 % en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar las células tres veces con PBS éstas se permeabilizaron con metanol frío durante 20 segundos a temperatura ambiente, (para la detección de tubulina no se realizó este paso). Seguidamente, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS, tras lo cual las uniones inespecíficas se bloquearon incubando las células con PBS y BSA al 0,3 % durante 30 minutos. A continuación, las células se incubaron con los anticuerpos específicos diluidos en la solución de bloqueo durante 24 h a 4 °C en una cámara húmeda. Los anticuerpos primarios utilizados se relacionan en la tabla 2.4.

Anticuerpo	Origen	Dilución	Casa Comercial
MAP-2	Ratón	1:250	<i>Sigma-Aldrich</i>
Neurofilamentos	Ratón	1:500	<i>Sigma-Aldrich</i>
Tau	Conejo	1:500	Purificado por <i>Biomedal</i>
Fosfo-Tau Thr-50	Oveja	1:500	Cedido por la Dra. Ana Isabel Cuenda
Fosfo-Tau Thr-69	Oveja	1:250	Cedido por la Dra. Ana Isabel Cuenda
Fosfo-Tau Thr-181	Ratón	1:500	<i>Thermo Fisher Scientific</i>
Tubulina	Ratón	1:1.000	<i>Sigma-Aldrich</i>

Tabla 2.4. Lista de anticuerpos primarios utilizados en inmunofluorescencia.

A continuación, las células se lavaron 3 veces con PBS durante 5 minutos y se incubaron con los anticuerpos secundarios marcados con diferentes fluorocromos durante 2 h en oscuridad. Los anticuerpos secundarios utilizados se especifican en la tabla 2.5.

Anticuerpo	Nombre	Dilución	Casa Comercial
Anti-conejo	Atto 633	1:250	<i>Molecular Probes</i>
Anti-conejo	Alexa 488	1:250	<i>Molecular Probes</i>
Anti-oveja	Alexa 594	1:250	<i>Molecular Probes</i>
Anti-ratón	FITC	1:250	<i>Molecular Probes</i>

Tabla 2.5. Lista de anticuerpos secundarios fluorescentes utilizados en inmunofluorescencia.

Finalizada la incubación con el anticuerpo secundario, éste se retira de los pocillos y las células se incuban con una solución de DAPI 5 μ M en PBS. Tras lo cual se procede al montaje de las preparaciones utilizando una solución de PBS y glicerol (V:V). Las preparaciones se analizaron por microscopía confocal de fluorescencia empleando un equipo Olympus FV1000 en la unidad de microscopía del STAB.

La tinción de mitocondrias se realizó con el fluorocromo denominado *MitoTracker® Green*, que es capaz de entrar en la mitocondria en función del volumen de la misma. Después de cada experimento, las células (no fijadas) se incubaron en presencia de 150 nM este fluorocromo durante 30 minutos a 37 °C, tras lo cual se procedió

a su visualización con el microscopio confocal de fluorescencia Olympus FV1000 en la unidad de microscopía del STAB.

Estos experimentos se realizaron en colaboración con el Dr. Alberto Álvarez Barrientos en el Servicio de Técnica Aplicadas a las Biociencias (STAB) de la Universidad de Extremadura.

8. Transfección transitoria de la proteína Tau en células de mamífero

8.1. Construcciones de DNA

8.1.1. pCMV5-HA-Tau, -T50A, -T50E, -T69A y -T69E

Para sobreexpresar la proteína Tau en las células SH-SY5Y y HEK-293 el ADNc de la isoforma 4R2N de la proteína Tau humana (hTau40) unida a hemaglutinina (HA-Tau) se clonó en el vector de expresión pCMV5. La Thr-50 y la Thr-69 de Tau se mutaron a alanina (A) o a ácido glutámico (E), mediante mutagénesis dirigida, utilizando el kit Quikchange (*Stratagene*). Estas construcciones de ADN fueron cedidas por la Dra. Ana Isabel Cuenda (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid).

8.1.2. pCMV5-PAGFP-Tau, -T50A, -T50E, -T69A y -T69E

Para sobreexpresar la proteína Tau en las células PC-12, el ADNc de la isoforma 4R2N de la proteína Tau humana (hTau40) unida a la proteína fluorescente verde fotoactivable (PAGFP-Tau) se clonó en el vector de expresión pCMV5. La Thr-50 y la Thr-69 de Tau se mutaron a alanina (A) o a ácido glutámico (E), mediante mutagénesis dirigida, utilizando el kit de mutagénesis dirigida Q5 (*New England BioLabs, Inc.*) Estas construcciones se realizaron en el laboratorio del Dr. Roland Brandt (departamento de Neurobiología, Universidad de Osnabrück, Alemania).

8.2. Transformación, crecimiento bacteriano y extracción del ADN plasmídico

Antes de comenzar con nuestros estudios, las construcciones de ADN se amplificaron con objeto de tener suficiente cantidad de las mismas para realizar todos los resultados. Para ello, y en primer lugar, las bacterias competentes JM109 (*Promega*) se incubaron en presencia

del ADN plasmídico (aproximadamente 100 ng) durante 30 minutos en hielo. A continuación, se expusieron a choque de calor durante 1 minuto a 42 °C y se incubaron durante otros 5 minutos en hielo. Pasado este tiempo, se añadió 1 ml de medio LB y la suspensión celular se incubó durante 1 hora a 37 °C en agitación constante para permitir la recuperación y replicación de las bacterias. Para seleccionar las bacterias que hubieran incorporado el plásmido, éstas se sembraron en placas de Petri preparadas con medio LB suplementado con 1,5 % de bactoagar y el antibiótico adecuado, al cual sólo son resistentes las bacterias transformadas. Tras permitir el crecimiento en placa durante toda la noche en una estufa a 37 °C, se seleccionó una colonia aislada, que se creció en 50 ml de medio LB fresco con el antibiótico adecuado (medio LBA) durante 8-10 horas a 37 °C y en agitación. Pasado este tiempo, se realizó una dilución 1:10 del cultivo en 500 ml de volumen final de medio LBA, permitiendo el crecimiento de las bacterias durante toda la noche. A continuación, los cultivos se centrifugaron a 20.000 g durante 15 minutos a 4 °C y el ADN plasmídico se purificó utilizando el kit comercial Plasmid Plus Maxi de *QUIAGEN*.

La concentración del ADN purificado se cuantificó midiendo su absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro, ya que 1 unidad de densidad óptica a 260 nm corresponde a 50 µg/ml de ADN.

8.3. Transfección transitoria mediada por lípidos: lipofección

8.3.1. Transfección de las células SH-SY5Y y HEK-293

El método de lipofección con polietilenimina (PEI) (Godbey *et al.*, 1999) se utilizó para transfectar las células SH-SY5Y y HEK-293.

El día anterior a la transfección, las células se sembraron en placas de 35 mm de diámetro en las condiciones habituales de cultivo. Transcurridas 24 h, se preparó la mezcla de transfección diluyendo las construcciones de ADN (1 µg) y el PEI (3 µl, preparado en tampón HEPES 20 mM pH 8 a una concentración de 1 mg/ml) en 100 µl de medio libre de sueros y de antibióticos. La mezcla se agitó vigorosamente y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Una vez preparada la mezcla de transfección, el medio de cultivo de las células se eliminó y se reemplazó por medio nuevo al que se añadió, gota a gota, la mezcla de transfección. Después de 24 horas desde la transfección, se realizaron los

experimentos y las células se procesaron de forma diferente dependiendo del objetivo final del estudio.

8.3.2. Transfección de las células PC-12

Las células PC-12 se transfectaron utilizando el reactivo comercial Lipofectamine® 3.000 (*InvitrogenTM, Life Technologies*) y se siguieron las instrucciones dadas por el fabricante. El día anterior a la transfección, las células se sembraron en placas de 100 mm de diámetro en las condiciones habituales de cultivo. Transcurridas 24 h, se preparó la mezcla de transfección diluyendo las construcciones de ADN (2,5 µg/ml), 5 µl del reactivo P5.000 y 3,75 µl del Lipofectamine® 3.000 en 250 µl de medio Opti-MEM® I atemperado a 37 °C. La mezcla se agitó suavemente y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se añadió directamente sobre el medio de incubación de las células. Después de 24 horas de la transfección, se realizaron los experimentos y las células se procesaron de forma diferente dependiendo del objetivo final del estudio.

9. Ensayo de asociación al citoesqueleto

La capacidad de asociación al citoesqueleto de la proteína Tau nativa y la de sus mutantes en los residuos Thr-50 y Thr-69 se estudió siguiendo el protocolo descrito por Ding *et al.*, 2006. Para ello, las células HEK-293 transfectadas con las construcciones pCMV5-HA-TauWT, pCMV5-HA-T50A, pCMV5-HA-T50E, pCMV5-HA-T69A y pCMV5-HA-T69E se recogieron en PBS atemperado, se centrifugaron a 10.000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente y finalmente se disgregaron y se lisaron en tampón de extracción atemperado (PIPES/KOH 0,1 M pH 6.75, MgSO₄ 1 mM, EGTA 2 mM, EDTA 0,1 mM, Tritón X-100 0,1 mM, glicerol 2 M, PMSF 1 mM e de inhibidores de proteasas) durante 8 minutos a 37 °C. A continuación, los extractos celulares se centrifugaron a 15.000 g durante 15 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante o fracción soluble (FS) se recogió y el precipitado celular se solubilizó en tampón de carga 2x y se sonicó brevemente, configurando la fracción asociada al citoesqueleto o insoluble (FI). Los niveles de la proteína Tau se analizaron en ambas fracciones mediante Western Blot.

9.1. Tratamiento con nocodazol

Con objeto de conocer la capacidad de protección o estabilización de los microtúbulos de la proteína Tau y de sus mutantes, las células HEK-293 transfectadas con las distintas construcciones se incubaron en ausencia o presencia de nocodazol 10 $\mu\text{g/ml}$ durante 2 horas antes de realizar el ensayo de asociación al citoesqueleto descrito anteriormente. Como indicador de la estabilidad de los microtúbulos se analizó los niveles de tubulina presentes en las fracciones asociadas al citoesqueleto mediante Western Blot.

El nocodazol es un agente despolimerizante de microtúbulos derivado del benzimidazol, el cual se une a β -tubulina libre impidiendo su polimerización e inhibiendo la dinámica de los microtúbulos *in vitro* e *in vivo* (De Brabander *et al.*, 1976; Hoebeke *et al.*, 1976; Vasquez *et al.*, 1997).

10. Ensayo de unión a los microtúbulos in situ

Se siguió el protocolo descrito por Ding *et al.* en 2006. Veinticuatro horas después de la transfección, las células se disgregaron y lisaron en el tampón de estabilización de los microtúbulos, previamente calentado a 37 °C (PIPES/KOH 80 mM pH 6.8, GTP 1 mM, MgCl_2 1 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 0,5 % y glicerol 30 %, PMSF 1 mM, inhibidores de proteasas y Taxol 10 μM). Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 5.000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente y se recogió parte de los sobrenadantes, que constituyen la fracción postnuclear (FPN). El resto de los sobrenadantes se centrifugaron a 100.000 g durante una hora a temperatura ambiente. Se recogieron los sobrenadantes (la fracción soluble no unida a microtúbulos, FNUM) y los precipitados se lavaron, se disgregaron en el tampón de estabilización de los microtúbulos y se sonicaron durante 10 segundos (fracción unida a microtúbulos, FUM). Los niveles de Tau en cada una de las fracciones se analizaron mediante Western Blot.

El taxol o paclitaxel es un agente estabilizador de los microtúbulos, que se une a la subunidad β de la tubulina y estabiliza y protege a los microtúbulos polimerizados frente a la despolimerización (Schiff *et al.*, 1979; De Brabander *et al.*, 1981).

11. Ensayo de polimerización de tubulina in vitro

11.1. Expresión de las proteínas de fusión GST-Tau

Para poder llevar a cabo este ensayo de polimerización *in vitro* se necesita expresar las diferentes proteínas de fusión previamente. Se partió de un precultivo de bacterias *E. coli* *BL21* transformadas con los plásmidos pGEX-6P-1-GST-Tau WT, pGEX-6P-1-GST-T50A, pGEX-6P-1-GST-T50E, pGEX-6P-1-GST-T69A o pGEX-6P-1-GST-T69E, los cuales se inocularon en 50 ml de medio LBA estéril (medio LB estéril suplementado con 100 µg/ml de ampicilina), y se dejaron crecer toda la noche a 37 °C. Cuando la densidad óptica de los cultivos a 600 nm alcanzó entre 0,5 y 0,6, se añadió IPTG a concentración final 1 mM y se dejaron durante 4 horas más a 37 °C en agitación suave continua. Seguidamente, las células se centrifugaron a 5.000 g 5 minutos a 4 °C y posteriormente el precipitado se lavó dos veces con el tampón de lavado (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 150 mM y EDTA 1 mM). Tras la última centrifugación, el precipitado celular se dispersó, a 4 °C y con la ayuda de pipeta en 6 ml de tampón de lisis de bacterias (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, 0,1 % β-mercaptoetanol, 0,2 mM PMSF, 1 mM de benzamidina, 2 mM de EGTA, 2 mM de EDTA, 1 % Tritón X-100 y 0,25 M de NaCl). Una vez disgregados, y para favorecer la lisis celular, los precipitados se sometieron a un ciclo de congelación-descongelación (se congelaron en N₂ líquido durante 5 minutos y se descongelaron sumergiéndolos en agua fría). Finalmente, se realizaron 4 ciclos de sonicación con microtips, a máxima potencia (75 W) durante 1 minuto, seguido de 30 segundos en hielo sin sonicar. Tras los 4 ciclos, los lisados se centrifugaron a 60.000 g durante 40 minutos a 4 °C. Para terminar, se recogieron los sobrenadantes y se añadió glicerol hasta una concentración del 10 % para su conservación. El extracto se dividió en alícuotas y se conservó a -80 °C hasta su uso.

11.2. Purificación de las proteínas recombinantes

El siguiente paso es la purificación de las proteínas de fusión, para la cual se sigue el protocolo definido por Guan y Dixon, 1991 que consistió en añadir a los lisados bacterianos un volumen de 2,5 ml de una suspensión de glutatión-agarosa equilibrada previamente en un tampón de equilibrado [Tris-HCl 50 mM pH 7,5, β-mercaptoetanol 0,1 % (v/v) y Brij-35 0,03 % (v/v)]. A continuación, las muestras se incubaron durante 30 minutos a 4 °C con

agitación suave. Tras esta incubación, se centrifugaron a 5.000 g durante 5 minutos, y los precipitados se lavaron 4 veces con el tampón de lavado (tampón de equilibrado suplementado con NaCl 0,125 M). Una vez finalizada la última centrifugación, los precipitados se disgregaron en tampón trombina (tampón de lavado al que se añadió CaCl₂ 2,5 mM y 3 µg de trombina), lo que permitió liberar las proteínas de la glutatión-agarosa. Las suspensiones se incubaron durante 15 minutos a 25 °C y seguidamente se centrifugaron a 5.000 g durante 5 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes, que contienen bien la proteína Tau recombinante o bien sus mutantes, se dializaron frente a un tampón de diálisis, compuesto por Tris-HCl 50 mM pH 7,5, β-mercaptoetanol 0,1 % (v/v), PMSF 0,2 mM, EGTA 0,1 mM, Brij-35 0,03 % (v/v) y glicerol 50 % (v/v) y se almacenaron a -80 °C.

Para recuperar la glutatión-agarosa para usos posteriores, los precipitados se dispersaron en tampón glutatión [Tris-HCl 50 mM pH 7,5, β-mercaptoetanol 0,1 % (v/v), PMSF 0,2 mM y benzamidina 1 mM], suplementado en el momento con glutatión fresco 20 mM. A continuación se centrifugaron a 100 g durante 2 minutos y posteriormente se lavaron con el tampón glutatión con 5 mM de glutatión fresco. La glutatión-agarosa se recuperó finalmente en tampón de equilibrado.

11.3. Desfosforilación de las proteínas recombinantes

Para eliminar cualquier posible fosforilación basal de las proteínas de fusión que pudiera interferir con el análisis del papel de la fosforilación de Tau en los residuos Thr-50 y Thr-69, éstas se trataron con fosfatasas antes de realizar los ensayos de polimerización de tubulina *in vitro*. Para ello, las proteínas purificadas se llevaron a una concentración de 100 µM en un tampón de desfosforilación (Tris/HCl 50 mM pH 8, EGTA 0,1 mM y DTT 2 mM) y las reacciones se iniciaron añadiendo 1 mU de PP2A, permitiendo su curso durante 30 minutos a 37 °C. Las muestras tratadas se conservaron a -20 °C hasta su uso.

11.4. Medida de la polimerización de tubulina por turbidez

Las reacciones de polimerización de la tubulina *in vitro* se realizaron en tampón PIPES 80 mM pH 6,8, MgCl₂ 1 mM, EGTA 1 mM y glicerol 50 %, al que se añadió 10 µM de tubulina y 10 µM de cada una de las proteínas de fusión y se iniciaron mediante la adición de GTP 1 mM. Las reacciones se incubaron a 37 °C en agitación constante. La turbidez de

cada muestra se siguió midiendo la absorbancia a 340 nm en discontinuo, desde el tiempo cero hasta 45 minutos en intervalos de 30 segundos, utilizando para ello el lector de placas Victor³, de *PerkinElmer*.

12. Fraccionamiento celular con sarcosil

Se siguió el protocolo descrito en Ding *et al*, 2006. Veinticuatro horas después de la transfección, las células HEK-293 se recogieron en PBS frío. Una fracción de 50 µl se separó y las células, presentes en la misma, se lisaron en el tampón de lisis para extractos celulares totales (fracción TT, Tau total). El resto de la suspensión celular se centrifugó a 180 g durante 10 minutos a temperatura ambiente y las células se homogeneizaron en el tampón Mes (Mes 20 mM pH 6,8, NaCl 80 mM, MgCl₂ 1 mM, EGTA 2 mM, NaH₂PO₄ 10 mM, NaF 20 mM, PMSF 1 mM e inhibidores de proteasas), tras lo cual se centrifugaron a 4 °C durante 5 minutos a 500 g, para eliminar los núcleos, obteniéndose la fracción postnuclear (FPN). A continuación, la FPN se mantuvo durante 20 minutos a 4 °C, para despolimerizar los microtúbulos, tras lo cual se centrifugó a 200.000 g durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante o fracción soluble (FS) se recogió y el precipitado se disgregó en el tampón Mes suplementado con NaCl 500 mM, sucrosa 10 % y sarcosil 1 %. Las muestras se agitaron durante 30 minutos a temperatura ambiente, se incubaron toda la noche a 4 °C y finalmente se centrifugaron a 200.000 g durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante o fracción soluble a sarcosil (FSS) se recogió y el precipitado o fracción insoluble a sarcosil (FIS) se solubilizó en tampón de carga 2x. Los niveles de Tau en cada una de las fracciones se analizaron mediante Western Blot.

13. Ensayo de pérdida de fluorescencia después de la fotoactivación (FDAP)

Se siguió el protocolo descrito por Weissmann *et al*. en 2009. Esta técnica se realizó utilizando un microscopio de barrido láser confocal C1 de *Nikon* (Nikon Eclipse TE2000-U invertido), equipado con una cámara de incubación con temperatura y CO₂ controlados (los ensayos se ejecutaron a 37 °C y 5 % de CO₂). La adquisición de las imágenes se realizó utilizando el *software* EZ-C1. Las imágenes fueron tomadas a una resolución de 256 x 265 píxeles.

Cuatro días después de la transfección, las células PC-12 se visualizaron en el microscopio utilizando una longitud de onda de excitación de 488 nm y se escogió una célula. A continuación, se seleccionó una región de unos 6 μm de diámetro de la prolongación celular, se fotoactivó mediante un pulso de luz de 405 nm durante 1 milisegundo y se tomaron imágenes durante 112 segundos a razón de 1 imagen/segundo. El análisis de las imágenes se realizó según se describe en Igaev *et al.*, 2014.

14. Ensayo de aislamiento de membrana

Después de la transfección y de la diferenciación, las PC-12 se recogieron en PBS y se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos. A continuación, se suspendieron en 500 μl del tampón de fraccionamiento subcelular (Tris 10 mM, KCl 10 mM, MgCl_2 0,5 mM y EGTA 1 mM, PMSF 1 mM, leupeptina 10 $\mu\text{g/ml}$, pepstatina 10 $\mu\text{g/ml}$, pirofosfato sódico 1 mM, ortovanadato sódico 1 mM y NaF 20 mM), se homogenizaron (con 10 movimientos) y se centrifugaron a 2.000 g durante 5 minutos para eliminar los núcleos. Los sobrenadantes se centrifugaron a 110.000 g durante 20 minutos. Se recogieron los sobrenadantes (fracción citosólica, FC) y el precipitado se resuspendió en el tampón anterior, constituyendo la fracción de membrana plasmática (FPM). En cada una de las fracciones se analizó los niveles de Tau mediante Western blot.

15. Análisis estadístico

Todos los tratamientos experimentales se realizaron por triplicado y cada experimento se repitió al menos tres veces. Los resultados se muestran como la media y su correspondiente error estándar. La comparación estadística entre los grupos experimentales se realizó mediante el test de la *t* de Student. La diferencia entre los grupos experimentales se consideró significativa cuando sus medias mostraron una $p < 0,05$.

IV. Resultados

Capítulo 1. Estudio del efecto del estrés hiperosmótico sobre Tau en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y

La hiperosmolaridad, que se define como el aumento anormal de la concentración osmolar en la sangre o en otros líquidos corporales, representa un estrés muy importante para las células, debido a la pérdida de agua por ósmosis y la consecuente contracción del tamaño de éstas. Las células poseen mecanismos para compensar la hiperosmolaridad, como acumular pequeñas moléculas orgánicas e iones inorgánicos o biomoléculas específicas osmoprotectoras que las protegen de la deshidratación causada por las fluctuaciones osmóticas (Libiouille *et al.*, 1996) y que no afectan física ni bioquímicamente a ningún proceso celular y actúan aumentando la osmolaridad interna de la célula y posibilitando la entrada de agua del exterior de manera más eficiente (Burg *et al.*, 2007).

El estrés hiperosmótico en el cerebro está asociado con varias alteraciones fisiopatológicas como la hipernatremia, la deshidratación, la hiperglucemia, la insuficiencia renal y con traumas o edemas producidos por un tumor cerebral. En estas condiciones se produce un movimiento de agua desde las células nerviosas hacia el plasma, lo que provoca una disminución en el volumen del cerebro como consecuencia de la contracción celular.

Durante este proceso tienen lugar importantes reorganizaciones del citoesqueleto que afectan tanto a la morfología como a las funciones de las neuronas. Si el estrés hiperosmótico es severo o se prolonga en el tiempo, las neuronas pierden la capacidad de regular su volumen, lo que provoca su muerte y la aparición de trastornos neurológicos (Simon y Freedman, 1980). El efecto directo que tiene la hiperosmolaridad sobre células del sistema nervioso ha sido poco estudiado, aunque se ha mostrado que induce la fosforilación de Tau, de HSP27 y la activación de caspasa 3 (Jenkins *et al.*, 2000; Stoothoff y Johnson, 2001; Niswander y Dokas, 2006, 2007).

En base a lo descrito anteriormente, en este primer capítulo hemos estudiado, con mayor profundidad, los mecanismos moleculares implicados en las modificaciones postraduccionales que tienen lugar en Tau en respuesta al estrés hiperosmótico y su posible relación con la muerte neuronal. Como agente inductor de estrés hiperosmótico hemos

utilizado el sorbitol, por ser el compuesto que más se utiliza en este tipo de estudios y por ser un potente activador de las rutas de señalización de las MAPKs e inducir apoptosis en varios tipos celulares (Sheikh-Hamad y Gustin, 2004; Zhong *et al.*, 2007).

1. Proteólisis de Tau y muerte celular por apoptosis

1.1. El estrés hiperosmótico induce proteólisis de Tau

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio (Olivera Santa-Catalina, 2012) mostraban que el sorbitol inducía la proteólisis de Tau de una forma dependiente al tiempo de exposición (figura 1.1-A) y que este efecto estaba mediado por caspasa 3 ya que su inhibidor específico, el compuesto Z-DEVD-fmk, prevenía la aparición de la forma proteolizada de Tau y la de su sustrato específico PARP-1 (figura 1.1-B).

Pero varios estudios muestran que además de la caspasa 3, la caspasa 6 juega un papel muy importante en la proteólisis de Tau asociada a la EA (ver capítulo de Introducción). Estos estudios, junto con el hecho de que caspasa 6 puede ser activada por caspasa 3 (LeBlanc, 2013), nos llevó a plantearnos la posibilidad de, si en nuestras condiciones experimentales, caspasa 6 podría estar también implicada en la proteólisis de Tau. Por ello, y como primera aproximación, analizamos la presencia del fragmento activo de caspasa 6 en respuesta a sorbitol y su posible regulación por caspasa 3. Tal y como podemos observar en la figura 1.1-C, el sorbitol produjo un aumento en los niveles del fragmento activo de caspasa 6, aumento que se previno casi completamente en presencia del inhibidor Z-DEVD-fmk. Estos resultados sugerían que la caspasa 6 podría contribuir en la proteólisis de Tau inducida por sorbitol.

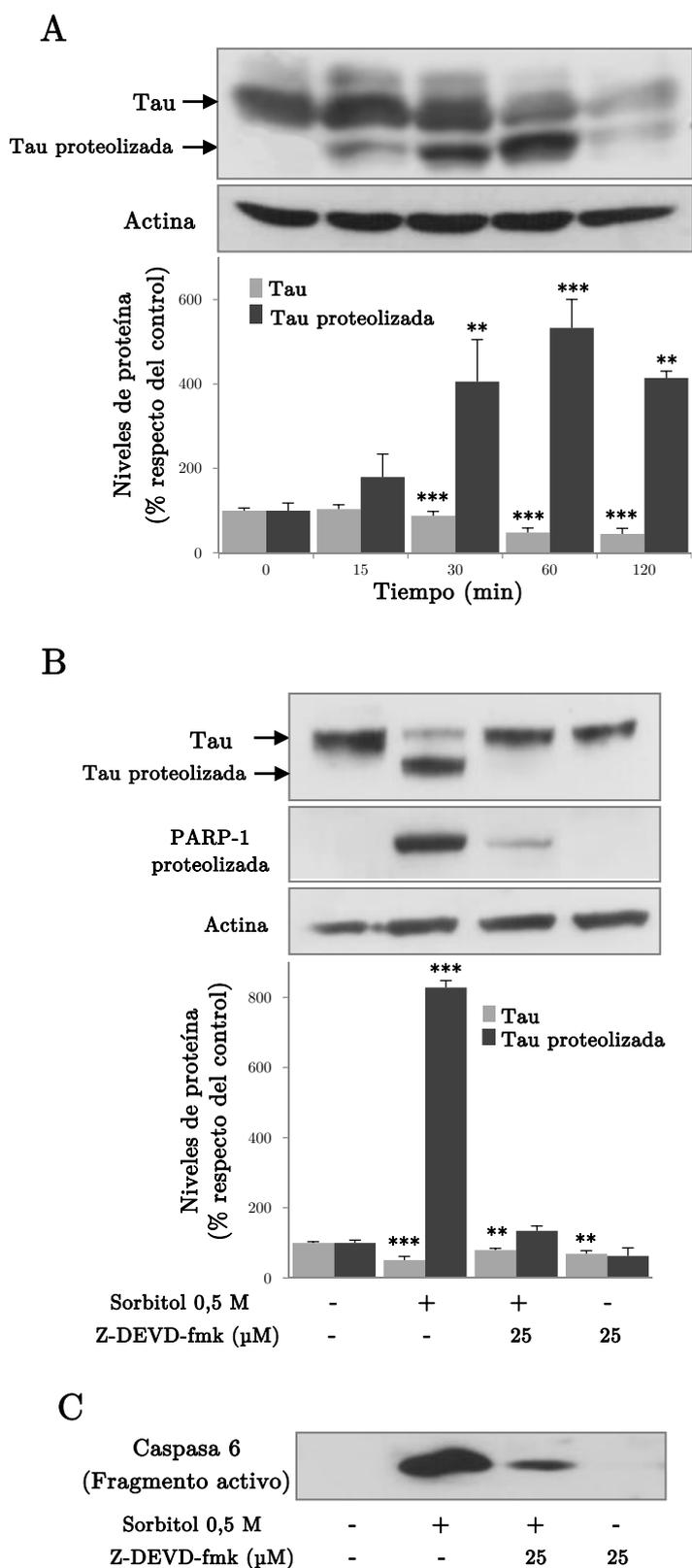


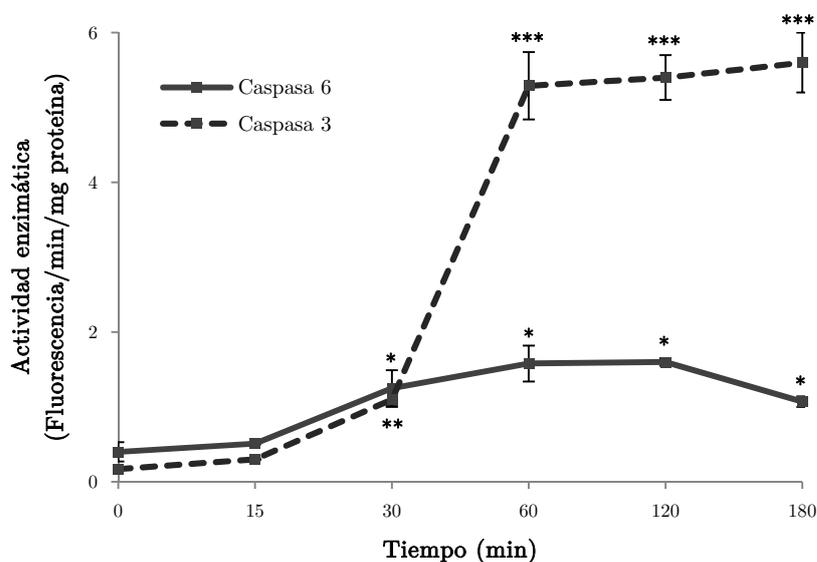
Figura 1.1.- El estrés hiperosmótico induce la proteólisis de Tau. **A:** Estudio tiempo-respuesta. Las células se incubaron en ausencia de sueros durante 12 horas y, a continuación, se trataron con sorbitol 0,5 M durante los tiempos indicados en la figura. **B y C:** Efecto del inhibidor de caspasa 3, Z-DEVD-fmk. Las células se pretrataron durante 1 hora con 25 µM del inhibidor Z-DEVD-fmk

antes de incubarlas con sorbitol 0,5 M durante 1 h más. Al final de cada experimento, los niveles de las diferentes proteínas se analizaron mediante Western blot. En la figura se muestra una imagen representativa y el análisis densitométrico correspondiente a la media \pm el error estándar de la media (EEM) de, al menos, 3 experimentos independientes. Los datos se expresan como el porcentaje de Tau (íntegra o proteolizada) con respecto al control. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$, comparado con las células sin tratar.

1.2. El tratamiento con sorbitol promueve la activación de caspasa 6 en las células SH-SY5Y

A la vista de los resultados anteriores decidimos estudiar si caspasa 6 podría estar implicada en la proteólisis de Tau inducida por el estrés hiperosmótico. Por ello, lo primero que hicimos fue examinar si el sorbitol promovía la activación de esta proteasa. De forma paralela, analizamos la activación de caspasa 3/7. En la figura 1.2-A se puede observar que el sorbitol produjo un aumento en la actividad de la caspasa 6 de manera dependiente del tiempo de incubación. El incremento en la actividad de caspasa 6 fue rápido y significativo a los 30 minutos y alcanzó el máximo a los 60 minutos, manteniéndose hasta el final de experimento (3 horas). De forma paralela, el sorbitol indujo un aumento en la actividad de la caspasa 3, tal y como habíamos observado previamente (Olivera Santa-Catalina, 2012), aunque el aumento de activación de esta caspasa fue casi 3 veces más intensa que la de caspasa 6. En estos mismos experimentos, analizamos la presencia del fragmento activo de ambas caspasas y como podemos observar en la figura 1.2-B, éstos comenzaron a aparecer a los 30 minutos, alcanzando sus niveles máximos a los 60 minutos, para disminuir a continuación a pesar de que las actividades enzimáticas se mantuvieron en el tiempo. Si bien los resultados de presencia de fragmento activo de caspasa no coinciden completamente con la actividad, esta correlación sí se observa al comparar la activación de caspasa 3 y su capacidad de proteolizar a uno de sus sustratos, ya que el aumento en los niveles de PARP-1 proteolizada iba en paralelo con los niveles de activación de la proteasa (figura 1.2-B). El mismo tipo de experimentos se realizó para la proteólisis de la proteína lamina A, sustrato específico de caspasa 6, pero no fue detectada por Western blot en este tipo celular y en nuestras condiciones.

A



B

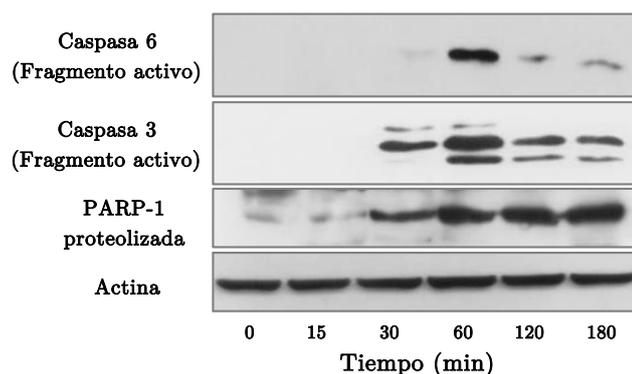


Figura 1.2.- La actividad y el fragmento activo de las caspasas 6 y 3 aumentan en respuesta al tratamiento con sorbitol. **A:** La actividad de las caspasa 6 y 3 se determinó en los lisados celulares mediante espectrofluorimetría, según se detalla en el apartado Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como el incremento de fluorescencia/minuto/mg de proteína. Se muestra la media \pm EEM de dos experimentos independientes medidos por triplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$, con respecto al control. **B:** Los niveles de las diferentes proteínas se analizaron mediante Western blot. En la figura se muestra una imagen representativa de dos experimentos independientes.

1.3. La inhibición de la actividad caspasa 6 previene parcialmente la proteólisis de Tau

Una vez comprobado que la caspasa 6 se activaba en respuesta a sorbitol, se procedió a determinar su papel en la proteólisis de Tau. Con este fin, las células se incubaron con sorbitol en ausencia o presencia de diferentes concentraciones del inhibidor de caspasa 6, el compuesto Z-VEID-fmk.

En la figura 1.3-A, se puede observar que la proteólisis de Tau inducida por sorbitol se previno parcialmente en presencia del inhibidor de caspasa 6, siendo esta prevención significativa a partir de una concentración de 2 μ M. El efecto del inhibidor Z-VEID-fmk fue específico ya que inhibió la actividad de caspasa 6 de manera dependiente de su concentración (figura 1.3-B). Por otra parte, con objeto de saber si podría existir una interacción entre caspasa 6 y caspasa 3, en estos mismos experimentos estudiamos la activación de caspasa 3 analizando por una parte los niveles del fragmento activo de la misma, y por otra la presencia del fragmento proteolizado de su sustrato PARP-1. Como se puede ver en la figura 1.3-C, el inhibidor Z-VEID-fmk produjo una disminución en la actividad de caspasa 3 pero sólo cuando se utilizó a la concentración más elevada de 10 μ M, no afectando a dicha actividad cuando se utilizó a bajas concentraciones de 2 y 5 μ M. En conjunto estos resultados indican que la caspasa 6 está implicada en la proteólisis de Tau inducida por el estrés hiperosmótico y que elevadas concentraciones del inhibidor Z-VEID-fmk pueden inhibir la activación de la caspasa 3.

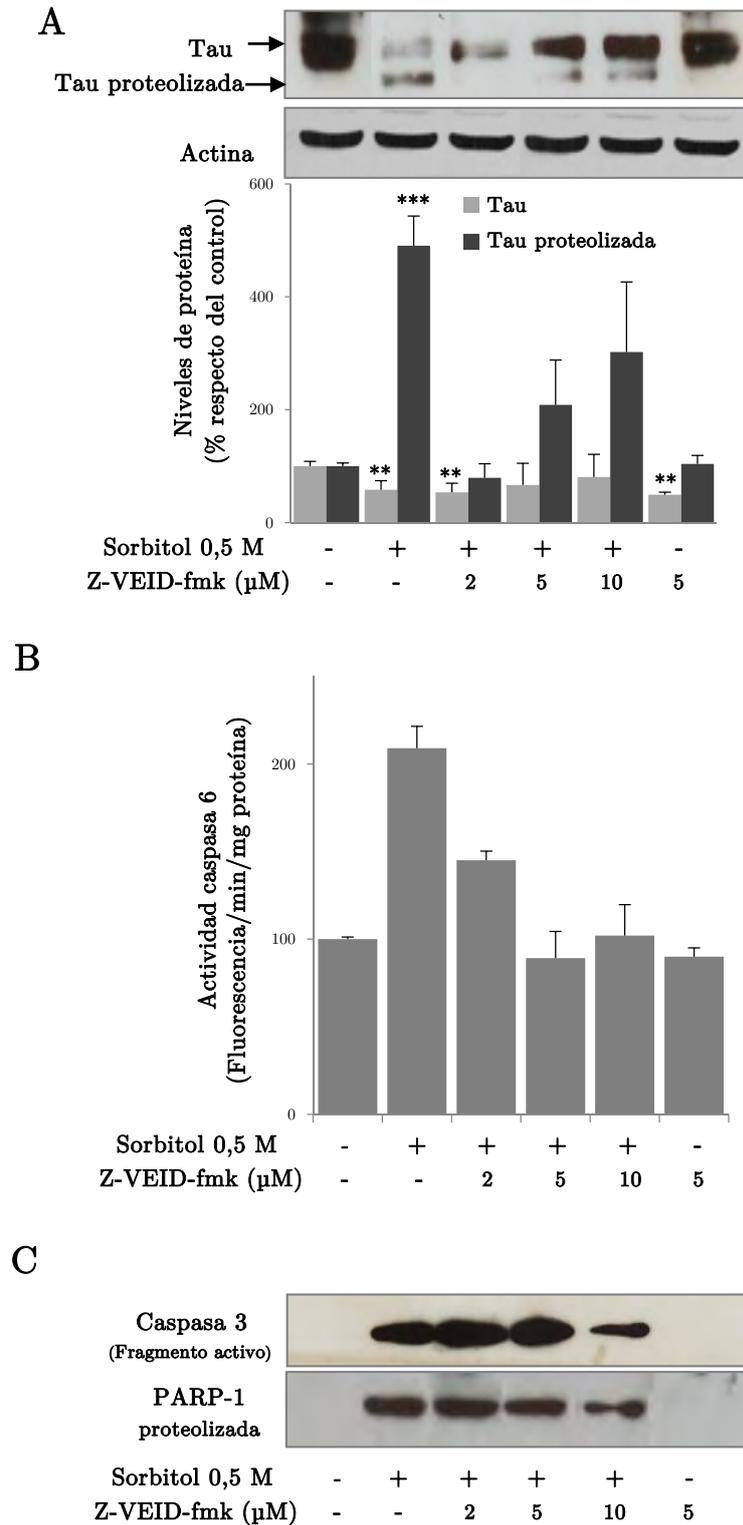


Figura 1.3.- La proteólisis de Tau inducida por sorbitol está mediada por caspasa 6. Las células SH-SY5Y se incubaron con sorbitol 0,5 M en ausencia o presencia de diferentes concentraciones del inhibidor de caspasa 6, Z-VEID-fmk. Al final de cada experimento, la proteólisis de Tau se analizó mediante Western blot (A), la actividad de caspasa 6 se estudió mediante espectrofluorimetría (B) y la activación de caspasa 3 se determinó, de forma indirecta, analizando el fragmento activo de la misma y la proteólisis de su sustrato, PARP-1, mediante Western blot (C). En la figura se muestra una imagen representativa y el análisis densitométrico

correspondiente a la media \pm EEM de tres experimentos independientes. La actividad enzimática se expresa como incremento de fluorescencia/minuto/mg de proteína y se muestra la media \pm EEM de dos experimentos independientes medidos por triplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$, con respecto al control.

1.4. La proteína Tau es proteolizada en el extremo N-terminal por caspasa 6 y caspasa 3

En el capítulo de Introducción vimos que los sitios de corte de caspasa 6 en Tau se localizan en el Asp-13 y posiblemente en el Asp-402 y Asp-421, mientras que caspasa 3 corta en el Asp-25 y el Asp-421 (Wang *et al.*, 2007b). Con el objetivo de averiguar en qué extremo de Tau cortan estas proteasas en nuestras condiciones experimentales, realizamos una serie de experimentos en los que utilizamos células de neuroblastoma transfectadas con la construcción pCMV5-HA-hTau40. Se utilizó esta construcción porque la proteólisis de Tau en su extremo N-terminal se puede seguir fácilmente mediante la utilización de anticuerpos que reconozcan la etiqueta HA situada en el extremo N-terminal de Tau. Por otra parte, la proteólisis de Tau en la posición Asp-421 se estudió utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente esa forma truncada de Tau (Tau-C3).

Pero antes de comenzar este estudio, teníamos que saber si la Tau exógena respondía de la misma forma que la Tau endógena al estrés hiperosmótico. Por ello, las células transfectadas se incubaron en presencia de sorbitol 0,5 M durante diferentes periodos de tiempo, tras los cual analizamos la proteína Tau mediante Western blot. En la figura 1.4-A se puede observar que el tratamiento con sorbitol también produjo la proteólisis de Tau recombinante (Tau exógena, de unos 70 KDa) de una manera dependiente del tiempo de incubación. Resulta importante destacar que tanto el patrón de fragmentación como el marco temporal fueron similares a los observados en la proteína Tau endógena. Por otra parte, cuando se examinó la expresión de la proteína Tau recombinante, mediante Western blot, utilizando un anticuerpo que reconoce la etiqueta HA, se observó que ésta desaparecía casi totalmente después de 1 hora de tratamiento con sorbitol. Estos resultados sugieren que la proteólisis de Tau en respuesta a estrés hiperosmótico tiene lugar, al menos en parte, en el extremo amino terminal. El efecto del sorbitol sobre la proteólisis de Tau en el extremo C-terminal lo desconocemos ya que el anticuerpo Tau-C3 no reconoció esta forma truncada de Tau en nuestras condiciones experimentales.

Una vez que comprobamos que el sorbitol promovía la proteólisis de Tau en el extremo N-terminal quisimos saber qué caspasa estaba mediando este efecto. Por lo que las células transfectadas con el vector de expresión pCMV5-HA-hTau40 se incubaron con sorbitol en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de los inhibidores específicos de caspasa 6 y de caspasa 3. Los resultados obtenidos, que se muestran en la figura 1.4-B, indican que ambas proteasas están implicadas en el procesamiento del extremo N-terminal de Tau, dado que su inhibición previene parcialmente la desaparición de HA.

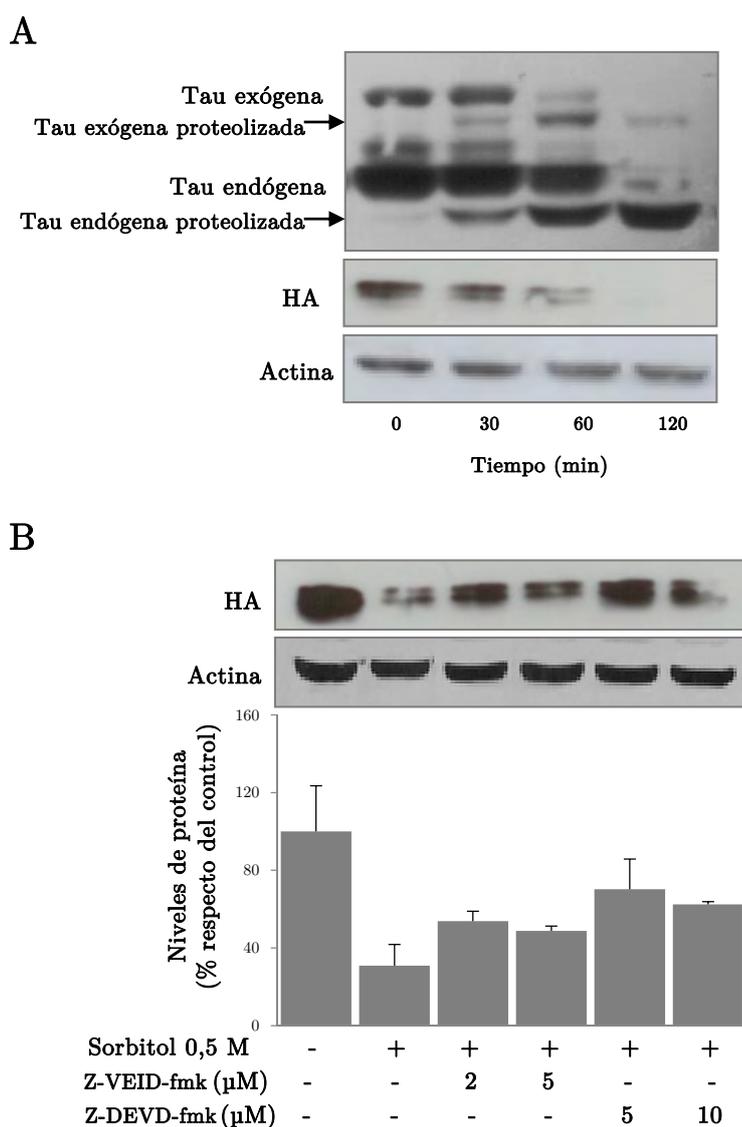


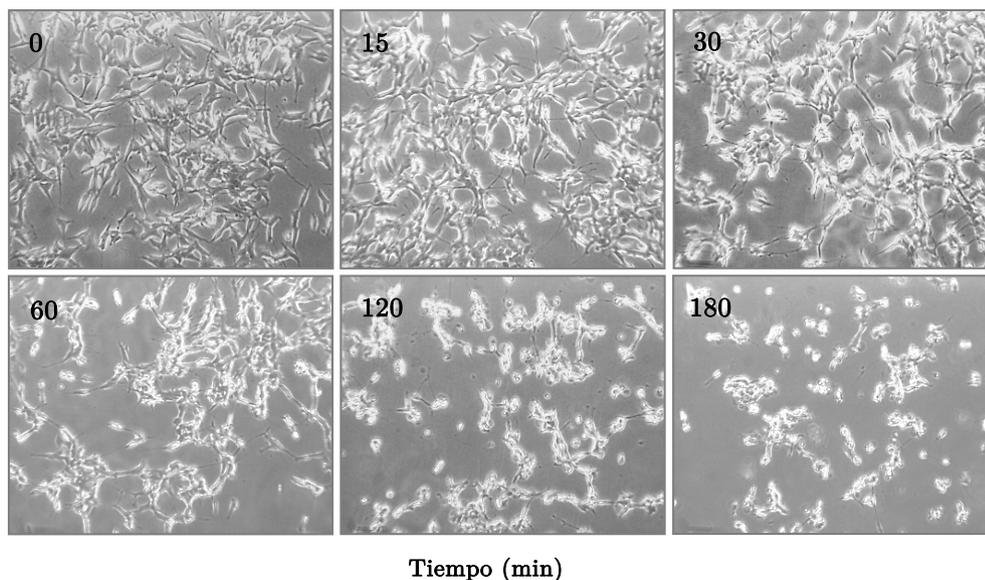
Figura 1.4.- El sorbitol induce la proteólisis de Tau en el extremo N-terminal: papel de caspasa 6 y 3. **A:** Estudio tiempo-respuesta. Las células transfectadas con el vector de expresión pCMV5-HA-hTau40 fueron privadas de suero durante 12 horas antes de estimularlas con sorbitol 0,5 M durante los tiempos indicados en la figura. **B:** Efecto de la inhibición de caspasa 6 y 3. Las células transfectadas se pretrataron durante 1 hora con diferentes concentraciones del inhibidor de caspasa 6, Z-VEID-fmk, y del inhibidor de caspasa 3, Z-DEVD-fmk y, a continuación, se incubaron con 0,5 M

de sorbitol durante 1 hora más. La presencia de Tau y de HA en los lisados celulares se analizó mediante Western Blot. En la figura se muestra una imagen representativa y el análisis densitométrico correspondiente a la media \pm EEM de dos experimentos independientes. Los datos se expresan como el porcentaje de los niveles de HA-Tau con respecto al control.

1.5. El estrés hiperosmótico promueve cambios en la morfología y la muerte por apoptosis en las células SH-SY5Y

Se ha manifestado en numerosos trabajos que la proteólisis de Tau está asociada a eventos tempranos de apoptosis y a alteraciones del citoesqueleto celular (Fasulo *et al.*, 2000). Por ello, quisimos comprobar si en nuestras condiciones experimentales, la proteólisis de Tau observada estaba asociada con estos eventos. En primer lugar estudiamos el efecto del estrés hiperosmótico sobre la morfología celular. Como se puede observar en la figura 1.5-A, el sorbitol produjo cambios morfológicos que fueron dependientes del tiempo de incubación. Las células comenzaron a padecer el efecto del estrés hiperosmótico a tiempos muy cortos, en los primeros 15 minutos, donde se pudo apreciar una disminución del volumen celular. A medida que transcurría el tiempo, se observaron numerosas células con una morfología redondeada y refringente, alguna de ellas flotando en el medio de cultivo. A las 3 horas de exposición a sorbitol, una gran parte de las células se encontraron suspendidas en el medio. Estas observaciones sugerían que el sorbitol podría estar induciendo la muerte celular, por lo que lo siguiente que hicimos fue cuantificar la viabilidad celular en las mismas condiciones experimentales utilizando para ello dos métodos diferentes, el del MTT y el de azul tripano, tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos indican que el sorbitol promueve una disminución en la viabilidad celular que era dependiente del tiempo de incubación (figura 1.5-B). El porcentaje de células vivas disminuyó significativamente a partir de los 30 minutos, llegando a ser mínimo a las 3 horas. Cabe destacar que se obtuvieron datos muy similares con ambas técnicas, dando validez a los resultados.

A



B

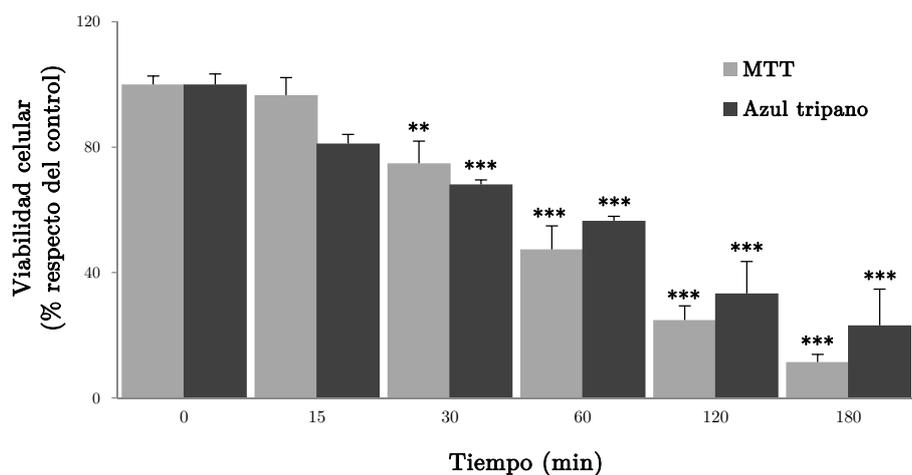


Figura 1.5.- El estrés hiperosmótico promueve cambios morfológicos y disminución de la viabilidad celular. Las células fueron privadas de suero durante 12 horas antes de estimularlas con sorbitol 0,5 M durante los tiempos indicados en la figura. **A:** A continuación, la morfología celular se observó a través de un microscopio de contraste de fases a 100x aumentos y se realizaron las correspondientes fotografías. **B:** La viabilidad celular se determinó mediante el método colorimétrico del MTT y del azul tripano, según se describe en el apartado Materiales y Métodos. La viabilidad celular se expresa como el porcentaje de células viables con respecto al control. Se muestra la media \pm EEM de tres experimentos independientes medidos por triplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$, comparado con las células sin tratar.

Una vez evidenciado que el sorbitol disminuye la viabilidad celular, el siguiente paso fue esclarecer qué tipo de muerte sufrían estas células en respuesta a sorbitol. Como la proteólisis de Tau está asociada al proceso de apoptosis, y éste se ha relacionado frecuentemente con la muerte celular observada en la enfermedad de Alzheimer y en otras enfermedades neurodegenerativas (Cotman y Anderson, 1995; Castro *et al.*, 2010), decidimos estudiar si el sorbitol inducía apoptosis en nuestras condiciones experimentales. Así, en primer lugar analizamos la presencia de células que están sufriendo apoptosis mediante citometría de flujo, ya que uno de los marcadores que indican muerte por apoptosis es el contenido hipodiploide del ADN de las células. Como se puede observar en la figura 1.6-A, el sorbitol produjo un aumento en el porcentaje de células apoptóticas que fue dependiente del tiempo de exposición. El efecto fue significativo desde los 30 min de incubación y aumentó progresivamente hasta las 3 horas, que fue el último tiempo estudiado. En segundo lugar, estudiamos el efecto del sorbitol sobre la morfología nuclear, ya que algunas características que definen el proceso de apoptosis son la condensación de la cromatina y la fragmentación del núcleo. Para ello, las células se visualizaron mediante microscopía confocal después de haber teñido los núcleos con DAPI, tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. Como se muestra en la figura 1.6-B, la aparición de núcleos condensados fue evidente después de 1 hora de tratamiento con sorbitol (cabezas de flechas en color blanco). A las 2 h, se observó gran cantidad de cuerpos apoptóticos en relación con el número total de células (cabezas de flechas en color blanco). Por último, analizamos si el sorbitol inducía la fragmentación internucleosomal del ADN, que es la característica bioquímica que define el proceso de apoptosis. Como se muestra en la figura 1.6-C, la fragmentación internucleosomal del ADN se observó a los 30 min aunque fue más patente a las 2 y 3 horas de exposición al sorbitol.

En conjunto, estos resultados muestran que la proteólisis de Tau inducida por el estrés hiperosmótico está asociada a la muerte celular por apoptosis.

