



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISILOGIA BIOFISICA Y NEUROCIENCIAS

“Efecto de las citocinas proinflamatorias $IFN\gamma/TNF\alpha$ sobre los niveles de la
proteína Tau”

TESIS

Que presenta:

JUAN CARLOS RAZO SEDGLACH

Para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE
NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Directores de la Tesis:

Dr. Porfirio Nava Domínguez

Dr. Benjamín Florán Garduño

México, D.F.

ENERO 2016

A mis madres:

Diana Guadalupe Sedglach Martínez

Juana Martínez Cordero

A mis hermanos:

José Luis Razo Sedglach

Javier Razo Sedglach

Eleazar Gerardo Cruz Bautista

Nuestra mayor gloria no está en no haber caído nunca, sino en levantarnos cada vez que caemos.

Oliver Goldsmith

Los experimentos realizados en este trabajo se llevaron a cabo en el laboratorio 41 del departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV bajo la dirección de:

Dr. Porfirio Nava Domínguez

Dr. Benjamín Florán Garduño



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Agradecimiento especial al CONACYT por todas las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto.

AGRADECIMIENTOS

Dr. Porfirio Nava Domínguez

Por su confianza y esfuerzo, por darme la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo y compartir conmigo su conocimiento. De manera especial quiero agradecer el tiempo y la paciencia que me brindo para aminorar mis errores y de esa manera, culminar este proyecto y enriquecer mi carrera académica profesional.

Dr. Benjamín Florán Garduño

Por su apoyo y dirección en el desarrollo de esta tesis.

A mi comité tutorial

Por sus comentarios y su guía a lo largo del proyecto, por el aporte y consejos para la mejora de esta tesis.

Dr. Rubén Gerardo Contreras Patiño

Dr. José Segovia Vila

Dr. José Carmen Luna Muñoz

DEDICATORIAS

A mi Madre

Por ser la mejor en todos los aspectos, por darme vida, amor, ánimos, cariño y aliento en todo momento y de igual manera, por todos esos regaños que forjaron en mí un deseo de perseverancia, en conclusión, eres lo mejor, gracias por todo .

A mis Hermanos

Por apoyarme en todo momento, por el tiempo y la paciencia que han tenido a lo largo de esta vida juntos.

A Carolina Serrano

Por ser una gran maestra, amiga, compañera y mentora, por tu apoyo, comprensión y paciencia a lo largo de este viaje juntos, por mostrarme mis errores y mejorar mis virtudes. Por siempre estar conmigo cuando te necesite.... Gracias.

A Daniel González y Dulce Becerra

Por ayudarme en esos días de incertidumbre, por escucharme y siempre tener una respuesta alentadora y sincera que me motivaba a seguir adelante.

Itzel, Toño y Omar

Por ser mis amigos, por permitirme compartir momentos de estrés y felicidad, por el apoyo incondicional brindado a este proyecto y por ayudarme a ser una mejor persona.

Aurora y Normita

Por su apoyo incondicional, por mostrarme mis errores y acompañarme a lo largo de este proyecto.

Dimelza, Diego e integrantes del laboratorio 41

Por sus consejos y el apoyo brindado

Elizabeth Bautista alumna de doctorado

Por el tiempo, el apoyo incondicional y recursos brindados a lo largo de este proyecto.

INDICE DE CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN	
1.1	Enfermedad de Alzheimer.....	1
1.2	Proteína Tau.....	1
1.3	Proteína Tau en condiciones patológicas.....	2
1.4	Fosforilación de la proteína Tau.....	3
1.5	Truncación de la proteína Tau.....	4
1.6	Inflamación en la enfermedad de Alzheimer.....	5
1.7	Citocinas inflamatorias en la enfermedad de Alzheimer.....	6
2.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	7
3.	HIPÓTESIS.....	8
4.	OBJETIVOS	
4.1	Objetivo general.....	8
4.2	Objetivos particulares.....	8
5.	MATERIALES.....	9
6.	MÉTODOS.....	11
7.	RESULTADOS	
7.1	Identificación de la proteína Tau en cerebros de pacientes con EA por inmunofluorescencia.....	17
7.2	Extracción de la proteína Tau del cerebro de pacientes con EA.....	17
7.3	Reconocimiento de la proteína Tau de cerebros de pacientes con EA por Dot Blot.....	18
7.4	Identificación de la proteína Tau en pacientes con EA por Western Blot.....	19
7.5	Efecto de las citocinas IFN γ /TNF α sobre la proteína Tau en células epiteliales.....	20
7.6	Incremento en los niveles de la proteína Tau por IFN γ /TNF α en células epiteliales RKO y SW480.....	21
7.7	Incremento en los niveles de la proteína Tau por activación de Akt en células epiteliales tratadas con citocinas IFN γ /TNF α	22
7.8	Efecto de IFN γ /TNF α sobre la proteína Tau en las células neuronales SH-SY5Y.....	23
7.9	Incremento en los niveles de la proteína Tau por IFN γ /TNF α en células neuronales SH-SY5Y.....	24
7.10	Incremento en los niveles proteicos de Tau por activación de Akt en células neuronales tratadas con citocinas IFN γ /TNF α	25
7.11	Incremento en la fosforilación de Tau por activación de Akt en células neuronales tratadas con citocinas IFN γ /TNF α	26
8.	DISCUSIÓN.....	27
9.	CONCLUSIONES.....	29
10.	PERSPECTIVAS.....	29
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	30

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas

Tabla 1. Anticuerpos primarios para Western Blot	13
Tabla 2. Anticuerpos secundarios para Western Blot.....	14
Tabla 3. Anticuerpos para Dot Blot.....	15
Tabla 4. Anticuerpos para inmunofluorescencia.....	16

Figuras

Figura 1. Isoformas de la proteína Tau.....	2
Figura 2. Agregados de la proteína Tau en cerebros de pacientes con EA y cerebros de pacientes control.....	17
Figura 3. Detección de la proteína Tau en extractos de FHAS obtenidos de cerebros de individuos control y pacientes con EA.....	18
Figura 4. Inmunoblot de la proteína Tau de individuos control y pacientes con EA.....	19
Figura 5. Las citocinas proinflamatorias $IFN\gamma/TNF\alpha$ aumentan los niveles de Tau-GFP en células epiteliales RKO.....	20
Figura 6. Tratamiento con citocinas $IFN\gamma/TNF\alpha$ en células RKO y SW480 transfectadas con la proteína Tau.....	21
Figura 7. Las citocinas proinflamatorias $IFN\gamma/TNF\alpha$ aumentan los niveles de Tau-GFP en células epiteliales RKO por la activación de Akt.....	22
Figura 8. Las citocinas proinflamatorias $IFN\gamma/TNF\alpha$ aumentan los niveles de Tau en células neuronales SH-SY5Y.....	23
Figura 9. Tratamiento con citocinas $IFN\gamma/TNF\alpha$ en células neuronales SH-SY5Y.....	24
Figura 10. Papel de Akt en el incremento de los niveles de la proteína Tau tratadas con citocinas proinflamatorias.....	25
Figura 11. Fosforilación de la proteína Tau por Akt en los residuos Thr ²¹² /Ser ²¹⁴ en células epiteliales y neuronales tratadas con citocinas proinflamatorias.....	26

ABREVIATURAS

BCA: Ácido Bicinconínico

BUAP: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

CaMK-II: Cinasa Dependiente de Ca^{+2} /Calmodulina II

Cdk5: Cinasa Dependiente de Ciclina 5

CHO: Células de Ovario de Hámster Chino

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

EA: Enfermedad de Alzheimer

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GFP: Proteína Verde Fluorescente

GSK- 3 β : Cinasa de Glucógeno Sintetasa beta

IL-6: Interleucina 6

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IFN γ : Interferon Gamma

JAK: Janus Quinasas

JAM: Junctional Adhesion Molecule

MAP: Proteínas Asociadas a Microtúbulos

PI3K: Fosfatidilinositol- 3-cinasa

PKA: Proteína Cinasa Dependiente de cAMP

PKC α : Proteína Cinasa C-alfa

RIPA: Amortiguador de Radioinmunoprecipitación

RKO: Células de Carcinoma de Colon Humano

SH-SY5Y: Células de Neuroblastoma de Humano

SNC: Sistema Nervioso Central

SW480: Células de Adenocarcinoma Colorectal de Humano

TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante beta

TNF α : Factor de Necrosis Tumoral alfa

RESUMEN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología neurodegenerativa que afecta a personas mayores de 65 años, en donde una de las lesiones presentes en los cerebros con EA es la acumulación de marañas neurofibrilares debido a la agregación de la proteína Tau. En condiciones normales esta proteína tiene como función estabilizar los microtúbulos axonales; sin embargo en la EA la proteína Tau pierde afinidad por los microtúbulos y forma agregados. Existen muchos factores que permiten que la proteína Tau se agregue, incluidas diferentes modificaciones postraduccionales, principalmente truncaciones y fosforilaciones. Algunos estudios han sugerido que los procesos neuroinflamatorios favorecen el desarrollo de EA, sin embargo el papel de estos procesos en la agregación de Tau es desconocido. En este trabajo evaluamos la presencia de modificaciones postraduccionales que se encuentran presentes en cerebros de pacientes con EA y el papel que juegan los procesos inflamatorios en la generación de las mismas. Empleamos muestras de cerebros de pacientes diagnosticados *post mortem* con EA y muestras de individuos control de diferentes edades, de los cuales se extrajo a la proteína Tau para su análisis. Los resultados obtenidos muestran un incremento en el peso molecular de la proteína Tau proveniente de pacientes con EA en comparación con individuos control debido posiblemente a la presencia de modificaciones postraduccionales. La sobreexpresión de una Tau acoplada a GFP (Tau-GFP) en células epiteliales que fueron estimuladas con citocinas proinflamatorias $IFN\gamma/TNF\alpha$, mostró un incremento en los niveles proteicos de Tau debido a la activación de Akt en estas células, dicho efecto fue confirmado utilizando células neuronales. Todo en conjunto sugiere que los procesos inflamatorios contribuyen al incremento en los niveles proteicos de la proteína Tau.

