

UCh-FC  
DOC-BMCN  
1557  
2.1

**ASOCIACIÓN DE TAU A LOS MICRODOMINIOS DE  
MEMBRANA "BALSAS LIPIDÍCAS":  
FOSFORILACIONES DE TAU Y RESPUESTAS AL PEPTIDO  
AMILOIDE A $\beta$ <sub>25-35</sub>**

Tesis  
Entregada A La  
Universidad De Chile  
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos  
Para Optar Al Grado De

Doctor en Ciencias con Mención en Biología Molecular, Celular y  
Neurociencias

Facultad de Ciencias

Por

Paula Andrea Hernández Valdés

Agosto, 2007

Director de Tesis: Prof. Dr. Ricardo Benjamín Maccioni  
Co-Director de Tesis: Dr. Christian Gonzalez-Billault



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

PAULA ANDREA HERNANDEZ VALDES

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 17 de Agosto de 2007.

Director de Tesis:

Dr. Ricardo Maccioni

Co-Director de Tesis

Dr. Christian Gonzalez

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Ariel Orellana

Dra. Veronica Cambiazo

Dra. Lee Meisel

Dr. Jorge Garrido



Handwritten signatures in blue ink, including a large signature for Ricardo Maccioni and several others for the evaluation committee members.



*A mi padre... aunque partiste  
antes, se que siempre estarás conmigo*



**T**odo comenzó la tarde del 15 de Mayo de 1979 en Santiago. Crecí rodeada de una hermosa familia, mis padres, mi hermana Pamela y mis tíos.

Desde pequeña siempre me gustó la biología, mi fascinación por los animales y la ciencia me llevó a querer seguir esta carrera desde muy temprano en mi vida.

Cuando comencé mi carrera universitaria, elegí estudiar en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

En mi segundo año de carrera comencé a trabajar en el Laboratorio del Dr. Ricardo Maccioni, quien me acogió y me ayudó a comenzar mi camino por la ciencia.

Por mis 8 años en el laboratorio formé muy buenos amigos, quienes aun siguen en mi vida, y de quienes aprendí maravillosas y valiosas experiencias.

Cuando comencé mi Doctorado, en la misma Facultad, viajé a Estados Unidos por un tiempo para trabajar en mi tesis.

Allí conocí a la Dra. Gloria Lee, quien ha sido pilar para mi formación científica junto a mi tutor.

Al mismo tiempo conocí a quien se convertiría en mi compañero de vida, Esteban, que apareció en mi vida justo cuando mi padre repentinamente falleció en Chile mientras yo me encontraba lejos.

Terminé mi trabajo de tesis viajando entre Chile y Estados Unidos. En el año 2005 contraí matrimonio y me trasladé a trabajar a la Universidad de Iowa, mientras terminaba de escribir mi tesis.

Gracias al esfuerzo de mis padres y a la confianza de mi familia fui capaz de completar esta etapa, ponerme de pie frente a muchos obstáculos y seguir caminando con la frente en alto.

## AGRADECIMIENTOS

Primero que nada a mis padres, porque fueron ellos quienes me apoyaron tanto de manera económica como emocional cuando decidí comenzar este duro camino por la ciencia. Sin ellos jamás habría logrado llegar a donde estoy.

Agradezco también a mi hermana Pamela, quien siempre e incondicionalmente ha confiado en mí, así como yo he confiado en ella de la misma manera.

Mi esposo, quien me ha levantado cuando ya sentía que no quedaban energías, que sin él a mi lado quizás no habría podido terminar esta etapa.

A mi tío Robin, quien siempre ha sido como un hermano mayor para mí. Siempre listo para ayudarme cuando más lo necesité.

Mi Sori, quien me crió y me soportó en esas complicadas etapas de niña, y de quien aprendí a ser una mejor persona.

Quisiera agradecer también a mi tutor de tantos años, el Dr. Ricardo Maccioni. Gracias por aceptarme y tener fe en mí aun cuando llegué al laboratorio siendo casi una niña. Gracias también por abrirme las puertas al extranjero y por darme todas las oportunidades que me dio durante mi estadía en su laboratorio.

Agradezco también a mi co-tutor Dr. Christian Gonzalez, por todos sus valiosos consejos.

También quiero agradecer a todos mi buenos amigos del laboratorio y de la Facultad, compañeros de carrera y de Doctorado: Andrea, Carlita, Ary, Marce, Gise, todas las Lore, Elias, Claudita, Dani, Rodrigo, Chinito, JP, Tomas, Felipe, Ruben, Sergio, Angarita, Vero, Hans, Juan y todos aquellos que pasaron por mi vida en esta etapa, en especial a Lore Saragoni quien fue mi primera guía en mi experiencia de laboratorio.

De manera especial necesito agradecer a una persona muy importante en mi formación científica, la Dra. Gloria Lee de la Universidad de Iowa. Ella siempre confió en mí y me apoyó al 100% en todo momento, incluso hasta la actualidad.

También de Estados Unidos quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio: mi gran amiga Vandana Sharma y mis amigos Mitul, Anu, Deb y Tim.

No puedo dejar fuera a quienes siempre me alentaron a terminar la tesis cuando estaba lejos de Chile, aquellos amigos en Iowa que marcaron mi vida: Blanca, Luis y el pequeño Jorge, Alex, Vero y Kike, Adela, Germán y el pequeño Teo, Guarío y Angelique, Nicole, Andrea, Carolina, Africa y Fernando.



Finalmente, quiero agradecer a CONICYT por darme la oportunidad de completar mis estudios de Postgrado bajo su financiamiento.



## INDICE DE MATERIAS

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUCCION .....	5
3.1 Planteamiento del Problema.....	5
3.2 Contexto fisiológico, celular y molecular de la Enfermedad de Alzheimer (EA) ..	7
3.3 Proteína tau. Funcion fisiológica y participación en la EA.....	10
3.4 Tau asociada a Membrana Plasmática y “balsas lipídicas” .....	19
4. HIPÓTESIS.....	23
5. OBJETIVO GENERAL .....	23
5.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	24
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	25
6.1 Material Biológico .....	25
6.2 Reactivos:.....	25
6.3 Anticuerpos .....	26
6.4 Cultivo celular.....	28
6.5 Obtención de los “balsas lipídicas” mediante centrifugación de gradientes de densidad de Optiprep .....	29
6.6 Electroforesis en Geles de Poliacrilamida.....	30
6.7 Inmunodetecciones.....	30
6.8 Inmunoprecipitaciones .....	31
6.9 Transfecciones Transientes.....	32
6.10 Preparación del péptido amiloide A $\beta$ <sub>25-35</sub> .....	33
6.11 Tratamientos con el péptido amiloide A $\beta$ <sub>25-35</sub> .....	33
7. RESULTADOS.....	35
7. 1. Análisis de “balsas lipídicas” .....	35
7.2 Fosforilación de tau asociada a “balsas lipídicas”. .....	37
7.3 Fosforilación de tau en Ser396/404 y Thr231: unión a Fyn y fosforilación en Tyr18.....	40
7.3.1 Unión de Fyn a tau fosforilada.....	40
7.3.2 Fosforilación de tau en Tyr 18 .....	40
7.4 Fosforilación de tau en Tyr18 como requerimiento para su asociación a “balsas lipídicas”. .....	42
7.4.1 Fosforilación de tau en Tyr18 <i>in vivo</i> al deleccionar la secuencia de interacción con Fyn ( $\Delta$ P-tau) .....	45
7.5 Relación entre Fyn y la asociación de tau a los “balsas lipídicas”.....	48
7.6 Distribución de las quinasas cdk5 y Gsk3 $\beta$ en “balsas lipídicas”.....	51
7.7 Efecto del péptido amiloide A $\beta$ <sub>25-35</sub> .....	53
7.7.1 Efecto del péptido sobre la fosforilación de tau en Tyr18 .....	53



7.7.2 Efecto del péptido sobre la fosforilación de tau en Ser396/404 y Thr231 .....	54
7.7.3 Variaciones en la distribución de tau en “balsas lipídicas” por tratamientos con el péptido A $\beta$ <sub>25-35</sub> .....	54
7.7.4 Cambios en la distribución de las quinasas Cdk5 y Gsk3 $\beta$ en “balsas lipídicas” bajo tratamientos con A $\beta$ <sub>25-35</sub> .....	58
7.7.5 Inhibición de Cdk5 por roscovitina en tratamientos con A $\beta$ <sub>25-35</sub> .....	60
8. DISCUSION .....	62
9. CONCLUSIONES .....	77
10. BIBLIOGRAFIA .....	78



## LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Fosforilaciones de tau en Ser/Thr.....15



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Procesamiento de la proteína precursora de amiloide.....	11
Figura 2: Esquema de las isoformas de tau.....	13
Figura 3: Marcadores de “balsas lipídicas” en SHSY5Y.....	36
Figura 4: Tau total en “balsas lipídicas”.....	38
Figura 5: Tau fosforilada en “balsas lipídicas”.....	39
Figura 6: Co-inmunoprecipitaciones de Fyn con tau.....	41
Figura 7: Nivel de P-Tyr18 en tau fosforilada.....	43
Figura 8: Diagrama de las variantes de tau utilizadas.....	44
Figura 9: Expresión de tau humana en N2a.....	46
Figura 10: “Balsas lipídicas” a partir de N2a.....	47
Figura 11: Expresión de tau en Cos7.....	49
Figura 12: “Balsas lipídicas” a partir de Cos7.....	50
Figura 13: Gsk3 $\beta$ y cdk5 en “lipids balsas lipídicas”.....	52
Figura 14: Transcurso temporal de tratamientos con amiloide en SHSY5Y.....	55
Figura 15: Variantes de tau fosforiladas en “balsas lipídicas” con amiloide.....	57
Figura 16: Gsk3 $\beta$ y cdk5 en “balsas lipídicas” con amiloide.....	59
Figura 17: Efecto de Roscovitina en la distribución de cdk5/p35 en “balsas lipídicas”.....	61
Figura 18: Esquema resumen de la dinámica de tau en “balsas lipídicas” con amiloide.....	75



**INDICE DE ABREVIATURAS**

APOE: Apolipoproteína E

APP: Proteína Precursora de Amiloide

BSA: Albúmina de suero de bovino

cdk5: quinasa dependiente de ciclina 5

C-terminal: carboxilo terminal

DMEM: Medio Dulbecco's Eagle Modificado

EA: Enfermedad de Alzheimer

Erk: p44 MAP Kinasa

FAD: Enfermedad de Alzheimer de tipo Familiar

Gsk3: quinasa sintetizadora de glicógeno 3

MAPs: Proteína Asociada a Microtúbulos

MEM: Medio mínimo Escencial

N-terminal: amino terminal

ONF: Ovillos neurofibrilares

PBS: Tampón fosfato salino

PHFs: filamentos helicoidales pareados

PP1: Proteína fosfatasa 1

PP2A: Proteína fosfatasa 2A

PP2B: Proteína fosfatasa 2B

PS: Presinilina

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SH: Dominio de Homología de Src

TBS: tampón Tris salino

TfR: receptor de transferrina

**INDICE DE NOMENCLATURA**

DNA: ácido desoxirribonucleico

Da: Dalton

KDa: kilo Dalton ( $10^3$ )

h: hora

min: minutos

Phe: fenilalanina

Tyr: tirosina

Thr: treonina

Ser: Serina

ml: mililitro ( $10^{-3}$ )

$\mu$ l: microlitro ( $10^{-6}$ )



## 1. RESUMEN

La Proteína Asociada a Microtúbulos, tau, participa normalmente en el desarrollo neuronal y es crítica para definir la polaridad de las neuronas. Alteraciones patológicas de esta proteína pueden llevar a la formación de estructuras anómalas como son los ovillos neurofibrilares, los cuales están asociados a enfermedades neurodegenerativas como es el caso de la Enfermedad de Alzheimer (EA). Una de las regulaciones postraduccionales de tau ocurre a nivel de su fosforilación en dos tipos de residuos. El primer tipo y ampliamente descrito es la fosforilación en residuos Ser/Thr, llevada a cabo por varias quinasas implicadas en diversas vías de transducción de señales. Entre ellas están cdk5 y Gsk3 $\beta$ , ambas relevantes durante el desarrollo neuronal y cuyas desregulaciones son un elemento substancial en la EA. El otro tipo de fosforilación que ha sido recientemente descrito ocurre en residuos Tyr, promovido por proteínas Tyr quinasas, entre las cuales se encuentran miembros de la familia Src como es la proteína Fyn—que está presente en cerebro y sistema inmunológico. Cabe señalar que esta enzima se encontró sobreactivada en la EA. Entre las cinco Tyr que posee la estructura de tau, Fyn fosforila sólo a Tyr18. Fyn se localiza preferentemente en las balsas lipídicas, microdominios de membrana plasmática compuestos por colesterol y esfingolípidos que participan en sistemas de transducción de señales. La proteína tau también está presente en estos microdominios, siendo capaz de unirse a Fyn a través del dominio SH3 de esta quinasa.

En esta tesis doctoral se analizaron los cambios a nivel de la fosforilación de tau, producidos como respuesta a tratamientos con el péptido amiloide  $A\beta_{25-35}$ . Se observó también que tau se asocia a las balsas lipídicas independientemente de su unión con Fyn e independiente de la fosforilación en Tyr18 inducida por esta quinasa. Se analizó la distribución diferencial en las balsas lipídicas de las variantes de tau fosforilada en Tyr18, Thr231 y Ser306/404. Se observó que éstas se reorganizan en respuesta al péptido amiloide  $A\beta_{25-35}$ . Las fosforilaciones en Tyr18 y en Thr231 aumentaron en las “balsas lipídicas” a los 2 min de tratamiento, mientras que la fosforilación en Ser396/404 sólo fue detectable en las “balsas lipídicas” luego de 10 min. Interesantemente, el complejo cdk5/p35 fue detectado en las “balsas lipídicas” semejando la distribución temporal y subcelular de tau fosforilada en Ser396/404. Lo que indica una posible relación entre el complejo cdk5/p35 y esa variante de tau a nivel de las “balsas lipídicas”. Al inhibir cdk5 con roscovitina, observamos que tanto el complejo cdk5/p35 como la fosforilación de tau en Ser396/404 fueron indetectables en las “balsas lipídicas”, revirtiendo el efecto producido a los 10 min por el péptido amiloide.

Estos resultados sugieren una nueva señalización celular en respuesta al péptido amiloide  $A\beta_{25-35}$ , donde se observaron cambios en el patrón de fosforilación de la tau asociada a “balsas lipídicas”. Este evento podría deberse a la interacción de tau con las quinasas responsables en las “balsas lipídicas”.

## 2. ABSTRACT

Tau protein, a low molecular weight Microtubule-Associated Protein, is commonly found in neurons and display several functions during neuronal development. Alterations in the structural and functional features of this protein appear to be implicated in some neurological disorders such as Alzheimer's disease and tauopathies. One of its post-translational regulations is the phosphorylation in two types of residues. The first and widely studied is the phosphorylation in Ser/Thr residues, carried out by various kinases implicated in different signaling pathways. These include the kinases cdk5 and GSK3 $\beta$ , of relevance in neuronal development, whose deregulations appears to be also implicated in Alzheimer's disease. The other type of residue is a Tyr phosphorylation conducted by Src family kinases such as Fyn—present in brain and the immunological system and overactive in Alzheimer's disease. Among the five Tyr residues present in human tau, Fyn phosphorylates only Tyr 18. Fyn is present in "lipid rafts", plasma membrane microdomains composed of cholesterol and sphingolipids that participate in signal transduction systems. Interestingly, tau has been also found in "lipid rafts" and is able to bind Fyn through an SH3 domain of the kinase.

The major objective of this thesis is the study of tau participation, in terms of phosphorylation, to treatments with the amyloid peptide A $\beta$ <sub>25-35</sub>. We have seen that tau can be associated to "lipid rafts" independent on the presence of Fyn and independent on its phosphorylation at Tyr18. The phosphorylated variants of tau studied here (P-Tyr18,

P-Thr 231 and P-Ser306/404) were differentially distributed on "lipid rafts", and rearranged upon the action of A $\beta$ <sub>25-35</sub>. The phosphorylations at Tyr18 and Thr231 increased in "lipid rafts" after 2 min of treatment with the amyloid, meanwhile, phosphorylation at Ser396/404 was detectable on these fractions only after 10min. Interestingly, the cdk5/p35 complex was detected in "lipid rafts" mimicking the distribution observed for phosphorylation at Ser396/404. This indicates a possible relation between the complex and that phosphorylation of tau. By inhibiting cdk5 with roscovitine, both the complex and Ser396/404 phosphorylation became undetectable in "lipid rafts", reversing the effect produced by 10min of amyloid peptide incubation.

These results suggest a new signal transduction system in response to amyloid peptide A $\beta$  (25-35), where we observed changes in the phosphorylation pattern of the tau subpopulation "lipid rafts" associated. This event is possibly due to the interaction of tau with its kinases in "lipid rafts".

### 3. INTRODUCCION

#### 3.1 Planteamiento del Problema

Este trabajo de tesis doctoral está focalizado en analizar los cambios en diferentes patrones de fosforilación de la proteína tau, y su fosforilación en residuos Tyr, en el contexto del estudio de la patogénesis de la Enfermedad de Alzheimer (EA), mediante un modelo ampliamente utilizado para este fin como es la estimulación de cultivos celulares con fibras agregadas del péptido  $\beta$ -amiloide. Se ha descrito que la proteína tau participa principalmente formando los llamados Filamentos Helicoidales Pareados (o su sigla en inglés PHFs), los cuales a su vez durante el avance de la enfermedad dan origen a los Ovillos Neurofibrilares (ONF). Estos elementos se agregan intracelularmente produciendo la citotoxicidad propia de una sobre agregación proteica (Billingsley y Kinkaïd 1997; revisado por Goedert et al., 1995).

Los PHFs son autoagregaciones de la proteína tau hiperfosforilada, modificación que imposibilita el cumplimiento de su función citosólica normal, esto es, la regulación y estabilización de los microtúbulos y del citoesqueleto en general (Witman et al., 1976; Correas et al., 1990; Farias et al., 1992; Lee y Rook, 1992; Moraga et al., 1993). Las hiperfosforilaciones que hasta ahora han sido estudiadas afectan a residuos de tipo Ser o Thr, efectuadas entre otras quinasas por cdk5 y Gsk3 $\beta$  (Billingsley y Kinkaïd 1997; Alvarez et al., 1999; 2001; Biernat et al., 1999; Taniguchi et al., 2001). Aunque existen

otras quinasas asociadas a este tipo de fosforilaciones en tau, los estudios dirigidos a la EA se han concentrado en cdk5 y Gsk3 $\beta$  dada su evidente sobreactivación (Takashima et al., 1998; Alvarez et al., 1999, 2001; Town et al., 2002).

La proteína tau contiene en su secuencia aminoacídica otros residuos críticos que pueden ser fosforilados y que hasta ahora han sido menos estudiados, tal es el caso de la fosforilación en Tyr. Tau posee cinco residuos Tyr de los cuales se han descrito tres fosforilados: Tyr18 sería fosforilada por la familia de las Src quinasas, entre ellas Fyn y Src (Lee et al., 1998, 2004); Tyr29 sería fosforilada por otro miembro de Src quinasas, Lck (Williamson et al., 2002); finalmente, Tyr394 sería fosforilada por la quinasa c-Abl (Derkinderen et al., 2005).

El interés por este novedoso modo de fosforilación se sustenta en observaciones que correlacionan la presencia de tau fosforilada en Tyr con: la autoagregación de tau, la generación de los PHFs y el avance de la enfermedad (Vega et al., 2005). En nuestro trabajo escogimos estudiar la participación de la proteína Tyr quinasa Fyn, porque a diferencia de las otras Tyr quinasas que fosforilan a tau, ésta se encuentra sobreactivada en la EA (Ho et al., 2005). De este contexto se derivan los dos primeros objetivos específicos de la tesis.

El residuo Tyr18 está conservado entre las distintas isoformas de tau humana y también en ratón, rata, chimpancé y bovino, de lo que se infiere su participación durante el desarrollo del cerebro. Las similitudes entre fosforilaciones de tau presentes en desarrollo fetal de cerebro y las presentes en la EA han sido descritas previamente. Una de las fosforilaciones más estudiadas de tau en dicha enfermedad es en Ser396/404,

también denominada epitopo PHF-1 debido a que se encuentra presente en los PHFs. Esta fosforilación, que es detectada normalmente durante el desarrollo neuronal del feto, reaparece en la patología (Kenessey y Yen, 1993; Combs et al., 1998). Ya que la isoforma de tau que se une con mayor afinidad a Fyn es la expresada en estadios de desarrollo neuronal fetal (Bhaskar et al., 2005), pensamos en la similitud que podría tener la fosforilación en Tyr18 en la EA con lo que ocurre con la fosforilación en Ser396/404 en la EA. A raíz de esto se propuso estudiar la participación de Tyr18 fosforilado en la EA.

A continuación se hará una breve descripción de los elementos de estudio más relevantes en este trabajo.

### **3.2 Contexto fisiológico, celular y molecular de la Enfermedad de Alzheimer (EA)**

La EA es una de las formas más comunes y estudiadas de demencia. La primera descripción de esta enfermedad fue realizada por Alois Alzheimer en 1907. Generalmente afecta a adultos mayores de 60 años disminuyendo el intelecto y provocando una pérdida progresiva y severa de la memoria. La persona afectada es incapaz de realizar las más simples tareas diarias como es el cuidado personal. El curso total de la enfermedad puede tomar de 2 a 20 años luego de que aparecen los primeros signos, aunque la muerte generalmente ocurre en alrededor de 8 a 10 años, tiempo que varía de persona a persona.

El primer componente cerebral que se ve afectado es el hipocampo—una zona neuronal con funciones de memoria. Los pacientes también pierden la memoria espacial.