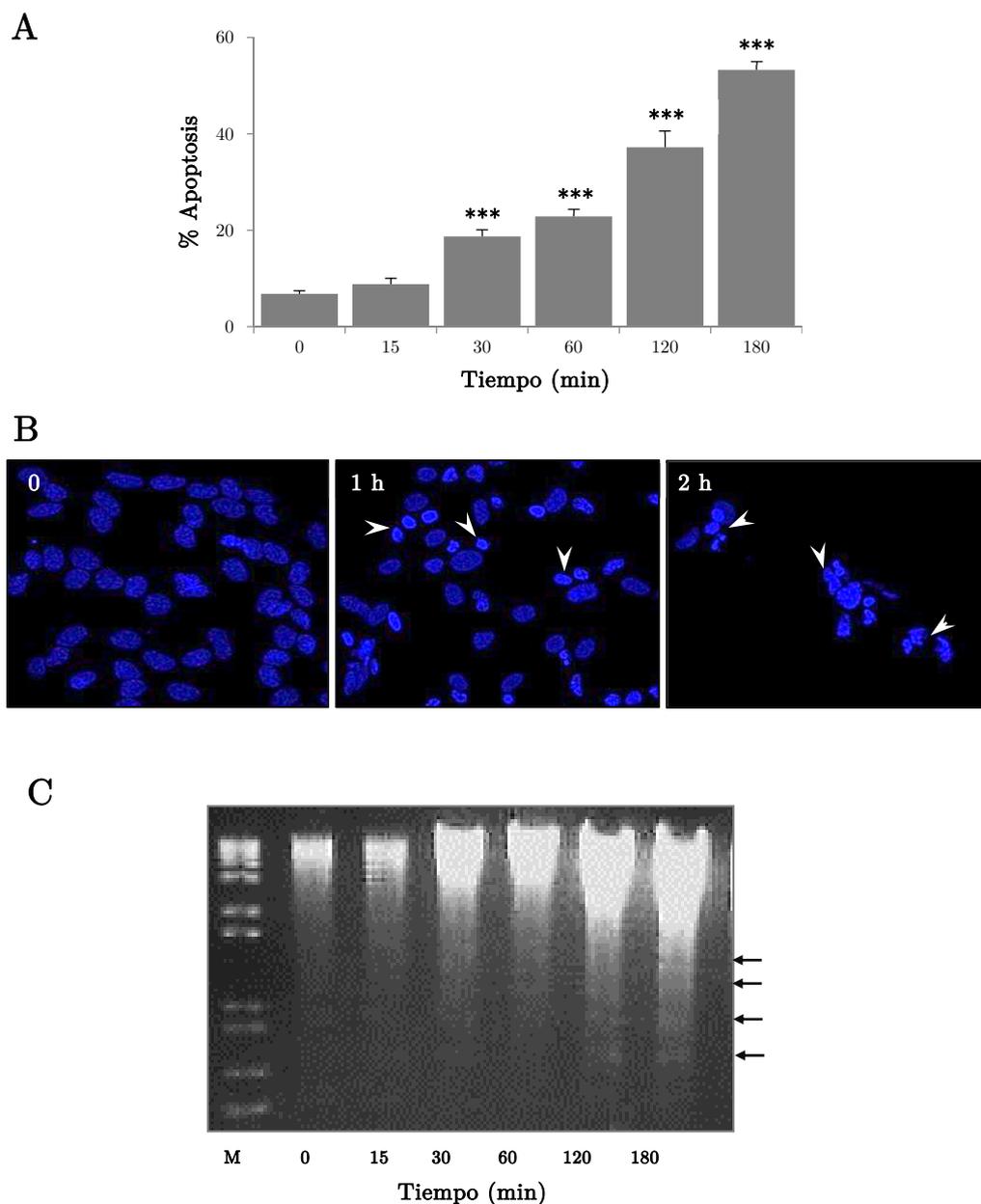


Figura 1.6.- El estrés hiperosmótico induce la apoptosis de las células SH-SY5Y. Las células se incubaron durante 12 horas en ausencia de suero, tras lo cual se trataron con sorbitol 0,5 M durante los tiempos indicados en la figura. **A:** Cuantificación de la apoptosis. Al final del experimento, la proporción de células que presentaban ADN hipodiploide se determinó por citometría de flujo, según se describe en el apartado Materiales y Métodos. Cada valor representa la media \pm EEM de tres experimentos diferentes. *** $p < 0,001$, comparado con las células control. **B:** Morfología nuclear. Después del tratamiento, las células se fijaron con paraformaldehído, se tiñeron con DAPI y se analizaron por microscopía confocal. Las cabezas de flecha blancas indican la presencia de núcleos condensados y fragmentados. **C:** Fragmentación internucleosomal del ADN. Después del tratamiento, las células se lisaron y el ADN presente en el citoplasma de la célula se purificó y analizó, según se detalla en el apartado de Materiales y Métodos. En la figura se muestra una imagen representativa de 2 experimentos independientes. M hace referencia al marcador de pesos moleculares y las flechas a las bandas del ADN fragmentado.

1.6. La inhibición conjunta de las caspasas 6 y 3 previene la apoptosis de las células SH-SY5Y inducida por estrés osmótico

Tras comprobar que se produce apoptosis debido al estrés hiperosmótico inducido por sorbitol, el siguiente paso fue evaluar el papel de las caspasas 6 y 3 en este proceso. Con este fin, las células se pretrataron con los inhibidores de estas caspasas, de forma individual o conjunta, se estimularon con sorbitol durante una hora y la apoptosis se analizó mediante citometría de flujo. En la figura 1.7-A se puede observar que la inhibición de caspasa 6 no previno la aparición de apoptosis con ninguna de las concentraciones del inhibidor Z-VEID-fmk utilizada. Concentraciones bajas del inhibidor de caspasa 3, tampoco previnieron la apoptosis inducida por sorbitol. Sin embargo, la concentración del inhibidor de caspasa 3 más alta utilizada, la de 25 μ M, sí que la previno. Ya que esta concentración inhibía la activación de las caspasas 3 y 6 (figura 1.1) decidimos estudiar si la inhibición conjunta de ambas caspasas era necesaria para prevenir el proceso de apoptosis inducido por sorbitol. Para ello, las células se incubaron con sorbitol en presencia de bajas concentraciones de ambos inhibidores. Como se puede observar en la figura 1.7-A, la apoptosis inducida por sorbitol sí que se previno, aunque de forma parcial, cuando las células se incubaron en presencia de bajas concentraciones de ambos inhibidores.

Estos resultados sugerían que para prevenir la apoptosis inducida por sorbitol era necesario inhibir la actividad de ambas caspasas. Para comprobar este hecho, lo que hicimos fue estudiar el efecto del inhibidor general de caspasas, el compuesto Z-VAD-fmk, en nuestras condiciones experimentales. Como podemos ver en la figura 1.7-B, elevadas concentraciones de este inhibidor previno completamente la apoptosis inducida por sorbitol.

En conjunto nuestros resultados sugieren que la caspasa 6 y la caspasa 3 inducen la proteólisis de Tau en respuesta a sorbitol de forma independiente, pero que es necesaria su acción conjunta para que las células mueran por apoptosis en respuesta a este tipo de estrés.

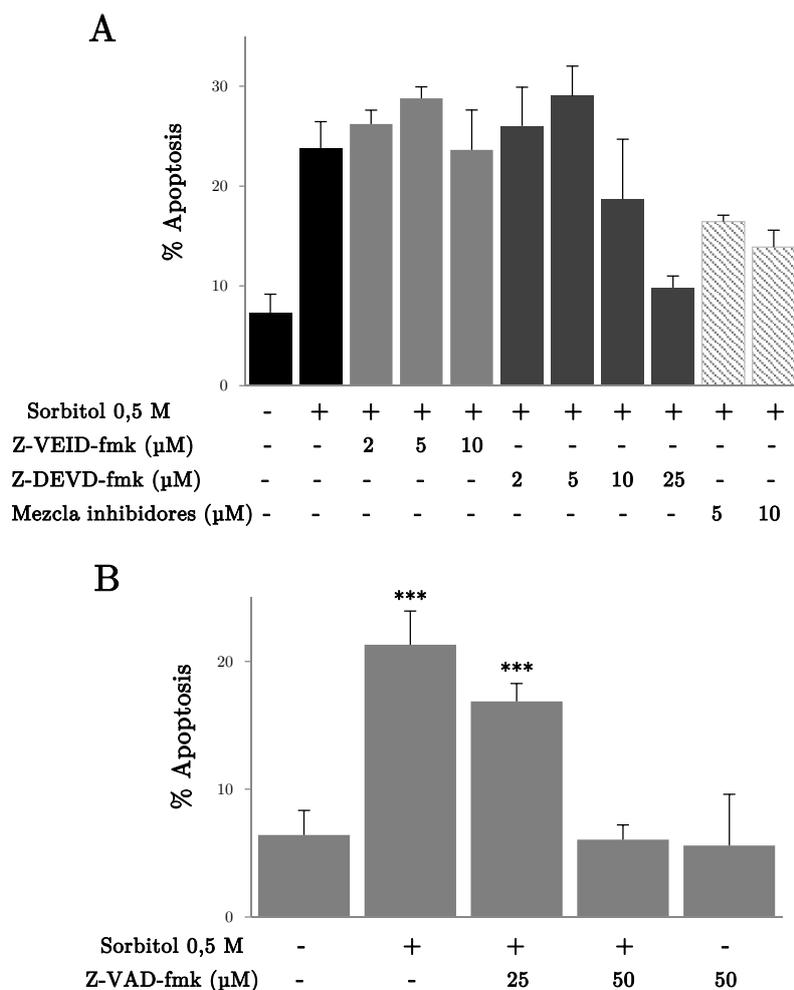


Figura 1.7.- Las caspasas 6 y 3 median la apoptosis inducida por sorbitol. Las células privadas de suero durante 12 horas fueron tratadas con sorbitol 0,5 M en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de los inhibidores de caspasa 6, (Z-VEID-fmk) y de caspasa 3 (Z-DEVD-fmk) (**A**) y del inhibidor general de caspasas (Z-VAD-fmk) (**B**). Al final del experimento, la proporción de células que presentaban ADN hipodiploide se determinó por citometría de flujo, como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. Cada valor representa la media \pm EEM de dos experimentos diferentes realizados por duplicado. *** $p < 0,001$, comparado con las células control.

2. Fosforilación de la proteína Tau

2.1. El estrés hiperosmótico induce la fosforilación de Tau

Como se expuso en el capítulo de Introducción, la fosforilación es la modificación postraduccional más importante y estudiada de Tau, ya que está implicada en el inicio y el desarrollo de las diferentes patologías asociadas con la proteína. Así, la fosforilación aberrante es una de las causas de la agregación de Tau y los residuos fosforilados que se encuentran en estos agregados constituyen marcadores de las enfermedades neurodegenerativas.

La regulación de la fosforilación de Tau en los dominios de repetición y las regiones adyacentes ha sido ampliamente estudiada, sin embargo poco se sabe de la regulación de la fosforilación de Tau en su extremo N-terminal. Debido a ello, nos propusimos estudiar la regulación de la fosforilación de Tau en el residuo Thr-50. Elegimos este sitio de fosforilación porque sólo está presente en las isoformas de Tau de especies animales que desarrollan de forma espontánea filamentos de esta proteína, como en humanos, otros primates, cabras y vacas (Nelson *et al.*, 1996) y se encuentra fosforilado en los NFTs (Feijoo *et al.*, 2005). Por otra parte, y con objeto de saber si el estrés hiperosmótico regula la fosforilación de diferentes residuos de Tau de la misma manera, estudiamos la fosforilación de Tau en otro residuo presente en el extremo N-terminal, la Thr-69, y en dos residuos situados en la región rica en prolinas, la Thr-181 y la Thr-205. Escogimos estos últimos residuos de Tau, ya que también se encuentran fosforilados en los NFTs y su nivel de fosforilación en el líquido cefalorraquídeo se utiliza como marcador de la EA (Godemann *et al.*, 1999; Hanger *et al.*, 2009; Blennow *et al.*, 2012).

Para comenzar con nuestros estudios, las células se incubaron en presencia de sorbitol 0,5 M durante diferentes periodos de tiempo, tras lo cual los niveles de fosforilación de Tau en cada uno de los residuos se analizó mediante Western blot utilizando anticuerpos de Tau fosfoespecíficos. Como se muestra en la figura 1.8, el tratamiento con sorbitol indujo un rápido aumento en la fosforilación de Tau en la posición Thr-50, que resultó ser dependiente del tiempo de incubación, comenzando a los 15 minutos y alcanzando su máximo a los 60 minutos, para disminuir a continuación. Resultados similares se obtuvieron cuando se analizó la fosforilación de Tau en los residuos

Thr-181 y Thr-205. Sin embargo, el sorbitol no estimuló la fosforilación de Tau en el residuo Thr-69, y lo que se observó fue una disminución en los niveles de fosforilación del mismo a partir de la hora de incubación con sorbitol. Es importante destacar que sólo se detectó fosforilación en la proteína Tau completa y no en la forma proteolizada (figura 1.8). En función de estos resultados, los experimentos posteriores de este trabajo se realizaron utilizando un tiempo fijo de tratamiento con sorbitol de 1 hora, que es el tiempo en el que se detectó la fosforilación máxima de la Thr-50.

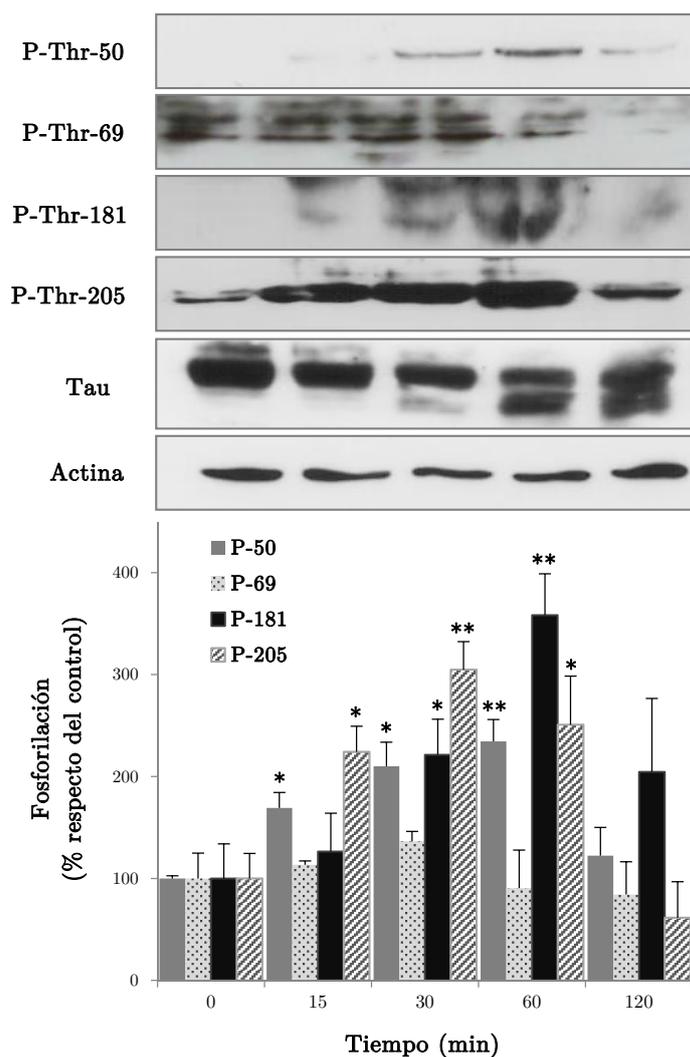


Figura 1.8.- El estrés hiperosmótico promueve la fosforilación de diversos residuos de Tau. Las células privadas de suero durante 12 horas se trataron con sorbitol 0,5 M durante los tiempos indicados en la figura. Después del experimento, las células se lisaron y cantidades iguales de proteína (10 µg para la detección de Tau total y actina y 30 µg para las formas fosforiladas de Tau) se analizaron por Western blot. En la figura se muestra un blot representativo y el análisis densitométrico correspondiente a la media \pm EEM de tres experimentos independientes. Los datos se expresan como el porcentaje de los niveles de Tau fosforilada con respecto al control. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$, comparado con las células sin tratar.

2.2. Activación de las MAPKs en respuesta al estrés hiperosmótico

Una vez comprobado que el tratamiento con sorbitol promovía un aumento en la fosforilación de los residuos Thr-50, Thr-181 y Thr-205 de Tau, nuestro siguiente objetivo fue estudiar si las rutas de señalización de las MAPKs, y en particular las rutas de las p38s, de las ERK 1/2 y de las JNKs, podrían estar implicadas en este proceso. Para ello, en primer lugar estudiamos si el sorbitol inducía la activación de estas quinasas. En la figura 1.9 se puede observar que el sorbitol promovió la fosforilación, y por tanto la activación, de las quinasas estudiadas, aunque los patrones de activación fueron diferentes entre ellas. Mientras que los niveles de fosforilación de las p38s y las ERK 1/2 aumentaron rápida y progresivamente durante los primeros 60 minutos, para después mantenerse o disminuir ligeramente, los niveles de fosforilación de las JNKs alcanzaron un máximo a los 30 minutos, disminuyendo bruscamente a continuación, aunque siguieron por encima de los niveles basales durante las 2 horas que duró el experimento. Los efectos del sorbitol fueron específicos sobre la fosforilación de las quinasas, ya que, como se puede observar en la figura 1.9, los niveles totales de las mismas no resultaron afectados por el choque osmótico.

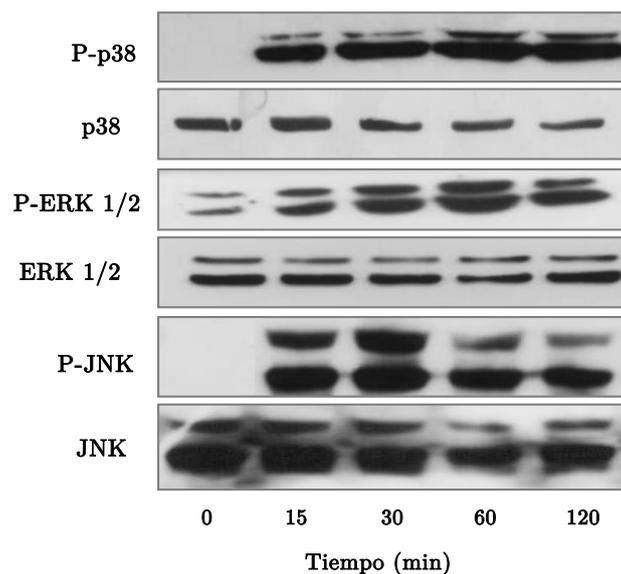


Figura 1.9.- Diferentes MAPKs se activan tras el tratamiento con sorbitol. Las células privadas de suero durante 12 horas fueron tratadas con sorbitol 0,5 M durante los tiempos indicados en la figura. Después de cada experimento, los niveles de fosforilación y totales de cada una de las proteínas quinasas estudiadas se analizaron por Western blot utilizando anticuerpos específicos. En la figura se muestra un blot representativo de, al menos, tres experimentos independientes.

2.3. Papel de las p38 MAPKs en la fosforilación de Tau inducida por estrés osmótico

Una vez comprobado que las p38s se activaban en respuesta a choque osmótico, nos propusimos analizar la posible contribución de esta ruta de señalización en la fosforilación de los residuos Thr-50, Thr-181 y Thr-205 de Tau que observábamos en dichas condiciones experimentales. Para ello, las células se incubaron con sorbitol en ausencia o presencia de dos concentraciones del inhibidor farmacológico BIRB0796. Cabe recordar, que la concentración de 0,1 μM inhibe a las isoformas α y β y la de 1 μM inhibe también a las isoformas γ y δ (Kuma *et al.*, 2005). Como se puede observar en la figura 1.10, el aumento en los niveles de fosforilación de Tau en el residuo Thr-50 inducida por sorbitol sólo se previno cuando se utilizó una concentración del inhibidor de 1 μM . Similares resultados se obtuvieron cuando se analizó la fosforilación de Tau en el residuo Thr-181. Sin embargo, cuando se estudió la fosforilación de Tau en el residuo Thr-205 se observó que las dos concentraciones del inhibidor utilizadas prevenían la fosforilación de Tau en respuesta a sorbitol (figura 1.10). Además podemos observar que la incubación de las células con el inhibidor sólo produjo una disminución en los niveles de fosforilación basal de Tau, siendo muy patente este efecto en la fosforilación del residuo Thr-181. Por otra parte, también se puede observar que la inhibición de la ruta de las p38s no prevenía la proteólisis de Tau inducida por sorbitol, tal y como habíamos observado previamente (Olivera Santa-Catalina, 2012). Para comprobar que el inhibidor había funcionado correctamente, analizamos mediante Western Blot la proteína MAPKAPK-2, un sustrato de las p38 MAPKs, ya que está descrito que la fosforilación de MAPKAPK-2 reduce su movilidad electroforética en geles SDS-PAGE (Feijoo *et al.*, 2005). Tal y como se observa en la figura 1.10, el inhibidor previno el retardo de la movilidad electroforética que sufre la proteína MAPKAPK-2 en respuesta a sorbitol.

En conjunto nuestros resultados sugieren que las isoformas γ y δ de las p38s están implicadas en la fosforilación de Tau en los residuos Thr-50 y Thr-181 inducida por sorbitol, mientras que todas las isoformas pueden estar implicadas en la fosforilación del residuo Thr-205. A su vez, apuntan a que estas quinasas regulan la fosforilación basal de Tau en los residuos estudiados pero no regulan la proteólisis de Tau.

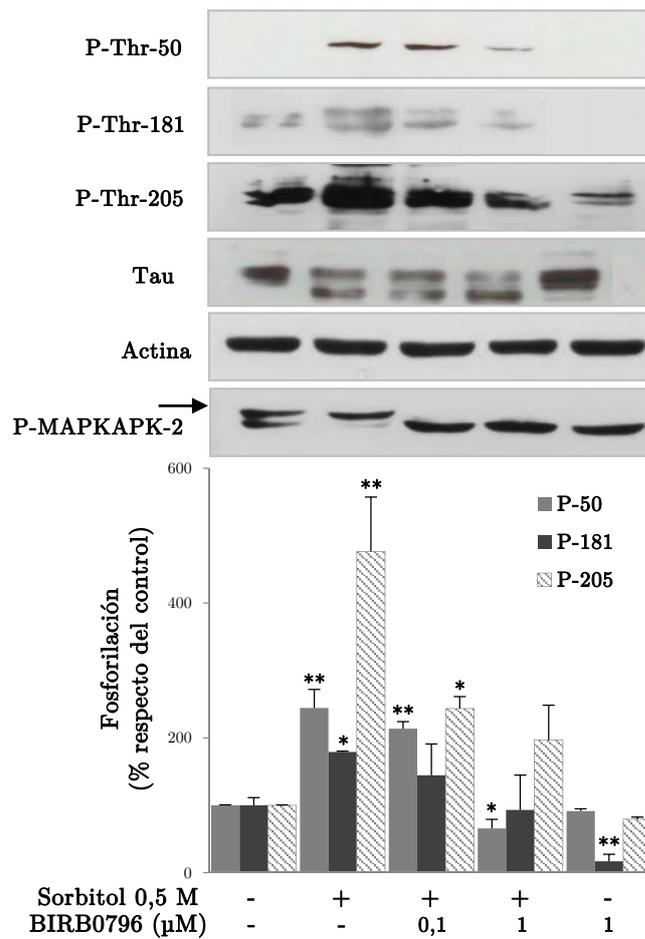


Figura 1.10.- Las proteínas quinasas p38s regulan la fosforilación de Tau inducida por estrés hiperosmótico. Las células, privadas de suero durante 12 horas, fueron pretratadas durante una hora con diferentes concentraciones del inhibidor farmacológico específico de las p38, el compuesto BIRB0796. Transcurrido este tiempo, se añadió sorbitol 0,5 M y la incubación se prolongó durante 1 hora más. Al finalizar el experimento, las células se lisaron y los niveles de las diferentes proteínas se analizaron mediante Western blot utilizando anticuerpos específicos. Como control positivo del efecto del inhibidor se analizó la movilidad electroforética de MAPKAPK-2. En la figura se muestra un blot representativo y el análisis densitométrico correspondiente a la media \pm EEM de tres experimentos independientes. Los datos se expresan como el porcentaje de los niveles de Tau fosforilada con respecto al control. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$, comparado con las células sin tratar.

2.4. La ruta de las ERK 1/2 no regula la fosforilación de Tau en respuesta a sorbitol en los residuos estudiados

Con objeto de conocer la posible contribución de la ruta de las ERK1/2 en la fosforilación de los residuos Thr-50, Thr-181 y Thr-205 de Tau inducida por sorbitol utilizamos el inhibidor farmacológico U0126, el cual actúa a nivel de la proteína MEK-1 (Bain *et al.*, 2007). Como se muestra en la figura 1.11, ninguna de las concentraciones del inhibidor utilizadas, 1 μ M y 10 μ M, previno la fosforilación de Tau inducida por sorbitol en

los residuos estudiados. Sin embargo, el inhibidor sí que previno la fosforilación basal de los mismos. También se puede observar que la inhibición de la ruta de las ERKs no previno la proteólisis de Tau inducida por sorbitol, tal y como habíamos observado previamente (Olivera Santa-Catalina, 2012). Para comprobar que el inhibidor había funcionado correctamente, analizamos los niveles de fosforilación de ERK 1/2 y como podemos observar el inhibidor previno la fosforilación de ERK 1/2 inducida por sorbitol de una manera dependiente de su concentración. También disminuyó la fosforilación basal de esta proteína.

Nuestros resultados sugieren que la ruta de las ERK 1/2 no participa en la fosforilación ni en la proteólisis de Tau inducida por sorbitol, pero sí que puede participar en la fosforilación basal de Tau.

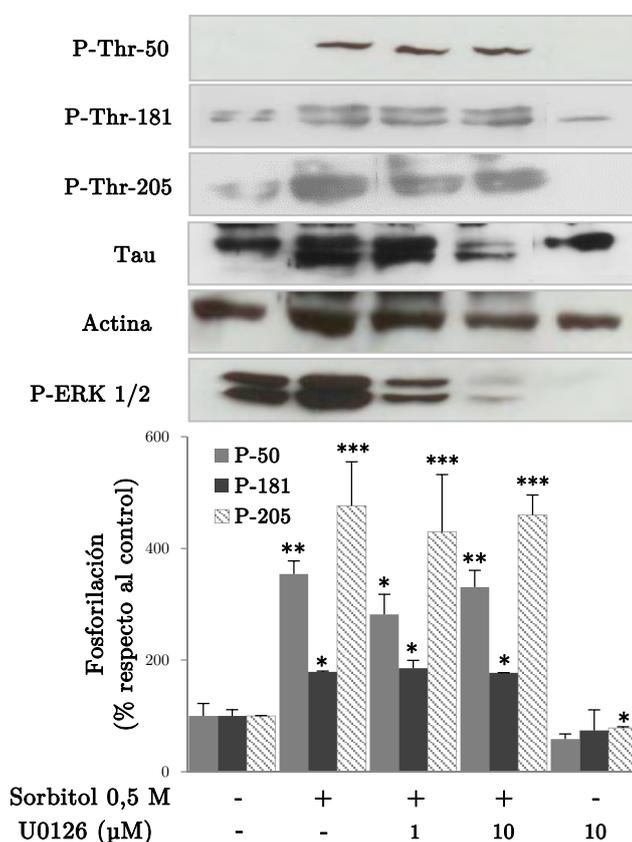


Figura 1.11.- La ruta de señalización de las ERK 1/2 no participa en la fosforilación de Tau inducida por estrés hiperosmótico. Las células se trataron como en la figura anterior pero utilizando diferentes concentraciones del inhibidor específico de las ERK 1/2, el compuesto U0126. Al finalizar el experimento, las células se lisaron y los niveles de las diferentes proteínas se analizaron mediante Western blot utilizando anticuerpos específicos. Como control positivo del efecto del inhibidor se analizaron los niveles de fosforilación de ERK 1/2. En la figura se muestra un blot representativo y el análisis densitométrico correspondiente a la media \pm EEM de tres experimentos independientes. Los datos se expresan como el porcentaje de los niveles de Tau fosforilada con respecto al control. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$, comparado con las células sin tratar.

2.5. La ruta de señalización de las JNKs está implicada en la fosforilación de Tau inducida por sorbitol en los residuos estudiados

Además de a las p38s y a las ERKs, el sorbitol induce la activación de las JNKs. Con objeto de estudiar la implicación de esta ruta en la fosforilación de Tau, las células se incubaron en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de un inhibidor peptídico que bloquea la fosforilación, y en consecuencia la activación de estas quinasas, los resultados obtenidos se muestran en la figura 1.12. Como se puede observar, el inhibidor de las JNKs previno parcialmente la fosforilación del residuo Thr-50 de Tau inducida por sorbitol y totalmente el incremento de la fosforilación de Tau en los residuos Thr-181 y Thr-205, así como la proteólisis de Tau. El efecto del inhibidor fue específico ya que previno completamente la fosforilación de las JNKs.

Estos resultados sugieren que la ruta de las JNKs media tanto la fosforilación como la proteólisis de Tau inducida por el sorbitol.

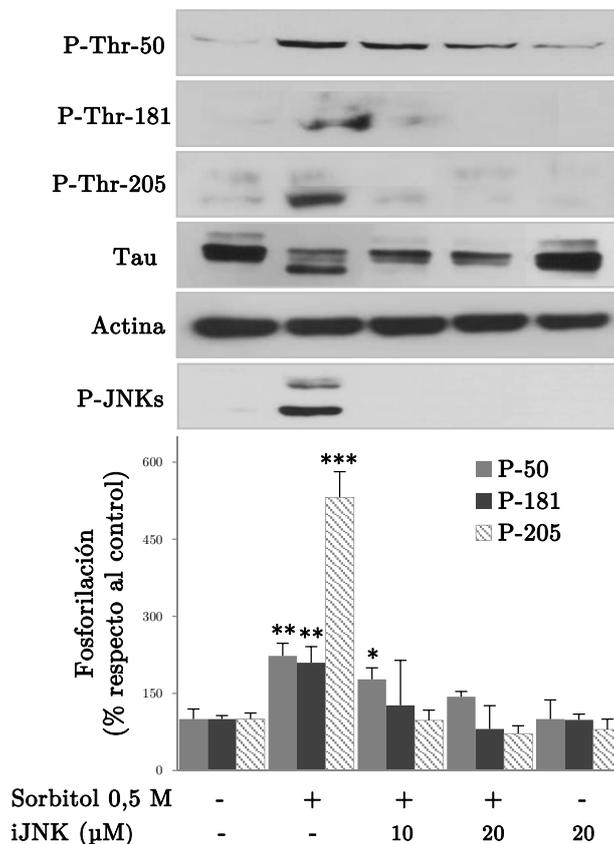


Figura 1.12.- La ruta de señalización de las JNKs participa en la fosforilación de Tau inducida por estrés hiperosmótico. Las células se incubaron con sorbitol en ausencia y presencia del inhibidor peptídico de las JNKs, tal y como se describe en la figura anterior. Al finalizar el experimento, las células se lisaron y los niveles de las diferentes proteínas se analizaron mediante Western blot

utilizando anticuerpos específicos. Como control positivo del efecto del inhibidor se analizaron los niveles de fosforilación de las JNKs. En la figura se muestra un blot representativo y el análisis densitométrico correspondiente a la media \pm EEM de tres experimentos independientes. Los datos se expresan como el porcentaje de los niveles de Tau fosforilada con respecto al control. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$, comparado con las células sin tratar.

2.6. Cambios en la localización de Tau en respuesta al estrés hiperosmótico

Numerosos estudios muestran que la localización de Tau en las neuronas depende de su estado de fosforilación (Braak *et al.*, 2011; Morris *et al.*, 2011; Whiteman *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2014; Scholz y Mandelkow, 2014). Por lo tanto nuestro siguiente objetivo fue estudiar si el estrés osmótico, además de inducir la fosforilación de Tau, promovía cambios en la distribución de la proteína. Para ello, las células se trataron con sorbitol durante 1 hora y la localización de Tau y de sus formas fosforiladas, se analizaron mediante inmunofluorescencia, tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. Como se observa en la figura 1.13, Tau presentó una distribución homogénea en las células sin tratar, encontrándose tanto en las neuritas como en el soma celular. Cabe destacar la presencia de Tau en el núcleo de la célula, ya que como se puede ver en la figura 1.13 Tau colocalizó con el marcador nuclear DAPI (ver cabeza de flechas). La incubación de las células con sorbitol, además de producir una disminución en el volumen celular y la retracción de las neuritas, provocó una redistribución de Tau hacia el soma de la célula, aumentando enormemente su presencia en el núcleo de las células (ver cabeza de flechas).

Una vez visto que el sorbitol promovía cambios en la localización de Tau quisimos ver si también inducía cambios en la distribución de sus formas fosforiladas. Como se puede observar en la figura 1.14-A, Tau fosforilada en Thr-50 siguió una distribución paralela con la Tau total en las células controles, aunque la intensidad de la fluorescencia fue mayor en las neuritas y en el núcleo (ver cabeza de flecha de color blanco en la columna de superposición de imágenes de P-Tau- 50 + Tau), lo que sugiere que en estas regiones celulares Tau se encuentra fosforilada en Thr-50. El tratamiento con sorbitol produjo una redistribución de fosfo-Tau Thr-50 que iba en paralelo a la observada con Tau (ver cabeza de flecha color anaranjado en la columna de superposición de P-Thr-50 + Tau). A la vez indujo un incremento en la fluorescencia de fosfo-Tau Thr-50 con respecto a las células sin

tratar, lo que sugiere que el sorbitol induce la fosforilación de Tau en ese residuo, lo que apoya los resultados observados mediante Western blot (figura 1.8).

En la figura 1.14-B se muestran los resultados obtenidos cuando se analizó la fosforilación de Tau en el residuo Thr-69. Como se puede observar la distribución de esta forma fosforilada de Tau iba en paralelo con la distribución de la fosfo-Tau Thr-50 en las células controles, ya que predomina en las neuritas y en el núcleo de las células (ver cabeza de flechas de color blanco en la columna de superposición de imágenes de P-Tau-69 + Tau). Pero en este caso, el tratamiento con sorbitol produjo una disminución de la fluorescencia de fosfo-Tau Thr-69 en el núcleo con respecto a las células control, detectándose sólo la fluorescencia en el citoplasma de la célula que rodea al núcleo (ver cabeza de flechas de color anaranjado en la columna de superposición de imágenes de P-Tau-69 + Tau).

La distribución de la forma fosforilada de Tau en la Thr-181 en las células controles y en las tratadas con sorbitol se muestra en la figura 1.14-C. Como se puede observar, en las células controles la fluorescencia de fosfo-Tau Thr-181 fue débil y sólo se encontró en el citoplasma de alguna de las células. El tratamiento de las células con el sorbitol no modificó la distribución de esta forma fosforilada de Tau pero sí que aumentó la intensidad de la fluorescencia. Estos resultados sugieren que el sorbitol induce la fosforilación de Tau en el residuo Thr-181, lo que coincide con los resultados obtenidos mediante Western blot (figura 1.8).

No se muestran resultados relativos a la distribución de fosfo-Tau Thr-205 porque por problemas técnicos no fuimos capaces de detectarla por inmunofluorescencia.

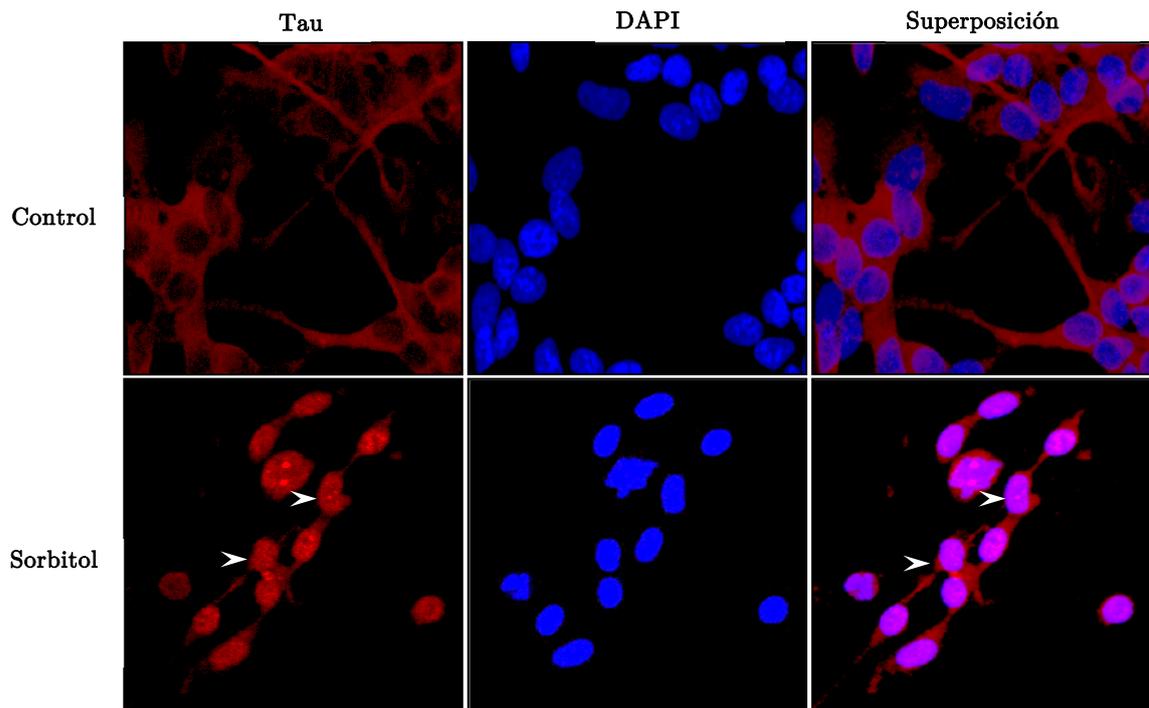
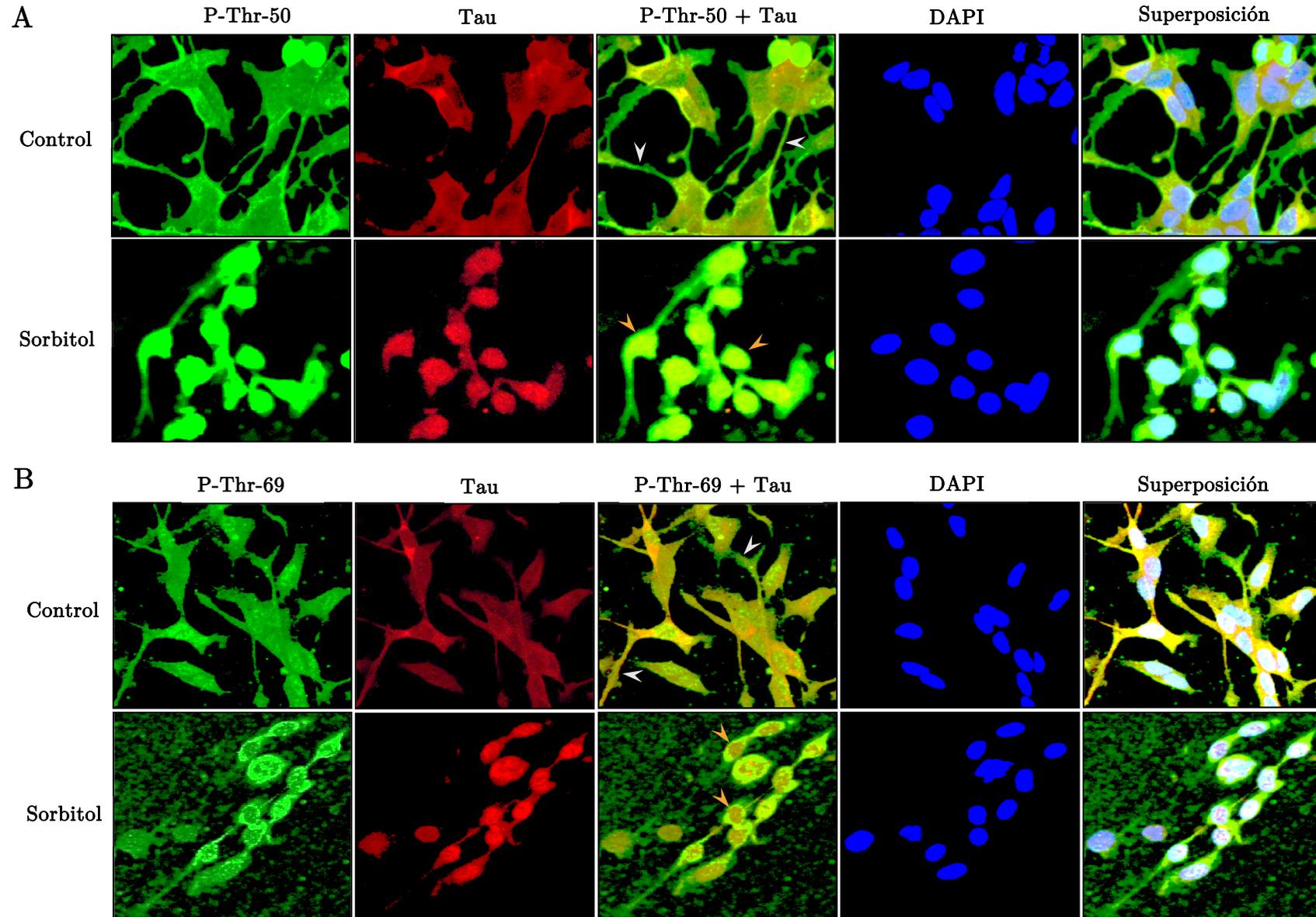


Figura 1.13.- Cambios en la localización de Tau en respuesta al estrés hiperosmótico. Las células se incubaron en presencia de sorbitol durante 1 hora. Tras lo cual, se fijaron y tiñeron con Tau (rojo) y con DAPI (azul), como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. La observación de las células se realizó mediante microscopía confocal. Las cabezas de flecha señalan la presencia de Tau en el núcleo de las células. Se muestra una imagen representativa, de más de tres experimentos independientes.



C

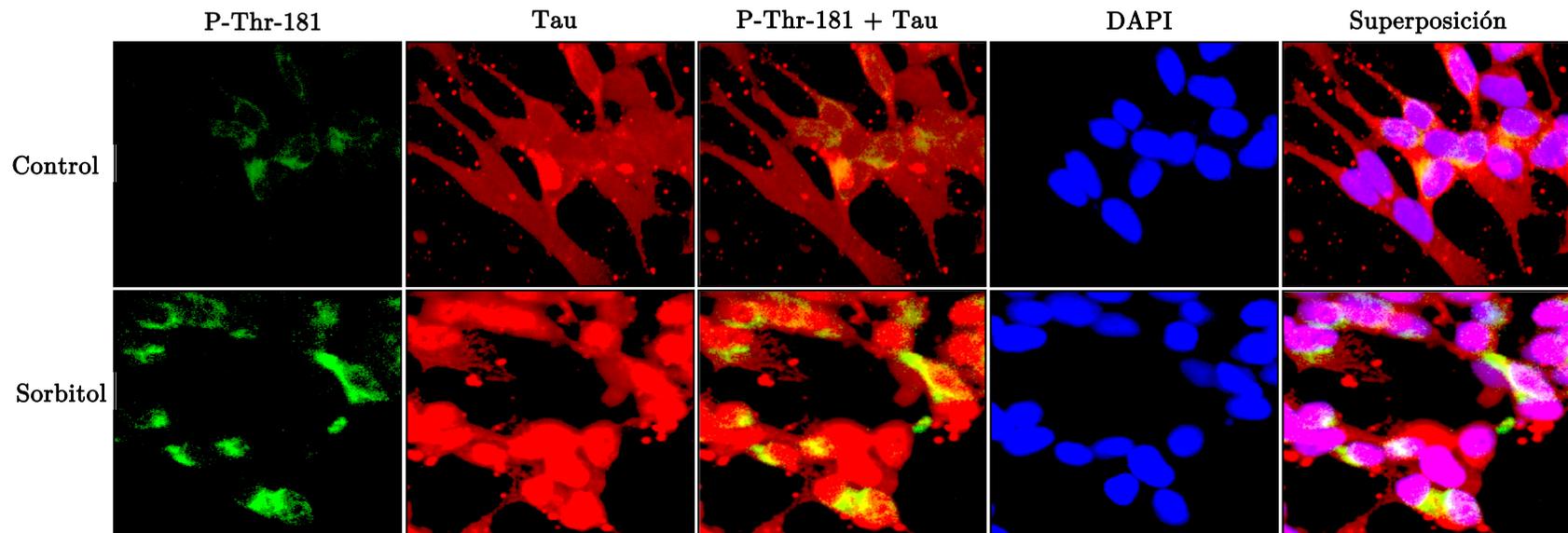


Figura 1.14.- Cambios en la localización de Tau fosforilada en respuesta al estrés hiperosmótico. A: Redistribución de fosfo-Tau Thr-50. B: Redistribución de fosfo-Tau Thr-69. C: Redistribución de fosfo-Tau Thr-181. Las células se incubaron en presencia de sorbitol durante 1 hora. Tras lo cual, se fijaron y tiñeron con las formas fosforiladas de Tau (verde), Tau (rojo) y con DAPI (azul), como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. La observación de las células se realizó mediante microscopía confocal. Las cabezas de flecha señalan la presencia de Tau en el núcleo de las células. Se muestra una imagen representativa, de más de tres experimentos independientes.

Los resultados anteriores ponen de manifiesto que Tau y alguna de sus formas fosforiladas están presentes en el núcleo de la célula. Con objeto de corroborar este hallazgo, analizamos los niveles de Tau y de sus formas fosforiladas en las fracciones citosólica y nuclear obtenidas a partir de células incubadas con sorbitol durante diferentes periodos de tiempo mediante Western blot. Tal y como se puede observar en la figura 1.15, el tratamiento con sorbitol produjo un aumento de los niveles de Tau y de sus formas fosforiladas en los residuos Thr-50 y Thr-205 en el núcleo de la célula, alcanzando los efectos máximos a los 15 minutos de tratamiento para disminuir a continuación. Los niveles de fosfo-Tau Thr-69 en el núcleo disminuyeron a la hora del tratamiento con sorbitol y no se detectó la presencia de Tau fosforilada en el residuo Thr-181 en esta misma fracción. Los efectos del sorbitol sobre los niveles de Tau y de sus formas fosforiladas en la fracción citosólica fueron similares a los observados cuando se analizaron extractos totales de las células (figura 1.8). La pureza de las fracciones se realizó analizando los niveles de las proteínas calpaína (marcador de citosol) y de histona-3 (marcador nuclear). Como se puede observar en la figura 1,15 sólo se detectó una pequeña contaminación de la fracción citosólica en la nuclear. Por lo tanto, los resultados obtenidos mediante Western blot apoyan los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia.

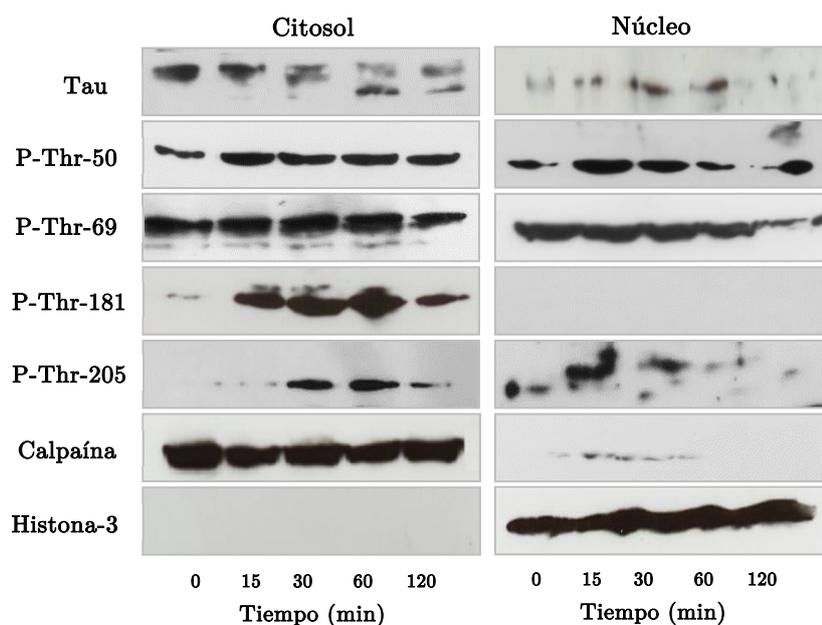


Figura 1.15.- El estrés hiperosmótico aumenta los niveles de Tau en el núcleo de la célula. Las células privadas de suero durante 12 horas fueron tratadas con sorbitol 0,5 M durante los tiempos indicados en la figura. Al final del experimento, se obtuvieron las fracciones citosólicas y nucleares

siguiendo el protocolo descrito en el apartado de Materiales y Métodos. Los niveles de Tau y de sus formas fosforiladas se analizaron mediante Western blot en ambas fracciones. La pureza de las fracciones se comprobó analizando los niveles de calpaína (proteína citosólica) y de histona-3 (proteína nuclear) en ambas fracciones. En la figura se muestra un blot representativo de dos experimentos independientes.

2.7 El estrés hiperosmótico provoca desorganización de los microtúbulos

La hiperfosforilación de Tau promueve la pérdida de unión a los microtúbulos, con la consecuente desorganización de los mismos (ver capítulo de Introducción). Ya que el estrés osmótico induce la fosforilación de Tau nuestro siguiente objetivo fue estudiar si también producía la desorganización de los microtúbulos. Con este fin, las células se incubaron en presencia de sorbitol durante 1 hora, tras lo cual se fijaron con metanol y la distribución de α -tubulina se analizó mediante inmunofluorescencia. Tal y como se observa en la figura 1.16 el sorbitol provocó la desorganización de los haces de tubulina, ya que en esta condición no se observaron los haces que nítidamente se observan en las células sin tratar.

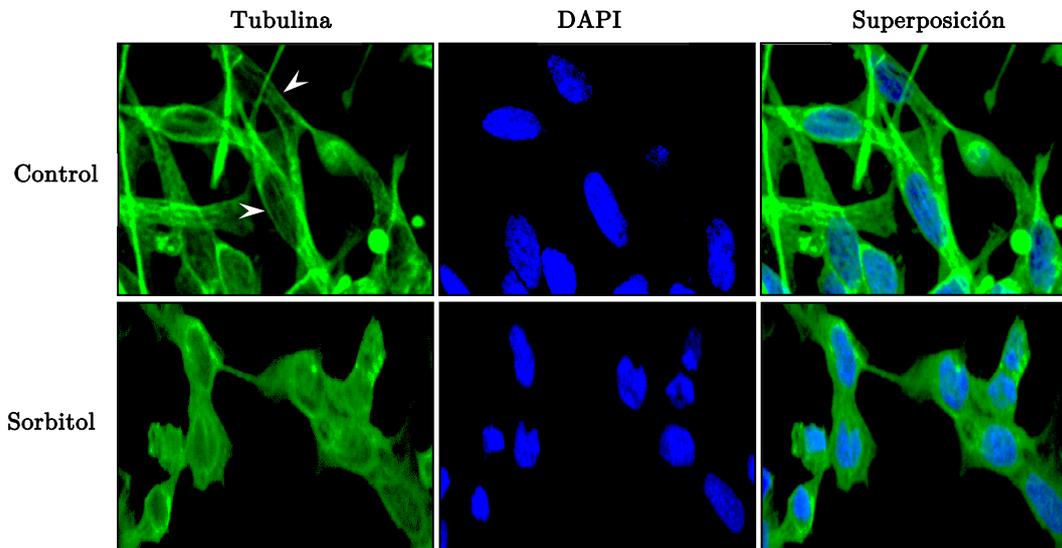


Figura 1.16.- El tratamiento con sorbitol promueve la desorganización de los microtúbulos. Las células se incubaron durante 1 hora con 0,5 M de sorbitol. Tras lo cual, se fijaron con metanol frío y tiñeron con α -tubulina (verde) y con DAPI (azul), como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. La observación de las células se realizó mediante microscopía confocal. Se muestra una imagen representativa de dos experimentos independientes.

2.8. La ruta de señalización de las JNKs media la apoptosis de las células SH-SY5Y inducida por sorbitol

Nuestros resultados sugieren que el estrés hiperosmótico induce la apoptosis de las células SH-SY5Y. La activación de las MAPKs están muy relacionadas con este proceso de muerte celular (Nozaki *et al.*, 2001; Borsello y Forloni, 2007). Por lo tanto nuestro siguiente objetivo fue estudiar qué MAPKs podría mediar la apoptosis en nuestras condiciones experimentales. Para ello, las células se incubaron con sorbitol en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de BIRB0796, de U0126 y del inhibidor peptídico de las JNKs. Al finalizar los experimentos, el porcentaje de apoptosis se analizó se mediante citometría de flujo y los niveles del fragmento activo de caspasa 3 se estudiaron mediante Western blot. Como se puede observar en la figura 1.17, la inhibición de las rutas de las p38s (A) y de las ERKs (B) no previno la apoptosis inducida por sorbitol, pero sí que lo hizo la inhibición de la ruta de las JNKs (C). La inhibición de la apoptosis fue dependiente de estado de activación de caspasa 3, ya que como podemos observar la inhibición de la apoptosis fue en paralelo con la desaparición del fragmento activo de esta caspasa (figura 1.17-C).

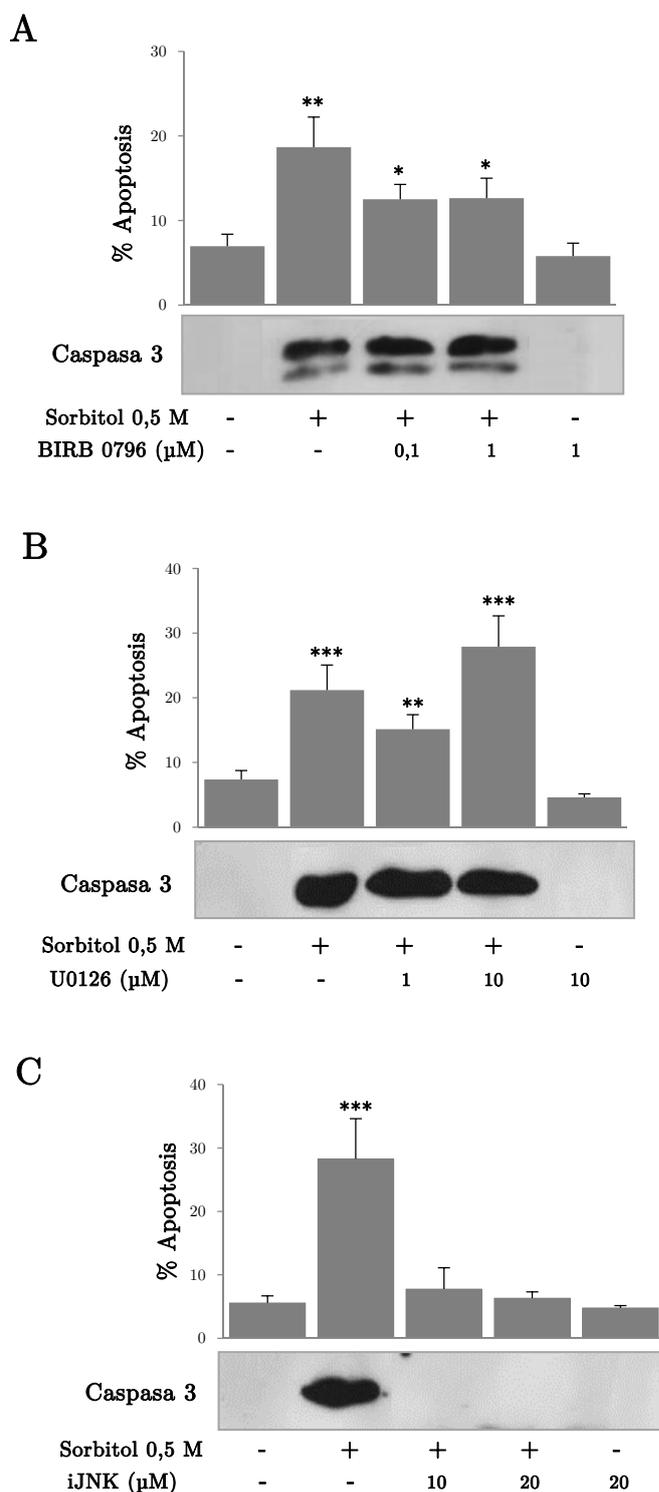


Figura 1.17.- La ruta de señalización de las JNKs previene la apoptosis inducida por el estrés hiperosmótico. Las células se trataron con sorbitol en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de los inhibidores específicos de las p38s (A), de las ERK 1/2 (B) y de las JNKs (C). Al final del experimento, la proporción de células que presentaban ADN hipodiploide se determinó por citometría de flujo, y los niveles del fragmento activo de caspasa 3 se analizaron mediante Western blot. En la figura se muestra un blot de caspasa 3 representativo. Cada valor representa la media \pm EEM de, al menos, tres experimentos diferentes realizados por duplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$, comparado con las células control.