ABSTRACT

Alzheimer's Disease (AD) is a neurodegenerative disease that affects people over 65, one of the lesions in AD brains is the accumulation of neurofibrillary tangles due to aggregation of the tau protein. Under normal conditions this protein has the function of axonal microtubules stabilize; However in AD Tau protein loses affinity for microtubules and forms aggregates. There are many factors that allow the Tau protein is added, including different posttranslational modifications, mainly truncations and phosphorylations. Some studies have suggested that the neuroinflammatory processes development into EA, however the role of these processes in the aggregation of Tau is unknown. We evaluated the presence of posttranslational modifications that are present in the brains of patients with AD and the role of inflammatory processes in generating them. We used brain samples from patients diagnosed with AD and *post mortem* samples from individuals of different ages and then we extracted the Tau protein for analysis. The results show an increase in the molecular weight of the Tau protein from AD patients compared with individuals possibly due to the presence of posttranslational modifications. Overexpression of Tau coupled to GFP (Tau-GFP) in epithelial cells were stimulated with proinflammatory cytokines $IFN\gamma/TNF\alpha$ showed increased levels of tau protein due to activation of Akt in these cells, this effect was confirmed using neuronal cells. All together suggests that inflammatory processes contribute to increased protein levels of the tau protein.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología neurodegenerativa que causa demencia en el 10% de las personas mayores a 65 años (*Sardi F. et al., 2011*). La EA se caracteriza por el deterioro progresivo e irreversible de los procesos cognitivos y de la memoria, lo que conlleva cambios en el comportamiento y en la conducta (*Hampela H. et al., 2010*). El diagnóstico definitivo de la enfermedad se realiza *post mortem*. En el cerebro de pacientes con EA se ha caracterizado la presencia de marañas neurofibrilares y placas neuríticas, ambas lesiones están relacionadas con la agregación de proteínas específicas. Las placas neuríticas son depósitos extracelulares compuestos esencialmente por proteína amiloide β acompañada con restos de cuerpos neuronales, también llamados neuritas distróficas (*Goedert M. et al., 1989*). Las marañas neurofibrilares son agregados proteicos compuestos principalmente por la proteína Tau que ha sufrido modificaciones postraduccionales (*Goedert M. et al., 1989; Weaver C.L. et al., 2000*). Aunque ha sido bien caracterizada la presencia de marañas neurofibrilares y placas neuríticas en la EA, el mecanismo por el cual se desarrollan y su relación con el proceso neurodegenerativo aún no están bien dilucidados.

1.2 Proteína Tau

La proteína Tau pertenece al grupo de Proteínas Asociadas a Microtúbulos (por sus siglas en inglés MAPs) de la familia MAP2/Tau, la cual incluye proteínas de vertebrados como MAP2, MAP4, además de sus homólogos en otros animales. La proteína Tau pesa entre 50 kDa y 70 kDa. Existen seis isoformas que varían de entre 352 a 441 aminoácidos que son resultado de *splicing* alternativo en los exones 2, 3 y 10, variando con esto el número de dominios repetidos presentes en la proteína o el tamaño en la porción N-Terminal. La proteína Tau se encuentra normalmente en los axones de las neuronas y no en dendritas o en cuerpos celulares (*Binder L.I., 1985*), aunque también se ha observado en el núcleo (*Lu J. et al., 2014*) y en la membrana citoplasmática (*Brandt R. et al., 1995; Cleveland W. et al., 1977; Dehmelt L. et al., 2004*). Además, la proteína Tau también se expresa en líneas

celulares no neuronales como los fibroblastos y las células epiteliales, entre otras (Maccioni R. B. y Cambiazo V., 1995; Cross D.C., 2000; Sjöberg M. K. et al., 2006).

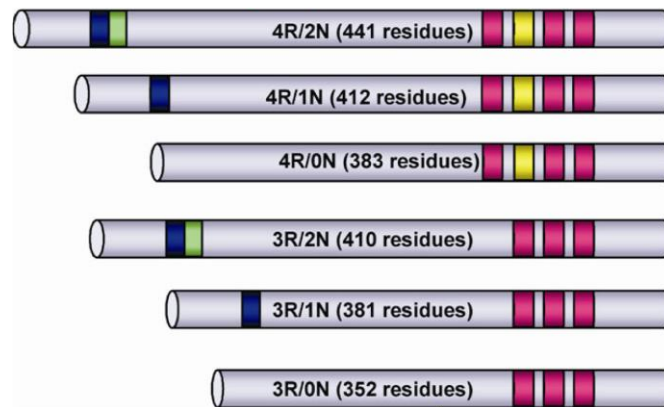


Figura 1. Isoformas de la proteína Tau.

En condiciones normales la proteína Tau se une a los microtúbulos axonales, los estabiliza y promueve su crecimiento (Brandt R. y Lee G., 1993; Ávila J. et al., 2004), participa en el transporte axonal de proteínas (Nichole E. et al., 2009), protege al ADN neuronal del estrés impidiendo su desnaturalización inducida por cambios en la temperatura y radicales libres, modula el crecimiento de los microtúbulos a partir de los centrómeros (Sultan A. et al., 2011; Hua Q y He RQ., 2003; Cross D.C. et al., 2000), promueve el desarrollo de la polaridad celular en cultivos neuronales (Brandt R. et al., 1995) y regula funciones relacionadas con la mitosis celular al asociarse con proteínas nucleares como nucleolina, entre otras (Sjöberg M. K. et al., 2006). Todo esto indica que la proteína Tau es esencial en muchos aspectos biológicos de las células neuronales.

1.3 Proteína Tau en condiciones patológicas

La agregación anormal de la proteína Tau se observa en cerebros de pacientes con Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas conocidas como Taupatías, las cuales se caracterizan principalmente por la inclusión de filamentos insolubles de la proteína Tau hiperfosforilada, troncada y con otras modificaciones postraduccionales. Se ha propuesto que en ciertas condiciones, la proteína Tau disminuye su afinidad por los microtúbulos, lo

que resulta en la liberación de oligómeros de Tau soluble (*Fischer A. et al., 2009; Shahani N. et al., 2002*) que detona la formación de las marañas. De hecho se ha demostrado que estos oligómeros de Tau pueden dañar la memoria en ratones no transgénicos, en forma similar a lo que sucede en los pacientes con Alzheimer (*Berger Z. et al., 2007; Santacruz K. et al., 2005; Sydow A. et al., 2011*). Para que los oligómeros de Tau soluble se agreguen en marañas, deben sufrir diferentes modificaciones postraduccionales (*Maeda S. et al., 2007; Crews E. y Masliah E., 2010*); se ha probado que la proteína Tau en su forma soluble puede ser blanco de cinasas, proteasas, ubiquitin-ligasas, glicosilasas y acetilasas (*Chen F. et al., 2004*) las cuales están implicadas con su toxicidad.

Se ha reportado que tratamientos que alteran la forma soluble de Tau inducen agregación e insolubilización de la proteína, por ejemplo, el rojo de congo, la inyección de proteínas de Tau fibrilares, la sobreexpresión de formas truncadas y la expresión de mutantes fosfomiméticas de Tau. Hasta el momento no se ha podido dilucidar el mecanismo preciso que lleva a la formación de estos agregados *in vivo* (*Jing L. et al., 2011; Khlistunova I. et al., 2006; Sato S. et al., 2002; Bandyopadhyay B. et al., 2007*), sin embargo, está claro que la formación de agregados de la proteína Tau comienza con la formación de dímeros, que son capaces de polimerizarse en oligómeros cada vez más grandes hasta constituir subunidades de filamentos llamados protómeros. La unión de dos o más protómeros forman unidades inmaduras llamadas premarañas que, al agregarse, forman finalmente estructuras llamadas marañas neurofibrilares. Se ha propuesto que estas lesiones que resultan de las modificaciones postraduccionales y de la agregación progresiva de la proteína Tau podrían ser una respuesta de protección del cuerpo o parte del proceso neuroinflamatorio crónico de la enfermedad.

1.4 Fosforilación de la proteína Tau

En condiciones normales, las fosforilaciones y defosforilaciones de la proteína Tau regulan el ensamble y acople de la misma a los microtúbulos, sin embargo cuando se encuentra hiperfosforilada la proteína pierde toda actividad biológica (*Ripova D. et al., 2012*). La hiperfosforilación de la proteína Tau puede resultar de la sobre expresión o incremento de

la actividad de algunas cinasas y/o una disminución en la expresión o actividad de fosfatasas (Buée L., 2000). Entre las cinasas que se sabe que pueden participar en la fosforilación de la proteína Tau se encuentran la *cinasa de glucógeno sintetasa beta* (GSK-3 β), *cinasa dependiente de ciclina 5* (Cdk5), *proteína cinasa dependiente de cAMP* (PKA) y *la cinasa dependiente de Ca²⁺/Calmodulina II* ((CaMK-II); de todas ellas, la GSK- 3 β tiene un papel fundamental en la regulación de la fosforilación de la proteína en condiciones tanto fisiológicas como patológicas, puesto que puede fosforilar a Tau en Ser¹⁹⁹, Thr²³¹, Ser³⁹⁶, Ser⁴⁰⁰, Ser⁴⁰⁴, y Ser⁴¹³, fosforilaciones detectadas en las MNF de los cerebros de pacientes con EA (Augustinack C. et al., 2002).

1.5 Truncación de la proteína Tau

Otra de las principales modificaciones que sufre la proteína Tau son las truncaciones. Algunos estudios proponen que éstas tienen un papel muy importante en la progresión de EA y la pérdida neuronal, ya que son el resultado de la activación de múltiples proteasas por diversas vías de señalización (Dhalla S. y Chakraborti S., 2014). Se ha reportado que las caspasas, calpaina y la trombina, entre otras, cortan a la proteína Tau en diferentes regiones, generando fragmentos de múltiples pesos moleculares, algunos de los cuales son neurotóxicos.

Caspasas

Son una familia de proteasas de cisteína esenciales en la apoptosis. Las caspasas se producen por la proteólisis de pro-caspasas. Las caspasas cortan a su proteína blanco en un sitio que tiene al menos un residuo de Aspartato (Nicholson D.W., 1999); la proteína Tau puede ser truncada por las caspasas 1, 3, 6, 7 y 8 en el Aspartico⁴²¹ y, además por la caspasa 6 en regiones cercanas al Aspártico¹³ (Gamblin T.C. et al., 2003).

Calpaina

Esta proteína de la familia de proteasas de cisteína se activan por el incremento de Ca²⁺ citosólico. La calpaina 1 se activa por concentraciones micromolares de Ca²⁺, la 2 requiere concentraciones milimolares de este ion (Sasaki T. et al., 1984). La proteína Tau puede ser

degradada por calpaina 1, formando fragmentos menores de ~17 kDa, que se han detectado en la neurodegeneración de células hipocampales (*Park S.Y., 2005*). Las truncaciones de Tau mediadas por calpaina se previenen si la proteína se fosforila por cinasas como GSK-3 β . Ambas calpains se han encontrado activadas anormalmente en cerebros de pacientes con EA (*Saito K. et al., 1993*).

Trombina

Es una proteasa de serina plasmática producto de la proteólisis de la protrombina. La trombina se ha relacionado con la agregación de la proteína Tau debido a que corta en múltiples argininas, glicinas y serinas, incluidas las Arg¹⁵⁵-Gli-¹⁵⁶, Arg²⁰⁹-Ser²¹⁰, entre otras, produciendo fragmentos que se han encontrado en cerebros de pacientes con EA (*Akiyama H. et al., 1992*).

1.6 Inflamación en la enfermedad de Alzheimer

La inflamación es una respuesta de protección del organismo que elimina la causa inicial del daño celular, inicia procesos de reparación y restablece la homeostasis del organismo e involucra células inmunes, vasos sanguíneos y mediadores químicos. Cuando la inflamación se encuentra en su etapa final o resolución, el organismo recupera su homeostasis, es decir se reduce el número de células inmunes en el sitio del daño por procesos de infiltración y apoptosis y aumenta la actividad fagocítica en el lugar. Cuando la inflamación y la neuroinflamación son crónicas, la resolución es disfuncional y fomenta neurodegeneración (*Wang X. et al., 2015*). Estudios epidemiológicos han sugerido que la neuroinflamación juega un papel muy importante en la neurodegeneración presente en la EA (*Nilsson L. et al., 1998*).