Luego se afecta la corteza y la amígdala. El principal componente extracelular en el cerebro de los enfermos con EA son los depósitos de amiloide compuestos por acumulaciones del péptido A $\beta$  (revisado por Maccioni et al., 2001b; Ling et al., 2003) mientras que el principal componente intracelular son los ovillos neurofibrilares (ONF) compuestos por agregaciones de la proteína tau hiperfosforilada (revisado por Goedert et al., 1995). La EA puede desarrollarse de manera temprana en adultos jóvenes en los casos de Alzheimer determinado genéticamente, o bien de manera tardía en individuos de la tercera edad. La primera se denomina EA de tipo familiar (FAD), que corresponde al 5% de los pacientes, la segunda afecta a aquellos individuos mayores de 60 años que desarrollan la patología por múltiples causas (enfermedad de tipo esporádico). Entre los factores asociados a FAD están las mutaciones en:

(i) La proteína Precursora de Amiloide (APP): este gen está localizado en el cromosoma 21. APP es ampliamente expresada en la superficie celular, especialmente en neuronas centrales, pero también en astrocitos, microglia, células endoteliales, músculo liso y en todas las neuronas periféricas. APP es procesada por 3 enzimas llamadas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  secretasas. La  $\alpha$ -secretasa es un miembro de la familia de metaloproteasas ADAM,  $\beta$ -secretasa es una aspartil proteasa unida a membrana, también llamada BACE. Ambas secretasas clivan el ectodominio de APP en distintos sitios, dando como resultado dos fragmentos denominados según la secretasa involucrada: APP $\alpha$  y APP $\beta$ . Luego de que ocurren estos clivajes, la  $\gamma$ -secretasa procesa el dominio transmembrana resultante del fragmento C-terminal de APP ( $\alpha$ -CTF y  $\beta$ -CTF) produciendo dos fragmentos más

pequeños llamados p3 (si es cortado previamente por  $\alpha$ -secretasa) ó  $A\beta$  (si es cortado previamente por  $\beta$ -secretasa). El fragmento p3 se disuelve fácilmente en el cerebro, pero el segundo no lo hace y por el contrario se acumula formando placas. El fragmento  $A\beta$  puede tener 40 o 42 aminoácidos ( $A\beta_{1-40}$  o  $A\beta_{1-42}$ ). La forma 1-42 es neurotóxica y se agrega más fácilmente en placas (**Figura 1**). Las mutaciones de APP podrían estar localizadas en la parte extracelular de la proteína—relacionada con los sitios de corte de las secretasas—favoreciendo la acumulación de la proteína en el espacio intercelular y formando las características placas de Amiloide (Wilquet y De Strooper, 2004).

(ii) Presenilinas: Existen dos de estas proteínas, presenilina 1 (PS1), localizada en el cromosoma 14 y presenilina 2 (PS2) localizada en el cromosoma 1. Mutaciones en estas proteínas son conocidas causas de EA debido a la acumulación de placas de amiloide.

(iii) Apolipoproteína E (APOE): localizado en el cromosoma 19, participa en el transporte de colesterol en la sangre a través del cuerpo. Hay 3 alelos para APOE:  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$ . No es que una mutación en este gen cause EA, es solamente que la ocurrencia natural del alelo  $\epsilon 4$  es un factor de riesgo.

(iv)  $\alpha$ -2-macroglobulina: se encontró en EA que existía un polimorfismo en una región intrónica de este gen, localizado en el cromosoma 21.

Entre los factores de riesgo que se han asociado a la aparición de la EA de tipo esporádico están:

(i) edad

(ii) acumulación de  $\beta$ -amiloide

(iii) agregación de tau para formar las fibras helioidales pareadas (PHFs), que conforman los ovillos neurofibrilares (ONFs) presentes en el interior de la célula.

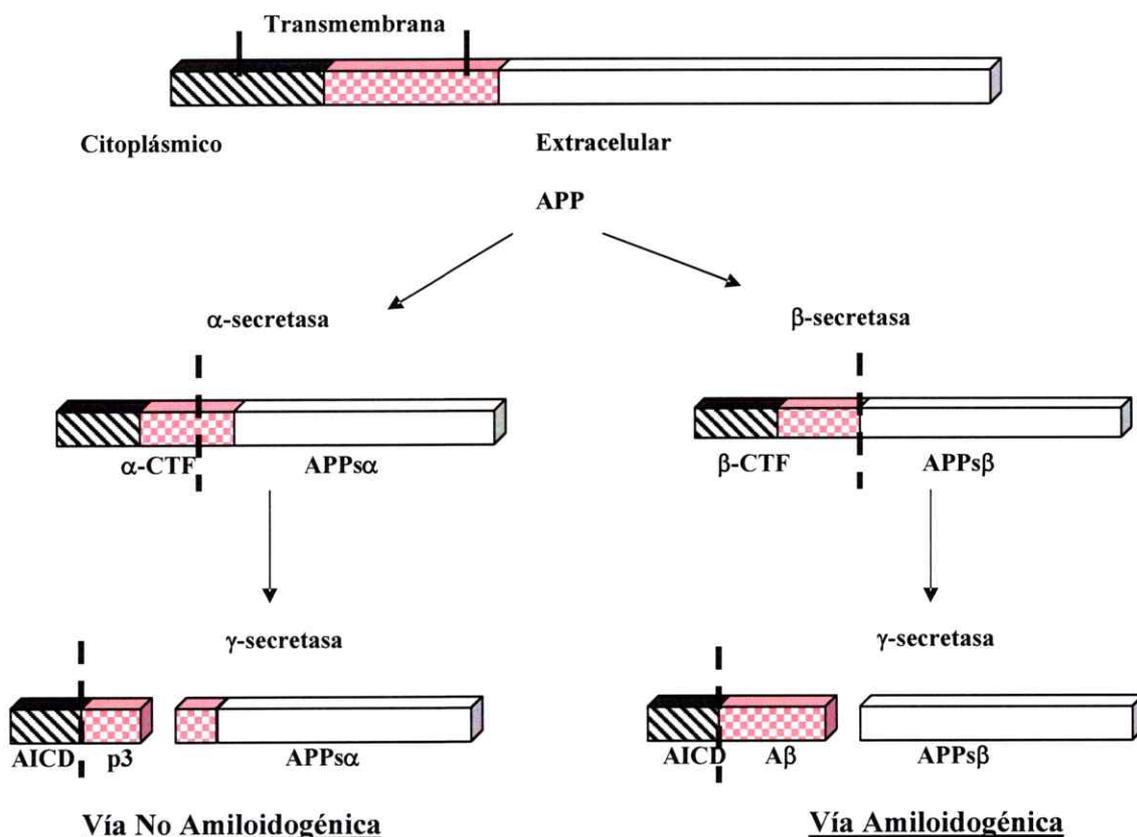
(iv) Respuesta inflamatoria: Debido a una reacción de las microglías frente a las placas amiloides.

(v) Estrés oxidativo: en EA ciertos factores como la placa de amiloide y la inflamación pueden causar daño en la mitocondria, produciendo radicales libres altamente reactivos en la célula lo cual a su vez causa el rompimiento de tejidos y la alteración o daño del DNA.

(vi) Calcio: la acumulación del péptido amiloide como placas puede causar una entrada excesiva de calcio a la célula, lo cual es tóxico para el normal funcionamiento de la neurona.

### **3.3 Proteína tau. Función fisiológica y participación en la EA**

Las MAPs son proteínas de alto peso molecular (>200kDa) encargadas de estabilizar a los microtúbulos en la formación de la red de citoesqueleto. Entre ellas está la proteína de bajo peso molecular denominada tau (45-62kDa), la cual se une a los microtúbulos por medio de unas repeticiones en su segmento C-terminal, denominadas dominios de unión a microtúbulos. Tau posee de 3 a 4 repeticiones dependiendo de la isoforma (Maccioni et al., 1988). Esta proteína, así como el resto de las MAPs, disminuye la concentración crítica de tubulina que se necesita para comenzar el proceso de polimerización de microtúbulos, estabilizándolos en su extremo positivo (Witman et al., 1976; Farias et al., 1992). Ésta es la principal función descrita para tau en los

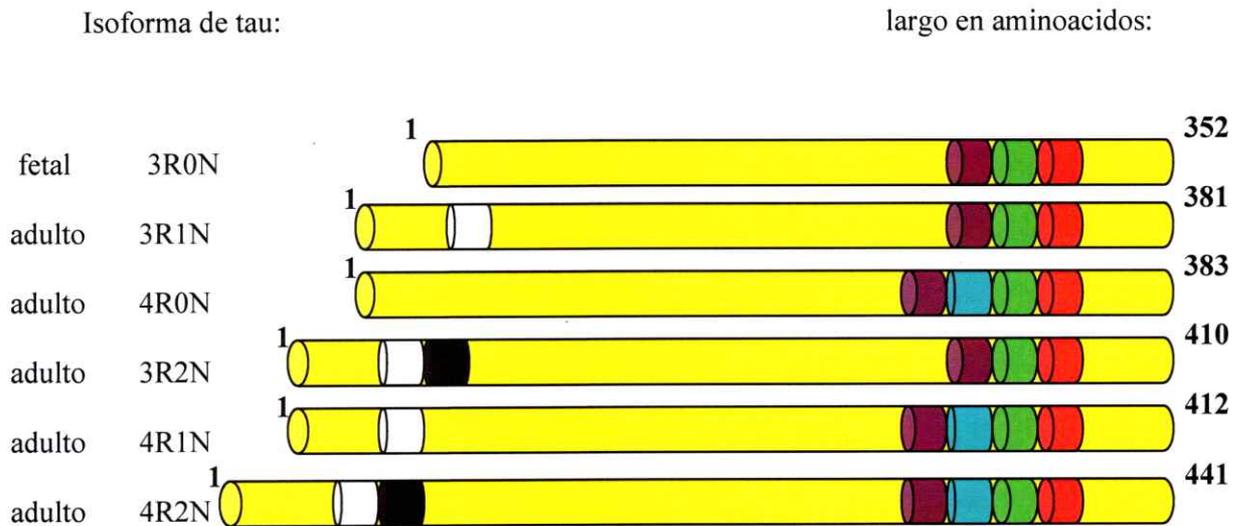


**Figura 1:** Modelo del procesamiento de la proteína precursora de amiloide (APP) por las secretasas  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ . La hidrólisis del APP puede ocurrir según la vía no amiloidogénica, como la  $\alpha$ -secretasa, lo que produce APPs $\alpha$ , o bien según la vía amiloidogénica efectuado por la  $\beta$ -secretasa y lo cual produce un fragmento más pequeño llamado APPs $\beta$ . La  $\gamma$ -secretasa corta luego de las secretasas anteriores produciendo un péptido pequeño llamado p3 (si proviene de APPs $\alpha$ ) el cual se disuelve fácilmente, o bien el péptido amiloide A $\beta$  que puede consistir en 40 o 42 amino ácidos. Este último es el que se acumula formando placas.

procesos de neuritogénesis y axiogénesis. Los microtúbulos asociados a tau con 4 repeticiones tienen mayor estabilidad *in vivo*, en términos de resistencia a nocodazol, que aquellos asociados a tau con sólo 3 repeticiones (Lee y Rook, 1992). Además, la expresión de tau en células no neuronales produce la extensión de procesos debidos a la polimerización y estabilización de microtúbulos (Lee and Rook, 1992). Tau también se une a los microfilamentos de actina por medio de uno de sus dominios de unión a microtúbulos (Moraga et al, 1993; Correas et al., 1990).

Se han descrito localizaciones subcelulares de la proteína tau diferentes a la citosólica, éstas son la localización nuclear (Cross et al., 2000; Sjöberg et al., 2006) y la localización en membrana (Brandt et al., 1995; Arrasate et al., 2000; Maas et al., 2000; Ekinci and Shea, 2000; Klein et al., 2002), lo cual podría conferirle otro tipo de funciones adicionales a la estabilización de citoesqueleto.

La proteína tau es codificada a partir de un solo gen ubicado en el cromosoma 17, sus 6 isoformas son producto del splicing alternativo de este gen, las cuales varían en el número de repeticiones en su extremo N-terminal y en el número de dominios de unión a microtúbulos en su extremo C-terminal (**Figura 2**) (Revisado por Maccioni y Cambiazo, 1995, y por Andreadis, 2005). La expresión de las distintas isoformas de tau difiere entre el sistema nervioso central y el periférico, y durante el desarrollo. De este modo, en el cerebro de rata por ejemplo, la tau fetal—que es la isoforma más pequeña—se expresa desde el estado embrionario E13. Desde el día postnatal P8, esta isoforma disminuye y las nuevas isoformas, llamadas isoformas de adulto, comienzan a expresarse. En general, tau es una proteína altamente soluble con una mayoría de residuos hidrofílicos; éstas



**Figura 2:** Esquema de las diferentes isoformas de tau. De las 6 isoformas de tau, la más pequeña es expresada en feto, mientras que las demás se expresan a partir de periodos postnatales. Su diferencia en tamaño es producto de la presencia o ausencia de los exones 2, 3 y 10. Los exones 2 y 3 (blanco y negro respectivamente) representan los dominios N-terminal, el exón 10 (en celeste) representa la repetición extra de unión a microtúbulos de las isoformas con 4 repeticiones en el extremo C-terminal.

características le confieren una estructura nativa desplegada, y una resistencia al calor y a tratamientos con ácido.

La función de tau es regulada post-traduccionalmente de varias maneras, principalmente por medio de fosforilaciones, ubiquitinaciones y O-glicosilaciones.

Debido a los objetivos de esta tesis, se dará énfasis a las fosforilaciones. Estas ocurren en dos tipos de residuos:

(1) **En residuos Ser/Thr:** ocurren principalmente en la región C-terminal, modificando la afinidad de tau por los microtúbulos (Billingsley y Kinkaid 1997; Alvarez et al., 1999; Biernat et al., 1999; Taniguchi et al., 2001). Un desbalance en las actividades de las quinasas responsables conllevan a la hiperfosforilación de tau, produciendo la formación de los filamentos helicoilados pareados (PHFs), que son elementos que componen a los ovillos neurofibrilares (ONFs) (Billingsley y Kinkaid, 1997). La **Tabla 1** resume las quinasas implicadas en este tipo de fosforilación junto con los residuos afectados (también descrita en Rojo et al., 2006).

(2) **En residuos Tyr:** Este tipo de fosforilación se ha propuesto como otro de los elementos importantes en el proceso de autoagregación de la proteína (Vega et al., 2005). Recientemente se han descrito: Tyr18 fosforilada principalmente por la quinasa Fyn aunque también puede ser fosforilada por Src (Lee et al., 2004), Tyr29 fosforilada *in vitro* por la quinasa Lck (Williamson et al., 2002), y Tyr 394 fosforilada por la quinasa c-Abl (Derkinderen et al., 2005).



En esta tesis nos enfocaremos en las Ser/Thr quinasas cdk5 y Gsk3 $\beta$ , y en la Tyr quinasa Fyn:

**a) Cdk5-p35:** Es un miembro de las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), las cuales están involucradas en la regulación del ciclo celular, sin embargo, cdk5 es uno de los pocos miembros de esta familia con funciones no relacionadas con el ciclo celular (revisado por Maccioni et al., 2001b). Se expresa en riñón, testículos, ovarios y cerebro (Lee et al., 2004b). La activación de cdk5 es regulada por dos subunidades presentes en cerebro, llamadas p35 y p39 (Paglini et al., 1998; Amin et al., 2002). El activador p35 es hidrolizado por calpaína, dando como resultado dos fragmentos: p10 (correspondiente al segmento N-terminal) y p25 (correspondiente al segmento C-terminal). p25 se asocia a cdk5 mostrando una actividad más estable y duradera pero no mayor que la actividad producida por p35 (Patrick et al., 1999; Cruz et al., 2003). El complejo cdk5/p35, o el más estable cdk5/p25, fosforila a tau en epitopos presentes en los PHFs. Este complejo la fosforila en residuos Ser/Thr seguidos por Pro y también en residuos que facilitan la posterior fosforilación por otras proteínas quinasas como Gsk3 (llamados sitios primed) (Cho y Johnson, 2003). La sobreexpresión o la sobreactivación del complejo produce una hiperfosforilación de tau, causando la autoagregación de tau y la posterior generación de los filamentos helicoidales pareados (PHFs).

**b) Gsk3 $\beta$ :** La proteína GSK3 $\beta$  de 46kDa se expresa en pulmón, riñones y cerebro (Lau et al., 1999). Para algunos sustratos, Gsk3 necesita de una fosforilación previa del

sustrato en un residuo Ser localizado en el lado C-terminal de su sitio de reconocimiento, éstos son llamados sitios de modificación establecida (“primed”); tau es un ejemplo de estos sitios. Pero hay otros casos en que el sustrato no necesita estar previamente fosforilado, como el caso de  $\beta$ -catenina; estos son llamados sitios de modificación no establecida (“unprimed”). Gsk3 $\beta$  cumple varias funciones implicadas en el desarrollo embrionario, en la regulación de la expresión génica y también en enfermedades neurodegenerativas. En la EA, la quinasa GSK3 $\beta$  fosforila a tau tanto en sitios de modificación establecida como en sitios de modificación no establecida. En pacientes que padecen esta patología, GSK3 $\beta$  colocaliza con los ovillos neurofibrilares (ONFs). En otros modelos, presinilina 1 (PS1), otra proteína que participa en esta enfermedad, se une al complejo GSK3 $\beta$ /tau activando a la quinasa y ayudando de este modo a la fosforilación de tau.

c) **Fyn:** Esta proteína de 59kDa sufre *splicing* alternativo del exon 7 en el gen *fyn* lo cual origina dos isoformas: FynT, expresada en células de origen hematopoiético y FynB, la cual es más ubicua y está en altos niveles en el cerebro. Como miembro de la familia de quinasas Src, Fyn posee un dominio de homología a Src (SH), el cual regula las interacciones proteína-proteína.

La activación se debe a la fosforilación en Tyr420 (Tyr416 en Src); éste es un evento de autofosforilación. Por el contrario, la inactivación se produce por fosforilación en Tyr531 (Tyr527 en Src) llevada a cabo por la quinasa Csk (Kypta et al., 1988; Cheng et

al., 1996). Fyn es una quinasa no receptora de membrana que participa en varios sistemas de transducción de señales dependiendo del tipo de célula donde esté localizado.

Fyn se une a tau a través de su dominio SH3. Este dominio reconoce a uno de los motivos ricos en prolina de tau, PXXP, específicamente entre los residuos Pro233 y Pro236 (enumerados según la secuencia de la isoforma mayor 4R2N) (Lee et al., 1998). Entre las 5 Tyr que posee la proteína tau, Fyn sólo fosforila a Tyr18 (Lee et al., 2004). Se piensa que Src también puede fosforilar a tau en otras de las Tyr y además en Tyr18, pero en este caso parece ser que lo hace en menor cantidad que Fyn (Bhaskar et al., 2005).

Fyn también participa en la EA, ésta es activada por el péptido amiloide produciendo la fosforilación de otras proteínas como respuesta (Williamson et al., 2002). En el hipocampo de ratones transgénicos para Fyn, ocurre una disminución en los niveles de terminales presinápticos reactivos para sinaptofisina (Ching et al., 2004), una degeneración progresiva de la sinapsis que también se ha descrito en la EA. Fyn también puede fosforilar y activar a la quinasa GSK3 $\beta$  favoreciendo de este modo la hiperfosforilación de tau. Recientemente se describió que Fyn se encuentra presente en mayores cantidades en la membrana plasmática de pacientes con Alzheimer, y que esto se correlaciona con la severidad de la enfermedad (Ho et al., 2005). También se observó en los mismos pacientes que los niveles de Fyn disminuyen en los terminales sinápticos incrementando en los cuerpos celulares neuronales, colocalizándose con los ovillos neurofibrilares.

### 3.4 Tau asociada a Membrana Plasmática y “balsas lipídicas”

El extremo C-terminal de tau tiene funciones relacionadas con la unión a microtúbulos y a microfilamentos de actina al igual que el resto de los miembros de la familia de las MAPs. El otro extremo, N-terminal, es una proyección de la proteína que no participa en la estabilización de microtúbulos ni en la extensión de procesos (Lee and Rook, 1992; Brandt and Lee, 1993; Léger et al., 1994). En 1995, Brandt y colaboradores observaron que cuando transfectaban sólo este dominio de tau en células PC12, éste se localizaba en la membrana plasmática. La interacción de tau con la membrana era independiente de la isoforma, todas incluyendo la tau de alto peso molecular eran encontradas en la membrana plasmática. Finalmente, este grupo sugirió que esta asociación con la membrana no era directa sino por medio de otras proteínas.

La asociación de tau con la membrana plasmática puede verse afectada según su patrón de fosforilación (Arrasate et al., 2000; Maas et al., 2000; Ekinci and Shea, 2000). Tau desfosforilada en Ser199 (epitopo del anticuerpo Tau-1), es detectada en la membrana plasmática. Cuando la fosforilación de tau en este tipo de residuos aumenta, tau es liberada de la membrana. Si se toma en cuenta que la hiperfosforilación de tau en epitopos Ser/Thr afecta su interacción con microtúbulos, su liberación de la membrana podría ayudar a que esta subpoblación específica de tau migre al citosol, acumulándose y favoreciendo su agregación. Esta idea concuerda con la menor cantidad de tau fosforilada en epitopos Ser396/404 y Ser199 encontrados en la membrana plasmática (Maas et al., 2000; Ekinci y Shea, 2000). Sin embargo, hasta el momento todos los

estudios se han realizado sobre fosforilaciones de tipo Ser/Thr y no sobre fosforilaciones en Tyr, de lo cual aún no se tiene amplia información.

Se ha propuesto que tau se une a la membrana plasmática en asociación con el citoesqueleto de actina subcortical presente en la periferia celular (Maas et al., 2000). Tau se une a actina por medio de las mismas repeticiones requeridas para su unión a microtúbulos (Correas et al., 1990; Moraga et al., 1993), lo cual también es regulado por fosforilaciones. Maas et al., (2000) propusieron que la acumulación de tau en compartimentos somatodendríticos observado en la EA podrían resultar de la pérdida de interacción tau/actina cortical debido al aumento en la fosforilación de tau en epitopos tipo PHF.

Para oligodendrocitos, se propuso un modelo para el proceso de mielinización. En él, Fyn interactúa con la membrana plasmática y con tau, y a su vez tau interactúa con los microtúbulos. Todo este complejo estaría presente en las "balsas lipídicas". Esto fue observado en experimentos de co-inmunoprecipitación realizados a partir de fracciones de "balsas lipídicas" (Klein et al., 2002).

Las "balsas lipídicas" se forman por el enriquecimiento de colesterol y de esfingolípidos en la membrana plasmática, esto le confiere características diferentes al resto de la membrana. Los esfingolípidos tienen cadenas largas y saturadas en vez de las cortas e insaturadas de los fosfolípidos, esto hace que la transición de la fase  $L_{\beta}$  (gel ordenado) a la fase  $L_{\alpha}$  (líquido cristalino) en los esfingolípidos ocurra cerca de la temperatura fisiológica  $37^{\circ}\text{C}$  en vez de lo normal que es  $0^{\circ}\text{C}$  o por debajo de los  $0^{\circ}\text{C}$ . Estas características, en conjunto con que los esfingolípidos están lateralmente más

compactos, los segregan del resto de los dominios desordenados de los fosfolípidos provocando su tendencia a agregarse. El conjunto de estas características bioquímicas hacen posible su purificación tomando ventaja de su insolubilidad a detergentes no iónicos tales como Triton X-100 a 4°C, metodología que es ampliamente utilizada en la actualidad.