Capítulo 2. Estudio del efecto de la neuroinflamación sobre la proteína asociada a microtúbulos Tau en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y diferenciadas

En la EA se produce una gran pérdida en el peso y el volumen del cerebro que parece ser debida a la contracción y la pérdida de los procesos neuronales. De hecho, la pérdida de sinapsis y de espinas dendríticas se correlaciona mejor con la pérdida cognitiva observada en la EA que la pérdida de las neuronas, que también se produce en esta enfermedad (Querfurth y LaFerla, 2010). En este proceso juegan un papel importante varios mediadores inflamatorios secretados por las células gliales, entre los que destaca la citoquina proinflamatoria TNF- α . Se ha descrito que TNF- α , y también IL-1 β , colocaliza con las placas seniles y los NFTs en las zonas del cerebro afectadas por la EA (McGeer y McGeer, 1995), lo que sugiere que esta citoquina, de forma individual o en conjunción con otras citoquinas, puede regular la formación, la agregación y la deposición de los péptidos β -amiloide y de los NFTs. Además, la fosforilación de Tau aumenta en un entorno inflamatorio (Lee *et al.*, 2010; Metcalfe y Figueiredo-Pereira, 2010), aunque de momento se desconoce la importancia de las citoquinas sobre la fosforilación de residuos específicos de Tau.

Por ello, en este segundo capítulo decidimos estudiar el efecto directo de las citoquinas sobre la fosforilación de Tau, así como las vías de señalización implicadas en el proceso, y sobre su localización. Como agentes inductores de estrés inflamatorio se utilizaron la citoquina proinflamatoria TNF- α en un primer abordaje y posteriormente, los sobrenadantes procedentes de las células U937 activadas con diferentes compuestos.

2.1. Efecto de la citoquina proinflamatoria TNF- α sobre Tau en células de neuroblastoma diferenciadas

2.1.1. El TNF- α produce cambios morfológicos en células diferenciadas

En la EA la morfología de las neuronas se altera (Lassmann *et al.*, 1993; Knobloch y Mansuy, 2008). Por ello, analizamos el efecto de TNF- α sobre la morfología de las células. Con este fin, las células diferenciadas se trataron con diferentes concentraciones de TNF- α y periodos de incubación, tras lo cual se observaron en un microscopio de contraste de fases. Como se puede observar en la figura 2.1-A, trascurridas las primeras 24 horas de exposición a la citoquina se apreciaron los efectos del tratamiento, que diferían según la concentración utilizada. Así, concentraciones bajas de citoquina favorecieron la prolongación de las neuritas, haciéndolas más finas y alargadas y, sin embargo, a concentraciones mayores los cuerpos celulares cambiaron a una forma más piramidal y los procesos neuronales se ensancharon y acortaron. En las concentraciones más altas utilizadas (25 y 50 ng/ml) las células se redondearon y se volvieron más refringentes. Los estudios de tiempo-respuesta, en los que se utilizaron una concentración de TNF- α de 10 ng/ml, mostraron que los efectos de TNF- α sobre la morfología celular comenzaron a verse a las 24 horas de incubación, fueron más acusados a las 48 h y se hicieron más patentes a las 72 h, cuando se observaron prolongaciones neuronales y somas más gruesos (figura 2.1-B).

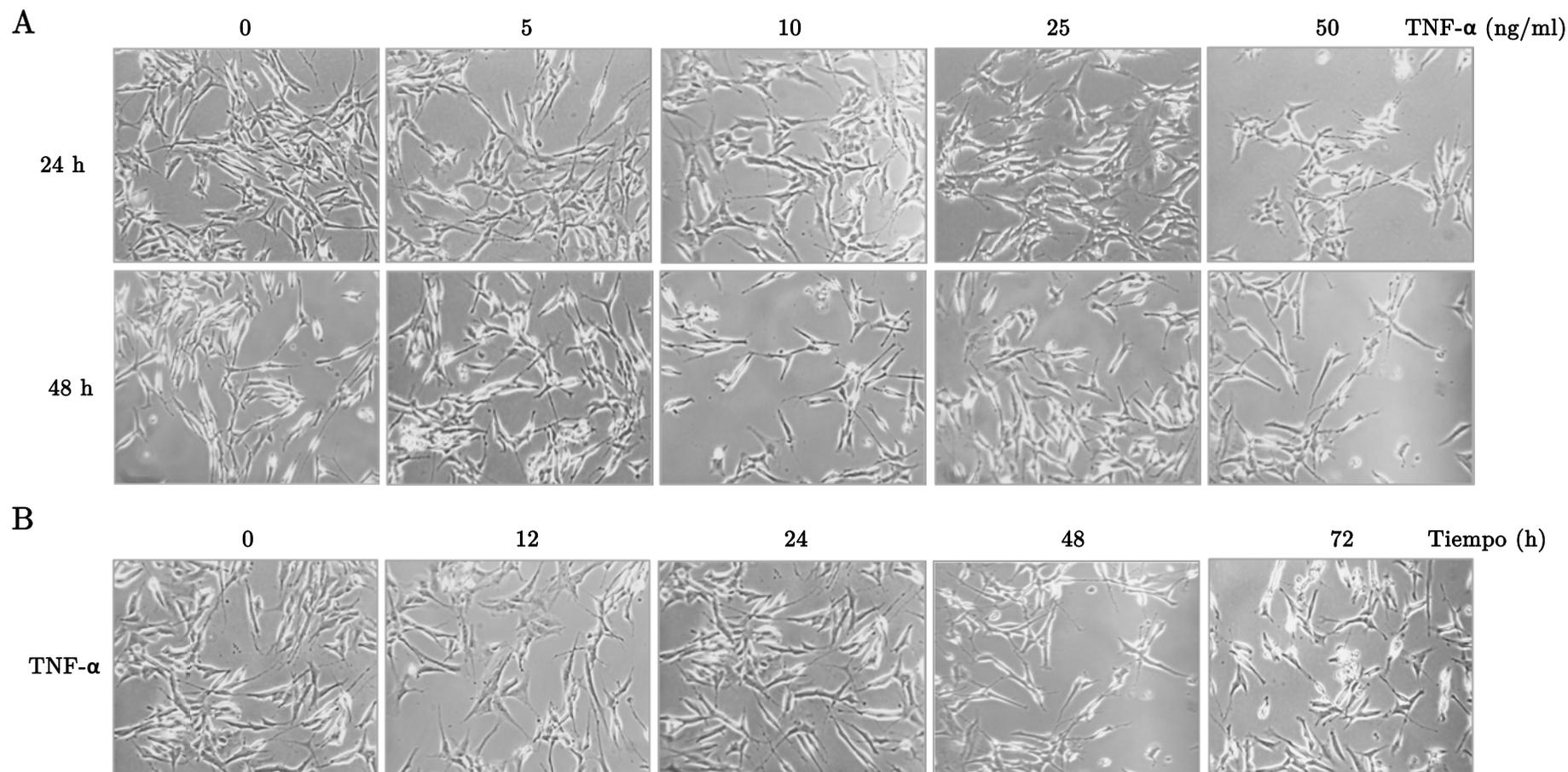


Figura 2.1.- Efecto del TNF- α sobre la morfología de las células SH-SY5Y diferenciadas. A) Estudio concentración-respuesta. Las células diferenciadas con 10 μ g/ml de AR durante 48 h fueron privadas de suero y tratadas con diferentes concentraciones de TNF- α durante 24 y 48 h. B) Estudio tiempo-respuesta. Después de ser diferenciadas, las células se incubaron con 10 ng/ml de TNF- α durante diferentes tiempos. Las células se visualizaron y fotografiaron en un microscopio invertido de contraste de fases bajo una ampliación de 100x.

2.1.2. Efecto del TNF- α sobre la viabilidad celular

Tras observar los evidentes efectos del TNF- α sobre la morfología celular y el aumento en el número de células redondeadas y refringentes, tras el tratamiento, que suele estar asociado a la muerte celular, se decidió analizar el efecto de esta citoquina sobre la viabilidad celular. Como se puede observar en la figura 2.2, el TNF- α produjo una pérdida de viabilidad de las células SH-SY5Y diferenciadas de manera dependiente de la concentración utilizada, que fue significativa desde la concentración de TNF- α más baja. Aun así, el porcentaje de células vivas no bajó del 80 % en todo el experimento.

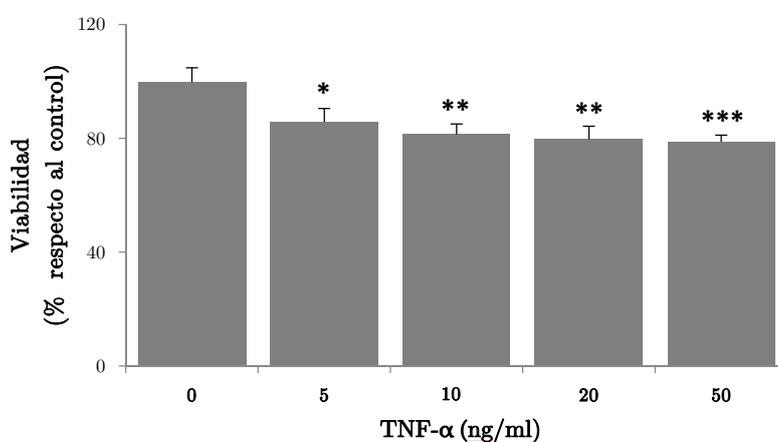


Figura 2.1.- El TNF- α disminuye la viabilidad celular. Después de ser diferenciadas, las células se trataron con diferentes concentraciones de TNF- α durante 24 h y la viabilidad celular se determinó mediante el método colorimétrico del MTT según se describe en el apartado Materiales y Métodos. La viabilidad celular se expresa como el porcentaje de células viables con respecto al control. Se muestra la media \pm EEM de tres experimentos independientes medidos por triplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$, comparado con las células sin tratar.

2.1.3. La expresión de Tau es modificada por el tratamiento con TNF- α

Aunque varios trabajos han demostrado que el TNF- α afecta a la fosforilación de Tau, poco se sabe sobre su efecto sobre la propia proteína. Por ello nos dispusimos a estudiar si el tratamiento con TNF- α afectaba a los niveles de Tau. Con esta finalidad, las células diferenciadas se trataron con concentraciones crecientes de la citoquina durante 24 h y los niveles de Tau fueron analizados mediante Western blot en los extractos celulares obtenidos. En la figura 2.3 se puede observar que el TNF- α aumentó de forma significativa los niveles de Tau. El incremento se observó principalmente en las concentraciones de 5 y 10 ng/ml, volviendo a los niveles basales a concentraciones mayores. Los efectos de TNF- α sobre los

niveles de Tau fueron específicos ya que los niveles de actina en las mismas condiciones experimentales no se modificaron.

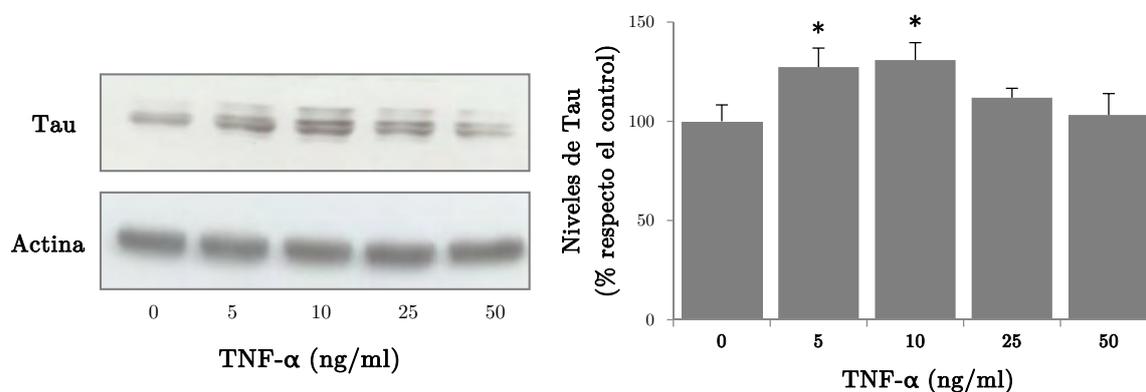


Figura 2.3.- El TNF- α aumenta los niveles de expresión de Tau en células de neuroblastoma.

Las células diferenciadas se trataron con concentraciones crecientes de TNF- α durante 24 h. Al final del experimento, las células se lisaron y cantidades iguales de proteína se analizaron mediante Western blot. En la figura se muestra un blot representativo y el análisis densitométrico correspondiente a la media \pm EEM de, al menos, tres experimentos independientes. Los datos se expresan como el porcentaje de los niveles de proteína con respecto al control * $p < 0,05$, comparado con las células sin tratar.

A la vista de los resultados anteriores, decidimos estudiar si el aumento en los niveles de Tau en respuesta a TNF- α se debía a un aumento de su expresión génica. Por ello, las células se incubaron con una concentración de TNF- α de 10 ng/ml en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de actinomicina D (inhibidor del proceso de transcripción) o de cicloheximida (inhibidor del proceso de traducción) durante 24 h. Como se muestra en la figura 2.4, el tratamiento con actinomicina y cicloheximida previno el aumento en los niveles de Tau inducidos por TNF- α de manera dependiente de la concentración utilizada. Estos resultados sugieren que el TNF- α estimula la expresión génica de Tau. También se puede observar que la expresión basal de Tau disminuye en presencia de ambos inhibidores.

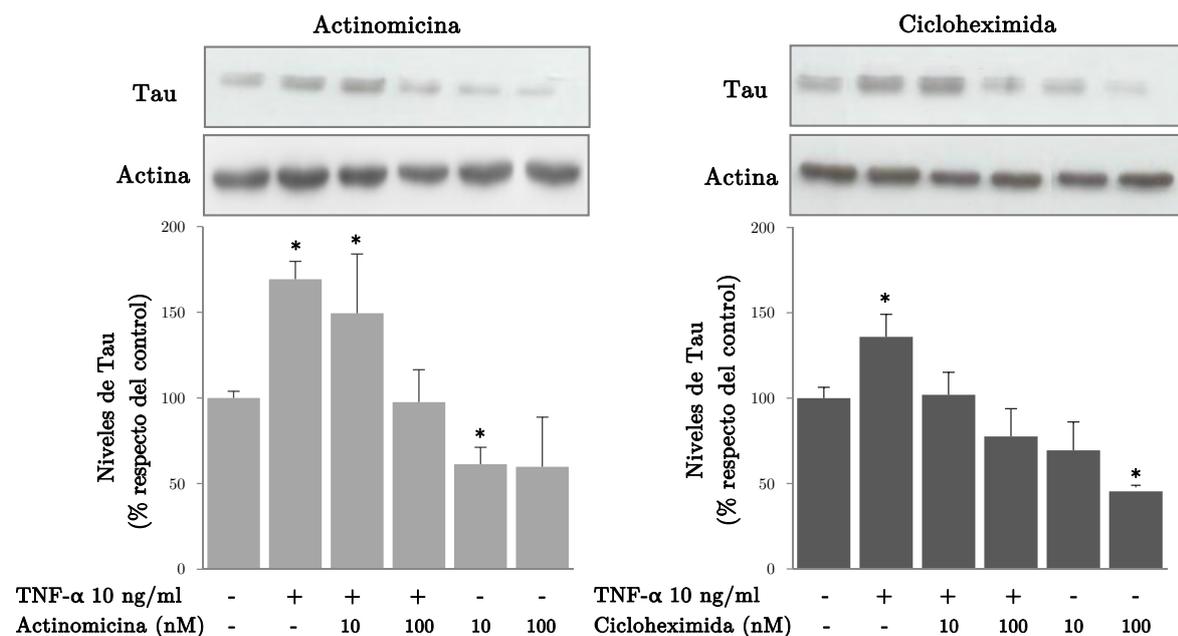


Figura 2.4.- Los inhibidores de la transcripción y de la traducción previenen el aumento de los niveles de Tau inducido por TNF- α . Las células diferenciadas se incubaron con 10 ng/ml de TNF- α en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de actinomicina y de cicloheximida. Al final del experimento, las células se lisaron y cantidades iguales de proteína se analizaron mediante Western blot. En la figura se muestra un blot representativo y el análisis densitométrico correspondiente a la media \pm EEM de tres experimentos independientes. Los datos se expresan como el porcentaje de los niveles de proteína con respecto al control. * $p < 0,05$, comparado con las células sin tratar.

2.1.4. TNF- α promueve la fosforilación de la proteína Tau

Una vez que vimos que el TNF- α inducía la expresión génica de Tau, nuestro siguiente objetivo fue estudiar su efecto sobre la fosforilación de la proteína en los residuos Thr-50, Thr-69, Thr-181 y Thr-205, que son los mismos residuos que estudiamos en el capítulo de estrés hiperosmótico. Como se muestra en la figura 2.5, el TNF- α promovió un aumento en el estado de fosforilación del residuo Thr-50 dependiente de la concentración, alcanzando un máximo a la concentración de 25 ng/ml para disminuir a continuación. Sin embargo, el tratamiento con TNF- α no modificó los niveles de fosforilación de Tau en la Thr-181 a concentraciones comprendidas entre 5 y 25 ng/ml, y a 50 ng/ml produjo una reducción en la fosforilación de dicho residuo. En cuanto a los niveles de fosforilación de la Thr-205, éstos mostraron una tendencia a aumentar progresivamente hasta alcanzar el máximo a la concentración de 50 ng/ml, siendo este aumento significativo desde la concentración de 10 ng/ml de TNF- α .

La fosforilación de Tau en el residuo Thr-69 no se muestra ya que no pudimos detectarla por Western blot en ninguna de las condiciones experimentales.

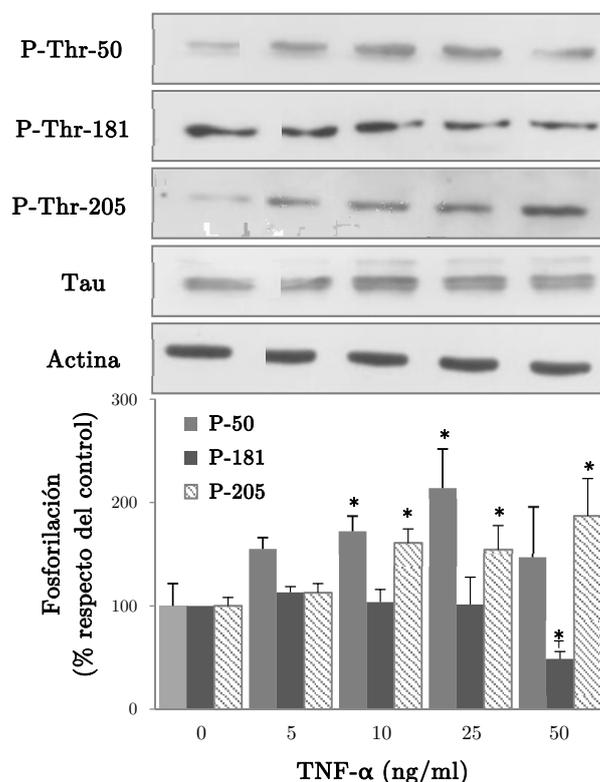


Figura 2.5.- El TNF- α promueve la fosforilación de los residuos Thr-50 y Thr-205 de Tau. Las células diferenciadas se trataron con diferentes concentraciones de TNF- α durante 24 h. Al final del experimento, las células se lisaron y cantidades iguales de proteína (10 μ g para la detección de Tau total y actina y 30 μ g para las formas fosforiladas de Tau) se analizaron por Western blot. En la figura se muestra un blot representativo y el análisis densitométrico correspondiente a la media \pm EEM de la relación existente entre los niveles de fosforilación de Tau y de Tau total de al menos 3 experimentos independientes. Los datos se expresan como el porcentaje de los niveles de fosforilación de las diferentes formas de Tau con respecto a las células sin tratar. * $p < 0,05$, comparado con las células sin tratar.

2.1.5. Las MAP quinasas se activan en respuesta a TNF- α

Varios estudios han relacionado la activación de las MAPKs con la fosforilación de Tau inducida por un entorno inflamatorio (Ferrer *et al.*, 2001; Sheng *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2003). En base a estas evidencias y como siguiente objetivo, se planteó analizar estas vías de señalización y su posible participación en la fosforilación de Tau inducida por TNF- α . Se comenzó examinando, mediante Western blot, la fosforilación y por tanto, la activación de las quinasas p38 MAPKs, ERK 1/2 y JNKs en respuesta a TNF- α . En la figura 2.6 se puede observar que el tratamiento promovió la activación de todas las MAPKs analizadas, aunque

presentaron diferentes patrones de activación. La fosforilación de las p38s aumentó hasta alcanzar un máximo entre los 15 y 60 primeros minutos de exposición a TNF- α , para disminuir a continuación. La activación de las ERK 1/2 fue rápida, durante los primeros 15 minutos, tiempo tras el cual la fosforilación vuelve a niveles basales. Por otra parte, las JNKs se activaron más rápidamente que las anteriores, en los primeros 5 minutos tras la exposición a la citoquina, y su nivel de fosforilación se mantuvo por encima del nivel del control durante las 3 h del experimento.

Los efectos del tratamiento con TNF- α fueron específicos sobre la fosforilación de las quinasas ya que sus respectivos niveles totales no resultaron afectados por la citoquina.

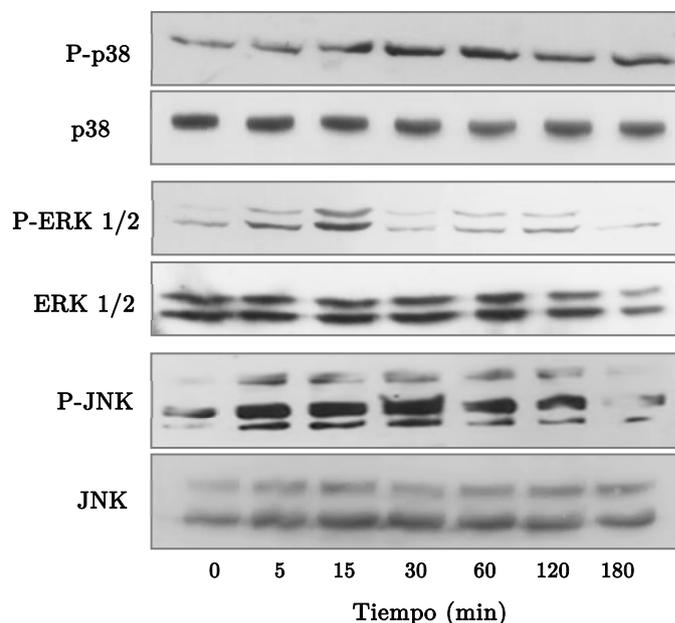


Figura 2.6.- El tratamiento con TNF- α promueve la fosforilación de las MAPKs. Las células diferenciadas se incubaron con 10 ng/ml de TNF- α durante los tiempos indicados en la figura. Después de cada experimento, las células se lisaron y los niveles de fosforilación y totales de cada una de las proteínas quinasas estudiadas se analizaron por Western blot utilizando anticuerpos específicos. En la figura se muestra un blot representativo de, al menos, tres experimentos independientes.

2.1.6. La fosforilación de los residuos Thr-50 y Thr-205 de Tau está regulada por la vía de las p38 MAPKs

Una vez comprobado que el TNF- α fosforila a Tau y que activa a diferentes MAP quinasas, el siguiente objetivo fue estudiar las vías de señalización intracelular que podrían contribuir a la fosforilación de Tau. Este estudio se inició con la ruta de las p38 MAPKs, puesto que esta vía está fuertemente ligada a los procesos de inflamación (Roux y Blenis,

2004; Kaminska, 2005). Para ello, las células diferenciadas se incubaron con TNF- α en ausencia o presencia de varias concentraciones del inhibidor farmacológico de las p38 MAPKs BIRB0796, empleado en el capítulo anterior. Una vez finalizado el tiempo de incubación las células se lisaron y las diferentes proteínas se examinaron mediante Western blot. Tal y como se observa en la figura 2.7, este inhibidor no tuvo efecto sobre los niveles de Tau total, pero disminuyó la fosforilación inducida por TNF- α en el residuo Thr-50 de una forma dependiente a la concentración. El inhibidor sólo, también disminuyó los niveles basales de fosforilación de Tau en el residuo Thr-50. Resultados similares se observaron cuando se analizó la fosforilación de Tau en el residuo Thr-205, aunque en este caso, el inhibidor no modificó la fosforilación basal del mismo. La inhibición de la fosforilación del sustrato de p38s, MAPKAPK-2, y por tanto, de su retardo electroforético, demostró el correcto funcionamiento del inhibidor.

Estos resultados sugieren que todas las isoformas de las p38s pueden estar implicadas en la fosforilación de Tau en ambos residuos.

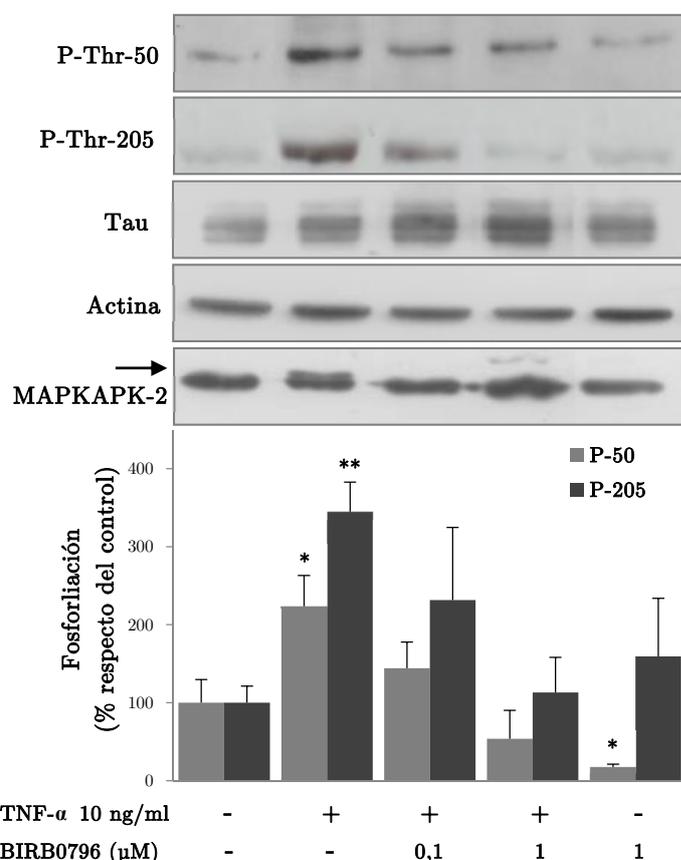


Figura 2.7.- Las p38 MAPKs regulan la fosforilación de la Thr-50 y Thr-205 de Tau inducida por TNF- α . Las células diferenciadas se incubaron en ausencia o en presencia de diferentes concentraciones del inhibidor de las p38s, BIRB0796, durante una hora. Transcurrido este tiempo, se

añadió 10 ng/ml de TNF- α y la incubación se prolongó durante 24 h. Al finalizar el experimento, las células se lisaron y los niveles de las diferentes proteínas se analizaron mediante Western blot utilizando anticuerpos específicos. Como control positivo del efecto del inhibidor se analizó la movilidad electroforética de MAPKAPK-2. En la figura se muestra un blot representativo y el análisis densitométrico correspondiente a la media \pm EEM de la relación existente entre los niveles de fosforilación de Tau y de Tau total de al menos 3 experimentos independientes. Los datos se expresan como el porcentaje de los niveles de fosforilación de las diferentes formas de Tau con respecto a las células sin tratar. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$, comparado con las células sin tratar.

2.1.7. La ruta de señalización de las ERKs está implicada en la fosforilación de los residuos Thr-50 y Thr-205 de Tau inducida por TNF- α

El siguiente objetivo fue analizar la implicación de la ruta de las ERKs en la fosforilación de los residuos Thr-50 y Thr-205 de Tau. Para ello, las células diferenciadas se incubaron con TNF- α en ausencia o presencia de dos concentraciones del inhibidor farmacológico de las ERKs, el U0126, empleado en el capítulo anterior. Como se puede observar en la figura 2.1.8 el inhibidor U0126 fue capaz de disminuir los niveles de Tau total aumentados con el tratamiento de TNF- α . Con respecto a la fosforilación del residuo Thr-50, este compuesto no tuvo un gran efecto inhibitorio, reduciendo parcialmente el aumento provocado por el tratamiento con la citoquina. En cuanto a la fosforilación de la Thr-205, ambas concentraciones del inhibidor previnieron la fosforilación de este residuo, aunque no se alcanzaron los niveles basales en ningún caso. La fosforilación de ERK 1/2 se previno totalmente tras el tratamiento con el inhibidor, corroborando la eficacia de éste.

En conjunto, estos resultados apuntan a que las ERK 1/2 regulan la expresión génica de Tau y su fosforilación en el residuo Thr-205, pero no parecen tener un papel importante en la fosforilación de Tau en el residuo Thr-50.

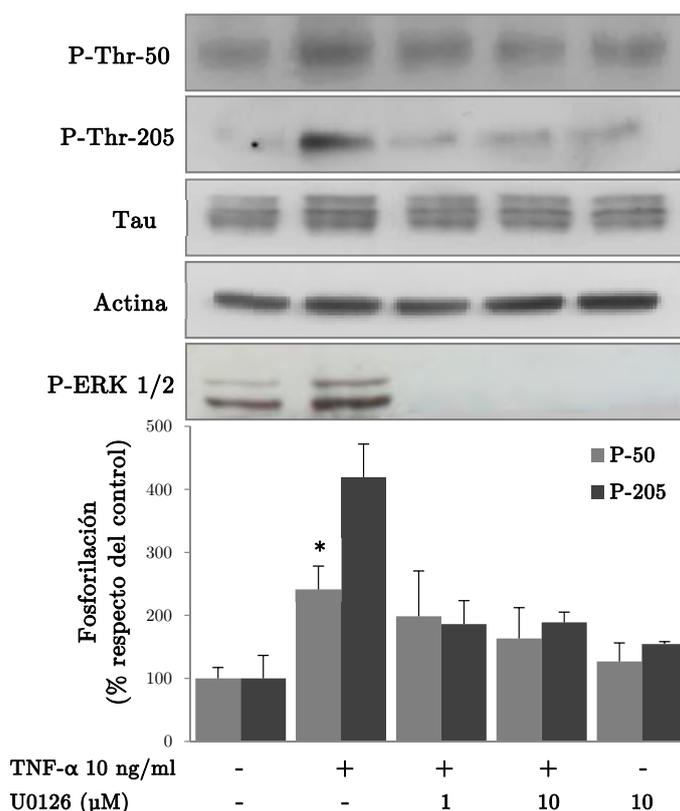


Figura 2.8.- La ruta de señalización de las ERKs regula la fosforilación del residuo Thr-205 de Tau inducida por TNF- α . Las células diferenciadas se incubaron en ausencia o en presencia de diferentes concentraciones del inhibidor de las ERKs, U0126, durante una hora. Transcurrido este tiempo, se añadió 10 ng/ml de TNF- α y la incubación se prolongó durante 24 h. Al finalizar el experimento, las células se lisaron y los niveles de las diferentes proteínas se analizaron mediante Western blot utilizando anticuerpos específicos. Como control positivo del efecto del inhibidor se analizaron los niveles de fosforilación de las ERKs. En la figura se muestra un blot representativo y el análisis densitométrico correspondiente a la media \pm EEM de la relación existente entre los niveles de fosforilación de Tau y de Tau total de tres (para el caso de la Thr-50) o dos (para la Thr-205) experimentos independientes. Los datos se expresan como el porcentaje de los niveles de fosforilación de las diferentes formas de Tau con respecto al control. * $p < 0,05$, comparado con las células sin tratar.

2.1.8. La cascada de señalización de las JNKs participa en la fosforilación del residuo Thr-50 de Tau

Como se ha mostrado anteriormente, las JNKs son fosforiladas y activadas por el tratamiento con TNF- α , por ello y por su implicación en las enfermedades neurodegenerativas (Ploia *et al.*, 2011), también se quiso conocer la importancia de esta ruta en la fosforilación de Tau en los residuos seleccionados. Para ello se siguió el protocolo descrito en el apartado anterior, utilizando en esta ocasión un péptido inhibidor de JNKs. Como se puede observar en la figura 2.9, el péptido inhibidor de JNKs previno el aumento

en los niveles de fosforilación de Tau en el residuo Thr-50 estimulados por TNF- α . Sin embargo, sobre la fosforilación de la Thr-205 pareció no tener mucho efecto, aunque sí previno parcialmente su fosforilación basal. Asimismo, se analizó el estado de fosforilación de c-jun, para comprobar que la actividad de las JNKs estaba inhibida. Los resultados mostraron que el tratamiento con péptido inhibidor previno la fosforilación de este sustrato de JNKs en respuesta a TNF- α . Por tanto, a la vista de estos resultados, se puede decir que la ruta de las JNKs contribuye en la fosforilación de Tau en el residuo Thr-50 inducida por TNF- α , pero no participa en la de Thr-205.

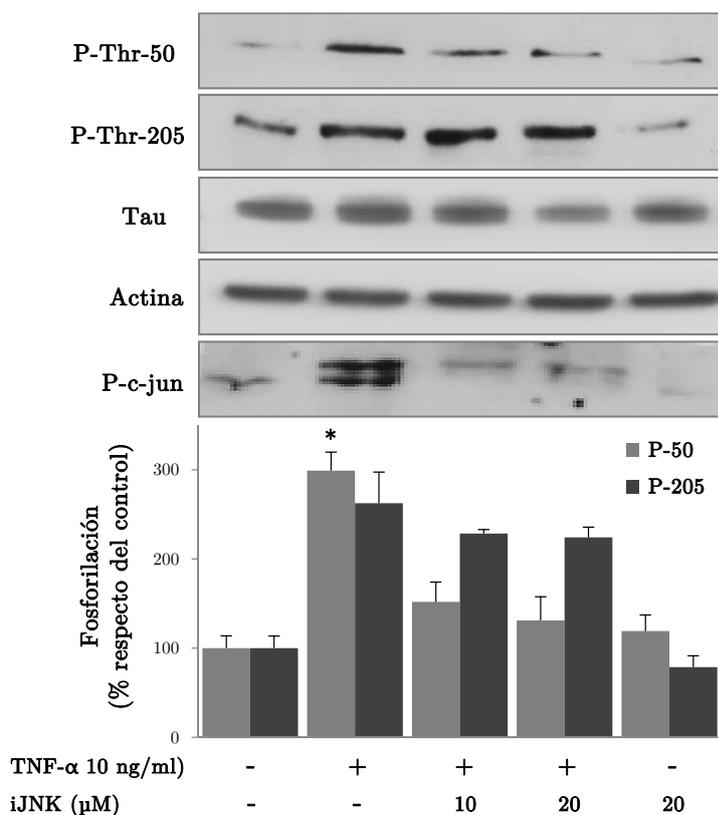


Figura 2.9.- La fosforilación del residuo de Tau Thr-50 promovida por el tratamiento con TNF- α está regulada por las JNKs, no así la de la Thr-205. Las células diferenciadas se incubaron en ausencia o en presencia de diferentes concentraciones del péptido inhibidor de las JNKs (iJNK durante una hora). Transcurrido este tiempo, se añadió 10 ng/ml de TNF- α y la incubación se prolongó durante 24 h. Al finalizar el experimento, las células se lisaron y los niveles de las diferentes proteínas se analizaron mediante Western blot utilizando anticuerpos específicos. Como control positivo del efecto del inhibidor se analizaron los niveles de fosforilación de c-jun. En la figura se muestra un blot representativo y el análisis densitométrico correspondiente a la media \pm EEM de la relación existente entre los niveles de fosforilación de Tau y de Tau total de tres (para el caso de la Thr-50) o dos (para la Thr-205) experimentos independientes. Los datos se expresan como el porcentaje de los niveles de fosforilación de las diferentes formas de Tau con respecto con respecto al control. * $p < 0,05$, comparado con las células sin tratar.

2.1.9. El TNF- α produce cambios en la localización intracelular de Tau en las células SH-SY5Y diferenciadas

Nuestros estudios muestran que el TNF- α aumenta la expresión y la fosforilación de Tau. Sabemos que la localización de Tau en las neuronas depende de su estado de fosforilación (ver introducción y capítulo anterior). Por lo tanto nuestro siguiente objetivo fue estudiar si el TNF- α , promovía cambios en la distribución de la proteína. Para ello, las células SH-SY5Y diferenciadas se incubaron con TNF- α durante 24 h y la localización de Tau y de sus formas fosforiladas, se analizaron mediante inmunofluorescencia, tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos.

En la figura 2.10 se muestra el efecto de TNF- α sobre la morfología y la localización de Tau en las células diferenciadas. Tal y como se puede observar, las células controles poseen una morfología alargada y fusiforme, con presencia de Tau por toda la célula. Cabe destacar que las células SH-SY5Y diferenciadas presentan una mayor intensidad de Tau en núcleo que las células sin diferenciar (ver figura 1.13). Tras la exposición a la citoquina, las células sufrieron los cambios morfológicos descritos anteriormente (figura 2.1): los somas adquieren una morfología más poligonal, y las células poseen menos prolongaciones y más cortas. En cuanto a la distribución de Tau, el TNF- α no modificó su localización, que fue también homogénea por toda la célula, aunque aumentó la intensidad de la señal tanto en el soma como en el núcleo. Estos resultados corroboran nuestros resultados anteriores que indicaban que el TNF- α estimula la expresión de Tau.

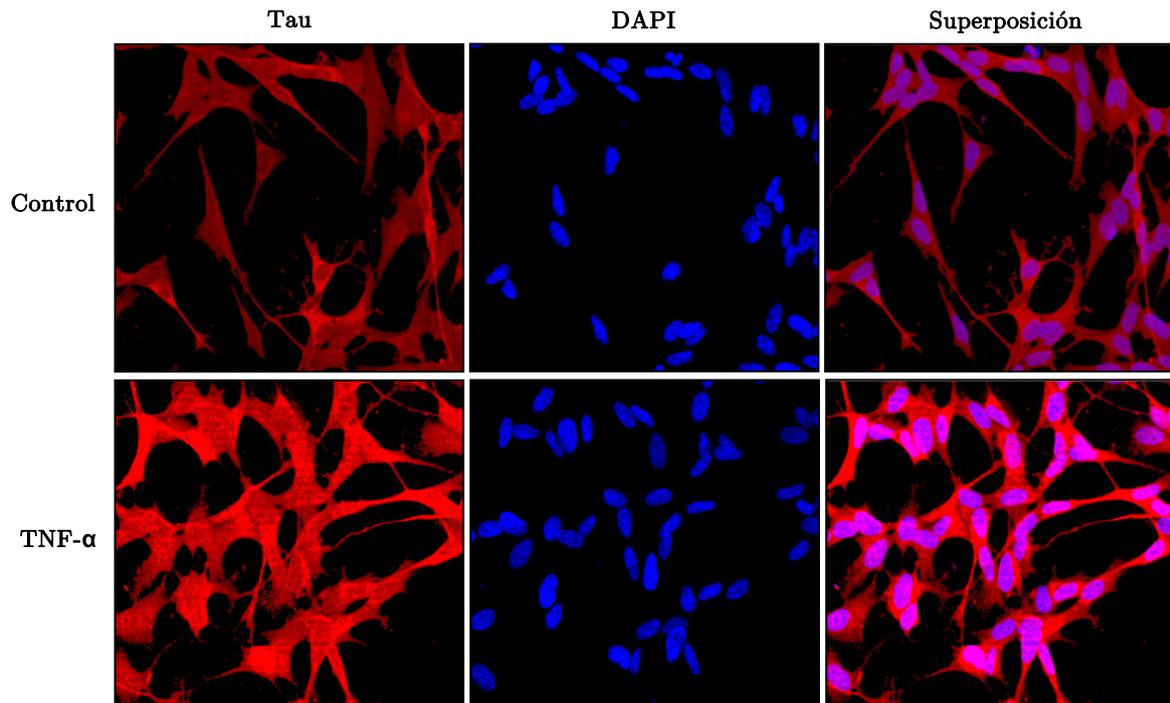


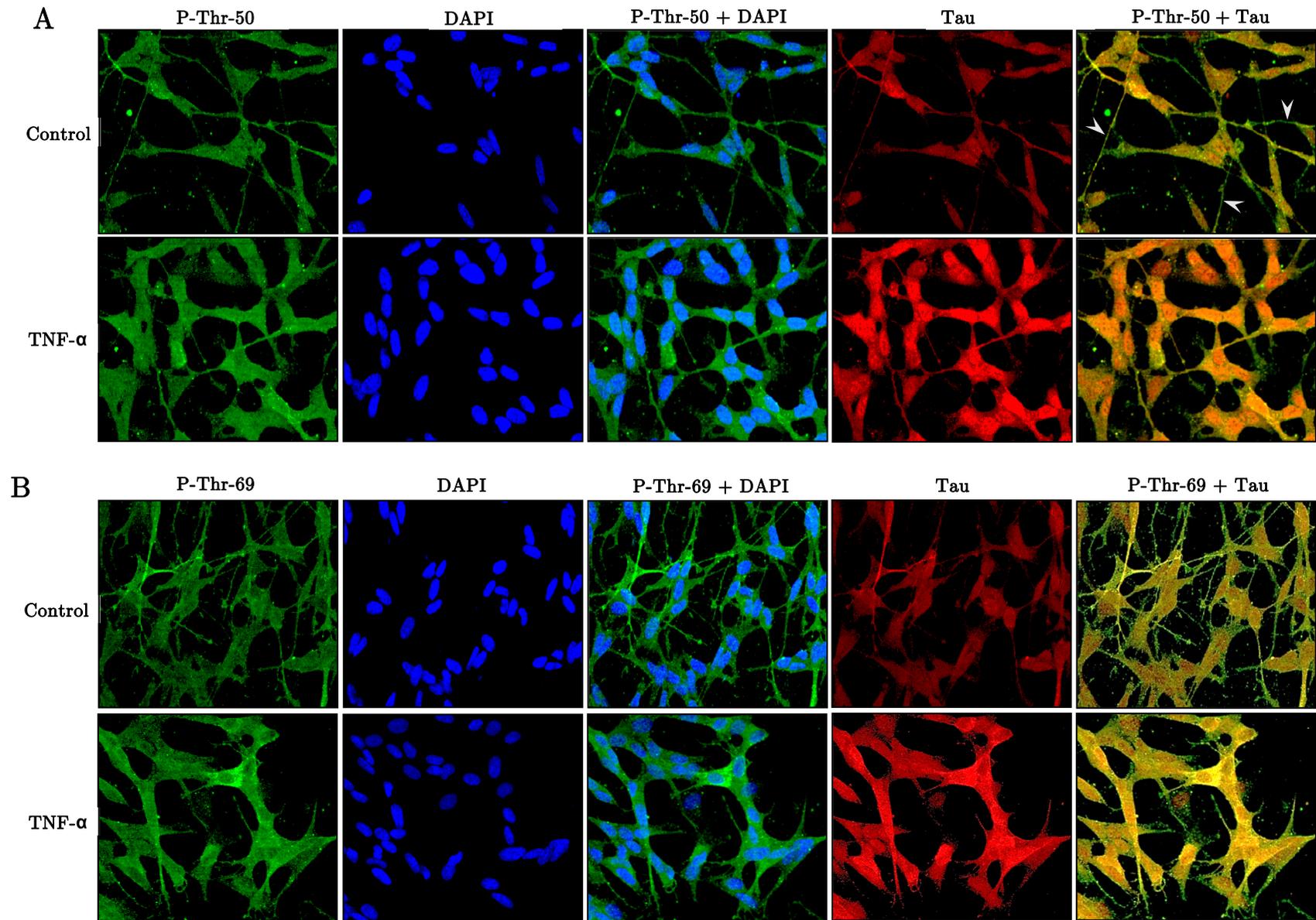
Figura 2.10.- Distribución intracelular de Tau en respuesta a $TNF-\alpha$. Las células diferenciadas se incubaron durante 24 h con 10 ng/ml de $TNF-\alpha$. Tras lo cual, se fijaron y se tiñeron con Tau (rojo) y con DAPI (azul), como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. La observación de las células se realizó mediante microscopía confocal. Se muestra una imagen representativa de más de tres experimentos independientes.

Tras comprobar los cambios en la proteína total, analizamos el efecto de $TNF-\alpha$ sobre la distribución de las formas de Tau fosforiladas. En la figura 2.11-A se observa que en las células control Tau fosforilada en el residuo Thr-50 (P-Thr-50) se localiza en toda la célula, siendo más abundante, que Tau sin fosforilar, en las terminaciones de las prolongaciones (ver cabeza de flecha de color blanco en la columna de superposición de imágenes de P-Thr-50 + Tau). Estos resultados sugieren que Tau se encuentra principalmente fosforilada en la posición Thr-50 en esas zonas. Tras la incubación con $TNF-\alpha$, la intensidad de fluorescencia de la fosfo-Tau Thr-50 se incrementó con respecto a las células sin tratar, lo que sugiere que el $TNF-\alpha$ induce la fosforilación de Tau en ese residuo, lo que apoya los resultados observados mediante Western blot (figura 2.5). Por otra parte, el $TNF-\alpha$ produjo una redistribución de fosfo-Tau Thr-50 hacia el citosol (ver cabeza de flecha de color blanco en la columna de superposición de imágenes de P-Thr-50 + DAPI) y en menor medida hacia el núcleo, y un menor aumento de intensidad en la mayoría de las prolongaciones con respecto a Tau. En la figura 2.11-B se muestran los

resultados derivados de la detección de Tau fosforilada en el residuo Thr-69 (P-Thr-69). La distribución de la fosfo-Tau Thr-69 en las células control fue similar a la observada con fosfo-Tau Thr-50 ya que estaba presente por toda la célula, incluido el núcleo. La incubación con TNF- α incrementó la intensidad de fluorescencia de fosfo-Tau Thr-69 en el soma y en menor medida en las prolongaciones y en el núcleo. Por lo tanto, a diferencia de lo que sucedía con el tratamiento con sorbitol (figura 1.14-B), el TNF- α no produjo una disminución de fosfo-Tau Thr-69 en el núcleo.

La fosforilación de Tau en el residuo Thr-181 apenas pudo detectarse en las células control, como se puede observar en la figura 2.11-C. Sin embargo, el tratamiento con TNF- α provocó un fuerte incremento de la fosfo-Tau Thr-181 en el citoplasma alrededor del núcleo. Este aumento de la fosforilación de Tau en el residuo Thr-181 en respuesta a TNF- α no pudo ser detectado mediante Western blot (figura 2.5), aunque sí que se detectó en respuesta a sorbitol (figura 1.8)

Por problemas técnicos no pudimos estudiar el efecto de TNF- α sobre la fosforilación y la distribución de Tau en el residuo Thr-205 mediante inmunofluorescencia.



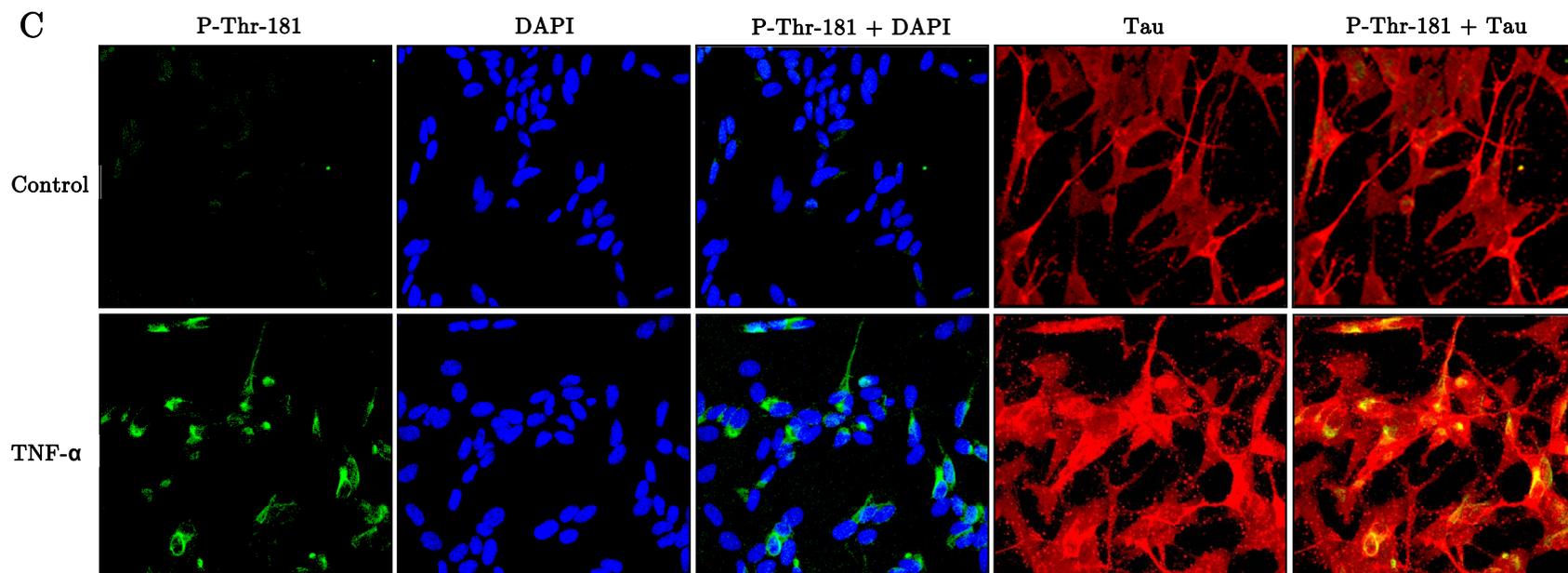


Figura 2.11.- Localización intracelular de las formas fosforiladas de Tau en Thr-50 (A), Thr-69 (B) y Thr-181 (C) en respuesta a TNF- α . Las células diferenciadas se incubaron durante 24 h con 10 ng/ml de TNF- α . Tras lo cual, se fijaron y tiñeron con las formas fosforiladas de Tau (verde), Tau (rojo) y con DAPI (azul), como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. La observación de las células se realizó mediante microscopía confocal. Las cabezas de flecha blancas señalan la presencia de Tau fosforilada en las prolongaciones. Se muestra una imagen representativa, de más de tres experimentos independientes.

2.1.10. Efecto del TNF- α sobre el transporte neuronal y la organización de los microtúbulos

La sobreexpresión y la hiperfosforilación de Tau inhibe el transporte a lo largo del axón y produce la desorganización de los microtúbulos (Ebner *et al.*, 1998, Avila *et al.*, 2004, Morris *et al.*, 2011). Ya que en nuestras condiciones experimentales, el TNF- α aumenta la expresión y la fosforilación de Tau quisimos saber si también podría afectar al transporte axonal y a la organización de los microtúbulos. Para ello, las células se incubaron con TNF- α durante 24 h, tras lo cual se analizó la localización de los neurofilamentos, ya que estas proteínas se transportan a lo largo del axón, y de tubulina mediante inmunofluorescencia. En la figura 2.12-A, se puede observar la presencia de neurofilamentos tanto en el soma como en las prolongaciones en las células controles. El tratamiento con TNF- α indujo la acumulación de los neurofilamentos en el soma, dejando de detectarse en las prolongaciones. Por otra parte, el TNF- α no modificó la localización de tubulina ni, en consecuencia, la organización de los microtúbulos (figura 2.12-B), aunque la intensidad de la fluorescencia disminuyó débilmente en respuesta al tratamiento. En conjunto estos resultados sugieren que el TNF- α inhibe el transporte a lo largo de las prolongaciones sin que llegue a afectar la red de microtúbulos.

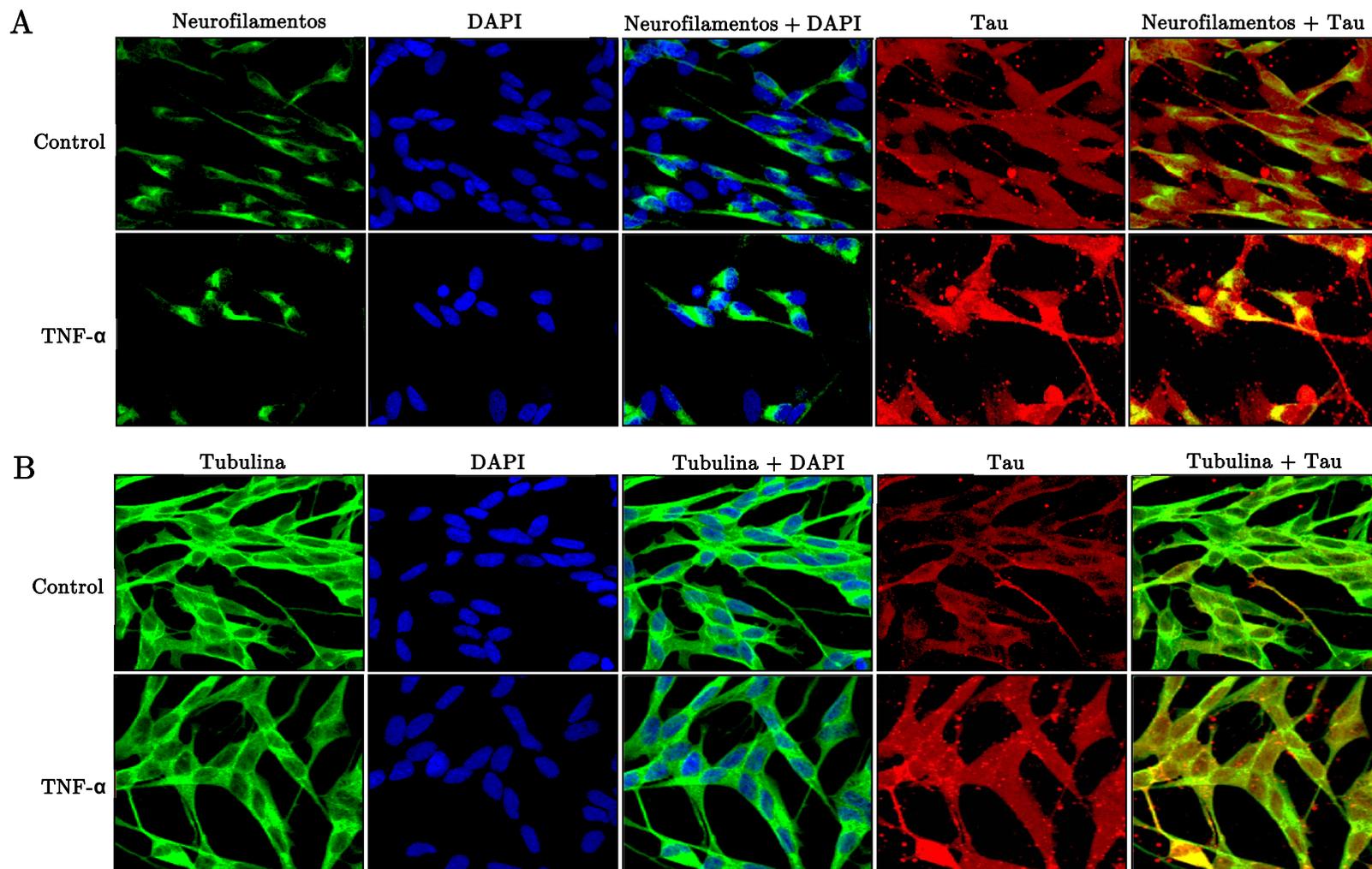


Figura 2.12.- Efecto del TNF- α sobre el transporte neuronal y la organización de los microtúbulos. Las células diferenciadas se incubaron durante 24 h con 10 ng/ml de TNF- α . Tras lo cual, se fijaron y tiñeron con neurofilamentos intermedios (A, verde), tubulina (B, verde), Tau (rojo) y con DAPI (azul), como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. La observación de las células se realizó mediante microscopía confocal. Se muestra una imagen representativa, de dos experimentos independientes.