Mediante tomografía de emisión de positrones se ha observado que pacientes con diagnóstico presuntivo de EA cursan con un proceso neuroinflamatorio, sugiriendo que la neuroinflamación podría preceder a la EA y agravarse con el tiempo de progresión; asimismo se ha detectado un incremento de las citocinas proinflamatorias en suero de

pacientes vivos, y en tejidos de cerebros obtenidos *post mortem* de pacientes con EA (Griffin W.S. et al., 1989; Cagnin A. et al., 2001; Swardfager W. et al., 2010).

1.7 Citocinas inflamatorias en la enfermedad de Alzheimer

Las citocinas y quimiocinas son moléculas mediadoras de la inflamación que aumentan durante procesos inflamatorios y estimulan la señalización intracelular para favorecer el incremento de la diferenciación celular, respuesta inmune, reparación tisular, apoptosis e inflamación. Estos mediadores afectan a diversos tejidos del organismo, incluido el cerebral. En el sistema nervioso los mayores productores de citocinas son la microglia y los astrocitos de la periferia, aunque otros órganos o regiones del organismo también pueden producirla y afectar directamente al tejido cerebral.

Se ha mostrado que IL-6, una citocina proinflamatoria, induce hiperfosforilación de la proteína Tau en células hipocampales (Quintanilla A.R. et al., 2004), además se ha reportado que TNF α , IL-8, IL-18 y IL-12p40 (esta última también conocida como la subunidad β de IL-12 e IL-23), se detectan en líquido cefalorraquídeo de pacientes con Alzheimer (Heneka M. T. et al., 2014). Por otro lado, el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) y la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1 α) aumentan en el plasma de pacientes con EA pero no en pacientes sin demencia (Swardfager W. et al., 2010; Akiyama H. et al., 2000).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los procesos neuroinflamatorios se han implicado en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, además se ha reportado un incremento de citocinas proinflamatorias en sangre y en cerebros de pacientes con esta enfermedad; sin embargo, hasta el momento no se ha reportado el papel que juegan las diversas citocinas proinflamatorias en el procesamiento de la proteína Tau. Por lo tanto, es de nuestro interés investigar cuál es el efecto que tienen dos citocinas proinflamatorias clásicas: el IFN γ y el TNF α , en la proteína Tau.

3. HIPÓTESIS

La mezcla de citocinas proinflamatorias $\text{IFN}\gamma/\text{TNF}\alpha$ aumenta los niveles de la proteína Tau.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Investigar si la proteína Tau incrementa en células que fueron expuestas a la mezcla de citocinas $\text{IFN}\gamma/\text{TNF}\alpha$.

4.2 Objetivos particulares

1. Extraer la proteína Tau del cerebro de pacientes con la enfermedad de Alzheimer.
2. Identificar si la proteína obtenida en los extractos de cerebros corresponde a la proteína Tau.
3. Analizar si las citocinas proinflamatorias $\text{IFN}\gamma/\text{TNF}\alpha$ afectan los niveles de la proteína Tau transfectada en células epiteliales SW480 y RKO.
4. Analizar si las citocinas proinflamatorias $\text{IFN}\gamma/\text{TNF}\alpha$ afectan los niveles de la proteína Tau endógena en células SH-SY5Y.
5. Evaluar el papel de Akt sobre el incremento en los niveles de la proteína Tau en células epiteliales expuestas a las citocinas proinflamatorias $\text{IFN}\gamma/\text{TNF}\alpha$.
6. Evaluar la presencia de Tau fosforilada en el residuo $\text{Thr}^{212}/\text{Ser}^{214}$ en células epiteliales y neuronales tratadas con las citocinas proinflamatorias $\text{IFN}\gamma/\text{TNF}\alpha$.

5. MATERIALES

Cuantificación de proteínas

Las muestras fueron cuantificadas con un ensayo de Ácido Bicinconínico (BCA) de *Thermo Scientific*.

Amortiguador de radioinmunoprecipitación (ripa)

Preparado en Agua destilada; 50 mM Tris-HCl a pH7.4; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 1% NP-40; 0.1% SDS y suplementado con una tableta de inhibidores de proteasas (*Complete*), inhibidores de fosfatasas 2 al 1% (v/v) concentración final.

Amortiguador de muestra de laemmli 2x

NuPage de *Life Technologies* suplementado al 20 % con β -mercaptoetanol (v/v).

Gel de separación al 10%

Preparado en agua destilada; 25% amortiguador de Tris-HCl 1.5 M a pH 6.8; SDS 4%; acrilamida al 30%; 0.1% persulfato de amonio y 0.01% Temed.

Gel de concentración al 5%

Preparado en agua destilada; 25% amortiguador de Tris-HCl 1.5 M a pH 8.8; SDS 4%; acrilamida al 30%; 0.1% persulfato de amonio y 0.01% Temed.

Regulador de corrida para electroforesis

Preparado en agua destilada a pH 8.3; 25 mM Tris-HCl; 192 mM glicina; 0.1% SDS (p/v).
TBS-T. Preparado en agua destilada; 150 Mm NaCl; 10 mM Tris-HCl; 4% HCl a pH 8.0; adicionado con Tween-20 0.1% (v/v) concentración final.

Solución de bloqueo

Leche descremada al 2% (p/v) disuelta en TBS-T.

Regulador de transferencia

Preparado en agua destilada; 25 mM Tris-HCl; 192 mM glicina; 0.1% SDS; 20% metanol (v/v) concentración final.

Solución amortiguadora de Tau

Preparado en agua destilada a pH 6.8; 0.1 mM de Mes; 1 mM de EGTA; 0.1 mM de EDTA; 0.5 mM de MgCl₂; 1 mM de mercaptoetanol; 0.8 mM de NaCl (v/v) concentración final.

Solución amortiguadora buffer h

Preparado en agua destilada a pH 7.4; 10 mM Tris; 1 mM EGTA; 0.8 M NaCl; 10% sacarosa (p/v) concentración final.

6. MÉTODOS

Células CHO

Se cultivaron células de ovario de hámster chino (CHO) en medio F12 suplementado con suero fetal bovino al 10%, hasta alcanzar una confluencia de 80%-90% para iniciar la transfección.

Células RKO

Se cultivaron células de carcinoma de colon humano (RKO), en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%, hasta alcanzar una confluencia de 80%-90% para iniciar la transfección.

Células SW480

Se cultivaron células de adenocarcinoma colorectal de humano (SW480), en medio F12 suplementado con suero fetal bovino al 10%, hasta alcanzar una confluencia de 80%-90% para iniciar la transfección.

Células SH-SY5Y

Se cultivaron células de neuroblastoma de humano (SH-SY5Y), en medio DMEM con alta glucosa y suplementado con suero fetal bovino al 15%, hasta alcanzar una confluencia de 80%-90% para iniciar con los tratamientos.

Transfección

Se empleó un plásmido que codifica para la proteína Tau (441 aa), fusionada a la Proteína Verde Fluorescente (GFP). Para realizar la transfección de la proteína se preparó una mezcla utilizando medio MEM, lipofectamina 2000 y el plásmido de Tau o el vector vacío. Esta mezcla se dejó reposar durante 20 min para la formación de micelas que contengan al plásmido; transcurrido ese tiempo la mezcla se colocó en pozos previamente sembrados con células CHO, RKO y SW480 a la confluencia antes mencionada. Las células se incubaron durante 10-12 hrs; posteriormente se retiró el medio MEM y se agregó medio suplementado durante 12 hrs para la síntesis de proteínas. La efectividad de la transfección se observa y mide por microscopia de luz y fluorescencia.

Tratamiento con estaurosporina

Después de la transfección, las células RKO, SW480 y SH-SY5Y fueron tratadas con 10 μ M de Estaurosporina durante 4 horas (Cooper J.K. et al., 1998).

Tratamiento con citocinas IFN γ /TNF α

Después de la transfección, las células RKO, SW480 y SH-SY5Y fueron tratadas con 100U/mL de IFN γ /TNF α por un periodo de 1-24 horas (Nava P. et al., 2010).

Tratamiento con cicloheximida

Después de la transfección, las células RKO, SW480 y SH-SY5Y fueron tratadas con 388 μ g/mL de cicloheximida durante 15 minutos, y posteriormente con 100U/mL de IFN γ /TNF α por un periodo de 6 horas (Nava P. et al., 2010).

Tratamiento con cloroquina

Después de la transfección, las células RKO, SW480 y SH-SY5Y fueron tratadas con 21 μ g/mL de cloroquina durante 15 minutos, y posteriormente con 100U/mL de IFN γ /TNF α por un periodo de 6 horas (Nava P. et al., 2010).

Tratamiento con AKT VIII

Después de la transfección, las células RKO, SW480 y SH-SY5Y fueon tratadas con 2.2 μ M de AktVIII durante 15 minutos, y posteriormente con 100U/mL de IFN γ /TNF α por un periodo de 6 horas (Nava P. et al., 2010).

Tratamiento con AZD5363

Después de la transfección, las células RKO, SW480 y SH-SY5Y fueron tratadas con 3 μ M de AZD5363 durante 15 minutos, y posteriormente con 100U/mL de IFN γ /TNF α por un periodo de 6 horas (Nava P. et al., 2010).

Western Blot

Las células se lisaron utilizando una solución de RIPA a 4 °C, posteriormente se sonicaron (*Sonic Vibra Cell*) a una amplitud de 40% durante 10 segundos, se homogenizaron y centrifugaron por 10 minutos a 12,000 rpm a 4 °C. El sobrenadante se utilizó para la cuantificación de proteínas mediante BCA. Una vez conocida la concentración de proteína en las muestras, se agregó un volumen de amortiguador de muestra de Laemmli 2x y beta-mercaptoetanol, la solución se calentó durante 10 minutos a 95 °C.

La muestra preparada se fraccionó en un gel de agarosa al 10%. Finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 0.45 A durante 2 horas aproximadamente. Posteriormente la membrana que contenía la proteína se bloqueó con solución de bloqueo durante 1 hora, en agitación moderada. Se realizaron tres lavados con TBS-Tween durante 15 minutos y se incubó la membrana con los siguientes anticuerpos primarios toda la noche en agitación suave a 4 °C.

Anticuerpos primarios	Especie	Isotipo	Dilución
229-233	Conejo	IgG	1:1000
GFP	Conejo	IgG	1:10000
Tau 7	Ratón	IgG	1:1000
Tau 499	Ratón	IgG	1:250
AT100	Ratón	IgG	1:500

Tabla 1. Anticuerpos primarios para Western Blot.

Al día siguiente se lavó el anticuerpo primario con PBS-Tween durante 10 minutos y la membrana se incubó con anticuerpo secundario durante 2 horas en agitación suave. Terminado el tiempo de incubación se lavó el anticuerpo secundario con TBS-Tween durante 10 minutos y se reveló por quimioluminiscencia empleando placas fotográficas kodak.

Anticuerpos secundario	Especie	Isotipo	Dilución
HRP	Anti-ratón	IgG	1:10000
HRP	Anti-conejo	IgG	1:10000

Tabla 2. Anticuerpos secundarios para Western Blot.