El nombre “balsas lipídicas” se origina en la menor densidad observada por medio de centrifugaciones de gradientes de densidad. Las “balsas lipídicas” pueden estar invaginadas en la membrana o no, dependiendo de si están compuestos de una proteína llamada caveolina. Esta interactúa con la membrana dando origen a las llamadas caveolas, las cuales son consideradas como formas especializadas de “balsas lipídicas” implicadas en transducción de señales. El tamaño de las “balsas lipídicas” fluctúa entre los 50 y 100 nm. Se cree que las “balsas lipídicas” están involucradas en transducción de señales, posiblemente permitiendo que un grupo de proteínas que participan en una misma vía se asocien mientras aísla otras de distintas vías, disminuyendo el entrecruzamiento. (Tsui-Pierchala et al., 2002; Foster et al., 2003; Blonder et al., 2004; revisado por Brown y London, 1998).

Las “balsas lipídicas” también están implicadas en la señalización por integrinas y en el procesamiento de la proteína Precursora de Amiloide (APP) (Parkin et al., 1999; Eehalt et al., 2003). La generación de A $\beta$  debido a la proteólisis de APP por  $\beta$ -secretasa parece ocurrir en las “balsas lipídicas”, e incrementos en los niveles de colesterol en la membrana plasmática pueden aumentar la formación de estos microdominios y por ende la producción de A $\beta$  (Marlow et al., 2003; Eehalt et al., 2003).

Además la quinasa Fyn, que fosforila a tau en Tyr18 se ubica principalmente en estos microdominios, así como también se ha descrito la presencia de tau en ellos (Klein et al., 2002; Kawarabayashi et al., 2004).

El modelo experimental escogido para la realización de esta tesis es la incubación de cultivos neuronales con el péptido amiloide que conforma las placas. Este péptido es generado por el clivaje de una proteína precursora de amiloide (APP). Generalmente este péptido consiste en 42 aminoácidos por lo que se denomina péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Sin embargo, recientemente se ha descrito otra variante de este mismo péptido, de tamaño más pequeño y altamente reactivo, el péptido A $\beta$ <sub>25-35</sub> (Varadarajan et al., 2001; Clementi y Misiti, 2005). Nuestro laboratorio ha utilizado ambos modelos de estudio (Sáez et al., 2006) y en este trabajo de tesis se utilizó solamente el péptido más pequeño.

En este trabajo de tesis doctoral estudiamos las variaciones en los patrones de fosforilación de tau, tanto en Tyr como en Ser/Thr, en respuesta a la incubación con el péptido amiloide A $\beta$ <sub>25-35</sub>. Estudiamos además la dependencia de estas fosforilaciones con las quinasas Fyn, cdk5 y Gsk3 $\beta$ , y analizamos finalmente qué es lo que ocurre con este subconjunto de proteínas en las “balsas lipídicas”.

#### **4. HIPÓTESIS GENERAL**

De acuerdo a los antecedentes presentados anteriormente que contemplan la asociación de tau, Fyn y Gsk3 $\beta$  a las “balsas lipídicas”, la fosforilación de tau en Tyr18 por Fyn, y la determinante participación de tau, Fyn, cdk5 y Gsk3 $\beta$  en la EA, postulamos que: **“El péptido amiloide A $\beta$ <sub>25-35</sub> induce una relocalización de la quinasa cdk5 en las “balsas lipídicas”, y tanto cdk5 como Gsk3 $\beta$  y Fyn fosforilan a tau en residuos Ser396/404, Thr231 y Tyr18 respectivamente, en este compartimiento subcelular”**

#### **5. OBJETIVO GENERAL**

El principal objetivo de esta tesis es caracterizar la asociación de tau a las “balsas lipídicas” y determinar la responsabilidad de Fyn en esta localización subcelular de tau. Dadas las evidencias obtenidas anteriormente por nuestro laboratorio, que vinculan cambios en la fosforilación de tau con la EA, buscamos la relación de este evento molecular vinculado a la fosforilación de tau con la subpoblación asociada a las “balsas lipídicas”.

## 5.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Estudiar los patrones de fosforilación de tau en Tyr18, Ser396/404 y Thr231 cuando está asociada a las “balsas lipídicas”.
2. Analizar el papel de la quinasa Fyn en la asociación de tau con las “balsas lipídicas” mediante el análisis de:
  - a) Efecto de las fosforilaciones de tau en Ser396/404 y Thr231 sobre su asociación con Fyn y su fosforilación en Tyr18.
  - b) Dependencia de la fosforilación en Tyr18 de tau en relación a su localización subcelular
  - c) Dependencia de tau por Fyn en relación a su localización en las “balsas lipídicas”
- 3.- Determinar la presencia de las quinasas Ser/Thr de tau, cdk5 y Gsk3 $\beta$  asociadas a las “balsas lipídicas” en células de neuroblastoma SHSY5Y.
- 4.- Estudiar el efecto del péptido amiloide A $\beta$ <sub>25-35</sub> en la fosforilación de tau en Tyr18, Ser396/404 y Thr231, y en la distribución en las “balsas lipídicas” tanto de tau como de cdk5 y Gsk3 $\beta$ .

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

**6.1 Material Biológico:** Se utilizaron 3 líneas celulares de mamífero:

- SHSY5Y neuroblastoma humano
- N2a neuroblastoma de ratón
- Cos7 riñón de simio

También se utilizó la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  para los procesos de amplificación y subclonamiento de los cDNA de interés.

### 6.2 Reactivos:

**GIBCO Laboratories Life Technologies, Inc.:** Medios de cultivo: MEM Eagle mínimo, F12 mezcla de nutrientes, DMEM Dulbecco's Eagle modificado, Opti-Mem I; Antibióticos-Antimicóticos 100x; Tripsina-EDTA 10x; MEM Aminoácidos no esenciales 100x; Suero Fetal de Bovino

**Polyscience:** Suero Fetal de Ternero.

**SIGMA:** Fibronectina, Inhibidor de tripsina del poroto se soja, Optiprep gradiente de densidad, Faloidina-rodamina, Bromuro de etidio,  $\beta$ -mercaptoetanol, poli-L-lisina, Laminina, Piruvato de sodio, Azida de sodio, Azul de Coomassie G-250,

Albúmina de suero de bovino (BSA), Hepes, Mes, Dnasa I, cocktail de inhibidores de proteasas 100X, PMSF, glicina, cloruro de sodio, Tris Base, Tween-20

**Perkin Elmer:** Reactivo ECL para Western blotting

**MERCK:** Triton X-100, etanol, metanol, 2-isopropanol, ácido clorhídrico

**Oncogene:** Proteína G PLUS agarosa.

**Invitrogen:** Lipofectamina 2000, plasmidio TOPO TA.

**BIO RAD:** Estándar de proteínas Precision Plus All Blue.

### **6.3 Anticuerpos:**

Tau5 monoclonal que reconoce todas las isoformas de tau independientes de su estado de fosforilación fue donado por el Dr. L. Binder (EEUU)

Anticuerpos 9G3 monoclonal y PY18 policlonal. Ambos reconocen tau fosforilada en Tyr18. Fueron donados por Dr. G. Lee (EEUU)

PHF-1 monoclonal que reconoce tau fosforilada en Ser396/404, CP17 monoclonal IgG y CP9 monoclonal IgM que reconocen tau fosforilada en Thr231. Fueron donados por Dr. P. Davies (EE UU)

JM policlonal que reconoce tau total independiente del estado de fosforilación. Donado por Dr. A. Takashima (Japón)

cdk5 policlonal C8 que reconoce cdk5 total. Donado por Dr. S. Brady (EEUU)

Anticuerpo monoclonal contra el Receptor de Transferrina TfR. Donado por Dr K. Simons (Alemania) y por los Drs. J. Balsamo y J. Lilien (EEUU)

Adquiridos en **Santa Cruz Biotechnology**. Anticuerpos contra cdk5 monoclonal J3 y también policlonal C8 que reconocen cdk5 total; cdk5 fosfo-Tyr15 policlonal que reconoce cdk5 fosforilada en Tyr15; p35 N20 policlonal que reconoce el segmento amino terminal de p35; p35 C19 policlonal que reconoce el segmento carboxilo terminal de p35; Erk1 policlonal que reconoce Erk1 total; Fyn policlonal que reconoce niveles totales de la quinasa Fyn; Src policlonal que reconoce niveles totales de la quinasa Src

Adquiridos en **BD Transduction Laboratories**. Flotillin-1 que reconoce niveles totales del marcador de "balsas lipídicas" flotilina-1

Adquiridos en **Upstate**. Src phospho-Tyr416 monoclonal que reconoce Src fosforilada en su sitio de activación Tyr416, reacciona también con otros miembros de la familia quinasa en el sitio de activación equivalente, como Fyn

Adquiridos en **Jackson Laboratories**. Anticuerpos secundarios acoplados a HRP (peroxidasa de rábano) para Western Blot: anti mouse IgG, IgM, anti rabbit IgG, anti goat IgG

#### **6.4 Cultivo celular**

La línea de neuroblastoma humano SHSY5Y fue crecida en una mezcla 1:1 de medios MEM y F12 suplementada con Hepes 15mM, MEM aminoácidos no esenciales 100x, 10% suero fetal de bovino y antibióticos 100x (100U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomycin) a 37° C y 5% CO<sub>2</sub>. Las líneas celulares N2a y Cos7 fueron crecidas en medio DMEM suplementado con 5% suero fetal de bovino y antibióticos, a 37° C y 5% CO<sub>2</sub>. Para todos los casos, al llegar a 70-80% de confluencia, las células fueron lavadas en tampón PBS 1X estéril y calentado a 37°C 2 veces, tripsinizadas con una solución de tripsina-EDTA 0.05% durante 2 a 3 min, luego centrifugadas en medio de cultivo y divididas en varias placas.

### 6.5 Obtención de las “balsas lipídicas” mediante centrifugación de gradientes de densidad de Optiprep

Para obtener fracciones enriquecidas en “balsas lipídicas” se usó el protocolo de gradientes de Optiprep en vez de gradientes de sacarosa. Las células provenientes de 2 placas de 100mm para el caso de SHSY5Y y N2a (en 70% confluencia) o de 1 placa de 100mm para el caso de Cos7 (en 70% confluencia) fueron lisadas en 2 ml de tampón MBS 1X con 1% Triton X-100 (MES 25mM, NaCl 150mM ajustado a pH 6.5 con NaOH) con inhibidores de proteasas y fosfatasas (2mg/ml aprotinina, 2mg/ml leupeptina, 1mg/ml pepstatina, 100mg/ml PMSF, 1mM ortovanadato de sodio y 20 mM fluoruro de sodio). Luego de ser homogenizadas con 10 golpes en un homogenizador de vidrio fueron incubadas en hielo durante 1 h con DNasa I (20 µg/ml). El gradiente de Optiprep fue preparado de la siguiente manera: la solución que va en el fondo del tubo tiene 40% de Optiprep, ésta se hizo mezclando un volumen del homogenizado total con dos volúmenes del Optiprep original que viene al 60%, las capas que siguen en orden ascendente en el tubo son 30% y 5% obtenidas mezclando 60% Optiprep con MBS 1X.

Los tubos con el material así obtenido fueron centrifugados en una ultracentrífuga Beckman Optima MAX-E a 43.000 rpm (~150.000 xg) durante 16h a 4°C (rotor MLS50 swinging bucket). Luego se colectaron 9 fracciones de 200 µl cada una desde la parte superior del tubo hacia el fondo. Volúmenes iguales de 60µl de cada una de las fracciones fueron analizadas por Western blot para marcadores de “balsas lipídicas” (Flotilina-1) y marcadores de fracciones de no “balsas lipídicas” (Erk1, Receptor de

Transferrina TfR). Las fracciones 3 a la 5 fueron consideradas como “balsas lipídicas” mientras que las fracciones 7 a la 9 fueron consideradas como fracciones de no “balsas lipídicas”.

### **6.6 Electroforesis en Geles de Poliacrilamida**

Los extractos obtenidos en las preparaciones de “balsas lipídicas” o bien en lisados totales de células fueron hervidos por 5 min en tampón Laemli (0,3M Tris pH 6,8; 5% SDS; 0,7M  $\beta$ -mercaptoetanol; 20% glicerol; 0,025% azul de bromofenol) para desnaturar a las proteínas, luego fueron brevemente centrifugadas y fraccionadas en un mini gel de poliacrilamida al 7 - 8%. En los casos de experimentos de co-inmunoprecipitaciones, las muestras fueron hervidas en tampón Laemli sin  $\beta$ -mercaptoetanol. Los mini geles fueron corridos por 1 h a 40mA en tampón Tris-Glicina (25mM Tris pH 8,3; 190mM glicina; 0,1% SDS).

### **6.7 Inmunodetecciones**

Luego de la electroforesis de proteínas en el gel, éstas fueron transferidas a una membrana de immobilon<sup>TM</sup>-P en un sistema de transferencia semi seco con tampón Tris-Glicina-Metanol por 36min a 10V o a una membrana de nitrocelulosa en un sistema de transferencia en húmedo con tampón Tris-Glicina-Metanol por 1h a 100V. Las membranas fueron lavadas brevemente en tampón TBS-T (50mM Tris, 150mM NaCl pH 7.6 con 0.1% Tween-20), bloqueadas con BSA al 3% en TBS-T por 1 h a temperatura

ambiente e incubadas con los anticuerpos correspondientes. Todos los anticuerpos fueron preparados en tampón TBS-T; los anticuerpos primarios fueron incubados durante toda la noche a 4°C y los secundarios por 1h a temperatura ambiente. Luego de cada incubación con anticuerpos, las membranas fueron lavadas 3 veces por 10 min cada vez con TBS-T. Finalmente el blot es revelado usando el reactivo ECL PLUS (Perkin Elmer).

### 6.8 Inmunoprecipitaciones

Las células provenientes de 1 o 2 placas de 100mm fueron homogenizadas en tampón de lisis con 2% Nonidet NP40 (25mM Tris, 150mM NaCl, pH 7.2) con Dnasa I e inhibidores de proteasas y fosfatasas (2mg/ml aprotinina, 2mg/ml leupeptina, 1mg/ml pepstatina, 100mg/ml PMSF, 1mM ortovanadato de sodio y 20 mM fluoruro de sodio). Los homogenizados fueron incubados por 1h en hielo y centrifugados durante 10min a 4°C a 13.000xg. Se tomaron los sobrenadantes y se cuantificaron las proteínas totales usando la metodología de BCA. Para cada inmunoprecipitación se usaron cantidades de proteínas totales entre 500 µg y 1000 µg. Antes de incubar las muestras con anticuerpos, éstas fueron sometidas a eliminación de unión inespecífica con las esferas magnéticas unidas a proteína G o a anti-mouse IgM durante 1h a 4°C en agitación suave. Luego de esto se procedió a incubar las muestras con los anticuerpos de interés durante toda la noche a 4°C en agitación suave. Para esto se utilizaron 5µl de anticuerpo concentrado como Fyn o 100µl de las sopas monoclonales (CP17 o CP9, 9G3, PHF-1). Todas las

sopas monoclonales fueron concentradas primero formando los inmunocomplejos con las esferas magnéticas correspondientes durante 1h a 4°C. Para esto se usaron 30µl de proteína G o 60µl de anti-mouse IgM. Luego de la incubación con el anticuerpo primario concentrado, se incubó durante 1h a 4°C con las esferas magnéticas correspondientes. Las muestras finalmente fueron lavadas 3 veces durante 5 min cada una con tampón de lisis pero con 1% Triton X-100 en vez de 2% Nonidet NP40. Luego se les agregó 20µl de Tampón Laemli 4X y se cargaron en un gel al 7 - 8% de poliacrilamida.

### **6.9 Transfecciones Transientes**

La línea de neuroblastoma de ratón N2a fueron transfectadas de forma transiente con 3 tipos de cDNAs de tau: tau fetal humana, tau mutante Y18F o tau con delección en un dominio rico en prolina ΔP. Éstos estaban insertos en el plasmidio pRcCMV (donado por la Dra. Gloria Lee) usando el protocolo de Lipofectamina 2000 (Invitrogen). En éste se mezclan 300µl de medio OptiMEM I sin suero con 8µl de Lipofectamina 2000 (por cada placa de 100mm), se incuba por 5min a temperatura ambiente, luego se le agrega una mezcla de 300µl de medio OptiMEM I con el cDNA a transfectar y se incuba durante 20min a temperatura ambiente. Para una placa de 100mm se usaron 4 µg de DNA y para una de 60mm, 1,5 µg. Mientras tanto las células fueron lavadas en PBS tibio 2 veces y cambiadas a medio OptiMEM I son suero y sin antibióticos. Pasados los 20min de incubación, la mezcla de DNA con Lipofectamina fue agregada a cada placa e incubada durante 4h a 37°C. Luego de este tiempo, las células fueron lavadas

cuidadosamente con PBS tibio 2 veces y se les agregó el medio fresco correspondiente a cada línea con suero fetal de bovino y antibióticos. Luego de 48h fueron homogenizadas y analizadas ya sea para extracto total o para obtención de “balsas lipídicas”.

Las células SHSY5Y fueron transfectadas con Flotilina-1-GFP (donado por la Dra. Caroline Neumann, Alemania). Las células Cos7 fueron transfectadas con tau fetal humana o las mutantes Y18F y  $\Delta P$ , y en algunos casos co-transfectadas con Fyn en el plásmido Apr8 (donados por la Dra. Lee, EEUU). Las células N2a fueron transfectadas con tau fetal humana y las mutantes Y18F y  $\Delta P$ .

#### **6.10 Preparación del péptido amiloide Abeta<sub>25-35</sub>**

El péptido fue preparado disolviendo el polvo en agua destilada ultrapura a una concentración final de 10mM. Fué luego alicuotado y guardado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **6.11 Tratamientos con el péptido amiloide Abeta<sub>25-35</sub>**

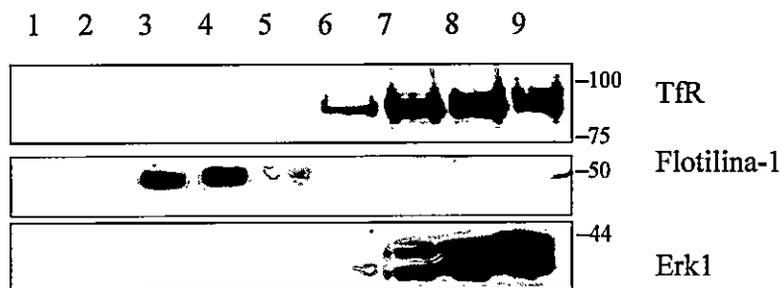
Las células SHSY5Y fueron crecidas en medio MEM-F12 con 10% suero. Los tratamientos fueron hechos añadiendo el péptido soluble directamente a la placa para obtener una concentración final de  $10\mu\text{M}$ . Las células fueron incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  con  $5\%\text{CO}_2$  por los tiempos correspondientes (1, 2, 5, 10 y 15 min). En algunos casos las células fueron pre incubadas por 1h a  $37^{\circ}\text{C}$  con el inhibidor de la quinasa cdk5, **roscovitina** a una concentración final de  $10\mu\text{M}$ , o bien preincubadas por 1h a  $37^{\circ}\text{C}$  con

el inhibidor de la quinasa Fyn **PP1** a una concentración final de 1 $\mu$ M. Para los tratamientos con roscovitina, las células fueron crecidas en placas de 100mm y se usaron para obtener fracciones enriquecidas en “balsas lipídicas”, para el caso de PP1, las células fueron crecidas en placas de 60mm y se utilizaron para analizar extractos totales.

## 7. RESULTADOS

### 7. 1. Análisis de “balsas lipídicas”

Usando la metodología de obtención de “balsas lipídicas” (Materiales y Métodos) fue posible visualizar las fracciones de “balsas lipídicas” como una franja blanca distribuida entre las capas de 30% y 5% de Optiprep. La franja blanca se rescató entre las fracciones 3, 4 y 5. Para esta Tesis, estas fracciones se consideraron como correspondientes a “balsas lipídicas” debido a que contienen gran cantidad del marcador de “balsas lipídicas”, flotilina-1, y carecen de los marcadores que no se localizan en las “balsas lipídicas”, tales como TfR y Erk1 (Figura 3). El procedimiento de obtención de fracciones de las “balsas lipídicas” más limpias (donde no se detectaban TfR y Erk1) resultaba en una baja concentración de proteínas, sin embargo dado los objetivos de esta tesis se prefirió priorizar la pureza de las fracciones sobre la concentración de proteínas obtenidas en las “balsas lipídicas”. De esta manera, se consideró como proteínas asociadas a las “balsas lipídicas” las que eran detectadas en al menos una de esas fracciones.

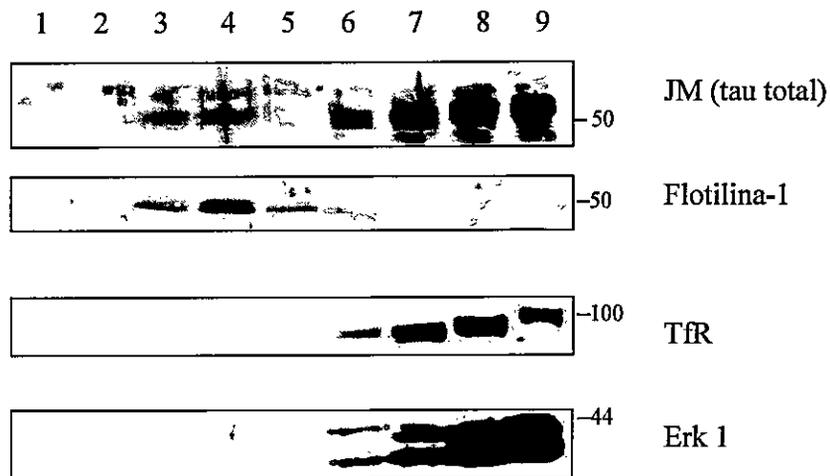


**Figura 3:** Análisis de los marcadores utilizados para analizar las fracciones de “balsas lipídicas” mediante *Western blot*. Se obtuvieron microdominios de membrana del tipo “balsas lipídicas” a partir de células SHSY5Y usando el protocolo de Triton X-100 en gradientes de Optiprep. Nueve muestras de 200 $\mu$ l cada una fueron tomadas desde el tope hacia el fondo del tubo y fraccionadas en un gel de poliacrilamida al 7%. Las fracciones 3, 4 y 5 son consideradas como balsas lipídicas debido a la presencia de marcadores de balsas lipídicas (Flotilina-1) y a la ausencia de los marcadores de “no balsas lipídicas” (Tfr y Erk1). Las fracciones 7, 8 y 9 son consideradas como “no balsas lipídicas” por la presencia de los marcadores Tfr y Erk1 y la ausencia de Flotilina-1. Las masas moleculares se indican en KDa.