2.1.11. Efecto del TNF- α sobre la proteína asociada a los microtúbulos MAP-2

Diferentes estudios muestran que la proteína MAP-2 muestra un comportamiento similar al de Tau en las enfermedades neurodegenerativas (Sanchez *et al.*, 2000; Dehmelt y Halpain, 2005). Por otra parte, Tau hiperfosforilada es capaz de secuestrar a MAP-2 (Alonso *et al.*, 1997; Iqbal y Grundke-Iqbal, 2005, 2008). Por lo tanto, nuestro siguiente objetivo fue estudiar el efecto de TNF- α sobre la localización de MAP-2. En la figura 2.13 se puede observar la presencia de MAP-2 por toda la célula, y que el TNF- α aumentó la intensidad de fluorescencia pero no la distribución de la proteína, resultado similar al obtenido con Tau.

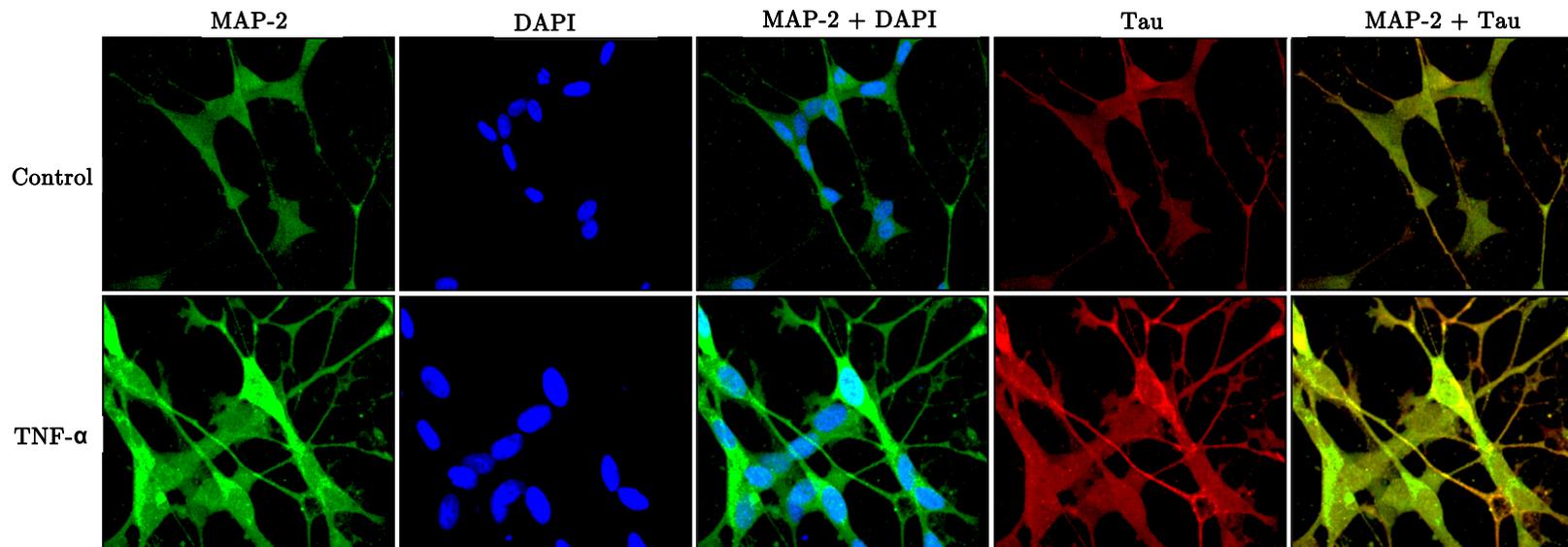


Figura 2.13.- Efecto del TNF- α sobre la proteína MAP-2. Las células diferenciadas se incubaron durante 24 h con 10 ng/ml de TNF- α . Tras lo cual, se fijaron y tiñeron con MAP-2 (verde), Tau (rojo) y con DAPI (azul), como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. La observación de las células se realizó mediante microscopía confocal. Se muestra una imagen representativa, de dos experimentos independientes.

2.2. Estudio del efecto de medios condicionados sobre la expresión, la fosforilación y la localización intracelular de Tau en las células SH-SY5Y diferenciadas

Como hemos introducido anteriormente, durante la inflamación la microglía, y en menor grado los astrocitos y las neuronas, secretan citoquinas proinflamatorias, quimioquinas y factores citotóxicos, como las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, al medio extracelular (Liu *et al.*, 1994; Hanisch, 2002; Morales *et al.*, 2014).

Por lo tanto nuestro siguiente objetivo fue estudiar el efecto de los medios condicionados procedentes de la activación de las células U937 diferenciadas con PMA y posteriormente estimuladas con PMA, LPS o con una mezcla de ambos compuestos, sobre Tau en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y diferenciadas con ácido retinoico. La activación de las células U937 lleva consigo la producción de un medio rico en citoquinas y quimioquinas, semejante al que se obtendría en una respuesta inflamatoria (tabla 2.1 de Materiales y Métodos).

2.2.1. Efecto de los medios condicionados sobre la morfología de las células SH-SY5Y diferenciadas

Siguiendo el esquema marcado en el estudio con TNF- α , el primer objetivo fue examinar el efecto de los medios condicionados sobre la morfología celular. Para ello, las células SH-SY5Y diferenciadas se incubaron con ácido retinoico con distintos porcentajes de medios condicionados durante 24 h. La figura 2.14 muestra que los mayores porcentajes de medio perjudicaban de manera más acusada la morfología de las células. En general, se observó una disminución de la longitud y un aumento del calibre de las neuritas que fue inversamente proporcional al porcentaje de medio utilizado, así como una forma más piramidal y menos fusiforme del soma, excepto en las células incubadas con el medio estimulado por LPS, que presentaron prolongaciones más finas y alargadas que las observadas en las células control. Hay que mencionar, que algunas de las células tratadas con la mezcla de PMA y LPS presentaron un fenotipo típico de la estimulación por PMA, pero en la misma placa también se observaron células con características propias de las

placa también se observaron células con características propias de las estimuladas por LPS, lo que será de especial interés en el apartado de localización intracelular. Además, a mayor tiempo de incubación los efectos fueron más marcados, observándose las células más perjudicadas por el tratamiento.

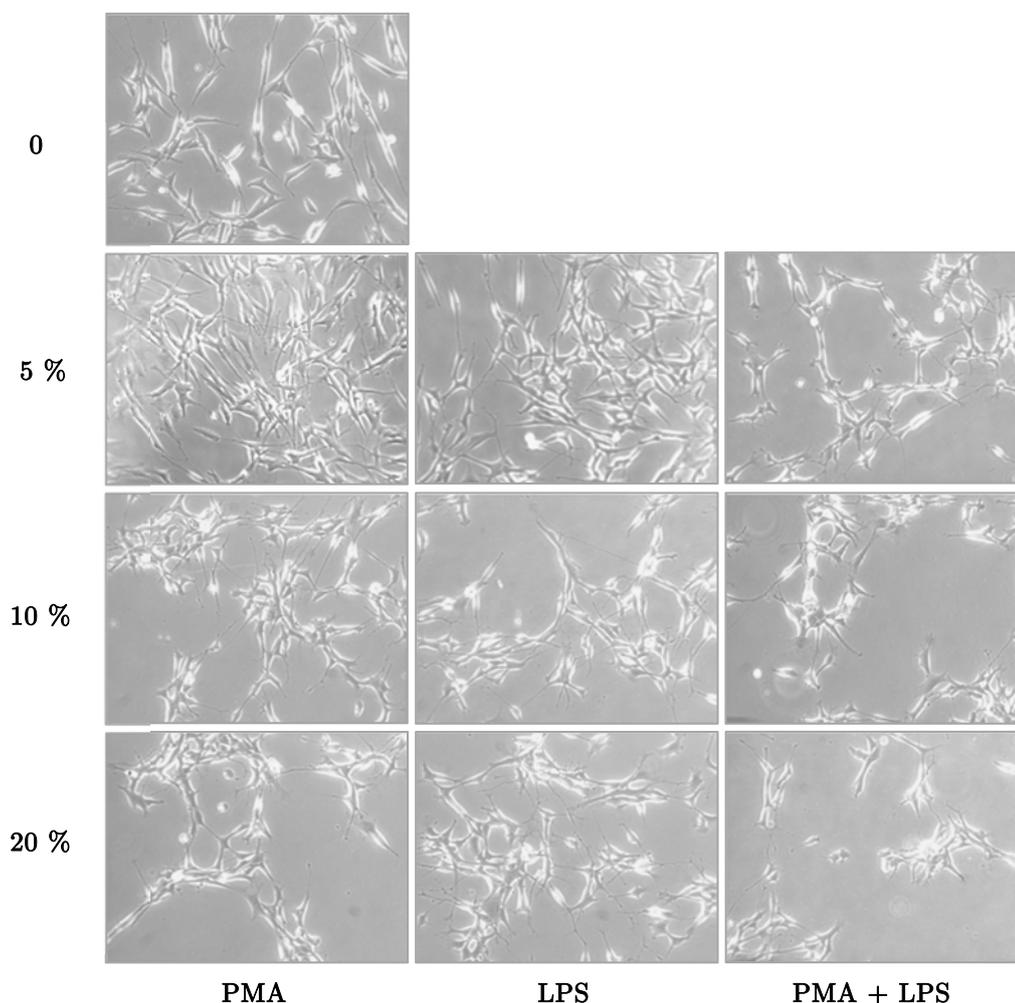


Figura 2.14.- Los medios condicionados producen cambios morfológicos en las células SH-SY5Y diferenciadas. Las células SH-SY5Y diferenciadas con 10 μ M de ácido retinoico durante 48 h se privaron de suero y estimularon con diferentes porcentajes de los medios condicionados durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, las células se visualizaron y fotografiaron en un microscopio invertido de contraste de fases a 100x.

2.2.2. Los medios condicionados afectan a la viabilidad celular de diferente manera

A la vista de los resultados obtenidos en los experimentos de morfología, decidimos analizar si el tratamiento con estos medios afectaba a la viabilidad celular. En la figura 2.15 se puede observar que el medio estimulado con LPS no afectó a la viabilidad celular. Sin embargo, los medios procedentes de células activadas con PMA y con la mezcla de PMA y

LPS disminuyeron la viabilidad de manera dependiente de la concentración utilizada. Los efectos del PMA sólo fueron significativos cuando se utilizó un porcentaje de medio del 20 %. El medio obtenido por la mezcla de PMA y LPS fue el que provocó mayor daño celular, ya que la reducción de viabilidad fue estadísticamente significativa desde el 5 %.

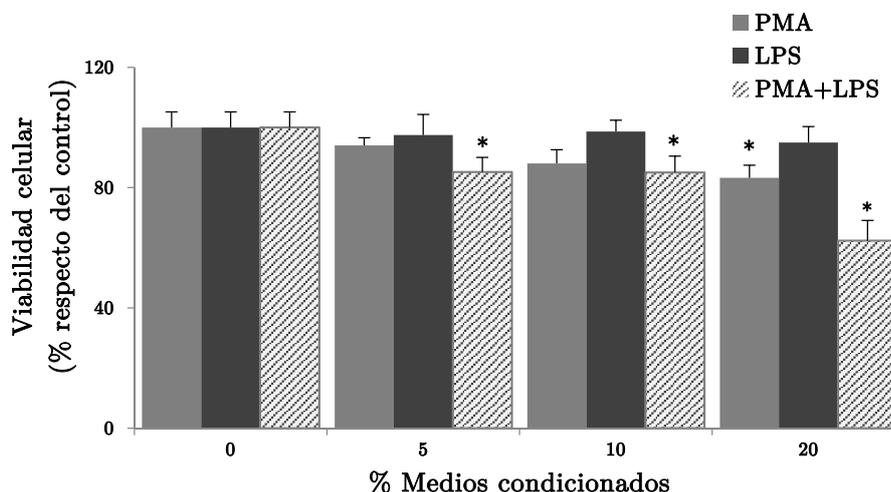


Figura 2.15.- Efecto de los medios condicionados sobre la viabilidad celular. Las células diferenciadas se trataron con diferentes porcentajes de los medios condicionados durante 24 h y la viabilidad celular se determinó mediante el método colorimétrico del MTT, según se describe en el apartado Materiales y Métodos. La viabilidad celular se expresa como el porcentaje de células viables con respecto al control. Se muestra la media \pm EEM de tres experimentos independientes medidos por triplicado. * $p < 0,05$, comparado con las células sin tratar.

2.2.3. Los niveles de Tau no son modificados por los medios condicionados

Nuestro siguiente objetivo fue estudiar si los medios condicionados promovían cambios en los niveles totales de Tau. Para lo cual, las células se incubaron con diferentes porcentajes de los medios condicionados durante 24 h y los niveles de Tau se analizaron mediante Western blot. Como se muestra en la figura 2.16, los niveles de Tau aumentaron en los medios PMA y LPS de una forma dependiente al porcentaje utilizado.

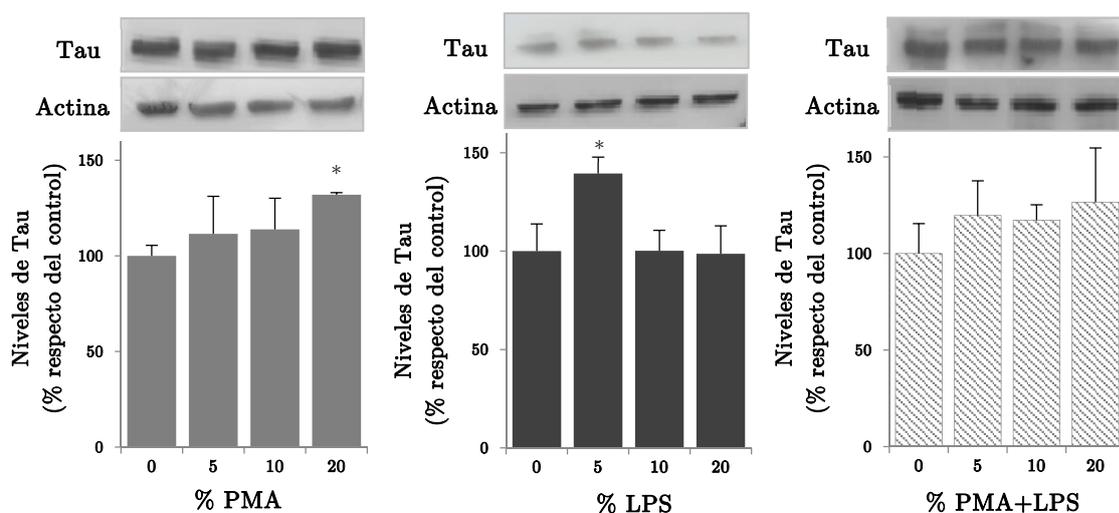


Figura 2.16.- Los niveles de Tau aumentan en respuesta a los medios condicionados. Las células diferenciadas se trataron con diferentes concentraciones de los medios condicionados durante 24 h. Después del experimento, las células se lisaron y cantidades iguales de proteína se analizaron mediante Western blot. En la figura se muestra un blot representativo y el análisis densitométrico correspondiente a la media \pm EEM de al menos tres experimentos independientes. Los datos se expresan como el porcentaje de los niveles de proteína con respecto al control * $p < 0,05$, comparado con las células sin tratar.

2.2.4. Los medios condicionados promueven la fosforilación de Tau

Una vez se comprobó que el tratamiento con los medios condicionados no modificaba los niveles totales de Tau, el siguiente objetivo fue analizar si estos medios inducían la fosforilación de Tau en los residuos Thr-50, Thr-181 y Thr-205. Para ello, las células SH-SY5Y diferenciadas se incubaron con porcentajes crecientes de los medios condicionados durante 24 h, tras lo cual la fosforilación residuo-específica de Tau se analizó mediante Western blot. En la figura 2.17 se observa que el medio condicionado PMA promovió un aumento de la fosforilación de Tau en los residuos Thr-50 y Thr-181, alcanzando un máximo con un porcentaje del 10 %, para disminuir ligeramente a continuación. La fosforilación del residuo Thr-205 incrementó progresivamente y de manera dependiente al porcentaje utilizado.

Los resultados obtenidos con el medio LPS se muestran en la figura 2.18. Como se puede observar, el medio LPS produjo un aumento en la fosforilación de Tau en los tres residuos analizados que fue máximo y significativo a un porcentaje de 10 % para disminuir a continuación.

En la figura 2.19 se puede observar que el medio PMA + LPS también produjo un aumento en la fosforilación de Tau en los tres residuos estudiados, pero en este caso el efecto comenzó a ser significativo con un porcentaje del 5 %, fue máximo con el 10 % para disminuir a continuación en los residuos Thr-50 y Thr-205, mientras que los niveles de fosforilación del residuo Thr-181 se mantuvieron con las tres concentraciones utilizadas.

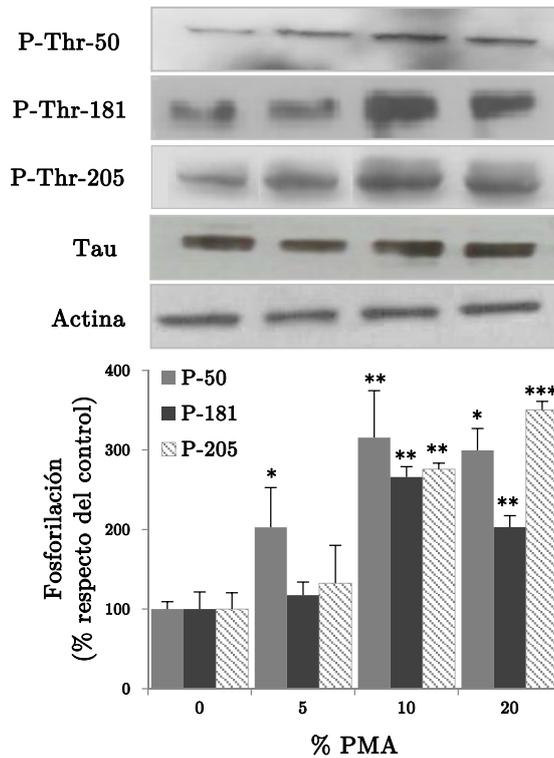


Figura 2.17.– *El medio condicionado PMA promueve la fosforilación de Tau.* Las células diferenciadas fueron tratadas con diferentes porcentajes de medio procedentes de células U937 estimuladas con PMA durante 24 h. Después del experimento, las células se lisaron y cantidades iguales de proteína (10 µg para Tau total y actina y 30 µg para las formas fosforiladas) se analizaron mediante Western blot. En la figura se muestra un blot representativo y el análisis densitométrico correspondiente a la media ± EEM de al menos tres experimentos independientes. Los datos se expresan como el porcentaje de los niveles de proteína fosforilada con respecto al control. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$, comparado con las células sin tratar.

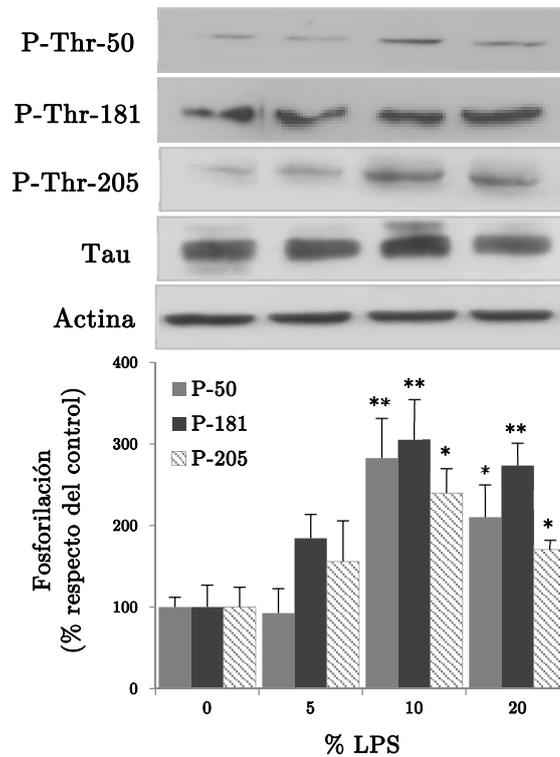


Figura 2.18.— *El medio condicionado LPS aumenta la fosforilación de Tau en los residuos Thr-50, Thr-181 y Thr-205*. Las células diferenciadas fueron tratadas con diferentes porcentajes de medio LPS durante 24 h. Después del experimento, las células se lisaron y cantidades iguales de proteína (10 μ g para Tau total y actina y 30 μ g para las formas fosforiladas) se analizaron mediante Western blot. En la figura se muestra un blot representativo y el análisis densitométrico correspondiente a la media \pm EEM de al menos tres experimentos independientes. Los datos se expresan como el porcentaje de los niveles de proteína fosforilada con respecto al control * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$, comparado con las células sin tratar.

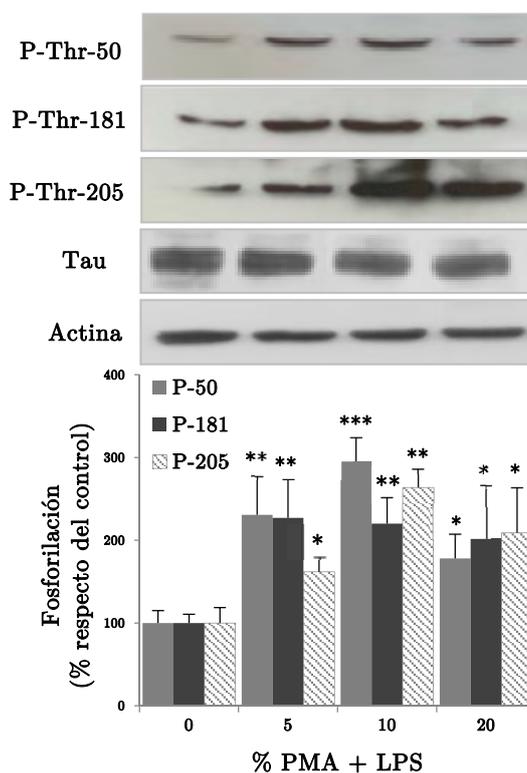


Figura 2.19.– Efecto del medio condicionado PMA + LPS sobre la fosforilación de Tau. Las células diferenciadas fueron tratadas con diferentes porcentajes de medio PMA + LPS durante 24 h. Después del experimento, las células se lisaron y cantidades iguales de proteína se analizaron mediante Western blot. En la figura se muestra un blot representativo y el análisis densitométrico correspondiente a la media \pm EEM de al menos tres experimentos independientes. Los datos se expresan como el porcentaje de los niveles de proteína fosforilada con respecto al control * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$, comparado con las células sin tratar.

2.2.5. Las MAPKs son activadas por el tratamiento con los medios condicionados

El siguiente objetivo fue analizar la fosforilación, y en consecuencia la activación, de las MAPKs y su posible participación en la fosforilación de Tau inducida por los medios condicionados. Por ello, las células SH-SY5Y diferenciadas se incubaron con un 10 % de los medios condicionados durante diferentes periodos de tiempo y los extractos celulares obtenidos se analizaron mediante Western blot. En la figura 2.20 se observa que todos los medios condicionados activaron a las MAPKs estudiadas. El medio PMA activó de manera rápida a las p38s, alcanzando un máximo a los 15 minutos, para disminuir rápidamente a continuación. La fosforilación de las ERK 1/2 apareció de forma más tardía, observándose el pico de activación entre la primera y la segunda hora de tratamiento. Las JNKs se activaron a los 5 min y se mantuvieron fosforiladas hasta el final del experimento.

El medio LPS aumentó la fosforilación de las p38s y de las ERK 1/2 de manera rápida, ya que se observó a partir de los 5 minutos, pero su efecto fue breve ya que la fosforilación de estas quinasas disminuyó de forma progresiva a partir de los 30 minutos. La fosforilación de las JNKs en respuesta a LPS fue más lenta pero permaneció hasta el final del experimento.

El medio PMA + LPS activó a las quinasas y su efecto, en relación con el tiempo, pareció combinar los efectos observados con cada medio particular. Las p38s se fosforilaron rápidamente, al igual que las ERK 1/2 pero éstas presentaron otro pico de activación tardío, a las 2 h, debido posiblemente a la influencia del PMA. La fosforilación de las JNKs también fue rápida y sostenida en el tiempo, pero su nivel de fosforilación fue mayor que la observada con los medios PMA + LPS.

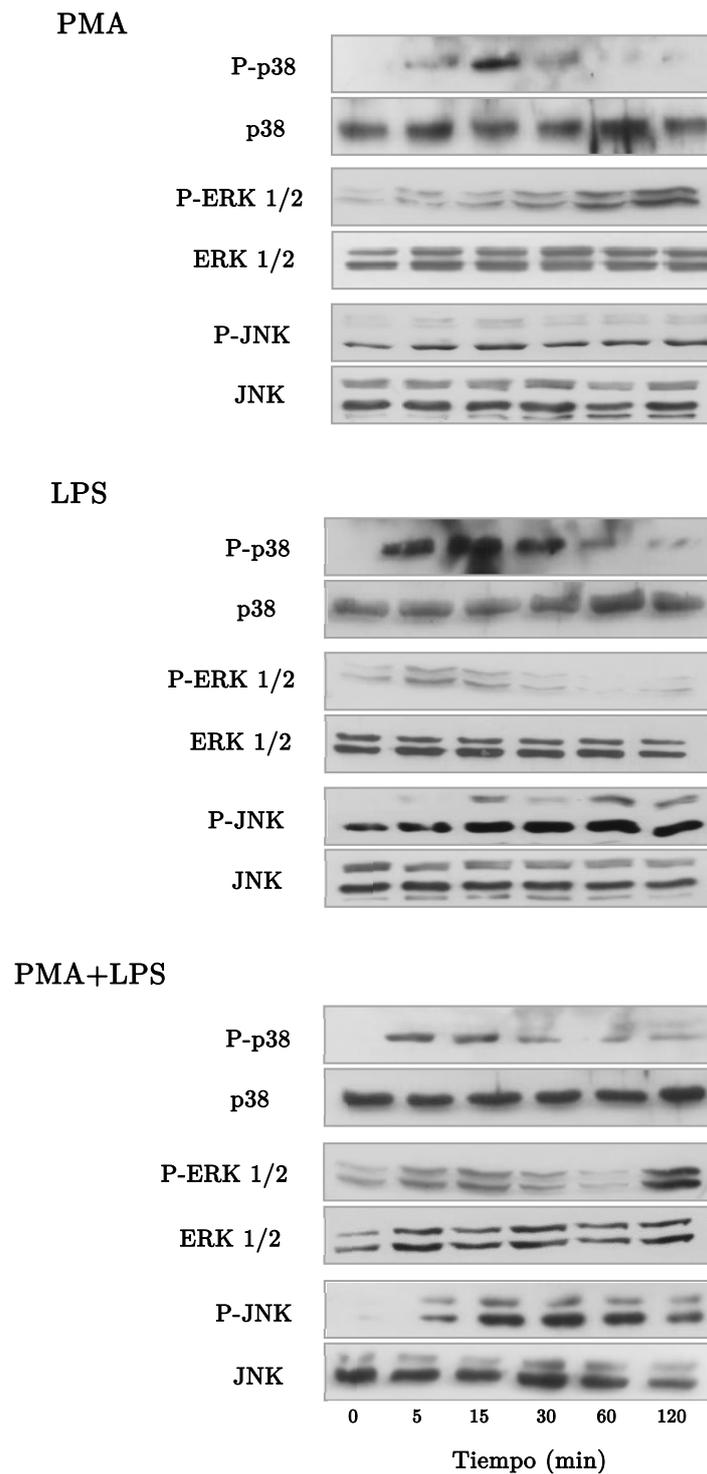


Figura 2.20.– *Los medios condicionados promueven la fosforilación de las MAPKs.* Las células diferenciadas se trataron con el 10 % de medio PMA, LPS o PMA + LPS durante los tiempos indicados en la figura. Después del experimento, las células se lisaron y los niveles de fosforilación de las MAPKs y sus niveles totales se determinaron mediante Western Blot. En la figura se muestra una imagen representativa de al menos, tres experimentos independientes.

2.2.6. Regulación de la fosforilación de Tau inducida por los medios condicionados por las p38 MAPKs

Una vez comprobado que los diferentes medios condicionados inducían la activación de las MAPKs quisimos estudiar la implicación de cada ruta de señalización en la fosforilación residuo-específica de Tau. Comenzamos con la ruta de las p38s. Para ello, las células se incubaron con un 10 % de cada uno de los medios condicionados en presencia o ausencia del inhibidor BIRB0796. Finalizado el experimento, las células se lisaron y las diferentes proteínas se analizaron mediante Western blot.

En la figura 2.21 se muestran los resultados correspondientes al medio PMA. Como se puede observar, las dos concentraciones utilizadas de BIRB0796 previnieron la fosforilación de Tau en los residuos Thr-181 y Thr-205 inducida por el medio PMA. El inhibidor sólo, también disminuyó los niveles basales de fosforilación de Tau en estos residuos. Estos resultados sugieren que las cuatro isoformas de las p38s participan en la fosforilación de Tau en estos residuos. Sin embargo, ninguna de las concentraciones de este inhibidor previno la fosforilación del residuo Thr-50 de Tau.

Como se puede observar en la figura 2.22, el tratamiento con el medio LPS promovió una subida en los niveles de fosforilación en los tres residuos estudiados y ambas concentraciones del inhibidor previnieron dicho incremento, especialmente en el residuo Thr-205, cuya fosforilación disminuyó por debajo los niveles basales con la concentración más alta de BIRB0796. Estos resultados sugieren que las cuatro isoformas de p38 están implicadas en la fosforilación de los residuos Thr-50, Thr-181 y Thr-205 de Tau inducidas por el medio LPS.

El efecto del BIRB0796 sobre la fosforilación de Tau inducida por el medio PMA + LPS fue diferente dependiendo del residuo estudiado. Así, el inhibidor previno parcialmente la fosforilación en los sitios Thr-50 y Thr-205, y completamente (figura 2.23), la de la Thr-181, cuyos niveles disminuyeron por debajo de los basales cuando se utilizó la concentración mayor del inhibidor.

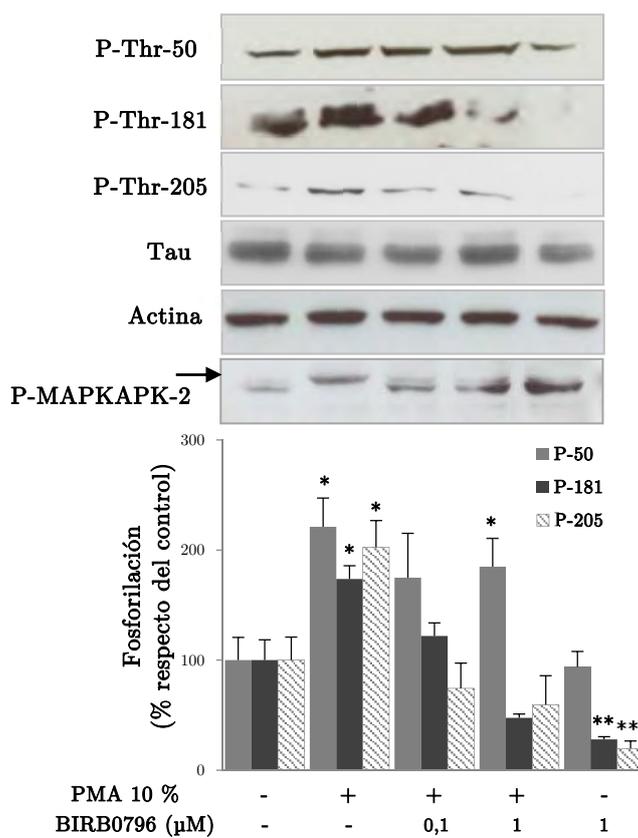


Figura 2.21.- Las p38s regulan la fosforilación de Tau inducida por el medio PMA. Las células diferenciadas se incubaron en ausencia o en presencia de 0,1 ó 1 μM de BIRB0796 durante 1 h. Transcurrido este tiempo se adicionó al medio el 10 % de medio PMA y se incubaron 24 h más. Al finalizar el experimento, las células se lisaron y los niveles de las diferentes proteínas se analizaron mediante Western blot utilizando anticuerpos específicos. Como control positivo del efecto del inhibidor se analizó la movilidad electroforética de MAPKAPK-2. En la figura se muestra un blot representativo y el análisis densitométrico correspondiente a la media ± EEM de tres experimentos independientes. Los datos se expresan como el porcentaje de los niveles de proteína fosforilada con respecto al control *p<0,05 y **p<0,01, comparado con las células sin tratar.

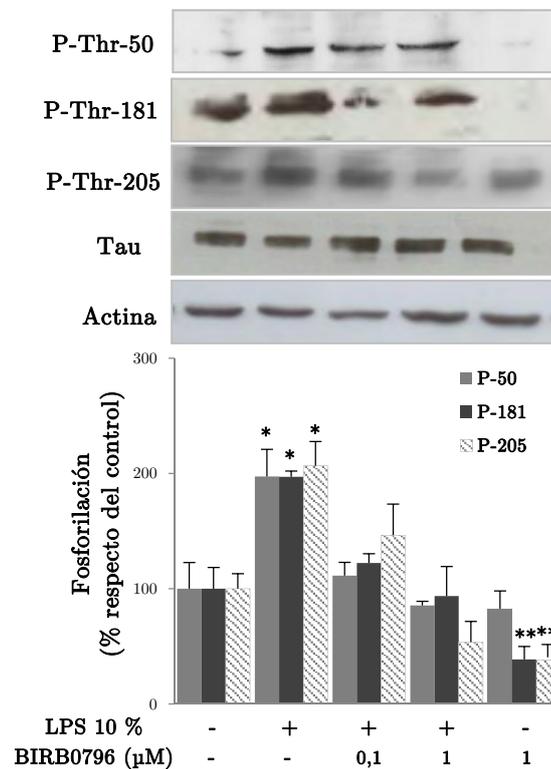


Figura 2.22.- El aumento de la fosforilación en los residuos Thr-50, Thr-181 y Thr-205 de Tau provocado por el medio LPS está regulado por las p38s. Las células diferenciadas se incubaron en ausencia o en presencia de 0,1 ó 1 μM de BIRB0796 durante 1 h. Transcurrido este tiempo se adicionó al medio el 10 % de medio LPS y se incubaron 24 h más. Al finalizar el experimento, las células se lisaron y los niveles de las diferentes proteínas se analizaron mediante Western blot utilizando anticuerpos específicos. En la figura se muestra un blot representativo y el análisis densitométrico correspondiente a la media ± EEM de tres experimentos independientes. Los datos se expresan como el porcentaje de los niveles de proteína fosforilada con respecto al control *p<0,05 y **p<0,01, comparado con las células sin tratar.

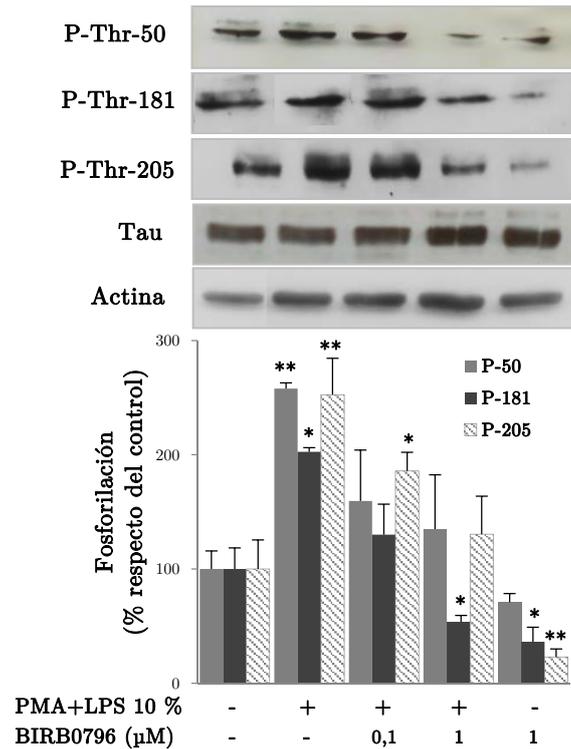


Figura 2.23.- Las p38s están implicadas en la fosforilación de la Thr-50, Thr-181 y Thr-205 de Tau promovida por el medio PMA + LPS. Las células diferenciadas se incubaron en ausencia o en presencia de 0,1 ó 1 µM de BIRB0796 durante 1 h. Transcurrido este tiempo se adicionó al medio el 10 % de medio PMA + LPS y se incubaron 24 h más. Al finalizar el experimento, las células se lisaron y los niveles de las diferentes proteínas se analizaron mediante Western blot utilizando anticuerpos específicos. En la figura se muestra un blot representativo y el análisis densitométrico correspondiente a la media ± EEM de tres experimentos independientes. Los datos se expresan como el porcentaje de los niveles de proteína fosforilada con respecto al control *p<0,05 y **p<0,01, comparado con las células sin tratar.

2.2.7. La ruta de las ERKs regula la fosforilación de Tau inducida por los medios condicionados

Tras examinar la vía de señalización de las p38s, el siguiente objetivo fue analizar la implicación de las ERKs en la fosforilación de Tau inducida por los medios condicionados. En la figura 2.24 se puede observar que el aumento en la fosforilación de los tres residuos de Tau inducida por el medio PMA fue prevenido por el inhibidor U0126 de una forma dependiente de la concentración, alcanzándose los niveles basales de fosforilación con la concentración de 10 µM. El medio LPS también indujo un aumento en los niveles de fosforilación de los residuos Thr-50, Thr-181 y Thr-205 que el tratamiento con el U0126 consiguió prevenir, obteniendo prácticamente idénticos resultados con las dos

concentraciones utilizadas (figura 2.25). Sin embargo, este inhibidor fue incapaz de prevenir completamente el incremento de fosforilación en la Thr-50 de Tau inducido por el medio de PMA + LPS, aunque el aumento en la fosforilación de los residuos Thr-181 y Thr-205 sí que fue reducido hasta los niveles basales tras el tratamiento con el U0126. Este inhibidor también disminuyó la fosforilación basal de Tau en el residuo Thr-181 (figura 2.26).

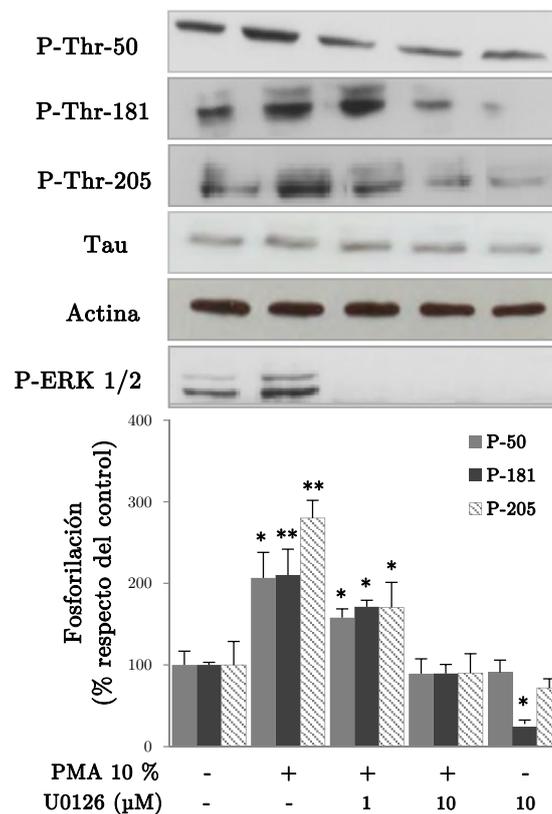


Figura 2.24.- La fosforilación de Tau inducida por el medio PMA es dependiente de la ruta de las ERKs. Las células diferenciadas se incubaron en ausencia o en presencia diferentes concentraciones del inhibidor de las ERKs U0126 durante 1 h. Transcurrido este tiempo se adicionó al medio el 10 % de medio PMA y se incubaron 24 h. Al finalizar el experimento, las células se lisaron y los niveles de las diferentes proteínas se analizaron mediante Western blot utilizando anticuerpos específicos. Como control positivo del efecto del inhibidor se analizaron los niveles de fosforilación de las ERK 1/2. En la figura se muestra un blot representativo y el análisis densitométrico correspondiente a la media \pm EEM de tres experimentos independientes. Los datos se expresan como el porcentaje de los niveles de proteína fosforilada con respecto al control * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$, comparado con las células sin tratar.

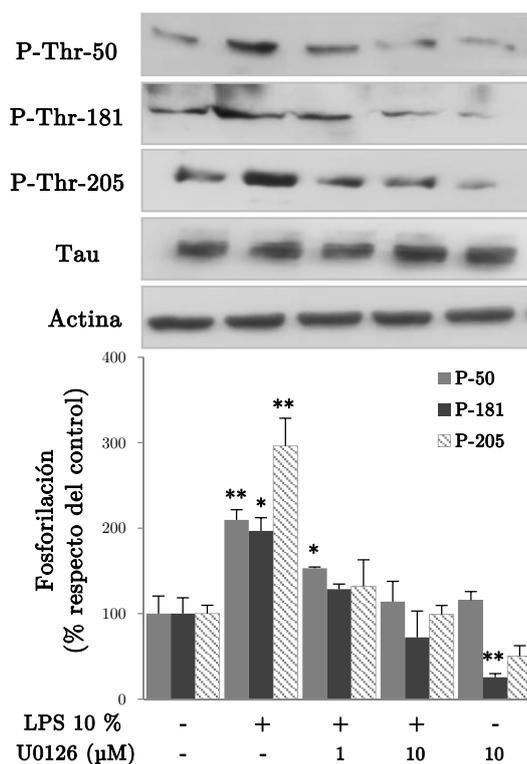


Figura 2.25.- Las ERKs participan en el incremento de la fosforilación de los residuos Thr-50, Thr-181 y Thr-205 de Tau promovido por el medio LPS. Las células diferenciadas se incubaron en ausencia o en presencia de diferentes concentraciones del inhibidor de las ERKs U0126 durante 1 h. Transcurrido este tiempo se adicionó al medio el 10 % de medio LPS y se incubaron 24 h. Al finalizar el experimento, las células se lisaron y los niveles de las diferentes proteínas se analizaron mediante Western blot utilizando anticuerpos específicos. En la figura se muestra un blot representativo y el análisis densitométrico correspondiente a la media \pm EEM de tres experimentos independientes. Los datos se expresan como el porcentaje de los niveles de proteína fosforilada con respecto al control * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$, comparado con las células sin tratar.

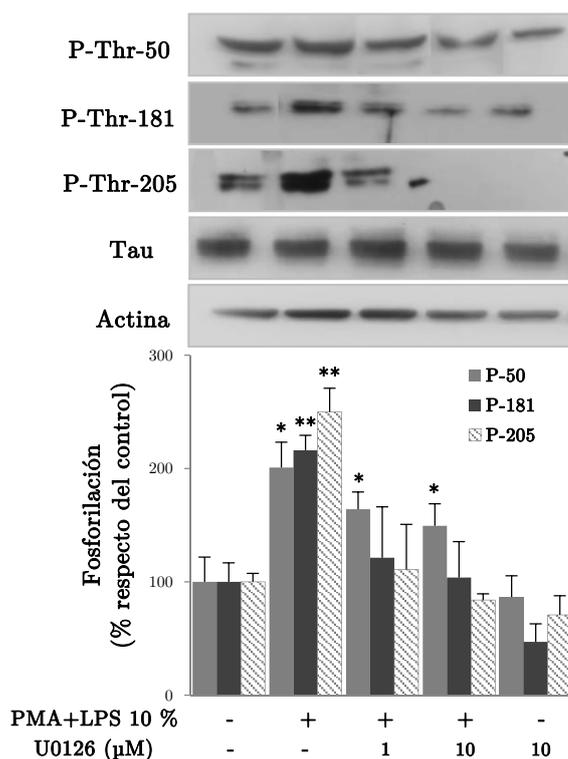


Figura 2.26.- La fosforilación de los residuos Thr-181 y Thr-205 de Tau está mediada por las ERKs. Las células diferenciadas se incubaron en ausencia o en presencia diferentes concentraciones del inhibidor de las ERKs U0126 durante 1 h. Transcurrido este tiempo se adicionó al medio el 10 % de medio PMA + LPS y se incubaron 24 h. Al finalizar el experimento, las células se lisaron y los niveles de las diferentes proteínas se analizaron mediante Western blot utilizando anticuerpos específicos. En la figura se muestra un blot representativo y el análisis densitométrico correspondiente a la media \pm EEM de tres experimentos independientes. Los datos se expresan como el porcentaje de los niveles de proteína fosforilada con respecto al control, * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ comparado con las células sin tratar.

2.2.8. La vía de señalización de las JNKs está implicada en la fosforilación de Tau en respuesta a los medios condicionados

A continuación estudiamos la ruta de las JNKs. Por ello, estas quinasas fueron inhibidas utilizando el péptido inhibidor de JNKs antes de estimular a las células diferenciadas con los medios. La figura 2.27 muestra que el tratamiento con el inhibidor de JNKs (iJNK) previno el incremento de los niveles de fosforilación en los residuos Thr-50, Thr-181 y Thr-205 inducido por el medio PMA, destacando su efecto sobre el sitio Thr-181, ya que la concentración más alta de este compuesto (20 μM) consiguió bajar incluso sus niveles basales. En la figura 2.28 se observa cómo sólo el aumento de la fosforilación del residuo Thr-205 debido al tratamiento con el medio LPS fue prevenido completamente por

este inhibidor. Sin embargo, este inhibidor no previno de forma significativa la fosforilación de la Thr-50 y la Thr-181 de Tau. El medio PMA + LPS aumentó los niveles de fosforilación de los tres residuos y el tratamiento con el péptido inhibidor lo previno en los residuos Thr- 50 y Thr-205, hasta alcanzar los niveles de fosforilación del control con las dos concentraciones utilizadas (10 y 20 μM), pero sólo lo evitó parcialmente en la Thr-181 (figura 2.29).

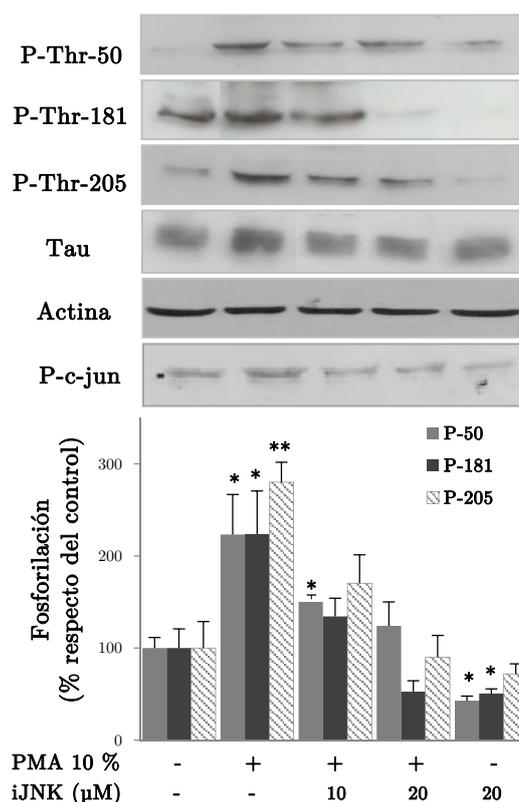


Figura 2.27.- La vía de las JNKs regula la fosforilación de Tau en los residuos Thr-50, Thr-181 y Thr-205 inducida por el medio PMA. Las células diferenciadas se incubaron en ausencia o en presencia diferentes concentraciones del péptido inhibidor de las JNKs (iJNK) durante 1 h. Transcurrido este tiempo se adicionó al medio el 10 % de medio PMA y se incubaron 24 h. Al finalizar el experimento, las células se lisaron y los niveles de las diferentes proteínas se analizaron mediante Western blot utilizando anticuerpos específicos. Como control positivo del efecto del inhibidor se analizaron los niveles de fosforilación de c-jun. En la figura se muestra un blot representativo y el análisis densitométrico correspondiente a la media \pm EEM de tres experimentos independientes. Los datos se expresan como el porcentaje de los niveles de proteína fosforilada con respecto al control *p<0,05 y **p<0,01, comparado con las células sin tratar.

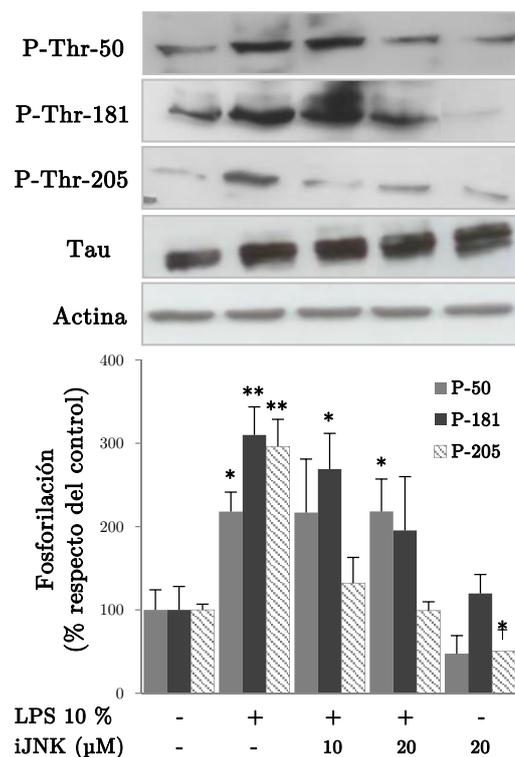


Figura 2.28.- El medio LPS promueve la fosforilación de la Thr-50, Thr-181 y Thr-205 de Tau regulada por la ruta de las JNKs. Las células diferenciadas se incubaron en ausencia o en presencia de diferentes concentraciones del péptido inhibidor de las JNKs (iJNK) durante 1 h. Transcurrido este tiempo se adicionó al medio el 10 % de medio LPS y se incubaron 24 h. Al finalizar el experimento, las células se lisaron y los niveles de las diferentes proteínas se analizaron mediante Western blot utilizando anticuerpos específicos. En la figura se muestra un blot representativo y el análisis densitométrico correspondiente a la media \pm EEM de tres experimentos independientes. Los datos se expresan como el porcentaje de los niveles de proteína fosforilada con respecto al control * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ comparado con las células sin tratar.

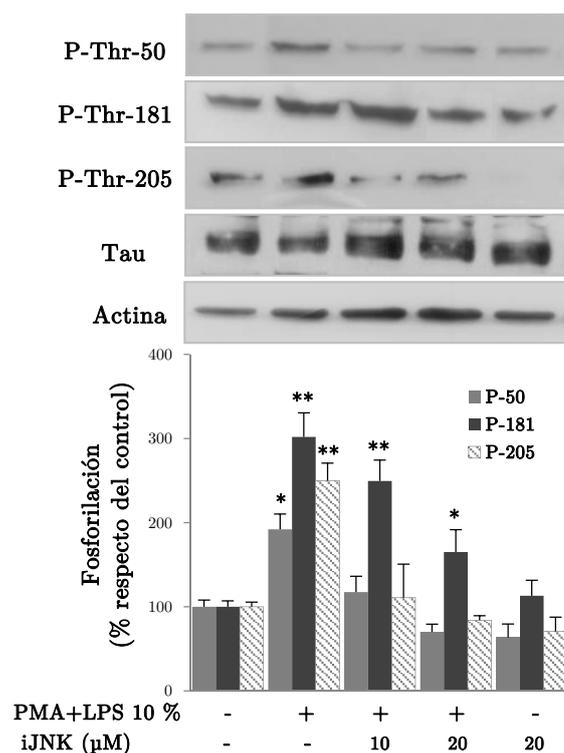


Figura 2.29.- Las JNKs participan en la fosforilación de Tau promovida por el medio mezcla de PMA y LPS. Las células diferenciadas se incubaron en ausencia o en presencia diferentes concentraciones del péptido inhibidor de las JNKs (iJNK) durante 1 h. Transcurrido este tiempo se adicionó al medio el 10 % de medio PMA + LPS y se incubaron 24 h. Al finalizar el experimento, las células se lisaron y los niveles de las diferentes proteínas se analizaron mediante Western blot utilizando anticuerpos específicos. En la figura se muestra un blot representativo y el análisis densitométrico correspondiente a la media \pm EEM de tres experimentos independientes. Los datos se expresan como el porcentaje de los niveles de proteína fosforilada con respecto al control * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$, comparado con las células sin tratar.

En la tabla 3.1, se muestra un resumen de los resultados obtenidos en el estudio de las vías de señalización implicadas en la fosforilación de Tau por los medios condicionados.

Estímulo / Residuo		Thr-50	Thr-181	Thr-205
Medios condicionados	PMA	ERK 1/2, JNKs	p38s, ERK 1/2, JNKs	p38s, ERK 1/2, JNKs
	LPS	p38s, ERK 1/2	p38s, ERK 1/2	p38s, ERK 1/2, JNKs
	P+L	p38s, JNKs	p38s, ERK 1/2	p38s, ERK 1/2, JNKs

Tabla 3.1. Vías señalización de las MAPKs que regulan la fosforilación de los residuos Thr-50, Thr-181 y Thr-205 de la proteína Tau inducida por los medios condicionados.

2.2.9. Los medios condicionados modifican la localización intracelular de Tau

Al igual que se hizo previamente con TNF- α , decidimos estudiar cómo afectaban los medios condicionados a la localización de la proteína Tau. Para ello, las células SH-SY5Y diferenciadas se incubaron con los diferentes medios condicionados durante 24 h y la localización de Tau y de sus formas fosforiladas, se analizaron mediante inmunofluorescencia, siguiendo el protocolo descrito en el apartado de Materiales y Métodos.

En la figura 2.30 se muestra el efecto de los distintos medios condicionados sobre la morfología y la localización de Tau en las células SH-SY5Y diferenciadas. Como se puede observar, las células de las muestras control poseen una morfología alargada y fusiforme, con presencia de Tau por toda la célula. Tras la incubación con los medios, las células sufrieron los cambios morfológicos ya observados en la figura 2.14, con los somas más poligonales y prolongaciones menos numerosas y más cortas, excepto con el medio LPS, que promovió un aumento en la longitud de las prolongaciones neuronales.

Por otra parte, todos los medios condicionados aumentaron los niveles de fluorescencia de Tau tanto en el soma como en las prolongaciones, aunque estos efectos no se observaron en todas las células. Estos resultados no coinciden con los resultados observados mediante Western blot, que indicaban que los medios condicionados no modificaban los niveles de Tau.

Hay que destacar que bajo estas condiciones experimentales, en la mayoría de los casos no se observó una gran entrada de Tau a núcleo como en los otros estímulos estudiados, aunque en algunas figuras sí se aprecia este hecho. Esta diferencia entre las diferentes figuras es causada por el estado de las células y el método utilizado.