Tejido de cerebro

Se emplearon secciones de corteza temporal de tejido cerebral humano de individuos control, donados por la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), y de pacientes diagnosticados *post mortem* con la enfermedad de Alzheimer, donados por el Banco Nacional de Cerebros (CINVESTAV). Las muestras fueron almacenadas a -80 °C hasta el momento de su procesamiento.

Extracción de la proteína Tau

De 2 a 2.5 gramos de tejido se descongelaron sumergiéndolos en la solución amortiguadora de Tau. Una vez descongelado el tejido se maceró con un Tissue Master 125, el tejido se homogenizó con un Politrón y se centrifugó a 100,000 xg a 4 °C durante 1 hora. Del precipitado obtenido se extrajeron los filamentos helicoidales apareados (FHAS) agregando primero 10 volúmenes de buffer H a 4 °C. Se homogenizó en un Politrón durante 15 segundos y se centrifugó a 27,200 xg durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante y el pellet se almacenaron a -80 °C hasta su posterior análisis.

Reconocimiento de la proteína Tau por Dot Blot

El precipitado obtenido del protocolo de extracción de Tau se resuspendió en solución RIPA y fue empleado para llevar a cabo la determinación de proteínas presentes en la muestra por un ensayo con (BCA). La muestra fue colocada en una membrana de nitrocelulosa, posteriormente se realizó el bloqueo con leche al 1.2% (p/v) en PBS durante

1 hora. Finalizado el tiempo de bloqueo, la membrana se incubó con el anticuerpo primario correspondiente.

Anticuerpos primarios	Especie	Isotipo	Dilución
Tau 499	Ratón	IgG	1:500
Anticuerpos secundario	Especie	Isotipo	Dilución
HRP	Anti-ratón	IgG	1:10000

Tabla 3. Anticuerpos para Dot Blot.

Al día siguiente el anticuerpo primario se lavó 3 veces con PBS-Tween durante 10 minutos y se incubó con anticuerpo secundario durante 2 horas en agitación suave. El anticuerpo secundario fue también lavado 3 veces con PBS-Tween durante 10 minutos y después se reveló por quimioluminiscencia en placas kodak en cuarto oscuro.

Inmunofluorescencias

Se realizaron cortes coronales de la región corteza temporal del cerebro, en un criostato Leica. Los cortes tuvieron un grosor de 20 μm y fueron montados en laminillas gelatinizadas y almacenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para realizar las inmunofluorescencias con los cortes obtenidos se utilizó el siguiente protocolo:

1. Fijar con metanol puro durante 20 minutos.
2. Realizar dos lavados rápidos con PBS (llenar y decantar) y uno con una duración de 10 minutos.
3. Bloquear con suero de Albumino Bovino al 0.2% durante 1 hora en cámara húmeda.
4. Incubar con anticuerpo primario toda la noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Anticuerpos primarios	Especie	Isotipo	Dilución
499	Ratón	IgG	1:500
7.51	Ratón	IgG	1:500
Tau C-3	Ratón	IgG	1:1000
Anticuerpos secundario	Especie	Isotipo	Dilución
Alexa 488	Anti-Ratón	IgG	1:1000

Tabla 4. Anticuerpos para inmunofluorescencia.

5. Realizar dos lavados rápidos con PBS (llenar y decantar) y uno con una duración de 10 minutos.
6. Incubar con anticuerpo secundario y con DAPI (1:1000) durante 1 hora a temperatura ambiente (en ausencia de luz).
7. Realizar dos lavados rápidos con PBS (llenar y decantar) y uno con una duración de 10 minutos.
8. Montar cada muestra con 5 μ L de phenyl y cubrir con cubreobjetos (en ausencia de luz).
9. Sellar con barniz evitando la formación de burbujas.

Microscopio confocal

Las secciones de cerebro teñidas por inmunofluorescencia fueron observadas y analizadas con un microscopio confocal Leica SP8.

7. RESULTADOS

7.1 Identificación de la proteína Tau en cerebros de pacientes con EA por inmunofluorescencia

Primero confirmamos que los cerebros empleados correspondieran a individuos sanos o pacientes diagnosticados con Alzheimer, los cuales presentan los agregados de la proteína Tau. Para ello, realizamos inmunohistoquímicas con anticuerpos contra la proteína Tau que reconocen la región N-terminal (499), la truncación del aspártico⁴²¹ (Tau C-3) y los dominios repetidos (7.51). La **figura 2** muestra imágenes representativas obtenidas de cerebros *post mortem* de individuos sanos y de pacientes con EA, Los cerebros obtenidos de pacientes con EA muestran agregados de la proteína Tau típicos de la enfermedad.

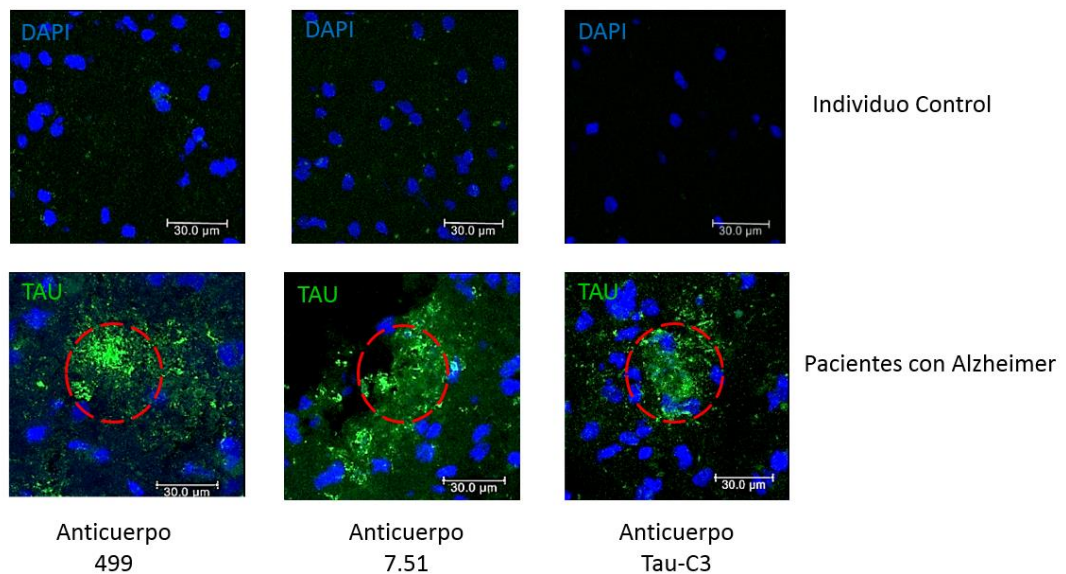


Figura 2. Agregados de la proteína Tau en cerebros de pacientes con EA y cerebros de pacientes control. Se usaron anticuerpos específicos dirigidos contra formas truncadas y nativas de la proteína. Rebanadas cerebrales de corteza temporal (grosor 20 μm). Anticuerpos primarios: Tau 499, Tau 7.51 y Tau C-3. Anticuerpo secundario: Alexa 488 (verde) y núcleos celulares con DAPI (azul), Bar= 30 μm.

7.2 Extracción de la proteína Tau del cerebro de pacientes con EA

Enseguida extrajimos la proteína Tau de los cerebros de individuos sanos y de los pacientes diagnosticados con EA (*Braak H. y Braak E., 1991*), para ello empleamos tres protocolos

distintos, uno de los cuales previamente se reportó que era útil para aislar Filamentos Helicoidales Apareados (FHAS) de Tau (*Lindwall G. y Cole R.D., 1984; Greenberg S.G., 1990; Csokova N. et al., 2004*) y dos más para extraer Filamentos Insolubles (IF) y el núcleo mínimo, este último se define como el fragmento mínimo elemental de las Marañas Neurofibrilares compuesta aproximadamente entre 92-95 aa (ABC). Debido a que el método de FHAs fue el más efectivo para la extracción de la proteína Tau, decidimos emplearlo en las siguientes extracciones. Una vez obtenida la proteína procedimos a evaluar cómo se encontraba la proteína Tau en cerebros de pacientes con EA.

7.3 Reconocimiento de la proteína Tau de cerebros de pacientes con EA por Dot Blot

Para detectar si los extractos de los cerebros contienen la proteína Tau empleamos el Dot Blot usando los anticuerpos específicos ya descritos. Los resultados muestran que los anticuerpos reconocen la proteína aislada en las fracciones que corresponden al pellet de IF2 y al sobrenadante de FHAS, demostrando que ambos protocolos de extracción son efectivos, sin embargo, dado que el protocolo FHAS produce mayores cantidades de proteína y es más sencillo decidimos usarlo como ensayo para extraer a la proteína Tau.

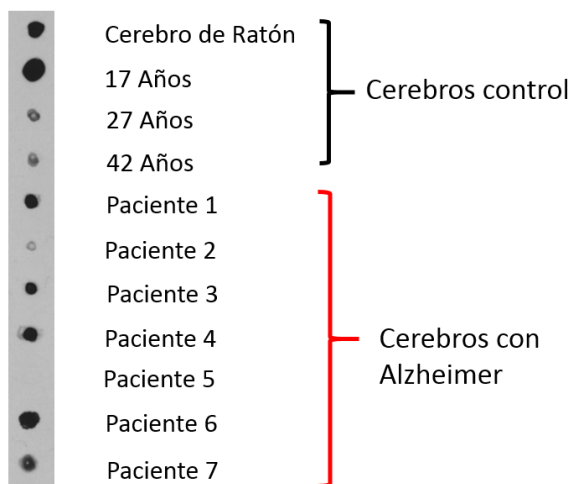


Figura 3. Detección de la proteína Tau en extractos de FHAS obtenidos de cerebros de individuos control y pacientes con EA. En una membrana de nitrocelulosa se adsorbieron 10 µg de muestra, se utilizó el anticuerpo Tau 499 con una dilución de 1:500 y se reveló por quimioluminiscencia.

En la **figura 3** se observa una gran variabilidad de cantidad de proteína Tau independientemente de si se obtiene de cerebros de individuos sanos o de pacientes con EA, la cual es reconocida por el anticuerpo Tau 499 cuando es extraída usando el método de FHAS. Hay que hacer notar que el anticuerpo Tau 499 reconoce formas nativas y procesadas por igual. Para analizar las formas procesadas, debemos hacer inmunoblots con anticuerpos que las reconocen específicamente.

7.4 Identificación de la proteína Tau en pacientes con EA por Western Blot

La **figura 4** muestra inmunoblots de extractos cerebrales y puede observarse que los pacientes con EA expresan menos proteína Tau que los individuos control; además la proteína Tau obtenida de individuos control se expresa en mayor cantidad, como formas de bajo peso molecular (menor de ~55 kDa), en comparación con los pacientes con EA. Es importante hacer notar que algunas muestras obtenidas de pacientes con EA revelan un barrido que indica que la proteína tiene formas de peso molecular aún mayor, debido a la presencia de modificaciones postraduccionales como fosforilaciones, entre otras, como se reportó anteriormente (*Crews E. y Masliah E., 2010; Garg S. et al., 2011*).