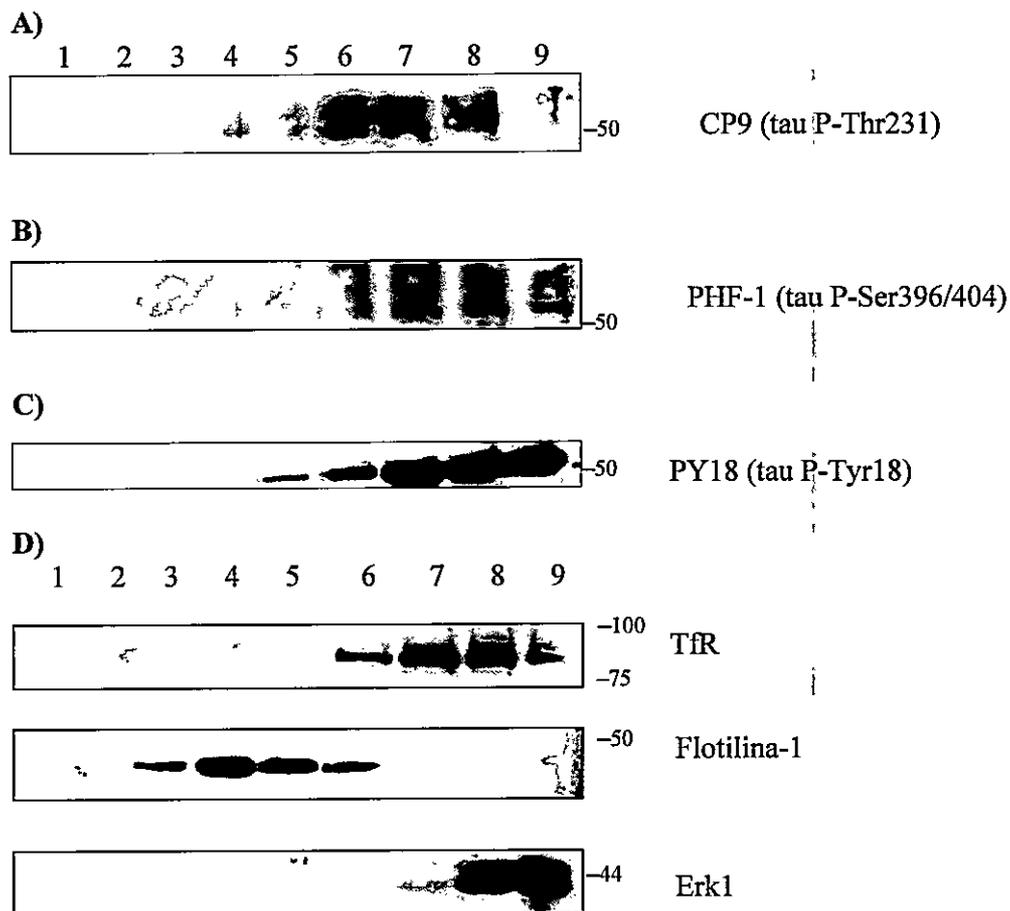
## 7.2 Fosforilación de tau asociada a las “balsas lipídicas”.

En los gradientes analizados para la obtención de las “balsas lipídicas” a partir de cultivos celulares de neuroblastoma humano SHSY5Y, se detectaron dos subpoblaciones de tau utilizando el anticuerpo policlonal JM, que reconoce todas las isoformas de tau independientes de su estado de fosforilación (Tanemura et al., 2002). Una de ellas asociada a las fracciones 3, 4 y 5 de “balsas lipídicas” y la otra mucho más abundante en las fracciones de no “balsas lipídicas” (7, 8 y 9) (**Figura 4**). La presencia mayoritaria de tau en las fracciones de no “balsas lipídicas” es concordante con la función de tau, la que se realiza principalmente en el citoplasma, donde controla la estabilización de los microtúbulos y del citoesqueleto en general (Farias et al., 2002).

Las variantes de tau fosforilada en epítomos Ser/Thr estudiadas aquí fueron los casos de fosforilación en Ser396/404, detectada con el anticuerpo PHF-1 y la fosforilación en Thr231 detectada con el anticuerpo CP9. Tau fosforilada en Thr231 fue detectada preferentemente en fracciones de no “balsas lipídicas” (**Figura 5A**). Tau fosforilada en Ser396/404 fue detectada exclusivamente en las fracciones de no “balsas lipídicas” (**Figura 5B**). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por los grupos de Maas y Ekinci (Maas et al., 2000; Ekinci y Shea, 2000), quienes demostraron que un incremento en la fosforilación de tau en Ser396/404 se correlacionaba con una pérdida de la interacción de esta proteína con la membrana plasmática. Por otro lado, la fosforilación de tau en Tyr18 fue detectada tanto en fracciones de “balsas lipídicas” como en fracciones de no “balsas lipídicas” (**Figura 5C**), indicando que no es exclusiva de “balsas lipídicas”.



**Figura 4:** Análisis de Tau total en “balsas lipídicas” mediante *Western blot*. Nueve muestras de 200 $\mu$ l cada una fueron tomadas desde el tope hacia el fondo del tubo y fraccionadas en un gel de poliacrilamida al 8%. El anticuerpo policlonal JM se usó para detectar tau total (Dr. Takashima). Las fracciones 3, 4 y 5 se consideraron como “balsas lipídicas” por la presencia de Flotilina-1. Las fracciones 7,8 y 9 son consideradas como “no balsas lipídicas” por la presencia de los marcadores TfR y Erk1. Tau está presente en las fracciones de “balsas lipídicas”, pero mayoritariamente se encuentra distribuída en las de no “balsas lipídicas”, reflejando que esta proteína cumple un rol mayoritariamente citosólico. Las masas moleculares se indican en KDa.



**Figura 5:** Análisis de la distribución de tau fosforilada en las “balsas lipídicas” mediante *Western blot*. Nueve muestras de 200 $\mu$ l cada una fueron tomadas desde la superficie hacia el fondo del tubo y fraccionadas en un gel de poliacrilamida al 8%. Se consideraron como fracciones de “balsas lipídicas” a la 3, 4 y 5 debido a la presencia del marcador Flotilina-1. Las fracciones 7,8 y 9 se consideraron como de no “balsas lipídicas” debido a la presencia de Tfr y Erk1. Tau fosforilada en Thr231 (CP9) y tau fosforilada Tyr18 (PY18) fueron detectadas en al menos una de las tres fracciones de balsas lipídicas mientras que tau fosforilada en Ser396/404 (PHF-1) fue solamente detectada en fracciones de no balsas lipídicas. La fosforilación en Tyr18 no es exclusiva de balsas lipídicas, indicando que podría estar ocurriendo también fuera de ellos. Las masas moleculares se indican en KDa.

### **7.3 Fosforilación de tau en Ser396/404 y Thr231: unión a Fyn y fosforilación en Tyr18**

#### **7.3.1 Unión de Fyn a tau fosforilada**

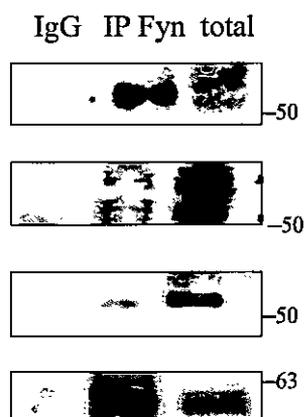
Desde el descubrimiento de tau asociada a membrana plasmática se ha propuesto que esta interacción estaría mediada por alguna proteína intermediaria, ya que tau no posee señales de localización en membrana ni dominios hidrofóbicos de transmembrana.

Debido a que la unión de tau a la membrana ocurre por medio de su extremo N-terminal, se pensó que una proteína presente en membrana y que interactúe con ese dominio podría ser un buen candidato (Klein et al., 2002). Es por esto que se ha tomado a la quinasa Fyn como elemento en estudio.

Ya que se encontraron diferencias en el patrón de fosforilación de tau asociada y no asociada a las “balsas lipídicas”, nos preguntamos de qué manera estas fosforilaciones influyen en la interacción tau/Fyn. En experimentos de co-inmunoprecipitaciones de tau con Fyn a partir de células SHSY5Y, se observó que Fyn se unía menos a tau fosforilada en Ser396/404 en comparación con tau fosforilada en Thr231 (**Figura 6**).

#### **7.3.2 Fosforilación de tau en Tyr 18**

Dado los resultados obtenidos, quisimos determinar si los niveles de fosforilación de tau en Tyr18 eran afectados por la fosforilación en Ser396/404 de la misma manera en

**IP:****Blot:**

9G3 (tau P-Tyr18)

CP9 (tau P-Thr231)

PHF-1 (tau P-Ser396/404)

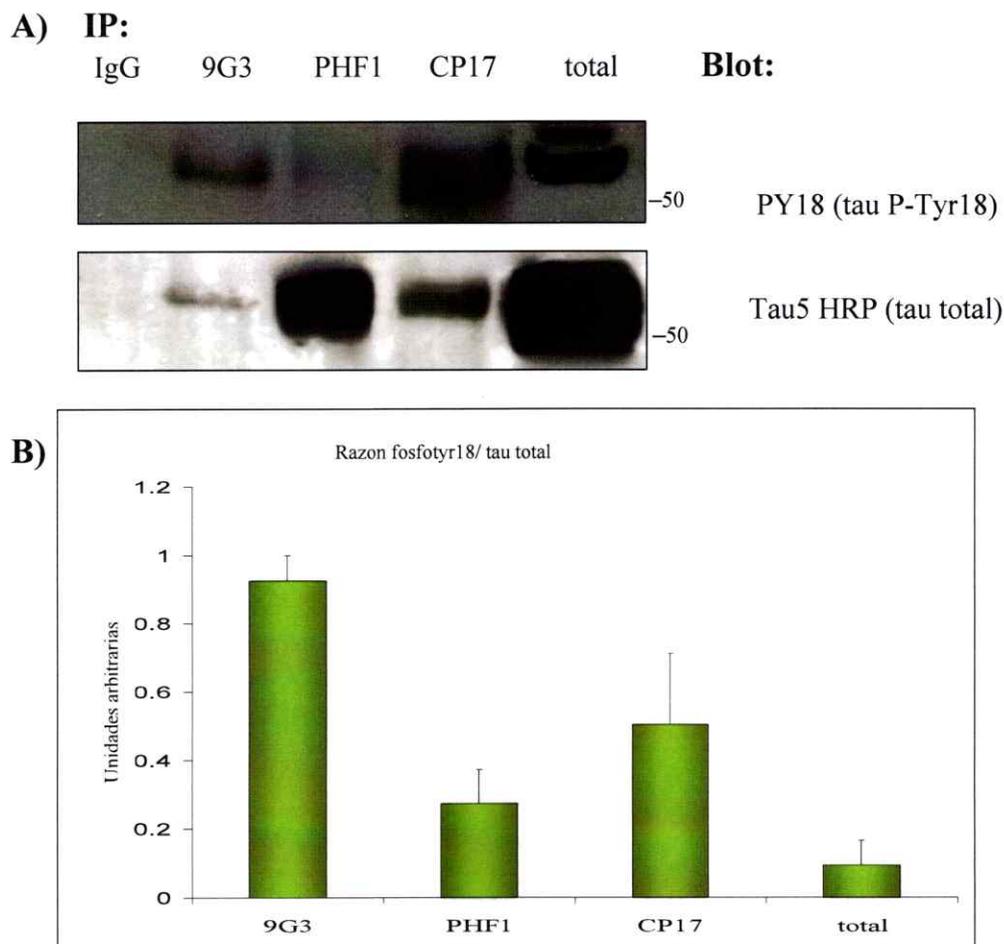
Fyn

**Figura 6:** Co-immunoprecipitaciones de Fyn con tau. Fyn fue inmunoprecipitada desde cultivos de SHSY5Y, fraccionada en geles al 7% en tampón de carga sin  $\beta$ -mercaptoetanol y analizada mediante *Western blot* para detectar las formas fosforiladas de tau en Tyr18 (con el anticuerpo 9G3), tau fosforilada en Thr231 (con el anticuerpo CP9), tau fosforilada en Ser396/404 (con el anticuerpo PHF-1) y Fyn. Fyn interactúa más con tau fosforilada en Tyr18 y mucho menos con tau fosforilada en Ser396/404. La variante de tau fosforilada en Thr231 presenta mayor inmunoprecipitación de Fyn que la fosforilada en Ser396/404, contrario a lo descrito por otros autores en casos de ensayos *in vitro*. En estos ensayos, posiblemente exista un elemento adicional que permita la mayor unión de Fyn con tau fosforilada en Thr231. Como control negativo se realizó el mismo ensayo reemplazando el anticuerpo Fyn por suero inespecífico de conejo IgG, como control negativo se cargaron 50 $\mu$ g de proteínas totales de extractos de SHSY5Y. Las masas moleculares se indican en KDa.

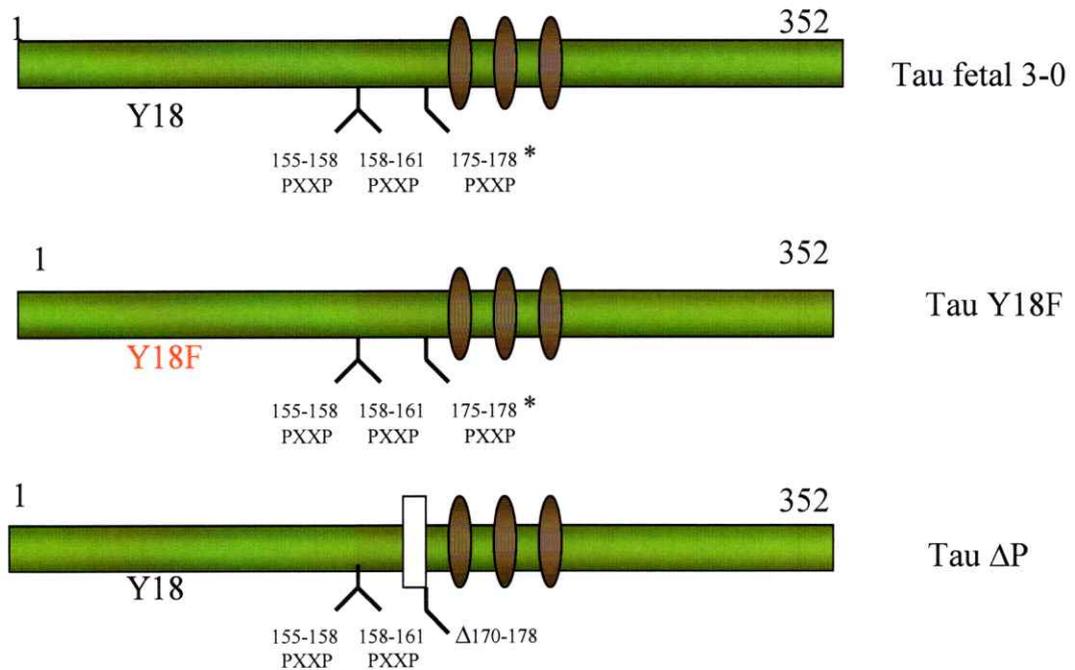
que se afectaba la unión a Fyn. Para esto, medimos los niveles de fosforilación en Tyr18 para las variantes de tau previamente fosforiladas en Ser396/404 o en Thr231 utilizando técnicas de inmunoprecipitación. Como muestra el experimento de la **Figura 7A**, ambas variantes presentan fosforilación en Tyr18, sin embargo los niveles detectados para la forma fosforilada en Ser396/404 son considerablemente menores que los de la fosforilada en Thr231 (representados en el gráfico de la **Figura 7B**), lo cual se correlaciona con su patrón de asociación a las “balsas lipídicas”. Los resultados obtenidos hasta este punto indican que la co-existencia de ambas fosforilaciones, Ser396/404 y Tyr18, podría estar ocurriendo en fracciones de no “balsas lipídicas”, ya que tau fosforilada en Ser396/404 fue detectada sólo en fracciones de no “balsas lipídicas” y tau fosforilada en Tyr18 fue detectada en ambos tipos de fracciones.

#### **7.4 Fosforilación de tau en Tyr18 como requerimiento para su asociación a “balsas lipídicas”.**

En el estudio correspondiente al segundo objetivo específico de la Tesis se quiso investigar la importancia de la fosforilación de tau en Tyr18 para su localización en “balsas lipídicas”, para ello se procedió a mutar este residuo o bien a afectar la unión directa con la quinasa Fyn. Se utilizaron 3 cDNAs distintos de tau humana: la isforma 3-0 tau fetal (htau), htau mutada en Tyr18 por Phe (Y18F-tau) y htau, en ella el motivo rico en prolinas encargado de interactuar directamente con Fyn fue deletado ( $\Delta$ P-tau) (**Figura 8**). Los niveles de expresión de cada una de las variantes de tau transfectadas se



**Figura 7:** Nivel de fosforilación de tau en Tyr18 cuando está previamente fosforilada en Ser396/404 o en Thr231. Se inmunoprecipitó tau usando los anticuerpos para epítopos fosforilados: 9G3 (fosforilada en Tyr18), PHF-1 (fosforilada en Ser396/404) y CP17 (fosforilada en Thr231). CP17 es un anticuerpo monoclonal IgG que reconoce el mismo epítopo que CP9 (IgM). **A)** Las muestras se fraccionaron en un gel de policarilamida y se analizaron mediante *Western blot* los niveles de fosforilación de tau en Tyr 18 usando el anticuerpo PY18, las mismas membranas fueron reanalizadas para cuantificar los niveles de tau total utilizando el anticuerpo tau5 acoplado a Peroxidasa Alcalina (HRP) **B)** Gráfico representando las cantidades relativas de fosforilación en Tyr18 de las variantes de tau detectadas por 9G3, PHF-1 y CP17. Ésto se calculó como la razón entre PY18/tau5 de tres experimentos independientes. Los resultados están indicados como los valores promedio con desviaciones estándar. Se observa que tau fosforilada en Thr231 tiene mayor nivel de fosforilación en Tyr18 que tau fosforilada en Ser396/404. Este patrón es similar al observado para el experimento de inmunoprecipitación de Fyn con las mismas variantes fosforiladas de tau. Las masas moleculares se indican en kDa.



**Figura 8:** Diagrama de las variantes de tau utilizadas en los experimentos con células N2a. La isoforma corresponde a la 3R0N, la más pequeña sin dominios N-terminales y con 3 repeticiones de unión a microtúbulos representados como óvalos rojos. Los motivos ricos en prolina PXXP se indican con los aminoácidos enumerados para esta isoforma. El PXXP que participa en la unión a Fyn se indica con un asterisco, éste fue deletado para el caso de ΔP. (equivalente a pro233-pro236 en la isoforma 4N2R). Tyr18 fue mutada a Phe para el caso de Y18F.

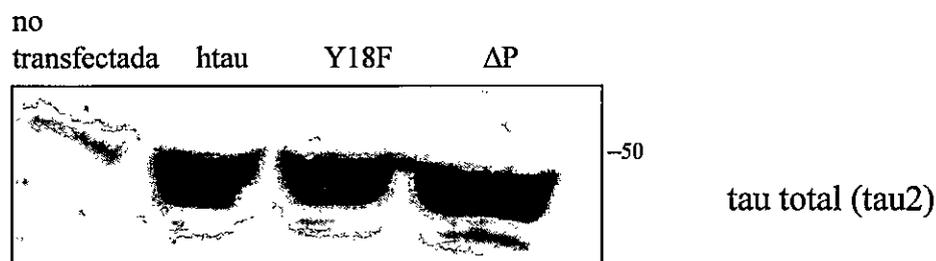
muestran en la **Figura 9**. Posteriormente, se analizó su distribución en las “balsas lipídicas”. Los resultados (**Figura 10**) muestran que todas las variantes: htau, Y18F-tau y  $\Delta$ P-tau fueron detectadas en las fracciones de “balsas lipídicas”. Esto sugiere que la fosforilación de tau en Tyr18 no sería necesaria para su interacción con “balsas lipídicas”. Para el caso de las células sin expresión inducida de tau humana se observó que presentaban niveles de tau endógena concentrada en las “balsas lipídicas” (debido a la detección de tau endógena por parte del anticuerpo), indicando que el mecanismo natural de estas células es localizar a tau en las “balsas lipídicas” en altas cantidades.

Los niveles detectados de  $\Delta$ P-tau en fracciones de “balsas lipídicas” fueron similares a los obtenidos para htau y Y18F tau, apuntando a que la interacción con Fyn tampoco sería necesaria para su localización en estos microdominios. No obstante, este experimento no aporta resultados concluyentes para dilucidar si  $\Delta$ P-tau ciertamente deja de interactuar con Fyn *in vivo*. Para esclarecer esta incógnita investigamos si esta delección también elimina la fosforilación en Tyr18.