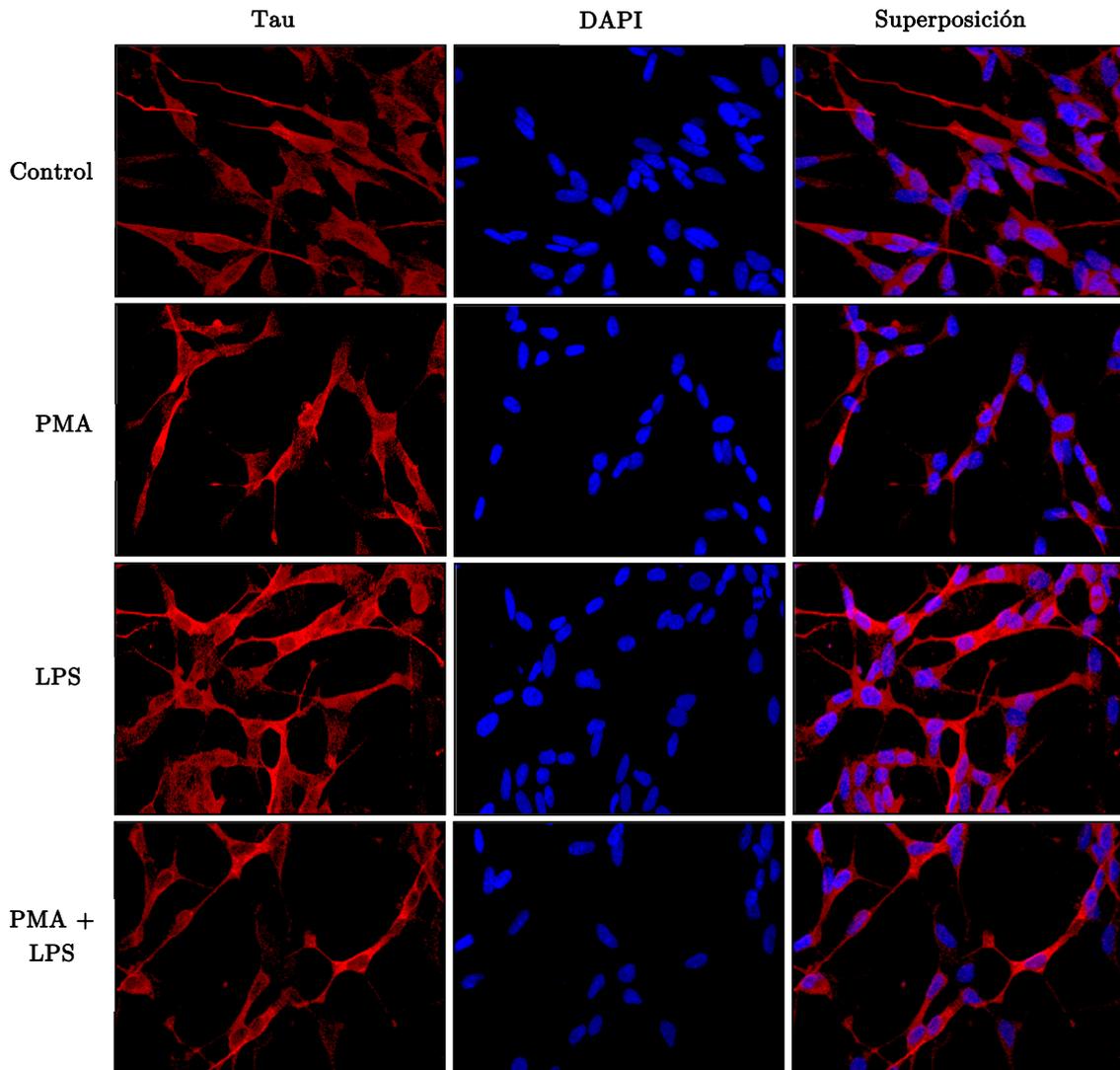


Figura 2.29.- Distribución intracelular de Tau en respuesta a los medios condicionados. Las células diferenciadas se incubaron durante 24 h con el 10 % de los medios PMA, LPS y PMA + LPS. Tras lo cual, se fijaron y tiñeron con Tau (rojo) y con DAPI (azul), como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. La observación de las células se realizó mediante microscopía confocal. Se muestra una imagen representativa, de más de tres experimentos independientes.

En las siguientes figuras se muestra el efecto de los medios condicionados sobre la fosforilación de los residuos Thr-50, Thr-69 y Thr-181 de Tau. En la figura 2.30 se puede observar que Tau fosforilada en el residuo Thr-50 (P-Thr-50) se localiza en toda la célula en los controles, aunque su intensidad de la fluorescencia fue mayor en las neuritas y en el núcleo que la de Tau sin fosforilar (ver cabeza de flecha de color blanco en la columna de superposición de imágenes de P-Thr-50 + Tau), lo que sugiere que en estas regiones celulares Tau se encuentra fosforilada en Thr-50. La exposición al medio PMA promovió un ligero

aumento en la fluorescencia de Tau sobre todo en soma y núcleo. La fluorescencia de fosfo-Tau-Thr-50 también aumentó en esos compartimentos pero disminuyó ligeramente en algunas prolongaciones, como se observa en la columna de superposición de imágenes de P-Thr-50 + Tau (cabeza de flecha blanca). El medio LPS promovió un incremento en las dos formas de Tau analizadas, pero no modificó la distribución de la fosfo-Tau-Thr-50. Resultados similares se obtuvieron cuando las células se incubaron en presencia del medio PMA + LPS. Como se observa en la figura 2.31, la fosfo-Tau-Thr-69 (P-Thr-69) se encontró en mayor concentración en las terminaciones de las células control (ver puntas de flecha blancas en la columna de superposición de las imágenes de P-Thr-69 + Tau). El medio PMA promovió un ligero incremento de esta forma fosforilada en soma y una pérdida en las prolongaciones. Con los medios LPS y PMA + LPS este aumento de la fosfo-Tau-Thr-69 fue más evidente. Finalmente, las células control presentaron muy bajos niveles de fluorescencia del residuo Thr-181 fosforilado y sólo en el citoplasma de la zona cercana al núcleo (figura 2.32). El tratamiento con los medios condicionados promovió un aumento de la intensidad de fluorescencia de la fosfo-Tau-Thr-181, que siguió detectándose en soma principalmente y en algunas prolongaciones en células incubadas con el medio LPS y en la mezcla de PMA y LPS (ver punta de flecha de color blanco en la columna de superposición de imágenes de P-Thr-181 + DAPI).

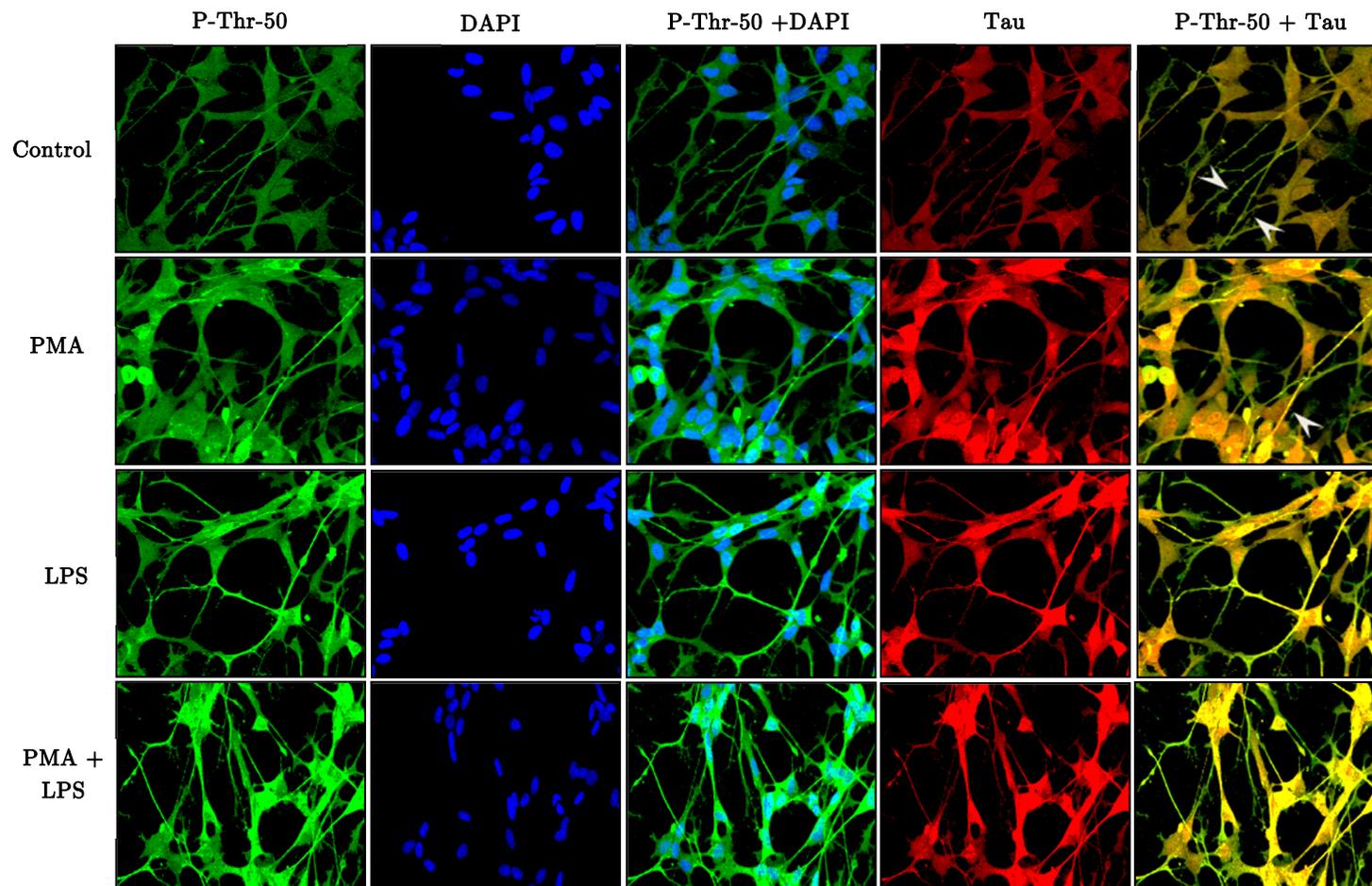


Figura 2.30.- Efecto de los medios condicionados sobre la localización intracelular de Tau fosforilada en el residuo Thr-50. Las células diferenciadas se incubaron durante 24 h con el 10 % de los medios PMA, LPS y PMA + LPS. Tras lo cual, se fijaron y tiñeron con fosfo-Tau Thr-50 (verde), Tau (rojo) y con DAPI (azul), como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. La observación de las células se realizó mediante microscopía confocal. Las cabezas de flecha indican la presencia de fosfo-Tau Thr-50 en las prolongaciones celulares. Se muestra una imagen representativa, de más de tres experimentos independientes.

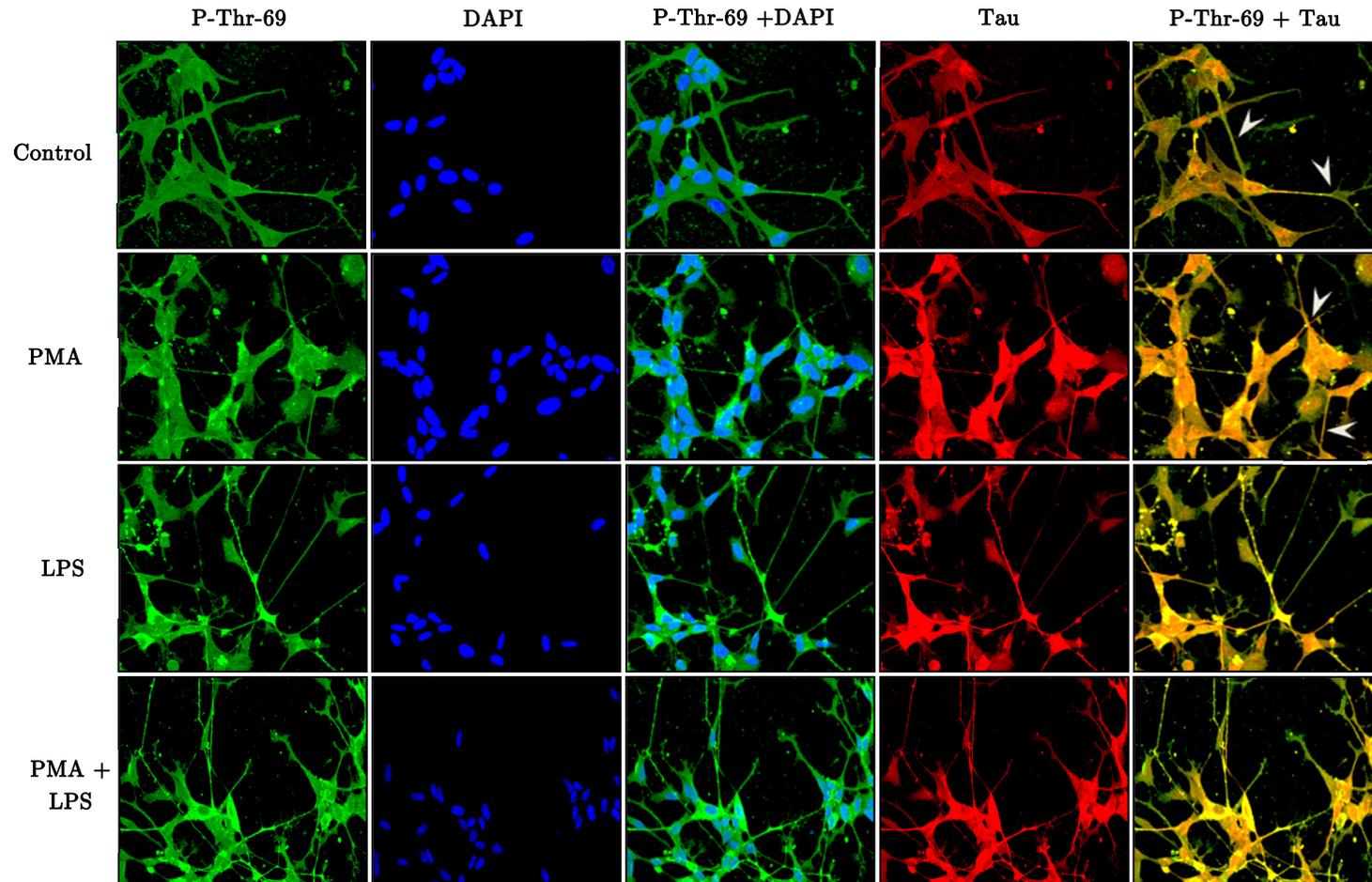


Figura 2.31.- Efecto de los medios condicionados sobre la localización intracelular de Tau fosforilada en el residuo Thr-69. Las células diferenciadas se incubaron durante 24 h con el 10 % de los medios PMA, LPS y PMA + LPS. Tras lo cual, se fijaron y tiñeron con fosfo-Tau Thr-69 (verde), Tau (rojo) y con DAPI (azul), como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. La observación de las células se realizó mediante microscopía confocal. Las cabezas de flecha indican la presencia de fosfo-Tau Thr-69 en las prolongaciones celulares. Se muestra una imagen representativa, de más de tres experimentos independientes.

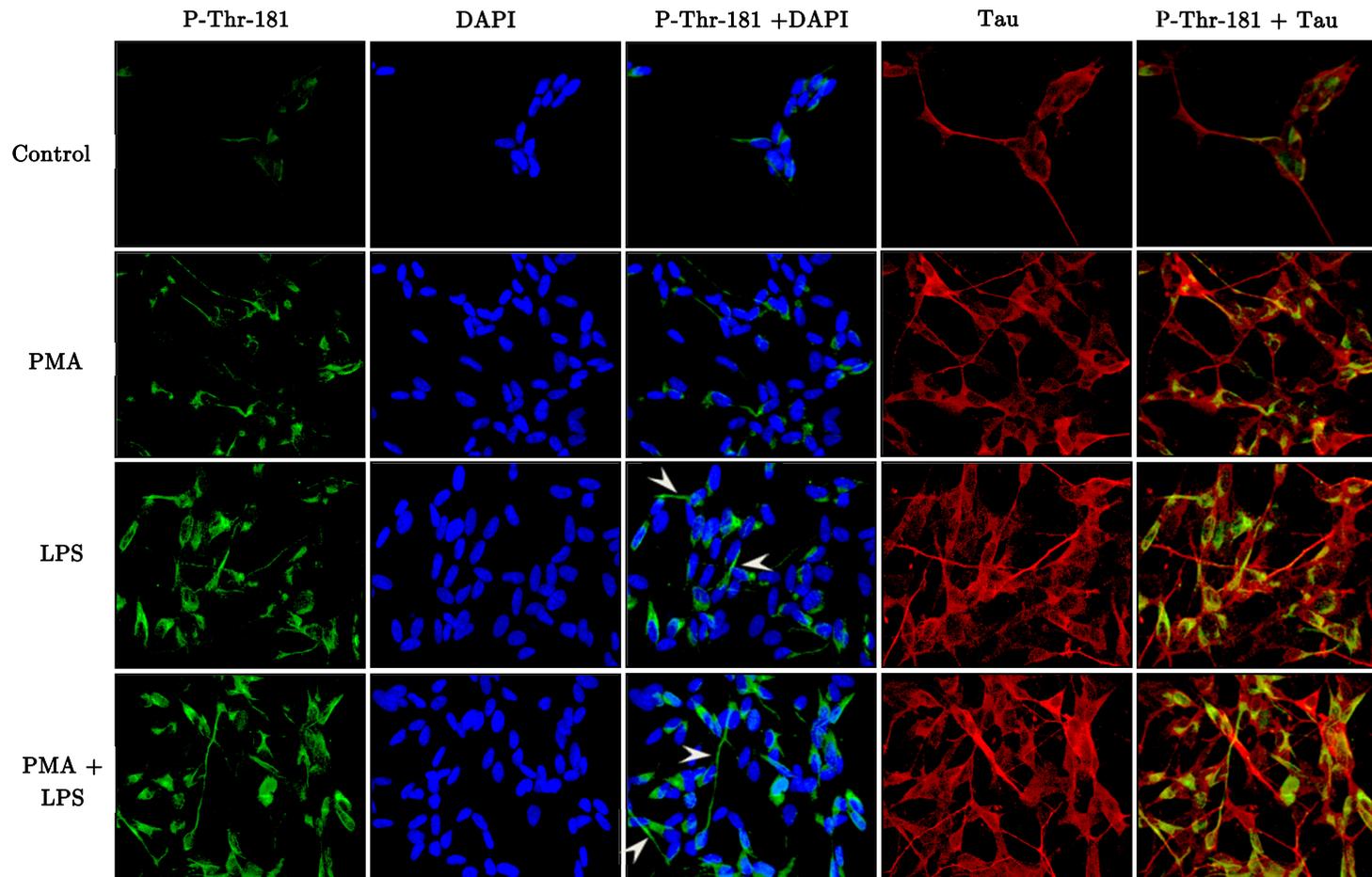


Figura 2.32.- Efecto de los medios condicionados sobre la localización intracelular de Tau fosforilada en el residuo Thr-181. Las células diferenciadas se incubaron durante 24 h con el 10 % de los medios PMA, LPS y PMA + LPS. Tras lo cual, se fijaron y tiñeron con fosfo-Tau Thr-181 (verde), Tau (rojo) y con DAPI (azul), como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. La observación de las células se realizó mediante microscopía confocal. Las cabezas de flecha indican la presencia de fosfo-Tau Thr-181 en las prolongaciones. Se muestra una imagen representativa, de más de tres experimentos independientes.

2.2.10. Efecto de los medios condicionados sobre el transporte axonal y la organización de los microtúbulos

Nuestro siguiente objetivo fue estudiar el efecto de los medios condicionados sobre el transporte axonal. En este caso, además de analizar la distribución de los neurofilamentos se estudió la distribución de las mitocondrias, ya que su transporte también se encuentra afectado en la EA (Hollenbeck y Saxton, 2005; Baloyannis, 2006; Rintoul y Reynolds, 2010). Como se puede observar en la figura 2.33, los medios condicionados inhibieron el transporte tanto de los neurofilamentos y de las mitocondrias (figura 2.34) ya que produjeron la acumulación de los mismos en el soma de las células. Sin embargo, ninguno de los medios desorganizó los microtúbulos, ya que como se puede observar en la figura 2.35, la distribución de la tubulina no se afectó.

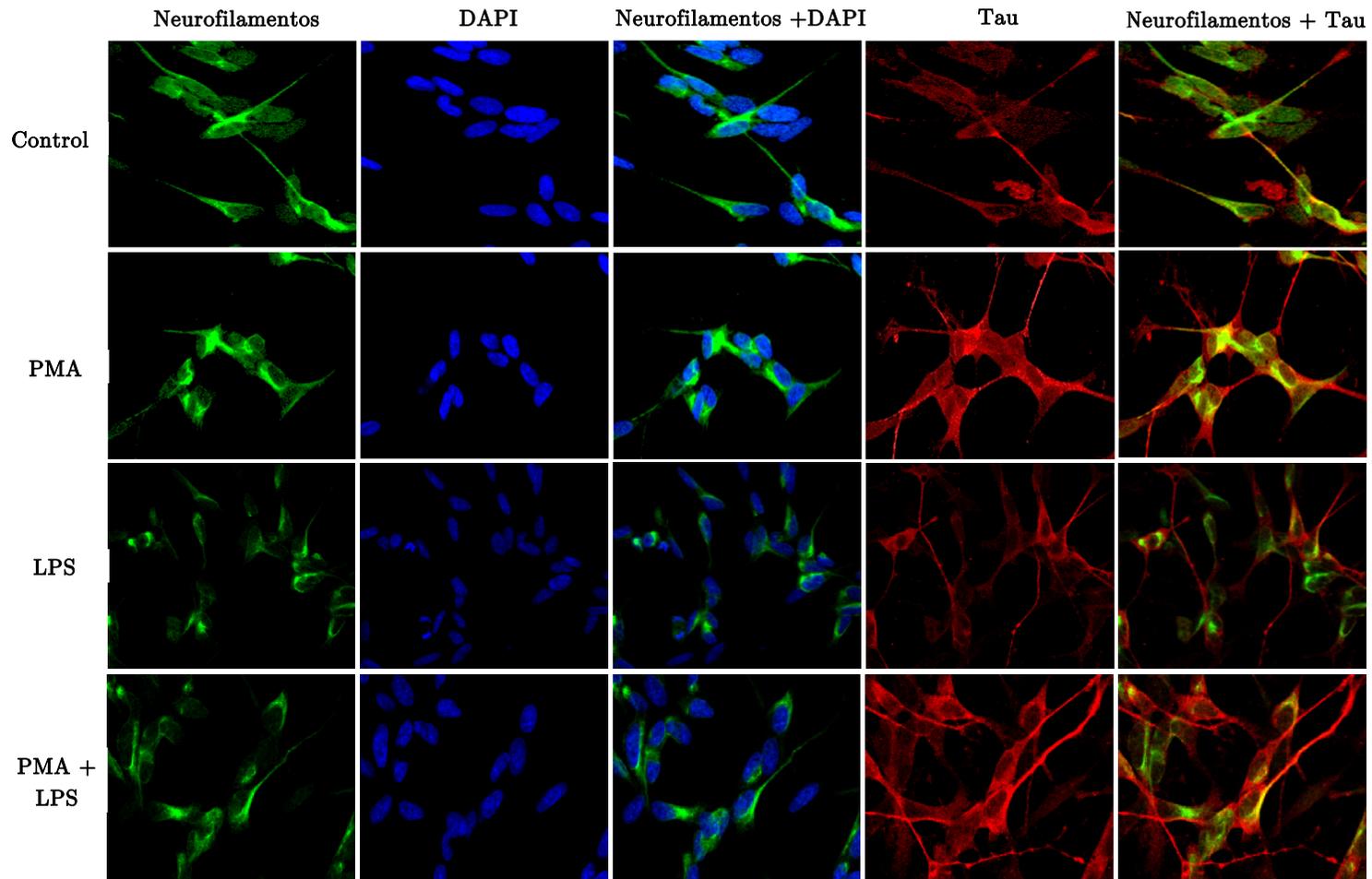


Figura 2.33.- Los medios condicionados afectan al transporte axonal pero no a la organización de los microtúbulos. Las células diferenciadas se incubaron durante 24 h con el 10 % de los medios condicionados PMA, LPS y PMA + LPS. Tras lo cual, se analizó la distribución de los neurofilamentos como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. La observación de las células se realizó mediante microscopía confocal. Se muestra una imagen representativa, de más de tres experimentos independientes.

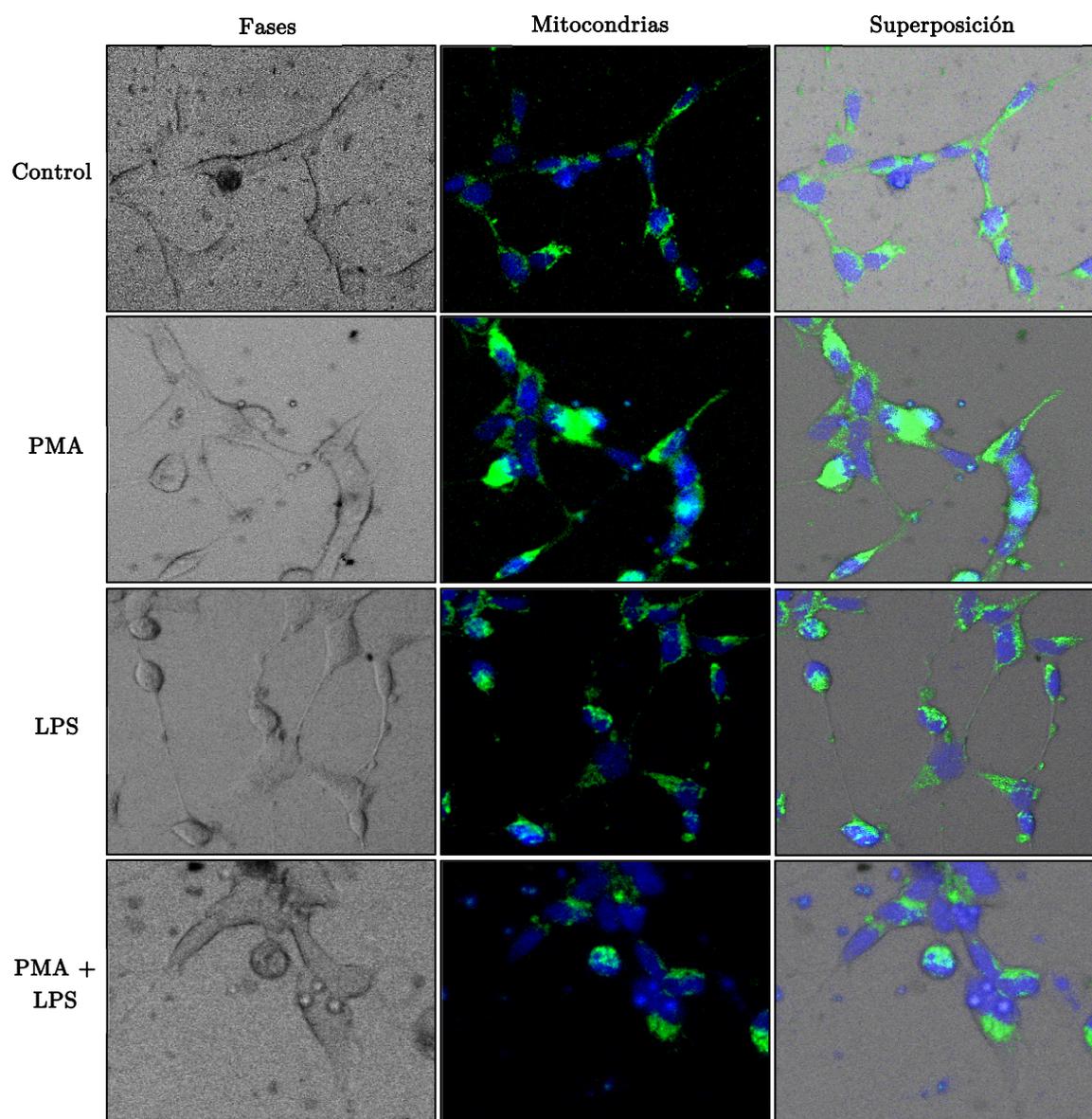


Figura 2.34.- Los medios condicionados afectan al transporte axonal pero no a la organización de los microtúbulos. Las células diferenciadas se incubaron durante 24 h con el 10 % de los medios condicionados PMA, LPS y PMA + LPS. Tras lo cual, se analizó la distribución de las mitocondrias como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. La observación de las células se realizó mediante microscopía confocal. Se muestra una imagen representativa, de más de tres experimentos independientes.

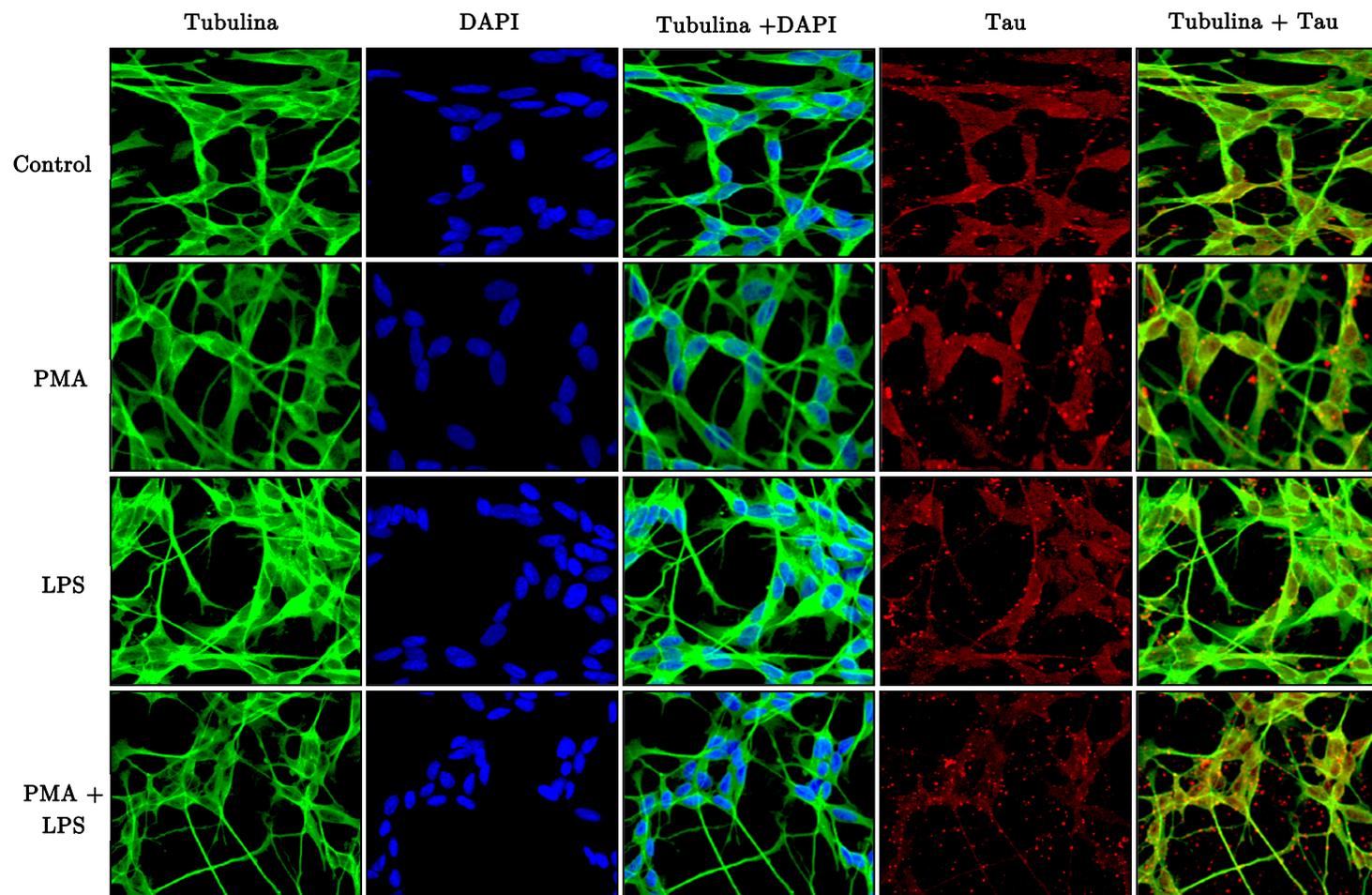


Figura 2.35.- Los medios condicionados afectan al transporte axonal pero no a la organización de los microtúbulos. Las células diferenciadas se incubaron durante 24 h con el 10 % de los medios condicionados PMA, LPS y PMA + LPS. Tras lo cual, se analizó la distribución de tubulina como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. La observación de las células se realizó mediante microscopía confocal. Se muestra una imagen representativa, de más de tres experimentos independientes.

2.2.11. La distribución de MAP-2 no se modifica por los medios condicionados

Con el fin de comprobar si los medios condicionados podrían afectar a otras proteínas asociadas a microtúbulos y no sólo a Tau, se analizó la distribución de la MAP-2.

En la figura 2.36 se observa que el marcaje de MAP-2 se localizó de manera uniforme por toda la célula control, paralelamente a Tau, aunque no se observó en núcleo. Tras la incubación con los medios PMA, LPS y PMA + LPS se incrementó la intensidad de su fluorescencia pero no se observaron cambios destacables en su distribución intracelular con respecto al control, por tanto, a la vista de estos resultados podemos concluir que los medios condicionados no afectan a la localización intracelular de MAP-2 en las SH-SY5Y diferenciadas.

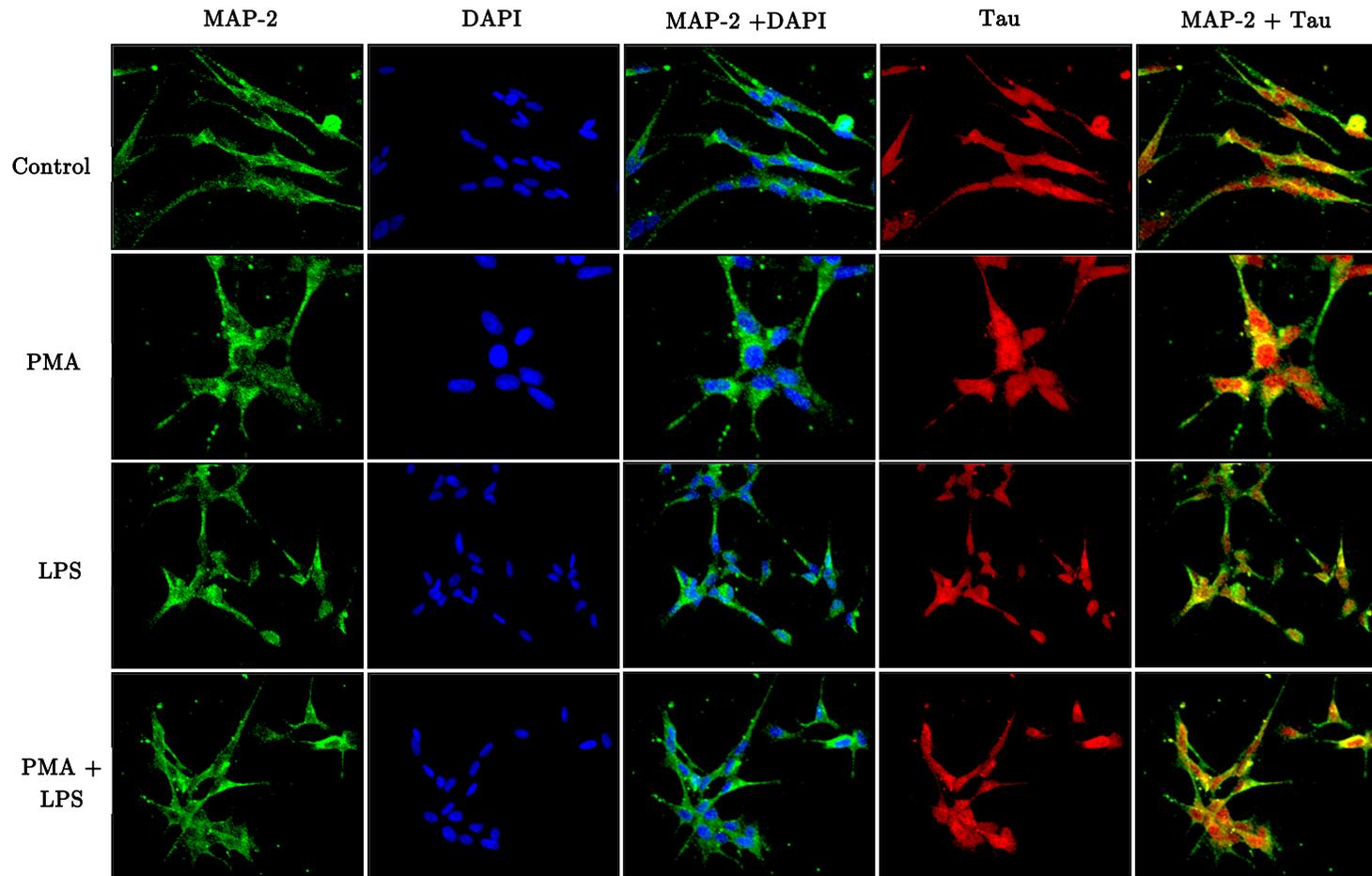


Figura 2.36.- Efecto de los medios condicionados sobre la localización intracelular de MAP-2. Las células diferenciadas se incubaron durante 24 h con el 10 % de los medios condicionados PMA, LPS y PMA + LPS. Tras este tiempo se fijaron y tiñeron con MAP-2 (verde), Tau (rojo) y con DAPI (azul), como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. La observación de las células se realizó mediante microscopía confocal. Se muestra una imagen representativa, de más de tres experimentos independientes.

Capítulo 3. Efecto de la fosforilación residuo-específica de Tau en su función y localización

En los capítulos anteriores hemos visto que Tau se encuentra fosforilada en los residuos Thr-50 y Thr-69 y que el estrés hiperosmótico y las citoquinas aumentan los niveles de fosforilación de Tau en el residuo Thr-50. Ya que las funciones fisiológicas y patológicas de Tau se encuentran reguladas por su estado de fosforilación, en este capítulo nos propusimos estudiar el efecto de la fosforilación específica de Tau en los residuos Thr-50 y Thr-69 sobre la función y localización de la proteína.

Para realizar nuestros estudios, utilizamos una aproximación experimental basada en el empleo de formas mutadas de Tau en las que se había sustituido el aminoácido treonina por alanina (T50A, T69A), excluyendo así la susceptibilidad a ser fosforilado (Utton *et al.*, 1997), o bien por ácido glutámico (T50E, T69E), simulando un estado de pseudofosforilación permanente por la adición de una carga negativa (Eidenmuller *et al.*, 2000). Aunque los efectos de una pseudofosforilación pueden no ser completamente iguales a los de una fosforilación real, esta técnica ha aportado importantes conocimientos acerca de cómo la fosforilación residuo-específica de Tau afecta a su estructura y función (Leger *et al.*, 1997; Eidenmuller *et al.*, 2000; Combs *et al.*, 2011).

Este capítulo está dividido en dos partes. La primera se realizó en nuestro laboratorio utilizando la línea celular HEK-293. Elegimos esta línea porque no expresa Tau y en consecuencia, los resultados obtenidos se deberían exclusivamente a la expresión exógena de la proteína. La segunda parte del capítulo se desarrolló en el laboratorio del Dr. Roland Brandt, en el Departamento de Neurobiología, de la Universidad de Osnabrück en Alemania. Para estos estudios se utilizó la línea celular PC-12, que es la utilizada en ese laboratorio.

3.1. Efecto de la fosforilación residuo-específica de Tau en las células HEK-293

3.1.1. Expresión de las construcciones de Tau en las células HEK-293

Antes de comenzar con nuestros estudios, lo primero que hicimos fue examinar la expresión de las diferentes construcciones de Tau en las células HEK-293. Para ello, las células se transfectaron con las construcciones pCMV5-HA-hTau40 (Tau), pCMV5-HA-hTau40-T50A (T50A), pCMV5-HA-hTau40-T50E (T50E), pCMV5-HA-hTau40-T69A (T69A) y pCMV5-HA-hTau40-T69E (T69E), tras lo cual la expresión de Tau se examinó mediante Western blot utilizando anticuerpos específicos para Tau. Como se muestra en la figura 3.1, las células expresaban todas las construcciones de Tau y a los mismos niveles.

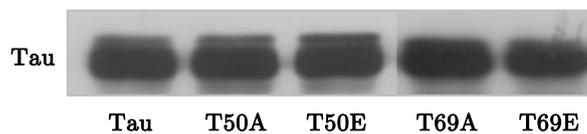


Figura 3.1.- Expresión de las construcciones de Tau en las células HEK-293. Las células se transfectaron con las construcciones pCMV5-HA-hTau40 (Tau), pCMV5-HA-hTau40-T50A (T50A), pCMV5-HA-hTau40-T50E (T50E), pCMV5-HA-hTau40-T69A (T69A) y pCMV5-HA-hTau40-T69E (T69E) según se describe en la sección de Materiales y Métodos. Después de 36 horas, las células fueron privadas de suero durante 12 horas adicionales, tras lo cual se lisaron y cantidades iguales de proteína de las diferentes condiciones experimentales se utilizaron para analizar la expresión de la proteína Tau mediante Western Blot. En la figura se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes.

3.1.2. Las mutaciones puntuales de Tau modifican su capacidad de asociación al citoesqueleto, así como su capacidad de unión y estabilización de los microtúbulos

Una vez comprobada que la expresión de las construcciones era correcta, se procedió a analizar la capacidad de unión al citoesqueleto de las diferentes formas de Tau. Con este fin, se llevó a cabo un ensayo de asociación al citoesqueleto, según se describe en el apartado de Materiales y Métodos, mediante el cual se obtienen dos fracciones a partir de las células transfectadas, una fracción soluble (FS) y una fracción insoluble (FI) que contiene el citoesqueleto. El ratio entre los niveles de Tau presentes en la fracción insoluble y la soluble se utilizó como indicador de la capacidad de asociación de la proteína al citoesqueleto, de modo que un ratio entre insoluble y soluble elevado indica una asociación más fuerte de Tau

con el citoesqueleto. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3.2. Como se puede observar Tau se distribuyó entre la fracción soluble e insoluble de manera equitativa, mientras que sorprendentemente todas las formas de Tau mutadas se repartieron de forma mayoritaria en la fracción soluble, disminuyendo significativamente en la fracción insoluble (figura 3.2-A). En la figura 3.2-B se muestra la representación gráfica del ratio entre los niveles de Tau presentes en la fracción insoluble y la soluble. En ella se puede observar que las formas mutadas de Tau presentaron un ratio muy inferior a la proteína sin mutar y por tanto, una menor capacidad de unión a citoesqueleto. Aunque cabe destacar que las formas pseudofosforiladas de Tau son las que tienen menor capacidad de unión al citoesqueleto. Estos resultados sugieren, por una parte que cualquier modificación en las Thr-50 y Thr-69 de Tau afecta a la facultad de la proteína para unirse al citoesqueleto y por otra parte que la capacidad de asociación de Tau al citoesqueleto es menor cuando estos residuos están pseudofosforilados.

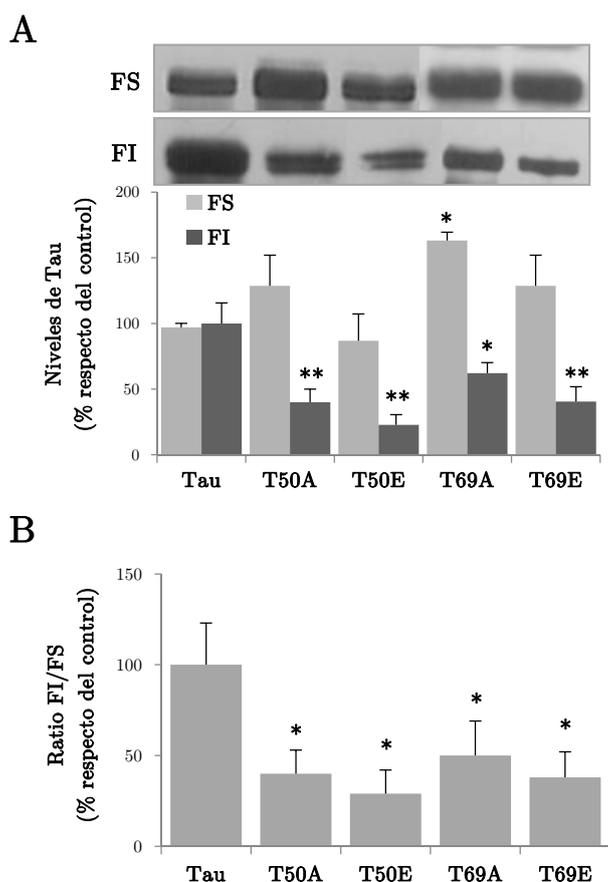


Figura 3.2.- Las mutaciones puntuales de Tau modifican su capacidad de asociación al citoesqueleto. Las células transfectadas con las diferentes construcciones de Tau se procesaron para obtener una fracción soluble (FS) y una fracción insoluble (FI), siguiendo el protocolo descrito en el ensayo de asociación al citoesqueleto de la sección Materiales y Métodos. A continuación, se analizó

la proteína Tau en ambas fracciones mediante Western Blot. **A:** Imagen representativa y el análisis densitométrico de tres experimentos. **B:** Grado de asociación de Tau con el citoesqueleto (**FI/FS**). Los datos representan la media \pm EEM de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto a Tau.

Como se introdujo al comienzo de este trabajo, una de las principales funciones de Tau es su unión a los microtúbulos y la consiguiente estabilización de los mismos. Con el fin de estudiar el efecto de la fosforilación de los residuos Thr-50 y Thr-69 de Tau en estas funciones, se realizó un ensayo *in situ* que permite estudiar la capacidad de unión de las proteínas a los microtúbulos en el que primero se estabilizan estas estructuras con Taxol, para posteriormente separar el contenido celular en tres fracciones, una fracción postnuclear (FPN), una fracción no unida a microtúbulos (FNUM) y otra precipitada o fracción unida a microtúbulos (FUM). Como se muestra en la figura 3.3, Tau se distribuyó de forma similar entre la fracción no unida y unida a los microtúbulos, mientras que los niveles de las formas de Tau mutadas aumentaron considerablemente en la FNUM y disminuyeron, consecuentemente, en la FUM, no encontrándose diferencias entre las mismas. Estos resultados sugieren que cualquier modificación en los residuos Thr-50 y Thr-69 de Tau disminuyen su capacidad de unirse a los microtúbulos.

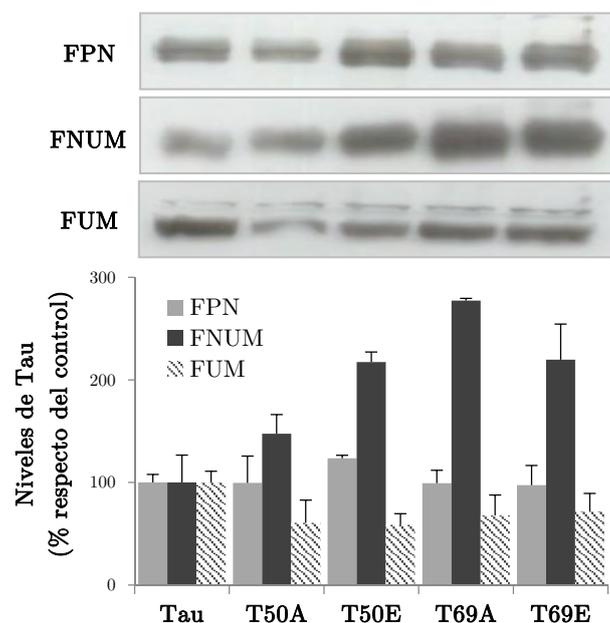


Figura 3.3.- Las mutaciones puntuales de Tau disminuyen su capacidad de unión a los microtúbulos. Las células transfectadas con las diferentes construcciones de Tau se lisaron y los microtúbulos presentes en los extractos celulares se estabilizaron con Taxol (10 μ M). A continuación, los extractos celulares se separaron en una fracción postnuclear (FPN), en una fracción soluble no unida a microtúbulos (FNUM) y una fracción unida a microtúbulos (FUM) según se describe en

Materiales y Métodos. Los niveles de Tau en las diferentes fracciones se analizaron mediante Western Blot. En la figura se muestra un blot representativo y el análisis densitométrico correspondiente a la media \pm EEM de dos experimentos independientes. Los datos se expresan como el porcentaje de los niveles de las diferentes formas de Tau con respecto a la proteína sin modificar.

Para determinar si las mutaciones en Tau afectaban a su capacidad de estabilizar los microtúbulos, las células transfectadas se trataron en ausencia (SN) o presencia (CN) de nocodazol, que es un compuesto que desorganiza a los microtúbulos por su capacidad de unirse a β -tubulina e inhibir, de esta forma, la dinámica de los mismos. Después del tratamiento, las células se lisaron y el contenido celular se separó en una fracción asociada al citoesqueleto, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado de Materiales y Métodos. En este caso los niveles de α -tubulina se utilizaron como el indicador de la estabilidad de los microtúbulos. Como se puede observar en la figura 3.4, en ausencia de nocodazol no se detectaron diferencias aparentes en los niveles de α -tubulina entre las células transfectadas con las diferentes formas de Tau. Sin embargo, tras el tratamiento con nocodazol, los niveles de α -tubulina en las células que expresan las formas de Tau T50E y T69E fueron inferiores, aunque sólo significativas en el último caso, a los detectados en las células que expresan Tau y los mutantes T50A y T69A. Estos resultados sugieren que la ausencia de fosforilación en estos residuos de Tau tiene un efecto protector frente a la desorganización de los microtúbulos inducida por nocodazol.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que la fosforilación de Tau en los residuos Thr-50 y Thr-69 disminuye su capacidad de asociarse a los microtúbulos, lo que se traduce en una menor protección de los mismos frente a procesos de despolimerización.

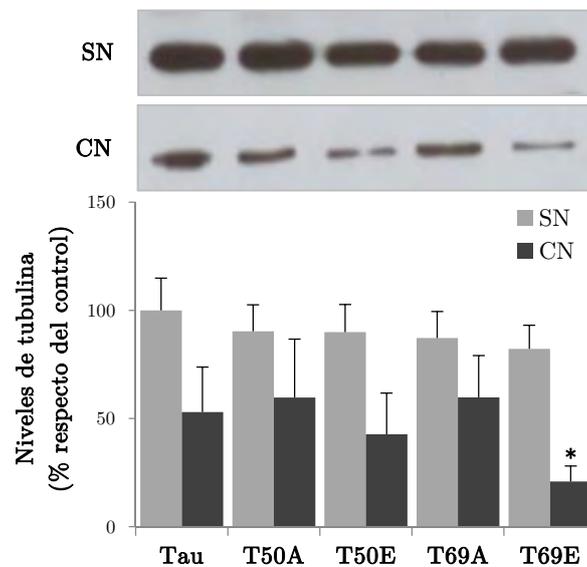


Figura 3.4.- La fosforilación de la Thr-50 y de la Thr-69 de Tau reduce la estabilidad de los microtúbulos. Las células transfectadas con las diferentes construcciones de Tau se incubaron en ausencia o presencia de 10 $\mu\text{g/ml}$ de nocodazol durante 2 horas antes de realizar el ensayo de asociación al citoesqueleto, tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. La estabilidad de los microtúbulos se evaluó por los niveles de α -tubulina presente en la fracción asociada al citoesqueleto. En la figura se muestra un blot representativo y el análisis densitométrico correspondiente a la media \pm EEM de al menos tres experimentos independientes. Los datos se expresan como el porcentaje de los niveles de las diferentes formas de Tau con respecto a la proteína sin modificar. * $p < 0,05$, con respecto a la proteína sin modificar.

3.1.3. La pseudofosforilación de Tau en el residuo Thr-69 favorece la agregación de la proteína

Además de en la estabilización y polimerización de los microtúbulos, la fosforilación juega un papel clave en la formación de agregados insolubles de Tau. Por este motivo, decidimos estudiar si la fosforilación de la Thr-50 y de la Thr-69 promovía la agregación de Tau. Para ello, las células transfectadas con cada una de las construcciones de Tau se solubilizaron utilizando el detergente sarcosil y se fraccionaron según se describe en el apartado de Materiales y Métodos, y la presencia de agregados de Tau en la fracción insoluble a sarcosil (FIS) se analizó mediante Western blot. Como se puede observar en la figura 3.5, sólo la pseudofosforilación de Tau en el residuo Thr-69 promovía la agregación de la proteína.

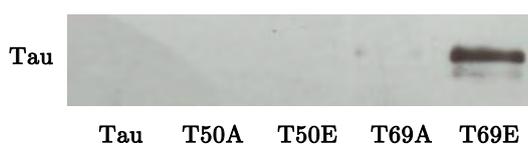


Figura 3.5.- La pseudofosforilación de Tau en la Thr-69 promueve la formación de agregados insolubles de la proteína Tau. Después de la transfección, las células se procesaron para obtener las fracciones insolubles al detergente sarcosil, según se describe en el apartado de Materiales y Métodos. La presencia de los agregados de Tau se analizó mediante Western blot. En la figura se muestra un blot representativo de dos experimentos independientes.

3.1.4. Efecto de las mutaciones puntuales de Tau y el estado de fosforilación de la proteína en la velocidad de polimerización de tubulina *in vitro*

A continuación, estudiamos la capacidad de los mutantes de Tau para promover la polimerización de la tubulina *in vitro*. Para ello, realizamos un ensayo de medida de turbidez, tal y como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Según este ensayo, la velocidad inicial de polimerización se calcula como la tangente a la curva de progreso en los 5 primeros minutos, tiempo donde el proceso es lineal, de manera que la pendiente de la recta en esos tiempos iniciales es la velocidad inicial en unidades de absorbancia a 340 nm/min. Estos ensayos se realizaron con las proteínas Tau recombinantes no modificadas (nombradas como fosforiladas) y con las mismas proteínas tratadas con la proteína fosfatasa PP2A (nombradas como desfosforiladas).

Como se muestra en la figura 3.6, cuando las proteínas recombinantes no fueron pretratadas con PP2A, la velocidad de polimerización de tubulina en presencia del mutante de Tau T50A fue superior a la detectada en la Tau sin modificar. El resultado contrario se obtuvo con la modificación T69A, que fue el mutante más lento. Cabe destacar que las formas fosforiladas de ambos residuos se comportaron como la proteína sin mutar. La desfosforilación de las proteínas recombinantes sólo modificó el efecto de las formas mutadas de Tau en el residuo Thr-69. Así, la velocidad de polimerización de tubulina en presencia de Tau T69A desfosforilada fue, en este caso, similar a la observada con Tau sin modificar, pero se observó un gran aumento de la velocidad de polimerización con el mutante Thr-69 pseudofosforilado. Nuestros resultados sugieren, que cuando las proteínas de Tau recombinantes se encuentran fosforiladas, la no fosforilación del residuo Thr-50 de Tau

promueve una polimerización más rápida de tubulina, mientras que la no fosforilación del residuo Thr-69 disminuye la velocidad de polimerización de la misma. Además muestran que los efectos de la pseudofosforilación puntual de Tau sobre la velocidad de polimerización de tubulina dependen del estado de fosforilación de Tau en otros residuos de la proteína.

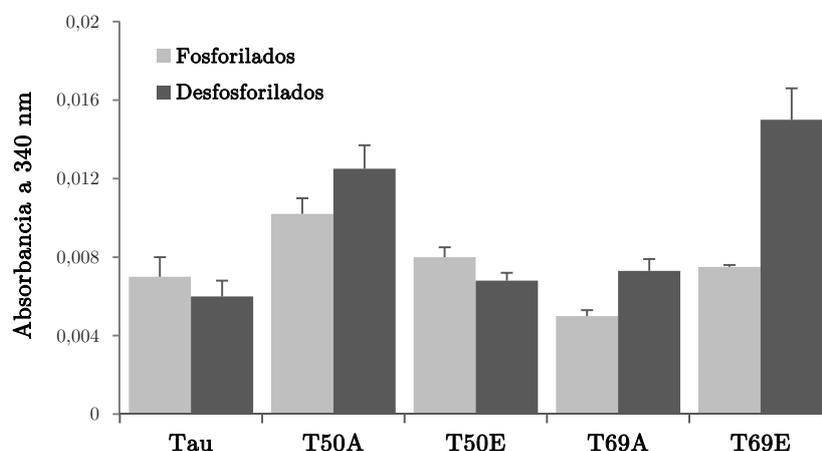


Figura 3.6.- Efectos de las formas mutadas de Tau en la velocidad de polimerización de la tubulina. La polimerización *in vitro* de la tubulina en presencia de las formas fosforiladas y desfosforiladas de Tau y sus mutantes T50A, T50E, T69A y T69E, se determinó mediante turbidimetría según se describe en el apartado de Materiales y Métodos. En la figura se muestra la representación gráfica de la velocidad máxima de polimerización de tubulina de cada condición experimental y corresponde a la media \pm EEM de al menos tres experimentos independientes.