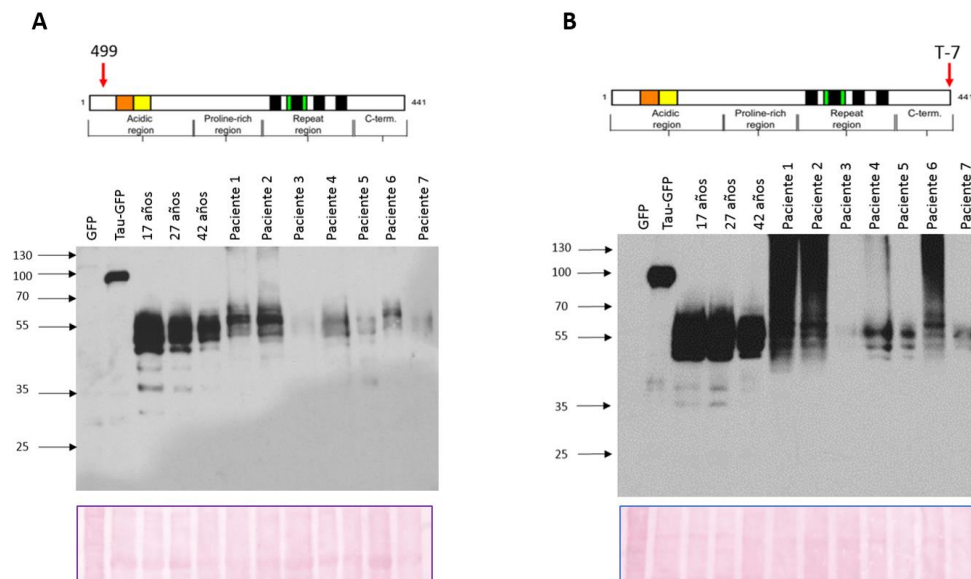


Figura 4. Inmunoblot de la proteína Tau de individuos control y pacientes con EA. La proteína Tau de pacientes con EA tiende a expresarse en menor cantidad y con formas de alto peso molecular. Para el Western Blot se emplearon dos anticuerpos: 499 (A) y Tau 7 (B).

7.5 Efecto de las citocinas IFN γ /TNF α sobre la proteína Tau en células epiteliales

Como en los cerebros de pacientes con EA se observó que la proteína Tau presenta aparentemente modificaciones postraduccionales y dado que en los cerebros de los pacientes con EA existe un incremento de citocinas proinflamatorias, decidimos evaluar si las citocinas IFN γ /TNF α tienen algún efecto sobre los niveles de la proteína Tau. La mezcla de citocinas afecta la estabilidad de muchas proteínas al inducir cambios postraduccionales, principalmente fosforilaciones (Ehrentraut S.F y Colgan S.P., 2012) además, de también inducir apoptosis (Nava P. et al., 2010).

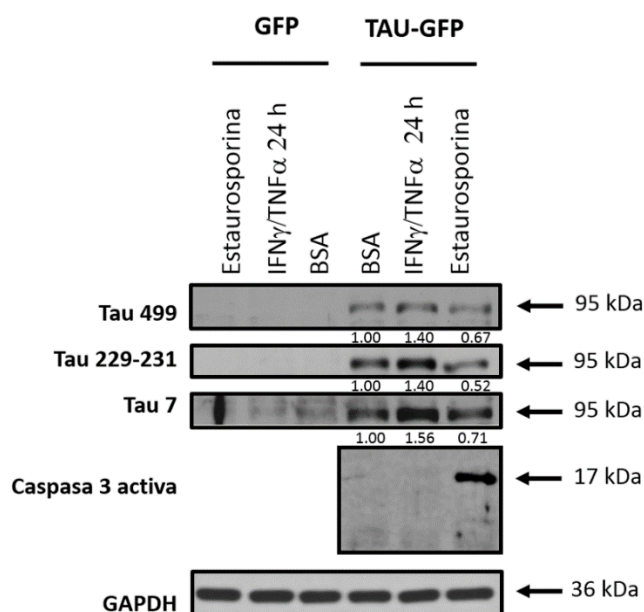


Figura 5. Las citocinas proinflamatorias IFN γ /TNF α aumentan los niveles de Tau-GFP en células epiteliales RKO. Las células RKO fueron transfectadas con la proteína Tau-GFP o con GFP sola. 12 horas postransfección las células epiteliales fueron tratadas con citocinas durante 24 horas o con estaurosporina (control positivo). Las células control recibieron solamente BSA. 15 μ g de proteína fueron analizados por Western Blot empleando anticuerpos que reconocen diferentes regiones de la proteína: 499 (N-termina), Tau 7 (C-terminal) y Tau 229-233 (parte central). La caspasa-3 activa se detectó con un anticuerpo específico y sólo se expresa en células incubadas con estaurosporina.

Debido a que ambos mecanismos se han ligado a la regulación de la proteína Tau, lo primero que hicimos fue transfectar a células epiteliales RKO con un plásmido que codifica

para la proteína TAU acoplada a GFP y posteriormente incubamos estas células con una mezcla de IFN γ /TNF α durante 24 horas (Nava P. et al., 2010). Otro grupo de células se trató con estaurosporina como control positivo de la muerte por apoptosis (Bertrand R. et al., 1994; Cooper J.K. et al., 1998; Kovacs D.M. et al., 1999). Posteriormente las células se lisaron en amortiguador RIPA y analizamos los niveles de la proteína Tau mediante WB con anticuerpos contra la región amino, media y carboxilo de la molécula.

Como se puede observar en la **figura 5**, los tres anticuerpos revelan que en las células tratadas con la mezcla de IFN γ /TNF α durante 24 horas existe un aumento en los niveles de la proteína Tau, mientras que la estaurosporina produce una ligera disminución en la molécula. La presencia de caspasa 3 activa demuestra que la estaurosporina induce muerte celular por apoptosis.

7.6 Incremento en los niveles de la proteína Tau por IFN γ /TNF α en células epiteliales RKO y SW480

En seguida se prosiguió a confirmar el incremento en el contenido celular de la proteína Tau inducido por las citocinas en las células epiteliales transfectadas.

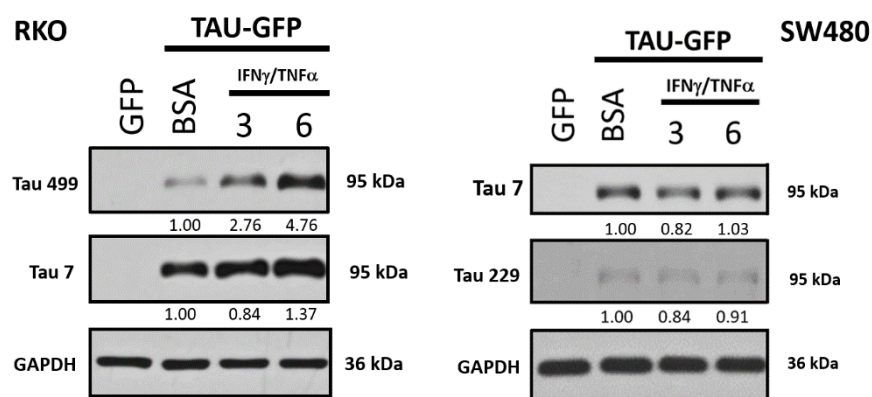


Figura 6. Tratamiento con citocinas IFN γ /TNF α en células RKO y SW480 transfectadas con la proteína Tau. Las células fueron tratadas con citocinas a 0, 3 y 6 horas. Como control negativo (tiempo 0) se utilizó BSA; para el análisis de la proteína Tau por Western Blot se emplearon anticuerpos que reconocen diferentes regiones de la proteína: 499 (N-termina), Tau 7 (C-terminal) y Tau 229-233 (parte central). Además se usó GFP para monitorear a la proteína Tau-GFP.

En la **figura 6** se observa que las citocinas producen un aumento en los niveles de la proteína Tau a las 3 y 6 horas de tratamiento en las células epiteliales RKO, mientras que en las células epiteliales SW480 del mismo origen no se observa este efecto. Estos resultados demuestran que las citocinas IFN γ /TNF α aumentan el contenido celular de la proteína Tau.

7.7 Incremento en los niveles de la proteína Tau por activación de Akt en células epiteliales tratadas con citocinas IFN γ /TNF α

Debido que las células RKO presentan una sobreactivación de la vía PI3K/Akt (*Wang J. et al., 2007*), mientras que las SW480 tienen una mutación en el mecanismo de degradación de β -catenina (*Yang J. et al., 2006*) y dado que durante los procesos inflamatorios la vía PI3K/Akt se encuentra activada (*Platanias L.C., 2005*), creemos que posiblemente Akt esté jugando un papel importante en el aumento en los niveles de la proteína Tau. Debido a esto, el siguiente paso fue evaluar el papel que pudiera tener la inhibición de Akt en el incremento en los niveles de la proteína Tau mediado por las citocinas proinflamatorias.

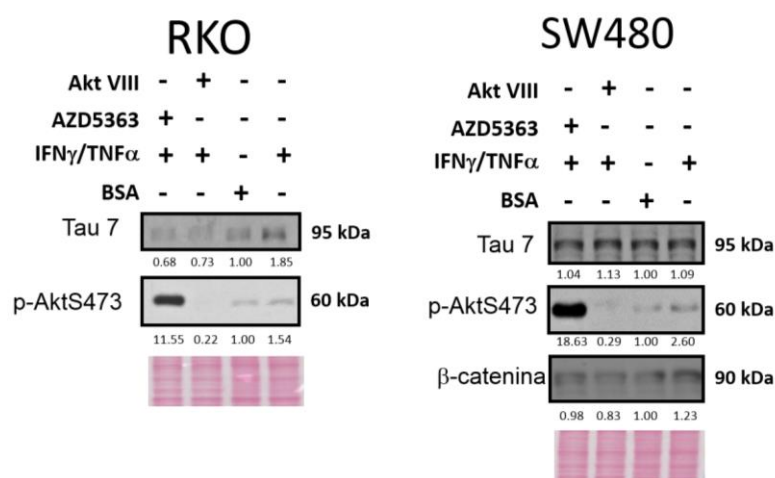


Figura 7. Las citocinas proinflamatorias IFN γ /TNF α aumentan los niveles de Tau-GFP en células epiteliales RKO por la activación de Akt. Las células RKO y SW480 fueron transfectadas con la proteína Tau-GFP. Posteriormente las células epiteliales fueron tratadas con inhibidores de Akt (AZD5363 y Akt VIII) durante 15 min y tratadas a continuación con citocinas durante 6 horas. Las células control recibieron solamente BSA. 15 μ g de proteína fueron analizados por Western Blot empleando el Tau 7 (C-terminal).

La **figura 7** muestra que las citocinas producen un aumento en los niveles de la proteína Tau como ya se había observado anteriormente, sin embargo, este incremento se revierte cuando las células epiteliales RKO son expuestas a inhibidores de Akt. Estos cambios no se observan en las células SW480.