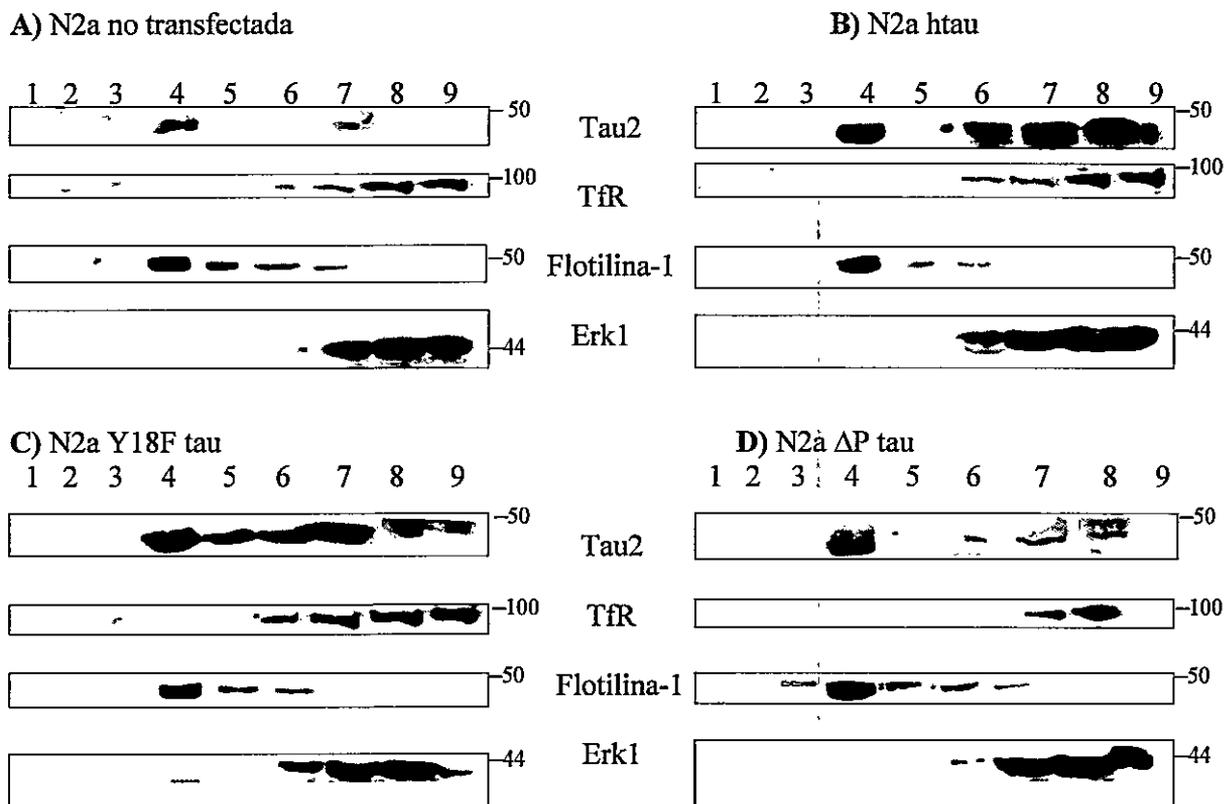
#### **7.4.1 Fosforilación de tau en Tyr18 *in vivo* al delecionar la secuencia de interacción con Fyn ( $\Delta$ P-tau)**

Teóricamente la mutante  $\Delta$ P-tau no debería ser fosforilada en Tyr18 por Fyn ya que no tiene la secuencia de unión a la quinasa (Bhaskar et al., 2005). Cuando esta mutante fue expresada conjuntamente con Fyn en células Cos7, se detectó fosforilación en Tyr18

## Transfecciones transientes en células N2a



**Figura 9:** Expresión de las tres variantes de cDNA de tau usadas. Las células fueron lisadas y analizadas luego de 48h de transfección. Los lisados totales fueron fragmentados en un gel de poliacrilamida al 7%. Las membranas fueron analizadas mediante *Western blot* con el anticuerpo Tau2 que reconoce tau total. Este anticuerpo también detectó tau endógena. Las tres variantes se expresan en niveles similares. La masa molecular bajo los 50KDa se debe a que es la isoforma de tau de menor tamaño. Masa molecular se indica en KDa.



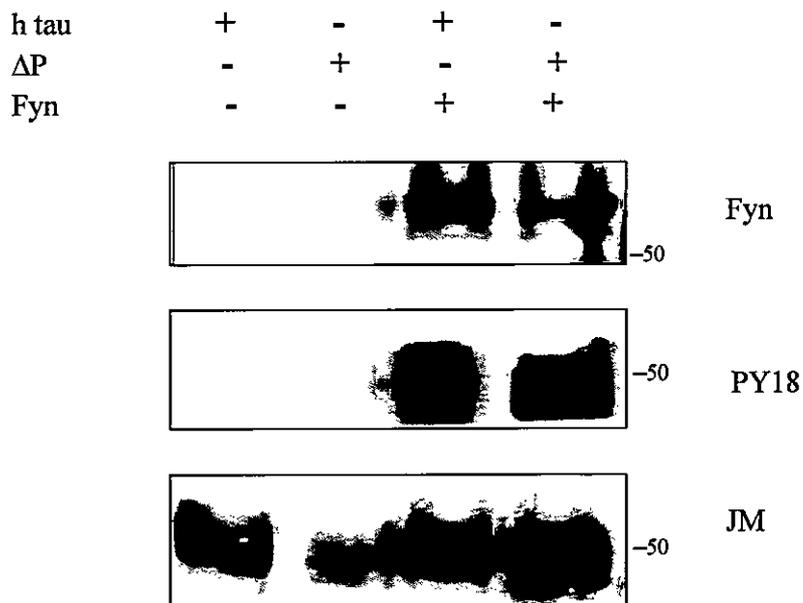
**Figura 10:** “Balsas lipídicas” obtenidas a partir de células N2a transfectadas con 3 cDNAs diferentes de tau, A) no transfectadas, B) htau, C) Y18F tau, D) ΔP tau. Tau fue detectada mediante *Western blot* usando el anticuerpo monoclonal Tau2. Cada gradiente obtenido tiene también sus marcadores para “balsas lipídicas” (Flotilina-1) y para fracciones de no “balsas lipídicas” (Tfr y Erk1). Nueve muestras de 200  $\mu$ l cada una fueron tomadas desde el tope hacia el fondo del tubo y fraccionadas en un gel de poliacrilamida al 7%. Se observa en estas células que el mecanismo natural parece ser la localización de tau en los microdominios de membrana. Todas las variantes de tau transfectadas son capaces de interactuar con membranas de tipo “balsas lipídicas”, lo cual indica que la fosforilación en Tyr18 no es elemento necesario para la localización subcelular de tau. La presencia de la mutante tau ΔP da luces a pensar que Fyn tampoco sería el elemento necesario puesto que en ensayos *in vitro* es ineficiente en la unión a Fyn. La detección de tau endógena en balsas lipídicas permite postular que en este tipo celular la localización subcelular de tau en balsas lipídicas es una tendencia natural y mayor que la línea de neuroblastoma humano SHSY5Y. La mutante tau ΔP está más concentrada en los microdominios, probablemente debido a que la delación afecta el dominio adjacente a la primera repetición de unión a microtúbulos; lo que la haría menos eficiente en la unión a éstos y por lo tanto tendería a migrar más a las “balsas lipídicas”. Las masas moleculares se indican en kDa.

(Figura 11). Considerando que estos experimentos fueron realizados en células donde existen otras proteínas, aparte de tau y Fyn, pensamos que algunas de ellas podrían estar interviniendo en su conexión.

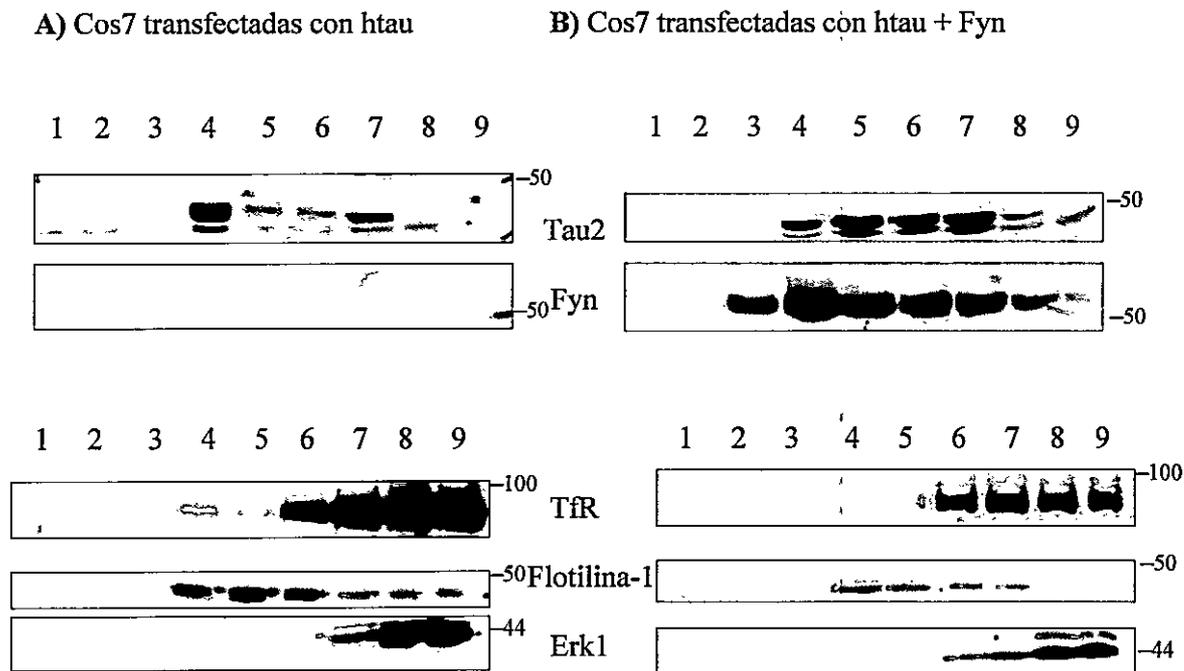
### **7.5 Relación entre Fyn y la asociación de tau a los “balsas lipídicas”**

El resultado anterior indica que la dependencia de tau por Fyn para ser localizada en los “balsas lipídicas” aún no está esclarecida, ya que de todas maneras tau podría unirse indirectamente a Fyn por medio de proteínas conectoras. Para evaluar con mayor detalle el rol de Fyn en la asociación de tau a “balsas lipídicas”, tomamos el modelo de células Cos7, ya que no presentan niveles de tau ni Fyn endógenas. Analizamos estas células en dos grupos: un grupo donde se expresó solamente htau y el otro donde se expresó htau junto con Fyn. Cuando ambos grupos fueron sometidos a extracción de “balsas lipídicas”, se observó que tau es capaz de localizarse en estos microdominios aún en ausencia de la quinasa Fyn (Figura 12A), lo que confirma que Fyn es elemento prescindible en la asociación de tau a la membrana. No obstante, esta unión de tau a la membrana no es directa (Arrasate et al., 2000) por lo que aún queda por establecer el elemento que permite su localización subcelular. Es también interesante notar (Figura 12B) que cuando Fyn no está presente, tau es detectada mayoritariamente en la fracción 4 del gradiente, lo que correspondería a “balsas lipídicas”. Sin embargo, cuando Fyn es expresada, la distribución de tau cambia distribuyéndose a lo largo del gradiente más que concentrándose en una sola fracción. Aunque este resultado muestra que tau no depende

## Células Cos7 transfectadas con



**Figura 11:** Expresión de las variantes htau o  $\Delta P$ -tau en células Cos7 en presencia o ausencia de Fyn. Sólo cuando Fyn fue con-transfectada se observa detección de tau fosforilada en Tyr18 utilizando el anticuerpo PY18. Los niveles de tau total y Fyn fueron obtenidos al reanalizar la misma membrana mediante *Western blot*. Se observa que  $\Delta P$ -tau también está fosforilada en Tyr18, contrario a lo que se describió para experimentos *in vitro* (Bhaskar et al., 2005). Puede ser que exista otro elemento presente en Cos7 que esté ayudando a la interacción de Fyn con la mutante de tau. Las masas moleculares se indican en KDa.



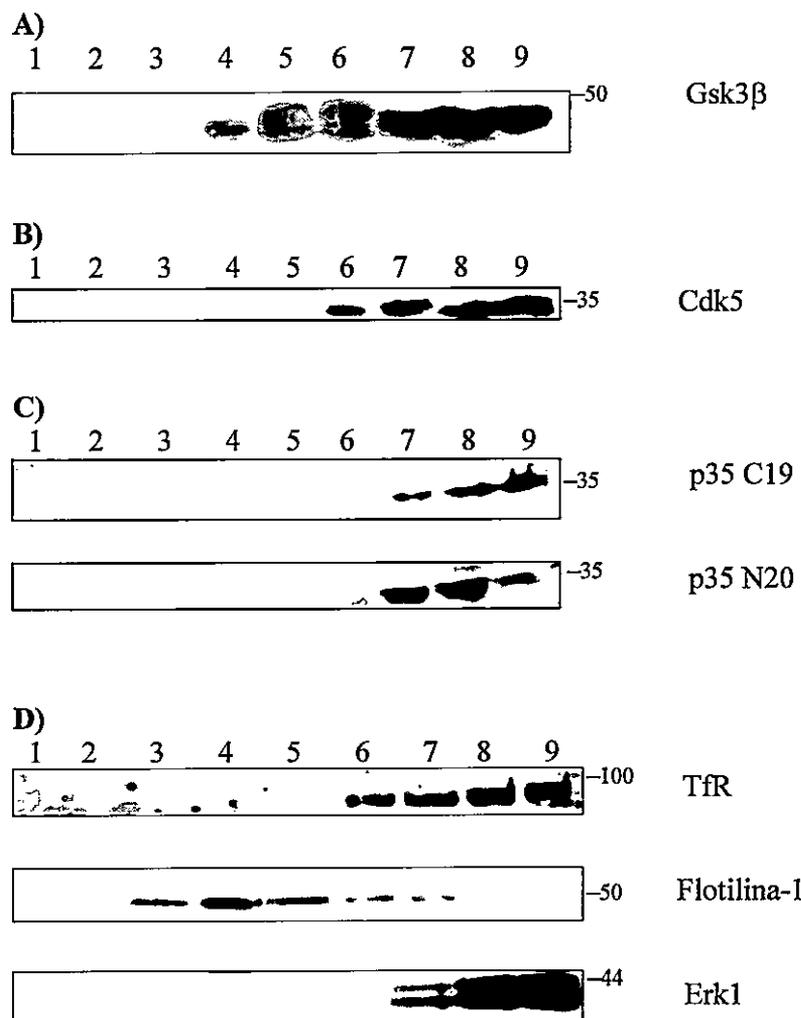
**Figura 12:** “Balsas lipídicas” obtenidos a partir de células Cos7 transfectadas con htau (A) o con htau + Fyn (B). Los marcadores de balsas lipídicas (Flotilina-1) y no balsas lipídicas (TfR y Erk1) se muestran para cada fracción. Nueve muestras de 200µl cada una fueron tomadas desde el tope hacia el fondo del tubo y fraccionadas en un gel de poliacrilamida al 7%. Éstos fueron analizados mediante *Western blot* para analizar los niveles de Fyn y tau total (tau2). No se detectó Fyn en Cos7 htau. En ambos casos tau está presente en las fracciones de “balsas lipídicas”, indicando la independencia de tau por Fyn para ser localizada en “balsas lipídicas”, sin embargo cuando Fyn está presente, la distribución de tau en el gradiente se ve alterada, es decir, no está concentrada sólo en la fracción 4 de “balsas lipídicas” como en el caso de htau, por lo que aunque Fyn no sea el elemento necesario y suficiente para la localización de tau en “balsas lipídicas”, regularía su distribución reflejada en el gradiente. Las fracciones 3, 4 y 5 se consideraron como “balsas lipídicas” por la presencia del marcador Flotilina-1. Las fracciones 7, 8 y 9 se consideraron como “no balsas lipídicas” por la presencia de TfR y Erk1. Las masas moleculares se indican en KDa.

de Fyn para asociarse a los “balsas lipídicas”, también indica que la presencia de la quinasa podría modular la distribución subcelular tau.

### **7.6 Distribución de las quinasas cdk5 y Gsk3 $\beta$ en “balsas lipídicas”**

Dos de las quinasas de tipo Ser/Thr que fosforilan a tau son Gsk3 $\beta$  y cdk5. Ambas son reconocidas por sus roles en la hiperfosforilación de tau observada en la EA (Mandelkow et al., 1992; Ishiguro et al., 1993; Pelech, 1995; Sperber et al., 1995; Billingsley and Kinkaid, 1997; Flaherty et al., 2000; Cruz et al., 2003). Tomando en cuenta que tau fue detectada en “balsas lipídicas” y además su patrón de fosforilación se distribuye diferencialmente, quisimos determinar si estas dos quinasas comparten la misma localización. La **Figura 13** muestra una serie de inmunodetecciones de cdk5 junto a su activador p35 y de Gsk3 $\beta$  en gradientes de “balsas lipídicas” en células SHSY5Y. La quinasa Gsk3 $\beta$  fue detectada en las fracciones de “balsas lipídicas”, contrario a lo observado para cdk5 y su activador p35.

Gsk3 $\beta$  fue recientemente descrita como presente en fracciones de “balsas lipídicas” (Sui et al., 2006). Hecho que concuerda con los resultados obtenidos en la **Figura 13**. Por otro lado, no existen evidencias de que cdk5 se localice en “balsas lipídicas”.



**Figura 13:** Distribución de Gsk3 $\beta$  y cdk5, junto a su activador p35, en “balsas lipídicas” obtenidos a partir de células SHSY5Y. Nueve muestras de 200 $\mu$ l cada una fueron tomadas desde el tope hacia el fondo del tubo, fraccionadas en un gel de poliacrilamida al 7% y analizadas mediante *Western blot*. **A)** Gsk3 $\beta$  está presente en las fracciones 4 y 5 consideradas como de “balsas lipídicas”, **B)** cdk5 no se encuentra en estas fracciones, sólo en fracciones de no balsas lipídicas, **C)** p35, el activador de cdk5 tampoco fue detectado en “balsas lipídicas” utilizando dos anticuerpos: C19 que reconoce el extremo C-terminal y N20 que reconoce el extremo N-terminal. **D)** Se consideraron fracciones de tipo “balsas lipídicas” a las 3, 4 y 5 por la presencia del marcador Flotilina-1. Las fracciones 7, 8 y 9 se consideraron como de no “balsas lipídicas” por la presencia de Tfr y Erk1. Las masas moleculares se indican en KDa.

## **7.7 Efecto del péptido amiloide A $\beta$ <sub>25-35</sub>**

### **7.7.1 Efecto del péptido sobre la fosforilación de tau en Tyr18**

Como modelo de estudio de la EA se ha usado ampliamente la incubación neuronal con el péptido amiloide, ya sea en su forma agregada o en su forma soluble. Williamson y colaboradores (2002) demostraron que células expuestas al péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> y al péptido A $\beta$ <sub>25-35</sub> respondían con un rápido incremento en los niveles de proteínas fosforiladas en residuos Tyr; entre ellas se encontraba tau. También describieron que a los pocos min de incubación se activaban quinasas de la familia Src, como Fyn.

La **Figura 14A** muestra inmunodetecciones obtenidas a partir de tratamientos breves en células SHSY5Y con 10 $\mu$ M A $\beta$ <sub>25-35</sub>; conducidos entre 1 y 15 min. Se detectó un aumento en la fosforilación de tau en Tyr18 luego de 2min de incubación. Posterior a este evento los niveles de fosforilación de tau en este residuo disminuyeron para seguir con un nuevo, aunque menor aumento, a partir de los 15min. Estos cambios en los niveles de fosforilación se representan más claramente en el gráfico de la **Figura 14B**, obtenido del promedio de cinco experimentos independientes.

Como se mencionó previamente, el residuo Tyr18 puede ser fosforilado por Fyn y Src, pero preferentemente por Fyn (Bhaskar et al, 2005). Williamson demostró que Fyn es activada a partir del primer minuto de tratamiento (Williamson et al., 2002). Una evidencia de la participación de Fyn en la fosforilación de tau en Tyr18 se muestra en la

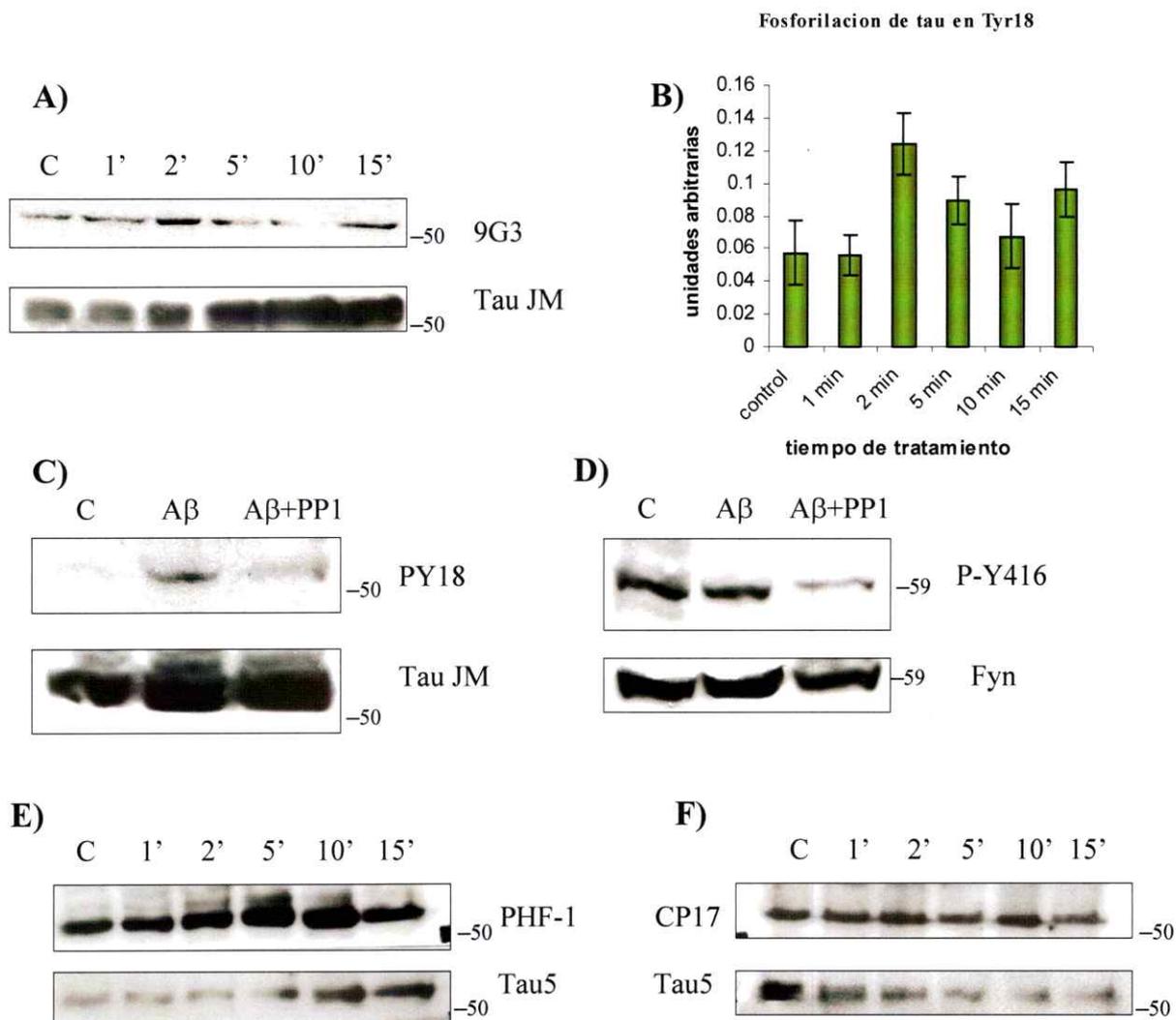
**Figura 14C**, en ella se observa que al incubar las células durante 1h con PP1 1 $\mu$ M, previo al tratamiento con A $\beta$ <sub>25-35</sub>, el incremento en la fosforilación de tau en Tyr18 que debía ser producido por A $\beta$  se redujo casi hasta los niveles basales. Los niveles de Fyn activa también se redujeron con PP1 (**Figura 14C**) PP1 es un inhibidor selectivo de la familia de las quinasas Src, sin embargo PP1 al ser usado en bajas dosis (rangos de 0,5 a 1 $\mu$ M) tiene mayor eficiencia sobre Fyn que sobre Src.