3.2. Efecto de la fosforilación residuo-específica de Tau en las células PC-12 diferenciadas

Una vez estudiado los efectos de las mutaciones de Tau en los residuos Thr-50 y Thr-69 en células no neuronales, nuestro siguiente objetivo fue estudiar sus efectos en células de tipo neuronal, para lo cual utilizamos las células PC-12 diferenciadas con NGF durante 96 horas.

3.2.1. Expresión de las construcciones de Tau en las células PC-12 diferenciadas

En primer lugar examinamos la expresión de las diferentes construcciones de Tau en las células PC12. Para ello, las células se transfectaron con las construcciones pCMV5-PAGFP-hTau40 (Tau), pCMV5-PAGFP-hTau40-T50A (T50A), pCMV5-PAGFP-hTau40-T50E (T50E), pCMV5-PAGFP-hTau40-T69A (T69A) y pCMV5-PAGFP-hTau40-T69E (T69E). Después de ser diferenciadas con NGF, las células se lisaron y la expresión de Tau

se examinó mediante Western blot utilizando anticuerpos específicos para Tau. En la figura 3.7 se puede observar que las células expresaron todas las construcciones de Tau pero no lo hicieron con la misma eficiencia. Así, los mutantes T50A, T50E y T69E presentaron una mayor expresión con respecto a la proteína sin mutar y, por el contrario, el mutante T69A se expresó en menor grado, incluso por debajo del nivel de Tau.

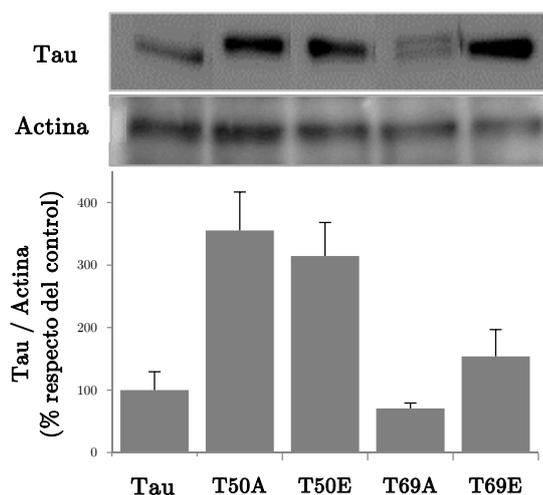


Figura 3.7.- Expresión de las construcciones de Tau en las células PC-12. Las células PC-12 se transfectaron con las construcciones pCMV5-PAGFP-hTau40 (Tau), pCMV5-PAGFP-hTau40-T50A (T50A), pCMV5-PAGFP-hTau40-T50E (T50E), pCMV5-PAGFP-hTau40-T69A (T69A) y pCMV5-PAGFP-hTau40-T69E (T69E) según se describe en la sección de Materiales y Métodos. Después de 4 días de diferenciación con NGF las células se lisaron y volúmenes iguales de lisado celular, de las diferentes condiciones experimentales, se utilizaron para analizar la expresión de la proteína Tau mediante Western Blot. En la figura se muestra una imagen representativa y el análisis desintométrico correspondiente a la media \pm EEM de la relación existente entre los niveles de Tau y actina de dos experimentos independientes. Los datos se expresan como el porcentaje de los niveles de las diferentes formas de Tau con respecto a la proteína sin modificar.

3.2.2. Efecto de las mutaciones puntuales de Tau sobre su capacidad de unión a los microtúbulos *in vivo*

Una vez que comprobamos que las células eran capaces de expresar las diferentes formas de Tau, estudiamos su interacción con los microtúbulos en la célula viva mediante el ensayo de pérdida de fluorescencia después de la fotoactivación (FDAP) según se describe en el apartado de Materiales y Métodos. En la figura 3.8 se puede observar que ninguna de las formas pseudofosforiladas de Tau modificó la capacidad de unión de la proteína a los microtúbulos, sin embargo sus formas no fosforilables sí que lo hicieron. Así, la forma mutada de Tau T50A presentó la mayor capacidad de unión a los microtúbulos, ya que la intensidad

de su señal se perdió a una velocidad menor que la de las demás formas de Tau. Por el contrario, la construcción T69A fue la que menos interactuó con los microtúbulos, dado que se separó de ellos más rápidamente. En la figura 3.8-B se puede observar el efecto de los mutantes no fosforilables fueron significativos con respecto a la proteína sin modificar y también con respecto a su pseudofosforilación (T50E o T69E).

Estos resultados sugieren, que la fosforilación de Tau en la Thr-50 disminuye su capacidad de unión a los microtúbulos y la fosforilación de Tau en la Thr-69 aumenta su capacidad de unión a los mismos, comparando sus efectos con las formas no fosforiladas de Tau.

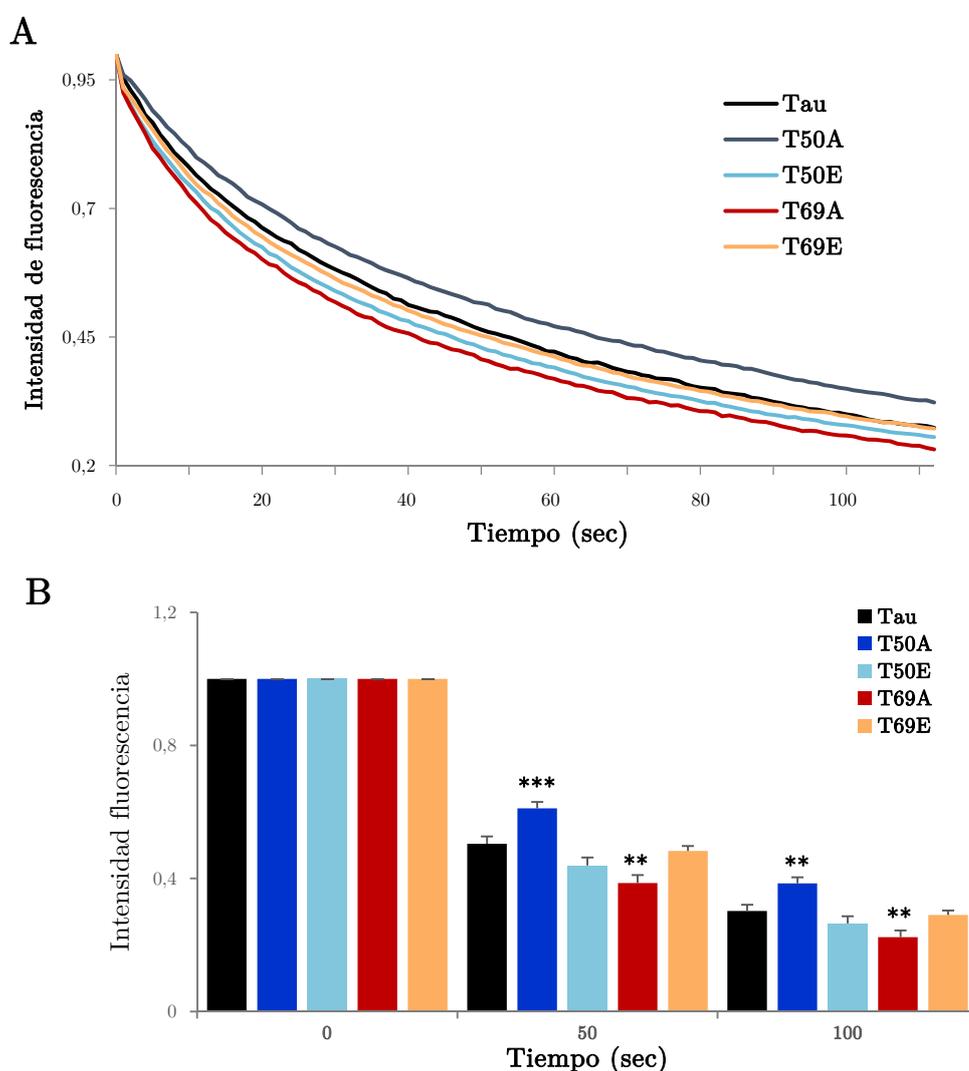


Figura 3.8.— Efecto de las mutaciones puntuales de Tau sobre su capacidad de unión a los microtúbulos *in vivo*. Las células PC-12 se transfectaron con las construcciones de Tau y se diferenciaron con NGF durante 4 días. Tras lo cual se realizó el ensayo de pérdida de fluorescencia después de la fotoactivación, tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. **A:** Pérdida de fluorescencia en función del tiempo tras la fotoactivación. **B:** Representación gráfica

correspondiente a la media \pm EEM de tres experimentos independientes a los tiempos indicados en la figura. Se analizaron al menos 12 células por condición experimental y por experimento. Los datos se expresan como los niveles de intensidad de fluorescencia de la proteína. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ con respecto a la proteína sin modificar.

3.3. El patrón de fosforilación de la proteína Tau se modifica por los cambios en el estado de fosforilación de los residuos Thr-50 o Thr-69

Se ha descrito que la fosforilación de determinados residuos de Tau puede afectar el estado de fosforilación de otros (Feijoo *et al.*, 2005; Gauthier-Kemper *et al.*, 2011). Teniendo esto en cuenta y a la vista de los resultados obtenidos anteriormente, quisimos saber si las mutaciones producidas en los residuos Thr-50 y Thr-69 provocaban cambios en el estado de fosforilación de Tau. Con este fin, se analizó por Western blot los niveles de fosforilación de Tau en los residuos Thr181, Ser-202/Thr205 (con el anticuerpo AT-8) y Ser-396/Ser-404 (PHF-1) en nuestras condiciones experimentales. En la figura 3.9 se puede observar que la forma pseudofosforilada de Tau en la posición Thr-69 fue la que produjo más modificaciones, disminuyendo la fosforilación Tau en los residuos Thr-181 y Ser-202/Thr-205 con respecto a la observada en la proteína sin modificar. La forma T50E también redujo la fosforilación de la Ser-202/Thr-205, aunque en menor medida. Sin embargo, las formas no fosforiladas no alteraron la fosforilación de los residuos estudiados. Cabe destacar que ninguna de las formas mutadas afectó a la fosforilación de Tau en los residuos Ser-396/Ser-404, localizados en el extremo C-terminal de la proteína.

Los resultados sugieren que las fosforilaciones de los residuos Thr-50 y, sobre todo, de Thr-69 de Tau pueden modificar la fosforilación en otros aminoácidos localizados en otras regiones de la proteína y en consecuencia, afectar a la estructura y la función de Tau.

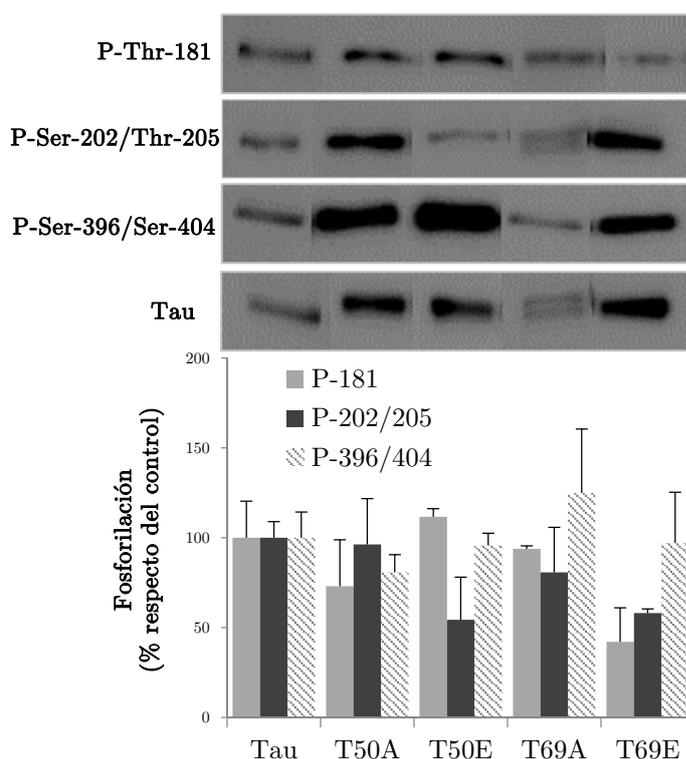


Figura 3.9.– *La fosforilación de la Thr-50 y de la Thr-69 de Tau modifica la fosforilación de otros residuos de la proteína.* Las células se transfectaron con las diferentes construcciones de Tau y se diferenciaron con NGF durante 4 días. Al finalizar el experimento, las células se lisaron y los niveles de las diferentes proteínas se analizaron mediante Western blot utilizando anticuerpos específicos. En la figura se muestra un blot representativo y el análisis densitométrico correspondiente a la media \pm EEM de la relación existente entre los niveles de fosforilación de Tau y de Tau total de dos experimentos independientes. Los datos se expresan como el porcentaje de los niveles de fosforilación de las diferentes formas de Tau con respecto a la proteína sin modificar.

3.4. Efecto de las mutaciones puntuales de Tau sobre su capacidad de unión a la membrana plasmática

Como se ha introducido anteriormente, varios trabajos han descrito que Tau puede interactuar con la membrana plasmática a través del extremo amino terminal (Brandt *et al.*, 1995) y que esta interacción está regulada por fosforilación (Maas *et al.*, 2000). Por ello, el siguiente objetivo fue estudiar si, bajo nuestras condiciones experimentales, Tau se encontraba asociada a la membrana plasmática y si esta interacción estaba regulada por fosforilación. Para ello, las células se transfectaron con las diferentes construcciones de Tau, se diferenciaron con NGF, tras lo cual se procesaron para obtener dos fracciones, una citosólica (FC) y otra asociada a la membrana plasmática (FMP), según se ha descrito en

el apartado de Materiales y Métodos. Como se puede observar en la figura 3.10, tanto Tau como sus formas fosforiladas y no fosforiladas en los residuos Thr-50 y Thr-69 se encontraron con ambas fracciones, aunque los niveles de Tau en la fracción citosólica fueron superiores en todas las condiciones estudiadas. Por otra parte, se puede observar que la sustitución de glutámico en los residuos Thr-50 y Thr-69 no modifica la interacción de Tau con la membrana plasmática. Hay que destacar que sólo la forma T69A presentó mayores niveles de Tau asociada a membrana, lo que sugiere que la fosforilación de Tau en este residuo puede disminuir su interacción con la membrana plasmática.

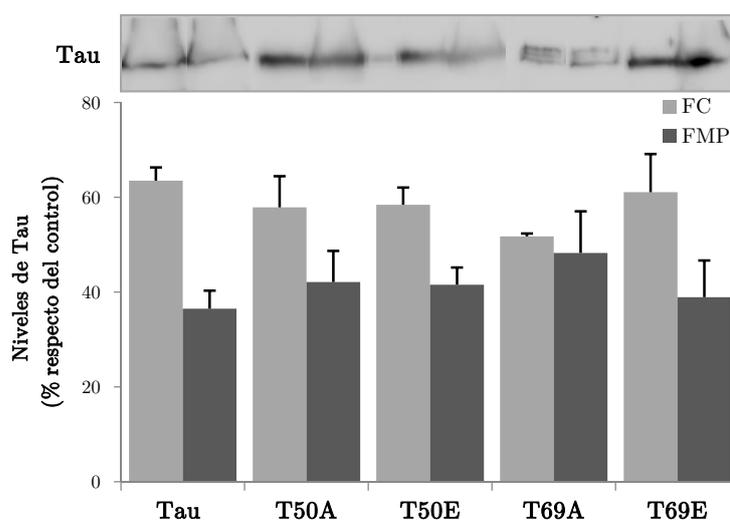


Figura 3.10.– *Efecto de las mutaciones puntuales de Tau sobre su capacidad de unión a la membrana plasmática.* Las células se transfectaron con las construcciones de Tau y se diferenciaron con NGF durante 4 días. A continuación, las células se procesaron para obtener una fracción citoplasmática (**FC**) y una fracción de membrana plasmática (**FMP**). Se tomaron volúmenes iguales de las diferentes fracciones y los niveles de Tau se analizaron mediante Western Blot. En la figura se muestra un blot representativo y el análisis densitométrico correspondiente a la media \pm error estándar de dos experimentos independientes. Los datos se expresan como el porcentaje de los niveles de Tau con respecto al control.

V. Discusión

La enfermedad de Alzheimer es el tipo de demencia con mayor incidencia en la población. Hoy en día afecta a más de 36 millones de personas en el mundo y se estima que esta cifra llegará a ser de unos 115 millones en el año 2050 (www.alz.co.uk/alzheimers). De ahí la gran importancia que tiene el conocer los mecanismos moleculares y celulares implicados en la aparición de esta enfermedad, y así identificar nuevas dianas terapéuticas que permitan desarrollar nuevas técnicas de diagnóstico o terapias más eficaces frente a este tipo de demencia.

Por ello, en este trabajo hemos estudiado los efectos del estrés hiperosmótico e inflamatorio sobre la expresión, las modificaciones postraduccionales y localización de Tau, proteína implicada en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer.

Capítulo 1. Estudio del efecto del estrés hiperosmótico sobre Tau en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y

1.1. Proteólisis de Tau y muerte celular por apoptosis

Estudios realizados en nuestro laboratorio ponían de manifiesto que el estrés hiperosmótico inducía la proteólisis de Tau y que la principal proteasa implicada en este proceso era caspasa 3. En este trabajo hemos descrito, por primera vez, que la caspasa 6 también media la proteólisis de Tau inducida por este tipo de estrés.

Nuestros resultados muestran que la caspasa 6 se activa en respuesta a sorbitol de forma dependiente del tiempo de incubación, comenzando a ser significativo el aumento de actividad tras los 30 minutos de tratamiento. El patrón de activación de caspasa 3 en respuesta a sorbitol fue similar al observado con caspasa 6. La activación de caspasa 3 inducida por el estrés hiperosmótico ha sido descrito previamente en este mismo tipo celular (Stoothoff y Johnson, 2001), y en otros tipos celulares neuronales (Niswander y Dokas, 2007) y no neuronales (Marfe *et al.*, 2008; Inesta-Vaquera *et al.*, 2009), pero es la primera vez que se describe la activación de caspasa 6 en respuesta a este estímulo. El hecho de que ambas proteasas muestren el mismo patrón de activación hace difícil predecir si ambas caspasas se activan a través de mecanismos independientes o si la activación de una regula la activación de la otra. Hemos visto que el inhibidor de caspasa 3, Z-DEVD-fmk a una concentración de 25 μ M, previene la aparición del fragmento de caspasa 6 y, por otra parte, también hemos

mostrado que el inhibidor de caspasa 6, Z-VEID-fmk, a una concentración de 10 μ M, inhibe parcialmente la aparición del fragmento activo de caspasa 3. Estos resultados, por una parte, pueden indicar que estos inhibidores utilizados a elevadas concentraciones son inespecíficos (Pereira y Song, 2008) o, por otra, que una caspasa puede regular la actividad de la otra. En este sentido, caspasa 6 puede activar a caspasa 3 (Allsopp *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2014) y la activación de caspasa 6 por caspasa 3 también ha sido descrita (Slee *et al.*, 1999; Inoue *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la proteólisis de Tau en respuesta a choque osmótico en las células SH-SY5Y es dependiente de caspasa 6, ya que la inhibición de su actividad, mediante el uso del inhibidor Z-VEID-fmk, previno parcialmente la disminución de los niveles de Tau y la aparición del fragmento proteolítico de la misma. La proteólisis de Tau por caspasa 6 ha sido previamente descrita (Guo *et al.*, 2004; Horowitz *et al.*, 2004; Graham *et al.*, 2011), lo que apoya nuestros resultados. Pero no tenemos que olvidar que, en nuestras condiciones experimentales, caspasa 3 también está implicada en este proceso. Por lo que, en conjunto, nuestros resultados sugieren que la proteólisis de Tau inducida por sorbitol puede estar mediada por ambas caspasas.

Mediante la expresión transitoria de la proteína de fusión HA-hTau40 en las células, pudimos comprobar que tanto caspasa 6 como caspasa 3 proteolizan a Tau en su extremo N-terminal. Nuestros resultados están de acuerdo con estudios previos que ponen de manifiesto que caspasa 6 corta a Tau en el residuo Asp-13 (Guo *et al.*, 2004; Rohn *et al.*, 2008) y que caspasa 3 lo hace en el residuo Asp-25 (Canu *et al.*, 1998; Fasulo *et al.*, 2000). La región N-terminal está implicada en la interacción de Tau con otras proteínas del citoesqueleto como la actina, así como con la membrana plasmática (Buee *et al.*, 2000; Morris *et al.*, 2011). Uno de los efectos más tempranos del estrés hiperosmótico en la célula es la retracción de la membrana plasmática debido a la salida de agua del interior celular para compensar la osmolaridad a ambos lados de la misma (Burg *et al.*, 2007). Por lo que la pérdida de la región N-terminal de Tau en respuesta a sorbitol podría inducir un cambio en la reorganización del citoesqueleto y, en consecuencia, producir el cambio en la morfología celular observado en este tipo de estrés. Por otra parte, la proteólisis de Tau en su extremo amino-terminal se ha asociado con la progresión del deterioro de la memoria

episódica, la que contiene las experiencias personales (Ghoshal *et al.*, 2002), posiblemente porque el fragmento N-terminal proteolizado se acumule en las terminaciones nerviosas y favorezca el deterioro sináptico (Amadoro *et al.*, 2010). De momento, no sabemos si estas caspasas proteolizan a Tau en su extremo C-terminal, en posición Asp-421, ya que cuando utilizamos el anticuerpo Tau-C3, que reconoce específicamente a Tau proteolizada en este residuo, no detectamos la presencia de la misma. No sabemos si la falta de resultados ha sido debido a problemas técnicos, ya que no disponíamos de controles positivos, o bien se debe a que ninguna caspasa corta en ese extremo o a que caspasa 6 está cortando en la posición Asp-402 (Guo *et al.*, 2004; Rohn *et al.*, 2008) lo que eliminaría el sitio de unión del anticuerpo.

El estrés hiperosmótico, además de producir la proteólisis de Tau, induce cambios en la morfología celular que están asociados con un descenso en la viabilidad y un aumento de la muerte celular por apoptosis. Nuestros resultados concuerdan con los observados por otros autores que muestran un paralelismo entre la proteólisis de Tau y la muerte celular en diferentes modelos experimentales (Fasulo *et al.*, 2000; Chung *et al.*, 2001; Stoothoff y Johnson, 2001; Rissman *et al.*, 2004; Cotman *et al.*, 2005; Corsetti *et al.*, 2008). Por lo que en conjunto, estos resultados sugieren que estímulos que producen una rápida activación de la cascada apoptótica inducen, además de apoptosis, la proteólisis de Tau.

Por otra parte, nuestros resultados también muestran que la apoptosis inducida por sorbitol sólo se previene cuando se inhibe, de forma conjunta, la actividad de las caspasas 6 y 3, o de todas las actividades caspasas, lo que sugiere que la actividad de, al menos las caspasas 6 y 3, son necesarias para inducir la apoptosis en nuestras condiciones experimentales. Nuestros resultados difieren de aquellos que muestran que la actividad caspasa 6 (Zhang *et al.*, 2000; Monnier *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2014) o caspasa 3 (Marfe *et al.*, 2008) median la apoptosis celular inducida por varios estímulos y en diferentes tipos celulares. Pero en estos estudios se utilizaron concentraciones elevadas de los inhibidores de caspasa 3 y de caspasa 6, por lo que éstos podrían estar inhibiendo la actividad de varias caspasas, tal y como hemos observado en nuestras condiciones experimentales.

2. Fosforilación, localización de Tau y muerte celular por apoptosis

Además de inducir la proteólisis de Tau, en el presente trabajo hemos mostrado que el estrés hiperosmótico promueve la fosforilación de Tau en los residuos Thr-50, Thr-181 y Thr-205, mientras que disminuye su fosforilación en el residuo Thr-69. La fosforilación de Tau en respuesta a sorbitol en los residuos Thr-50 y Thr-181, así como en otros residuos situados a lo largo de toda la proteína, se ha descrito con anterioridad (Jenkins *et al.*, 2000; Stoothoff y Johnson, 2001; Feijoo *et al.*, 2005) pero nuestro trabajo muestra por primera vez que el estrés hiperosmótico induce la fosforilación de Tau en el residuo Thr-205 y que disminuye la fosforilación en el residuo Thr-69. Cabe destacar el comportamiento diferente que tienen dos residuos de Tau ubicados en el extremo N-terminal frente a un mismo estímulo.

Puesto que Tau es fosforilada por diversos miembros de la familia de las MAPKs (Illenberger *et al.*, 1998; Feijoo *et al.*, 2005; Hanger *et al.*, 2009), estudiamos los efectos del estrés hiperosmótico sobre la activación de estas quinasas y comprobamos que el sorbitol promovía la activación de las p38s, las ERKs y las JNKs. Mediante la utilización de inhibidores farmacológicos de las mismas, pudimos comprobar que las p38s y las JNKs, pero no las ERKs, mediaban la fosforilación de Tau en respuesta a sorbitol en los residuos estudiados. Por lo que se refiere a las quinasas p38, nuestros resultados sugieren que las isoformas γ y δ pueden estar implicadas en la fosforilación de Tau en los residuos Thr-50 y Thr-181 en respuesta a sorbitol y que todas las isoformas lo pueden estar en la fosforilación de la Thr-205. Nuestros resultados están en consonancia con un estudio previo que apunta a la p38 δ como la quinasa responsable de la fosforilación del residuo Thr-50 de Tau en respuesta a sorbitol (Feijoo *et al.*, 2005). Aunque la fosforilación de Tau en la Thr-181 y la Thr-205 por las p38s ha sido descrita en estudios *in vitro* (Feijoo *et al.*, 2005), nuestro trabajo muestra por primera vez, que estas quinasas fosforilan dichos residuos de Tau *in vivo* en respuesta al estrés hiperosmótico. Finalmente, nuestros resultados muestran por primera vez que la ruta de las JNKs media la fosforilación de Tau en los residuos Thr-50, Thr-181 y Thr-205 en respuesta al estrés hiperosmótico.

El estrés hiperosmótico también produce un cambio en la distribución celular de Tau, que se traduce en un aumento en los niveles de la proteína tanto en el citoplasma como en el núcleo de la célula. Por otra parte, el sorbitol induce la fosforilación de Tau nuclear en el

residuo Thr-50 mientras que disminuye su fosforilación en el residuo Thr-69. El aumento en los niveles citosólicos de Tau total y fosforilada en los residuos Thr-50, Thr-69 y Thr-181 en respuesta al sorbitol están de acuerdo con el hecho de que la fosforilación de Tau induce su acumulación en el espacio somatodendrítico (Scholz y Mandelkow, 2014). El aumento en los niveles de Tau fosforilado en otros residuos y sin fosforilar en el núcleo en respuesta a diferentes estreses ha sido previamente descrito (Thurston *et al.*, 1997; Sultan *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2013a; Lu *et al.*, 2013b; Violet *et al.*, 2014), pero nuestro trabajo muestra por primera vez que un mismo estímulo regula de forma diferente la fosforilación de diferentes residuos de Tau nuclear. De momento desconocemos el efecto que puede tener la entrada y la fosforilación diferencial de Tau en el núcleo, pero podemos sugerir que puede ser una de las señales que provocan la apoptosis de la célula en respuesta a sorbitol. De hecho, recientemente se ha descrito que la hiperfosforilación de Tau nuclear compromete la estabilidad del ADN, porque lo desprotege frente al ataque de especies reactivas de oxígeno y a la hipertermia, o porque provoca una disminución la velocidad de renaturalización del ADN (Lu *et al.*, 2013a; Violet *et al.*, 2014). El aumento de la fosforilación de Tau en núcleo también se ha correlacionado con una alteración del ADN en células de neuroblastoma (Lu *et al.*, 2013b).

Nuestro trabajo muestra que el estrés hiperosmótico produce la desorganización de los haces de tubulina. Este efecto está en consonancia con el hecho de que la hiperfosforilación de Tau disminuye su capacidad de unión microtúbulos lo que produce la desorganización de los mismos (Hanger *et al.*, 2014).

Finalmente también hemos mostrado que las JNKs, además de fosforilar a Tau, inducen la apoptosis de las células en respuesta a sorbitol, y que este efecto puede estar mediado por la activación de, al menos, caspasa 3. De hecho existe una correlación temporal entre la activación de las JNKs y la de las caspasas 6 y 3, ya que se observa una activación de las JNKs previa al pico de máxima actividad de las proteasas. Nuestros resultados difieren de los obtenidos por Niswander y Dokas en 2007 que mostraban que las quinasas p38 mediaban la apoptosis de las neuronas procedentes de hipocampo de rata en respuesta al sorbitol. Posiblemente esta discrepancia se deba a la diferencia en el tipo celular utilizado. Sea por un motivo o por otro, la implicación de las JNKs (Tournier *et al.*, 2000; Su *et al.*, 2014) o de las p38s (Mandal *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2014) en la apoptosis inducida por varios tipos de estreses

y en diferentes modelos celulares ha sido ampliamente descrita.

Capítulo 2. Estudio del efecto de la neuroinflamación sobre la proteína asociada a microtúbulos Tau en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y diferenciadas

La inflamación en el SNC o neuroinflamación, es un proceso que se asocia a la progresión de diversas enfermedades como el Alzheimer. En este proceso participan la activación de las células gliales (microglía y astrogía), la liberación de compuestos inflamatorios y la activación de determinadas cascadas de señalización. En el caso concreto de la EA, la respuesta inmune generada para eliminar las placas seniles y los NFTs no se extingue, es decir, se vuelve crónica (Eikelenboom *et al.*, 2010; Heneka *et al.*, 2015). El objetivo de esta etapa del estudio fue recrear un entorno inflamatorio (y oxidativo) similar al que se presenta en la EA, y caracterizado por altos niveles de citoquinas proinflamatorias. Las citoquinas, de entre las que destaca el TNF- α , tienen numerosos papeles en la fisiología y patología humana. La presencia de elevados niveles de TNF- α en enfermedades neurodegenerativas está más que demostrada (McCoy *et al.*, 2011; Rubio-Perez y Morillas-Ruiz, 2012), aunque todavía su papel no está del todo esclarecido. Por todo esto, y porque TNF- α parece ser uno de los efectores patológicos más importantes dentro de la neuroinflamación (Bradley, 2008; Clark *et al.*, 2010), se decidió estudiar en particular el papel de esta citoquina en el presente trabajo. Para este capítulo también se utilizaron los medios condicionados procedentes de la línea celular U937. Con este tipo de estímulo se consigue mimetizar *in vitro* un ambiente determinado, en este caso, un entorno proinflamatorio (Giulian, 1993; Craig *et al.*, 2008). En este trabajo, los sobrenadantes obtenidos de los cultivos de las células U937 tras ser estimuladas con PMA, LPS o la mezcla de los 2 compuestos anteriores, fueron ricos en citoquinas y otros compuestos inflamatorios, lo que constituyó una reproducción de la respuesta inflamatoria.

2.1. Efecto de la inflamación sobre Tau

Las neuronas son morfológica y funcionalmente muy asimétricas. Por ello nos propusimos estudiar el efecto de TNF- α y de los medios condicionados sobre la morfología de las células de neuroblastoma diferenciadas. Hemos mostrado que el tratamiento con TNF- α

altera la morfología celular, fundamentalmente reduciendo el número y la longitud de las prolongaciones. Estos resultados concuerdan con los de otros autores que mostraron que el TNF- α inhibía la diferenciación de SH-SY5Y diferenciadas con NGF y en neuronas (Neumann *et al.*, 2002; Takei y Laskey, 2008). Sin embargo, en 1992 se demostró que, combinada con el INF- γ , TNF- α también podía inducir diferenciación (Ponzoni *et al.*, 1992), hecho que se ha corroborado más tarde *in vitro* (Obregon *et al.*, 1997; Widera *et al.*, 2006). A pesar de estas evidencias, la incubación con esta citoquina generalmente inhibe la proliferación y la diferenciación neuronal mediante uno de sus receptores (TNFR-1) (Iosif *et al.*, 2006).

Además, observamos que la incubación con los medios condicionados provocó diferentes cambios morfológicos en las células de neuroblastoma diferenciadas tras 24 h de incubación. Estos cambios, similares a los provocados por TNF- α , si bien eran dependientes de la concentración utilizada, no todas las células de una muestra seguían el mismo patrón. Algunos autores han indicado que un estímulo dado afecta a células individuales, no al conjunto, sin encontrar explicación para este fenómeno (Callahan *et al.*, 1999), algo similar a lo que ocurre en las muestras de los medios condicionados. Nosotros pensamos que se debe a que el proceso de diferenciación no está sincronizado en los cultivos, de manera que cada célula está en una etapa del proceso. Por tanto, nuestros resultados sugieren que el efecto de estas citoquinas proinflamatorias sobre la diferenciación es dependiente del estadio en el que se encuentre el proceso.

De entre los medios condicionados utilizados en este trabajo, el de resultados más interesantes fue el obtenido mediante la estimulación con LPS, el medio LPS, ya que promovía el aumento en la longitud de las prolongaciones celulares. Este efecto puede deberse a que este medio contenía una mayor concentración de IL-1 β . Se ha comprobado en diversos estudios que esta citoquina promueve diferenciación neuronal y supervivencia tanto *in vivo* como *in vitro* (Kannan *et al.*, 1996; Allan y Rothwell, 2001; Wang *et al.*, 2007c). Los cambios morfológicos inducidos por la inflamación pueden conllevar a la pérdida funcional de las neuronas y causar finalmente su muerte, en nuestro estudio, cuando se analizaron las células tratadas con TNF- α se observó que el porcentaje de supervivencia disminuía levemente y que el tratamiento con los medios condicionados tampoco afectaron notablemente a la

viabilidad celular, ya que sólo se redujo significativamente tras la incubación con el medio mezcla de PMA y LPS. Estos resultados van en paralelo con los obtenidos en el análisis morfológico de las células, en los que no se observaron marcadores de muerte, y corroboran la poca toxicidad de estos estresores para las SH-SY5Y diferenciadas. No obstante, existen numerosos artículos que sugieren que un entorno inflamatorio favorece la muerte celular programada o apoptosis (Carson y Ribeiro, 1993; Onishi *et al.*, 1997; Pregi *et al.*, 2009) o una forma regulada de necrosis, conocida como necroptosis (Kaczmarek *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Kearney *et al.*, 2015), no observadas bajo nuestras condiciones experimentales.

Otro de los efectos que observamos tras incubar las células con TNF- α fue que esta citoquina producía un aumento de los niveles de Tau total, que fue ratificado posteriormente mediante inmunofluorescencia. Este aumento también se ha visto en ratones (Demjen *et al.*, 2004) y es un marcador de la EA en líquido cefalorraquídeo (Sjogren *et al.*, 2001). Un resultado similar obtuvo el grupo de Ojala y colegas cuando utilizaron otra citoquina proinflamatoria, la IL-18 (Ojala *et al.*, 2008); y también se ha observado tras la incubación con IL-1 (Sheng *et al.*, 2000). Cuando se analizó este incremento, se descubrió que tenía origen a nivel de expresión de proteínas, puesto que, tanto la actinomicina (inhibidor de la transcripción) como la cicloheximida (inhibidor de la síntesis de proteínas) fueron capaces de prevenir este incremento inducido por TNF- α , indicando que debe existir algún mecanismo mediante el cual esta citoquina estimule la expresión del ARN_m de Tau. Tras la incubación con los medios condicionados, observamos que algunos porcentajes indujeron modificaciones significativas en los niveles de Tau total mediante Western blot. En ningún caso, el porcentaje de 10 % promovió un aumento de Tau, aunque sí lo detectamos por inmunofluorescencia. La causa de este resultado posiblemente sea la sensibilidad del método empleado, ya que las concentraciones de citoquinas del contenido de los medios utilizados fueron muy bajas (en rango de picomol/ml). Estos resultados están en desacuerdo con lo visto por Lee y colegas en su estudio de este mismo año, en el que utilizaron las líneas celulares SH-SY5Y y N-tera2/D1 diferenciadas y estimuladas con TNF- α y un medio condicionado procedentes de microglía humana activada con LPS y IFN- γ (Lee *et al.*, 2015). Estas

diferencias pueden atribuirse a que estos autores emplearon una concentración muy baja de TNF- α (1 ng/ml) y al tiempo de incubación (48 h).

Como ya se ha mencionado, las citoquinas secretadas por la microglía pueden activar las vías de señalización que hiperfosforilan a la proteína asociada a microtúbulos Tau (Li *et al.*, 2003; Ojala *et al.*, 2008) y contribuir al proceso patológico (Brown y Neher, 2010). Dado que la funcionalidad de Tau está principalmente regulada por su fosforilación, el siguiente objetivo fue analizar el grado de fosforilación de Tau en los residuos Thr-50, Thr-181 y Thr-205 por primera vez en respuesta al estímulo inflamatorio. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con TNF- α promovió el aumento de la fosforilación de los sitios Thr-50 y Thr-205, pero no la del residuo Thr-181. De igual modo, los medios condicionados también propiciaron la subida de los niveles de fosforilación de los tres residuos. Está comprobado que la inflamación favorece la hiperfosforilación de Tau (Hensley, 2010; Lee *et al.*, 2010; Metcalfe y Figueiredo-Pereira, 2010), aunque éste es el primer trabajo que demuestra que la Thr-50 se fosforila en respuesta a dicho estímulo. En cuanto a la fosforilación de Tau en el residuo Thr-181, se ha probado que ésta es mayor en células SH-SY5Y sin diferenciar (Jenkins *et al.*, 2000). En paralelo a esta afirmación, en nuestro laboratorio hemos podido comprobar que células sin diferenciar (las empleadas en el capítulo de estrés osmótico) presentan un nivel mayor de “fosforilación basal” en este residuo que en las células diferenciadas, como se ha podido observar en las imágenes de inmunofluorescencia y que por ello, el efecto de estos estímulos sea menor.

En conjunto, nuestros resultados apoyan la hipótesis descrita en la Introducción, y es que la neuroinflamación característica de la EA promueve el aumento de la fosforilación de Tau.

Además de la fosforilación de la proteína Tau, se ha descrito que durante los procesos inflamatorios se activan varias cascadas de señalización. Numerosas evidencias demuestran la relación de TNF- α con las MAP quinasas en multitud enfermedades (Broom *et al.*, 2009; Kim y Choi, 2010; Sabio y Davis, 2014). Nuestros datos muestran que el TNF- α y los medios condicionados inducen la activación de las principales MAP quinasas (p38s, ERK 1/2 y JNKs), aunque éstas ya se encuentran fosforiladas antes del estímulo. Este hecho es

comprensible dado que las MAPKs participan diversos procesos celulares además de contribuir a la fosforilación específica de Tau como hemos mostrado. En este sentido, nuestros resultados sugieren que la regulación de la fosforilación de los tres residuos analizados es llevada a cabo por las diferentes rutas de las MAPKs en respuesta a TNF- α y a los medios condicionados. La heterogeneidad de los datos alude a la complejidad de regulación del metabolismo de Tau: se ha descrito que muchas quinasas que fosforilan a esta proteína lo hacen con eficiencias diferentes sobre residuos específicos (Anderton *et al.*, 2001), y que la fosforilación de un residuo específico de Tau por una quinasa determinada depende del tipo celular y del estímulo con el que se trabaje. De hecho, hemos podido comprobar en esta tesis que los resultados obtenidos con sorbitol no coinciden los con descritos con el estímulo inflamatorio. Posiblemente entren en juego distintos moduladores de la respuesta celular dependiendo de los efectores utilizados, como pueden ser otras quinasas.

Antes se ha comentado, que la señalización responsable de la fosforilación específica de estos tres residuos inducida por estos estresores no ha sido descrita antes, por ello no existe bibliografía. Sin embargo, se conocen otros estímulos inflamatorios, como la IL-6, que aumentan la fosforilación de la Thr-205 vía activación de las p38s (Quintanilla *et al.*, 2004), la misma ruta de señalización que utiliza la IL-1 β para promover la fosforilación de Tau y las patologías asociadas a ella (Li *et al.*, 2003; Tanji *et al.*, 2003; Ghosh *et al.*, 2013). *In vitro* se ha definido que las tres MAP quinasas participan en la fosforilación de los residuos de Tau Thr-181 y Thr-205 (Drewes *et al.*, 1992; Reynolds *et al.*, 2000; Yoshida *et al.*, 2004), resultados semejantes a los obtenidos en nuestro laboratorio.

La fosforilación de Tau en los residuos Thr-50, Thr-181 y Thr-205 previa a la estimulación con los estresores o “fosforilación basal” observada en las muestras control es debida al proceso de diferenciación al que se someten las células SH-SY5Y. Se ha publicado que el ácido retinoico estimula la fosforilación de Tau en residuos que se encuentran hiperfosforilados en los NFTs presentes en los pacientes que sufren la enfermedad de Alzheimer, así como el aumento de Tau total (Jamsa *et al.*, 2004). Éste no es un hecho aislado, también en la línea celular PC-12 diferenciada con NGF se ha descrito un incremento de la fosforilación de MAP-2 (Teng *et al.*, 1993) y de la propia Tau (Sadot *et al.*, 1995). A

pesar de ello, las células SH-SY5Y diferenciadas siguen siendo un buen modelo para este estudio dado que la diferencia entre los niveles de fosforilación basales y los obtenidos en las células tratadas es lo suficientemente significativa para observar los efectos de los estímulos. Además, en la Introducción se ha mencionado que existen residuos de Tau que se encuentran fosforilados en condiciones fisiológicas para poder llevar a cabo sus funciones, pudiendo ser los residuos estudiados parte de ellos.

En esta fosforilación basal de Tau participan todas las MAPKs analizadas. Sin embargo el grupo de Planel afirma que las ERKs no fosforilan a Tau en condiciones fisiológicas *in vivo* ni *in vitro* (Noel *et al.*, 2014). Esta teoría se ha descrito en neuronas humanas y de ratón (Ferrer *et al.*, 2001; Houser *et al.*, 2008). Pero bajo nuestras condiciones experimentales, las ERK 1/2 también regulan esta fosforilación basal, dado que se encontraban ligeramente fosforiladas antes del estímulo y porque el inhibidor U0126 la previno en todos los residuos analizados, por tanto, nuestros resultados están en desacuerdo con los estudios anteriores.

2.2. Localización intracelular y transporte axonal

Varios estudios relacionan el aumento en los niveles de Tau con una deslocalización de la proteína y con una disminución del transporte axonal (Ebner *et al.*, 1998; Brandt *et al.*, 2005). En nuestro trabajo hemos mostrado por primera vez que el TNF- α y los medios condicionados indujeron la deslocalización de Tau y de sus formas fosforiladas, que se traduce en una disminución de su presencia en las prolongaciones celulares y un aumento de las mismas en el soma e incluso de algunas de ellas en núcleo (Thr-50). Además, la citoquina por separado promovió el incremento de Tau y de la fosforilación de los residuos de Tau Thr-50, Thr-69 y Thr-181, éste último no detectado por Western blot, como ya se ha mencionado. Los resultados con los medios condicionados fueron similares, observándose también un aumento de la Tau total que no había sido probado mediante Western blot. Hay que decir, que los aumentos de los niveles de fluorescencia fueron más discretos que los observados tras el tratamiento con sorbitol, pero ya se ha explicado la diferencia entre estos agentes estresantes. Además, otra diferencia con sorbitol, es que éste promovió la pérdida de fluorescencia de la Thr-69 fosforilada del núcleo, sin embargo con TNF- α y los medios

condicionados, los niveles de fluorescencia de esta forma fosforilada se mantuvieron prácticamente constantes. Como ya se ha discutido en el apartado anterior, la salida de la fosfo-Tau Thr-69 del núcleo puede estar relacionada con las lesiones que presentan las células apoptóticas en este orgánulo. Ya que con el estímulo inflamatorio no se analizó si había este tipo de muerte porque no lo vimos necesario a la vista de los resultados obtenidos en la viabilidad celular y en el estudio morfológico, la no alteración de esta forma fosforilada de Tau nos confirmaría que no se da este tipo de muerte celular tras la exposición a TNF- α o a los medios condicionados.

Otra notable diferencia es la presencia del residuo Thr-181 fosforilado en las células control, ya que en las células diferenciadas se detectaron niveles inferiores a los observados en las células sin diferenciar empleadas con el estímulo de estrés hiperosmótico.

Nuestros datos sugieren que el entorno inflamatorio aumenta la fosforilación de Tau, promueve su deslocalización de las prolongaciones y su acumulación en el soma, induciendo la patogenia de Tau.

La deslocalización de Tau suele estar asociada a una disminución en el transporte a lo largo del axón de orgánulos como las mitocondrias o de otras proteínas como los neurofilamentos, por ello, se esperaba ver una desorganización de los haces, como en las células tratadas con sorbitol, pero apenas se apreciaron cambios, sólo una ligera disminución de los niveles de fluorescencia de tubulina. Una posible explicación a esta “pérdida” de tubulina es que, en un entorno inflamatorio, los microtúbulos, y más en concreto la tubulina, sufren modificaciones postraduccionales como la acetilación/desacetilación, glicilación o destirosinación (Li y Yang, 2015), que podrían impedir su correcta detección por los anticuerpos utilizados en este estudio. Además, estas modificaciones juegan un papel importante en la regulación de la estabilidad de los microtúbulos, lo que podría contribuir a la afectación observada en el citoesqueleto en las prolongaciones.

Donde sí se observaron cambios fue en la localización de los neurofilamentos: tras el tratamiento con TNF- α o con los medios condicionados, se retractaron y sólo se detectaron en el soma. Como se ha dicho antes, los neurofilamentos están implicados en el transporte celular, pero además del transporte de proteínas, en las enfermedades neurodegenerativas el transporte de orgánulos también sufre modificaciones. Así, en la

EA se ha descrito que la interrupción del tránsito de mitocondrias por el axón causa una pérdida de estos orgánulos en las terminales y, en consecuencia, la degeneración sináptica, ya que el suministro local energía para mantener las sinapsis está comprometido (Hollenbeck y Saxton, 2005; Baloyannis, 2006; Dubey *et al.*, 2008). Por ello, el daño a nivel de transporte axonal podría explicar el origen a la retracción axonal que se da en las enfermedades neurodegenerativas. En este trabajo se ha descrito por primera vez que, en las células tratadas con medios condicionados, existe una pérdida de mitocondrias generalizada en las prolongaciones celulares. Además, se observaron bulbos axonales tras la incubación con el medio LPS, lo cual indica también afectación del transporte. Nuestros datos coinciden con otros estudios en los que se han utilizado otros estímulos, como el estrés oxidativo (Ebner *et al.*, 1998; Stamer *et al.*, 2002). Recientemente se ha apuntado que, en determinados puntos a lo largo del axón donde es necesario liberar las moléculas u orgánulos que están siendo transportados, como son los puntos de ramificación o las terminales sinápticas, se percibe un aumento local de Tau (Black *et al.*, 1996; Dawson *et al.*, 2010), confirmando que Tau participa en la liberación de la carga y su implicación en el transporte celular (Dixit *et al.*, 2008), resultado que podría explicar nuestros resultados de acumulación de Tau en las prolongaciones observada en las imágenes de inmunofluorescencia.

Un estado de fosforilación de Tau determinado y su unión a los microtúbulos son necesarios para permitir un correcto transporte axonal (Ballatore *et al.*, 2007). Varios trabajos llevados a cabo en ratones transgénicos o con cerebros de pacientes que sufren la EA, relacionan la fosforilación de Tau con perturbación del transporte (Kopeikina *et al.*, 2011; Rodriguez-Martin *et al.*, 2013). En este sentido, se ha probado que en células PC-12 diferenciadas y en neuronas corticales, la fosforilación de Tau en el residuo Thr-205 reduce la motilidad mitocondrial en las neuritas (Shahpasand *et al.*, 2012), lo que concuerda con lo visto en nuestro laboratorio.

Además de afectar a Tau, el entorno inflamatorio altera la localización de otras proteínas del citoesqueleto, asociadas también a neurodegeneración, como MAP-2. Está ampliamente aceptado que MAP-2 se encuentra mayoritariamente confinada al

espacio somatodendrítico (Kanai y Hirokawa, 1995; Dehmelt y Halpain, 2005), pero en nuestro modelo celular se detectó por toda la célula, al igual que ocurriera con la proteína Tau. Esta distribución “anómala” de MAP-2 puede explicarse por el estado de maduración de las células, ya que están en un proceso de diferenciación y la compartimentación de MAP-2 tiene lugar en células ya maduras (Crandall *et al.*, 1986; Dotti *et al.*, 1987). El comportamiento de MAP-2 fue bastante similar al de Tau con TNF- α y con los medios condicionados, aumentó ligeramente pero no hubo cambios en su localización. Este resultado sólo coincide con un artículo de 2001, en el cual se describía que TNF- α no modificaba los niveles de MAP-2 (Marx *et al.*, 2001). Puede que sólo sea la citoquina TNF- α la que suscite este tipo de efecto sobre MAP-2, y que bajo condiciones desfavorables para la célula se active un mecanismo de compensación en el cual otras MAPs realicen las funciones que la MAP afectada no puede cubrir (Boucher *et al.*, 1999; Gordon-Weeks y Fischer, 2000; Takei *et al.*, 2000). No obstante, la mayoría de las escasas publicaciones sobre este tema, sugieren una disminución de MAP-2 en respuesta a un estímulo (Ashford *et al.*, 1998). Como se ha adelantado en la Introducción, MAP-2 puede ser secuestrada por Tau y formar parte de los agregados en las tauopatías (Alonso *et al.*, 1997), y por tanto, disminuir la cantidad de MAP-2 funcional.

Capítulo 3. Efecto de la fosforilación residuo-específica de Tau en su función y localización

Tau juega un papel importante en la regulación de la dinámica de los microtúbulos en situaciones de normalidad fisiológica. Su implicación en patologías neurodegenerativas se debe a que es el mayor componente de los NFTs y a su fosforilación aberrante. Con estos antecedentes, se puede entender la importancia de su fosforilación en la regulación de sus funciones biológicas. Una de esas funciones es la estabilización de los microtúbulos celulares a través de su asociación a las moléculas de tubulina, constituyente básico de este tipo de estructuras. Se sabe que la fosforilación de Tau en ciertos residuos localizados en los dominios de repetición o en regiones adyacentes de la proteína regulan negativamente su asociación a los microtúbulos, promoviendo su separación de los mismos (Buee *et al.*, 2000; Gendron y Petrucelli, 2009). Sin embargo, no se conoce con exactitud la función que desempeña el dominio amino terminal de Tau en la regulación de esta propiedad de la proteína, a pesar de ser responsable de otras importantes funciones como interaccionar con la membrana plasmática o poseer sitios de corte por caspasas (Mandelkow y Mandelkow, 2012). Por esta razón, y continuando con estudios previos de nuestro grupo de investigación realizados por la Dra. Marta Olivera Santa-Catalina, se propuso estudiar el papel de la fosforilación del extremo N-terminal de Tau en su unión a microtúbulos y en su relación con su entorno. Los residuos de Tau elegidos para el estudio fueron la treonina-50 y la treonina-69. Las formas fosforiladas de estos residuos forman parte de los agregados de Tau (Feijoo *et al.*, 2005; Hanger *et al.*, 2009) y son fosforilados por MAPKs como hemos podido demostrar en trabajos no publicados de nuestro laboratorio y en otras investigaciones (Godemann *et al.*, 1999; Reynolds *et al.*, 2000). Para este estudio el modelo celular escogido fue la línea celular HEK-293 dado que carece Tau endógena, y resulta idónea para la expresión de formas mutadas de Tau mediante el uso de sus correspondientes construcciones plasmídicas. Dichas construcciones, y para cada residuo objeto de estudio, permitían la expresión de una Tau no fosforilable en el residuo (mutación a alanina), o una Tau pseudofosforilada en el residuo (mutación a ácido glutámico). Tanto la alanina como el ácido glutámico fueron elegidos por

sus propiedades y tamaño, para que no interfieran en la estructura de la proteína. Aunque la fosforilación fisiológica es dinámica y transitoria en respuesta a varios estímulos o eventos celulares, los mutantes que mimetizan un estado fosforilado o no fosforilable pueden ser útiles para estudiar el papel regulador de la fosforilación de una proteína en particular en la célula. Aunque el uso de este tipo de construcciones está aceptado y ofrece buenos resultados para examinar los cambios estructurales y funcionales que resultan de este tipo de modificación postraduccional en Tau, como se ha demostrado en varias publicaciones (Utton *et al.*, 1997; Eidenmuller *et al.*, 2000; Fath *et al.*, 2002; Sun y Gamblin, 2009), los efectos de una pseudofosforilación pueden no ser completamente iguales a los de una fosforilación real. Pero con esta técnica se ha evitado el problema que suponen las aproximaciones basadas en el uso de quinasas constitutivamente activas que pueden fosforilar más de un residuo de la proteína.

Resultados previos de nuestro laboratorio habían demostrado que la fosforilación Tau en el residuo Thr-50 dificultaba su unión a los microtúbulos (Olivera Santa-Catalina, 2012). En el presente trabajo se ha demostrado que cualquiera de las modificaciones efectuadas en los residuos de Tau Thr-50 y Thr-69 afectaban a su asociación con el citoesqueleto, pero las formas no fosforiladas (T50A y T69A) presentaron una tendencia a unirse al citoesqueleto levemente superior que sus respectivas formas fosforiladas. Si bien estos resultados no coinciden exactamente con los obtenidos en el laboratorio con anterioridad, hay que mencionar que estos primeros experimentos se realizaron sin utilizar la proteína nativa como control, por tanto, sólo se observaron las diferencias entre los 2 mutantes con el residuo Thr-50 de Tau modificado. Aunque era de esperar que las no fosforiladas favorecieran la unión al citoesqueleto, como ocurre con la Ser-396 del extremo C-terminal de Tau (Bramblett *et al.*, 1993), en el presente trabajo, los resultados con HEK-293 sugieren que los residuos de treonina son necesarios para mantener la estructura de la proteína Tau que favorezca su unión a microtúbulos, y que, desde el punto de vista estructural, el cambio de un residuo fosfotreonina por glutámico obstaculiza especialmente su unión a tubulina, tal y como se ha comprobado en otros trabajos en residuos sitiados en el dominio de unión a microtúbulos (Utton *et al.*, 1997; Xie *et al.*, 1998; Combs *et al.*, 2011). Llama la atención que en la mayoría de estos estudios sólo ha utilizado la pseudofosforilación para sus experimentos y no han

comparado sus resultados con el mutante opuesto, el que impide la fosforilación, por lo que las diferencias que observan son mayores con respecto a la proteína sin mutar y hace más completo nuestro trabajo.