7.8 Efecto de IFN γ /TNF α sobre la proteína Tau en las células neuronales SH-SY5Y

Para descartar que el incremento en los niveles de la proteína se deba a una sobreexpresión de Tau en las células epiteliales y no al efecto de las citocinas, utilizamos células neuronales SH-SY5Y que expresan de forma endógena a la proteína Tau (*Jämsä A. et al., 2004*); incubamos estas células con una mezcla de IFN γ /TNF α (*Nava P. et al., 2010*) y estaurosporina como control positivo de apoptosis (*Bertrand R. et al., 1994; Cooper J.K. et al., 1998; Kovacs D.M. et al., 1999*) durante 24 horas. Posteriormente las células se lisaron en amortiguador RIPA y analizamos los niveles de la proteína Tau mediante WB con anticuerpos contra la región media y carboxilo de la molécula.

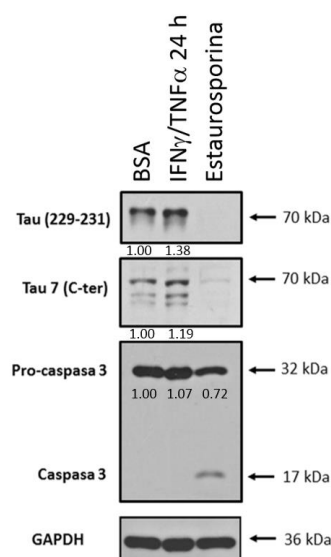


Figura 8. Las citocinas proinflamatorias IFN γ /TNF α aumentan los niveles de Tau en células neuronales SH-SY5Y. Las células neuronales fueron tratadas con IFN γ /TNF α durante 24 horas o con estaurosporina (control positivo). Las células control recibieron solamente BSA. 15 μ g de proteína fueron analizados por Western Blot empleando anticuerpos que reconocen diferentes regiones de la proteína: Tau 7 (C-terminal) y Tau 229-233 (parte central). La caspasa-3 activa se detectó con un anticuerpo específico y sólo se expresa en células incubadas con estaurosporina.

Como se puede observar en la **figura 8**, los resultados muestran que en las células tratadas con la mezcla de $\text{IFN}\gamma/\text{TNF}\alpha$ durante 24 horas aumentan los niveles de la proteína Tau de forma similar que en las células epiteliales, sin embargo, en presencia de estaurosporina existe una evidente disminución en los niveles de la proteína Tau debido posiblemente a la degradación de la proteína por la presencia de caspasa 3 activa (*Gamblin T.C. et al., 2003*).

7.9 Incremento en los niveles de la proteína Tau por $\text{IFN}\gamma/\text{TNF}\alpha$ en células neuronales SH-SY5Y

Enseguida decidimos confirmar el aumento del contenido celular de la proteína Tau que inducen las citocinas en células neuronales. En la **figura 9** se observa que la mezcla de $\text{IFN}\gamma/\text{TNF}\alpha$ producen un aumento en los niveles de la proteína Tau a las 3 horas de incubación, aumento que alcanza su máximo a las 6 horas de forma similar que en las células epiteliales. Estos resultados confirman que las citocinas $\text{IFN}\gamma/\text{TNF}\alpha$ aumentan el contenido celular de la proteína Tau tanto en células epiteliales como en neuronales.

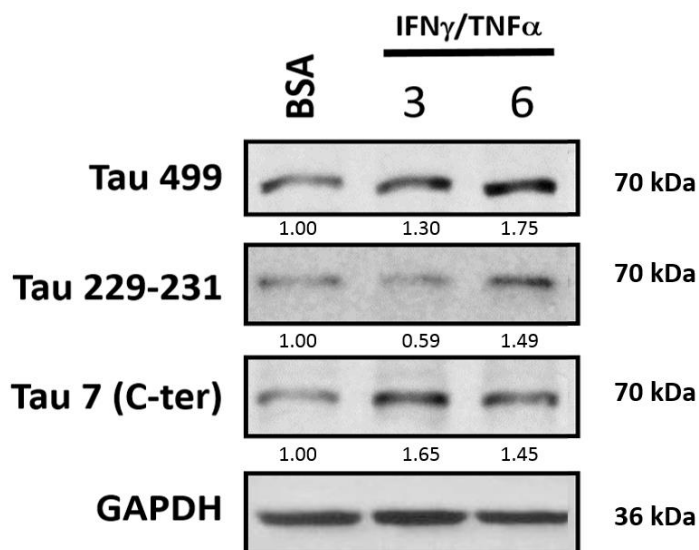


Figura 9. Tratamiento con citocinas $\text{IFN}\gamma/\text{TNF}\alpha$ en células neuronales SH-SY5Y. Las células fueron tratadas con citocinas durante 0, 3 y 6 horas. Como control negativo (tiempo 0) se utilizó BSA; para el análisis de la proteína Tau por Western Blot se emplearon anticuerpos que reconocen diferentes regiones de la proteína: 499 (N-termina), Tau 7 (C-terminal) y Tau 229-233 (parte central).

7.10 Incremento en los niveles proteicos de Tau por activación de Akt en células neuronales tratadas con citocinas IFN γ /TNF α

Posteriormente evaluamos el papel de Akt en el incremento en los niveles de la proteína Tau de forma similar que en las células epiteliales. La **figura 10** muestra que las citocinas producen un aumento en los niveles de la proteína Tau en células neuronales como ya se había observado, sin embargo, este incremento se revierte cuando las células son tratadas con inhibidores de Akt de forma similar a lo observado en las células epiteliales. Adicionalmente analizamos los niveles de p-Akt473 y observamos que tiene la misma tendencia que el incremento/disminución de los niveles de la proteína Tau. Lo cual sugiere que existe una correlación directa entre ambos fenómenos.

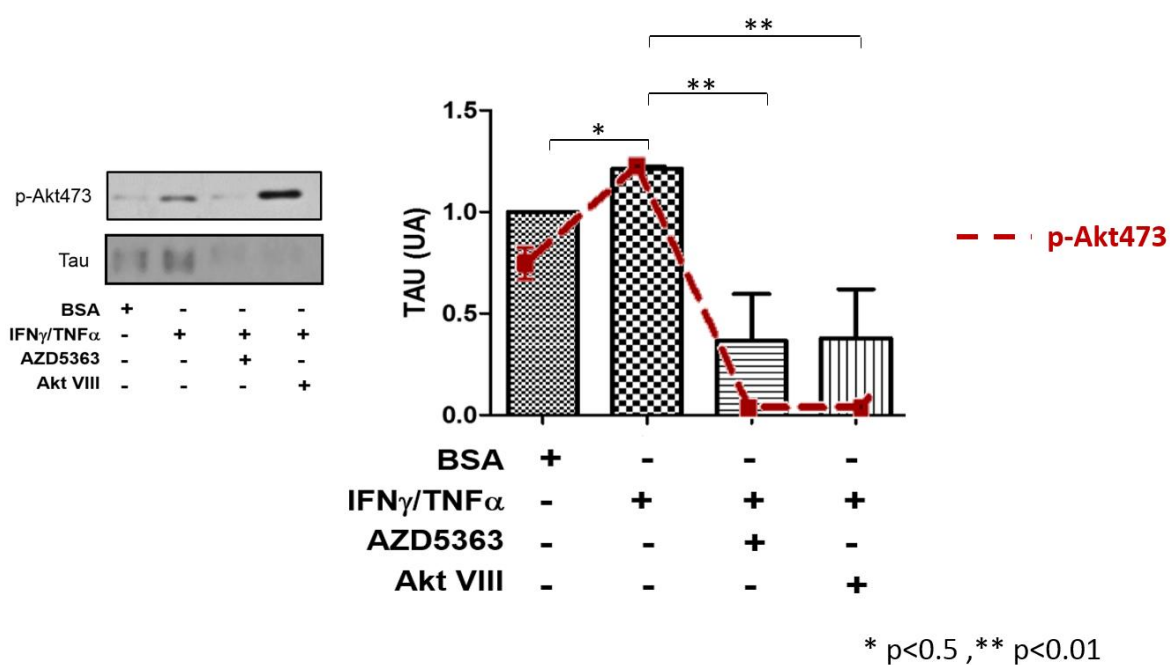


Figura 10. Papel de Akt en el incremento de los niveles de la proteína Tau tratadas con citocinas proinflamatorias. Las células neuronales fueron tratadas con inhibidores de Akt (AZD5363 y Akt VIII) durante 15 min, y con citocinas IFN γ /TNF α durante 6 horas. Las células control recibieron solamente BSA. 15 μ g de proteína fueron analizados por Western Blot.

7.11 Incremento en la fosforilación de Tau por activación de Akt en células neuronales tratadas con citocinas IFN γ /TNF α

Dado que Akt puede fosforilar a la proteína Tau en dos residuos bien caracterizados Thr²¹²/Ser²¹⁴ y estas fosforilaciones se han implicado en controlar la estabilidad de la molécula (Ksiezak-Reding H. et al., 2003), finalmente evaluamos la fosforilación de la proteína Tau en los residuos Thr²¹²/Ser²¹⁴ cuando las células epiteliales y neuronales son tratadas con las citocinas IFN γ /TNF α . En la **figura 11** se observa que no hay incremento en la fosforilación de la proteína Tau en células epiteliales y células neuronales en comparación con el control (BSA). Estos resultados sugieren que el incremento en los niveles de la proteína Tau por las citocinas IFN γ /TNF α se deba posiblemente a la fosforilación de la proteína Tau por la cinasa Akt en otro residuo aún no descrito o por otro mecanismo de regulación.

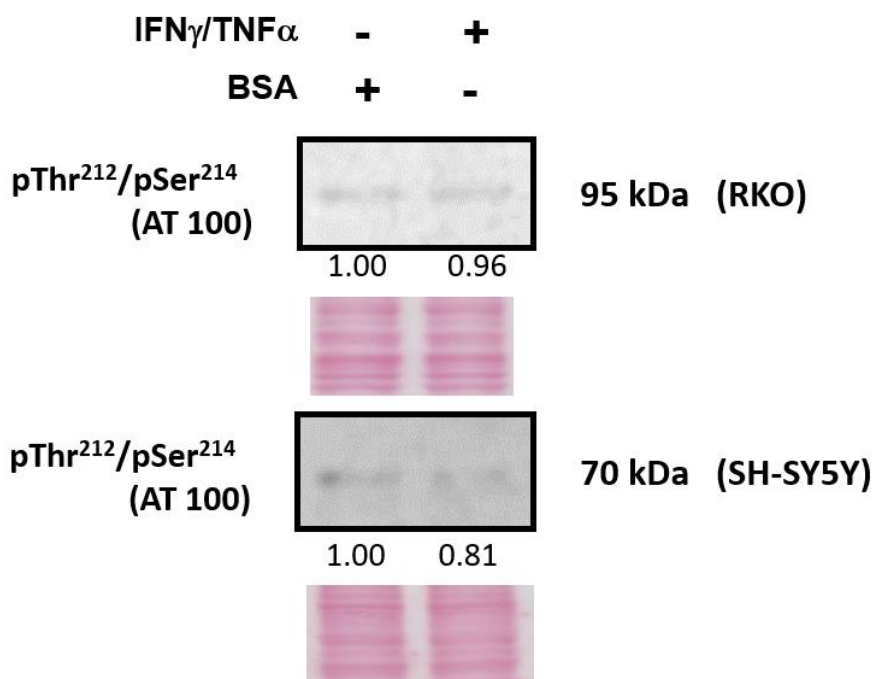


Figura 11. Fosforilación de la proteína Tau por Akt en los residuos Thr²¹²/Ser²¹⁴ en células epiteliales y neuronales tratadas con citocinas proinflamatorias. Las células epiteliales y neuronales fueron tratadas con citocinas IFN γ /TNF α durante 6 horas. Las células control recibieron solamente BSA. 15 μ g de proteína fueron analizados por Western Blot; se empleó el anticuerpo AT100 que reconoce la fosforilación de la proteína Tau en los residuos Thr²¹²/Ser²¹⁴.