### 7.7.2 Efecto del péptido sobre la fosforilación de tau en Ser396/404 y Thr231

Las **Figuras 14D y 14E** muestran cómo se afectan los niveles de fosforilación en los epitopos Ser396/404 y Thr231 respectivamente. Los niveles de fosforilación en Ser396/404 tienden a aumentar entre 5 y 10min de tratamiento con A $\beta$ , mientras que los niveles de fosforilación en Thr 231 incrementan desde el primer minuto, lo que determinamos luego de calcular la proporción de tau fosforilada con los niveles de tau total (normalización).

### 7.7.3 Variaciones en la distribución de tau en “balsas lipídicas” por tratamientos con el péptido A $\beta$ <sub>25-35</sub>

Para determinar si se activa una cascada de respuesta al péptido amiloide en la cual participe tanto tau como algunas de sus quinasas, quisimos establecer si existe algún efecto en la distribución y en los patrones de fosforilación de tau en “balsas lipídicas”

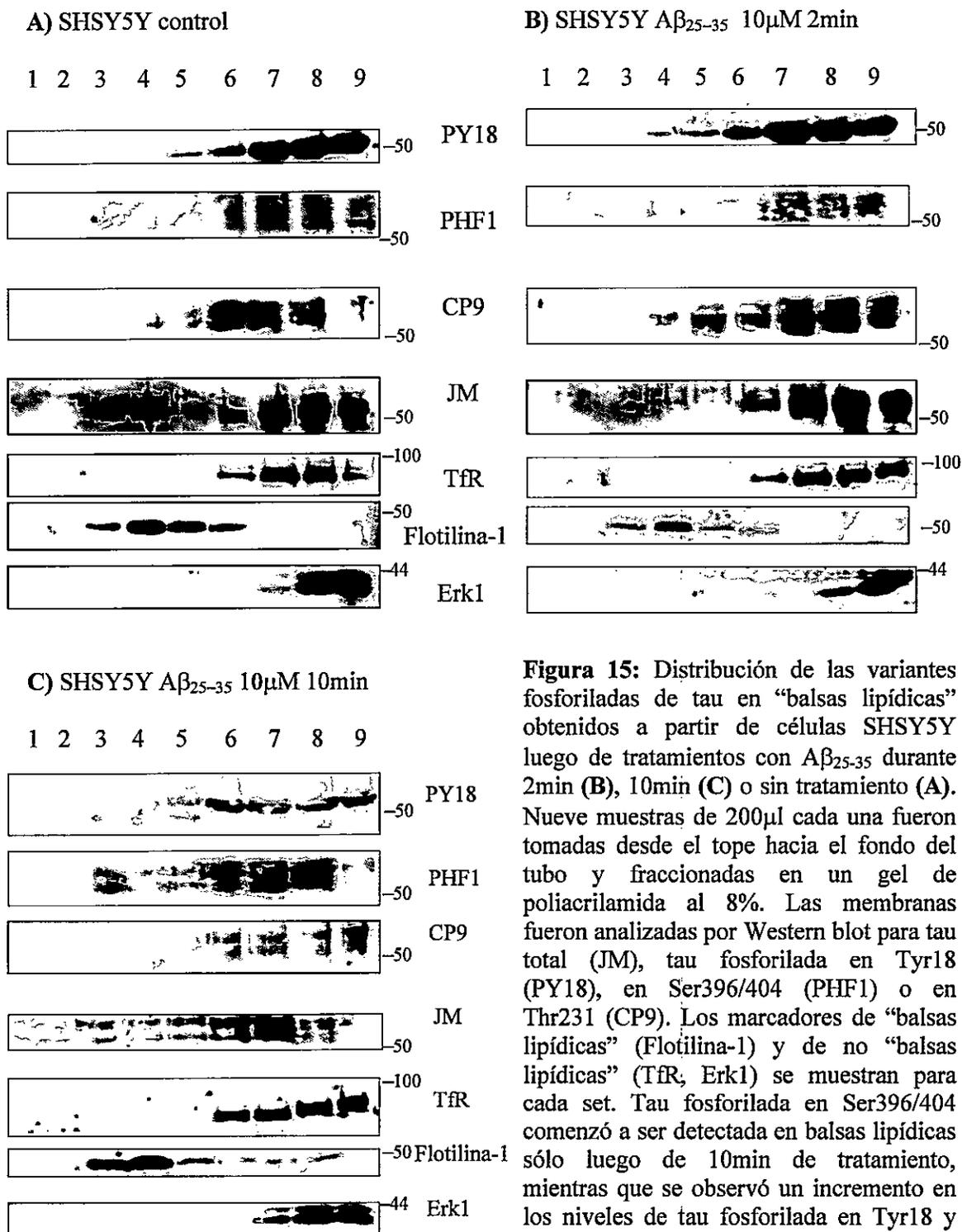


**Figura 14:** Curso temporal de tratamientos de células SHSY5Y con A $\beta_{25-35}$  10 $\mu$ M **A)** Inmunodetecciones por *Western blot* que muestran el patón de fosforilación de tau en Tyr18 (9G3) con los tratamientos. Hay un incremento en los niveles de esta fosforilación de tau luego de una incubación de 2min, **B)** lo cual es más fácil de observar en el gráfico que representa los valores promedio de 5 experimentos independientes con sus desviaciones estándar. Para determinar la responsabilidad de Fyn en este aumento las células fueron pre-incubadas durante 1h con PP1 1 $\mu$ M, inhibidor de la familia de las Src quinasas. **C)** Luego de tratar las células con PP1, el aumento esperado en la fosforilación de tau en Tyr18 (PY18) producto del A $\beta$  se ve abolido, los niveles bajan a los observados en células control. **D)** La fosforilación de Fyn en Tyr416, que indica activación de la quinasa, también disminuye con PP1. **E)** Por otro lado, también se muestran los niveles de tau fosforilada en Ser396/404 (PHF-1) o **F)** en Thr231 (CP17). Para el caso de Ser396/404 hay un incremento luego de 5 a 10min. Para tau fosforilada en Thr 231, el incremento comienza entre el minuto 1 y 2. Las masas moleculares se indican en KDa.

bajo la influencia del péptido amiloide. Tau en células SHSY5Y no tratadas, se distribuye de la siguiente manera: tau fosforilada en Tyr18 se localiza tanto en fracciones de “balsas lipídicas” como en no “balsas lipídicas”; tau fosforilada en Thr231 se localiza mayoritariamente en fracciones no “balsas lipídicas”, mientras que la variante fosforilada en Ser396/404 no fue detectada en fracciones de “balsas lipídicas”, quedando distribuida solamente en fracciones no “balsas lipídicas” (**Figura 15A**).

Cuando las células fueron expuestas al amiloide en solución durante 2min, los patrones de distribución de tau cambiaron: se produjo un aumento en los niveles de fosforilación de tau en Thr231 detectados en fracciones de “balsas lipídicas”; lo mismo sucedió con la fosforilación en Tyr18. La fosforilación en Ser396/404 tampoco fue detectada en “balsas lipídicas” a este tiempo (**Figura 15B**).

Al ser expuestas durante 10 min con el mismo tratamiento, se detectaron aún más cambios: la fosforilación de tau en Thr231 disminuyó haciéndose indetectable en las fracciones de “balsas lipídicas”; lo mismo ocurrió con la fosforilación en Tyr18. Sin embargo los niveles de fosforilación en Ser396/404 incrementaron notablemente y por primera vez fueron detectados en “balsas lipídicas” (**Figura 15C**). Una vez determinada la distribución de tau, se hace necesario estudiar si existen posibles cambios en la distribución de las quinasas Gsk3 $\beta$  y cdk5 bajo tratamientos con el péptido amiloide.



**Figura 15:** Distribución de las variantes fosforiladas de tau en “balsas lipídicas” obtenidos a partir de células SHSY5Y luego de tratamientos con  $A\beta_{25-35}$  durante 2min (B), 10min (C) o sin tratamiento (A). Nueve muestras de 200 $\mu$ l cada una fueron tomadas desde el tope hacia el fondo del tubo y fraccionadas en un gel de poliacrilamida al 8%. Las membranas fueron analizadas por Western blot para tau total (JM), tau fosforilada en Tyr18 (PY18), en Ser396/404 (PHF1) o en Thr231 (CP9). Los marcadores de “balsas lipídicas” (Flotilina-1) y de no “balsas lipídicas” (Tfr, Erk1) se muestran para cada set. Tau fosforilada en Ser396/404 comenzó a ser detectada en balsas lipídicas sólo luego de 10min de tratamiento, mientras que se observó un incremento en los niveles de tau fosforilada en Tyr18 y Thr231 luego de 2min para luego desaparecer de los microdominios a los 10min. Las masas moleculares se indican en KDa.

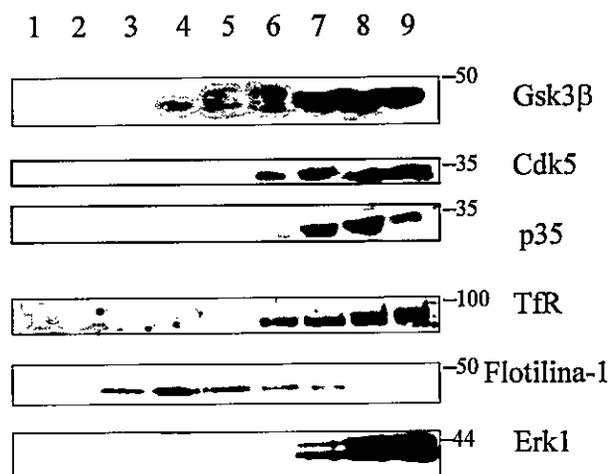
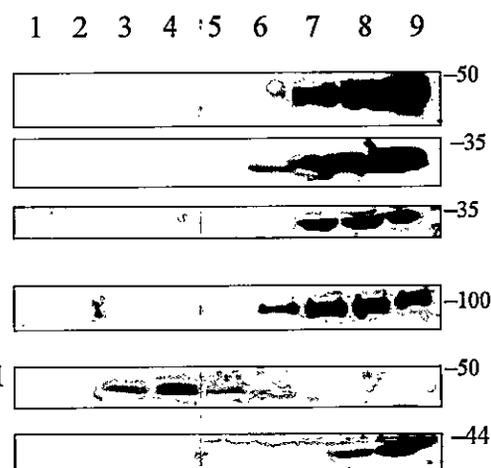
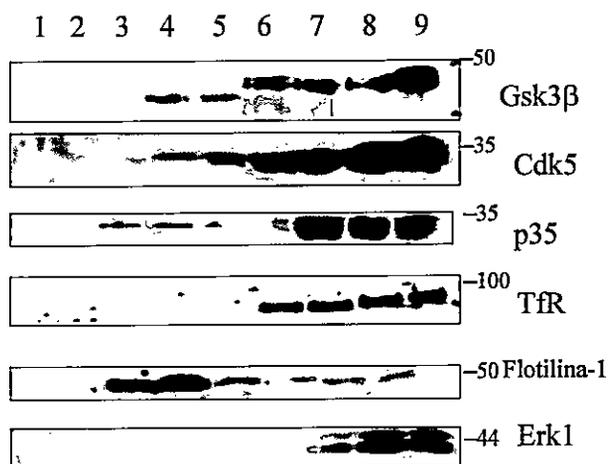
#### 7.7.4 Cambios en la distribución de las quinasas cdk5 y Gsk3 $\beta$ en “balsas lipídicas” bajo tratamientos con A $\beta$ <sub>25-35</sub>

En células SHSY5Y no tratadas, la proteína quinasa Gsk3 $\beta$  fue detectada en “balsas lipídicas”, pero por el contrario ni la quinasa cdk5 ni su activador p35 estaban presentes en esas fracciones (Figura 16A).

Luego de 2min de tratamiento con el péptido amiloide, Gsk3 $\beta$  dejó de ser detectada en “balsas lipídicas”, tampoco se detectó la presencia de cdk5 o p35 en estas condiciones (Figura 16B).

Al analizar las fracciones de “balsas lipídicas” luego de 10min de tratamiento, se observó que Gsk3 $\beta$  volvió a aparecer, indicando un posible recambio en la subpoblación de esta quinasa asociada a los microdominios. Adicionalmente, las bandas de Gsk3 $\beta$  detectadas en “balsas lipídicas” luego de 10 min presentan un aparente menor peso molecular, indicando la posibilidad de un estado menos fosforilado. Por otro lado, tanto la quinasa cdk5 como su activador p35 comenzaron a ser detectados por primera vez en “balsas lipídicas” (Figura 16C) concordando con el aumento percibido en los niveles de tau fosforilada en Ser396/404 en la misma localización subcelular. De este modo, es posible que el complejo cdk5/p35 sea responsable del aumento en los niveles de esta variante de tau en “balsas lipídicas” como respuesta al péptido amiloide A $\beta$ <sub>25-35</sub>.

## A) SHSY5Y control

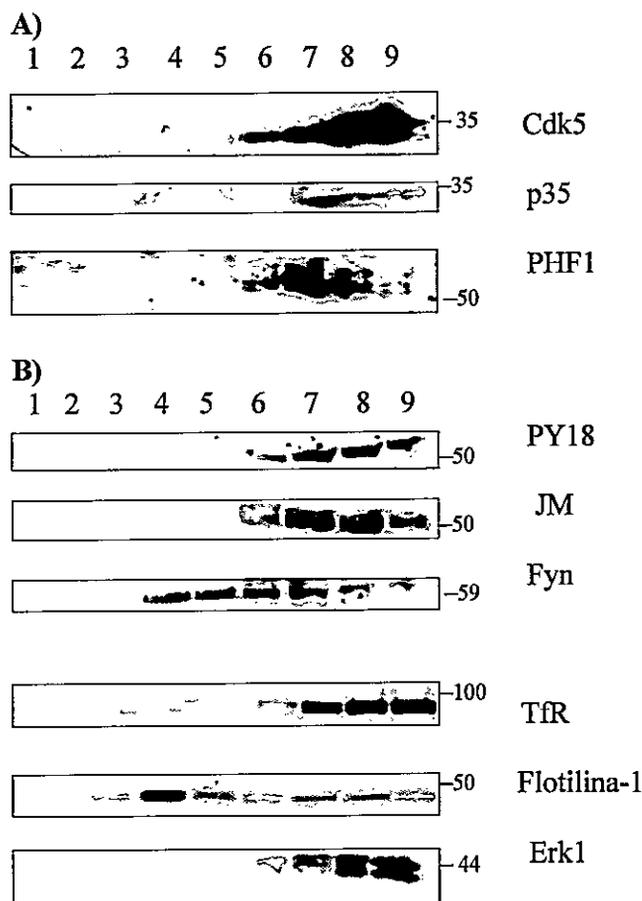
B) SHSY5Y A $\beta_{25-35}$  10 $\mu$ M 2minC) SHSY5Y A $\beta_{25-35}$  10 $\mu$ M 10min

**Figura 16:** Distribución de las quinasas Cdk5 y Gsk3 $\beta$  en “balsas lipídicas” obtenidos a partir de células SHSY5Y luego de tratamientos con A $\beta_{25-35}$  durante 2min (B), 10min (C) o sin tratamiento (A). Nueve muestras de 200 $\mu$ l cada una fueron tomadas desde el tope hacia el fondo del tubo y fraccionadas en un gel de poliacrilamida al 8%. Las membranas fueron analizadas mediante *Western blot* para Gsk3 $\beta$ , Cdk5 y p35. Los marcadores de “balsas lipídicas” (Flotilina-1) y “no balsas lipídicas” (Tfr, Erk1) se muestran para cada set. La quinasa Cdk5 y su activador p35 comienzan a ser detectados en balsas lipídicas sólo después de 10min de tratamiento, coincidiendo con el patrón observado para tau fosforilada en Serina 396/404. Las masas moleculares se indican en KDa.

### 7.7.5 Inhibición de cdk5 por roscovitina en tratamientos con $A\beta_{25-35}$

A partir de los resultados obtenidos en el punto anterior, sospechamos que cdk5/p35 es responsable del aumento en los niveles de tau fosforilada en Ser396/404 en “balsas lipídicas” luego de 10 min de tratamientos con  $A\beta_{25-35}$ . Para comprobarlo, analizamos cuál sería el efecto producido al inhibir esta quinasa. Para inhibir al complejo cdk5/p35 se pre-incubaron las células con roscovitina (ver Materiales y Métodos), luego fueron tratadas durante 10min con  $A\beta_{25-35}$  y se obtuvieron fracciones de “balsas lipídicas”. Con roscovitina, los niveles tanto de cdk5 como de p35 desaparecieron de las fracciones de “balsas lipídicas” (Figura 17). Junto con esto, los niveles de tau fosforilada en Ser396/404 en “balsas lipídicas” también disminuyeron al nivel de las células sin tratamiento.

Por otro lado, la distribución y los niveles de tau fosforilada en Tyr18 no presentaron mayores variaciones, aunque esta vez no fueron detectados en la fracción 5 (considerada como “balsas lipídicas”). Al parecer la inhibición de cdk5 por roscovitina tiene pequeños efectos sobre la fosforilación de tau en Tyr18. Tau total analizada con el anticuerpo JM para este caso no fue detectada en las fracciones de “balsas lipídicas”, coincidiendo con la ausencia de las variantes de tau fosforilada en Ser396/404 y Tyr18.



**Figura 17:** Efecto de Roscovitina en la distribución de cdk5 bajo tratamientos con el péptido  $A\beta_{25-35}$ . Las “balsas lipídicas” fueron obtenidos a partir de células SHSY5Y pre-tratadas durante 1h con Roscovitina  $10\mu\text{M}$  y luego incubadas con  $A\beta_{25-35}$   $10\mu\text{M}$  durante 10min. Nueve muestras de  $200\mu\text{l}$  cada una fueron tomadas desde el tope hacia el fondo del tubo y fraccionadas en un gel de poliacrilamida al 8%. Posteriormente fueron analizadas mediante *Western blot*. **(A)** roscovitina afecta la distribución de cdk5 y p35 así como también en la fosforilación de tau en Ser396/404 (PHF-1). **(B)** efecto de roscovitina en la distribución de tau total, tau fosforilada en Tyr18 (PY18) y Fyn. **(C)** Marcadores de “balsas lipídicas” (flotilina-1) y “no balsas lipídicas” (Tfr, Erk1). Luego de 10min de incubación con  $A\beta$ , la redistribución observada para cdk5 y p35 se ve abolida al inhibir a cdk5 con roscovitina. También disminuye la fosforilación de tau en Ser96/404 dejando de ser detectada en “balsas lipídicas”. Tau fosforilada en Tyr18 disminuye un poco en comparación con el caso sin roscovitina. Tau total (JM) tampoco se detecta en balsas lipídicas. La distribución de Fyn cambia de alguna manera, observándose bandas tan intensas en fracciones de no balsas lipídicas como en las detectadas en “balsas lipídicas”. Las masas moleculares se indican en KDa.

## 8. DISCUSION

En este trabajo de tesis quisimos profundizar la investigación sobre el cambio en los niveles de fosforilación de tau en modelos de estudio de Alzheimer, investigando la fosforilación en Tyr18 (producida por la quinasa Fyn), además de las más conocidas fosforilaciones en Ser396/404 y Thr231. También quisimos saber si la fosforilaciones de tau en Tyr18, Ser396/404 y Thr231 participaban en un sistema de transducción de señales activado en “balsas lipídicas”. Un buen estímulo para activar esta cascada fue el A $\beta$ . Ello por dos razones: la primera porque la inducción de neurodegeneración en células neuronales en cultivo por acción de A $\beta$  constituye un modelo típico de estudio para la EA, y la segunda porque además se ha descrito que A $\beta$  activa a la proteína Fyn (Williamson et al., 2002).

Los primeros objetivos específicos de esta tesis fueron la caracterización de la subpoblación de tau detectada en “balsas lipídicas” en términos de sus niveles de fosforilación en Tyr8, Ser396/404 y Thr231, así como dilucidar el papel de Fyn como elemento mediador de la interacción de tau con las “balsas lipídicas”. Todo esto nos puede llevar a una mejor comprensión de esta subpoblación de tau: qué tipo de modificaciones presenta y cómo es que está asociada a los microdominios. ¿Es Fyn realmente una proteína involucrada en esta localización subcelular de tau?

Para profundizar nuestros conocimientos de la interacción de tau con Fyn quisimos añadir información a lo previamente descrito. Analizamos la interacción de ambas proteínas cuando tau está fosforilada previamente en Ser396/404 y/o en Thr231.

Comparando nuestros resultados sobre la interacción de Fyn con las variantes fosforiladas de tau, y estudios publicados (Bhaskar et al., 2005) se destaca que efectivamente la fosforilación de tau afecta su interacción con Fyn. Sin embargo, Bhaskar y colaboradores observaron que la fosforilación en Thr231 disminuía considerablemente la interacción directa *in vitro*, lo que no sucedió en nuestro estudio. Una explicación a este fenómeno es que justamente exista otra proteína involucrada en la asociación de tau a las “balsas lipídicas”, y que no esté presente en el ensayo *in vitro*, la cual actúe como mediador de la unión entre tau y Fyn, facilitando la asociación cuando tau está fosforilada en Thr231.

Se hace necesario mencionar que los experimentos en esta tesis fueron realizados en cultivos de líneas celulares, donde además de estar presentes tau y Fyn, nos encontramos ante la presencia de una compleja maquinaria metabólica y proteica con un sinúmero de factores adicionales. Si bien las inmunoprecipitaciones permiten estudiar interacciones de proteínas, no es posible discriminar cuando esta unión es directa o indirecta, ya que en el producto puede haber un complejo proteico con más elementos en medio. Por otro lado, la interacción de tau con Fyn en estos resultados se ve afectada por la fosforilación de tau en Ser396/404, a diferencia del aumento percibido por Bhaskar y colaboradores (2005) en experimentos *in vitro*.