Casi en paralelo con estos resultados, en la aproximación *in vivo* realizada en PC-12 se observó que el mutante T50A presentaba una unión más fuerte a microtúbulos. Pero si comparamos todos los resultados, parece haber discrepancia entre ambos modelos. Sin embargo, aunque si bien estos modelos buscan ser una aproximación “*in vivo*”, tienen diferencias considerables. La principal diferencia es que en el modelo PC-12 se trabaja con células diferenciadas a tipo neuronal mientras que las HEK-293 es un modelo no neuronal, y por las distintas técnicas empleadas. También hay que tener en cuenta que el aumento de la Tau disociada observada en el primer ensayo se debe en parte a que el Taxol y Tau compiten por los mismos sitios de unión en los microtúbulos, y por ello, en presencia de este compuesto Tau puede encontrarse disociada o en estado soluble (Black, 1987). En general, nuestros datos sugieren que la pseudofosforilación del residuo Thr-50 de Tau afecta a su habilidad para unirse y polimerizar los microtúbulos. Apoyando esta hipótesis, algunos estudios han indicado que la pseudofosforilación de determinados residuos (de la región próxima al dominio de unión a microtúbulos) perturba la polimerización (Combs *et al.*, 2011). Sin embargo, en otras regiones de la proteína Tau, la fosforilación no afecta la polimerización estabilizada por Taxol *in vivo* ni *in vitro* (Haque *et al.*, 1999; Devred *et al.*, 2002; Amniai *et al.*, 2009). Puede que el extremo N-terminal participe indirectamente en la unión a microtúbulos, manteniendo la estructura necesaria para esta interacción o directamente, ya que la introducción de cargas negativas en Tau disminuiría su unión a los microtúbulos, por la repulsión con la superficie negativa de la tubulina, promoviendo la inestabilidad de los microtúbulos y pudiendo afectar a otras propiedades de Tau como su localización celular.

Aparte de ser el mutante que más tiempo está unido a los microtúbulos, T50A favorece la polimerización de los microtúbulos más largos y más rápidamente. En el lado contrario se encuentra la forma no fosforilada de la Thr-69 de Tau, la cual se disocia de los microtúbulos antes y polimeriza a menor velocidad y las formas fosforiladas, que fueron similares a la proteína sin modificar. Estos resultados concuerdan con los obtenidos *in vivo* pero no coinciden con los obtenidos por Feijoo y colaboradores, quienes muestran que la

mutación T50E de Tau promueve un aumento en la velocidad de polimerización *in vitro*. Sobre el residuo Thr-69 de Tau no hay nada descrito hasta el momento, pero sí se han estudiado otros residuos situados en otras regiones de Tau, como por ejemplo la fosforilación de la Ser-202 y la Thr-205, las cuales disminuyen la polimerización de tubulina y su unión a microtúbulos, o la Ser-235 y la Ser-404 que fosforiladas muestran una capacidad para inducir polimerización igual que la Tau nativa (Wada *et al.*, 1998). Esta disparidad de resultados en la literatura hace muy complicado conocer el papel específico de cada residuo y pone de manifiesto la necesidad del desarrollo de técnicas más precisas para llevar a cabo estas investigaciones.

Por otra parte, el tratamiento con fosfatasas previo a la medida de la velocidad produjo algunos cambios que afectaron sobre todo a la forma fosforilada de la Thr-69, lo que nos indicó que, en el efecto de las modificaciones de los residuos de Tau Thr-50 y Thr-69 pueden interferir otros elementos, posiblemente otras fosforilaciones en diferentes zonas de la proteína Tau.

La pseudofosforilación de la Thr-50 y la Thr-69 de Tau también afectó negativamente a su capacidad polimerizadora, mientras que los mutantes no fosforilados la promovían. El resultado de la T50A concuerda con los anteriores, en los que se describía una unión a microtúbulos más fuerte que el resto de los mutantes; con respecto a la T69A, este resultado coincide con los obtenidos en las HEK-293, pero no con lo visto *in vivo* ni *in vitro*. Una posible explicación a la aparente contraposición de los resultados son los modelos celulares elegidos, ya que la afinidad de la proteína recombinante usada *in vitro* por los microtúbulos se ve comprometida en el modelo de cultivo celular, puesto que la regulación de Tau está mediada por quinasas y fosfatasas que no se encuentran en el sistema *in vitro*. También hay que tener en cuenta la existencia de otras proteínas asociadas a los microtúbulos en la célula, que al igual que Tau, pueden unirse a este tipo de estructuras y estabilizarlas, y cuya asociación a la tubulina podría verse facilitada como un mecanismo compensador diferente en cada tipo celular en respuesta a una deficiente función de Tau debido a su grado de fosforilación. Ésta puede ser la causa por la que obtengamos tan variados resultados en los diferentes modelos utilizados.

Nuevamente, nuestros resultados son opuestos a los obtenidos por Feijoo, quien percibió una mayor repolimerización y extensiones más largas tras la incubación con nocodazol con el mutante pseudofosforilado de la Thr-50. Pero en paralelo a nuestros datos, la mayoría de los trabajos realizados en este sentido sugieren que la fosforilación disminuye la habilidad de Tau para prevenir la despolimerización de los microtúbulos, como son los realizados con los residuos Thr-231/Ser-235 o Ser-396/Ser-404 (Ding *et al.*, 2006).

En conjunto con los resultados de asociación a microtúbulos, nuestros datos apuntan que una unión más fuerte a microtúbulos podría ayudar a estabilizarlos. Dado que la unión a microtúbulos de Tau requiere una conformación determinada de la proteína, no es difícil imaginar que existen residuos clave que pueden modificar dicha conformación, lo que afectaría a su unión con los microtúbulos y su capacidad polimerizadora.

La despolimerización de los microtúbulos y la disociación de Tau de ellos, podrían favorecer la formación de agregados. Estos depósitos insolubles son característicos de las patologías de la proteína Tau, de ahí nuestro interés en saber si la fosforilación de los dos residuos estudiados propiciaba su formación. Aunque nuestras condiciones de trabajo (*in vitro*) no pueden ser comparables a las que tienen lugar en el interior de la célula, donde el ambiente reducido tenga posiblemente consecuencias sobre la agregación, el uso de mutantes es un modelo aceptado. Los resultados indicaron que la T69E inducía este fenómeno, no así las demás construcciones, coincidiendo con el estudio realizado por Hanger y colegas en 2009, pero opuestos a lo obtenido por Feijoo en su trabajo, donde el residuo Thr-50 fosforilado sí estaba presente en los agregados de Tau. De nuestros resultados también se puede extraer que no todas las fosforilaciones específicas de Tau tienden a formar los NFTs, como es el caso del residuo Thr-50, no presente en los agregados pero sí relacionado con la patología asociada a Tau. El mecanismo mediante el cual el residuo Thr-69 fosforilado induce agregación todavía no se ha esclarecido, pero se puede sugerir, teniendo en consideración los datos previos de esta tesis, que produce un cambio en la estructura de la proteína que podría promover la formación de agregados.

Otra de las propiedades de Tau que pueden verse afectadas por su estado de fosforilación es su localización subcelular, como hemos comprobado anteriormente, por ello

nos planteamos investigar si su fosforilación en el extremo N-terminal, que es la parte de Tau asociada a la membrana plasmática (Brandt *et al.*, 1995), tenía un papel relevante en esta interacción. Bajo nuestras condiciones experimentales, los resultados obtenidos indicaron que todos los mutantes eran más abundantes en el citosol, pero que también se encontraban asociados a la membrana plasmática, en una proporción similar a la proteína sin modificar, sugiriendo, por primera vez, que ni la fosforilación del residuo Thr-50 y ni la del Thr-69 de Tau participan en su asociación a la membrana plasmática. Sin embargo, los trabajos realizados sobre este tema coinciden en apuntar que Tau se encuentra desfosforilada cuando está asociada a membrana (Brandt *et al.*, 1995; Ekinci y Shea, 2000; Maas *et al.*, 2000; Pooler *et al.*, 2012). Es importante destacar que estos autores trabajaron bien con una construcción de Tau en la cual se habían mutado varios sitios a lo largo de la proteína (simulando el estado de Tau en los PHFs) o con fragmentos del extremo amino terminal de Tau, por lo que el efecto descrito fue mayor que el obtenido por nosotros. Dado que apenas observamos diferencias entre los diferentes mutantes, pensamos que nuestros resultados apoyan la hipótesis que sugiere que Tau no interacciona directamente con la membrana plasmática, sino que lo hace probablemente a través de otras proteínas (Gauthier-Kemper *et al.*, 2011), y que por ello, la fosforilación de un solo residuo no es suficiente para alterar esta asociación, necesaria seguramente para la estabilización de los microtúbulos.

Se ha puesto de manifiesto en numerosas ocasiones que las modificaciones realizadas en el extremo C-terminal pueden afectar al N-terminal y a sus funciones (Gauthier-Kemper *et al.*, 2011), por ello y por los resultados obtenidos en el resto de ensayos, creímos que sería interesante analizar si se modificaba el patrón de fosforilación de Tau, es decir, si otros residuos veían modificados su estado (fosforilado o no) en presencia de las distintas mutaciones. Tras el estudio se concluyó que la fosforilación del residuo Thr-69 de Tau afectaba a la Thr-181 y Ser-202/Thr-205 fosforiladas y que el mutante T50E también afectó a la fosforilación del residuo Ser-202/Thr-205 pero no a los demás. Esto nos sugiere, que la fosforilación del residuo de Tau Thr-69, y en menor grado la de la Thr-50, podrían promover un cambio conformacional en Tau que desencadenaría una serie de modificaciones que afectaría a otras regiones de la proteína hasta la formación de agregados. Estos resultados

están en contraposición a lo observado por Feijoo y colaboradores, quienes observaron una disminución en la fosforilación del residuo Thr-181 en células HEK-293 transfectadas con la construcción de Tau T50E y ninguna alteración de los niveles de fosforilación de la posición Ser-202/Thr-205. Existen otros trabajos en los que se observa la modificación del patrón de fosforilación (Gauthier-Kemper *et al.*, 2011), lo que confirmaría que existen residuos clave que alteran el comportamiento de la proteína cuando son modificados.

Por tanto, los datos obtenidos sugieren que los residuos Thr-50 y Thr-69 de Tau deben ser clave para el mantenimiento de la forma “en clip” que presenta Tau en condiciones fisiológicas, estableciendo algún tipo de interacción con los residuos situados en la región rica en prolinas (como la posición Thr-181 o la Ser-202/Thr-205), pero no con los que se localizan en el extremo C-terminal (lo que explicaría que el estado de los residuos Ser-396/Ser-404 no se modificasen). Hay que mencionar, que el cambio conformacional también afectaría a su unión a microtúbulos, ya que, teniendo en cuenta los resultados previos, las formas fosforiladas pierden sus funciones estabilizadora y polimerizadora de microtúbulos (comparándolas con su homólogo sin fosforilar) y posibilitando de esta manera la formación de agregados.

VI. Conclusiones

Basándonos en los resultados obtenidos en este trabajo, podemos proponer las siguientes conclusiones:

1. El estrés hiperosmótico produce la proteólisis de Tau y la apoptosis de las células SH-SY5Y mediante la activación de las caspasas 6 y 3, a través de un mecanismo en el que participan las proteínas quinasas JNKs.
2. El estrés hiperosmótico y el inflamatorio inducen cambios morfológicos específicos en las células SH-SY5Y.
3. El estrés hiperosmótico y el inflamatorio promueven la fosforilación de Tau en los residuos Thr-50, Thr-181 y Thr-205 a través de la activación de MAPKs diferentes. El TNF- α induce, además, un aumento en los niveles de expresión de Tau.
4. La distribución de la proteína Tau, fosforilada y sin fosforilar, se modifica en respuesta al estrés hiperosmótico y al inflamatorio de forma específica.
5. La fosforilación y los cambios en la localización de Tau en respuesta al estrés hiperosmótico y el inflamatorio están asociados con la desorganización del citoesqueleto y con una pérdida del transporte a través del axón, respectivamente, lo que sugiere que la proteína Tau ha perdido su función.
6. La pseudofosforilación en los residuos Thr-50 y Thr-69 de Tau disminuye la capacidad de unión de la proteína al citoesqueleto y la de asociarse a los microtúbulos, reduciendo de esta forma la estabilidad de los mismos. A su vez, disminuye la capacidad promotora de la polimerización de los microtúbulos, e influye en la fosforilación de Tau en otros residuos, pero no modifica su interacción con la membrana plasmática.

Además podemos obtener la siguiente conclusión general:

Aunque los estreses hiperosmótico e inflamatorio activan a las mismas rutas de señalización celular, los efectos que éstas tienen sobre Tau y la viabilidad celular son diferentes, lo que sugiere que deben existir diferentes mediadores que modulen la respuesta celular a cada tipo de estrés.

Conclusions

Based on the results of this study, we can conclude that:

1. Hyperosmotic stress induces Tau proteolysis and apoptosis through the activation of caspase 6 and 3 and JNKs in SH-SY5Y cells.
2. Hyperosmotic and inflammatory stresses promote specific morphological changes in SH-SY5Y cells.
3. Hyperosmotic stress and inflammation induce Tau phosphorylation at Thr-50, Thr-181 and Thr-205 through different MAPKs pathways. In addition, TNF- α increases Tau expression.
4. Tau distribution is modified in response to both hyperosmotic stress and inflammation in a specific way.
5. Both Tau phosphorylation and distribution are associated to cytoskeleton disorganization and impaired axonal transport in response to hyperosmotic stress and inflammation respectively.
6. Tau pseudophosphorylation at both Thr-50 and Thr-69 reduce its ability to associate to cytoskeleton and microtubules, decreasing their stability. Moreover, these pseudophosphorylations reduce the ability of Tau to promote microtubule polymerization and also affect other Tau phosphorylated sites. However, Tau phosphorylated at Thr-50 or Thr-69 does not modify its interaction with the plasmatic membrane.

The general conclusion of this work is:

Although hyperosmotic and inflammatory stresses active the same signaling pathways, their effects on Tau and on cellular viability are different. This suggests that there are other mediators which modulate the cellular response to each stress.

VII. Bibliografía

Akhmanova, A. y Hoogenraad, C. C. 2005. "Microtubule plus-end-tracking proteins: mechanisms and functions." *Curr Opin Cell Biol* 171: 47-54.

Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G. M., Cooper, N. R., Eikelenboom, P., Emmerling, M., Fiebich, B. L., Finch, C. E., Frautschy, S., Griffin, W. S., Hampel, H., Hull, M., Landreth, G., Lue, L., Mrak, R., Mackenzie, I. R., McGeer, P. L., O'Banion, M. K., Pachter, J., Pasinetti, G., Plata-Salaman, C., Rogers, J., Rydel, R., Shen, Y., Streit, W., Strohmeyer, R., Tooyoma, I., Van Muiswinkel, F. L., Veerhuis, R., Walker, D., Webster, S., Wegrzyniak, B., Wenk, G. y Wyss-Coray, T. 2000. "Inflammation and Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* 213: 383-421.

Alonso, A. C., Grundke-Iqbal, I., Barra, H. S. y Iqbal, K. 1997. "Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau." *Proc Natl Acad Sci U S A* 941: 298-303.

Alonso, A., Zaidi, T., Novak, M., Grundke-Iqbal, I. y Iqbal, K. 2001. "Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments." *Proc Natl Acad Sci U S A* 9812: 6923-6928.

Alonso Vilatela, M. E., Lopez-Lopez, M. y Yescas-Gomez, P. 2012. "Genetics of Alzheimer's disease." *Arch Med Res* 438: 622-631.

Alzheimer, A., Stelzmann, R. A., Schnitzlein, H. N. y Murtagh, F. R. 1995. "An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde"." *Clin Anat* 86: 429-431.

Alzheimer, A., Sterzmann, R.A., Schnitzlein, H.N. y Murtagh, F.R. 1907. "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde." *Z Psychiatr Psych Gerichtl Med.* 64: 146-148.

Allan, S. M. y Rothwell, N. J. 2001. "Cytokines and acute neurodegeneration." *Nat Rev Neurosci* 210: 734-744.

Allen, B., Ingram, E., Takao, M., Smith, M. J., Jakes, R., Virdee, K., Yoshida, H., Holzer, M., Craxton, M., Emson, P. C., Atzori, C., Migheli, A., Crowther, R. A., Ghetti, B., Spillantini, M. G. y Goedert, M. 2002. "Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein." *J Neurosci* 2221: 9340-9351.

Allsopp, T. E., McLuckie, J., Kerr, L. E., Macleod, M., Sharkey, J. y Kelly, J. S. 2000. "Caspase 6 activity initiates caspase 3 activation in cerebellar granule cell apoptosis." *Cell Death Differ* 710: 984-993.

Amadoro, G., Corsetti, V., Stringaro, A., Colone, M., D'Aguanno, S., Meli, G., Ciotti, M., Sancesario, G., Cattaneo, A., Bussani, R., Mercanti, D. y Calissano, P. 2010. "A NH2 tau fragment targets neuronal mitochondria at AD synapses: possible implications for neurodegeneration." *J Alzheimers Dis* 212: 445-470.

Amniai, L., Barbier, P., Sillen, A., Wieruszeski, J. M., Peyrot, V., Lippens, G. y Landrieu, I. 2009. "Alzheimer disease specific phosphoepitopes of Tau interfere with assembly of tubulin but not binding to microtubules." *FASEB J* 234: 1146-1152.

Amor, S., Puentes, F., Baker, D. y van der Valk, P. 2010. "Inflammation in neurodegenerative diseases." *Immunology* 1292: 154-169.

Anderton, B. H., Betts, J., Blackstock, W. P., Brion, J. P., Chapman, S., Connell, J., Dayanandan, R., Gallo, J. M., Gibb, G., Hanger, D. P., Hutton, M., Kardalidou, E., Leroy, K., Lovestone, S., Mack, T., Reynolds, C. H. y Van Slegtenhorst, M. 2001. "Sites of phosphorylation in tau and factors affecting their regulation." *Biochem Soc Symp*67: 73-80.

Andreadis, A., Brown, W. M. y Kosik, K. S. 1992. "Structure and novel exons of the human tau gene." *Biochemistry* 3143: 10626-10633.

Arnold, C. S., Johnson, G. V., Cole, R. N., Dong, D. L., Lee, M. y Hart, G. W. 1996. "The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine." *J Biol Chem* 27146: 28741-28744.

Ashford, J. W., Sultanian, N. S., Zhang, S. X. y Geddes, J. W. 1998. "Neuropil threads are collinear with MAP2 immunostaining in neuronal dendrites of Alzheimer brain." *J Neuropathol Exp Neurol* 5710: 972-978.

Askanas, V., Engel, W. K., Bilak, M., Alvarez, R. B. y Selkoe, D. J. 1994. "Twisted tubulofilaments of inclusion body myositis muscle resemble paired helical filaments of Alzheimer brain and contain hyperphosphorylated tau." *Am J Pathol* 1441: 177-187.

Avila, J., Lucas, J. J., Perez, M. y Hernandez, F. 2004. "Role of tau protein in both physiological and pathological conditions." *Physiol Rev* 842: 361-384.

Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C. J., McLauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J. S., Alessi, D. R. y Cohen, P. 2007. "The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update." *Biochem J* 4083: 297-315.

Baloyannis, S. J. 2006. "Mitochondrial alterations in Alzheimer's disease." *J Alzheimers Dis* 92: 119-126.

Ballatore, C., Lee, V. M. y Trojanowski, J. Q. 2007. "Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders." *Nat Rev Neurosci* 89: 663-672.

Barger, S. W. y Harmon, A. D. 1997. "Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E." *Nature* 3886645: 878-881.

Berry, R. W., Abraha, A., Lagalwar, S., LaPointe, N., Gamblin, T. C., Cryns, V. L. y Binder, L. I. 2003. "Inhibition of tau polymerization by its carboxy-terminal caspase cleavage fragment." *Biochemistry* 4227: 8325-8331.

Biedler, J. L., Helson, L. y Spengler, B. A. 1973. "Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture." *Cancer Res* 3311: 2643-2652.

Black, M. M. 1987. "Taxol interferes with the interaction of microtubule-associated proteins with microtubules in cultured neurons." *J Neurosci* 711: 3695-3702.

Black, M. M., Slaughter, T., Moshich, S., Obrocka, M. y Fischer, I. 1996. "Tau is enriched on dynamic microtubules in the distal region of growing axons." *J Neurosci* 1611: 3601-3619.

Blasko, I., Veerhuis, R., Stampfer-Kountchev, M., Saurwein-Teissl, M., Eikelenboom, P. y Grubeck-Loebenstein, B. 2000. "Costimulatory effects of interferon-gamma and interleukin-1beta or tumor necrosis factor alpha on the synthesis of Abeta1-40 and Abeta1-42 by human astrocytes." *Neurobiol Dis* 76 Pt B: 682-689.

Blennow, K., de Leon, M. J. y Zetterberg, H. 2006. "Alzheimer's disease." *Lancet* 3689533: 387-403.

- Blennow, K., Zetterberg, H. y Fagan, A. M.** 2012. "Fluid biomarkers in Alzheimer disease." *Cold Spring Harb Perspect Med* 29: a006221.
- Bogoyevitch, M. A.** 2006. "The isoform-specific functions of the c-Jun N-terminal Kinases (JNKs): differences revealed by gene targeting." *Bioessays* 289: 923-934.
- Bolmont, T., Haiss, F., Eicke, D., Radde, R., Mathis, C. A., Klunk, W. E., Kohsaka, S., Jucker, M. y Calhoun, M. E.** 2008. "Dynamics of the microglial/amyloid interaction indicate a role in plaque maintenance." *J Neurosci* 2816: 4283-4292.
- Borsello, T. y Forloni, G.** 2007. "JNK signalling: a possible target to prevent neurodegeneration." *Curr Pharm Des* 1318: 1875-1886.
- Bosc, C., Oenariet, E., Andrieux, A. y Job, D.** 1999. "STOP proteins." *Cell Struct Funct* 245: 393-399.
- Boucher, M., Belanger, D., Beaulieu, C. y Leclerc, N.** 1999. "Tau-mediated process outgrowth is differentially altered by the expression of MAP2b and MAP2c in Sf9 cells." *Cell Motil Cytoskeleton* 424: 257-273.
- Boyne, L. J., Tessler, A., Murray, M. y Fischer, I.** 1995. "Distribution of Big tau in the central nervous system of the adult and developing rat." *J Comp Neurol* 3582: 279-293.
- Braak, H., Thal, D. R., Ghebremedhin, E. y Del Tredici, K.** 2011. "Stages of the pathologic process in Alzheimer disease: age categories from 1 to 100 years." *J Neuropathol Exp Neurol* 7011: 960-969.
- Bradford, M. M.** 1976. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Bradley, J. R.** 2008. "TNF-mediated inflammatory disease." *J Pathol* 2142: 149-160.
- Bramblett, G. T., Goedert, M., Jakes, R., Merrick, S. E., Trojanowski, J. Q. y Lee, V. M.** 1993. "Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding." *Neuron* 106: 1089-1099.
- Brandt, R., Hundelt, M. y Shahani, N.** 2005. "Tau alteration and neuronal degeneration in tauopathies: mechanisms and models." *Biochim Biophys Acta* 17392-3: 331-354.
- Brandt, R., Leger, J. y Lee, G.** 1995. "Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain." *J Cell Biol* 1315: 1327-1340.
- Broom, O. J., Widjaya, B., Troelsen, J., Olsen, J. y Nielsen, O. H.** 2009. "Mitogen activated protein kinases: a role in inflammatory bowel disease?" *Clin Exp Immunol* 1583: 272-280.
- Brown, G. C. y Neher, J. J.** 2010. "Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglial killing of neurons." *Mol Neurobiol* 412-3: 242-247.
- Brown, M. D. y Sacks, D. B.** 2008. "Compartmentalised MAPK pathways." *Handb Exp Pharmacol* 186: 205-235.
- Buee-Scherrer, V. y Goedert, M.** 2002. "Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases in intact cells." *FEBS Lett* 5151-3: 151-154.
- Buee, L., Bussiere, T., Buee-Scherrer, V., Delacourte, A. y Hof, P. R.** 2000. "Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders." *Brain Res Brain Res Rev* 331: 95-130.
- Burg, M. B., Ferraris, J. D. y Dmitrieva, N. I.** 2007. "Cellular response to hyperosmotic stresses." *Physiol Rev* 874: 1441-1474.

- Caceres, A. y Kosik, K. S.** 1990. "Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons." *Nature* 3436257: 461-463.
- Callahan, L. M., Vaules, W. A. y Coleman, P. D.** 1999. "Quantitative decrease in synaptophysin message expression and increase in cathepsin D message expression in Alzheimer disease neurons containing neurofibrillary tangles." *J Neuropathol Exp Neurol* 583: 275-287.
- Canu, N., Dus, L., Barbato, C., Ciotti, M. T., Brancolini, C., Rinaldi, A. M., Novak, M., Cattaneo, A., Bradbury, A. y Calissano, P.** 1998. "Tau cleavage and dephosphorylation in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis." *J Neurosci* 1818: 7061-7074.
- Carden, M. J., Trojanowski, J. Q., Schlaepfer, W. W. y Lee, V. M.** 1987. "Two-stage expression of neurofilament polypeptides during rat neurogenesis with early establishment of adult phosphorylation patterns." *J Neurosci* 711: 3489-3504.
- Carlier, M.F.** 2010. "Actin-based Motility: Cellular, Molecular and Physical Aspects", *Springer*.
- Carrillo-Mora, P., Luna, R. y Colin-Barenque, L.** 2014. "Amyloid beta: multiple mechanisms of toxicity and only some protective effects?" *Oxid Med Cell Longev* 2014: 795375.
- Carson, D. A. y Ribeiro, J. M.** 1993. "Apoptosis and disease." *Lancet* 3418855: 1251-1254.
- Castro, R. E., Santos, M. M., Gloria, P. M., Ribeiro, C. J., Ferreira, D. M., Xavier, J. M., Moreira, R. y Rodrigues, C. M.** 2010. "Cell death targets and potential modulators in Alzheimer's disease." *Curr Pharm Des* 1625: 2851-2864.
- Ciccarone, V., Spengler, B. A., Meyers, M. B., Biedler, J. L. y Ross, R. A.** 1989. "Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages." *Cancer Res* 491: 219-225.
- Clark, I. A., Alleva, L. M. y Vissel, B.** 2010. "The roles of TNF in brain dysfunction and disease." *Pharmacol Ther* 1283: 519-548.
- Cleveland, D. W., Hwo, S. Y. y Kirschner, M. W.** 1977a. "Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin." *J Mol Biol* 1162: 207-225.
- Cleveland, D. W., Hwo, S. Y. y Kirschner, M. W.** 1977b. "Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly." *J Mol Biol* 1162: 227-247.
- Cohen, T. J., Guo, J. L., Hurtado, D. E., Kwong, L. K., Mills, I. P., Trojanowski, J. Q. y Lee, V. M.** 2011. "The acetylation of tau inhibits its function and promotes pathological tau aggregation." *Nat Commun* 2: 252.
- Combs, B., Voss, K. y Gamblin, T. C.** 2011. "Pseudohyperphosphorylation has differential effects on polymerization and function of tau isoforms." *Biochemistry* 5044: 9446-9456.
- Cooper, J. A., Bowen-Pope, D. F., Raines, E., Ross, R. y Hunter, T.** 1982. "Similar effects of platelet-derived growth factor and epidermal growth factor on the phosphorylation of tyrosine in cellular proteins." *Cell* 311: 263-273.
- Corsetti, V, Amadoro, G, Gentile, A, Capsoni, S, Ciotti, MT, Cencioni, MT, Atlante, A, Canu, N, Rohn, TT y Cattaneo, A** 2008. "Identification of a caspase-derived N-terminal tau fragment in cellular and animal Alzheimer's disease models." *Molecular and Cellular Neuroscience* 383: 381-392.

- Cotman, C. W. y Anderson, A. J. 1995. "A potential role for apoptosis in neurodegeneration and Alzheimer's disease." *Mol Neurobiol* 101: 19-45.
- Cotman, C. W., Poon, W. W., Rissman, R. A. y Blurton-Jones, M. 2005. "The role of caspase cleavage of tau in Alzheimer disease neuropathology." *J Neuropathol Exp Neurol* 642: 104-112.
- Craig, M., Ying, C. y Loberg, R. D. 2008. "Co-inoculation of prostate cancer cells with U937 enhances tumor growth and angiogenesis in vivo." *J Cell Biochem* 1031: 1-8.
- Crandall, J. E., Jacobson, M. y Kosik, K. S. 1986. "Ontogenesis of microtubule-associated protein 2 (MAP2) in embryonic mouse cortex." *Brain Res* 3931: 127-133.
- Cras, P., Kawai, M., Siedlak, S. y Perry, G. 1991. "Microglia are associated with the extracellular neurofibrillary tangles of Alzheimer disease." *Brain Res* 5582: 312-314.
- Crawford, E. D. y Wells, J. A. 2011. "Caspase substrates and cellular remodeling." *Annu Rev Biochem* 80: 1055-1087.
- Cripps, D., Thomas, S. N., Jeng, Y., Yang, F., Davies, P. y Yang, A. J. 2006. "Alzheimer disease-specific conformation of hyperphosphorylated paired helical filament-Tau is polyubiquitinated through Lys-48, Lys-11, and Lys-6 ubiquitin conjugation." *J Biol Chem* 28116: 10825-10838.
- Cuenda, A., Cohen, P., Buee-Scherrer, V. y Goedert, M. 1997. "Activation of stress-activated protein kinase-3 (SAPK3) by cytokines and cellular stresses is mediated via SAPKK3 (MKK6); comparison of the specificities of SAPK3 and SAPK2 (RK/p38)." *EMBO J* 162: 295-305.
- Cuenda, A., Rouse, J., Doza, Y. N., Meier, R., Cohen, P., Gallagher, T. F., Young, P. R. y Lee, J. C. 1995. "SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1." *FEBS Lett* 3642: 229-233.
- Cuenda, A. y Rousseau, S. 2007. "p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases." *Biochim Biophys Acta* 17738: 1358-1375.
- Chakrabarty, P., Jansen-West, K., Beccard, A., Ceballos-Diaz, C., Levites, Y., Verbeeck, C., Zubair, A. C., Dickson, D., Golde, T. E. y Das, P. 2010. "Massive gliosis induced by interleukin-6 suppresses Abeta deposition in vivo: evidence against inflammation as a driving force for amyloid deposition." *FASEB J* 242: 548-559.
- Chen, J., Kanai, Y., Cowan, N. J. y Hirokawa, N. 1992. "Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons." *Nature* 3606405: 674-677.
- Chen, Q., Zhou, Z., Zhang, L., Xu, S., Chen, C. y Yu, Z. 2014. "The cellular distribution and Ser262 phosphorylation of tau protein are regulated by BDNF in vitro." *PLoS One* 93: e91793.
- Chong, Y. H., Shin, Y. J., Lee, E. O., Kaye, R., Glabe, C. G. y Tenner, A. J. 2006. "ERK1/2 activation mediates Abeta oligomer-induced neurotoxicity via caspase-3 activation and tau cleavage in rat organotypic hippocampal slice cultures." *J Biol Chem* 28129: 20315-20325.
- Chowdhury, I., Tharakan, B. y Bhat, G. K. 2008. "Caspases - an update." *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 1511: 10-27.
- Chu, W. M. 2013. "Tumor necrosis factor." *Cancer Lett* 3282: 222-225.
- Chung, C. W., Song, Y. H., Kim, I. K., Yoon, W. J., Ryu, B. R., Jo, D. G., Woo, H. N., Kwon, Y. K., Kim, H. H., Gwag, B. J., Mook-Jung, I. H. y Jung, Y. K. 2001. "Proapoptotic effects of tau cleavage product generated by caspase-3." *Neurobiol Dis* 81: 162-172.

- Dan, I., Watanabe, N. M. y Kusumi, A.** 2001. "The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades." *Trends Cell Biol* 115: 220-230.
- Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, M. A., Lassota, P. y Traganos, F.** 1992. "Features of apoptotic cells measured by flow cytometry." *Cytometry* 138: 795-808.
- Davis, R. J.** 2000. "Signal transduction by the JNK group of MAP kinases." *Cell* 1032: 239-252.
- Davis, R.J. y Dickens, M.** 2000. "Inhibitors of the JNK signal transduction pathway and methods of use". *Google Patents*.
- Dawson, H. N., Cantillana, V., Jansen, M., Wang, H., Vitek, M. P., Wilcock, D. M., Lynch, J. R. y Laskowitz, D. T.** 2010. "Loss of tau elicits axonal degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease." *Neuroscience* 1691: 516-531.
- de Ancos, J. G. y Avila, J.** 1993. "Differential distribution in white and grey matter of tau phosphoisoforms containing four tubulin-binding motifs." *Biochem J* 296 (Pt 2): 351-354.
- De Brabander, M., Geuens, G., Nuydens, R., Willebrords, R. y De Mey, J.** 1981. "Taxol induces the assembly of free microtubules in living cells and blocks the organizing capacity of the centrosomes and kinetochores." *Proc Natl Acad Sci U S A* 789: 5608-5612.
- De Brabander, M. J., Van de Veire, R. M., Aerts, F. E., Borgers, M. y Janssen, P. A.** 1976. "The effects of methyl (5-(2-thienylcarbonyl)-1H-benzimidazol-2-yl) carbamate, (R 17934; NSC 238159), a new synthetic antitumoral drug interfering with microtubules, on mammalian cells cultured in vitro." *Cancer Res* 363: 905-916.
- de Calignon, A., Fox, L. M., Pitstick, R., Carlson, G. A., Bacskai, B. J., Spires-Jones, T. L. y Hyman, B. T.** 2010. "Caspase activation precedes and leads to tangles." *Nature* 4647292: 1201-1204.
- de Calignon, A., Spires-Jones, T. L., Pitstick, R., Carlson, G. A. y Hyman, B. T.** 2009. "Tangle-bearing neurons survive despite disruption of membrane integrity in a mouse model of tauopathy." *J Neuropathol Exp Neurol* 687: 757-761.
- DeGiorgio, L. A., Shimizu, Y., Chun, H. S., Cho, B. P., Sugama, S., Joh, T. H. y Volpe, B. T.** 2002. "APP knockout attenuates microglial activation and enhances neuron survival in substantia nigra compacta after axotomy." *Glia* 382: 174-178.
- Dehmelt, L. y Halpain, S.** 2005. "The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins." *Genome Biol* 61: 204.
- Demjen, D., Klussmann, S., Kleber, S., Zuliani, C., Stieltjes, B., Metzger, C., Hirt, U. A., Walczak, H., Falk, W., Essig, M., Edler, L., Krammer, P. H. y Martin-Villalba, A.** 2004. "Neutralization of CD95 ligand promotes regeneration and functional recovery after spinal cord injury." *Nat Med* 104: 389-395.
- Derijard, B., Hibi, M., Wu, I. H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M. y Davis, R. J.** 1994. "JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain." *Cell* 766: 1025-1037.
- Devred, F., Douillard, S., Briand, C. y Peyrot, V.** 2002. "First tau repeat domain binding to growing and taxol-stabilized microtubules, and serine 262 residue phosphorylation." *FEBS Lett* 5231-3: 247-251.
- Dhavan, R. y Tsai, L. H.** 2001. "A decade of CDK5." *Nat Rev Mol Cell Biol* 210: 749-759.

- Dickson, D. W., Lee, S. C., Mattiace, L. A., Yen, S. H. y Brosnan, C. 1993. "Microglia and cytokines in neurological disease, with special reference to AIDS and Alzheimer's disease." *Glia* 71: 75-83.
- Ding, H., Matthews, T. A. y Johnson, G. V. 2006. "Site-specific phosphorylation and caspase cleavage differentially impact tau-microtubule interactions and tau aggregation." *J Biol Chem* 28128: 19107-19114.
- Dixit, R., Ross, J. L., Goldman, Y. E. y Holzbaur, E. L. 2008. "Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau." *Science* 3195866: 1086-1089.
- Dorval, V. y Fraser, P. E. 2006. "Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of natively unfolded proteins tau and alpha-synuclein." *J Biol Chem* 28115: 9919-9924.
- Dotti, C. G., Banker, G. A. y 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* 231: 121-130.
- Drewes, G., Lichtenberg-Kraag, B., Doring, F., Mandelkow, E. M., Biernat, J., Goris, J., Doree, M. y Mandelkow, E. 1992. "Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state." *EMBO J* 116: 2131-2138.
- Dubey, M., Chaudhury, P., Kabiru, H. y Shea, T. B. 2008. "Tau inhibits anterograde axonal transport and perturbs stability in growing axonal neurites in part by displacing kinesin cargo: neurofilaments attenuate tau-mediated neurite instability." *Cell Motil Cytoskeleton* 652: 89-99.
- Ebner, A., Godemann, R., Stamer, K., Illenberger, S., Trinczek, B. y Mandelkow, E. 1998. "Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease." *J Cell Biol* 1433: 777-794.
- Eidenmuller, J., Fath, T., Hellwig, A., Reed, J., Sontag, E. y Brandt, R. 2000. "Structural and functional implications of tau hyperphosphorylation: information from phosphorylation-mimicking mutated tau proteins." *Biochemistry* 3943: 13166-13175.
- Eikelenboom, P., van Exel, E., Hoozemans, J. J., Veerhuis, R., Rozemuller, A. J. y van Gool, W. A. 2010. "Neuroinflammation - an early event in both the history and pathogenesis of Alzheimer's disease." *Neurodegener Dis* 71-3: 38-41.
- Ekinci, F. J. y Shea, T. B. 2000. "Phosphorylation of tau alters its association with the plasma membrane." *Cell Mol Neurobiol* 204: 497-508.
- Encinas, M., Iglesias, M., Liu, Y., Wang, H., Muhaisen, A., Cena, V., Gallego, C. y Comella, J. X. 2000. "Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells." *J Neurochem* 753: 991-1003.
- Faire, K., Waterman-Storer, C. M., Gruber, D., Masson, D., Salmon, E. D. y Bulinski, J. C. 1999. "E-MAP-115 (ensconsin) associates dynamically with microtubules in vivo and is not a physiological modulator of microtubule dynamics." *J Cell Sci* 112 (Pt 23): 4243-4255.
- Fasulo, L., Ugolini, G., Visintin, M., Bradbury, A., Brancolini, C., Verzillo, V., Novak, M. y Cattaneo, A. 2000. "The neuronal microtubule-associated protein tau is a substrate for caspase-3 and an effector of apoptosis." *J Neurochem* 752: 624-633.
- Fath, T., Eidenmuller, J. y Brandt, R. 2002. "Tau-mediated cytotoxicity in a pseudohyperphosphorylation model of Alzheimer's disease." *J Neurosci* 2222: 9733-9741.

Favata, M. F., Horiuchi, K. Y., Manos, E. J., Daulerio, A. J., Stradley, D. A., Feeser, W. S., Van Dyk, D. E., Pitts, W. J., Earl, R. A., Hobbs, F., Copeland, R. A., Magolda, R. L., Scherle, P. A. y Trzaskos, J. M. 1998. "Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase." *J Biol Chem* 27329: 18623-18632.

Feijoo, C., Campbell, D. G., Jakes, R., Goedert, M. y Cuenda, A. 2005. "Evidence that phosphorylation of the microtubule-associated protein Tau by SAPK4/p38delta at Thr50 promotes microtubule assembly." *J Cell Sci* 118Pt 2: 397-408.

Ferrer, I., Blanco, R., Carmona, M., Ribera, R., Goutan, E., Puig, B., Rey, M. J., Cardozo, A., Viñals, F. y Ribalta, T. 2001. "Phosphorylated map kinase (ERK1, ERK2) expression is associated with early tau deposition in neurones and glial cells, but not with increased nuclear DNA vulnerability and cell death, in Alzheimer disease, Pick's disease, progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration." *Brain Pathology* 112: 144-158.

Filipek, A., Schneider, G., Mieltska, A., Figiel, I. y Niewiadomska, G. 2008. "Age-dependent changes in neuronal distribution of CacyBP/SIP: comparison to tubulin and the tau protein." *J Neural Transm* 1159: 1257-1264.

Fojo, A.T. 2009. "The Role of Microtubules in Cell Biology, Neurobiology, and Oncology", *Humana Press*.

Gallo, G. y Lanier, L.M. 2010. "Neurobiology of Actin: From Neurulation to Synaptic Function", *Springer*.

Gamblin, T. C., Chen, F., Zambrano, A., Abraha, A., Lagalwar, S., Guillozet, A. L., Lu, M., Fu, Y., Garcia-Sierra, F., LaPointe, N., Miller, R., Berry, R. W., Binder, L. I. y Cryns, V. L. 2003. "Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 10017: 10032-10037.

Gao, M., Labuda, T., Xia, Y., Gallagher, E., Fang, D., Liu, Y. C. y Karin, M. 2004. "Jun turnover is controlled through JNK-dependent phosphorylation of the E3 ligase Itch." *Science* 3065694: 271-275.

Garcia-Sierra, F., Mondragon-Rodriguez, S. y Basurto-Islas, G. 2008. "Truncation of tau protein and its pathological significance in Alzheimer's disease." *J Alzheimers Dis* 144: 401-409.

Gartner, A., Nasmyth, K. y Ammerer, G. 1992. "Signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae* requires tyrosine and threonine phosphorylation of FUS3 and KSS1." *Genes Dev* 67: 1280-1292.

Gauthier-Kemper, A., Weissmann, C., Golovyashkina, N., Sebo-Lemke, Z., Drewes, G., Gerke, V., Heinisch, J. J. y Brandt, R. 2011. "The frontotemporal dementia mutation R406W blocks tau's interaction with the membrane in an annexin A2-dependent manner." *J Cell Biol* 1924: 647-661.

Gendron, T. F. y Petrucelli, L. 2009. "The role of tau in neurodegeneration." *Mol Neurodegener* 4: 13.

Gerrish, A., Russo, G., Richards, A., Moskvina, V., Ivanov, D., Harold, D., Sims, R., Abraham, R., Hollingworth, P., Chapman, J., Hamshere, M., Pahwa, J. S., Dowzell, K., Williams, A., Jones, N., Thomas, C., Stretton, A., Morgan, A. R., Lovestone, S., Powell, J., Proitsi, P., Lupton, M. K., Brayne, C., Rubinsztein, D. C., Gill, M., Lawlor, B., Lynch, A., Morgan, K., Brown, K. S., Passmore, P. A., Craig, D., McGuinness, B., Todd, S., Johnston, J. A., Holmes, C., Mann, D., Smith, A. D., Love, S., Kehoe, P. G., Hardy, J., Mead, S., Fox, N.,

Rossor, M., Collinge, J., Maier, W., Jessen, F., Kolsch, H., Heun, R., Schurmann, B., van den Bussche, H., Heuser, I., Kornhuber, J., Wiltfang, J., Dichgans, M., Frolich, L., Hampel, H., Hull, M., Rujescu, D., Goate, A. M., Kauwe, J. S., Cruchaga, C., Nowotny, P., Morris, J. C., Mayo, K., Livingston, G., Bass, N. J., Gurling, H., McQuillin, A., Gwilliam, R., Deloukas, P., Davies, G., Harris, S. E., Starr, J. M., Deary, I. J., Al-Chalabi, A., Shaw, C. E., Tsolaki, M., Singleton, A. B., Guerreiro, R., Muhleisen, T. W., Nothen, M. M., Moebus, S., Jockel, K. H., Klopp, N., Wichmann, H. E., Carrasquillo, M. M., Pankratz, V. S., Younkin, S. G., Jones, L., Holmans, P. A., O'Donovan, M. C., Owen, M. J. y Williams, J. 2012. "The role of variation at AbetaPP, PSEN1, PSEN2, and MAPT in late onset Alzheimer's disease." *J Alzheimers Dis* 282: 377-387.

Ghosh, S., Wu, M. D., Shaftel, S. S., Kyrkanides, S., LaFerla, F. M., Olschowka, J. A. y O'Banion, M. K. 2013. "Sustained interleukin-1beta overexpression exacerbates tau pathology despite reduced amyloid burden in an Alzheimer's mouse model." *J Neurosci* 3311: 5053-5064.

Ghoshal, N., Garcia-Sierra, F., Wu, J., Leurgans, S., Bennett, D. A., Berry, R. W. y Binder, L. I. 2002. "Tau conformational changes correspond to impairments of episodic memory in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease." *Exp Neurol* 1772: 475-493.

Giulian, D. 1993. "Reactive glia as rivals in regulating neuronal survival." *Glia* 71: 102-110.

Glenner, G. G. y Wong, C. W. 1984. "Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein." *Biochem Biophys Res Commun* 1223: 1131-1135.

Godbey, W. T., Wu, K. K. y Mikos, A. G. 1999. "Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery." *J Control Release* 602-3: 149-160.

Godemann, R., Biernat, J., Mandelkow, E. y Mandelkow, E. M. 1999. "Phosphorylation of tau protein by recombinant GSK-3beta: pronounced phosphorylation at select Ser/Thr-Pro motifs but no phosphorylation at Ser262 in the repeat domain." *FEBS Lett* 4541-2: 157-164.

Goedert, M., Cuenda, A., Craxton, M., Jakes, R. y Cohen, P. 1997b. "Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases." *EMBO J* 1612: 3563-3571.

Goedert, M., Hasegawa, M., Jakes, R., Lawler, S., Cuenda, A. y Cohen, P. 1997a. "Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases." *FEBS Lett* 4091: 57-62.

Goedert, M., Spillantini, M. G. y Crowther, R. A. 1992. "Cloning of a big tau microtubule-associated protein characteristic of the peripheral nervous system." *Proc Natl Acad Sci U S A* 895: 1983-1987.

Goedert, M., Spillantini, M. G., Jakes, R., Rutherford, D. y Crowther, R. A. 1989b. "Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease." *Neuron* 34: 519-526.

Goedert, M., Spillantini, M. G., Potier, M. C., Ulrich, J. y Crowther, R. A. 1989a. "Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain." *EMBO J* 82: 393-399.

- Goldgaber, D., Harris, H. W., Hla, T., Maciag, T., Donnelly, R. J., Jacobsen, J. S., Vitek, M. P. y Gajdusek, D. C. 1989. "Interleukin 1 regulates synthesis of amyloid beta-protein precursor mRNA in human endothelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 8619: 7606-7610.
- Gomez-Ramos, A., Diaz-Hernandez, M., Cuadros, R., Hernandez, F. y Avila, J. 2006. "Extracellular tau is toxic to neuronal cells." *FEBS Lett* 58020: 4842-4850.
- Gomez-Ramos, A., Diaz-Hernandez, M., Rubio, A., Diaz-Hernandez, J. I., Miras-Portugal, M. T. y Avila, J. 2009. "Characteristics and consequences of muscarinic receptor activation by tau protein." *Eur Neuropsychopharmacol* 1910: 708-717.
- Gomez-Ramos, A., Diaz-Hernandez, M., Rubio, A., Miras-Portugal, M. T. y Avila, J. 2008. "Extracellular tau promotes intracellular calcium increase through M1 and M3 muscarinic receptors in neuronal cells." *Mol Cell Neurosci* 374: 673-681.
- Gong, C. X., Liu, F., Grundke-Iqbal, I. y Iqbal, K. 2005. "Post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease." *J Neural Transm* 1126: 813-838.
- Goode, B. L., Denis, P. E., Panda, D., Radeke, M. J., Miller, H. P., Wilson, L. y Feinstein, S. C. 1997. "Functional interactions between the proline-rich and repeat regions of tau enhance microtubule binding and assembly." *Mol Biol Cell* 82: 353-365.
- Gordon-Weeks, P. R. y Fischer, I. 2000. "MAP1B expression and microtubule stability in growing and regenerating axons." *Microsc Res Tech* 482: 63-74.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. y Nairn, R. 1977. "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." *J Gen Virol* 361: 59-74.
- Graham, R. K., Ehrnhoefer, D. E. y Hayden, M. R. 2011. "Caspase-6 and neurodegeneration." *Trends Neurosci* 3412: 646-656.
- Greene, L. A. y Tischler, A. S. 1976. "Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 737: 2424-2428.
- Griffith, L. M. y Pollard, T. D. 1978. "Evidence for actin filament-microtubule interaction mediated by microtubule-associated proteins." *J Cell Biol* 783: 958-965.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M. y Binder, L. I. 1986. "Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology." *Proc Natl Acad Sci U S A* 8313: 4913-4917.
- Gu, Y., Oyama, F. y Ihara, Y. 1996. "Tau is widely expressed in rat tissues." *J Neurochem* 673: 1235-1244.
- Guan, K. L. y Dixon, J. E. 1991. "Eukaryotic proteins expressed in Escherichia coli: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase." *Anal Biochem* 1922: 262-267.
- Guillozet-Bongaarts, A. L., Cahill, M. E., Cryns, V. L., Reynolds, M. R., Berry, R. W. y Binder, L. I. 2006. "Pseudophosphorylation of tau at serine 422 inhibits caspase cleavage: in vitro evidence and implications for tangle formation in vivo." *J Neurochem* 974: 1005-1014.
- Guo, H., Albrecht, S., Bourdeau, M., Petzke, T., Bergeron, C. y LeBlanc, A. C. 2004. "Active caspase-6 and caspase-6-cleaved tau in neuropil threads, neuritic plaques, and neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease." *Am J Pathol* 1652: 523-531.
- Gustke, N., Trinczek, B., Biernat, J., Mandelkow, E. M. y Mandelkow, E. 1994. "Domains of tau protein and interactions with microtubules." *Biochemistry* 3332: 9511-9522.

Haeusgen, W., Boehm, R., Zhao, Y., Herdegen, T. y Waetzig, V. 2009. "Specific activities of individual c-Jun N-terminal kinases in the brain." *Neuroscience* 1614: 951-959.

Halpain, S. y Dehmelt, L. 2006. "The MAP1 family of microtubule-associated proteins." *Genome Biol* 76: 224.

Hanger, D. P., Anderton, B. H. y Noble, W. 2009. "Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease." *Trends Mol Med* 153: 112-119.

Hanger, D. P., Betts, J. C., Loviny, T. L., Blackstock, W. P. y Anderton, B. H. 1998. "New phosphorylation sites identified in hyperphosphorylated tau (paired helical filament-tau) from Alzheimer's disease brain using nanoelectrospray mass spectrometry." *J Neurochem* 716: 2465-2476.

Hanger, D. P., Lau, D. H., Phillips, E. C., Bondulich, M. K., Guo, T., Woodward, B. W., Pooler, A. M. y Noble, W. 2014. "Intracellular and extracellular roles for tau in neurodegenerative disease." *J Alzheimers Dis* 400: S37-45.

Hanisch, U. K. 2002. "Microglia as a source and target of cytokines." *Glia* 402: 140-155.

Haque, N., Tanaka, T., Iqbal, K. y Grundke-Iqbal, I. 1999. "Regulation of expression, phosphorylation and biological activity of tau during differentiation in SY5Y cells." *Brain Res* 8381-2: 69-77.

Hardy, J. y Selkoe, D. J. 2002. "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics." *Science* 2975580: 353-356.

Hasegawa, M., Jakes, R., Crowther, R. A., Lee, V. M., Ihara, Y. y Goedert, M. 1996. "Characterization of mAb AP422, a novel phosphorylation-dependent monoclonal antibody against tau protein." *FEBS Lett* 3841: 25-30.

Hass, R., Bartels, H., Topley, N., Hadam, M., Kohler, L., Goppelt-Strube, M. y Resch, K. 1989. "TPA-induced differentiation and adhesion of U937 cells: changes in ultrastructure, cytoskeletal organization and expression of cell surface antigens." *Eur J Cell Biol* 482: 282-293.

He, H. J., Wang, X. S., Pan, R., Wang, D. L., Liu, M. N. y He, R. Q. 2009. "The proline-rich domain of tau plays a role in interactions with actin." *BMC Cell Biol* 10: 81.

Heneka, M. T., Carson, M. J., Khoury, J. E., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., Petzold, G. C., Town, T., Morgan, D., Shinohara, M. L., Perry, V. H., Holmes, C., Bazan, N. G., Brooks, D. J., Hunot, S., Joseph, B., Deigendesch, N., Garaschuk, O., Boddeke, E., Dinarello, C. A., Breitner, J. C., Cole, G. M., Golenbock, D. T. y Kummer, M. P. 2015. "Neuroinflammation in Alzheimer's disease." *Lancet Neurol* 144: 388-405.

Heneka, M. T., Rodriguez, J. J. y Verkhratsky, A. 2010. "Neuroglia in neurodegeneration." *Brain Res Rev* 631-2: 189-211.

Heneka, M. T., Sastre, M., Dumitrescu-Ozimek, L., Dewachter, I., Walter, J., Klockgether, T. y Van Leuven, F. 2005. "Focal glial activation coincides with increased BACE1 activation and precedes amyloid plaque deposition in APP[V717I] transgenic mice." *J Neuroinflammation* 2: 22.

Hensley, K. 2010. "Neuroinflammation in Alzheimer's disease: mechanisms, pathologic consequences, and potential for therapeutic manipulation." *J Alzheimers Dis* 211: 1-14.

- Herrmann, H. y Aebi, U.** 2004. "Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds." *Annu Rev Biochem* 73: 749-789.
- Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A. y Karin, M.** 1993. "Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain." *Genes Dev* 711: 2135-2148.
- Hirokawa, N., Shiomura, Y. y Okabe, S.** 1988. "Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules." *J Cell Biol* 1074: 1449-1459.
- Hoebeke, J., Van Nijen, G. y De Brabander, M.** 1976. "Interaction of oncodazole (R 17934), a new antitumoral drug, with rat brain tubulin." *Biochem Biophys Res Commun* 692: 319-324.
- Holtzman, D. M., Morris, J. C. y Goate, A. M.** 2011. "Alzheimer's disease: the challenge of the second century." *Sci Transl Med* 377: 77sr71.
- Hollenbeck, P. J. y Saxton, W. M.** 2005. "The axonal transport of mitochondria." *J Cell Sci* 118Pt 23: 5411-5419.
- Horiguchi, T., Uryu, K., Giasson, B. I., Ischiropoulos, H., LightFoot, R., Bellmann, C., Richter-Landsberg, C., Lee, V. M. y Trojanowski, J. Q.** 2003. "Nitration of tau protein is linked to neurodegeneration in tauopathies." *Am J Pathol* 1633: 1021-1031.
- Horowitz, P. M., Patterson, K. R., Guillozet-Bongaarts, A. L., Reynolds, M. R., Carroll, C. A., Weintraub, S. T., Bennett, D. A., Cryns, V. L., Berry, R. W. y Binder, L. I.** 2004. "Early N-terminal changes and caspase-6 cleavage of tau in Alzheimer's disease." *J Neurosci* 2436: 7895-7902.
- Houser, C. R., Huang, C. S. y Peng, Z.** 2008. "Dynamic seizure-related changes in extracellular signal-regulated kinase activation in a mouse model of temporal lobe epilepsy." *Neuroscience* 1561: 222-237.
- Hua, Q. y He, R. Q.** 2002. "Effect of phosphorylation and aggregation on tau binding to DNA." *Protein Pept Lett* 94: 349-357.
- Hua, Q. y He, R. Q.** 2003. "Tau could protect DNA double helix structure." *Biochim Biophys Acta* 16452: 205-211.
- Huang, C., Jacobson, K. y Schaller, M. D.** 2004. "A role for JNK-paxillin signaling in cell migration." *Cell Cycle* 31: 4-6.
- Huang, Y. y Mucke, L.** 2012. "Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies." *Cell* 1486: 1204-1222.
- Hunter, T.** 2007. "The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond." *Mol Cell* 285: 730-738.
- Igaev, M., Janning, D., Sundermann, F., Niewidok, B., Brandt, R. y Junge, W.** 2014. "A refined reaction-diffusion model of tau-microtubule dynamics and its application in FDAP analysis." *Biophys J* 10711: 2567-2578.
- Ihara, Y., Nukina, N., Miura, R. y Ogawara, M.** 1986. "Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease." *J Biochem* 996: 1807-1810.
- Illenberger, S., Zheng-Fischhofer, Q., Preuss, U., Stamer, K., Baumann, K., Trinczek, B., Biernat, J., Godemann, R., Mandelkow, E. M. y Mandelkow, E.** 1998. "The endogenous and

cell cycle-dependent phosphorylation of tau protein in living cells: implications for Alzheimer's disease." *Mol Biol Cell* 96: 1495-1512.