8. DISCUSIÓN

Los procesos inflamatorios crónicos se han asociado con cambios patológicos de la proteína Tau, si bien los mecanismos involucrados no se conocen, en este trabajo se demostró que las citocinas proinflamatorias $\text{INF}\gamma/\text{TNF}\alpha$ aumentan el contenido celular de la proteína Tau. El mecanismo que produce este aumento aún no es claro, podría resultar de la activación de la síntesis de Tau, de la inhibición de las proteasas que la degradan o de la estabilización de la proteína al adquirir una confirmación que no es susceptible de degradar debido posiblemente a la presencia de modificaciones postraduccionales como fosforilaciones. Las citocinas podrían favorecer la agregación de Tau y así impedir su degradación durante apoptosis. En la EA la proteína Tau se fosforila anormalmente, lo que conduce a su agregación (*Grundke-Iqbal I. et al., 1986*). La agregación de la proteína Tau fue confirmada en cerebros de pacientes con EA por inmunofluorescencia (**Figura 2**) como método de diagnóstico (*Kidd. M., 1963; Mena R. and Luna-Muñoz., 2009; Hampel H. et al., 2010*).

La purificación de FHAS y de la proteína Tau nos permite detectar formas de la proteína con pesos moleculares menores de 55 kDa hasta casi 70 kDa como ya se ha reportado anteriormente (*Garg S. et al., 2011; Zhang Z. et al., 2014*). Sin embargo, no detectamos truncaciones en las muestras de pacientes con EA. Probablemente la resistencia a la extracción se deba a que las formas truncadas se asocian en marañas neurofibrilares que son muy difíciles de deshacer (*Wisshik C. et al., 1988; Novak M. et al., 1993*); esta misma resistencia podría explicar también por qué se extrae menos proteína Tau de cerebros de pacientes con EA (**Figura 4 panel A y B**). Este último punto se ve apoyado por el hecho de que existe un claro incremento en el peso molecular de la proteína Tau obtenida de pacientes con EA (**Figura 4 panel A y B**) y que podría corresponder a asociaciones complejas de la proteína Tau fosforilada en los pacientes con EA que, al aumentar su tamaño, sería cada vez menos soluble y por tanto difícil de extraer (*Chen F. et al., 2004*).

Estas modificaciones postraduccionales presentes en los cerebros con EA pueden ser favorecidas por los procesos inflamatorios, dado que uno de los efectos más interesantes de $\text{INF}\gamma/\text{TNF}\alpha$ fue el incremento en los niveles de la proteína Tau en células epiteliales (**Figura 5**) y neuronales (**Figura 8**) y no la degradación de la molécula como se esperaba,

pues estas citocinas juntas se sabe que inducen apoptosis en células epiteliales (*Nava P. et al., 2010*).

En la apoptosis mediada por citocinas se activa caspasa 3 (*Selznick L.A. et al., 1999; Saito M. et al., 2010*) y calpaina (*Garg S. et al., 2011*), que pueden truncar a la proteína Tau en la EA (*Basurto-Islas G. et al., 2008; Gamblin T.C. et al., 2003*), pero como se observa en nuestros resultados, éstas no fueron capaces de degradar a la proteína. Esto se debe posiblemente a que la acción sinérgica de ambas citocinas podría activar diferentes cinasas como Akt en células epiteliales (**Figura 7**) y neuronales (**Figura 10**), la cual, como se observa en los resultados, induce un incremento en el nivel proteico de la proteína Tau. Este incremento podría estar mediado por la fosforilación de Tau en los residuos Thr²¹²/Ser²¹⁴ (*Ksiezak-Reding H. et al., 2003*) o puede deberse a otra fosforilación de la proteína Tau aún no descrita (**Figura 11**) en alguno de sus casi ochenta sitios potenciales de fosforilación en serinas y treoninas (*Sergeant N. et al., 2005*). Debido a que algunos de estos sitios se fosforilan durante procesos inflamatorios (*Quintanilla L.A. et al., 2003*) estas fosforilaciones pueden prevenir la degradación de la proteína por proteasas (*Arai T. et al., 2004*). Otro mecanismo probable es la inhibición de los mecanismos de degradación de la proteína Tau por Akt, como es el caso de autofagia (*Wang Y. and Mandelkow E., 2012*). En conclusión, en esta tesis se reporta que la proteína Akt regula los niveles de la proteína Tau durante procesos inflamatorios mediados por INF γ /TNF α .

9. CONCLUSIONES

1. Las citocinas proinflamatorias $\text{INF}\gamma/\text{TNF}\alpha$ aumentan el contenido celular de la proteína Tau.
2. Las citocinas proinflamatorias aumentan los niveles proteicos de Tau al inducir la activación de la cinasa Akt.
3. El incremento en los niveles de Tau mediados por Akt son independientes de la fosforilación en los residuos $\text{Thr}^{212}/\text{Ser}^{214}$.

10. PERSPECTIVAS

- Evaluar si Akt fosforila otro residuo cuando las células neuronales son expuestas a las citocinas proinflamatorias $\text{INF}\gamma/\text{TNF}\alpha$.
- Evaluar el comportamiento de la proteína Tau en líneas celulares cuando son expuestas a otras citocinas proinflamatorias (IL-1b, IL-6, IL-12).
- Investigar la distribución de $\text{INF}\gamma/\text{TNF}\alpha$ y Akt activo en las muestras de los cerebros de pacientes con EA.

11. BIBLIOGRAFÍA

Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strommeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T. *Inflammation and Alzheimer's disease*. *Neurobiology of Aging* 2000; 21(3):383-421.

Akiyama H, Ikeda K, Kondo H, McGeer PL. *Thrombin accumulation in brains of patients with Alzheimer's disease*. *Neuroscience Letters* 1992; 146:152–154.

Apelt J, Schliebs R. *β -Amyloid-induced glial expression of both pro- and anti-inflammatory cytokines in cerebral cortex of aged transgenic Tg2576 mice with Alzheimer plaque pathology*. *Brain Research* 2001; 894(1):21–30.

Arai T, Guo JP, McGeer PL. *Proteolysis of Non-phosphorylated and Phosphorylated Tau by Thrombin*. *The Journal of Biological Chemistry* 2005; 280(7):5145–5153.

Arvin B, Neville LF, Barone FC, Feuerstein GZ. *The role of inflammation and cytokines in brain injury*. *Neuroscience review* 1996; 20(3):445-452.

Ávila J, Lucas JJ, Pérez M, Hernández F. *Role of Tau Protein in Both Physiological and Pathological Conditions*. *Physiological Reviews* Published 2004; 84(2):361-384.

Bandyopadhyay B, Li G, Yin H, Kuret J. *Tau Aggregation and Toxicity in a Cell Culture Model of Tauopathy*. *The Journal of Biological Chemistry* 2007; 282:16454-16464.

Basurto-Islas, Luna-Muñoz, Guillozet-Bongaarts AL, Binder LI, Mena R, García-Sierra. *Accumulation of Aspartic Acid421- and Glutamic Acid391-Cleaved Tau in Neurofibrillary Tangles Correlates With Progression in Alzheimer Disease*. *The Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 2008; 67(5):470Y483.

Bertrand R, Solary E, O'Connor P, Kohn W, Pommier Y. *Induction of a Common Pathway of Apoptosis by Staurosporine*. *Experimental Cell Research* 1994; 211(2):314–321.

Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI. *The distribution of tau in the mammalian central nervous system*. *Journal of Cell Biology* 1985; 4:1371-1378.

Braak H, Braak E. *Neuropathological staging of Alzheimer-related changes*. *Acta Neuropathology* 1991; 82:239-259.

Brandt R, Lee G. *Functional organization of microtubule-associated protein tau. Identification of regions which affect microtubule growth, nucleation, and bundle formation in vitro.* Journal of Biological Chemistry 1993; 268:3414-3419.

Brandt R, Léger J, Lee G. *Interaction of Tau with the Neural Plasma Membrane Mediated by Tau's Amino-terminal Projection Domain.* The Journal of Cell Biology 1995; 131(5) 1327-1340.

Buée L, Bussièrè T, Buée-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. *Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders.* Brain Research Reviews 2000; 33(1):95–130.

Cagnin A, Brooks DJ, Kennedy AM, Gunn RN, Myers R, Turkheimer FE, Jones T, Banati RB. *In-vivo measurement of activated microglia in dementia.* The Lancet 2001; 358(9280):461–467

Chen F, David D, Ferrari A, Gotz J. *Posttranslational modifications of tau: role in human tauopathies and modeling in transgenic animals.* Current Drug Targets 2004; 5:503–515.

Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW. *Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly.* Journal of Molecular Biology 1977; 116(2):227-247.

Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW. *Purification of Tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin.* Journal of Molecular Biology 1977; 116: 207-225.

Cooper JK, Schilling G, Peters MF, Herring WJ, Sharp AH, Kaminsky Z, Masone J, Khan FA, Delanoy M, Borchelt DR, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA. *Truncated N-terminal fragments of huntingtin with expanded glutamine repeats form nuclear and cytoplasmic aggregates in cell culture.* Human Molecular Genetics 1998; 7(5):783-790.

Crews L, Masliah E. *Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease.* Human Molecular Genetics 2010; 19(R1):R12-20.

Cross DC, Muñoz JP, Hernández P, Maccioni RB. *Nuclear and cytoplasmic tau proteins from human nonneuronal cells share common structural and functional features with brain tau.* Journal of Cellular Biochemistry 2000; 78(2):305-17.

Csokova N, Skrabana R, Liebig HD, Mederlyova A, Kontsek P, Novak M.. *Rapid purification of truncated tau proteins: model approach to purification of functionally active fragments of disordered proteins, implication for neurodegenerative diseases.* Protein Expression and Purification 2004; 35:366–372.

Dehmelt L, Halpain S. *The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins.* Genome Biology 2004; 6:204.