Experimentos posteriores de este trabajo de tesis, que se discuten con mayor detalle más adelante, abrieron la posibilidad de que esta menor interacción se deba solamente a una menor co-existencia de Fyn y tau fosforilada en Ser396/404 en el mismo espacio.

Al observar que los patrones de fosforilación de tau afectaban su unión con Fyn quisimos investigar la relación entre la fosforilación en Tyr18 y las fosforilaciones en Ser

396/404 y Thr 231. Fue interesante observar que cuando tau estaba fosforilada en Ser 396/404 presentaba un menor nivel de fosforilación en Tyr 18 comparado con la proteína fosforilada en Thr 231, similar al patrón observado de unión de tau fosforilada con Fyn. El efecto sobre la fosforilación en Tyr 18 producido por la previa fosforilación en Ser 396/404 podría ser una consecuencia directa del efecto sobre la unión con Fyn.

Al analizar la distribución de las variantes fosforiladas de tau en Tyr 18, en Ser 396/404 y en Thr 231 observamos que ninguna de ellas es exclusiva de "balsas lipídicas", sin embargo Tyr 18 es la que presenta el mayor grado de asociación con los microdominios, coincidiendo con que Fyn (responsable de esta modificación) se distribuye principalmente en este espacio subcelular. Tau fosforilada en Thr 231 presenta sólo bajos niveles de detección en los microdominios, mientras que la fosforilación en Ser 396/404 se encontró exclusivamente en las fracciones de no "balsas lipídicas". Estas distribuciones diferenciales de tau según su patrón de fosforilación se asemejan al patrón de unión detectado con la proteína Fyn. La presencia de fosforilación de tau en Tyr 18 en las fracciones de no "balsas lipídicas" indica que esta fosforilación no es exclusiva de los microdominios de membrana. Para estos resultados planteamos dos explicaciones: que tau fosforilada en Tyr 18 se disocia de las "balsas lipídicas" o bien que la fosforilación puede ocurrir tanto dentro como fuera de ellos. Cabe mencionar que, si bien es cierto, Fyn está principalmente asociada a este tipo de membrana no está solamente en este espacio, una porción de Fyn que no ha sido palmitoilada puede estar también de forma soluble en el citosol, por ello la interacción de tau con Fyn también puede ocurrir a nivel citosólico.

Luego de analizar la unión tau/Fyn, se procedió a evaluar la importancia de esta quinasa en la localización subcelular de tau. Existían dos posibilidades: que Fyn se asociara a tau y que esta quinasa fuera la responsable de la interacción de tau con la membrana, o bien que la fosforilación de tau en Tyr 18 fuera la señal que indicara la localización de tau en los microdominios. Al ver que la fosforilación en Tyr 18 no era exclusiva de "balsas lipídicas", nuestra hipótesis fue que ésta no sería un blanco para la localización subcelular de tau. Para comprobar esta hipótesis quisimos observar lo que sucedía cuando este residuo era mutado por Phe y cuando se eliminaba la secuencia de tau encargada de interactuar con Fyn. Ambas opciones nos permitirían bloquear la fosforilación en Tyr 18 y así analizar directamente su importancia en la asociación con las "balsas lipídicas".

Se trabajó con el gen de la tau humana introducida en una línea de neuroblastoma de ratón. Esto porque se quiso analizar una línea de neuroblastoma, que expresa elementos parecidos y específicos de una línea celular neuronal, pero a la vez donde se pudiera expresar una forma distinta de tau, en este caso, la tau humana. El expresar tau humana y no trabajar con tau endógena se realizó porque los anticuerpos utilizados en este estudio para la fosforilación en Tyr 18 son específicos de tau humana y porque se quiso tratar de diferenciar la población de tau endógena de la introducida a la célula.

En las "balsas lipídicas" obtenidas para la línea N2a, neuroblastoma de ratón, se comprobó que la fosforilación de tau en Tyr 18 no es el elemento necesario para la localización subcelular de tau en "balsas lipídicas", debido a que cuando el residuo está mutado, tau sigue siendo localizada en este compartimiento. En este experimento se observó que la variante de tau con delección en su secuencia de unión a Fyn también

estaba localizada en las "balsas lipídicas". Según se describió (Bhaskar et al., 2005) esta variante de tau es ineficiente en la unión a Fyn. Aquí nos referimos nuevamente a una unión directa de las proteínas, ya que este experimento se realizó *in vitro*. Según esta descripción, teóricamente  $\Delta$ P-tau y Fyn no deberían unirse. Esto entrega nuevas luces en la opción de que además Fyn no sea el elemento necesario para la ubicación de tau en balsas lipídicas. Sin embargo, como se vio anteriormente, los experimentos *in vitro* han dado resultados distintos a los obtenidos en líneas celulares, por lo que fue necesario comprobar directamente si estas dos proteínas se unían o no en el modelo celular. Para esto se expresó tau humana normal y  $\Delta$ P-tau junto con Fyn en una línea celular que no tiene expresión endógena de ninguna de las dos (Cos7, riñón de simio). La interacción se analizó en términos de fosforilación de tau en Tyr 18. Si la mutante deletionada de tau no podía unirse a Fyn entonces tampoco podría ser fosforilada en Tyr 18. Con bastante sorpresa se observó que la mutante se fosforilaba en Tyr 18 a niveles tan altos como la forma normal de tau. Se debe considerar aquí que esta línea celular posee expresión endógena de Src, la otra quinasa que puede fosforilar a tau en Tyr 18 pero menos que Fyn (Bhaskar et al., 2005). Ello lleva a pensar que Src toma el papel de Fyn y produce la fosforilación en la mutante, pero hay dos fenómenos que descartan esta posibilidad: uno es que en los controles donde no se expresa Fyn no existe fosforilación de la mutante aun cuando Src está presente y dos, que se describió en el mismo trabajo de Bhaskar y colaboradores que la mutante es tan ineficiente en la unión a Src como a Fyn. Ello corrobora nuestra explicación de que existe en la célula un elemento que podría estar mediando esta unión y facilitando la fosforilación de tau. Este elemento podría ser el

mismo que participa en la interacción de Fyn con la forma fosforilada de tau en Thr 231, algo que *in vitro* pierde unión y que las líneas celulares sigue interactuando. La principal quinasa que fosforila a tau en Thr231 es Gsk3 $\beta$  y está presente en las tres líneas celulares analizadas hasta este punto, por lo que se abre la posibilidad de que esta proteína actúe como elemento participante en la unión tau/Fyn.

Cdk5 es otra de las quinasas de tau involucrada en la EA y que también quisimos analizar en este estudio, en el marco de los dos últimos objetivos específicos de la tesis. Además, el sitio de fosforilación de tau en Thr231 por Gsk3 $\beta$  es un sitio de modificación establecida (primed), lo que significa que necesita de la fosforilación previa de otro residuo, en este caso Ser235 producido principalmente por cdk5.

Dada la importancia de este tipo de fosforilación en tau tanto en el caso de la patología como en la normal regulación de la función de tau, se hizo necesario estudiar la posible localización de ambas quinasas en las “balsas lipídicas”, compartiendo ubicación con tau y por lo tanto dando posibilidad a que estos microdominios favorezcan el encuentro y la posterior fosforilación de tau. Se analizó entonces la presencia de las dos quinasas en las “balsas lipídicas” obtenidos a partir de neuroblastoma humano, SHSY5Y. Se había descrito recientemente que Gsk3 $\beta$  se asocia a los microdominios de membrana, y más aún, que bajo ciertos estímulos en el modelo en estudio esta localización aumentaba (Sui et al., 2006). Ese fue el primer registro de esta quinasa en las “balsas lipídicas” y hasta el momento ha sido el único. En el caso de cdk5, no hay evidencias que prueben la asociación de esta quinasa a las “balsas lipídicas”.

La presencia de Gsk3 $\beta$  en “balsas lipídicas” en contraste con la ausencia de cdk5 sugieren la idea de Gsk3 $\beta$  como mediador de tau con las “balsas lipídicas”. Al estar al menos una de las dos quinasas de tau presente en las “balsas lipídicas”, es posible que tau esté involucrada en un sistema de transducción de señales donde no sólo se vea afectada su fosforilación en Tyr 18 sino también en fosforilaciones de tipo Ser/Thr. Para resolver esta hipótesis analizamos los niveles de fosforilación de tau en Tyr 18, Ser 396/404 y Thr 231 en extractos de células SHSY5Y incubadas con A $\beta_{25-35}$  durante tiempos cortos entre 1-15 min. Como se muestra en Resultados, la fosforilación en Tyr 18 aumentó considerablemente a partir de 2 min de incubación, coincidiendo con lo publicados previamente (Williamson et al., 2002) que describía la activación de la quinasa Fyn con el mismo estímulo luego de 1 minuto de tratamiento. En el aumento de la fosforilación de tau en Tyr 18 se observó luego una disminución a los 5 y 10 min, para elevarse nuevamente a los 15 min, aunque esta vez el incremento fue menor que el producido a los 2 min. La primera y mayor fosforilación de tau en Tyr 18 es producida por Fyn, luego de ser activada al minuto de tratamiento. El segundo incremento podría deberse a la propia quinasa Src, quien fosforila a tau en menores cantidades comparada con Fyn y que según evidencias anteriores es posible que se active como respuesta posterior a la activación de Fyn (von Wichert et al., 2003).

Como se describe en Resultados para analizar el papel de Fyn en esta fosforilación a los 2 min se incubaron las células con un inhibidor de la familia de las Src quinasas, PP1, el cual es más efectivo sobre Fyn que sobre Src en bajas dosis. Los resultados mostraron que al inhibir Fyn, la fosforilación de tau en Tyr18 a los 2 min de tratamiento disminuyó

considerablemente, llegando a los niveles basales del caso control. Luego de observar lo que sucedía con Tyr18 quisimos analizar el caso de Ser396/404 y Thr231. Para Ser396/404 la curva de progreso temporal de la fosforilación inducida por A $\beta$  mostró un incremento en la fosforilación desde los 5 min de tratamiento y manteniéndose durante 10 min. Para Thr231, al comparar los niveles fosforilados con los niveles de tau total hubo un aumento en la fosforilación luego del primer minuto de tratamiento. Los cambios detectados a partir de extractos sugieren la participación de tau en un posible sistema de transducción de señales en respuesta al A $\beta$ , ya que a tiempos cortos de tratamiento se producen cambios en la fosforilación de tau tanto en Tyr18 como en Ser396/404 y Thr231.

¿Es posible que estos cambios sean parte de un sistema localizado donde estos microdominios de membrana faciliten la fosforilación de tau?. Analizamos entonces lo que ocurría con estas tres fosforilaciones pero a nivel de los “balsas lipídicas”. Dado los cambios observados en 2 min y 10 min con A $\beta$ , analizamos lo que ocurría con tau en términos de distribución y fosforilación en “balsas lipídicas”.

Luego de 2 min con A $\beta$  la fosforilación en Tyr18, que aumentaba a nivel celular total, aumentó también en las fracciones de “balsas lipídicas”, lo que indica que esta fosforilación estaría ocurriendo en los microdominios como respuesta a la activación de Fyn producida por el péptido. La fosforilación en Thr231 también aumenta en las fracciones de “balsas lipídicas” a los 2 min, coincidiendo con el aumento en extractos totales a partir del primer minuto de tratamiento. No se detectó fosforilación en

Ser396/404 en las fracciones de "balsas lipídicas", lo que también coincide con que el aumento en sus niveles no se percibe sino hasta los 5 min de tratamiento.

Luego de 10 min de incubación con A $\beta$ , los niveles tanto de tau fosforilada en Tyr18 como en Thr231 disminuyeron en las "balsas lipídicas", lo que coincide con los patrones observados para extractos totales. Ambas fosforilaciones se encuentran concentradas ahora en fracciones de no "balsas lipídicas". El caso de Ser 396/404 se hace interesante, ya que por primera vez fue detectada en las fracciones de "balsas lipídicas", esto coincide con los niveles obtenidos a partir de extractos totales, donde observamos un aumento luego de 5 min que podría estar ocurriendo a nivel de "balsas lipídicas".

Considerando que los patrones de fosforilación de tau cambiaron en "balsas lipídicas" producto de la incubación con el péptido amiloide, analizamos lo que ocurría con las quinasas cdk5 y Gsk3 $\beta$ . Por medio de los mismos tratamientos de SHSY5Y con A $\beta$ <sub>25-35</sub> y obtención de "balsas lipídicas" a los 2 y 10 min, vimos que Gsk3 $\beta$  está presente en "balsas lipídicas" en el caso control, pero que desaparece de los microdominios a los 2 min para luego volver a esta localización a los 10 min.

Para la quinasa cdk5, observamos que presenta el mismo patrón de distribución en el curso temporal que la variante de tau fosforilada en Ser396/404. Es posible entonces que sea el aumento de esta quinasa en los "balsas lipídicas" observado en este tiempo el responsable del aumento en la fosforilación de tau en Ser396/404.

Para comprobar esto, se pre-incubaron las células con un activador selectivo de la quinasa cdk5, roscovitina, para luego proceder con el tratamiento con A $\beta$  durante 10 min. Interesantemente, bajo estas condiciones se inhibe la localización de cdk5 en

“balsas lipídicas”, además su activador p35 tampoco está presente en esas fracciones. p35 es una proteína que posee miristoilación en su extremo N-terminal y que por lo tanto está asociada a membrana, al contrario del fragmento p25 producido por la proteólisis por calpaína. La unión con p35, por lo tanto, permitiría que cdk5 se localizara en membrana y en este caso, el complejo podría asociarse a “balsas lipídicas” producto de la incubación con A $\beta$ . La inhibición de cdk5 con roscovitina no solo bloquea la localización subcelular del complejo en “balsas lipídicas”, sino que también bloquea la fosforilación de tau en Ser 396/404. Por lo tanto el responsable de esta modificación de tau es el complejo cdk5/p35. Además con este resultado se infiere que la asociación de cdk5 con “balsas lipídicas” depende de su activación, ya que al ser inhibida se bloquea tanto su actividad quinasa como su localización en “balsas lipídicas”. Al analizar el patrón de distribución de tau total en “balsas lipídicas” en tratamientos con roscovitina, tau total desaparece de las “balsas lipídicas”, lo que sugiere que los niveles de tau en “balsas lipídicas” detectados a los 10 min de incubación con el péptido se deben principalmente a la forma fosforilada en Ser396/404 y no a las formas fosforiladas en Tyr18 y en Thr231, las cuales en ese tiempo de incubación desaparecen de los microdominios.

Este fenómeno es nuevo, tanto la participación de tau en respuestas de corto plazo al amiloide como la participación de cdk5 asociada a “balsas lipídicas”. Ya que estos microdominios de membrana han sido recientemente asociados a la EA, los resultados obtenidos aquí permiten postular una vía de respuesta temprana al péptido, en que no solo se active Fyn produciendo un aumento en la fosforilación en Tyr 18, sino que

también un aumento en la fosforilación de tau en Thr 231 y luego en Ser 396/404. La asociación de tau en “balsas lipídicas” con el complejo cdk5/p35 activado permite inferir la participación de estos microdominios como ambientes propicios para el encuentro de ambas proteínas y por lo tanto que se favorezca la fosforilación de tau. La secuencia de eventos observada en “balsas lipídicas” se resume en el modelo de la **Figura 18**.

Esta interacción no es sólo importante para explicar el caso de la EA, sino también explicaría lo que ocurre durante el desarrollo de cerebro fetal, ya que el tipo de fosforilación de tau como Ser 396/404 es de vital importancia para la normal extensión de procesos neuronales, regulando la afinidad y estabilización por tau de los microtúbulos. Nuestros resultados podrían ser también de interés en el contexto del desarrollo neuronal.

Volviendo a la búsqueda del elemento responsable en la localización de tau en “balsas lipídicas”, concluimos que Fyn no es necesario y suficiente para cumplir este rol, lo que indica la existencia un nuevo mediador. En apoyo de la hipótesis de la no participación de Fyn está el hecho de detectar fosforilación en Tyr 18 en  $\Delta P$ -tau, donde el dominio de unión a Fyn fue deletado. En este trabajo postulamos que existe un intermediario en la unión de tau con Fyn para el caso de  $\Delta P$  y que posiblemente sea el mismo que participe en la interacción de tau con membrana. Pensamos que Gsk3 $\beta$  podría cumplir este rol, ya que está presente en las células Cos 7, donde se realizó el análisis de fosforilación de  $\Delta P$  por Fyn. Se ha descrito que interactúa con Fyn y además también está presente en “balsas lipídicas” en células controles, sin embargo, no se ha descrito que Gsk3 $\beta$  posea elementos que le permitan asociarse directamente a la membrana

plasmática. Es más, al explicar la detección de la quinasa en los microdominios de membrana se postuló también la unión con alguna proteína de unión a membrana.

Se ha descrito que tau y Gsk3 $\beta$  forman un complejo con la proteína de andamio 14-3-3. Ésta es ubicua y se asocia directamente a la membrana plasmática. Se describió que la fosforilación de tau por una forma de Gsk3 $\beta$  fosforilada en Ser 9, considerada como inactiva, se veía altamente favorecida por la unión de 14-3-3 al complejo. Además, cuando Gsk3 $\beta$  era fosforilada en Tyr 216, considerada como forma activa, se disociaba de 14-3-3, liberándose del complejo con tau ubicado en membrana (Agawal-Mawal et al., 2003). Al analizar nuestros resultados, vimos que a los 2 min de tratamiento con el péptido, la quinasa se libera de los microdominios. Esta disociación de la membrana podría ocurrir producto del aumento en la fosforilación de Gsk3 $\beta$  en Tyr 216. Se ha observado que esta fosforilación aumenta luego de estímulos en los que participa Fyn, de hecho en el caso de la activación por insulina, Fyn es responsable del aumento de la fosforilación de Gsk3 $\beta$  en Tyr 216 en menos de 2 min de tratamiento (Lesort et al., 1999).

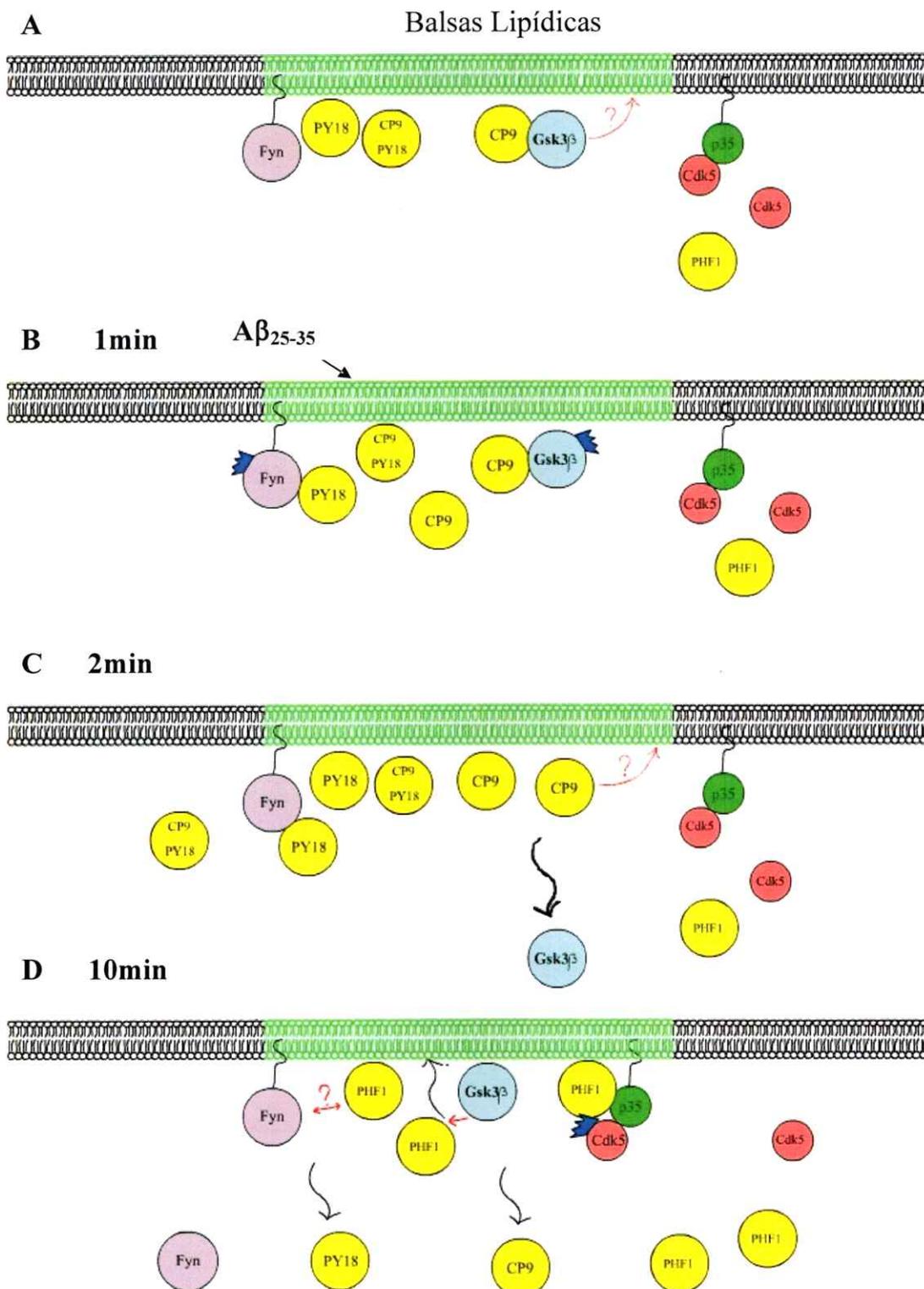
Es interesante notar que el patrón de migración electroforética de la quinasa a los 10 min en las fracciones de “balsas lipídicas” difiere de las fracciones no “balsas lipídicas”, ésta presenta una mayor migración electroforética con un menor peso molecular aparente. Una explicación a este fenómeno es que exista un recambio en la subpoblación de Gsk3 $\beta$  asociada a membrana, que al activarse sea fosforilada en su residuo Tyr 216 y como producto se libere de las “balsas lipídicas”. Luego la forma que regresa a las “balsas lipídicas” sea una variante inactiva y desfosforilada en Tyr216 y por lo tanto de

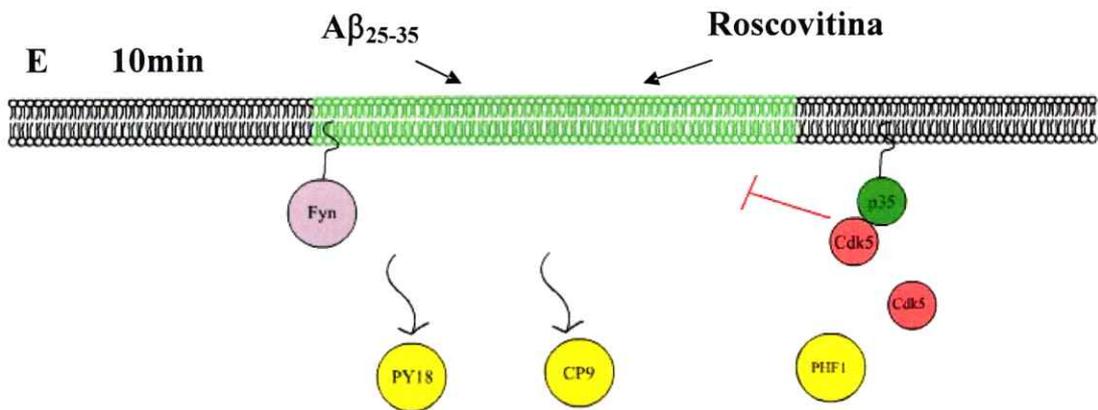
mayor movilidad electroforética. Este planteamiento coincide con las características de unión descritas para Gsk3 $\beta$  con 14-3-3.