Inesta-Vaquera, F. A., Centeno, F., del Reino, P., Sabio, G., Peggie, M. y Cuenda, A. 2009. "Proteolysis of the tumour suppressor hDlg in response to osmotic stress is mediated by caspases and independent of phosphorylation." *FEBS J* 2762: 387-400.

Inoue, S., Browne, G., Melino, G. y Cohen, G. M. 2009. "Ordering of caspases in cells undergoing apoptosis by the intrinsic pathway." *Cell Death Differ* 167: 1053-1061.

Iosif, R. E., Ekdahl, C. T., Ahlenius, H., Pronk, C. J., Bonde, S., Kokaia, Z., Jacobsen, S. E. y Lindvall, O. 2006. "Tumor necrosis factor receptor 1 is a negative regulator of progenitor proliferation in adult hippocampal neurogenesis." *J Neurosci* 2638: 9703-9712.

Iqbal, K. y Grundke-Iqbal, I. 2005. "Metabolic/signal transduction hypothesis of Alzheimer's disease and other tauopathies." *Acta Neuropathol* 1091: 25-31.

Iqbal, K. y Grundke-Iqbal, I. 2008. "Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention." *J Cell Mol Med* 121: 38-55.

Iqbal, K., Liu, F., Gong, C. X. y Grundke-Iqbal, I. 2010. "Tau in Alzheimer disease and related tauopathies." *Curr Alzheimer Res* 78: 656-664.

Irvine, G. B., El-Agnaf, O. M., Shankar, G. M. y Walsh, D. M. 2008. "Protein aggregation in the brain: the molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's diseases." *Mol Med* 147-8: 451-464.

Ishiguro, K., Shiratsuchi, A., Sato, S., Omori, A., Arioka, M., Kobayashi, S., Uchida, T. y Imahori, K. 1993. "Glycogen synthase kinase 3 beta is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments." *FEBS Lett* 3253: 167-172.

Jacobsen, J. S., Wu, C. C., Redwine, J. M., Comery, T. A., Arias, R., Bowlby, M., Martone, R., Morrison, J. H., Pangalos, M. N., Reinhart, P. H. y Bloom, F. E. 2006. "Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 10313: 5161-5166.

Jalava, A., Heikkila, J., Lintunen, M., Akerman, K. y Pahlman, S. 1992. "Staurosporine induces a neuronal phenotype in SH-SY5Y human neuroblastoma cells that resembles that induced by the phorbol ester 12-O-tetradecanoyl phorbol-13 acetate (TPA)." *FEBS Lett* 3002: 114-118.

Jalava, A. M., Heikkila, J., Akerlind, G., Pettit, G. R. y Akerman, K. E. 1990. "Effects of bryostatins 1 and 2 on morphological and functional differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells." *Cancer Res* 5011: 3422-3428.

Jamsa, A., Hasslund, K., Cowburn, R. F., Backstrom, A. y Vasange, M. 2004. "The retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor differentiated SH-SY5Y cell line as a model for Alzheimer's disease-like tau phosphorylation." *Biochem Biophys Res Commun* 3193: 993-1000.

Janelins, M. C., Mastrangelo, M. A., Park, K. M., Sudol, K. L., Narrow, W. C., Oddo, S., LaFerla, F. M., Callahan, L. M., Federoff, H. J. y Bowers, W. J. 2008. "Chronic neuron-specific tumor necrosis factor-alpha expression enhances the local inflammatory environment ultimately leading to neuronal death in 3xTg-AD mice." *Am J Pathol* 1736: 1768-1782.

Jaworski, J., Hoogenraad, C. C. y Akhmanova, A. 2008. "Microtubule plus-end tracking proteins in differentiated mammalian cells." *Int J Biochem Cell Biol* 404: 619-637.

Jenkins, S. M., Zinnerman, M., Garner, C. y Johnson, G. V. 2000. "Modulation of tau phosphorylation and intracellular localization by cellular stress." *Biochem J* 345 Pt 2: 263-270.

- Jensen, L. M.** 1987. "Phenotypic differentiation of aphidicolin-selected human neuroblastoma cultures after long-term exposure to nerve growth factor." *Dev Biol* 1201: 56-64.
- Johnson, G. V. y Stoothoff, W. H.** 2004. "Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction." *J Cell Sci* 117Pt 24: 5721-5729.
- Kaczmarek, A., Vandenabeele, P. y Krysko, D. V.** 2013. "Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance." *Immunity* 382: 209-223.
- Kaminska, B.** 2005. "MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits." *Biochim Biophys Acta* 17541-2: 253-262.
- 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* 142: 421-432.
- Kannan, Y., Bienenstock, J., Ohta, M., Stanisiz, A. M. y Stead, R. H.** 1996. "Nerve growth factor and cytokines mediate lymphoid tissue-induced neurite outgrowth from mouse superior cervical ganglia in vitro." *J Immunol* 1571: 313-320.
- Kearney, C. J., Cullen, S. P., Tynan, G. A., Henry, C. M., Clancy, D., Lavelle, E. C. y Martin, S. J.** 2015. "Necroptosis suppresses inflammation via termination of TNF- or LPS-induced cytokine and chemokine production." *Cell Death Differ*.
- Khan, A. R. y James, M. N.** 1998. "Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes." *Protein Sci* 74: 815-836.
- Kim, E. K. y Choi, E. J.** 2010. "Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases." *Biochim Biophys Acta* 18024: 396-405.
- Kim, I., Park, E. J., Seo, J., Ko, S. J., Lee, J. y Kim, C. H.** 2011. "Zinc stimulates tau S214 phosphorylation by the activation of Raf/mitogen-activated protein kinase-kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway." *Neuroreport* 2216: 839-844.
- Kitazawa, M., Oddo, S., Yamasaki, T. R., Green, K. N. y LaFerla, F. M.** 2005. "Lipopolysaccharide-induced inflammation exacerbates tau pathology by a cyclin-dependent kinase 5-mediated pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease." *J Neurosci* 2539: 8843-8853.
- Knobloch, M. y Mansuy, I. M.** 2008. "Dendritic spine loss and synaptic alterations in Alzheimer's disease." *Mol Neurobiol* 371: 73-82.
- Kolarova, M., Garcia-Sierra, F., Bartos, A., Ricny, J. y Ripova, D.** 2012. "Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease." *Int J Alzheimers Dis* 2012: 731526.
- Kopeikina, Katherine J., Carlson, George A., Pitstick, Rose, Ludvigson, Adam E., Peters, Alan, Luebke, Jennifer I., Koffie, Robert M., Frosch, Matthew P., Hyman, Bradley T. y Spires-Jones, Tara L.** 2011. "Tau Accumulation Causes Mitochondrial Distribution Deficits in Neurons in a Mouse Model of Tauopathy and in Human Alzheimer's Disease Brain." *Am J Pathol* 1794: 2071-2082.
- Kosik, K. S., Orecchio, L. D., Bakalis, S. y Neve, R. L.** 1989. "Developmentally regulated expression of specific tau sequences." *Neuron* 24: 1389-1397.
- Kovac, A., Zilka, N., Kazmerova, Z., Cente, M., Zilkova, M. y Novak, M.** 2011. "Misfolded truncated protein tau induces innate immune response via MAPK pathway." *J Immunol* 1875: 2732-2739.

- Kovac, A., Zilkova, M., Deli, M. A., Zilka, N. y Novak, M.** 2009. "Human truncated tau is using a different mechanism from amyloid-beta to damage the blood-brain barrier." *J Alzheimers Dis* 184: 897-906.
- Kuma, Y., Sabio, G., Bain, J., Shpiro, N., Marquez, R. y Cuenda, A.** 2005. "BIRB796 inhibits all p38 MAPK isoforms in vitro and in vivo." *J Biol Chem* 28020: 19472-19479.
- Kumar, S., McDonnell, P. C., Gum, R. J., Hand, A. T., Lee, J. C. y Young, P. R.** 1997. "Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles." *Biochem Biophys Res Commun* 2353: 533-538.
- Kyriakis, J. M. y Avruch, J.** 1990. "pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine." *J Biol Chem* 26528: 17355-17363.
- Kyriakis, J. M. y Avruch, J.** 2001. "Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation." *Physiol Rev* 812: 807-869.
- Laemmli, U. K.** 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 2275259: 680-685.
- Lapointe, N. E., Horowitz, P. M., Guillozet-Bongaarts, A. L., Silva, A., Andreadis, A. y Binder, L. I.** 2009. "Tau 6D and 6P isoforms inhibit polymerization of full-length tau in vitro." *Biochemistry* 4851: 12290-12297.
- Lassmann, H., Fischer, P. y Jellinger, K.** 1993. "Synaptic pathology of Alzheimer's disease." *Ann N Y Acad Sci* 695: 59-64.
- LeBlanc, A. C.** 2013. "Caspase-6 as a novel early target in the treatment of Alzheimer's disease." *Eur J Neurosci* 3712: 2005-2018.
- Ledesma, M. D., Bonay, P., Colaco, C. y Avila, J.** 1994. "Analysis of microtubule-associated protein tau glycation in paired helical filaments." *J Biol Chem* 26934: 21614-21619.
- Lee, D. C., Rizer, J., Selenica, M. L., Reid, P., Kraft, C., Johnson, A., Blair, L., Gordon, M. N., Dickey, C. A. y Morgan, D.** 2010. "LPS-induced inflammation exacerbates phospho-tau pathology in rTg4510 mice." *J Neuroinflammation* 7: 56.
- Lee, G., Cowan, N. y Kirschner, M.** 1988. "The primary structure and heterogeneity of tau protein from mouse brain." *Science* 2394837: 285-288.
- Lee, G. y Leugers, C. J.** 2012. "Tau and tauopathies." *Prog Mol Biol Transl Sci* 107: 263-293.
- Lee, G., Thangavel, R., Sharma, V. M., Litersky, J. M., Bhaskar, K., Fang, S. M., Do, L. H., Andreadis, A., Van Hoesen, G. y Ksiezak-Reding, H.** 2004. "Phosphorylation of tau by fyn: implications for Alzheimer's disease." *J Neurosci* 249: 2304-2312.
- Lee, J. C., Laydon, J. T., McDonnell, P. C., Gallagher, T. F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M. J., Heys, J. R., Landvatter, S. W. y et al.** 1994. "A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis." *Nature* 3726508: 739-746.
- Lee, M., McGeer, E. y McGeer, P. L.** 2015. "Activated human microglia stimulate neuroblastoma cells to upregulate production of beta amyloid protein and tau: implications for Alzheimer's disease pathogenesis." *Neurobiol Aging* 361: 42-52.
- Lee, V. M., Carden, M. J., Schlaepfer, W. W. y Trojanowski, J. Q.** 1987. "Monoclonal antibodies distinguish several differentially phosphorylated states of the two largest rat

neurofilament subunits (NF-H and NF-M) and demonstrate their existence in the normal nervous system of adult rats." *J Neurosci* 711: 3474-3488.

Lee, V. M., Goedert, M. y Trojanowski, J. Q. 2001. "Neurodegenerative tauopathies." *Annu Rev Neurosci* 24: 1121-1159.

Leger, J., Kempf, M., Lee, G. y Brandt, R. 1997. "Conversion of serine to aspartate imitates phosphorylation-induced changes in the structure and function of microtubule-associated protein tau." *J Biol Chem* 27213: 8441-8446.

Leugers, C. J. y Lee, G. 2010. "Tau potentiates nerve growth factor-induced mitogen-activated protein kinase signaling and neurite initiation without a requirement for microtubule binding." *J Biol Chem* 28525: 19125-19134.

Li, Y., Liu, L., Barger, S. W. y Griffin, W. S. 2003. "Interleukin-1 mediates pathological effects of microglia on tau phosphorylation and on synaptophysin synthesis in cortical neurons through a p38-MAPK pathway." *J Neurosci* 235: 1605-1611.

Liao, Y. F., Wang, B. J., Cheng, H. T., Kuo, L. H. y Wolfe, M. S. 2004. "Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and interferon-gamma stimulate gamma-secretase-mediated cleavage of amyloid precursor protein through a JNK-dependent MAPK pathway." *J Biol Chem* 27947: 49523-49532.

Libioulle, C., Llabres, G. y Gilles, R. 1996. "Protein patterns, osmolytes, and aldose reductase of L-929 cells exposed to hyperosmotic media." *J Cell Physiol* 1681: 147-154.

Liu, M. C., Kobeissy, F., Zheng, W., Zhang, Z., Hayes, R. L. y Wang, K. K. 2011. "Dual vulnerability of tau to calpains and caspase-3 proteolysis under neurotoxic and neurodegenerative conditions." *ASN Neuro* 31: e00051.

Liu, S., Wang, X., Li, Y., Xu, L., Yu, X., Ge, L., Li, J., Zhu, Y. y He, S. 2014. "Necroptosis mediates TNF-induced toxicity of hippocampal neurons." *Biomed Res Int* 2014: 290182.

Liu, T., Clark, R. K., McDonnell, P. C., Young, P. R., White, R. F., Barone, F. C. y Feuerstein, G. Z. 1994. "Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons." *Stroke* 257: 1481-1488.

Loomis, P. A., Howard, T. H., Castleberry, R. P. y Binder, L. I. 1990. "Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 8721: 8422-8426.

LoPresti, P., Poluha, W., Poluha, D. K., Drinkwater, E. y Ross, A. H. 1992. "Neuronal differentiation triggered by blocking cell proliferation." *Cell Growth Differ* 39: 627-635.

LoPresti, P., Szuchet, S., Papasozomenos, S. C., Zinkowski, R. P. y Binder, L. I. 1995. "Functional implications for the microtubule-associated protein tau: localization in oligodendrocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 9222: 10369-10373.

Lu, J., Miao, J., Su, T., Liu, Y. y He, R. 2013b. "Formaldehyde induces hyperphosphorylation and polymerization of Tau protein both in vitro and in vivo." *Biochim Biophys Acta* 18308: 4102-4116.

Lu, X., Li, C., Wang, Y. K., Jiang, K. y Gai, X. D. 2014. "Sorbitol induces apoptosis of human colorectal cancer cells via p38 MAPK signal transduction." *Oncol Lett* 76: 1992-1996.

Lu, Y., He, H. J., Zhou, J., Miao, J. Y., Lu, J., He, Y. G., Pan, R., Wei, Y., Liu, Y. y He, R. Q. 2013a. "Hyperphosphorylation results in tau dysfunction in DNA folding and protection." *J Alzheimers Dis* 373: 551-563.

Maas, T., Eidenmuller, J. y Brandt, R. 2000. "Interaction of tau with the neural membrane cortex is regulated by phosphorylation at sites that are modified in paired helical filaments." *J Biol Chem* 27521: 15733-15740.

Maccioni, R. B., Farias, G., Morales, I. y Navarrete, L. 2010. "The revitalized tau hypothesis on Alzheimer's disease." *Arch Med Res* 413: 226-231.

Maccioni, R. B., Munoz, J. P. y Barbeito, L. 2001. "The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders." *Arch Med Res* 325: 367-381.

Maeda, S., Sahara, N., Saito, Y., Murayama, M., Yoshiike, Y., Kim, H., Miyasaka, T., Murayama, S., Ikai, A. y Takashima, A. 2007. "Granular tau oligomers as intermediates of tau filaments." *Biochemistry* 4612: 3856-3861.

Mandal, C., Dutta, A., Mallick, A., Chandra, S., Misra, L. y Sangwan, R. S. 2008. "Withaferin A induces apoptosis by activating p38 mitogen-activated protein kinase signaling cascade in leukemic cells of lymphoid and myeloid origin through mitochondrial death cascade." *Apoptosis* 1312: 1450-1464.

Mandelkow, E. M. y Mandelkow, E. 2012. "Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration." *Cold Spring Harb Perspect Med* 27: a006247.

Mandell, J. W. y Banker, G. A. 1996. "Microtubule-associated proteins, phosphorylation gradients, and the establishment of neuronal polarity." *Perspect Dev Neurobiol* 42-3: 125-135.

Maphis, N., Xu, G., Kokiko-Cochran, O. N., Cardona, A. E., Ransohoff, R. M., Lamb, B. T. y Bhaskar, K. 2015. "Loss of tau rescues inflammation-mediated neurodegeneration." *Front Neurosci* 9: 196.

Marfe, G., Morgante, E., Di Stefano, C., Di Renzo, L., De Martino, L., Iovane, G., Russo, M. A. y Sinibaldi-Salimei, P. 2008. "Sorbitol-induced apoptosis of human leukemia is mediated by caspase activation and cytochrome c release." *Arch Toxicol* 826: 371-377.

Marshall, C. J. 1995. "Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation." *Cell* 802: 179-185.

Martin, L., Latypova, X. y Terro, F. 2011. "Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease." *Neurochem Int* 584: 458-471.

Marx, C. E., Jarskog, L. F., Lauder, J. M., Lieberman, J. A. y Gilmore, J. H. 2001. "Cytokine effects on cortical neuron MAP-2 immunoreactivity: implications for schizophrenia." *Biol Psychiatry* 5010: 743-749.

Matenia, D. y Mandelkow, E. M. 2009. "The tau of MARK: a polarized view of the cytoskeleton." *Trends Biochem Sci* 347: 332-342.

McCoy, M. K., Ruhn, K. A., Blesch, A. y Tansey, M. G. 2011. "TNF: a key neuroinflammatory mediator of neurotoxicity and neurodegeneration in models of Parkinson's disease." *Adv Exp Med Biol* 691: 539-540.

McGeer, P. L. y McGeer, E. G. 1995. "The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases." *Brain Res Brain Res Rev* 212: 195-218.

McGeer, P. L. y McGeer, E. G. 2002. "Innate immunity, local inflammation, and degenerative disease." *Sci Aging Knowledge Environ* 200229: re3.

- Meda, L., Baron, P., Prat, E., Scarpini, E., Scarlato, G., Cassatella, M. A. y Rossi, F. 1999. "Proinflammatory profile of cytokine production by human monocytes and murine microglia stimulated with beta-amyloid[25-35]." *J Neuroimmunol* 931-2: 45-52.
- Medina, M. y Avila, J. 2014. "The role of extracellular Tau in the spreading of neurofibrillary pathology." *Front Cell Neurosci* 8: 113.
- Meraz-Rios, M. A., Toral-Rios, D., Franco-Bocanegra, D., Villeda-Hernandez, J. y Campos-Pena, V. 2013. "Inflammatory process in Alzheimer's Disease." *Front Integr Neurosci* 7: 59.
- Metcalf, M. J. y Figueiredo-Pereira, M. E. 2010. "Relationship between tau pathology and neuroinflammation in Alzheimer's disease." *Mt Sinai J Med* 771: 50-58.
- Mietelska-Porowska, A., Wasik, U., Goras, M., Filipek, A. y Niewiadomska, G. 2014. "Tau protein modifications and interactions: their role in function and dysfunction." *Int J Mol Sci* 153: 4671-4713.
- Min, S. W., Cho, S. H., Zhou, Y., Schroeder, S., Haroutunian, V., Seeley, W. W., Huang, E. J., Shen, Y., Masliah, E., Mukherjee, C., Meyers, D., Cole, P. A., Ott, M. y Gan, L. 2010. "Acetylation of tau inhibits its degradation and contributes to tauopathy." *Neuron* 676: 953-966.
- Minafra, L., Di Cara, G., Albanese, N. N. y Cancemi, P. 2011. "Proteomic differentiation pattern in the U937 cell line." *Leuk Res* 352: 226-236.
- Mitchison, T. y Kirschner, M. 1984. "Dynamic instability of microtubule growth." *Nature* 3125991: 237-242.
- Miyasaka, T., Watanabe, A., Saito, Y., Murayama, S., Mann, D. M., Yamazaki, M., Ravid, R., Morishima-Kawashima, M., Nagashima, K. y Ihara, Y. 2005. "Visualization of newly deposited tau in neurofibrillary tangles and neuropil threads." *J Neuropathol Exp Neurol* 648: 665-674.
- Moe, James G., Chatterjee, Ishita, Davidowitz, Eliot J. y Arancio, Ottavio 2009. "Modulation of synaptic function by extracellular tau enriched in oligomers." *Alzheimer's & Dementia* 54, Supplement: P499.
- Monnier, P. P., D'Onofrio, P. M., Magharious, M., Hollander, A. C., Tassew, N., Szydłowska, K., Tymianski, M. y Koeberle, P. D. 2011. "Involvement of caspase-6 and caspase-8 in neuronal apoptosis and the regenerative failure of injured retinal ganglion cells." *J Neurosci* 3129: 10494-10505.
- Morales, I., Guzman-Martinez, L., Cerda-Troncoso, C., Farias, G. A. y Maccioni, R. B. 2014. "Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches." *Front Cell Neurosci* 8: 112.
- Morishima-Kawashima, M., Hasegawa, M., Takio, K., Suzuki, M., Yoshida, H., Watanabe, A., Titani, K. y Ihara, Y. 1995. "Hyperphosphorylation of tau in PHF." *Neurobiol Aging* 163: 365-371; discussion 371-380.
- Morris, M., Maeda, S., Vossel, K. y Mucke, L. 2011. "The many faces of tau." *Neuron* 703: 410-426.
- Mosmann, T. 1983. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods* 651-2: 55-63.

- Mukrasch, M. D., Bibow, S., Korukottu, J., Jeganathan, S., Biernat, J., Griesinger, C., Mandelkow, E. y Zweckstetter, M. 2009. "Structural polymorphism of 441-residue tau at single residue resolution." *PLoS Biol* 72: e34.
- Nagao, S. I., Kumamoto, T., Masuda, T., Ueyama, H., Toyoshima, I. y Tsuda, T. 1999. "Tau expression in denervated rat muscles." *Muscle Nerve* 221: 61-70.
- Nelson, P. T., Stefansson, K., Gulcher, J. y Saper, C. B. 1996. "Molecular evolution of tau protein: implications for Alzheimer's disease." *J Neurochem* 674: 1622-1632.
- Neumann, H., Schweigreiter, R., Yamashita, T., Rosenkranz, K., Wekerle, H. y Barde, Y. A. 2002. "Tumor necrosis factor inhibits neurite outgrowth and branching of hippocampal neurons by a rho-dependent mechanism." *J Neurosci* 223: 854-862.
- Neve, R. L., Harris, P., Kosik, K. S., Kurnit, D. M. y Donlon, T. A. 1986. "Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2." *Brain Res* 3873: 271-280.
- Nishina, H., Nakagawa, K., Azuma, N. y Katada, T. 2003. "Activation mechanism and physiological roles of stress-activated protein kinase/c-Jun NH2-terminal kinase in mammalian cells." *J Biol Regul Homeost Agents* 174: 295-302.
- Niswander, J. M. y Dokas, L. A. 2006. "Phosphorylation of HSP27 and synthesis of 14-3-3epsilon are parallel responses to hyperosmotic stress in the hippocampus." *Brain Res* 11161: 19-30.
- Niswander, J. M. y Dokas, L. A. 2007. "Hyperosmotic stress-induced caspase-3 activation is mediated by p38 MAPK in the hippocampus." *Brain Res* 1186: 1-11.
- Noble, W., Hanger, D. P., Miller, C. C. y Lovestone, S. 2013. "The importance of tau phosphorylation for neurodegenerative diseases." *Front Neurol* 4: 83.
- Noel, A., Poitras, I., Julien, J., Petry, F. R., Morin, F., Charron, J. y Planel, E. 2014. "ERK (MAPK) does not phosphorylate tau under physiological conditions in vivo or in vitro." *Neurobiol Aging*.
- Nozaki, K., Nishimura, M. y Hashimoto, N. 2001. "Mitogen-activated protein kinases and cerebral ischemia." *Mol Neurobiol* 231: 1-19.
- Obregon, E., Punzon, M. C., Gonzalez-Nicolas, J., Fernandez-Cruz, E., Fresno, M. y Munoz-Fernandez, M. A. 1997. "Induction of adhesion/differentiation of human neuroblastoma cells by tumour necrosis factor-alpha requires the expression of an inducible nitric oxide synthase." *Eur J Neurosci* 96: 1184-1193.
- Ojala, J. O., Sutinen, E. M., Salminen, A. y Pirttila, T. 2008. "Interleukin-18 increases expression of kinases involved in tau phosphorylation in SH-SY5Y neuroblastoma cells." *J Neuroimmunol* 2051-2: 86-93.
- Olivera Santa-Catalina, M. 2012. "Regulación postraduccional de la proteína Tau en respuesta a estrés hiperosmótico." *Tesis Doctoral*.
- Onishi, Y., Tanimoto, Y. y Kizaki, H. 1997. "Inflammation and apoptosis." *Bull Tokyo Dent Coll* 382: 65-76.
- Overmyer, M., Helisalmi, S., Soininen, H., Laakso, M., Riekkinen, P., Sr. y Alafuzoff, I. 1999. "Reactive microglia in aging and dementia: an immunohistochemical study of postmortem human brain tissue." *Acta Neuropathol* 974: 383-392.

Pahlman, S., Hoehner, J. C., Nanberg, E., Hedborg, F., Fagerstrom, S., Gestblom, C., Johansson, I., Larsson, U., Lavenius, E., Ortoft, E. y et al. 1995. "Differentiation and survival influences of growth factors in human neuroblastoma." *Eur J Cancer* 31A4: 453-458.

Pahlman, S., Odelstad, L., Larsson, E., Grotte, G. y Nilsson, K. 1981. "Phenotypic changes of human neuroblastoma cells in culture induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate." *Int J Cancer* 285: 583-589.

Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K. y Cobb, M. H. 2001. "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." *Endocr Rev* 222: 153-183.

Pei, J. J., Braak, E., Braak, H., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Winblad, B. y Cowburn, R. F. 1999. "Distribution of active glycogen synthase kinase 3beta (GSK-3beta) in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes." *J Neuropathol Exp Neurol* 589: 1010-1019.

Pei, J. J., Braak, H., An, W. L., Winblad, B., Cowburn, R. F., Iqbal, K. y Grundke-Iqbal, I. 2002. "Up-regulation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and MEK1/2 is associated with the progression of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease." *Brain Res Mol Brain Res* 1091-2: 45-55.

Pei, J. J., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Bogdanovic, N., Winblad, B. y Cowburn, R. F. 1998. "Accumulation of cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) in neurons with early stages of Alzheimer's disease neurofibrillary degeneration." *Brain Res* 7972: 267-277.

Pereira, N. A. y Song, Z. 2008. "Some commonly used caspase substrates and inhibitors lack the specificity required to monitor individual caspase activity." *Biochem Biophys Res Commun* 3773: 873-877.

Pimienta, G. y Pascual, J. 2007. "Canonical and alternative MAPK signaling." *Cell Cycle* 621: 2628-2632.

Ploia, C., Antoniou, X., Scip, A., Grande, V., Cardinetti, D., Colombo, A., Canu, N., Benussi, L., Ghidoni, R., Forloni, G. y Borsello, T. 2011. "JNK plays a key role in tau hyperphosphorylation in Alzheimer's disease models." *J Alzheimers Dis* 262: 315-329.

Ponzoni, M., Casalaro, A., Lanciotti, M., Montaldo, P. G. y Cornaglia-Ferraris, P. 1992. "The combination of gamma-interferon and tumor necrosis factor causes a rapid and extensive differentiation of human neuroblastoma cells." *Cancer Res* 524: 931-939.

Pooler, A. M., Usardi, A., Evans, C. J., Philpott, K. L., Noble, W. y Hanger, D. P. 2012. "Dynamic association of tau with neuronal membranes is regulated by phosphorylation." *Neurobiol Aging* 332: 431 e427-438.

Pregi, N., Wenker, S., Vittori, D., Leiros, C. P. y Nesse, A. 2009. "TNF-alpha-induced apoptosis is prevented by erythropoietin treatment on SH-SY5Y cells." *Exp Cell Res* 3153: 419-431.

Querfurth, H. W. y LaFerla, F. M. 2010. "Alzheimer's disease." *New England Journal of Medicine* 3624: 329-344.

Quintanilla, R. A., Orellana, D. I., Gonzalez-Billault, C. y Maccioni, R. B. 2004. "Interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway." *Exp Cell Res* 2951: 245-257.

Raghunandan, R. y Ingram, V. M. 1995. "Hyperphosphorylation of the cytoskeletal protein Tau by the MAP-kinase PK40erk2: regulation by prior phosphorylation with cAMP-dependent protein kinase A." *Biochem Biophys Res Commun* 2153: 1056-1066.

Raman, M., Chen, W. y Cobb, M. H. 2007. "Differential regulation and properties of MAPKs." *Oncogene* 2622: 3100-3112.

Ramon y Cajal, S. 1952. "Structure and connections of neurons." *Bull Los Angel Neuro Soc* 171-2: 5-46.

Ransohoff, R. M. 2009. "Chemokines and chemokine receptors: standing at the crossroads of immunobiology and neurobiology." *Immunity* 315: 711-721.

Rapoport, M., Dawson, H. N., Binder, L. I., Vitek, M. P. y Ferreira, A. 2002. "Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 999: 6364-6369.

Rapoport, M. y Ferreira, A. 2000. "PD98059 prevents neurite degeneration induced by fibrillar beta-amyloid in mature hippocampal neurons." *J Neurochem* 741: 125-133.

Redfern, C. P., Lovat, P. E., Malcolm, A. J. y Pearson, A. D. 1995. "Gene expression and neuroblastoma cell differentiation in response to retinoic acid: differential effects of 9-cis and all-trans retinoic acid." *Eur J Cancer* 31A4: 486-494.

Reifert, J., Hartung-Cranston, D. y Feinstein, S. C. 2011. "Amyloid beta-mediated cell death of cultured hippocampal neurons reveals extensive Tau fragmentation without increased full-length tau phosphorylation." *J Biol Chem* 28623: 20797-20811.

Reyes, J. F., Reynolds, M. R., Horowitz, P. M., Fu, Y., Guillozet-Bongaarts, A. L., Berry, R. y Binder, L. I. 2008. "A possible link between astrocyte activation and tau nitration in Alzheimer's disease." *Neurobiol Dis* 312: 198-208.

Reynolds, C. H., Betts, J. C., Blackstock, W. P., Nebreda, A. R. y Anderton, B. H. 2000. "Phosphorylation sites on tau identified by nanoelectrospray mass spectrometry: differences in vitro between the mitogen-activated protein kinases ERK2, c-Jun N-terminal kinase and P38, and glycogen synthase kinase-3beta." *J Neurochem* 744: 1587-1595.

Reynolds, C. H., Garwood, C. J., Wray, S., Price, C., Kellie, S., Perera, T., Zvelebil, M., Yang, A., Sheppard, P. W., Varndell, I. M., Hanger, D. P. y Anderton, B. H. 2008. "Phosphorylation regulates tau interactions with Src homology 3 domains of phosphatidylinositol 3-kinase, phospholipase Cgamma1, Grb2, and Src family kinases." *J Biol Chem* 28326: 18177-18186.

Reynolds, C. H., Nebreda, A. R., Gibb, G. M., Utton, M. A. y Anderton, B. H. 1997. "Reactivating kinase/p38 phosphorylates tau protein in vitro." *J Neurochem* 691: 191-198.

Richter-Landsberg, C. 2008. "The cytoskeleton in oligodendrocytes. Microtubule dynamics in health and disease." *J Mol Neurosci* 351: 55-63.

Ringheim, G. E., Szczepanik, A. M., Petko, W., Burgher, K. L., Zhu, S. Z. y Chao, C. C. 1998. "Enhancement of beta-amyloid precursor protein transcription and expression by the soluble interleukin-6 receptor/interleukin-6 complex." *Brain Res Mol Brain Res* 551: 35-44.

Rintoul, G. L. y Reynolds, I. J. 2010. "Mitochondrial trafficking and morphology in neuronal injury." *Biochim Biophys Acta* 18021: 143-150.

Risco, A. y Cuenda, A. 2012. "New Insights into the p38gamma and p38delta MAPK Pathways." *J Signal Transduct* 2012: 520289.

Rissman, R. A., Poon, W. W., Blurton-Jones, M., Oddo, S., Torp, R., Vitek, M. P., LaFerla, F. M., Rohn, T. T. y Cotman, C. W. 2004. "Caspase-cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology." *J Clin Invest* 1141: 121-130.

- Roberson, E. D., Scearce-Levie, K., Palop, J. J., Yan, F., Cheng, I. H., Wu, T., Gerstein, H., Yu, G. Q. y Mucke, L. 2007. "Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model." *Science* 3165825: 750-754.
- Rodriguez-Martin, T., Cuchillo-Ibanez, I., Noble, W., Nyenya, F., Anderton, B. H. y Hanger, D. P. 2013. "Tau phosphorylation affects its axonal transport and degradation." *Neurobiol Aging*.
- Rogers, J. T., Leiter, L. M., McPhee, J., Cahill, C. M., Zhan, S. S., Potter, H. y Nilsson, L. N. 1999. "Translation of the alzheimer amyloid precursor protein mRNA is up-regulated by interleukin-1 through 5'-untranslated region sequences." *J Biol Chem* 27410: 6421-6431.
- Rohn, T. T., Rissman, R. A., Davis, M. C., Kim, Y. E., Cotman, C. W. y Head, E. 2002. "Caspase-9 activation and caspase cleavage of tau in the Alzheimer's disease brain." *Neurobiol Dis* 112: 341-354.
- Rohn, T. T., Vyas, V., Hernandez-Estrada, T., Nichol, K. E., Christie, L. A. y Head, E. 2008. "Lack of pathology in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease after overexpression of the anti-apoptotic protein Bcl-2." *J Neurosci* 2812: 3051-3059.
- Rosenberg, K. J., Ross, J. L., Feinstein, H. E., Feinstein, S. C. y Israelachvili, J. 2008. "Complementary dimerization of microtubule-associated tau protein: Implications for microtubule bundling and tau-mediated pathogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 10521: 7445-7450.
- Roskoski, R., Jr. 2012. "ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation." *Pharmacol Res* 662: 105-143.
- Rossi, G., Dalpra, L., Crosti, F., Lissoni, S., Sciacca, F. L., Catania, M., Di Fede, G., Mangieri, M., Giaccone, G., Croci, D. y Tagliavini, F. 2008. "A new function of microtubule-associated protein tau: involvement in chromosome stability." *Cell Cycle* 712: 1788-1794.
- Roux, P. P. y Blenis, J. 2004. "ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions." *Microbiol Mol Biol Rev* 682: 320-344.
- Rubio-Perez, J. M. y Morillas-Ruiz, J. M. 2012. "A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines." *ScientificWorldJournal* 2012: 756357.
- Sabapathy, K., Hu, Y., Kallunki, T., Schreiber, M., David, J. P., Jochum, W., Wagner, E. F. y Karin, M. 1999. "JNK2 is required for efficient T-cell activation and apoptosis but not for normal lymphocyte development." *Curr Biol* 93: 116-125.
- Sabio, G. y Davis, R. J. 2014. "TNF and MAP kinase signalling pathways." *Semin Immunol*.
- Sabio, G., Reuver, S., Feijoo, C., Hasegawa, M., Thomas, G. M., Centeno, F., Kuhlendahl, S., Leal-Ortiz, S., Goedert, M., Garner, C. y Cuenda, A. 2004. "Stress- and mitogen-induced phosphorylation of the synapse-associated protein SAP90/PSD-95 by activation of SAPK3/p38gamma and ERK1/ERK2." *Biochem J* 380Pt 1: 19-30.
- Sadot, E., Barg, J., Rasouly, D., Lazarovici, P. y Ginzburg, I. 1995. "Short- and long-term mechanisms of tau regulation in PC12 cells." *J Cell Sci* 108 (Pt 8): 2857-2864.
- Saez, T. E., Pehar, M., Vargas, M., Barbeito, L. y Maccioni, R. B. 2004. "Astrocytic nitric oxide triggers tau hyperphosphorylation in hippocampal neurons." *In Vivo* 183: 275-280.
- Sanchez, C., Diaz-Nido, J. y Avila, J. 2000. "Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function." *Prog Neurobiol* 612: 133-168.

Savage, M. J., Lin, Y. G., Ciallella, J. R., Flood, D. G. y Scott, R. W. 2002. "Activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 in an Alzheimer's disease model is associated with amyloid deposition." *J Neurosci* 229: 3376-3385.

Schiff, P. B., Fant, J. y Horwitz, S. B. 1979. "Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol." *Nature* 2775698: 665-667.

Schmitz, C., Rutten, B. P., Pielen, A., Schafer, S., Wirths, O., Tremp, G., Czech, C., Blanchard, V., Multhaup, G., Rezaie, P., Korr, H., Steinbusch, H. W., Pradier, L. y Bayer, T. A. 2004. "Hippocampal neuron loss exceeds amyloid plaque load in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease." *Am J Pathol* 1644: 1495-1502.

Scholz, T. y Mandelkow, E. 2014. "Transport and diffusion of Tau protein in neurons." *Cell Mol Life Sci*.

Schweers, O., Schonbrunn-Hanebeck, E., Marx, A. y Mandelkow, E. 1994. "Structural studies of tau protein and Alzheimer paired helical filaments show no evidence for beta-structure." *J Biol Chem* 26939: 24290-24297.

Sengupta, A., Kabat, J., Novak, M., Wu, Q., Grundke-Iqbal, I. y Iqbal, K. 1998. "Phosphorylation of tau at both Thr 231 and Ser 262 is required for maximal inhibition of its binding to microtubules." *Arch Biochem Biophys* 3572: 299-309.

Shahpasand, K., Uemura, I., Saito, T., Asano, T., Hata, K., Shibata, K., Toyoshima, Y., Hasegawa, M. y Hisanaga, S. 2012. "Regulation of mitochondrial transport and inter-microtubule spacing by tau phosphorylation at the sites hyperphosphorylated in Alzheimer's disease." *J Neurosci* 327: 2430-2441.

Shaw, G., Morse, S., Ararat, M. y Graham, F. L. 2002. "Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells." *FASEB J* 168: 869-871.

Shaw, G. y Weber, K. 1982. "Differential expression of neurofilament triplet proteins in brain development." *Nature* 2985871: 277-279.

Sheffield, L. G., Marquis, J. G. y Berman, N. E. 2000. "Regional distribution of cortical microglia parallels that of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease." *Neurosci Lett* 2853: 165-168.

Sheikh-Hamad, D. y Gustin, M. C. 2004. "MAP kinases and the adaptive response to hypertonicity: functional preservation from yeast to mammals." *Am J Physiol Renal Physiol* 2876: F1102-1110.

Sheng, J. G., Jones, R. A., Zhou, X. Q., McGinness, J. M., Van Eldik, L. J., Mrak, R. E. y Griffin, W. S. 2001. "Interleukin-1 promotion of MAPK-p38 overexpression in experimental animals and in Alzheimer's disease: potential significance for tau protein phosphorylation." *Neurochem Int* 395-6: 341-348.

Sheng, J. G., Mrak, R. E. y Griffin, W. S. 1997. "Glial-neuronal interactions in Alzheimer disease: progressive association of IL-1alpha+ microglia and S100beta+ astrocytes with neurofibrillary tangle stages." *J Neuropathol Exp Neurol* 563: 285-290.

Sheng, J. G., Zhu, S. G., Jones, R. A., Griffin, W. S. y Mrak, R. E. 2000. "Interleukin-1 promotes expression and phosphorylation of neurofilament and tau proteins in vivo." *Exp Neurol* 1632: 388-391.

- Sidell, N. 1982. "Retinoic acid-induced growth inhibition and morphologic differentiation of human neuroblastoma cells in vitro." *J Natl Cancer Inst* 684: 589-596.
- Simon, R. P. y Freedman, D. D. 1980. "Neurologic manifestations of osmolar disorders." *Geriatrics* 356: 71-83.
- Sjoberg, M. K., Shestakova, E., Mansuroglu, Z., Maccioni, R. B. y Bonnefoy, E. 2006. "Tau protein binds to pericentromeric DNA: a putative role for nuclear tau in nucleolar organization." *J Cell Sci* 119Pt 10: 2025-2034.
- Sjogren, M., Davidsson, P., Tullberg, M., Minthon, L., Wallin, A., Wikkelso, C., Granerus, A. K., Vanderstichele, H., Vanmechelen, E. y Blennow, K. 2001. "Both total and phosphorylated tau are increased in Alzheimer's disease." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 705: 624-630.
- Slee, E. A., Harte, M. T., Kluck, R. M., Wolf, B. B., Casiano, C. A., Newmeyer, D. D., Wang, H. G., Reed, J. C., Nicholson, D. W., Alnemri, E. S., Green, D. R. y Martin, S. J. 1999. "Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner." *J Cell Biol* 1442: 281-292.
- Solito, E. y Sastre, M. 2012. "Microglia function in Alzheimer's disease." *Front Pharmacol* 3: 14.
- Spires-Jones, T. L. y Hyman, B. T. 2014. "The Intersection of Amyloid Beta and Tau at Synapses in Alzheimer's Disease." *Neuron* 824: 756-771.
- Stamer, K., Vogel, R., Thies, E., Mandelkow, E. y Mandelkow, E. M. 2002. "Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress." *J Cell Biol* 1566: 1051-1063.
- Stoothoff, W. H. y Johnson, G. V. 2001. "Hyperosmotic stress-induced apoptosis and tau phosphorylation in human neuroblastoma cells." *J Neurosci Res* 656: 573-582.
- Su, C. C., Chen, J. Y., Din, Z. H., Su, J. H., Yang, Z. Y., Chen, Y. J., Wang, R. Y. y Wu, Y. J. 2014. "13-acetoxysarcocrossolide induces apoptosis on human gastric carcinoma cells through mitochondria-related apoptotic pathways: p38/JNK activation and PI3K/AKT suppression." *Mar Drugs* 1210: 5295-5315.
- Sudo, T., Kawai, K., Matsuzaki, H. y Osada, H. 2005. "p38 mitogen-activated protein kinase plays a key role in regulating MAPKAPK2 expression." *Biochem Biophys Res Commun* 3372: 415-421.
- Sultan, A., Nessler, F., Violet, M., Begard, S., Loyens, A., Talahari, S., Mansuroglu, Z., Marzin, D., Sergeant, N., Humez, S., Colin, M., Bonnefoy, E., Buee, L. y Galas, M. C. 2011. "Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection." *J Biol Chem* 2866: 4566-4575.
- Sun, Q. y Gamblin, T. C. 2009. "Pseudohyperphosphorylation causing AD-like changes in tau has significant effects on its polymerization." *Biochemistry* 4825: 6002-6011.
- Sundstrom, C. y Nilsson, K. 1976. "Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937)." *Int J Cancer* 175: 565-577.
- Takei, Y. y Laskey, R. 2008. "Tumor necrosis factor alpha regulates responses to nerve growth factor, promoting neural cell survival but suppressing differentiation of neuroblastoma cells." *Mol Biol Cell* 193: 855-864.
- Takei, Y., Teng, J., Harada, A. y Hirokawa, N. 2000. "Defects in axonal elongation and neuronal migration in mice with disrupted tau and map1b genes." *J Cell Biol* 1505: 989-1000.

- Takeuchi, H., Jin, S., Wang, J., Zhang, G., Kawanokuchi, J., Kuno, R., Sonobe, Y., Mizuno, T. y Suzumura, A. 2006. "Tumor necrosis factor-alpha induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner." *J Biol Chem* 28130: 21362-21368.
- Tanji, K., Mori, F., Imaizumi, T., Yoshida, H., Satoh, K. y Wakabayashi, K. 2003. "Interleukin-1 induces tau phosphorylation and morphological changes in cultured human astrocytes." *Neuroreport* 143: 413-417.
- Tashiro, K., Hasegawa, M., Ihara, Y. y Iwatsubo, T. 1997. "Somatodendritic localization of phosphorylated tau in neonatal and adult rat cerebral cortex." *Neuroreport* 812: 2797-2801.
- Teng, K. K., Georgieff, I. S., Aletta, J. M., Nunez, J., Shelanski, M. L. y Greene, L. A. 1993. "Characterization of a PC12 cell sub-clone (PC12-C41) with enhanced neurite outgrowth capacity: implications for a modulatory role of high molecular weight tau in neuritogenesis." *J Cell Sci* 106 (Pt 2): 611-626.
- Thomas, P. y Smart, T. G. 2005. "HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins." *J Pharmacol Toxicol Methods* 513: 187-200.
- Thurston, V. C., Pena, P., Pestell, R. y Binder, L. I. 1997. "Nucleolar localization of the microtubule-associated protein tau in neuroblastomas using sense and anti-sense transfection strategies." *Cell Motil Cytoskeleton* 381: 100-110.
- Thurston, V. C., Zinkowski, R. P. y Binder, L. I. 1996. "Tau as a nucleolar protein in human nonneural cells in vitro and in vivo." *Chromosoma* 1051: 20-30.
- Togo, T., Akiyama, H., Iseki, E., Uchikado, H., Kondo, H., Ikeda, K., Tsuchiya, K., de Silva, R., Lees, A. y Kosaka, K. 2004. "Immunohistochemical study of tau accumulation in early stages of Alzheimer-type neurofibrillary lesions." *Acta Neuropathol* 1076: 504-508.
- Tournier, C., Hess, P., Yang, D. D., Xu, J., Turner, T. K., Nimnual, A., Bar-Sagi, D., Jones, S. N., Flavell, R. A. y Davis, R. J. 2000. "Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway." *Science* 2885467: 870-874.
- Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. 1979. "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* 769: 4350-4354.
- Trinczek, B., Ebnet, A., Mandelkow, E. M. y Mandelkow, E. 1999. "Tau regulates the attachment/detachment but not the speed of motors in microtubule-dependent transport of single vesicles and organelles." *J Cell Sci* 112 (Pt 14): 2355-2367.
- Trojanowski, J. Q., Schuck, T., Schmidt, M. L. y Lee, V. M. 1989. "Distribution of tau proteins in the normal human central and peripheral nervous system." *J Histochem Cytochem* 372: 209-215.
- Troy, C. M., Akpan, N. y Jean, Y. Y. 2011. "Regulation of caspases in the nervous system implications for functions in health and disease." *Prog Mol Biol Transl Sci* 99: 265-305.
- Utton, M. A., Vandecandelaere, A., Wagner, U., Reynolds, C. H., Gibb, G. M., Miller, C. C., Bayley, P. M. y Anderton, B. H. 1997. "Phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase 3beta affects the ability of tau to promote microtubule self-assembly." *Biochem J* 323 (Pt 3): 741-747.
- Vale, R. D. 2003. "The molecular motor toolbox for intracellular transport." *Cell* 1124: 467-480.

Van Noorden, Cornelis J. F. 2001. "The history of Z-VAD-FMK, a tool for understanding the significance of caspase inhibition." *Acta Histochemica* 1033: 241-251.

Vasquez, R. J., Howell, B., Yvon, A. M., Wadsworth, P. y Cassimeris, L. 1997. "Nanomolar concentrations of nocodazole alter microtubule dynamic instability in vivo and in vitro." *Mol Biol Cell* 86: 973-985.

Vega, L. R. y Solomon, F. 1997. "Microtubule function in morphological differentiation: growth zones and growth cones." *Cell* 896: 825-828.

Venero, J. L., Burguillos, M. A. y Joseph, B. 2013. "Caspases playing in the field of neuroinflammation: old and new players." *Dev Neurosci* 352-3: 88-101.

Verhey, K. J. y Gaertig, J. 2007. "The tubulin code." *Cell Cycle* 617: 2152-2160.

Verlhac, M. H., de Pennart, H., Maro, B., Cobb, M. H. y Clarke, H. J. 1993. "MAP kinase becomes stably activated at metaphase and is associated with microtubule-organizing centers during meiotic maturation of mouse oocytes." *Dev Biol* 1582: 330-340.

Violet, M., Delattre, L., Tardivel, M., Sultan, A., Chauderlier, A., Caillierez, R., Talahari, S., Nessler, F., Lefebvre, B., Bonnefoy, E., Buee, L. y Galas, M. C. 2014. "A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection in vivo under physiological and hyperthermic conditions." *Front Cell Neurosci* 8: 84.

Vogel, J., Anand, V. S., Ludwig, B., Nawoschik, S., Dunlop, J. y Braithwaite, S. P. 2009. "The JNK pathway amplifies and drives subcellular changes in tau phosphorylation." *Neuropharmacology* 575-6: 539-550.

Wada, T. y Penninger, J. M. 2004. "Stress kinase MKK7: savior of cell cycle arrest and cellular senescence." *Cell Cycle* 35: 577-579.

Wada, Y., Ishiguro, K., Itoh, T. J., Uchida, T., Hotani, H., Saito, T., Kishimoto, T. y Hisanaga, S. 1998. "Microtubule-stimulated phosphorylation of tau at Ser202 and Thr205 by cdk5 decreases its microtubule nucleation activity." *J Biochem* 1244: 738-746.

Wajant, H., Pfizenmaier, K. y Scheurich, P. 2003. "Tumor necrosis factor signaling." *Cell Death Differ* 101: 45-65.

Wang, J. Z., Gong, C. X., Zaidi, T., Grundke-Iqbal, I. y Iqbal, K. 1995. "Dephosphorylation of Alzheimer paired helical filaments by protein phosphatase-2A and -2B." *J Biol Chem* 2709: 4854-4860.

Wang, J. Z. y Liu, F. 2008. "Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons." *Prog Neurobiol* 852: 148-175.

Wang, X., Fu, S., Wang, Y., Yu, P., Hu, J., Gu, W., Xu, X. M. y Lu, P. 2007c. "Interleukin-1beta mediates proliferation and differentiation of multipotent neural precursor cells through the activation of SAPK/JNK pathway." *Mol Cell Neurosci* 363: 343-354.

Wang, X., Wang, D., Zhao, J., Qu, M., Zhou, X., He, H. y He, R. 2006. "The proline-rich domain and the microtubule binding domain of protein tau acting as RNA binding domains." *Protein Pept Lett* 137: 679-685.

Wang, Y. 2007a. "Mitogen-activated protein kinases in heart development and diseases." *Circulation* 11612: 1413-1423.

Wang, Y., Garg, S., Mandelkow, E. M. y Mandelkow, E. 2010. "Proteolytic processing of tau." *Biochem Soc Trans* 384: 955-961.

- Wang, Y. P., Biernat, J., Pickhardt, M., Mandelkow, E. y Mandelkow, E. M. 2007b. "Stepwise proteolysis liberates tau fragments that nucleate the Alzheimer-like aggregation of full-length tau in a neuronal cell model." *Proc Natl Acad Sci U S A* 10424: 10252-10257.
- Webster, S., Bonnell, B. y Rogers, J. 1997. "Charge-based binding of complement component C1q to the Alzheimer amyloid beta-peptide." *Am J Pathol* 1505: 1531-1536.
- Wegiel, J., Wang, K. C., Imaki, H., Rubenstein, R., Wronska, A., Osuchowski, M., Lipinski, W. J., Walker, L. C. y LeVine, H. 2001. "The role of microglial cells and astrocytes in fibrillar plaque evolution in transgenic APP(SW) mice." *Neurobiol Aging* 221: 49-61.
- Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. Y. y Kirschner, M. W. 1975. "A protein factor essential for microtubule assembly." *Proc Natl Acad Sci U S A* 725: 1858-1862.
- Weissmann, C., Reyher, H. J., Gauthier, A., Steinhoff, H. J., Junge, W. y Brandt, R. 2009. "Microtubule binding and trapping at the tip of neurites regulate tau motion in living neurons." *Traffic* 1011: 1655-1668.
- Welte, M. A. 2004. "Bidirectional transport along microtubules." *Curr Biol* 1413: R525-537.
- Whiteman, I. T., Minamide, L. S., Goh de, L., Bamburg, J. R. y Goldsbury, C. 2011. "Rapid changes in phospho-MAP/tau epitopes during neuronal stress: cofilin-actin rods primarily recruit microtubule binding domain epitopes." *PLoS One* 66: e20878.
- Widera, D., Mikenberg, I., Elvers, M., Kaltschmidt, C. y Kaltschmidt, B. 2006. "Tumor necrosis factor alpha triggers proliferation of adult neural stem cells via IKK/NF-kappaB signaling." *BMC Neurosci* 7: 64.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B. y Johnson, G. L. 1999. "Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human." *Physiol Rev* 791: 143-180.
- Wischik, C. M., Novak, M., Edwards, P. C., Klug, A., Tichelaar, W. y Crowther, R. A. 1988a. "Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 8513: 4884-4888.
- Wischik, C. M., Novak, M., Thogersen, H. C., Edwards, P. C., Runswick, M. J., Jakes, R., Walker, J. E., Milstein, C., Roth, M. y Klug, A. 1988b. "Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 8512: 4506-4510.
- Wu, G. S. 2004. "The functional interactions between the p53 and MAPK signaling pathways." *Cancer Biol Ther* 32: 156-161.
- Xie, H., Litersky, J. M., Hartigan, J. A., Jope, R. S. y Johnson, G. V. 1998. "The interrelationship between selective tau phosphorylation and microtubule association." *Brain Res* 7981-2: 173-183.
- Xie, H. R., Hu, L. S. y Li, G. Y. 2010. "SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease." *Chin Med J (Engl)* 1238: 1086-1092.
- Yamada, K., Cirrito, J. R., Stewart, F. R., Jiang, H., Finn, M. B., Holmes, B. B., Binder, L. I., Mandelkow, E. M., Diamond, M. I., Lee, V. M. y Holtzman, D. M. 2011. "In vivo
- Yi, C. H. y Yuan, J. 2009. "The Jekyll and Hyde functions of caspases." *Dev Cell* 161: 21-34.

Yoshida, H., Hastie, C. J., McLauchlan, H., Cohen, P. y Goedert, M. 2004. "Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by isoforms of c-Jun N-terminal kinase (JNK)." *J Neurochem* 90: 352-358.

Yoshiyama, Y., Higuchi, M., Zhang, B., Huang, S. M., Iwata, N., Saido, T. C., Maeda, J., Suhara, T., Trojanowski, J. Q. y Lee, V. M. 2007. "Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model." *Neuron* 53: 337-351.

Yuan, A., Rao, M. V., Veeranna y Nixon, R. A. 2012. "Neurofilaments at a glance." *J Cell Sci* 125Pt 14: 3257-3263.

Zhang, F. y Jiang, L. 2015. "Neuroinflammation in Alzheimer's disease." *Neuropsychiatr Dis Treat* 11: 243-256.

Zhang, W. y Liu, H. T. 2002. "MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells." *Cell Res* 12: 9-18.

Zhang, Y. y Dong, C. 2007. "Regulatory mechanisms of mitogen-activated kinase signaling." *Cell Mol Life Sci* 642: 2771-2789.

Zhang, Y., Goodyer, C. y LeBlanc, A. 2000. "Selective and protracted apoptosis in human primary neurons microinjected with active caspase-3, -6, -7, and -8." *J Neurosci* 20: 8384-8389.

Zhao, H., Zhao, W., Lok, K., Wang, Z. y Yin, M. 2014. "A Synergic Role of Caspase-6 and Caspase-3 in Tau Truncation at D421 Induced by H₂O₂." *Cell Mol Neurobiol* 34: 369-378.

Zhong, W., Xie, Y., Wang, Y., Lewis, J., Trostinskaia, A., Wang, F., Puscheck, E. E. y Rappolee, D. A. 2007. "Use of hyperosmolar stress to measure stress-activated protein kinase activation and function in human HTR cells and mouse trophoblast stem cells." *Reprod Sci* 14: 534-547.

Zilka, N., Kazmerova, Z., Jadhav, S., Neradil, P., Madari, A., Obetkova, D., Bugos, O. y Novak, M. 2012. "Who fans the flames of Alzheimer's disease brains? Misfolded tau on the crossroad of neurodegenerative and inflammatory pathways." *J Neuroinflammation* 9: 47.

Alzheimer's Disease International. 2015. www.alz.co.uk/alzheimers.