- Dhalla NS**, Chakraborti S. *Role of Proteases in Cellular Dysfunction*. Springer 2014.
- Ehrentraut SF**, Colgan SP. *Implications of protein post-translational modifications in IBD*. *Inflammatory Bowel Diseases* 2012; 18(7):1378-88.
- Gamblin TC**, Chen F, Zambrano A, Abraha A, Lagalwar S, Guillozet AL, Lu M, Fu Y, Garcia-Sierra F, LaPointe N, Miller R, Berry RW, Binder LI, Cryns VL. *Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; 100:10032–10037.
- Garg S**, Timm T, Mandelkow EM, Mandelkow E, and Wang Y. *Cleavage of Tau by calpain in Alzheimer's disease: the quest for the toxic 17 kD fragment*. *Neurobiology of Aging* 2011; 32:1–14.
- Goedert M**, Jakes R. *Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization*. *EMBO Journal* 1990; 13:4225-4230.
- Goedert M**, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA. *Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease*. *Neuron* 1989; 3(4):519–526.
- Greenberg SG**, Davies P. *A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct proteins by polyacrylamide gel electrophoresis*. *Neurobiology* 1990; 87:5827-5831.
- Griffin WS**, Stanley LC, Ling C, White L, MacLeod V, Perrot LJ, White CL 3rd, Araoz C. *Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1989; 86(19):7611-7615.
- Grundke-Iqbal I**, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. *Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986; 83(13):4913-4917.
- Guo JL**, Lee VM. *Seeding of Normal Tau by Pathological Tau Conformers Drives Pathogenesis of Alzheimer-like Tangles*. *The Journal of Biological Chemistry* 2011; 286: 15317-15331.
- Hampel H**, Blennow K, Shaw LM, Hoessler YC, Zetterberg H, Trojanowski JQ. *Total and phosphorylated tau protein as biological markers of Alzheimer's disease*. *Experimental Gerontology* 2010; 45:30–40.
- Heneka MT**, Kummer MP, Latz E. *Innate immune activation in neurodegenerative disease*. *Nature Reviews Immunology* 2014; 14:463–477.
- Hua Q**, He RQ. *Tau could protect DNA double helix structure*. *Biochimica et Biophysica Acta* 2003; 1645(2):205-211.

Jämsäa A, Hasslund K, Cowburn RF, Bäckström A, Vasänge M. *The retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor differentiated SH-SY5Y cell line as a model for Alzheimer's disease-like tau phosphorylation*. Biochemical and Biophysical Research Communications 2004; 319(3):993–1000.

Jeganathan S, von Bergen M, Mandelkow EM, Mandelkow E. *The Natively Unfolded Character of Tau and Its Aggregation to Alzheimer-like Paired Helical Filaments*. Biochemistry 2008; 47:10526–10539.

Khlistunova I, Biernat J, Wang Y, Pickhardt M, von Bergen M, Gazova Z, Mandelkow E, Mandelkow E.M. *Inducible expression of Tau repeat domain in cell models of tauopathy: aggregation is toxic to cells but can be reversed by inhibitor drugs* Journal of Biological Chemistry 2006; 281(2):1205-14.

Kidd M. *Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease*. Nature 1963; 197:192-193.

Kook SY, Hong HS, Moon M, Ha CM, Chang S, Mook-Jung I. *$A\beta_{1-42}$ -RAGE interaction disrupts tight junctions of the blood-brain barrier via Ca^{2+} -calcineurin signaling*. Journal of Neuroscience 2012; 32(26):8845-54.

Kovacs DM, Mancini R, Henderson J, Na SJ, Schmidt SD, Kim TW, Tanzi RE. *Staurosporine-induced activation of caspase-3 is potentiated by presenilin 1 familial Alzheimer's disease mutations in human neuroglioma cells*. Journal of Neurochemistry 1999; 73(6):2278-2285.

Ksiazak-Reding H, Pyo HK, Feinstein B, Pasinetti GM. *Akt/PKB kinase phosphorylates separately Thr212 and Ser214 of tau protein in vitro*. Biochimica et Biophysica Acta 2003; 1639(3):159-68.

LaPointe NE, Morfini G, Pigino G, Gaisina IN, Kozikowski AP, Binder LI, Brady ST. *The amino terminus of tau inhibits kinesin-dependent axonal transport: Implications for filament toxicity*. Journal of Neuroscience Research 2009; 87(2):440–451.

Lee G, Rook SL. *Expression of tau protein in non-neuronal cells: microtubule binding and stabilization*. Journal of Cell Science 1992; 102:227-237.

Lindwall G, Cole RD. *The Purification of Tau Protein and the Occurrence of Two Phosphorylation States of Tau in Brain*. The Journal of biological chemistry 1984; 259(19):12241-12245.

Lu J, Li T, He R, Bartlett PF, Götz J. *Visualizing the microtubule-associated protein tau in the nucleus*. Science China Life Sciences 2014; 57(4):422-31.

Maccioni RB, Cambiazo V. *Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly*. *Physiological Reviews* 1995; 75(4):835-864.

Maeda S, Sahara N, Saito Y, Murayama M, Yoshiike Y, Kim H, Miyasaka T, Murayama S, Ikai A, Takashima A. *Granular Tau Oligomers as Intermediates of Tau Filaments*. *Biochemistry* 2007; 46:3856-3861.

Mehlhorn G, Hollborn M, Schliebs R. *Induction of cytokines in glial cells surrounding cortical beta-amyloid plaques in transgenic Tg2576 mice with Alzheimer Pathology*. *International Journal of Developmental Neuroscience* 2000; 18:423-431.

Mena R, Luna-Muñoz J. *Stages of Pathological Tau Protein Processing in Alzheimer's Disease: From Soluble Aggregations to Polymerization into Insoluble Tau-PHF's*. Chapter Stages of Pathological Tau-Protein Processing in Alzheimer's Disease: From Soluble Aggregations to Polymerization into Insoluble Tau-PHF's in Hypotheses and Research Milestones in Alzheimer's Disease 2009:79-91.

Nilsson L, Rogers J, Potter H. *The essential role of inflammation and induced gene expression in the pathogenic pathway of Alzheimer's disease*. *Frontiers in bioscience* 1998; 16(3):436-446.

Novak M, Kabat J, Wischik CM. *Molecular characterization of the minimal protease resistant tau unit of the Alzheimer's disease paired helical filament*. *EMBO Journal* 1993; 12:365–370.

Park SY, Ferreira A. *The Generation of a 17 kDa Neurotoxic Fragment: An Alternative Mechanism by which Tau Mediates β -Amyloid-Induced Neurodegeneration*. *The Journal of Neuroscience* 2005; 25(22):5365–5375.

Platanias LC. *Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling*. *Nature Reviews Immunology* 2005; 5(5):375-86.

Quintanilla RA, Orellana DI, González-Billault C, Maccioni RB. *Interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway*. *Experimental Cell Research* 2004; 295(1):245-57.

Saito K, Elce JS, Hamos JE, Nixon RA. *Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: a potential molecular basis for neuronal degeneration*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993; 90:2628–2632.

Santacruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, Guimaraes A, DeTure M, Ramsden M, McGowan E, Forster C, Yue M, Orne J, Janus C, Mariash A, Kuskowski M, Hyman B, Hutton M, Ashe KH. *Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function*. *Science* 2005; 309:476–481.

Sardi F, Fassina L, Venturini L, Inguscio M, Guerriero F, Rolfo E, Ricevuti G. *Alzheimer's disease, autoimmunity and inflammation. The good, the bad and the ugly*. *Autoimmunity Reviews* 2011; 11(2):149-53.

Sasaki T, Kikuchi T, Yumoto N, Yoshimura N, Murachi T. *Comparative specificity and kinetic studies on porcine calpain I and calpain II with naturally occurring peptides and synthetic fluorogenic substrates*. *Journal of Biological Chemistry* 1984; 259:12489–12494.

Sato S, Tatebayashi Y, Akagi T, Chui DH, Murayama M, Miyasaka T, Planel E, Tanemura K, Sun X, Hashikawa T, Yoshioka K, Ishiguro K, Takashima A. *Tau Phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase-3 β and JNK3 Induces Oligomeric Tau Fibrils in COS-7 Cells*. *The Journal of Biological Chemistry* 2002; 277:42060-42065.

Sergeant N, Delacourte A, Buée L. *Tau protein as a differential biomarker of tauopathies*. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005; 1739(2):179–197.

Shahani N, Brandt R. *Functions and malfunctions of the tau proteins*. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2002; 59(10):1668-80.

Sjöberg MK, Shestakova E, Mansuroglu Z, Maccioni RB, Bonnefoy E. *Tau protein binds to pericentromeric DNA: a putative role for nuclear tau in nucleolar organization*. *Journal of Cell Science* 2006; 119:2025-34.

Sultan A, Nesslany F, Violet M, Bégard S, Loyens A, Talahari S, Mansuroglu Z, Marzin D, Sergeant N, Humez S, Colin M, Bonnefoy E, Buée L, Galas MC. *Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection*. *Journal of Biological Chemistry* 2011; 286(6):4566-75.

Swardfager W, Lanctôt K, Rothenburg L, Wong A, Cappell J, Herrmann N. *A Meta-Analysis of Cytokines in Alzheimer's Disease*. *Biology Psychiatry* 2010; 68:930–941.

Sydow A, Van der Jeugd A, Zheng F, Ahmed T, Balschun D, Petrova O, Drexler D, Zhou L, Rune G, Mandelkow E, D'Hooge R, Alzheimer C, Mandelkow EM. *Reversibility of Tau-related cognitive defects in a regulatable FTD mouse model*. *Journal of Molecular Neuroscience* 2011; 45: 432–437.

Uberti D, Rizzini C, Spano PF, Memo M. *Characterization of tau proteins in human neuroblastoma SH-SY5Y cell line*. *Neuroscience Letters* 1997; 235(3):149–153.

Wang J, Kuropatwinski K, Hauser J, Rossi MR, Zhou Y, Conway A, Kan JL, Gibson NW, Willson JK, Cowell JK, Brattain MG. *Colon carcinoma cells harboring PIK3CA mutations display resistance to growth factor deprivation induced apoptosis*. *Molecular Cancer Therapeutics* 2007; 6(3):1143-50.

Wang X, Zhu M, Hjorth E, Cortés-Toro V, Eyjolfsdottir H, Graff C, Nennesmo I, Palmblad J, Eriksdotter M, Sambamurti K, Fitzgerald JM, Serhan CN, Granholm AC, Schultzberg M.

Resolution of inflammation is altered in Alzheimer's disease. Alzheimer's & Dementia 2015; 11:40–50.

Wang Y, Mandelkow E. *Degradation of tau protein by autophagy and proteasomal pathways.* Biochemical Society Transactions 2012; 40(4):644-52.

Weaver CL, Espinoza M, Kress Y, Davies P. *Conformational change as one of the earliest alterations of tau in Alzheimer's disease.* Neurobiology of Aging 2000; 21:719–727.

Wischik CM, Novak M, Edwards PC, Klug A, Tichelaar W, Crowther RA. *Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1998; 85:4884–4888.

Yang J, Zhang W, Evans PM, Chen X, He X, Liu C. *Adenomatous polyposis coli (APC) differentially regulates beta-catenin phosphorylation and ubiquitination in colon cancer cells.* The Journal of Biological Chemistry 2006; 281(26):17751-7.

Zhang Z, Song M, Liu X, Kang SS, Kwon IS, Duong DM, Seyfried NT, Hu WT, Liu Z, Wang JZ, Cheng L, Sun YE, Yu SP, Levey AI, Ye K. *Cleavage of tau by asparagine endopeptidase mediates the neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease.* Nature Medicine 2014; 20(11):1254-1262.