Tomando en cuenta los antecedentes presentados, Gsk3 $\beta$  podría ser activada luego del primer minuto de tratamiento con amiloide, coincidente con el aumento en la fosforilación de tau en Thr 231. Posiblemente a los 2 min la quinasa sea liberada de las "balsas lipídicas" debido a un aumento en su fosforilación en Tyr 216. Sin embargo, puede que los niveles de tau fosforilada en Thr 231 producidos por la quinasa antes de ser liberada, aun se mantengan detectables a los 2 min.

Finalmente, A $\beta$  podría actuar por medio de la unión con integrinas, ya que existen evidencias que implican un motivo RHDS, similar al motivo RGD presente en proteínas de unión a integrinas como es el caso de fibronectina. Se ha descrito una competencia entre fibronectina y el péptido amiloide en la unión por integrinas (Sabo et al., 1995).

Como proyección futura de este trabajo de tesis sería interesante continuar con la búsqueda del elemento responsable de la asociación de tau con "balsas lipídicas", y analizar la relocalización de cdk5 en "balsas lipídicas" como blanco de tratamiento en la EA, con el fin de prevenir la hiperfosforilación de tau.





**Figura 18:** Caricatura representando la dinámica del complejo Fyn-tau y las quinasas Cdk5 y Gsk3 $\beta$  al incubar células SHSY5Y con A $\beta_{25-35}$  10 $\mu$ M. **A)** células control, **B)** luego de 1min de incubación **C)** luego de 2min de incubación, **D)** luego de 10min, **E)** pre-tratamiento por 1h con Roscovitina 10 $\mu$ M y luego por 10min con A $\beta_{25-35}$ . Desde el primer minuto de tratamiento con A $\beta$ , se presume que Fyn y Gsk3 $\beta$  se activan y consecuentemente aumenten los niveles de tau fosforilada en Tyr18 (PY18) y tau fosforilada en Thr231 (CP9) observado a los 2min. Luego de 10min, cdk5 podría experimentar una activación y una posterior relocalización en “balsas lipídicas”, aumentando los niveles de tau fosforilada en Ser396/404 (PHF-1). En este punto, Gsk3 $\beta$  también podría contribuir a la fosforilación de tau en Ser396/404. La interacción entre Fyn y tau fosforilada en Ser396/404 en casos con A $\beta$  aún se desconoce. Con incubación previa de las células con el inhibidor de cdk5, roscovitina, el complejo cdk5/p35 ya no se relocaliza en las “balsas lipídicas” así como tampoco se detectan niveles de tau fosforilada en Ser396/404 en estas fracciones.

● : Proteína tau

■ : activación de quinasas

↗ : mecanismo desconocido de interacción con la membrana

## 9. CONCLUSIONES

- Tau se localiza en las “balsas lipídicas” independiente de Fyn, aunque Fyn podría estar modulando su distribución subcelular según se observó en células Cos7.
- La fosforilación de tau en Tyr 18 por Fyn no es determinante para su distribución subcelular.
- Las proteína quinasa cdk5 se asocia a “balsas lipídicas” solamente en respuesta a tratamientos con el amiloide  $A\beta_{25-35}$ .
- Las variantes fosforiladas de tau en Thr231 y Ser396/404 se distribuyen diferencialmente en “balsas lipídicas”. El mismo patrón se ve reflejado en la unión con Fyn y en los niveles de fosforilación en Tyr 18.
- La interacción de tau fosforilada en Ser 396/404 y Thr231 con Fyn sería favorecida por proteínas mediadoras.
- La presencia de tau, cdk5 y Gsk3 $\beta$  en las “balsas lipídicas”, y los cambios en la fosforilación de tau como respuesta al  $A\beta_{25-35}$ , plantean un mecanismo de interacción producido por este estímulo.

## 10. BIBLIORAFIA

- Agawal-Mawal A., Qureshi H., Cafferty P., Yuan Z., Han D., Lin R. and Paudel H. (2003) 14-3-3 connects glycogen synthase kinase 3 $\beta$  to tau within a brain Microtubule-associated tau phosphorylation complex. *J Biol Chem* 278(15):12722-12728
- Alvarez, A., Toro, R., Cáceres, A. and Maccioni, R.B. (1999) Inhibition of tau phosphorylating protein kinase Cdk5 prevents beta-amyloid induced neuronal death. *FEBS Letters*. 459: 421-427
- Alvarez A., Munoz JP., Maccioni RB. (2001) A Cdk5-p35 stable complex is involved in the beta-amyloid-induced deregulation of Cdk5 activity in hippocampal neurons. *Exp Cell Res*. 264: 266-74
- Amin N., Albers W. and Pant H. (2002) Cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) activation requires interaction with three domains of p35. *J Neurosci Res* 67:354-362
- Andreadis A. (2005) Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative disease. *Biochim et Biophys Acta* 1739:91-103
- Arrasate M., Pérez M., and Ávila J. (2000) Tau dephosphorylation at Tau-1 site correlates with its association to cell membrane. *Neurochem Res*. 25: 43-50
- Bhaskar K., Yen S. and Lee G. (2005) Disease-related modifications in Tau affect the interaction between Fyn and Tau. *J Biol Chem* 280(42):35119-35125
- Biernat J. and Mandelkow EM. (1999) The development of cell processes induced by tau protein requires phosphorylation of serine 262 and 356 in the repeat domain and is inhibited by phosphorylation in the proline-rich domains. *Mol Biol Cell* 10: 727-740
- Billingsley M. and Kinkaid R. (1997) Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein: effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration. *Biochem J*. 323: 577-591
- Blonder J., Hale ML., Lucas DA., Schaefer CF., Yu LR., Conrado TP., Isaac HJ., Stiles BG. and Veenstra TD. (2004) Proteomic analysis of detergent-resistant membrane lipids. *Electrophoresis* 25(9):1307-1318
- Brandt R. and Lee G. (1993) Functional organization of Microtubule-associated protein Tau. *J Biol Chem* 268: 3414-3419

- Brandt R., Léger J. and Lee G. (1995) Interaction of Tau with the neural plasma membrane mediated by Tau amino-terminal projection domain. *J Cell Biol* 131: 1327-1340
- Brown DA and London E. (1998) Functions of lipids and lipids in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14: 111-136
- Cheng HC, Bjorge JD, Aebersold R, Fujita DJ and Wang JH (1996). Purification of bovine thymus cytosolic C-terminal Src kinase (CSK) and demonstration of differential efficiencies of phosphorylation and inactivation of p56lyn and pp60c-src by CSK. *Biochemistry*.35(36):11874-87
- Ching J., Palop J., Yu Q., Kojima N., Masliah E. and Mucke L. (2004) Fyn kinase modulates synaptotoxicity, but not aberrant sprouting, in human amyloid precursor protein transgenic mice. *Neurobiol Disease* 24(19):4692-4697
- Cho J. and Johnson G. (2003) Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  phosphorylates Tau at both primed and unprimed sites. *J Biol Chem* 278 (1): 187-193
- Clementi ME. and Misiti F. (2005) Substitution of methionine 35 inhibits apoptotic effects of A $\beta$ (31-35) and A $\beta$ (25-35) fragments of amyloid-beta protein in PC12 cells. *Med Sci Monit* 11(11): BR381-385
- Combs C., Coleman P. and O'Banion MK. (1998) Developmental regulation and PKC dependence of Alzheimer's-type tau phosphorylations in cultured fetal rat hippocampal neurons. *Develop Brain Res* 107:143-158
- Correas I., Padilla R. and Avila J. (1990) The tubulin-binding sequence of brain microtubule-associate proteins, tau and MAP-2, is also involved in actin binding. *Biochem J* 269(1):61-64
- Cross D., Muñoz J.P., Hernández P. and Maccioni R.B (2000). Nuclear and cytoplasmic Tau protein from human non-neuronal cells share common structural and functional features with brain tau. *J Cell Biochem* 78: 305-317
- Cruz J., Tseng H., Goldman J., Shih H. and Tsai LH. (2003) Aberrant Cdk5 activation by p25 triggers pathological events leading to neurodegeneration and neurofibrillary tangles. *Neuron* 40:471-483
- Derkinderen P., Scales T., Hanger D., Leung K., Byers H., Ward M., Lenz Ch., Price C., Bird I., Perera T., Kellie S., Williamson R., Noble W., Van Etten R., Leroy K., Brion J., Reynolds H. and Anderton B. (2005) Tyrosine 394 is phosphorylated in Alzheimer's

paired helical filaments tau and in fetal tau with c-Abl as the candidate tyrosine kinase. *J Neurosci* 25(28):6584-6593

Eckert G., Igbavboa U. Müller W. and Wood G. (2003) "balsas lipídicas" of purified mouse brain synaptosomes prepared with or without detergent reveal different lipid and protein domains. *Brain Res* 962: 144-150

Eehalt R., Keller P., Haas Ch., Thiele Ch. and Simons K. (2003) Amyloidogenic processing of the Alzheimer  $\beta$ -amyloid precursor protein depends on "balsas lipídicas". *J Cell Biol* 160(1):113-123

Ekinci F. and Shea T. (2000) Phosphorylation of tau alters its association with the plasma membrane. *Cell Mol Neurobiol* 20: 497-508

Farias GA, Muñoz JP, Garrido J, Maccioni RB. (2002) Tubulin, actin, and tau protein interactions and the study of their macromolecular assemblies *J Cell Biochem* 85:315-24

Farias GA, Vial C. and Maccioni RB. (1992) Specific macromolecular interactions between tau and the microtubule system. *Mol Cell Biochem* 112: 81-88

Flaherty DB., Soria JP., Tomasiewicz HG. and Wood JG. (2000) Phosphorylation of human tau protein by microtubule-associated kinases: Gsk3 $\beta$  and cdk5 are key participants. *J Neurosci Res* 62:463-472

Foster L., de Hoog C. and Mann M. (2003) Unbiased quantitative proteomics of balsas lipídicas reveals high specificity for signaling factors. *Proc Natl Acad Sci* 100(10):5813-5818

Goedert M., Crowther A. and Garner C. (1991) Molecular characterization of microtubule-associated proteins tau and MAP2. *Trends in Neuroscience* 14(5):193-199

Goedert M., Spillantini MG., Jakes R., Crowther RA., Vanmechelen E., Probst A., Gotz J., Burki K. and Cohen P. (1995) Molecular dissection of the paired helical filament. *Neurobiol Aging*. 16(3):325-34. Review.

Ho G., Hashimoto M., Adame A., Izu M., Alford M., Thal L., Hansen L. and Masliah A. (2005) Altered p59<sup>Fyn</sup> kinase expression accompanies disease progression in Alzheimer's disease: implications for its functional role. *Neurobiol Aging* 26:625-635

Ishiguro K., Shiratsuchi A., Sato S., Omori A., Arioka M., Kobayashi S., Uchida T. and Imahori K. (1993) Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments. *FEBS Lett* 325(3):167-172

Kawarabayashi T., Shoji M., Younkin LH., Wen-Lang L., Dickson DW., Murakami T., Matsubara E., Abe K., Ashe KH and Younkin SG. (2004). Dimeric amyloid beta protein rapidly accumulates in balsas lipídicas followed by apolipoprotein E and phosphorylated tau accumulation in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 24(15): 3801-3809

Kenessey A. and Yen S. (1993) The extent of phosphorylation of fetal tau is comparable to that of PHF-tau from Alzheimer paired helical filaments. *Brain Res* 629(1):40-46

Klein C., Krämer EM., Cardine AM., Schraven B., Brandt R. And Trotter J.(2002) Process outgrowth of oligodendrocytes is promoted by interaction of fyn kinase with the cytoskeletal protein tau. *J Neuroscience* 22: 698-707

Kypta RM., Hemming A. and Courtneidge SA. (1988) Identification and characterization of p59fyn (a src-like protein tyrosine kinase) in normal and polyoma virus transformed cells. *EMBO J.* 7(12):3837-44.

Lau KF., Miller CCJ., Anderton B. and Shaw PC. (1999) Expression analysis of glycogen synthase kinase-3 in human tissues. *J Peptide Res* 54:85-91

Lee G. (2005) Tau and src family tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta* 1739:323-330

Lee G., Newman T., Gard D., Band H. and Panchamoorthy G. (1998) Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinase. *J Cell Sci* 111: 3167-3177

Lee G., Thangavel R., Sharma V., Litersky J., Bhaskar K., Fang S., Do H., Andreadis A., Van Hoesen G. and Ksiezak-Reding H. (2004) Phosphorylation of Tau by Fyn: implications for Alzheimer's Disease. *J Neuroscience* 24(9):2404-2312

Lee G. and Rook S. (1992) Expression of tau protein in non-neuronal cells: microtubule binding and stabilization. *J Cell Sci* 102: 227-237

Lee KY., Rosales JL., Lee BC., Chung SH., Fukui Y., Lee NS., Lee KY. and Jeong YG. (2004b) Cdk5/p35 expression in the mouse ovary. *Mol Cells.* 17(1):17-22.

Léger J.G., Brandt R. and Lee G. (1994) Identification of tau protein regions required for process formation in PC12 cells. *J Cell Sci* 107: 3403-3412

Lesort M., Jope R. and Johnson G. (1999) Insulin Transiently increases tau phosphorylation : involvement of Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and Fyn tyrosine kinase. *J Neurochem* 72:576-584

Li T. and Paudel HK. (2006) Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylates Alzheimer's disease-specific Ser396 of microtubule-associated protein tau by a sequential mechanism. *Biochemistry.* 45(10):3125-33.

- Ling Y., Morgan K. and Kalsheker N. (2003) Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease. *Int J Biochem and Cell Biol* 35:1505-1535
- Maas T., Eidenmüller J., and Brandt R. (2000) Interaction of tau with the neural membrane cortex is regulated by phosphorylation at sites that are modified in paired helical filaments. *J Biol Chem.* 275: 15733-40
- Maccioni RB, Rivas CI and Vera JC. (1988) Differential interaction of synthetic peptides from the carboxyl-terminal regulatory domain of tubulin with microtubule-associated proteins. *EMBO J.* (7):1957-63
- Maccioni R.B. and Cambiazo V. (1995) Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. *Physiol Rev.* 75: 835-64
- Maccioni RB., Munoz JP., Barbeito L. (2001a) The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch. Med. Res.* 32(5):367-81
- Maccioni R.B., Otth C., Concha II., Munoz JP. (2001b) The protein kinase Cdk5. Structural aspects, roles neurogenesis and involvement in Alzheimer's pathology. *Eur.J. Biochem.* 268:1518-27
- Mandelkow EM., Drewes G., Biernat J., Gustke N., Van Lint Vandenheede JR., Mandelkow E. (1992) Glycogen synthase kinase-3 and Alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau. *FEBS Lett.* 314:315-21
- Marlow L., Cain M., Pappolla MA. and Sambamurti K. (2003) Beta-secretase processing of the Alzheimer's amyloid protein precursor (APP). *J Mol Neurosci.* 20(3):233-9.
- Moraga DM., Nunez P., Garrido J. and Maccioni RB. (1993) A tau fragment containing a repetitive sequence induces binding of actin filaments. *J Neurochem* 61(3):979-986
- Murai H., Okazaki M. and Kikuchi A. (1996) Tyrosine dephosphorylation of glycogen synthase kinase-3 is involved in its extracellular signal-dependent inactivation. *FEBS Lett.* 392(2):153-60
- Paglini G., Pigino G., Kunda P., Morfini G., Maccioni R., Quiroga S., Ferreira A. and Caceres A. (1998) Evidence for the participation of the neuron-specific CDK5 activator P35 during laminin-enhanced axonal growth. *J Neurosci.* 18(23):9858-69.
- Parkin E., Turna A. and Hooper N. (1999) Amyloid precursor protein, although partially detergent-insoluble in mouse cerebral cortex, behaves as an atypical lipid raft protein. *Biochem J* 344:23-30

- Patrick G., Zukerberg L., Nikolic M., de la Monte S., Dikkes P. and Tsai LH. (1999) Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* 402:615-622
- Pelech S. (1995) Networking with proline-directed protein kinases implicated in tau phosphorylation. *Neurobiol Aging* 16(3):247-261
- Rojo L., Sjoberg MK., Hernandez P., Zambrano C. and Maccioni RB. (2006) Roles of cholesterol and lipids in the etiopathogenesis of Alzheimer's disease. *J Biomed Biotechnol* 2006(3):73976
- Sabo S., Lambert MP., Kessey K., Wade W., Krafft G. and Klein WL. (1995) Interaction of beta-amyloid peptides with integrins in a human nerve cell line. *Neurosci Lett* 184:25-28
- Saez E., Pehar M., Vargas MR., Barbeito L. and Maccioni RB. (2006) Production of nerve growth factor by beta-amyloid-stimulated astrocytes induces p75NTR-dependent tau hyperphosphorylation in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 84 (5):1098-1106
- Shea TB. (1997) Phospholipids alter tau conformation, phosphorylation, proteolysis, and association with microtubules: implication for tau function under normal and degenerative conditions. *J Neurosci Res.* 50(1):114-22.
- Simons K and Toomre D. (2000) "balsas lipidicas" and signal transduction. *Nature Reviews* 1: 31-39
- Sjoberg MK., Shestakova E., Mansuroglu Z., Maccioni RB. and Bonnefoy E. (2006) Tau protein binds to pericentromeric DNA: a putative role for nuclear tau in nucleolar organization. *J Cell Sci* 119(10):2025-2034
- Sperber BR., Leight S., Goedert M., Lee VM. (1995) Glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylates tau protein at multiple sites in intact cells. *Neurosci. Lett.* 197:149-53
- Sui Z., Kovacs A. and Maggirwar S. (2006) Recruitment of active glycogen synthase kinase-3 into neuronal "balsas lipidicas". *Biochem Biophys Res Commun* 345:1643-1648
- Takashima A., Honda T., Yasutake K., Michel G., Murayama O., Murayama M., Ishiguro K. and Yamaguchi H. (1998) Activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 $\beta$  by amyloid  $\beta$  peptide (25-35) enhances phosphorylation of tau in hippocampal neurons. *Neurosci Res* 31:317-323

- Tanemura K., Murayama M., Akagi T., Hashikawa T., Tominaga T., Ichikawa M., Yamaguchi H. and Takashima A. (2002) Neurodegeneration with tau accumulation in a transgenic mouse expressing V337M human tau. *J Neurosci.* 22(1):133-41.
- Taniguchi T., Kawamata T., Mukai H., Hasegawa H., Isagawa T., Yasuda M., Hashimoto T., Terashima A., Nakai M., Ono Y. and Tanaka Ch. (2001) Phosphorylation of tau by PKN. *J Biol Chem* 276:10025-31
- Tsui-Pierchala B., Encinas M., Milbrandt J and Jonson M., Jr. (2002) "balsas lipídicas" in neuronal signaling and function. *TRENDS in Neurosci* 25 (8): 412-417
- Town T., Zolton J., Shaffner R., Schnell B., Crescentini R., Wu Y., Zeng J., DelleDonne A., Obregon D. and Tan J, Mullan M. (2002) p35/Cdk5 pathway mediates soluble amyloid-beta peptide-induced tau phosphorylation in vitro. *J Neurosci Res.* 69(3):362-72.
- Varadarajan S., Kanski J., Aksenova M., Lauderback Ch. and Butterfield A. (2001) Different mechanism of oxidative stress an neurotoxicity for Alzheimer's A $\beta$ (1-42) and A $\beta$ (25-35). *J Am Chem Soc* 123:5625-5631
- Vega I., Cui L., Propst J., Hutton M., Lee G. and Yen SH. (2005) Increase in tau tyrosine phosphorylation correlates with the formation of tau aggregates. *Mol Brain Res* 138: 135-144
- von Wichert G., Jiang G., Kostik A., De Vos K., Sap J. and Sheetz M. (2003) RPTP- $\alpha$  acts as a transducer of mechanical force on  $\alpha_v\beta_3$ -integrin-cytoskeleton linkages. *J Cell Biol* 161(1):143-153
- Wada S., Morishima-Kawashima M., Qi Y., Misoni H., Shimada Y., Ohno-Iwashita Y. and Ihara Y. (2003)  $\gamma$ -secretase activity is present in balsas lipídicas but is not cholesterol-dependent. *Biochemistry* 42:13977-13986
- Williamson R., Scales T., Clark B., Gibb G., Reynolds H., Kellie S., Bird I., Varndell I., Sheppard P., Everall I. and Anderton B. (2002) Rapid tyrosine phosphorylation of neuronal proteins including Tau and Focal Adhesion Kinase in response to Amyloid- $\beta$  peptide exposure: involvement of Src family protein kinases. *J Neurosci* 22(1):10-20
- Wilquet V. and De Strooper B. (2004) Amyloid-beta precursor protein processing in neurodegeneration. *Curr Opin Neurobiol* 14:582-588
- Witman GB., Cleveland DW., Weingarten MD. and Kirschner MW. (1976) Tubulin requires tau for growth onto microtubule initiating sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 73(11):4070-4.

Wischik CM. and Crowther RA. (1986) Subunit structure of the Alzheimer tangle. *Br Med Bull* 42(1):51-56